

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

TEMEL BİYOTEKNOLOJİ
DOKTORA TEZİ

Mikroyerçekim Biyoreaktöründe Adipoz Kök Hücrelerden

Kardiyak Hücrelerin Üretilmesi

Arın Doğan

Danışman Öğretim Üyesi

Prof. Dr.Yaşar Murat Elçin

Aralık

2017

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının; akademik kural ve etik ilkelere bağılı kalınarak hazırlandığını, çalışmada yararlanılan ve bu çalışma ürünü olmayan bütün bilgiler için kaynak yayınlara atıfta bulunulmuş olduğunu beyan ederim.

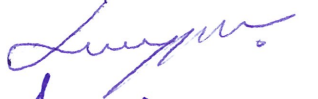
Arın Doğan



ONAY

Prof. Dr. Yaşar Murat Elçin danışmanlığında Arın Doğan tarafından hazırlanan bu çalışma 27.12.2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Duygu Uçkan Çetinkaya

İmza: 

Üye: Prof. Dr. Yaşar Murat Elçin

İmza: 

Üye: Yrd. Doç. Dr. Klara Dalva

İmza: 

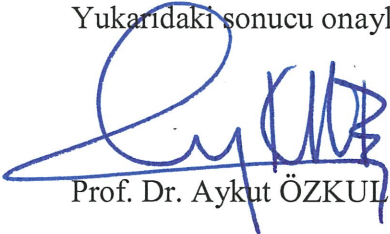
Üye: Yrd. Doç. Dr. Serap Durkut

İmza: 

Üye: Yrd. Doç. Dr. Doruk Engin

İmza: 

Yukarıdaki sonucu onaylarım.


Prof. Dr. Aykut ÖZKUL

Enstitü Müdürü

ÖZET

Doktora Tezi

Mikroyerçekim Biyoreaktöründe Adipoz Kök Hücrelerden

Kardiyak Hücrelerin Üretilmesi

Arın Doğan

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

Danışman: Prof. Dr. Yaşar Murat Elçin

Bu çalışmada insan kaynaklı adipoz kök hücrelerin yüksek oranda kardiyak karakterli hücelere farklılaştırılması için yeni bir yöntem geliştirilmesi amaçlanmıştır. İnsan adipoz kök hücreleri üç boyutlu mikroyerçekimi biyoreaktöründe kültür edilerek çoğaltılmıştır. 5-Azasitidin indüksiyonu sonrasında kardiyak büyüme besi ortamında kültür yapıldı. Hücrelerin farklılaşma veriminin artırılması amacıyla, doğal elastinden oluşan elastik hidrojel mikroküreler sentezlenmiştir ve karakterizasyon sonrasında mikroyerçekimi kültürü ortamında hücrelerle beraber kültürü yapılmıştır. Kültür süreci sonunda elde edilen hücre gruplarına uygulanan kantitatif eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu ile kalp gelişimine ve erişkin kalp hücrelerine özgü genlerin ifade düzeyleri incelenmiştir. Gen bazında gruplar arasında bağıl gen ifadesi düzeyleri açısından değişim görülmüştür, buna karşın gen ifadesi düzeyleri bir arada değerlendirildiğinde deney koşulları arasında istatistiksel açıdan anlamlı fark bulunmamaktadır.

2017, 150 sayfa

Anahtar kelimeler: Adipoz kök hücreler; mikroyerçekimi biyoreaktörü; kardiyak farklılaşma; elastin; elastin-temelli mikroküre; hücre üretimi.

ABSTRACT

PhD Thesis

Production of Cardiac Cells from Adipose Stem Cells in Microgravity Bioreactor

Arın Doğan

Ankara University Biotechnology Institute

Prof. Yaşar Murat Elçin

This study aims to develop a new method for differentiating human adipose stem cells into cells with cardiac characteristics in high volumes. Human adipose stem cells were cultured and proliferated in three dimensional microgravity bioreactor. Cardiac differentiation was induced with 5-Azacytidine and cells were further cultured in a cardiac growth medium. To induce a higher degree of cardiac differentiation, groups of cells were cultured in the presence of elastic hydrogel microspheres derived from natural alpha elastin. The resulting cell populations were investigated by using quantitative real-time polymerase chain reaction technique for the analysis of expression levels of genes related to cardiac differentiation and adult cardiomyocytes. Our results showed no significant overall difference between groups, however there were changes in the gene expression levels of some cardiac genes.

2017, 150 pages

Keywords: Adipose stem cell; microgravity bioreactor; cardiac differentiation; elastin; elastin-based microspheres; cell production.

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasının yapılmasında, öncelikle danışmanım sayın Prof. Dr. Y. Murat Elçin'e çalışmanın gerçekleştirilmesi için sağladığı imkânlardan, doku mühendisliği ve biyomalzeme alanına adım atmamı sağlayan, uzun yıllar sağladığı bilimsel ve insani desteğinden ötürü teşekkürü borç bilirim.

Sayın Prof. Dr. A. Eser Elçin'e, gerek doktora çalışmamda ve gerekse diğer bilimsel çalışmalarımızda sarf ettiği özverili emekten dolayı ve öğrenme sürecime yaptığı katkılardan dolayı şükranlarımı sunarım.

Laboratuvar arkadaşlarıma, doktora sürecim sırasında örnek teşkil etmelerinden ötürü teşekkür ederim. Yük. Kim. Mahmut Parmaksız'a candan dostluğu ve özverili bir çalışma arkadaşı olduğu için, Yük. Kim. Murat Taner Vurat'a kardeşliği ve laboratuvarda her an yardımımıza koştuğu için, Mol. Bio. Betül Ayanoğlu'na emeklerinden ötürü teşekkür ederim. Öz ağabeyim Bora Bozatlı'ya metindeki yazım hatalarının düzeltilmesindeki yardımından dolayı teşekkürlerimi sunarım. Sevgili yol arkadaşım Mine Hasırcı'ya, tez yazım sürecindeki sabrı ve desteği için teşekkür ederim.

Uzun ve zorlu eğitim sürecimde sağladıkları büyük maddi ve manevi destekleri için annem Uz. Dr. F. Nermin Tuncel ve babam Prof. Dr. Yıldırım Beyatlı Doğan'a minnetimi ve sonsuz sevgimi sunuyorum. Fedakârlığınızın karşılığını ancak kendi çocuklarıma ödeyebilirim.

Bu tez çalışmasının gen ifadesi analizi ile ilgili deneyleri kısmen **Ankara Üniversitesi BAP 17L0430005** desteği ile gerçekleştirilmiştir.

İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN	i
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xiii
SİMGELER DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	2
2.1. KÖK HÜCRELER.....	2
2.2. DOKU MÜHENDİSLİĞİ YAKLAŞIMI	4
2.2.1. KÖK HÜCRE TEMELLİ YAKLAŞIMLAR	6
2.2.1.1. İlaç Geliştirme Süreçlerinde Kök Hücre Kullanımı.....	6
2.2.1.2. Adipoz Kök Hücreler ve Kullanım Alanları	8
2.2.1.3. Sınıflandırma ve Kullanım Alanları.....	14
2.2.1.4. AKH'lerin Kardiyomiyosite Farklılaşması.....	14
2.2.2. DOĞAL ELASTİNİN ÖZELLİKLERİ, İŞLEVLERİ VE ELASTİN TÜREVLERİNİN DOKU MÜHENDİSLİĞİ ALANINDA KULLANIMI	23
2.3. MEKANİK ETKİLERİN KÖK HÜCRE DAVRANIŞI ÜZERİNE ETKİLERİ. 25	
2.4. KALP VE DAMAR HASTALIKLARININ TEDAVİSİNDE DOKU MÜHENDİSLİĞİ YAKLAŞIMLARI	25

2.4.1. KALBİN EMBRİYOLOJİSİ, HİSTOLOJİSİ VE FONKSİYONEL ANATOMİSİ	28
2.4.2. KALP HASTALIKLARI, KONVANSİYONEL TEDAVİ SEÇENEKLERİ VE YETERSİZLİKLER	34
2.4.3. ÇALIŞMADA İNCELENEN GENLERİN İŞLEVİ VE ÖNEMİ	38
<u>3. GEREKÇE VE AMAÇ.....</u>	42
<u>4. MATERYAL VE YÖNTEM.....</u>	44
4.1. MATERYAL	44
4.2. YÖNTEM.....	44
4.3. ELASTİN MİKROKÜRELERİN SENTEZİ	45
4.3.1. MİKROKÜRE SENTEZİ PROTOKOLÜNÜN GELİŞTİRİLMESİ	45
4.3.2. ETKİNLİĞİ İSPATLANAN AŞAMALAR IŞIĞINDA GELİŞTİRİLEN YÖNTEM	46
4.4. ELASTİN MİKROKÜRELERİN KARAKTERİZASYONU	48
4.4.1. FAZ-KONTRAST GÖRÜNTÜLEME VE BOYUT DAĞILIMI	48
4.4.1.1. Atomik Kuvvet Mikroskop Görüntüleme	49
4.4.1.2. Taramalı Elektron Mikroskobu Görüntüleme.....	49
4.4.1.3. Yüzey Yükü Analizi	49
4.4.1.4. Örneklerin ATR FTIR Spektrum Ölçümü	49
4.4.1.5. Eş-Zamanlı Hücre Proliferasyon Analizi	50
4.5. İKİ BOYUTLU HÜCRE KÜLTÜRÜ	52
4.6. ÜÇ BOYUTLU MİKROYERÇEKİMİ BİYOREAKTÖRÜ	52
4.7. ADİPOZ KÖK HÜCRE KÜLTÜRÜ	53
4.7.1. AKIM SİTOMETRİ ANALİZLERİ.....	54

4.7.1.1. Koloni Oluşturan Fibroblastik Birim Analizi (CFU-f)	55
4.7.1.2. Üç Nesle Farklılaştırma Analizi (Tri-lineage)	55
4.7.1.3. Farklılaşma İndüksiyonu ve Kardiyak Vasat	56
4.8. KANTİTATİF EŞ ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU	57
4.8.1. MRNA İZOLASYONU	57
4.8.2. CDNA SENTEZİ	59
4.8.3. KANTİTATİF EŞ ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU	62
4.8.4. İNCELENEN KARDİYAK GENLER	63
4.8.5. GEN İFADESİ ANALİZLERİ	65
4.8.6. İMMÜNOHİSTOKİMYASAL ANALİZLER	65
4.8.6.1. Örneklerin Boyanması	66
<u>5. ARAŞTIRMA BULGULARI</u>	<u>67</u>
5.1. ELASTİN MİKROKÜRELERİN KARAKTERİZASYON SONUÇLARI	67
5.1.1. BOYUT DAĞILIMI	67
5.1.2. TARAYICI ELEKTRON MİKROSKOP GÖRÜNTÜLEME	70
5.1.3. ATOMİK KUVVET MİKROSKOP ANALİZİ	70
5.1.4. ZETA POTANSİYEL ANALİZİ	72
5.1.5. FTIR SPEKTRUM ANALİZİ	73
5.1.6. EŞ-ZAMANLI HÜCRE PROLİFERASYON ANALİZİ	74
5.2. ADİPOZ KÖK HÜCRE KARAKTERİZASYONU	76
5.2.1. KOLONİ OLUŞTURAN FİBROBLASTİK BİRİM ANALİZİ (COLONY- FORMİNG UNİT-FİBROBLAST ASSAY) CFU-F	76
5.2.2. ÜÇ NESLE FARKLILAŞMA ANALİZİ (TRİLİNEAGE)	77
5.2.3. HÜCRE YÜZEY BELİRTEÇLERİ	77

5.3. FARKLILAŞMA SONRASI ANALİZLER	78
5.3.1. GEN İFADESİ ANALİZİ.....	78
5.3.1.1. İki Boyutlu Kültür Sonucunda Gen İfadesi Değişimleri.....	80
5.3.1.2. Üç Boyutlu Kültür Sonucunda Gen İfadesi Değişimleri	83
5.3.2. İMMÜNOHİSTOKİMYASAL ANALİZ.....	86
5.3.2.1. Hematoksilin-Eozin Boyaması	86
5.3.2.2. Aktin Boyaması	87
5.3.2.3. CD34 Boyaması.....	88
5.3.2.4. C-kit (CD117) Boyaması	89
5.3.2.5. GATA4 Boyaması	90
5.3.2.6. NKX2-5 Boyaması.....	91
5.3.2.7. Troponin I Boyaması	92
5.3.2.8. Troponin T Boyaması	93
<u>6. TARTIŞMA VE SONUC.....</u>	<u>95</u>
<u>7. KAYNAKLAR</u>	<u>110</u>
<u>8. EKLER.....</u>	<u>127</u>
8.1. KULLANILAN MAKİNE-TEÇHİZAT LİSTESİ.....	127
8.2. KULLANILAN HÜCRELERİN ÖZELLİKLERİ	128
<u>9. ÖZGEÇMİŞ.....</u>	<u>129</u>
<u>10. TEZDEN ÇIKAN YAYINLAR.....</u>	<u>139</u>

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Farklılaşma/Soy potansiyeli açısından kök hücre tiplerinin hiyerarşisi (3,4).	3
Şekil 4.1. Elastin mikrokürelerin sentez aşamaları.....	44
Şekil 4.2. İki ve üç boyutlu hücre kültürü gruplar ve analiz basamakları.	45
Şekil 4.3. Genipin molekülünün yapısı.	48
Şekil 4.4. Eş-zamanlı hücre analizi sistemi. (A) Bilgisayar ve EZHA analizörü, (B) EZHA SP istasyonu, (C) 96 kuyucuklu e-plaka. (D) EZHA istasyonu.	51
Şekil 4.5. Mikroyerçekimi biyoreaktöründe adipoz kök hücrelerden oluşan hücre kümelerinin şematik gösterimi.	52
Şekil 4.6. Synthecon mikroyerçekimi biyoreaktörü sistemi.....	57
Şekil 4.7. İmmünohistokimyasal analiz ve antikorların kullanımı.....	65
Şekil 5.1. Elastin-temelli mikrokürelerin sentezlenmesinde optimizasyon ara basamaklarından bir inversiyon mikroskop görüntüsü.....	67
Şekil 5.2. Elastin-temelli mikrokürelerin sentezlenmesinde optimal sonuç gösteren grupların sonuçlarına ait bir inversiyon mikroskobu görüntüsü. (ölçek: 40µm).....	68
Şekil 5.3. Elastin-temelli mikrokürelerin sentezlenmesinde optimizasyon ara basamaklarından bir inversiyon mikroskop görüntüsü.....	69
Şekil 5.4. Sentez basamakları sırasında ilk yıkama sonrası elde edilen elastin mikroküre peletin suda dağıtılmadan önceki görüntüsü.	70
Şekil 5.5. Atomik kuvvet mikroskop analizi ölçümleri.....	71
Şekil 5.6. Su içerisinde yeniden süspansiyon haline getirilen peletin çoklu ölçümde elastik modül dağılımını gösteren bir histogram.	71
Şekil 5.7. Kompozit topografik görüntüleme sonucu.....	71

Şekil 5.8. Zeta potansiyel ölçümü. Elastin mikrokürelerin zeta potansiyeli -39,9 mV olarak ölçüldü.	72
Şekil 5.9. Fourier Transform Infrared Spektrum analizi sonucu elde edilen spektrum görüntüleri.	73
Şekil 5.10. Artan elastin mikroküre konsantrasyonunun hücre viabilitesine etkisi.....	74
Şekil 5.11. Üç boyutlu mikroyerçekimi biyoreaktöründe hücre öbeklerinin ışık mikroskop görüntüsü. (Ölçek 50µm).....	75
Şekil 5.12. Üç boyutlu mikroyerçekimi biyoreaktöründe oluşan hücre öbekleri ve elastin mikrokürelerin görünümü. (Ölçek 50µm).	76
Şekil 5.13. CFU-f analizi görüntülemesi.	76
Şekil 5.14. Üç nesle farklılaşma analizi. a) Oil Red O, b)Alcian Blue ve c) Von Kossa....	77
Şekil 5.15. Hematopoietik hatta ilişkin yüzey belirteçlerini ifadelemediği belirlenmiştir. CD29, CD90, CD105 yüzey belirteçleri ifadenmektedir.....	78
Şekil 5.16. İki boyutlu hücre kültürü deneylerinde uygulanan gruplar.	79
Şekil 5.17. Üç boyutlu hücre kültürü deneylerinde uygulanan gruplar.	80
Şekil 5.18. İki boyutlu hücre kültürü yapılan 3 grupta NKX2-5 gen ifadesinin değişimi. P=0,024.....	80
Şekil 5.19. İki boyutlu hücre kültürü yapılan 3 grupta MYL7 gen ifadesinin değişimi. *P=0,037, **P=0,037.	81
Şekil 5.20. İki boyutlu hücre kültürü yapılan 3 grupta Brachyury (T) gen ifadesinin değişimi. *P=0,034.	82
Şekil 5.21. İki boyutlu hücre kültürü yapılan 3 grupta TBX5 gen ifadesinin değişimi. *P=0,034, **P=0,037.	83

Şekil 5.22. Üç boyutlu hücre kültürü yapılan 3 grupta CDH2 gen ifadesinin değişimi. *P=0,037, **P=0,05.	84
Şekil 5.23. Üç boyutlu hücre kültürü yapılan 3 grupta GJA1 gen ifadesinin değişimi.	84
Şekil 5.24. Üç boyutlu kültürde CNN1 gen ifadesi değişimi. P=0,37.....	85
Şekil 5.25. Hematoksilin-Eozin boyaması sonuçları. Ölçek çubuğu solda 200µm, sağda 100 µm.....	87
Şekil 5.26. Aktin boyaması sonuçları. Ölçek çubuğu solda 200µm, sağda 100 µm.	88
Şekil 5.27. CD34 boyaması sonuçları. Ölçek çubuğu solda 200µm, sağda 100 µm.....	89
Şekil 5.28. C-kit boyaması sonuçları. Ölçek çubuğu solda 200µm, sağda 100 µm.	90
Şekil 5.29. GATA4 boyaması sonuçları. Ölçek çubuğu solda 200µm, sağda 100 µm.	91
Şekil 5.30. NKX2-5 boyaması sonuçları. Ölçek çubuğu solda 200µm, sağda 100 µm.	92
Şekil 5.31. Troponin-I boyaması sonuçları. Ölçek çubuğu solda 200µm, sağda 100 µm...	93
Şekil 5.32. Troponin-T boyaması sonuçları. Ölçek çubuğu solda 200µm, sağda 100 µm..	94
Şekil 6.1. Pluripotent ve progenitör hücrelerde kardiyak farklılaşma ve gelişim sürecinde aktivite gösteren proteinler ve belirteçler (139).	96

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Farklı kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin taşıdıkları yüzey belirteçleri.	10
Çizelge 2.2. Adipoz kök hücrelerin yüzey belirteçleri.	14
Çizelge 2.3. Adipoz kök hücrelerin kardiyomiyosite farklılaşmasında uygulanan yöntemler.	16
Çizelge 2.4 Farklılaşma çalışmalarında kullanılan eş-zamanlı PZR belirteçleri.	22
Çizelge 2.5. Kalbin gelişim aşamalarında görev alan önemli düzenleyiciler.	34
Çizelge 4.1. mRNA izolasyonu kitinin bileşenleri.	57
Çizelge 4.2. cDNA sentezi için kullanılan kitin bileşenleri.	59
Çizelge 4.3. cDNA sentezinde kullanılan primer ve total RNA karışımının bileşimi.	61
Çizelge 4.4. Revers transkripsiyon reaksiyonu için kullanılan bileşenler.	61
Çizelge 4.5. PZR Reaksiyonu için kullanılan bileşenler.	62
Çizelge 4.6. Kantitatif eş zamanlı-PZR döngü koşulları.	63
Çizelge 4.7 Tez çalışmasında incelenen eş-zamanlı PZR belirteçleri.	64
Çizelge 5.1. Dalga numaraları ve temsil ettikleri fonksiyonel gruplar.	74

SİMGELER DİZİNİ

5-AZA	5-Azasitidin
AFM	Atomik Kuvvet Mikroskopu
AKH	Adipoz Kök Hücre
CD	Farklılaşma Grubu Antijenleri
ddH ₂ O	Çift distile su
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetil sülfoksit
EDC/NHS	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimid/ N-hidroksisüksinimid
El	Elastin
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorting
FTIR	Fourier Transform Infrared
GATA4	GATA Binding Protein 4
HDM	Hücre Dışı Matris
MLC	Myosin Light Chain
NKX2-5	NK2 Homeobox-5
PBS	Tuz Fosfat Tamponu
SVF	Stromal Vasküler Fraksiyon
TBX5	T-Box 5
uPKH	Uyarılmış Pluripotent Kök Hücre

1. GİRİŞ

Kalp ve damar hastalıkları gelişmiş dünya ülkelerinde ölüm sebeplerinin başında gelmektedir. Mevcut tedavi seçenekleri, geçmiş yıllara kıyasla önemli düzeyde fayda sağlamakta olsa da, her yıl on milyonlarca insan kalp ve damar hastalıkları sebebi ile hayatını kaybetmekte, sürekli artan sağlık harcamaları ve iş gücü kaybı, yeni tedavi seçeneklerinin geliştirilmesini gerekli kılmaktadır.

Yeni ilaç geliştirme süreçleri milyar dolar düzeyinde harcamalar ile yürütülmektedir. Ortalama olarak on yıldan uzun sürede piyasaya çıkan yeni ilaç molekülleri, beklenmedik yan etkiler sebebi ile piyasadan çekilebilir, bu durum büyük mâli zararlara ve kaynak israfına sebep olarak, tedavi maliyetlerinin dolaylı artışına sebep olmakta, yan etki profili yüksek olan ilaçlar ise önemli sağlık sorunlarına ve hatta can kayıplarına yol açabilmektedir. İlaç geliştirme aşamalarında model organizmaların yanı sıra, insan hücrelerini kullanarak yapılan ilaç tarama çalışmaları, farmakolojik yanıtın incelenmesini sağlayan güncel yöntemler arasında önemli bir yer tutar.

Kardiyovasküler hastalıkların konvansiyonel yöntemler ile tedavisinin yeterli iyileşme sağlamadığı veya hastalıkların ilerleyişini durduramadığı durumlar için onarımsal tedavi yöntemleri geliştirilmektedir. Bu yaklaşımlar arasında hücre temelli yaklaşımlar ve biyomalzeme temelli ya da eşikli aday yöntemler önemli bir yer tutar. Onarımsal tedavilerin hücresel bileşenlerinin sağlanması, başlı başına önemli atılımlar gerektiren konulardan birisidir. Kök ya da progenitör hücreler kullanılarak miyokard ya da vasküler yapılar için gereken olgun hücre tiplerinin yüksek miktarlarda ve standartlaşmış biçimde elde edilmesi için halen çok sayıda temel bilimsel çalışma yürütülmektedir.

Bu tez çalışması, yukarıda bahsedilen ilaç geliştirme çalışmaları ve hücresel tedaviler için yüksek sayıda, kararlı karakterde kalp hücresi elde edilmesi amacı ile adipoz kök hücrelerin yüksek verimde kardiyomiyosit farklılaşması için yeni bir biyomalzeme taşıma sistemi ve büyüme faktörü karışımının etkinliğini, literatürde bu amaçla daha önce uygulanmamış mikroyerçekimi biyoreaktörü kültürü koşullarında sınamayı amaçlamıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. KÖK HÜCRELER

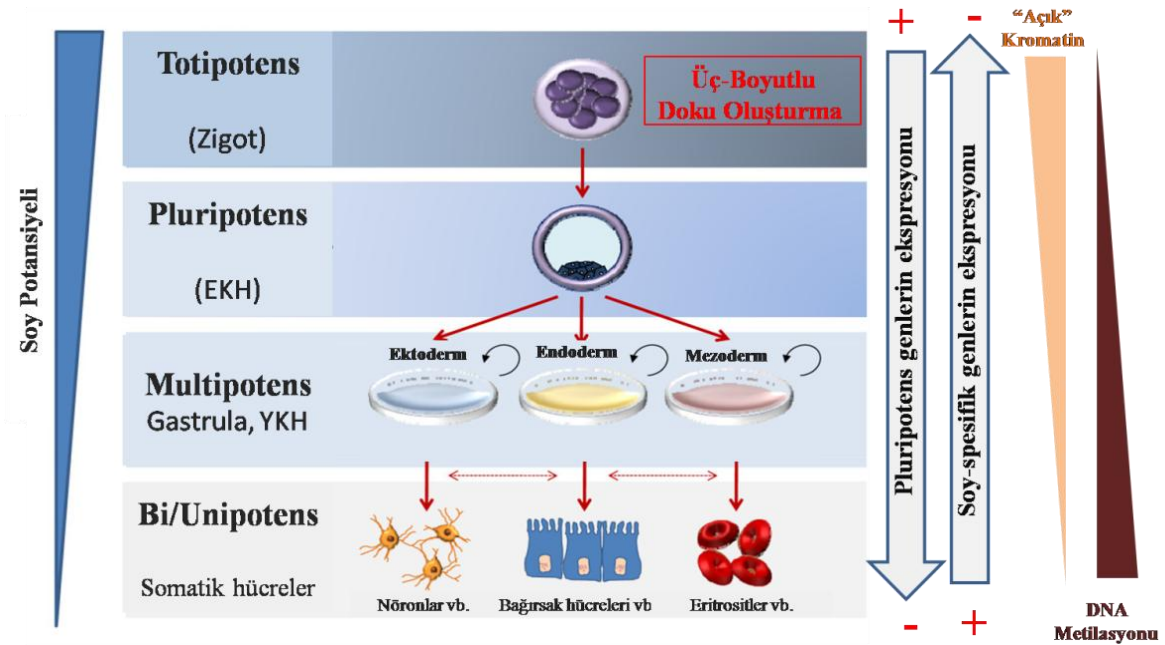
Kök hücreler, rejeneratif tıp kavramının önemli yapıtaşlarıdır. Geliştirilen teknolojiler ışığında yeni hücre kaynaklarının, saflaştırma yöntemlerinin bulunması ile beraber hücrelerin çoğaltılması ve uygulanma yeni yaklaşımlar ortaya çıkmaktadır. Dünya genelinde halen onlarca farklı hastalık için erken faz klinik çalışmaları başlatılmaktadır. Farklılaşmamış nitelikte olan kök hücreler, asimetric bölünme özelliğinden ötürü kendine eşdeğer özellikte hücreler üretebilme kapasitesine sahiptir. Ek olarak, bölünme sonucu oluşan transit (geçiş) hücreler ile ileri düzeyde farklılaşmış ve dokuya özgü erişkin karakterdeki hücrelere kaynak verirler. Kök hücreler, bu özellikleri ile organizmanın yaşamı boyunca hasar gören dokuları, ölen hücreleri telafi eder. Sonuç olarak kök hücreler kendi kopyalarını üretebilen ve çeşitli hücre tiplerine farklılaşabilen özel bir hücre grubudur. Sürekli olarak hücre yitimine maruz kalan deri ve bağırsak dokularında kök hücre aktivitesi ömür boyunca devam etmektedir. Buna karşın kalp, beyin ve pankreas dokularında var olan kök hücreler ihmal edilebilir düzeyde yenileyici işlev gösterir ve yalnızca özel koşullarda onarıma katkıda bulunurlar.

Potens kavramı, kök hücrelerin farklılaşma gücünü belirten ve Türkçede köklük olarak anılan bir özelliktir. Potens derecesine göre multipotent, pluripotent, totipotent ve bi/unipotent olarak dört sınıfta incelenir. Totipotent kök hücreler, en yüksek farklılaşma kapasitesine sahiptir. Zigot hücresi, döllenmeyi takip eden dört gün süresince totipotent özellik gösterir. Totipotent hücreler organizmadaki bütün doku tiplerine farklılaşma ve bütün bir organizma oluşturma özelliğine sahiptir. Bölünerek sayıca artan hücreler, dördüncü günden itibaren artık pluripotent karakterdedir. Pluripotent hücreler bir organizmaya köken verme becerisinden yoksundur, buna karşın bütün doku tiplerine farklılaşabilirler. Morula evresindeki blastokistin iç hücre kitlesini oluşturan hücreler pluripotent niteliktedir. Gelişim süresince bölünerek sayıca artan hücreler, kısmen farklılaşarak potens kaybederler ve multipotent nitelik gösterirler. Multipotent kök hücre grubunun önemli üyelerinden birisi mezenkimal kök hücrelerdir. Mezenkimal kök hücreler, yağ dokusu, kalp ve kemik iliği dâhil, neredeyse vücuttaki tüm organlara farklılaşma özelliği gösterebilir. Embriyonun olgunlaşma sürecinde farklılaşma ve hücre

bölünmesinin ilerlemesi ile kök hücrelerin potensi azalır. Unipotent kök hücre olarak adlandırılan bu hücre tipi, asimetrik hücre bölünmesi sonucunda tek bir hücre tipine kaynak verir. Farklılaşma süreci ilerledikçe pluripotense ilişkin gen ifadesi azalır, öte yandan doku karakterini yansıtan gen ifadesinde artış görülür.

Mezenkimal kök hücreler diğer adı ile mezenkimal stromal hücreler in karakteristik özellikleri arasında plastik yüzeye tutunma, kendi hücre popülasyonunu yenileyebilme özelliği bulunur. Mezenkimal kök hücreler adipoz doku, kemik ve kıkırdak dokuya dönüşme potansiyeline sahiptir. 1970’li yıllarda ilk olarak tanımlanan bu kök hücre grubu, literatürdeki çalışmalarda çoğunlukla kemik iliğinden izole edilse de, periferik kan, fetal karaciğer, kordon kanı, iskelet kası ve adipoz dokudan mezenkimal kök hücre izolasyonu gerçekleştirilmiştir (1,2).

Kök hücreler elde edildikleri kaynaklara ve farklılaşma potansiyellerine göre; erişkin/mezenkimal kök hücreler, embriyonik kök hücreler ve uyarılmış pluripotent kök hücreler olarak sınıflandırılmaktadır. Farklılaşma sürecinde ilerledikçe pluripotense ilişkin gen ifadesi azalır, buna karşın dokuya özgü protein ekspresyonunda artış görülür (bkz. Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Farklılaşma/Soy potansiyeli açısından kök hücre tiplerinin hiyerarşisi (3,4).

Embriyonik kök hücreler vücuttaki tüm hücre tiplerine dönüşme kapasitesine sahip pluripotent kök hücrelerdir (5,6). Blastokist iç kitlesinden elde edilen embriyonik kök hücreler (7), kültür koşullarında belirli bir yoğunluğa ulaşmalarını takiben farklılaşarak kalp kası benzeri özellikler gösterebilir. Ancak oluşan kolonilerin tamamen tek bir hücre tipinden oluşmadığı, sinir, kemik ve kıkırdak hücresi benzeri hücreler de içerdiği gösterilmiştir. Bu sebeple tutarlı bir kardiyak farklılaşmanın gerçekleşmesi ve olgun karakterli kardiyomiyojenik farklılaşma sağlanması için biyokimyasal uyarım gereklidir.

Uyarılmış pluripotent kök hücreler, normal koşullarda doğada bulunmayan bir hücre tipidir. Bu hücreler, ileri derecede farklılaşmış somatik hücrelerin, embriyonik transkripsiyon faktörlerine ait gen dizileri kullanılarak “geriye programlanması” sonucu elde edilir. Bu hücreler pluripotens özelliği gösterirler ve embriyonik kök hücrelerden farklı özellikleri vardır. Yamanaka ve arkadaşları yaptıkları araştırmada c-Myc, Klf4, Oct3/4 ve Sox2 genlerini viral vektörler aracılığı ile dermal fibroblast hücrelerine aktararak pluripotens kazandırmıştır (8). Uyarılmış pluripotent hücreler, ilaç taraması, toksisite çalışmaları ve hastalık/farmakodinami modelleme araştırmalarında kullanılmaktadır. İnsan hücreleri ile uygulama yapılmasını sağladığından hayvan modellerine kıyasla önemli bir avantaj sağlamaktadır. Viral vektörlerin kullanımından ötürü oluşan güvenlik kaygıları çok az sayıda klinik çalışma gerçekleştirilmesine yol açmıştır.

2.2. DOKU MÜHENDİSLİĞİ YAKLAŞIMI

Doku mühendisliği, biyomalzeme alanından köken alan bir yaklaşım olup, amacı, iskele yapıları, hücre ve biyoaktif moleküllerin bir araya getirilerek yapay olarak fonksiyonel doku ve organlar geliştirilmesidir. Bu yolla, nihai olarak hastalıklı dokuların iyileştirilmesi, restore edilmesi, tekrar işlev göstermesi amaçlanarak iş gücü kaybının, kalıcı sakatlıkların ve organ nakli ihtiyacının önüne geçilmesi amaçlanmaktadır.

Doku mühendisliği alanı, onarımsal tıp yaklaşımlarının bir koludur, iyileşmenin sağlanması için vücudun kendi sistemlerini aktive ederek yeni hücre bölünmesi ve doku sentezlenmesini sağlamaktadır. Bu amaçla doku tipine ve beklenen işleve göre tamamen sentetik biyoyumlu malzemeler kullanılabileceği gibi, biyolojik kökenli malzemeler de kullanılabilir. Farklı doku tiplerinden hücrelerin, zenojenik, homolog ya da otolog kaynaklı yapılar içinde çoğalarak, normal fizyolojik aktivite göstermesi, hücre dışı bileşenleri ve

büyüme faktörlerini sentezleyerek ortama salmaları ve hücrelerin bunun yanında dokuya özgü metabolik işlevleri gerçekleştirmeleri için uyumlu niş ve yüzeyler oluşturulması amaçlanmaktadır. Bu amaçla dokuların normal gelişim süreçleri içinde morfogenez mekanizmalarının bilinmesi gereklidir. Kullanılan diğer önemli nokta ise normal yara iyileşme mekanizmalarının dokuya özgü nitelikleridir. Yara iyileşme süreçlerinin doku mühendisliği için kritik önemi olduğundan, iyileşmenin kontrol edilebilmesi amacı ile anjiogenez olayının kontrol edilmesi bir diğer önemli araştırma alanıdır (9).

Doku mühendisliğinin bazı yaklaşımları malzemelerin rehber ya da kalıp olarak kullanılması ile konak dokuların bu yapı içine doğru gelişmesinin tetiklenmesini amaçlar. Bu biçimde organ içerisinde cerrahi müdahale ya da hastalık sonucunda oluşan estetik ve işlevsel açıdan sorun teşkil eden boşlukların doldurulması sağlanır. Diğer bir yaklaşımda mühendislik teknikleri ile oluşturulan yapı implante edilmeden önce, dokuya özgü hücrelerle ya da progenitör hücrelerle desteklenmektedir. Bu yaklaşımda amaç rasyonel tasarım yöntemleri ile canlı bir doku tasarlamaktır.

Yapay dokuların sentezlenmesinde en önemli araçlardan olan hücrelerin elde edilmesi, istenen karakteristik özellikleri göstermesi ve muhafaza etmesi her hastaya kolaylıkla uyum sağlayacak standardize tedavi yöntemlerinin geliştirilmesinde önemli bir sorun ve araştırma sorusu olmayı sürdürmektedir. Bu konuda nihai gereklilik, her an uygulama için hazır olarak üretilebilen, her insan için immünolojik olarak uygun hücrelerin doku bankalarında muhafaza edilerek üretilmesidir. Evrensel olarak uyum gösteren hücrelerin ilk aşamalarda embiyonik kök hücrelerin ya da bunlardan farklılaştırılan hücrelerin hastalara nakli denenmiştir. Alınan olumsuz sonuçlar ışığında onarımsal tedavi alanı daha güvenli alternatiflerin arayışına girmiş ve de erişkin kök hücre ve progenitörlerin otolog olarak izole edilip uygun yöntemlerle (enjeksiyon ya da doku mühendisliği araçları ile) hastalara implante edilmesi yoluna gidilmiştir.

Uyarılmış pluripotent kök hücre (uPKH) teknolojisi erişkin dokularından elde edilmiş ileri düzeyde farklılaşmış somatik hücrelerin transkripsiyonel olarak yeniden programlanma ile pluripotent hale getirilmesi esasına dayanır. İlaç geliştirme süreçlerinde dokuya özgü modellerin oluşturulmasını sağladığından çok önemli kullanıma alanları mevcut olsa da, uPKH hücreleri transkripsiyon faktörlerinin ulaştırılmasında kullanılan viral vektörlerin

lizojenik varlığı, çeşitli kromozal anomali ve instabiliteye sahip olması (10), bu hücrelerin klinik olarak kullanımını kısıtlamaktadır. 2012 yılında Tıp alanında Nobel ödülüne layık görülen Gurdon ve Yamanaka'nın çalışmaları (8), hastalıkların anlaşılması ve tedavi geliştirilmesi ile ilgili önemli bilimsel ilerlemelere sebep olmuştur. Buna karşın halen klinik uygulama aşamasında olan veya klinik deneme aşamasında bulunan uPKH çalışmalarının sayısı bir elin parmaklarını geçmezken, ikinci ya da üçüncü fazda klinik çalışma ise bulunmamaktadır. Embriyonik kök hücre ve indüklenmiş pluripotent hücrelerle güvenlik ile sorunlar aşılanaya kadar insan erişkin kök hücreleri ile otolog tedavi seçenekleri halen önem taşımaktadır. Kök hücre temelli yaklaşımların büyük çoğunluğu otolog kaynaklı progenitör ve kök hücrelerin kullanıldığı denemeleri içermektedir.

2.2.1. Kök Hücre Temelli yaklaşımlar

Kök hücre temelli yaklaşımlar, ilaç geliştirme, doğrudan enjeksiyon ve biyomalzeme destekli onarımsal yaklaşımlar gibi bir çok farklı alanı barındıran geniş bir çatı kavramdır. Bu tez çalışmasında temel amaç yüksek miktarda ve stabil karakterli hücre gruplarının eldesi olduğundan, her üç yaklaşıma da fayda sağlanması amaçlanmıştır.

2.2.1.1. İlaç Geliştirme Süreçlerinde Kök Hücre Kullanımı

Günümüzde standart yaklaşım olarak çeşitli farmakolojik ve cerrahi tedavi yöntemleri ile miyokard rejenerasyonun kısmen arttırılması ve kalp yetmezliği belirtilerinin bir ölçüde hafifletilmesi amaçlanmaktadır. Farmakolojik olarak β -blokerler, ACE inhibitörleri ve benzer ilaçların kullanımı ile hasarlı kalp üzerindeki stres azaltılarak kalp yetmezliğinin ilerlemesi yavaşlatılabilmekte, ancak kalp tamamen iyileştirilememektedir. Farmakolojik yaklaşımlar ile onarımın değil, sürecin idamesi ve organ işlevinin daha fazla bozulmadan devam ettirilmesi mümkün olmaktadır. Yani, tedaviler semptomatik nitelikte olup, bazı hastalık grupları için kullanılan ilaçlar belirtilerin %50-70'ini giderebilmektedir (11). Bu durum onarımsal tedavilerin geliştirilmesinin gerekliliğini göstermektedir. Öte yandan, konvansiyonel tedavilerin başarısının arttırılması halen önemli araştırma hedeflerinin başında gelmektedir. Hastaların büyük çoğunluğu ömür boyu ilaç kullanmak durumunda olduğundan, yan etki profili düşük olan yeni ilaç moleküllerinin geliştirilmesi, tedavi başarısının artırılması ve sağlık harcamalarının azaltılması açısından büyük önem taşır (12).

İlaç geliştirme çalışmaları, ortalama 10 yıl süren çok yüksek maliyetli süreçlerdir. Son dönemlerde insan hücre hatları kullanılarak mutajenite ve tumörojenite açısından farmakodinamik, farmakokinetik etkiler incelenmekte ve aday moleküller toksisite açısından araştırılmaktadır. İnsan denek kullanılmadan insan metabolizması ile ilgili karmaşık bulgulara ulaşılması ve çalışma maliyetinin düşük olması, insan hücre hatlarının ilaç geliştirme sürecinde kullanılmasının en önemli avantajlarındanıdır.

Kardiyomiyositlerin laboratuvar koşullarında üretilmesi ile kalp hastalıkları için yeni tedavilerin geliştirilmesi, kalp gelişiminin çalışılması, kanser gibi (13) farklı hastalıkların tedavisinde kullanılmak üzere ilaç moleküllerinin kardiyotoksitesinin incelenmesi için gereklidir. İnsan kardiyomiyosit kültürleri, insandan çok farklı metabolizmaya sahip deney hayvanlarında yapılan laboratuvar çalışmalarına kuvvetli bir alternatif olarak ortaya çıkmıştır. Kardiyomiyositler, ilaç moleküllerinin yan etkilerine, çeşitli moleküllerin ortaya çıkarabileceği toksik etkilere karşı hassastır. Buna ek olarak doğuştan gelen genetik ve epigenetik özelliklere göre farklı bireylerin çeşitli gen-temelli veya konvansiyonel ilaç moleküllerine karşı farklı metabolik tepkiler verebileceği bilinmektedir. İnsan kalbindeki belirli bir hastalığın laboratuvar koşullarında düşük maliyetle çalışılabilmesini sağlayacağından “tüpte kalp” uygulamaları, temel tıp araştırmalarında, farmakoloji ve biyoteknoloji alanlarında önem taşımaktadır. Kardiyomiyositlerin yüksek verimde ve standartlarda in-vitro üretimini, kişiye özgü tedavi seçeneklerinin oluşturulabilmesinin önünü açma potansiyeline sahiptir (14).

İlaç geliştirme sürecinde hayvan modellerinin kullanılması ile ilaç adayı moleküllerin piyasaya sürülme ve ileri geliştirme basamaklarında hayati tehlike yaratan başarısızlıklara yol açılması mümkündür. Bunun sebebi, insan ile en yaygın olarak tercih edilen model canlı fare arasında, kardiyak fizyoloji açısından uçurum niteliğindeki farklılıklardır (15). Yakın zamanlarda, kalbe yönelik toksik etkileri, ani kardiyak ölüm, kalp üzerinde aritmik ve apoptotik etkileri sebebi ile piyasadan çekilen kilo kaybı (sibutramin), ağrı kesici (propoksifen) ve anti-enflamatuvar (rofekoksib) ilaç molekülleri, ilaç geliştirme sürecinde insan kardiyomiyosit hücre hatları yerine, model organizmanın veya sıkça yapıldığı gibi insan embriyonik böbrek hücrelerinin kullanılmasının sakıncalarını göstermektedir (13). Bir ilaç molekülünün geliştirme sürecinde yapılan harcamaların ortalama olarak 1,5 milyar

ABD doları düzeyinde olması, geliştirilen bir ilacın uygun platformda değerlendirilmesinin gerekliliğine işaret etmektedir (16,17).

2.2.1.2. Adipoz Kök Hücreler ve Kullanım Alanları

Adipoz doku yapısında adipositler ve gevşek bağ doku bulundurur. Yağ dokusu, adipositlere ek olarak, stromal vasküler fraksiyonda bulunan öncül-adiposit, fibroblast, vasküler endotelyal hücreler ve çeşitli bağışıklık sistem hücrelerinden meydana gelir. Adipoz dokunun temel işlevi vücutta yağın üretilmesi ve depolanması olup, yağ deposunun metabolik enerji deposu olarak çalışmasının yanı sıra fiziksel destek ve yalıtım özelliği ile vücut sıcaklığı düzenleme özelliği de bulunmaktadır. Yüksek düzeyde hormonal aktivite gösteren bir doku olduğundan aynı zamanda başlıca endokrin organlar arasında kabul edilmektedir (18).

Adipoz kök hücreler (eski tanımlamaya göre adipoz mezenkimal kök hücreler), 1960'lı yıllarda ilk olarak Martin Rodbell ve ekibi tarafından öncül adiposit hücreler ismi ile tanımlanmıştır (19). İnsan yağ dokusunda çoğalma özelliği olan, farklı doku hatlarına farklılaşma özelliği gösteren bir hücre grubunun bulunduğu ilk olarak tanımlanmıştır. Adipoz kaynaklı kök/stromal hücreler (Adipose Stromal/Stem Cell, kısaltması), kavramsal gelişim döneminde AdMSC, AdSC olarak farklı isimlerle tanımlanmıştır. 2004 yılında Uluslararası Adipoz Tedavi Gereçleri ve Bilim Federasyonu (International Federation of Adipose Therapeutics and Science), farklı disiplinlerde çalışan araştırma grupları arasındaki iletişimin sorunsuzca sağlanabilmesi için, “adipoz kök hücre” adının kullanılması kararlaştırmıştır. AKH'ler, kahverengi ve beyaz yağ dokusunda bulunan bir mezenkimal stromal hücre tipidir. Benzer farklılaşma kapasitesine sahip diğer mezenkimal kök hücre tipleri arasında plasenta, göbek kordonu kanı, göbek kordonu perivasküler, göbek kordonu kaynaklı Wharton Jeli, dental pulpa, amniyon sıvısı, sinoviyal zar ve anne sütü kaynaklı hücreler sunulabilir. Göbek bağı, kemik iliği ve yağ doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin taşıdığı yüzey belirteçleri çizelge 2.1'de yer almaktadır.

Bu hücre grubunun izolasyonu vücutta yağın bulunduğu, anatomik olarak uygun olan karın, meme, bacak ve kalça konumlarından *liposuction* yöntemi ya da cerrahi kesi yöntemleri ile yapılabilir. Yağ dokusu eksplantlarının uygun tampon ve besiyeri çözeltileri içinde mekanik ve enzimatik olarak parçalanması sonrasında gerçekleştirilen bir dizi

santrifüjleme basamağı sonunda ayırt edilen stromal vasküler fraksiyon (yağ dokunun dolaşımıyla beslenmesini sağlayan vasküler ağı destek hücreleri) içinden elde edilmektedir. Stromal vasküler fraksiyon deri altı yağ katmanından elde edilen parça biyopsi ya da lipoaspirat örneklerinden izolasyon ile elde edilir. Çeşitli gruplar tarafından uygulanan izolasyon yöntemleri, farklılıklar içermekle beraber, yıkama, enzimatik yıkım, mekanik parçalama ve sentrifüj aşamalarından oluşur. SVF hücrelerinin ayrıştırılması temel işleyiş ilkesi olarak ortak aşamalar içerir. Ayrıştırma basamaklarının sonrasında hücreler, dondurarak saklama (kriyopreservasyon) ile korunabilir ya da kültür koşullarında çoğaltılıp karakterize edilerek AKH kültürü olarak kullanılabilir (20).

Vücutta yağ doku, fizyolojik ve morfolojik farklılıklar itibarı ile alt gruplara ayrılır. Kahverengi yağ hücreleri uncoupling protein-1 (UCP1) ifadeleyen mitokondri açısından zengindir. Yağ çok sayıda damla şeklinde sitozole dağıldığından ve yüksek sayıda mitokondri içerdiğinden kahverengi görünür. UCP1 aktivitesi sonucu mitokondride elektrokimyasal gradyan oluşması engellenerek, ATP sentezi yerine ısı açığa çıkması sağlanır. Açığa çıkan metabolik ısı, dolaşım yolu ile vücuda dağıtılarak vücut sıcaklığının düzenlenmesinde kullanılır (21). Erişkin insanda kahverengi yağ dokusu miktarı, sarı yağ dokusuna kıyasla azdır. Soğuk iklimlerde yaşayan veya hibernasyon (kış uykusu) özelliği gösteren memelilerde vücut yağ kütlesinin önemli bir kısmını oluşturur.

Laboratuvar koşullarında kullanılan izolasyon yöntemlerinin yanı sıra enzimatik olmayan ayrıştırma yöntemini tercih eden yaklaşımlar vardır. Klinik uygulamalar için GMP (Good Manufacturing Practices; İyi Üretim Uygulamaları) temelli yöntemler uygulanmaktadır, kollajenaz preparatları için GMP uyumlu seçenekler vardır. Enzimatik olmayan yöntemler “İyi Laboratuvar Uygulamaları” açısından insan veya hayvan kaynaklı olmaları sebebi ile rekombinant enzim ve stabilizör protein kullanımının getireceği istenmeyen etkilerin gelişmesini önler. Elde edilecek hücrelerin kullanım amacına göre enzimatik ayrıştırma basamağı içeren ve içermeyen hücre izolasyonu yöntemleri tercih edilebilir. Enzimatik olmayan yöntemler, yağ dokudan stromal fraksiyon eldesinin otomatizasyonuna olanak sağlar. Enzimatik yıkım aracı olarak kullanılan dispaz, tripsin ve kollajenaz. Bu enzimler proteolitik aktivite ile hücrelerarası yapıların, yüzey reseptörlerinin veya belirteçlerinin yıkımına sebep olur. Nonenzimatik izolasyon yöntemleri arasında kesme gerilimi (shear stress), basınç ve sentrifügasyon gibi fiziksel etkiler uygulayan yaklaşımlar vardır (22). Bu

yöntemlere ek olarak önerilen akım-sitometrisi esaslı adipoz kök hücre saflaştırması yöntemleri, verim açısından enzim içeren yöntemle yakın sonuçlar verdiği gösterilmiştir (23).

Yağ dokusu, memeli canlıların ömrü boyunca yüksek plastisite gösterir. İçerdiği rejeneratif prekürsörler ile çoğalma ve rejenerasyon kapasitesi sürekli olarak üst düzeydedir. Yağ doku stromasında bulunan bu hücre grubu, izolasyon yöntemleri ile dokunun geri kalanından ayrıştırılabilir. Adipoz kök hücreler, yağ doku aspiratlarının stroma vasküler fraksiyonu olarak tanımlanan kısmından elde edilebilir. Bu hücre fraksiyonu heterojen bir yapıdadır ve normal yağ doku fizyolojisinde, yağ dokuyu ve yağ doku içerisindeki vasküler yapıları içerir. Adipoz kök hücrelerin saflaştırılması kemik iliği mezenkimal kök hücrelerinin saflaştırılmasına kıyasla önemli avantajlar içerir. Örneğin kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin elde edilebilecek aspiratın miktarı kısıtlıdır. Benzer biçimde aspirat ve doku parçalarının elde edilmesi, vücuttan alınan dokunun kemik iliğine kıyasla hayati öneminin az olması, diğer doku tiplerine göre erişim kolaylığı, ameliyatın invazivlik düzeyi (girişimin zararlılık niteliği) bakımından daha güvenlidir. Doku kaybının herhangi bir işlev kaybı yaratmaması ve düşük hayati risk taşıması, lipoaspirasyonla elde edilen adipoz kök hücre yönteminin önemli bir avantajdır. Kemik iliği (Kİ-MKH), kordon kanı (GK-MKH), adipoz (AKH) kaynaklı kök hücrelere ilişkin yüzey belirteçlerine Çizelge2.1’de yer verilmiştir (24).

Çizelge 2.1. Farklı kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin taşıdıkları yüzey belirteçleri.

Yüzey Belirteçleri	Kİ-MKH	GK-MKH	AKH
CD10	+	+	+
CD13	+	+	+
CD29	+	+	+
CD44	+	+	+
CD49	+	+	+
CD73	+	+	+

Çizelge 2.1. (devam)

Yüzey Belirteçleri	Kİ-MKH	GK-MKH	AKH
CD90	+	+	+
CD105	+	+	+
MHC Sınıf I	+	+	+
SSEA-4	+	+	+
CD14	-	-	-
CD31	-	-	-
CD45	-	-	-
CD56	-	-	-
CD144	-	-	-
MHC Sınıf II	-	-	-
CD9			+
CD22	+		
CD34			+
CD51	+		
CD54	+		+
CD55			+
CD59			+
CD64a	+		
CD71	+		+
CD106	+	+	
CD133	+		
CD140b	+		
CD146	+		

Çizelge 2.1. (devam)

Yüzey Belirteçleri	Kİ-MKH	GK-MKH	AKH
CD166	+		
CD271	+		
CD340	+		
CD349	+		
ESG1		+	
GD2 Sentaz	+	+	
LIFr		+	
SCF		+	
SSEA-1	+		
Stro 1	+		
Telomeraz		+	
Tra-1-60		+	

AKH'ler karın, bacak ve meme çevresinden yağ aldırma işlemleri sırasında 100 mL ila 3 L arasında elde edilen atık lipoaspirat örneklerinin yüksek miktarlarda izole edilebilir. Kemik iliği aspiratlarına kıyasla, hücre sayısı açısından 5 kat yüksek konsantrasyonda mezenkimal hücre eldesi mümkündür. Bu hücre tipi, belirlenen indüksiyon koşulları altında her üç embriyonal gelişim tabakasına (endoderm, mezoderm, ektoderm) ait dokuların erişkin hücrelerine farklılaşabilme kapasitesine sahiptir (25). Kemik, yağ, kıkırdak, kas, endotel, nöron, deri ve karaciğer hücrelerine başarılı biçimde farklılaştırıldıklarına dair kanıtlar mevcuttur.

Adipoz dokudan elde edilen SVF hücreleri ve spesifik olarak AKH'ler endotel hücresine ve kardiyomiyositlere dönüşme potansiyeli bulundurmanın yanı sıra, anjiogenik faktörlerin salımı gibi (vasküler endotelial büyüme faktörü, VEGF), yeni kan damarı oluşumunu

tetikleyici işlevler gösterirler. Çeşitli humoral faktörler, kimyasal tetikleyiciler ve fiziksel kültür koşulları SVF hücrelerinin kardiyak ve vasküler farklılaşma göstermesini tetikler (bkz. Çizelge 2.3). Bunun yanı sıra asılı kültürlerde spontan olarak organize olan AKH'lerin kontraktilite (kasılım) aktivitesi olan kardiyak benzeri hücelere farklılaşma göstermeleri, bu hücre tipinin hedef dokuya fenotipik olarak yakınlığına dair fikir vermektedir. Yarı katı metilselüloz ortamında kültürü yapılan AKH'ler endotelial progenitor benzeri hücelere farklılaşarak tüp benzeri yapılar oluşturur (26). Bu yapıyı oluşturan hücelere, endotel-spesifik CD 31 ve von Willebrand Faktörü (vWF) ifadesi gösterdiği rapor edilmiştir. İnsan AKH kullanılan fare *in vivo* bacak iskemisi modellerinde anjiyografik skorlama ve deri altı kan dolaşımı açısından belirgin iyileşme gözlenmiştir. Metilselüloz ortamında sürdürülen AKH kültüründeki hücelerin oluşturdukları kontraktil öbekleri oluşturan hücelere NKX2-5, GATA4 ve MEF2c gibi önemli kalbe özgü transkripsiyon faktörlerinin yanında MLC-2v, cTnt ve sarkomerik alfa aktinin gibi kasılma aparatının komponentlerini teşkil eden yapısal proteinleri ifadeler. Konneksin-43 ve çeşitli kalp progenitorlarına özgü yüzey belirteçleri taşırlar ve “pacemaker aktivitesi” gösterebilirler.

AKH'ler kemik iliği kaynaklı mezenkimal hücelere kıyasla daha yüksek bağışıklık modulator özelliğe sahiptir (27,28). Bu sayede konak organizma tarafından oluşturulabilecek graft versus host (29) veya şiddetli alerjik reaksiyon (30) gibi olumsuz yanıtların oluşmasını engelleyerek, rejeneratif tedavi açısından avantajlar sağlayabilirler. Ek olarak anti-enflamatuvar (31) ve antioksidan (32) özelliği sayesinde hücre veya doku iskeleti naklinin yapıldığı bölgede olumsuz yöndeki doku modellemesinin önüne geçebilir ve bölgesel iyileşmeyi hızlandırabilir. Özellikle uzun süreli kültürlerde hücelere antijenik açıdan homojen bir grup haline gelir ve bağışıklık tetikleyici özellikleri azalır (33). Graft bölgesinde anjiyogenez (34,35) tetikleyerek greftin başarılı bir biçimde tutunmasını etkiler. Kalp hastalıklarının tedavisinde birçok önemli klinik çalışmaya konu olmuşlardır (36-40). Ek olarak bir diğer alt tip olan mezenkimal hücelere ile embriyonik kök hücelere kıyaslandığı bir çalışmada, adipoz kaynaklı kök hücelere, embriyonik kök hücelere farklı olarak teratom oluşturmayarak doku rejenerasyonuna katkıda bulunduğu saptanmıştır (24,41).

2.2.1.3. Sınıflandırma ve Kullanım Alanları

Adipoz kök hücrelerle yapılan ve tanımlayıcı basamaklar içeren başlıca çalışmalar Patricia Zuk ve ekibi tarafından 2013 yılında hazırlanan bir derlemede karşılaştırılmıştır. Çizelge 2.2’de yüzey belirteçleri açısından literatürdeki bu çalışmaları ifade ettikleri ve etmedikleri ortak belirteçlere göre sınıflandırılmıştır (19).

Çizelge 2.2. Adipoz kök hücrelerin yüzey belirteçleri.

	Pozitif Belirteçler	Negatif Belirteçler
Önerilen ortak fenotip	CD13, CD29, CD34, CD44, CD49d, CD54, CD90, CD140a, HLA-ABC, CD105, CD140b, CD146, CD166, SMA, HLA-DR	CD11a, CD11b, CD11c, CD14, CD31, CD45, CD106, CD144
Tartışmalı AKH belirteçleri	CD105, CD140b, CD146, CD166, SMA, HLA-DR	
Stromal hücre belirteçleri	CD29, CD44, CD73, CD90, CD166	
Hematopoietik belirteçler	CD31, CD34, CD45, ABCG2	
Perisit belirteçleri	CD146, Stro-1, 3G5	

2.2.1.4. AKH’lerin Kardiyomiyosite Farklılaşması

AKH’lerin kardiyomiyositlere farklılaştırılmasının farklılaşmamış hücre enjeksiyonu ile kıyaslandığı kardiyak infarkt modelinde, iki grup arasında anlamlı fark bulunmadığı saptanmıştır (42).

Çok sayıda çalışmada farklı konsantrasyonlarda ve inkübasyon sürelerinde kimyasal bileşikler kullanılarak kardiyomiyosit yönünde farklılaşma sağlanmıştır. Mezenkimal multipotent stromal hücrelerin kardiyojenik farklılaşma tetikleyicileri arasında 5-azasitidin, askorbik asit, BMP, spontan farklılaşma, ikariin, nitrik oksit, kardiyomiyosit ko-kültürü gibi farklı teknikler denenmiş ve anlamlı sonuçlar elde edilmiştir (43-47). Farklılaşma sürecinin takip edilebilmesi için çeşitli ayırt edici işlevsel belirteçlerin varlığı, protein ve gen ifadesi düzeyinde takip edilmiştir. Adipoz kök hücrelerin kardiyomiyosite farklılaşmasının incelendiği yayınlar Çizelge 2.3'te toplanmıştır. 5-Azasitidin (5-Aza) molekülü, DNA ve RNA yapısındaki bir nükleozid olan sitidin analogudur. Düşük dozlarda uygulandığında DNA metiltransferaz inhibitörü olarak işlev gösterir. 5-Azasitidin, DNA hipermetilasyonu ile meydana gelen gen susturumunu engelleyerek kardiyak gen ifadesinin tetiklenmesine yol açtığı ve farklılaşmayı başlattığı ifade edilmektedir (48,49). Çizelge 2.3'te derlenen 5-Azasitidin molekülünün kardiyak yönde farklılaşma amacıyla uygulandığı araştırma makalelerinde elde edilen farklılaşma protokollerinin sonuçları önemli yanlarıyla sunulmaktadır.

Çizelge 2.3. Adipoz kök hücrelerin kardiyomiyosite farklılaşmasında uygulanan yöntemler.

Kaynak	Bileşik	Erken dönem	Geç dönem	Yüzde-sonuç
Gaustad, 2004	Kardiyomiyosit ekstraktı		α -aktinin, desmin, kardiyak troponin I, konneksin-43, lamin A	%20-30
Planat-Benard, 2004	5-aza-2-deoksisitidin	NKX2-5, GATA4 ve MEF2C, β -MHC	Pacemaker aktivitesi MLC-2v, MLC-2a ve ANP	%0,02-%0,07 kontraktilite, miyotüp oluşumu
Palpant, 2007	Fare AKH İndüksiyon, Wnt5a, Dickkopf1, Wnt3a		Tropomiyozin, α -sarkomerik aktin, kardiyak Troponin T ve Troponin I	Anlamlı düzeyde farklılaşma. Doza bağlı atım gösteren koloniler. %12,3 ve %14,6 $\pm$ 0,3 vs. 4,5 $\pm$ 1,5; P < 0,01,
Song, 2007	Spontan, VEGF	NKX2-5, GATA4, α -MHC,	cTn-I	%0,005 - %0,07
Van Dijk, 2008	5-aza-2-deoksisitidin, laminin kaplama		Alfa-aktinin, Mlc2a, Serca2a	%61
Arminan, 2009	--	GATA4, NKX2-5	TnI; β -MHC, ANP, alfa-aktinin.	Anlamlı düzeyde farklılaşma
Gwak, 2009	TGF- β 1	MHC, α -sarkomerik aktin		%17

Çizelge 2.3. (devam)

Kaynak	Bileşik	Erken dönem	Geç dönem	Yüzde-sonuç
Rebelatto, 2009	Nitrik oksit		Fötal alfa-kardiyak aktin, kardiyak troponin T ve konneksin-43, VMHC, alfa sarkomerik aktinin	%20
Sliwa, 2009	SCF içeren bazal H4230 besi ortamı, 10 ng/ml IL-6, 10 ng/ml IL-3	GATA4	MEF 2C, MyoD	
Zhu, 2009	Kardiyomiyositler ile kokültür 1:5 ve IGF-1	ANP, GATA4 Nkx2-5	α -skA, b-MHC, TnI, Cx43,	Kasılma yok %20-40
Choi, 2010	5-aza, TRA, kardiyomiyosit ile ko-kültür	GATA4 ve Nkx2-5, ve kontraktil proteinler	α -aktinin, Troponin I ve cMHC	%27,2 kasılma var
Jin, 2010	İkarin, İkarin + PD98059	NKX2-5, GATA4, MLC-2v	Alfa-aktinin ve cTnT	%21,46
Jumabay, 2010	BMP4, Noggin, BMP-inhibitörü, Dkk-1, a Wnt-inhibitörü veya non-canonical Wnt5a	NKX2-5	Troponin I	%10-15 Kasılma var

Çizelge 2.3. (devam)

Kaynak	Bileşik	Erken dönem	Geç dönem	Yüzde-sonuç
Peran, 2010	İnsan kalp dokusundan elde edilen kardiyomiyosit hücre içi materyali		Konneksin-43, sarkomerik α -aktinin, kardiyak troponin I ve T ve dezmin) Gen düzeyinde: kardiyak miyozin hafif zincir 1, alfa-kardiyak aktin, kardiyak troponin T ve kardiyak, b-miyozin	%12-15
Metzele, 2011	Kardiyomiyositler ile iAKH füzyonu	Ki67	troponin I, troponin T, MHC, TNNT2	%19,86 $\pm$ 4,84 füzyon, tamamı kontraktil
Choi, 2010	Trikostatin A ve 5-Aza	NKX2-5	Sarkomerik aktin kardiyak MHC, α -aktin, Troponin I ve Cx-43	%27,2 kontraktilite
Chang, 2012	Forbol miristat asetat	cTnT, MLC ve MHC, Cx 43		Prelinik uygulamada kullanılmıştır, yüzde bilgisine yayında yer verilmemiştir.
Yeh, 2012	5-Azasitidin varlığında kitosan membran yüzeyinde fiziksel stimülasyon	Wnt11, GATA4, NKX2-5, Tnnt2 ve Myh6	N-cadherin, Zo-1	Anlamlı düzeyde farklılaşma

Çizelge 2.3. (devam)

Kaynak	Bileşik	Erken dönem	Geç dönem	Yüzde-sonuç
Madonna, 2013	Myocardin A transfeksiyonu	Oct-4, GATA4, Nkx2-5, MLC2v, Mef2c, DTEF ve McA		Anlamlı düzeyde farklılaşma
Peran, 2013	İnsan post mortem kardiyak hücre ekstraktı	GATA4 veya Mef2-c	Kardiyak a-aktin ve kardiyak troponin I, T, dezmin	%50-60 troponin boyaması
Song, 2013	Angiotensin II, azasitidin ve angiotensin II + bFGF		myosin heavy chain, troponin I ve Cx43	%21 ve %18
Zanetti, 2013	ATP2A2, GJA1 ve NPPA transfeksiyonu	Myh7, beta MHC, GATA4, MEF2C		%0,007, %0,009 ve %0,004
Girao-Silva, 2013	Kısa süreli çok eksenli esnetme		Alfa-sarkomerik aktin, troponin I	Farklılaşma yok
Khaleghi, 2014	BMP4	NKX2-5, TBX5, GATA4	Kardiyak troponin, alfa aktinin, dezmin, BMP4, β -MHC, α -MHC, MLC2A ve MLC2V	%53,6 troponin ifadesi

Çizelge 2.3. (devam)

Kaynak	Bileşik	Erken dönem	Geç dönem	Yüzde-sonuç
Naeem, 2014 (konferans sunumu)	Zebularin	-----	-----	Anlamlı düzeyde farklılaşma
Pavesi, 2014	Elektriksel uyarım		Cx 43	Anlamlı düzeyde farklılaşma

AKH yüksek verimlilikle kardiyomiyosit benzeri hücrelere farklılaşması birçok farklı bilimsel ve tıbbi kullanım alanları açısından önem taşımaktadır. Kullanılan farklılaştırıcı ajanlar, takip edilen değişkenler ve başarı düzeyleri yer almaktadır. Adipoz kök hücrelerin kalp dokusu hücrelerine farklılaşması konusunda önemli bir potansiyele sahip olması ile beraber, bu farklılaşmayı standardize biçimde ve işlevde iyileşme sağlayabilecek ya da ilaç maddesi geliştirme çalışmalarında kullanılabilecek güvenilir model sistemlerin geliştirilmesini amaçlayan çalışmalara gereksinim bulunmaktadır. Çizelge 2.3'te AKH'ler üzerinde kardiyomiyosit yönünde farklılaşmanın incelendiği çalışmalar özetlenmiştir (46,50-69). Klinik uygulamalar söz konusu olduğunda miyokardiyal enfarktüs sonrasında kalbin fonksiyonel iyileşmesini amaçlayan hücre temelli rejeneratif yaklaşımlar önemlidir. Bu tedavide amaçlanan otolog yolla elde edilen kök ve öncül hücrelerin miyokard içine enjekte edilerek parakrin etki ile ve kardiyomiyosite farklılaşma ile rejenerasyonu tetiklemesidir. Adipoz kök hücrelerin kendiliğinden kardiyomiyositlere farklılaşabilmesi (55,64), AKH'lerden elde edilen kardiyomiyositlerin kontraktıl (kasılğan) özellik göstermesi, yüksek miktarlarda hücrenin kemik iliğine kıyasla daha kolay ve daha az "invaziv" biçimde elde edilebilmesi hücresel tedavide AKH kullanımı açısından avantajlar bulunduğunu gösterebilir. Bir başka önemli potansiyel kullanım alanı, ilaç geliştirme ve insan kardiyovasküler hastalıklarının laboratuvar koşullarında incelenmesi amacı ile kültür yapılmasıdır. Aday ilaç moleküllerinin hedef dokuya özgü koşullar içinde değerlendirilmesi, hayvan modellerinden sonraki ileri bir aşama olarak kullanılabilir ve metabolik koşullar veya gen ifadenmesi değiştirilerek elde edilen kardiyomiyositler üzerinde hastalık koşulları taklit edilebilir. Bu amaçla AKH'lerin kardiyomiyosite farklılaştırılarak sağlıklı ya da hastalığa özgü hücre hatlarının geliştirilmesi ile kardiyak iyon kanal proteinlerine ilişkin genlerin mutasyonları, ve çeşitli kardiyomiyopati tiplerinin araştırılması mümkündür. AKH'ler kişiye özgü onarımsal tedavilerde kullanım için önemli bir aday hücre grubudur. Elde edilmedeki kolaylık, klinik deney koşullarında sınanmış güvenilirlik, çoğalma ve farklılaşma düzeylerinin yüksek olması, hücresel tıp açısından önemli avantajlardır. Bunların yanı sıra, AKH'ler, otolog yolla (hastanın kendisinden) elde edilerek tedavi için kullanılan hücre tiplerinin hepsinde olduğu gibi, hastada yabancı malzeme veya dokuya yönelik olarak gelişebilecek bağışıklık yanıtı oluşumuna sebep olmazlar. AKH, bu özellikler sayesinde, kişiselleştirilmiş tıp uygulamalarında kullanım açısından önemli bir aday hücre tipidir.

Çalışma kapsamında gen ifadesi düzeyi incelenen kardiyak farklılaşma ve işlevlerle ilişkili genler Çizelge 2.4’de yer almaktadır. Listelenen bu genlerin hücresel işlevleri ve kardiyak farklılaşma açısından önemi, bu genlerin literatürdeki farklılaşma ile ilgili çalışmalardaki yeri tartışma bölümünde detaylı biçimde incelenmiştir.

Çizelge 2.4 Farklılaşma çalışmalarında kullanılan eş-zamanlı PZR belirteçleri.

Kaynak	Kaynak hücre tipi	Farklılaşma etkeni	Belirteçler
Khaleghi, 2014	AKH	5-Aza ve BMP4	GATA4, MEF2C, NKX2-5, TBX5 α -MHC, β -MHC, MLC2V, MLC2A.
Gwak, 2009	AKH	TGF- β 1	Troponin I ve troponin T, Cx 43, GATA4 NKX2-5, MH, α -sarkomerik aktin
Planat-Benard, 2004	AKH	5-Aza ve spontan gruplar	GATA4, NKX2-5, ANP, MLC-2v, Mlc-2a
Rungarunlert, 2011	EKH	Mikroyerçe kimi, activin A	Oct4, NKX2-5, Tnnt2, Myh6, Myl2, Nppa ve Brachyury T
Den Hartogh, 2016	MESP-1 pozitif kardiyak progenitörler		GATA4, LHX2, COUP-TF1, ZEPH2, TSHZ2, ZFH3, PPAR-epsilon ve NKX2-5
Koninckx, 2013	Eksplant kültürdeki Kardiyak progenitörler		Troponin T, α -aktinin, MHC, Connexin43, Kv 4.3, alfa1c, GATA4
Smith, 2007	Eksplant kültür		NKX2-5, troponin I, α sarkomerik aktin, Cx 43

2.2.2. Doğal Elastinin Özellikleri, İşlevleri ve Elastin Türevlerinin Doku Mühendisliği Alanında Kullanımı

Kalp ECM'sinde baskın olan proteinlerden Elastin, ~750 aminoasitli, 68.469 Da molekül ağırlığında ve bazik izoelektrik noktası olan (pI 10,4) büyük oranda hidrofobik bir proteindir. Yüksek oranda prolin ve glisin bakiyelerinin yanı sıra, hidroksiprolin içeren elastin, birçok biyolojik tampon sisteminde ancak ihmal edilebilir düzeyde çözünürlük gösterir. Elastinin bileşimi detaylı incelendiğinde, türler arasında farklılık göstermekle birlikte, insanlarda glisin, alanin, valin ve prolin amino asitleri başta olmak üzere treonin, lözin, izolözin, tirozin, arginin, fenilalanin dâhil yaklaşık 20 amino asitten oluşan kompleks bir bileşime sahip olduğu gözlenmektedir (70).

Elastin, hücreler tarafından hücre dışı alana salınan öncül tropoelastin moleküllerinin hücre zarı dış yüzeyindeki katlantılarda kovalent bağlanması ile oluşur. Tropoelastin molekülleri lizin bakiyeleri üzerinden ileri derecede çapraz bağlanarak elastin iplik ve tabakalarını oluşturur. Elastin proteini kalbin gevşeme aşamasında önemli işlevlere sahiptir. Kanın kalbe dolması sırasında ventrikülün genişlemesi, pompalanacak kanın kalbe dolması için gerekli, ancak kontrol edilmesi gereken bir işlevdir. Ventrikülün aşırı genişlemesi kalpte kasılma ile görevli hücrelerin parçalanmasına ve HDM yapısının dağılmasına neden olabileceği gibi, sonrasında normal bir kasılma işlevinin sağlanması imkânsızdır. Elastin proteini, titin proteiniyle beraber kalbin gerilme ve eski formuna geri dönme yeteneğini temin ederken, yapısal özellikleri ile organa/dokuya mekanik dayanım da kazandırır. Kalp hücrelerinin kasılma aktivitesi, içinde bulunduğu hücreler arası protein ağının da hücre ile beraber esnemesi ve eski formuna dönmesi sayesinde gerçekleşir (71).

Bu kapsamda, kalp dokusundaki çeşitli HDM elemanlarının, kök hücrelerin kardiyojenik farklılaşmasına olan etkileri incelenmiş, ancak sentetik elastin-benzeri peptitlerin kullanıldığı çalışmaların dışında, doğal elastin proteininin kök hücrelerin kardiyojenik farklılaşmasında kullanıldığı bir çalışma görülmemiştir. Elastin-benzeri peptitlerin kullanımını kapsayan çalışmalar incelendiğinde, temelde tropoelastinin bileşiminde tekrar eden amino asit dizilerinin kullanımı amaçlanmıştır. Söz konusu elastin-benzeri peptit yapılarının, doğal elastine kıyasla daha az oranda glisin, valin ve prolin amino asitlerini içeren dizilerin farklı sayılarda tekrarlarından oluşturulduğu görülmektedir (72,73). Elastin

yapısında yer alan diğer amino asitlerin kök hücre davranışları ve farklılaşma potansiyeli üzerine etkileri halen aydınlatılmayı beklemektedir (74-76).

Elastomerik rekombinant proteinlerin doğal elastin proteini ile önemli fonksiyonel ve mekanik farklılıkları bulunmaktadır. Elastinin vücutta başka hiçbir protein tarafından sağlanamayan düzeydeki elastisite özelliği, “elastin-benzeri protein” ve benzer yapıdaki elastomerik rekombinant proteinlerde bulunmamaktadır. Bir yüzeyin sertlik ve esneme sonrası eski yapısına dönme becerisi gibi özelliklerini niteleyen elastik modül değeri göz önüne alındığında, çapraz bağlı durumdaki elastin-benzeri proteinlerin yaklaşık 35-45 kPa değerindeki elastikliğinin karşısında doğal elastin proteinin 300-600 kPa değerlerine sahip olduğu görülmektedir (72). Bu yaklaşık 10 katlık esneklik farkı, protein yapısındaki bileşenlerin fizyolojik olarak, hücre tutunması, fibroblast ve mezenkimal kök hücre proliferasyonunu tetikleme gibi özellikler açısından önemli farklılıklar göstermesine sebep olabileceği düşünülmüştür. Mezenkimal kök hücrelerin, farklı sertlikteki yüzey tutunma koşullarından etkilenecek, kemik, nöral ve kas hücrelerine farklılaşabildikleri bilinmektedir (77). Bu bulgular ışığında, yüksek elastisiteye sahip sübstrat, büyüme faktörleri/biyomoleküller ve mikroyerçekimli kültür koşullarının farklılaşma düzeylerinde anlamlı farklara sebep olacağı tahmin edilmiştir.

Elastin proteini, tropoelastin birimlerinden oluşan polimer yapısında bir moleküldür. Tropoelastin geninin 1 numaralı ekzonundan meydana gelen peptit dizisi, sinyal peptidi özelliğindedir; bunun yanısıra toplam 36 ekzonun ifadelenmesi ile oluşan bu proteinin son işlevsel dizisi (C terminali), integrin türevlerinin bağlandığı diziler aracılığı ile dokuyu oluşturan hücrelerle bağlantı kurulmasını sağlar. Tropoelastin, diğer bazı ECM bileşeni proteinlerden farklı olarak RGD tanıma dizilerini içermez. Buna karşın, C-terminalinde bulunan ve ECM proteinlerinin ve hücrelerin bağlanmasını sağlayan integrin/GAG bağlanma bölgelerine sahiptir. Bu sayede normal fizyolojik koşullar altında hücre göçü, proliferasyonu ve hücre tutunması işlevlerine katkıda bulunur. Son olarak, Elastin bağlayıcı protein (Elastin Binding Protein-EBP) bağlama bölgelerini içeren doğal elastin proteininin, elastin ve EBP arasında gerçekleşen bağlanma sonucunda fibroblast/monosit kemotaksisi ve kas fibrili sentezlenmesinin tetiklenmesi gibi ispatlanmış işlevlere yol açtığı bilinmektedir. Bahsi geçen bu fizyolojik ve mekanik özellikler, Elastin-benzeri proteinler

tarafından kısmen taklit edilebilse de, işlevsel özelliklerin bütünü, yalnızca doğal tropoelastin ve elastin proteinleri tarafından taşınmaktadır (78,79).

2.3. MEKANİK ETKİLERİN KÖK HÜCRE DAVRANIŞI ÜZERİNE ETKİLERİ

Süstrat sertliği, kök hücre farklılaşma yönünü belirleyen önemli etkenlerdendir. Young modülü (E, paskal olarak ölçülür) malzemenin esneklik göstermesi için gereken kuvveti tanımlar. Farklı elastik modüle sahip hücre dışı ortamda kültürü yapılan mezenkimal kök hücreler, sertlik derecesindeki değişime göre farklı biçimde tepki verir (80). Sentetik biyomalzemelerin sertliği ve bununla ilişkili olarak elastikiyet özelliği çapraz bağlanma düzeyi ile kontrol edilebilir. PDMS, hiyaluronik asit ve kollajen ile yapılan çalışmalar, farklı elastik modüle sahip yüzeylerin, kök hücre farklılaşmasını yönlendirdiğini göstermektedir (81). Ek olarak, benzer biçimde, farklılaşmış hücrelerin fonksiyon ve karakteristik özelliklerinin ifade edilmesi için hücre tipi ile bağlı olduğu hücre dışı ortam arasında mekanik uyum bulunması gereklidir (82). Kardiyomiyosit kültürü koşullarında yüzey elastisite düzeyi $E \leq 11$ kPa seviyesinde optimal kasılma aktivitesi gözlenmektedir. Yeni doğan rat kalbinde epikard tabakasının elastik modülü embriyonik dönemde 12 ± 4 kPa düzeyindedir. Neonatal dönemde ise 39 ± 7 kPa düzeyine artış gösterir. Bu belirgin değişim rat kardiyomiyositlerinin fenotipik olarak olgunlaşmasına ve gelişim sırasında artan kan akışı ihtiyacının karşılanmasını sağlar (83).

2.4. KALP VE DAMAR HASTALIKLARININ TEDAVİSİNDE DOKU MÜHENDİSLİĞİ YAKLAŞIMLARI

Kök hücrelerin miyokard tabakasına hücre süspansiyonu formunda enjekte edilmesi, kalbin yoğun bir organ olması sebebi ile ve infarkt varlığına bağlı olarak pro-enflamatuvar bir ortam olması sebebi ile greft hücrelerinin (enjekte edilen hücrelerin) büyük bir kısmının miyokarda yerleşmeden ölmesine yol açmaktadır. Hücrelerin besi ortamı içinde, eşlik eden koruyucu bir ortam olmadan aktarılması yöntemlerin etkinliğini kısıtladığından, kesme kuvvetini azaltan hidrojel kullanılarak hücrelerin canlılığının devam ettirilmesi, önerilen yöntemlerden birisidir (84). Enjekte edilebilen biyomalzemeler kesme kuvvetini azaltmalarının yanı sıra kalbe yakın düzeyde elastikiyet, iletkenlik ve sertlik getirdiğinden ventrikül işlevine ve dolayısıyla olumsuz yeniden modelleme süreçlerinin önüne geçmektedir. Miyokard enfarktüsü modellerinde embriyonik kök hücre kaynaklı

kardiyomiyositlerin enjekte edilerek kullanımının onarımı arttırdığı gözlenmiştir (85). Atimik farelerde yapılan başka bir çalışmada uPKH ve MKH kaynaklı kardiyomiyosit kullanımının, infarkt bölgesinde kalbe özgü proteinlerin ifade edilmesini arttırdığı, fibröz oluşmasında azalışa yol açtığını göstermektedir (86). Preklinik çalışmalardan elde edilen bulgular, gelecekte, miyokard enfarktüsünün tedavisini amaçlayan klinik uygulamalarda uPKH kaynaklı kardiyomiyositlerin kullanıldığı yeni yaklaşımları destekleyebilir. Hücrelerle beraber kullanılan enjekte edilebilir biyomateriyaller, hücre canlılığında, yerleşmesinde ve greftlenmesinde artış sağlamaktadır. Buna rağmen, bahsedilen tarzda in-situ mühendislik uygulamalarının klinik aşamaya geçmesi için önemli aşamaların katedilmesi gereklidir. Çok az sayıda istisna olmakla beraber (87), uPKH ve uPKH kaynaklı hücreler ile yapılan klinik çalışmalar uygulamaya geçmiş değildir.

Deneysel ve kliniğe dayalı bulgular, biyomalzeme enjeksiyonunun hızlı biçimde basınç yükünü azaltarak ventriküler destek sağladığını göstermektedir. Miyokard enfarktüsü sonrasında, iskemiden ötürü kasılma kapasitesinin azalması, kalp yetmezliğinin ortaya çıkmasına sebep olur. Miyokard içine yapılan biyomalzeme enjeksiyonu, olumsuz yeniden modelleme sürecini geciktirerek ya da durdurarak sol ventrikül diastolik hacminin korunmasını sağlayabilmektedir. Klinik çalışmaların sonuçlarına göre, yeniden kazanılan elastikiyet ve ventrikül duvarının pasif esnemesinin kısıtlanması, hızlı bir semptomatik iyileşme sağlamaktadır (88). Buna ek olarak, biyomalzeme yapısında çapraz bağlama yolu ile katılan büyüme faktörleri, küçük moleküller veya transkripsiyon faktörleri ile enjekte edilen bu biyomalzemelerin anti-apoptotik ve anti-enflamatuvar yanıt vermesi sağlanabilir (89). Protein bakiyeleri ile modifiye edilen iskele yapıları, konak hücrelerin yapı içine göç etmesini sağladığından, zaman içinde konak HDM yapılarının greft yerine geçmesini tetikler. Deselülerize biyomalzemeler, klinik olarak kullanılabilecek enjekte-edilebilir biyomalzemeler arasındaki başlıca adaydır. Deselülerizasyon tekniği özetle, nakli yapılacak homolog doku örneğinin hücrelerden arındırılarak HDM yapısının elde edilmesi mantığına dayanır. Araştırmacılar bu amaçla, hızlı dondurup-çözme döngüleri, hidrostatik basınç, elektroporasyon gibi fiziksel yöntemlerin yanı sıra deterjan, baz çözeltisi uygulaması ve nükleazlar gibi enzimler kullanılabilir. Gelişmekte olan doku mühendisliği çözümleri, değişik kalp hastalıklarının farklı safhalarına yönelik olarak özelleşmektedir. Mezenkimal kök hücre veya biyomalzemelerin intramiyokardiyal enjeksiyonu hücre kaybını ve hücre kaybının oluşturduğu işlev yitimini kompanse ederek olumsuz yeniden

modelleme sürecinin önüne geçmektir. Yeni yaklaşımlar ile biyoyapay yamalar kullanılarak geniş lezyonların tedavi edilmesi amaçlanmaktadır. Bu yama yaklaşımlarının önde geleni kasılma becerisine sahip otolog kardiyomiyosit içeren hücre tabakaları ile doğrudan müdahale edilerek kalbe kasılma becerisi kazandırılması ve kalp yetmezliği gelişiminin önüne geçilmesidir (90). Son dönemde yaklaşım olarak çığır açan bir önemli atılım ise tüm organ deselülerizasyonu ile elde edilen insan kalplerinin hasta kalbin yerine nakledilmesidir. Bu amaçla, deselülerize edilerek yabancı antiijenlerden arındırılan verici kalbinin, hastanın kendi hücreleri ile reselülerize edilerek, anatomik ve hücresele olarak uyumlu bir biyoyapay bir organ görevi görmesi amaçlanmaktadır. Henüz preklini aşamadaki bu yöntem, klini uygulamaya aktarılabilmesi durumunda, normal koşullarda acil olarak gerçekleştirilen kalp naklinin elektif bir müdahale haline gelmesini sağlayacaktır. Buna ek olarak, hastanın kendi kök hücrelerinden üretilen kardiyomiyositlerin kullanılmasından dolayı bağışıklık baskılayıcı ilaçların kullanımına ihtiyaç olmayacaktır (81). Deselülerize yapıların kalbin lezyon içeren kısımlarının yerine nakli ise bir diğeri olası yaklaşımdır.

Kalbe implante edilecek biyoyapay dokuların canlılığının ve işlevinin sağlanması için dolaşım bağlantısının bulunması şarttır. Çözünmüş gazların dolaşım sistemi ile alışverişi, besin yapıtaşlarının alınması ve artıkların bertaraf edilmesi, normal doku homeostazının sağlanması amacı ile alıcının dolaşım sistemi ile bağlantılı olması şarttır. Bu amaçla kardiyak yapıların greft başarısı ve uzun süreli işlev gösterebilmesi için, implante edilen yapıların vaskularizasyonu gerekebilir. Bu amaçla yapıların vücuda implante edilmeden önce mikro-damar yapıları ile inşa edilmesi, implantasyon sonrasında madde alışverişini mümkün kılar (91,92). Doğal dokuya benzer biçimde, biyoyapay iskelelerin kalınlığı difüzyon yüzeyine olan mesafesi tarafından belirlenir. Kısaca, doku içerisinde nekrozun önlenmesi için, bir hücre ile difüzyon yüzeyi arasındaki mesafe 200 mikrometreden fazla olmalıdır (93).

Doku taslaklarının ve biyoyapay implantların kanlanması yanı sıra, temel olarak damar hastalıklarında vasküler doku mühendisliği ürünlerinin bir tedavi biçimi olarak geliştirilmesi, önemli bir yaklaşımdır. Komplike kardiyovasküler lezyonların cerrahi tedavisi sırasında vasküler greftlerin kullanımı söz konusudur. Bu amaçla hastadan alınan otogreftlerin yeterli olmaması durumunda tamamen yapay damar greftlerinin tercih

edilmesi gerekmektedir. Yapay kaynaklı biyomalzemelerin kullanılması beraberinde trombotik olay riskinde artış, malzeme iç yüzeyi üzerinde kalsiyum birikmesi, stenoz ve artan enfeksiyon riskini getirir. Ek olarak tamamen yapay malzemeler kullanılarak yapılan damar implantları çocuk hastalarda, büyüme ile birlikte ortaya çıkan gereksinimleri karşılamamaktadır. Doku mühendisliği yaklaşımı ile geliştirilen vasküler otogreftler, sinspesifik veya zenojenik deselülerize vasküler greftler ve insan kaynaklı aselüler greft seçenekleri, rejeneratif süreçler kapsamında yabancı maddenin zamanla bozunarak yerini konak organizmanın dokularına bırakmasından dolayı tercih edilmektedir. Greftin bozunurluğu ve konak doku ile yer değiştirmesi, greftin biyolojik olarak uyumlu ve uzun vadede başarılı olması, benzer çözümlere kıyasla tıbbi harcamaları azaltan etkenlerdir. Günümüzde damar doku mühendisliği hastaya özgü çözümler geliştirme gayretinin yanı sıra her an hazır olarak kullanılabilecek tam-uyumlu damar greftlerinin geliştirilmesine yoğunlaşmıştır (94).

Kapak hastalıkları için önemli cerrahi tedavi yöntemlerden birisi kapak replasman ameliyatlarıdır. Stenoz, konjenital sebepler, bikuspit aortik kapak hastalığı, endokardit ve romatizmal hastalıklar sebebi ile dejenere olan kalp kapakçıklarının yapay mekanik kapaklarla veya biyoprotezlerle değiştirildiği yaygın olarak uygulanan yaklaşımlarla tedavi edilmektedir. Mekanik yapay kapakçıkların uygulandığı vakalarda ömür boyu antikoagülan kullanımı ve buna bağlı artan kanama riski söz konusudur. Bunlara alternatif olarak geliştirilen biyoprotezler ise genellikle 15-20 senelik kullanım ömrüne sahiptir. Doku mühendisliği yöntemleri ile üretilen biyomalzeme temelli kalp kapakçıkları sürekli antikoagülan kullanımına gerek oluşturmamasının yanı sıra, vücutta kendileştiğinden ve gelişme çağındaki hasta ile beraber büyüyebileceğinden ötürü alandaki önemli boşlukları doldurmaktadır (94).

2.4.1. Kalbin Embriyolojisi, Histolojisi ve Fonksiyonel Anatomisi

İnsan kalbi, toraks bölgesinin ortasında yer alır ve apeks kısmı sol tarafa dönüktür. Beşinci ve sekizinci torasik omurların arasında, mediastinumun ortasında yer alır. Kalp, iki tabakadan oluşan bir kese olan perikard ile çevrilidir ve bu yapı aracılığı ile mediastene bağlanır (95). Kalbin ön yüzeyi sternum ve kaburga kıkırdaklarına, kalbin arka yüzeyi ise vertebral kolona yakındır (96). Kalbin yukarı bölümü vena kaval, aort ve pulmoner arter olmak üzere büyük damarlara bağlıdır. Bu kısım üçüncü kaburga kıkırdağı ile aynı hizada

bulunur. Kalbin alt ucu olan apeks bölgesi, sternumun sol tarafında, mediasten hattına 8-9 cm mesafede bulunur. Kalbin büyük bölümü kısmen sola yerleşiktir ve tüm vücuda kan pompalama görevini gerçekleştiren “sol kalp” olduğundan, kalp solda hissedilir. Kalp, akciğer loblarının arasında bulunduğu sol akciğer daha küçüktür. Sağ akciğerin sınırı kalbin bulunduğu bölgede içe doğru girintilidir. Kalp, koni şeklinde olup, apeks kısmına doğru inceler. Ortalama bir yetişkin kalbi 250-350 gram ağırlığında ve yaklaşık olarak bir yumruk büyüklüğündedir. Buna karşın, düzenli antrenman yapan bir atletin kalbi, çok daha büyük ölçülere ulaşabilir (96).

Kalp, üstte iki kulakçık ve altta iki karıncık olmak üzere dört odacıktan oluşur. Atriyum olarak adlandırılan kulakçıklar atrioventriküler kapakçıklar aracılığı ile ventriküllere bağlanır. Kalbin dış yüzeyinde görülen koroner sulkus atriyum ile ventrikül arasındaki bileşimin bulunduğu hattadır (97). Sağ ve sol atriyumun üst kısımlarında kulak biçiminde atriyal apendaj ismi verilen yapılar bulunur. Kardiyak kök hücre ve progenitörlerin zengin olarak bulunduğu bir bölge olmasında ötürü önemlidir (97,98). Sağ atriyum ve ventrikül beraber olarak sağ kalp olarak adlandırılabilir, benzer biçimde sol kalp terminolojisi de, sol ventrikül ve atriyum beraber anılırken kullanılır (97). İki ventrikül birbirinden interventriküler septum ile ayrılır. Kalbin dış yüzeyindeki anterior longitudinal sulkus interventriküler septumun hizasında bulunur (95).

Kalbin yoğun bağ dokudan oluşan iskeleti, kalbe biçimini verir. Atrioventriküler septum ve dört kalp kapakçığının tutunduğu fibröz halkalar bu iskelet yapısının önemli bileşenleridir (99). Bağ dokudan oluşan bu yapı, kolajenin elektrik iletkenliği belirgin biçimde düşük olduğundan, aynı zamanda kalbin elektriksel iletim sisteminin sınırlarını çizer. İnteratriyal septum, atriyumları birbirinden ayırır ve interventriküler septum ise ventrikülleri birbirinden ayırır (96). Karıncıklarda kan pompalama işlevi, yüksek basınç değerleri oluşturduğundan, ventriküller arasındaki septum, interatriyal septumdan çok daha kalındır.

Atriyum ve ventriküllerin arasındaki kapakçıklara atrioventriküler kapakçık adı verilir. Sağ atriyum ile sağ ventrikül arasında trikuspid kapakçık bulunur. Bu kapakçık üç yapraktan oluşur ve korda tendinea adı verilen tendon ligamentleri ile anterior, posterior ve septal papiller kaslara bağlanır (100). Sol atriyum ve ventrikül arasında mitral kapakçık bulunur. Diğer adı ile bikuspid kapakçık olarak adlandırılan bu kapakçık, anterior ve posterior olmak üzere iki yapraktan oluşur. Bu kapakçıklar da kordalar ile ventrikül

duvarından köken alan iki papiller kas demetine bağlanır (101). Bu yapılar, papiller kaslar kalp duvarlarına kordalar ile tutunur. Papiller kaslar kapakçıkların kapanırken fazla ileri gitmesini engeller (102). Kalp döngüsünün gevşeme aşamasında papiller kaslar da gevşer ve bu aşamada korda tendinea üzerindeki gerilim azdır. Kalbin odacıklarının kasılması esnasında papiller kaslar da eş-zamanlı olarak kasılma aktivitesi gösterirler. Bu kasılma sırasında kordalar üzerinde gerilim oluşur ve böylece atroventriküler kapakçıkların yapraklarını yerinde tutarak atriyumun içine doğru katlanmalarını engellerler. Ventriküllerin çıkışında yarımay kapakçıkları bulunur. Pulmoner kapakçık, pulmoner arterin başladığı bileşkede bulunur. Bu kapakçık üç yapraklıdır ve herhangi bir papiller kas bağlantısı bulunmamaktadır. Ventrikül gevşediğinde, yani diastol aşamasında, kan pulmoner arterden ventriküle geri akar ve kapakçığın içini doldurur. Bu sayede kapakçık geliş yönüne doğru kanın oluşturduğu basınçla kapanır. Aort başlangıcında yarımay aort kapakçığı bulunur. Bu kapakçık da papiller kas bağlantısı olmadan çalışmaktadır. Üç yaprakçıklı olan bu kapakçık, pulmoner kapakçıkta olduğu gibi aorttan geriye akan kanın basıncı ile kapanır (103).

Sağ atriyum, vücudun en büyük iki veni (toplardamar) olan superior ve inferior vena cava'dan neredeyse sürekli olarak gelen kanla beslenir. Inferior vena cava'nın atriyum bağlandığı bileşkede bulunan koroner sinus bölgesine koroner dolaşımdan gelen bir miktar kan sağ atriyumun içine akar. Sağ atriyum duvarının iç yüzeyinde oval biçimli fossa ovalis ismi verilen bir çöküntü bulunur. Bu yapı, fetal dönemde iki kulakçık arasındaki kan geçişini sağlayan açıklığın kalıntısıdır. Sağ atriyumun iç yüzeyi, fossa ovalis ve pektinat kasların yüzeyi haricinde çoğunlukla pürüzsüzdür. Sağ ventrikülün iç yüzeyinde trabeculae carneae adı verilen uzunlamasına kas çıkıntıları bulunur. Trabeküller endokardiyum ile örtülüdür. Bu yapıların yanı sıra kalp kasından oluşan moderatör bant, ince yapılı sağ ventrikül duvarını sağlamlaştırır ve kardiyak iletim için önemlidir. İntraventriküler septumda başlayarak inferior papiller kasa bağlanır. Sağ ventrikül pulmoner artere açılır ve kasılma sırasında buraya kan pompalayarak akciğerlere kan gönderir.

Akciğerden oksijenlenerek pulmoner venler aracılığı ile kalbe geri dönen kan sol atriya dolar. Sol atriyum iç yüzeyinde pektinat kaslar mevcuttur (100). Bütün vücuda kan pompaladığı için, sadece akciğere kan pompalayan sağ ventriküle kıyasla çok daha büyük bir kas kitlesine sahiptir ve dolayısıyla çok daha kalındır. Sağ ventrikülden olduğu gibi sol ventrikül iç yüzeyinde trabeküller bulunur, ancak moderatör bantlar mevcut değildir. Sol

ventrikül, aort kapakçığı aracılığı ile aorta kan pompalar. Bu bileşkede iki küçük açıklık yolu ile kalbin kendi dolaşımına taşınan temiz kan sol ana koroner artere ve sağ koroner artere dolar.

Kalp duvarının dışında viseral ve parietal tabakalardan oluşan perikard kesesi bulunur. İçeride endokard, ortada miyokard ve dışta epikard tabakalarına ayrılır. Endokard tabakası yassı epitelden oluşur. Bu tabaka kalp odacıklarının içini ve kapakçıklarını kaplar. Bu tabaka, kalbe bağlanan ven ve arterlerin iç yüzeyini oluşturan endotel tabakasının devamı olup, miyokard yapısına ince bir bağ doku tabakası ile birleşir. Endokard tabakası, salgıladığı endotelin molekülleri ile miyokardın kasılmasında düzenleyici görev alabilir (97).

Kalp duvarının orta tabakasını miyokard oluşturur. Bu tabaka kalp kasıdır. İstemsiz kasılan çizgili kas ve kollajen ağından oluşmaktadır. Kalp kası yapısı karmaşık bir düzen gösterir. Kalp kası hücreleri birbirine bağlanırken dönüş ve spiral yapıları ile kulakçıkların duvarını ve büyük damarların başlangıç bölgesini oluşturur. Bu karmaşık spiralli yapı, kalp kasının, kanı daha etkili biçimde pompalamasını sağlamaktadır.

Kasılğan kalp kası hücreleri ve pacemaker hücreleri olmak üzere iki tip kalp kası hücresi vardır. Bu hücreler atriyum ve ventrikül hücrelerinin %99'unu oluşturur. Bu hücreler birbirlerine interkale disklerle bağlanır ve böylece pacemaker hücrelerinin gönderdiği aksiyon potansiyeli impulslarına hızlı yanıt verilebilmektedir. Kardiyomiyositler, interkale diskler aracılığı ile sinsityum oluşturur ve senkronize, hızlı kasılmalar ile kanın pompalanması sağlanabilir. Pacemaker hücreleri kalp hücrelerin %1'ini teşkil eder ve kalbin iletim sistemini oluşturur. Bu hücreler kasılğan hücrelere kıyasla daha küçüktür ve az sayıda miyofibril ile kasılma fonksiyonu gösterir. Aksiyon potansiyelinin iletilmesi açısından nöronlara benzeyen bir işlev gösterirler. Kalp kası otoritmik özellik gösterir. Hücreler, sabit ritimde aksiyon potansiyeli iletimi ile kalbin tamamının kasılmasını sağlar.

Perikard kesesi kalbi çevreler ve iki membrandan oluşur. İçerideki epikard tabakası seröz yapıdadır, dışarıdaki epikard ise fibröz özelliktedir. Vücudun geri kalanından kalbe ulaşan kan damarları ve sinirler kalp kasına epikard tabakasını geçerek ulaşır. Perikardiyal kavite perikardiyal sıvıyı içerir ve bu yolla kalbin yüzeyi kayganlaştırılır.

Vücuttaki tüm hücreler için olduğu gibi, kalp dokusu da oksijen, besin ve metabolik atıkların alışverişi için dolaşım aktivitesine ihtiyaç duyar. Kalp hücreleri koroner dolaşım

ile beslenir. Bu özel dolaşım sistemi arter, ven ve lenfatik damarlar içerir. Koroner dolaşım içindeki kanın akış debisi, kalbin kasılması ve gevşemesine bağlı olarak artar ya da azalır.

Kalp dokusu aort kapağının üzerinden itibaren başlayan sağ ve sol koroner arter ile kanlanır. Sol ana arter başlangıç bölgesine yakın bir noktada sol ön inen arter ve sol sirkumfleks arter olarak ikiye ayrılır. Sol n inen arter kalbin n tarafına, dış kısmına ve sol ventrikülün septumuna kan ulaştırır. Bunun için arter küçük arterlere ayrılarak diyagonal ve septal dallara ayrılır. Sol sirkumfleks arter kalbin arka yüzünün ve sol ventrikülün alt kısmının kanlanması sağlar. Sağ koroner arter, sağ atriyum, sağ ventrikül ve sol ventrikülün arka bölgesine kan ulaştırır. Sağ koroner arter, atriyoventriküler düğüm ve sinoatrial düğüme kan ulaştırır. Sağ koroner arter, kalbin arka yüzeyindeki bir oyuk içinde ilerler ve sol ön inen arter ise n yüzeydeki bir oyuk içinde uzanır. Kalbin koroner damarlarının yerleşimi açısından bireyler arasında önemli varyasyonlar görülür (96). Koroner arterler küçük dallara ayrılırken küçük çaplı arterler ile kalp dokusunun derinlerine ulaşır, uzak uçlarda arteryal dağıtım ağları birbiri ile birleşir.

Koroner sinüs, sağ atriyumun içine boşalan büyük bir vendir ve kalbin venöz drenajının çoğunluğu bu ven aracılığı ile gerçekleşir. Sol atriyum ve ventriküllerden geri dönen büyük kalp veni, sol ventrikülün arka yüzünden kan toplayan arka kardiyak ven ve ventriküllerin tabanından kan toplayan, orta kalp veni, diğer küçük venlerle beraber buraya açılır (26). n kardiyak venler sağ atriyumun n yüzeyinden gelen kanı toplayarak doğrudan sağ atriyum içine iletir.

Kalbin her üç tabakasının altında pleksus adı verilen küçük lenfatik ağlar bulunur. Bu ağlar solda ve sağda iki ana dala bağlanır. Atriyoventrikler oyukta, sol ventrikülün diyaframa bakan yüzünden gelen lenfi toplayan bir damarla birleşir.

Kalbin otonom innervasyonu, sempatik sinir gövdesinden dallanan vagus siniri yolu ile sinyal alır. Bu sinirler kalp ritmini etkiler ancak kontrol etmez. Bunun yanı sıra sempatik sinirler kalp kasılmasının kuvvetini etkiler. Bu sinirlerden aktarılan sinyaller medulla oblongata bölgesinden gelen mesajları taşır. Parasempatik sinir sisteminin vagus siniri kalbin atım hızını yavaşlatırken, sempatik gövdeden gelen mesajlar kalbin atım hızını arttırır. Bu sinirler beraber olarak kalbin üzerinde kardiyak pleksus adı verilen bir sinir ağı oluşturur (27).

Vagus siniri beyin kökünden köken alır, kalp dâhil olmak üzere toraks ve abdomen bölgesindeki birçok organ için parasempatik uyarım sağlar (29). Sempatik sinir gövdesinden çıkan T1-T4 torasik ganglionlarının uzantıları sinoatriyal ve atriyoventriküler düğümlere, atriyum ve ventiküllere ulaşır. Kalbin ventrikülleri ağırlıklı olarak parasempatik iplikçiklerde ziyade sempatik sinirlerle innerve olur. Sempatik uyarım sonucunda nopinefrin (noradrenalin) isimli nörotransmitter kardiyak sinirlerin nöromüsküler bileşim bölgesinden salınmaktadır. Bu durum, repolarizasyon sürecinin kısılmasını sağlayarak depolarizasyon ve kasılma aşamasını hızlandırarak kalp hızını artırır. Kimyasal ya da ligand-bağımlı sodyum ve kalsiyum iyon kanallarının açılmasını sağlar ve pozitif yüklü iyonların içe akışını sağlar. Norepinefrin beta-1 reseptörüne bağlanır (101,104).

Kalp, embriyogenez süreci içerisinde işlev gösteren ilk organ olup, üçüncü hafta içinde atım yaparak kan pompalamaya başlar. Bu işlev, embriyonik ve prenatal gelişim için önemlidir.

Kardiyojenik bölge, nöral plaka içindeki splanknoplörük mezenkimden köken alır. İki endokardiyal tüp, bu bölgede kaynaşarak ilkin kalp tüpünü oluşturur (105). Üçüncü ve dördüncü haftalarda kalp tüpü uzayarak katlanır ve perikardiyum içinde “S” biçimini alır. Bu şekil değişikliği ile odacıklar ve ana damarlar hizalanır. İlerleyen gelişim sürecinde septumlar, kapakçıklar ve kalbin odacıkları meydana gelir. Beşinci haftanın sonunda septumların gelişimi tamamlanmıştır. Dokuzuncu haftanın sonunda ise kapakçıkların oluşması süreci tamamlanır. Beşinci haftadan önce atriyumlar arasında fetal kalbe özgü foramen ovale isimli açıklık bulunur. Bu açıklık kanın sağ akciğeri baypaslayarak doğrudan sağ atriyumdan sol atriya geçmesini sağlar. Akciğer kanın oksijenizasyonu için kullanılmadığından gerekli bir özellik olan foramen ovale, doğum olayının sonrasındaki saniyeler içinde septum primum isimli doku flapının kapanması ile beraber kapanır ve akciğer dolaşımı başlar.

Zigot oluşumunun sonrasındaki 22 gün içinde kalp atmaya başlar. Annenin kalp atışına yakın bir tempo olan dakikada 75-80 atım yapar. 7. hafta, dakikada 165-185 atım mertebesine ulaşır ve doğum sonrasında ortalama olarak dakikada 145 atım hızında çalışır (106).

Gastrulasyon sırasında 3 ana germ tabakası oluşur. Mezoderm tabakası, ventral endoderm ve dorsal ektoderm arasında bulunur. Miyokardiyal öncül hücreler T-box transkripsiyon faktörü T (Brachyury) proteinini ifadeler. Bu hücreler, posterior epiblasttan köken alarak ilkin çizginin anterior pozisyonuna göç eder. Sonrasında bu hücreler yanal olarak hareket eder, embriyonik sölom oluşumu sırasında lateral splanknik mezodermin lateral bölgelerine yerleşir (107) kardiyak progenitörler orta hatta bir araya gelir ve hilâl biçimini alır. Hilâlin tepe kısmı kranial olarak konumlanırken, uçları kaudal yöne bakar. Altta yer alan ön bağırsak endoderminden prokardiyojenik sinyaller gelir, orta hat yapıları antikardiyojenik sinyaller üretir ve nöral plaka kalp alanlarının kesin büyüklüğünü ve biçimini belirler (108).

Çizelge 2.5. Kalbin gelişim aşamalarında görev alan önemli düzenleyiciler.

Embriyonik Aşama (gün)	Kardiyak Yarım Ay	Doğrusal Kalp Tüpü	Kıvrılan Kalp	Odacık ve Septum Oluşumu
Fare Embriyosu	7,5	8	9-12	10+
İnsan Embriyosu	15	20	28-30	32+
Önemli Düzenleyiciler	GATA4 ISL1 NKX-2,5 BAF60C MESP1/2 MEF2C	GATA4 TBX20 NKX-2,5 MEF2C TBX5	GATA4 MEF2C NKX-2,5 TBX5 HAND1/2	GATA4 PITX2 NKX-2,5 TBX1 TBX5

2.4.2. Kalp Hastalıkları, Konvansiyonel Tedavi Seçenekleri ve Yetersizlikler

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) verilerine göre, kardiyovasküler hastalıklar 2008 yılında toplam ölümlerin %30'una neden olarak dünya genelindeki ölümlerin başlıca sebebi olmuştur. Toplam 17 milyon kardiyovasküler nedene bağlı ölümün 7,3 milyonu koroner kalp hastalığı sonucu gerçekleşmiştir. 2030 yılına gelindiğinde, 25 milyon ölümün kardiyovasküler hastalıklardan kaynaklanacağı ve bu ölüm olaylarının %80'inin orta ve düşük gelirli ülkelerde gerçekleşeceği öngörülmektedir (109). Amerikan Kalp Derneği (AHA) verilerine göre, yaklaşık 300 milyon nüfusa sahip A.B.D.'de 2013 yılı itibarı ile 5,1 milyon kişinin kalp yetmezliği hastası olduğu ve kronik nitelikteki bu hastalığın can kayıplarına, iş gücü kayıplarına ve ~32 milyar dolarlık sağlık hizmetleri harcamasına yol açtığı saptanmıştır (110). Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) verileri dikkate alındığında, benzer biçimde, 2013 yılında ülkemizdeki toplam ölümlerin %39,8'ini dolaşım sistemine bağlı hastalıklar oluşturmaktadır (111). Bahsi geçen ölüm nedenlerinin başında gelen kalp

yetmezliği, temelde kardiyomiyosit kaybına dayanır. İnsan kalbinin sol ventrikülünde ~2-4 milyar kadar kardiyomiyosit bulunmakta olup, miyokard infarktüsü takip eden birkaç saat içerisinde bu hücrelerin ~%30'u kaybedilmektedir. Bunun yanında, hipertansiyon veya kalp kapağı hastalıkları gibi aşırı kardiyak yüklemeye neden olan kalp hastalıklarının, uzun yıllar boyunca yavaş ancak sürekli olarak kardiyomiyositlerin ölümüne neden olduğu bilinmektedir. Ayrıca yaşlanmaya bağlı olarak kalp yapısındaki değişim incelendiğinde, herhangi bir spesifik kalp rahatsızlığı olmaksızın yılda yaklaşık 1 gram miyokard dokusunun (~2 milyon kardiyomiyosite karşılık gelir) kaybedildiği ve bu nedenle kalp performansının düşerek kalp hastalığı olasılığının arttığı da bilinmektedir. Bu çerçevede, yapıdaki mevcut kardiyomiyosit popölasyonunun korunması ve/veya rejenerasyonu ile mevcut kalp yetmezliklerinin onarılması mümkün olabilir (112).

Günümüzde 5 milyondan fazla insan akut miyokard infarktüs sonrası kronik kalp yetmezliği ile yaşamaktadır, halen etkin bir tedavi seçeneği geliştirilebilmiş değildir (110). Günden güne artan nüfusla beraber yeni vakalardaki artış göz önüne alındığında, kardiyovasküler hastalıklar için etkili tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesi aciliyetini korumaktadır (113).

Günümüzde standart yaklaşım olarak çeşitli farmakolojik ve cerrahi tedavi yöntemleri ile miyokard rejenerasyonun kısmen arttırılması ve kalp yetmezliği belirtilerinin bir ölçüde hafifletilmesi amaçlanmaktadır. Farmakolojik olarak β -blokörler, ACE inhibitörleri ve benzer ilaçların kullanımı ile hasarlı kalp üzerindeki stres azaltılarak kalp yetmezliğinin ilerlemesi yavaşlatılabilmekte, ancak tam olarak tedavi edilememektedir. Dolayısıyla farmakolojik yaklaşımlar ile onarımın aksine, sürecin idamesi ve yan etkilerin azaltılması mümkün olmaktadır. İlaç kullanımına dayalı tedaviler semptomatik nitelikte olup, kullanılan ilaçlar belirtilerin %50-70'ini giderebilmektedir (11). Hastaların büyük çoğunluğu ömür boyu ilaç kullanmak durumunda olup, yan etki profili düşük yeni ilaç moleküllerinin geliştirilmesi kalp hastalıklarının tedavisi açısından her zaman önemini sürdüren, gerek hasta ve hasta yakınları, gerekse tedavi ve sigorta masraflarının büyük kısmını üstlenen ülkelerde kritik bir konudur (114).

Kardiyomiyositlerin laboratuvar koşullarında üretilmesi ile kalp hastalıkları için yeni tedavilerin geliştirilmesi, kalp gelişiminin çalışılması, kanser gibi farklı hastalıkların

tedavisinde kullanılmak üzere ilaç moleküllerinin kardiyotoksitesinin incelenmesi için gereklidir. İnsandan farklı bir metabolizmaya sahip bir deney hayvanında yapılacak laboratuvar çalışmalarına kuvvetli bir alternatif olarak ortaya çıkmıştır. Kardiyomiyositler, ilaç moleküllerinin yan etkilerine, çeşitli moleküllerin ortaya çıkarabileceği toksik etkilere karşı hassastır. Buna ek olarak doğuştan gelen genetik ve epigenetik özelliklere göre farklı bireylerin çeşitli gen-bazlı veya konvansiyonel ilaç moleküllerine karşı farklı metabolik tepkiler verebileceği bilinmektedir. İnsan kalbindeki belirli bir hastalığın laboratuvar koşullarında düşük maliyetle çalışılabilmesini sağlayacağından “tüpte kalp” uygulamaları, temel tıp araştırmalarında, farmakoloji ve biyoteknoloji alanlarında önem taşımaktadır. Kardiyomiyositlerin yüksek verimde ve standartlarda in-vitro üretimi, kişiye özgü tedavi seçeneklerinin oluşturulabilmesinin önünü açmıştır (14).

İlaç geliştirme sürecinde hayvan modellerinin kullanılması ile ilaç adayları moleküllerin piyasaya sürülme ve ileri geliştirme basamaklarında hayati tehlike yaratan başarısızlıklara yol açılması mümkündür. Bunun sebebi insan ile model canlı arasında kardiyak fizyoloji açısından uçurum niteliğindeki farklılıklardır (115). Yakın zamanlarda, kalbe yönelik toksik etkileri, ani kardiyak ölüm, kalp üzerinde aritmik ve apoptotik etkileri sebebi ile piyasadan çekilen kilo kaybı (sibutramin), ağrı kesici (propoksifen) ve anti-enflamatuvar (rofekoksib) ilaç molekülleri, ilaç geliştirme sürecinde insan kardiyomiyosit hücre hatları yerine, model organizmanın veya sıkça yapıldığı gibi insan embriyonik böbrek hücrelerinin kullanılmasının sakıncalarını göstermektedir (13). Bir ilaç molekülünün geliştirme sürecinde yapılan harcamaların ortalama olarak 1,5 milyar ABD doları düzeyinde olması, geliştirilen bir ilacın uygun platformda değerlendirilmesinin gerekliliğine işaret etmektedir (16,17).

İlaç yaklaşımlarının yetersiz kaldığı vakalarda cerrahi yaklaşımlar ele alınır. Koroner arter baypas greftleme yolu ile koroner arter tıkanıklığının miyokard üzerinde hasar yaratması engellenebilmektedir. Enfarktüs oluşması durumunda ise miyokardın revaskülarizasyonu yapılsa da, bu işlemin uygulanabilirliği ventrikül doku alanı/miktarı ile sınırlı kalmaktadır. Dolayısıyla, orta veya şiddetli miyokard infarktüs sonrasında ventrikül fonksiyon bozukluğu uygulanan ilaç tedavileri ve/veya cerrahi işlemlerle oluşması halinde tamamen iyileşme sağlanması mümkün değildir.

İleri dönem kalp yetmezliğinin nihai tedavisi sol ventrikül destek cihazı kullanımı veya kalp naklidir. Destek sistemleri, hayatta kalma süresini uzatabilmekte ise de, kullanım süresince artan tromboz, enfeksiyon, gastrointestinal kanama ve organ yetmezliği gibi riskler kullanımını önemli ölçüde sınırlamaktadır. Dolayısıyla destek sistemleri, uzun süreli tedavi seçeneğinden daha çok nakil zamanına kadar bir köprü/idame aracı olarak kullanılmaktadır. Kalp yetmezliği bulunan ve nakle ihtiyaç duyulan hasta sayısındaki artış göz önüne alındığında, kalp nakli tek tedavi seçeneği olarak sunulmaktadır. Dünya genelinde her yıl yaklaşık 4.000 hasta ile sınırlı kalan kalp nakli seçeneği (116), sayıları hızla artan kalp nakli bekleme listelerindeki onbinlerce insanın tedavi edilemeden hayatlarını kaybetmelerini engelleyememektedir. Ayrıca, son aşamadaki kalp yetmezliği olan hastaların durumu çoğunlukla kalp naklinin yapılmasına engel teşkil edebilmektedir (117). Dolayısıyla kalp hastalıklarına bağlı gerçekleşen ölümlerdeki artış ve geleneksel yöntemlerin sınırlamaları/dezavantajları göz önüne alındığında, bu yaklaşımın artan hasta nüfusunun ihtiyaçlarını karşılamadığı, can kayıplarının çoğunu önlemediği, tedavi masrafları ve iş gücü kayıplarından ötürü sigorta sistemlerine büyük yükler getirdiği açıktır.

Onarımsal tedaviler, mevcut tedavilerin aşamadığı kısıtlamaları aşmak, tedavi masraflarını düşürmek ve yeni tedavilerin daha yüksek sayıdaki hasta grubuna nakil aşamasına gelmeden fayda sağlamayı amaçlamaktadır. Kalp yetmezliği vakalarının ilerlemesini önlemek amacı ile geliştirilen onarımsal tedavilerin iki önemli keşif alanı bulunmaktadır. Bunlardan birincisi, hücresel kitlenin yeniden kazanılmasıdır. Bu amaçla kök hücre üretimi, kullanışlı bir kök hücre tipinin seçilmesi, yüksek miktarlarda ve güvenilir biçimde bu hücrelerin elde edilmesi gereklidir. İkinci önemli alan ise kalpte mesaj iletimini engellemeyen, kalbe özgü mekanik direngenlik ve esneklik gibi özellikleri destekleyebilen ve rejenerasyon sürecine aracı olabilecek biyomalzemelerin geliştirilmesidir. Bahsedilen ihtiyaçlar ışığında, bu tez çalışması, hücresel tedaviler ve ilaç geliştirme çalışmalarına katkı sağlayabilecek kök hücre üretimi ve kalbe özgü farklılaşmayı ve onarımı destekleme olasılığı bulunan bir biyomalzemenin geliştirilmesi amaçlanmıştır.

2.4.3. Çalışmada İncelenen Genlerin İşlevi ve Önemi

TBX5 geni (T-box 5), alternatif eşleşme ile 5 transkripte kaynak olmaktadır. Bu genin ürünü olan Tbx5 proteini transkripsiyon regülatörü olarak görev alır. Diziye özgü DNA bağlanma özelliği ile RNA polimeraz II regülatörü, transkripsiyonal aktivasyon, transkripsiyon faktörü bağlanması işlevi gösterir. TBX5 geni insanda bütün doku tiplerinde ifadelenmekle beraber, kalp dokusunda diğer dokulara kıyasla yüksek oranda ifadelenmektedir(118-120).

Brachyury T gen ailesinde sınıflandırılan bir transkripsiyon faktörü olan TBX5 geninin ürünleri epitel morfogenezi, hücre-hücre etkileşimi, uzuv gelişimi, akciğer gelişimi gibi kalp oluşumu ile doğrudan ilişkili olmayan gelişimsel işlevlere sahiptir. TBX5 delesyonu, erken dönem kalp gelişimini sağlayan NKX2-5 ve GATA4 ifadesinde ciddi düşüşe sebep olduğundan embriyonik aşamada letal özellikli bir mutasyon olma özelliği taşır (118,120). Buna karşın, kalp gelişimi ile ilgili işlevleri ağırlıklıdır ve bu işlevler kalp oluşumu için zorunludur. Bunlar arasında: *His* demetlerinin gelişimi, atriyoventriküler kapakçık gelişimi, endokardiyal yastık gelişimi, sol ventrikül oluşumu, ventriküler kardiyak kas oluşumu, ventriküler septum oluşumu, atriyal septum oluşumu, genel kalp oluşumu, kardiyak hücre farklılaşması, kardiyomiyosit proliferasyonu, ikincil kalp alanında kardiyoblast proliferasyonu, perikard gelişimi, koroner vaskülogenez sürecinde hücre göçü ve kardiyoblast farklılaşmasının düzenlenmesi TBX5 gen ürünlerinin en önemli işlevleridir (108,121).

CDH2 geni, N-Cadherin olarak da adlandırılan Cadherin 2 proteinini kodlar. Bu genin ürünü kalsiyum iyonu bağlanması, protein kinaz bağlaması, katenin türevlerinin bağlanması işlevlerini gösterir. Kalsiyum-bağımlı hücre tutunma proteinleri ailesi olan cadherinler, homofilik biçimde diğer cadherin protein molekülleri ile etkileşerek hücreler arası bağlantıların kurulmasını sağlar (122,123). Bu özelliğinden dolayı heterojen hücre karışımlarında spesifik bir doku tipine ait hücrelerin ayırt edilmesi için kullanılabilir. Diğer biyolojik işlevleri arasında adherens bağlantılarının organizasyonu, beyin morfogenezi sayılabilir. İfadelenen protein, interkale disklerin yapısında, fascia adherens ve fokal adhezyon yapısında bulunabilmektedir. Yüksek yoğunluklu oligonükleotit array çalışmaları ile gerçekleştirilen dokuya özgü ifade

analizleri, CDH2 geninin kalp kasında ve düz kas dokusunda yüksek biçimde ifadelendiğini gösterir (123,124).

GJA1 geni, konneksin 43 (Cx-43) olarak da adlandırılan gap junction alfa 1 proteini kodlar (125). Gja1 proteini sinyal iletim aktivitesi, transmembran transportör aktivitesi, iyon transportu, diğer konneksin proteini moleküllerine bağlanma işlevlerinin yanı sıra kardiyomiyositlerin elektriksel eşleşmesi, sinyal iletimi ve hücre iletişimi için gerekli olan *gap junction* kanal aktivitesini sağlar (126,127). Gap junction ve konneksin kompleksinin varlığı orta ve ileri dönem kalp farklılaşması açısından ayırt edici protein belirteçlerden birisidir. Endotel hücre proliferasyonunun regülasyonu, hücre iletişimi, hücreler arası bağlantı, taşıma, kalp gelişimi, kardiyak hücre proliferasyonu, mekanik uyartıya verilen yanıt başta olmak üzere çok sayıda dokuda işlevleri bulunmaktadır (126). Literatürde, kardiyak-spesifik bileşenlerle birlikte ifadelenmesi durumunda kalp hücrelerine farklılaşma ile ilgili bir indikatör olarak kabul edilmektedir.

MYH7 (myosin heavy chain 7) geni miyozin ağır zincir 7 proteinini ifadeler. Miyozin molekülü protein iki ağır zincir, iki alkali hafif zincir ve iki regülatör hafif zincir altbiriminden oluşur (128). MYH7'nin son ürünü, kardiyak miyozinin beta zinciri olarak adlandırılan yavaş kasılan ağır zinciridir. Ağırlıklı olarak sağlıklı insanda kalbin ventrikül bölgesinde ifadelenir. Yavaş kasılma özelliği bulunan tip 1 iskelet kası iplikçiklerinin yapısında da bulunmaktadır. İfadelenme miktarındaki bağıl farklılıkların derecesi kalp kasının kasılma hızı ile korelasyon gösterir. MYH7 genindeki mutasyonlar ailesel hipertrofik kardiyomiyopatiye, dilate kardiyomiyopatiye ve bazı kardiyak miyopati tiplerine sebep olur (129). Myh7 proteininin moleküler işlevleri arasında, motor aktivite, aktin bağlanma, kalmodulin bağlanması, ATP bağlanması ve mikro-iplikçik motor aktivitesi sayılabilir. MYH7 gen ürününün biyolojik işlevleri arasında yetişkin kalp gelişimi, kalp hızının düzenlenmesi, kalp atım kuvvetinin düzenlenmesi, ATP metabolizasyonu, kalp kası ve iskelet kasının kasılması, kalp ventrikülünün morfogenez ve stres yanıtı olarak kardiyak hipertrofi gelişimi sıralanır (130). Kardiyak sarkomer yapısında miyozin kompleksinde, miyofibril yapısında ve Z-disk yapısındaki varlığından ötürü kalbin kasılma aparatı bileşenlerinin ifadelenmesini sağladığından kalp farklılaşması açısından ileri dönem bir belirteç olarak görülebilir.

MYL7 geni miyozin hafif zincir 7 proteinini kodlar. Miyozin molekülü, iki miyozin ağır zincirinden ve dört miyozin hafif zincirinden oluşan bir hekzamerdir. Hafif zincirlerin ikisi regülatör özelliklidir (örneğin, MYL7), bunlara ek olarak 2 adet bazik hafif zincirden meydana gelir. Myl7 proteini kalsiyum ve protein bağlama özelliğine sahiptir (131). MYL7 yalnızca kalpte ifadelenen bir gen olması sebebi ile kardiyak farklılaşmanın önemli bir işaretçisi olarak yaygın biçimde kullanılmaktadır. Sitoplazmik bir protein olan MYL7 kardiyomiyosit sarkomerinde A bandında bulunduğundan kasılmayı sağlar ve olgunlaşmış kardiyomiyosit fenotipinde mutlaka bulunması gereken bir hücresel elemandır (132,133).

Memelilerde aktin proteininin alfa, beta ve gama olmak üzere üç farklı izoformu vardır. ACTA2 (alfa aktin 2, aortik düz kas aktini) geni aktin protein ailesinin bir üyesidir. Diğer alfa aktin tiplerinde olduğu gibi kasılma aparatında yer alır. Hücre hareketinde ve yapısal bütünlüğün sağlanmasında çalışır (134). ACTA2, aort düz kas aktin proteini olarak adlandırılrsa da kalpte, retinada, akciğerlerde ve istemsiz kas dokusunun bulunduğu uterusda ifadelendir. ATP bağlama ve protein kinaz bağlama özelliği ile kasılma sürecinde görev alır. ACTA2 gen ifadesinin varlığı kas dokusuna farklılaşma olduğunu göstermektedir. Beraberinde yalnızca kalbe özgü genlerin ifadelendiği göz önüne alındığında kasılma aparatına sahip bir kalp hücresine farklılaşma olduğu yorumu getirilebilir (135,136).

Troponin I, troponin proteinin inhibitör altbirimini oluşturur. Aktin bağlanma özelliği, kalsiyum kanal inhibitör özelliği, metal iyonu bağlama ve troponin C ve T bağlama özelliği bulunmaktadır. Kalp kasılmasında, kalsiyum homeostazında, kalp gelişiminde, kalp kasılmasının regülasyonunda ve ventriküler kalp kası morfogenezinde görev alır (137). Troponin I yalnızca kalpte ifadelenen bir izoform olduğundan, gen ekspresyonu düzeyinde varlığı kalp hücresine farklılaşma açısından kesin bir göstergedir. Kalp ve kasa özgü diğer genlerin ifadesi ile beraber değerlendirildiğinde kalp hücresine farklılaşma olduğunu göstermektedir (138).

Brachyury T geninin (Gen simgesi T, bazı kaynaklarda kolay anlaşılması için Bry kullanılır) protein ürünü diziye özgü DNA bağlama, RNA polimeraz II aktive edici transkripsiyon faktörüne bağlanma, transkripsiyon baskılayıcı aktivite özellikleri gösterir. Embriyonik bir transkripsiyon faktörüdür. Mezoderm oluşumu ve farklılaşmasından sorumlu genlerin transkripsiyonal regülasyonunda görevlidir. T bölgesi adı verilen

palindromik diziye bağlanarak gen transkripsiyonunu aktive eder. Görev aldığı birçok gelişim ve farklılaşma mekanizması arasında öne çıkanlar, mezoderm oluşumu, somit oluşumu nöral, tüp kapanması, notokord oluşumu, kalp morfogenezi, temel Wnt sinyal yolağı, anatomik yapının morfogenezi, başlangıç çizgisi oluşumu ve kalbin sağ-sol asimetrisinin oluşumu sayılabilir. Kardiyak progenitör indikatörü olan Mesp1'in ifadesini indükler ve kalp oluşumu ile ilişkili transkripsiyon faktörlerinin ifadenmesini sağlar (139,140).



3. GEREKÇE VE AMAÇ

Bu tez çalışmasının başlıca amacı, adipoz kök hücreleri kaynak olarak kullanarak kardiyomiyosit karakterli hücrelerin yüksek miktarlarda üretilmesi için yeni bir yöntem geliştirmektir. Bu amaçla üç farklı yöntemin kombinasyonları, hücre kültürü koşullarında sistematik biçimde uygulandı ve sonuç olarak elde edilen hücreler kardiyak gen ifadesi açısından incelenerek yöntemlerin ve kombinasyonlarının etkinliği sınandı.

Kullanılan değişkenlerden birincisi, literatürdeki çalışmalarda adipoz kök hücrelerin kardiyak yönde farklılaşması amacı ile daha önce kullanılmamış olan üç boyutlu mikroyerçekimi kültürü koşuludur. Bu amaçla öncelikle iki boyutlu standart koşullarda kültürü yapılan insan adipoz kök hücreler, yeterli sayıya ulaşılmasını takiben üç boyutlu mikroyerçekimi kültürü ortamına aktarılmıştır. Bu yaklaşımın kullanılmasındaki gerekçeler; yerçekimi ivmesinin ihmal edilebilir düzeyde düşük olduğu koşullarında hücrelerin küresel öbekler oluşturması, bir yüzeye temas halinde olmayan hücrelerin her yönden besin ve çözünmüş gaz transferi yapabilmesi, biyoreaktör ortamında temas inhibisyonunun toplam hücre sayısını sınırlamaması, yüzey bağımlı olmayan hücrelerin tutunma için metabolik enerji harcamaması olarak özetlenebilir.

İkinci değişken olarak, kardiyomiyojenik indüksiyona maruz bırakılan hücrelerin kültüründe, literatürde daha önce adipoz kök hücrelerin kültürü için uygulanmamış olan kardiyak besi ortamı kullanılmıştır. Kardiyak besi ortamı, kardiyak progenitörlerin eksplant ve izolasyon sonrasında fenotipik karakterlerin korunması amacı ile kullanılmaktadır. Bu çalışmada kombine edilen besi ortamı, mikroyerçekimi koşulları ve elastin mikroküre taşıyıcılar ile kalp-benzeri bir çevresel uyarım sağlanması amaçlanmıştır.

Kullanılan üçüncü değişken ise biyolojik kaynaklı elastik hidrojel taşıyıcılar varlığında kültürün farklılaşma üzerine etkisidir. Bu amaçla sentezlenen doğal alfa elastin kaynaklı hidrojel mikroküre yapısındaki materyal, bu tez çalışması kapsamında geliştirilerek karakterize edilmiş olup, mekanik çevresel etkilerden faydalanarak kardiyak farklılaşmaya veya edinilen kardiyak karakterlerin korunmasına katkıda bulunması amacı ile kullanılmıştır.

Yukarıda bahsedilen amaca yönelik olarak gerekçelendirilen deney aşamaları, iki boyutlu ve üç boyutu kültür koşullarında üç farklı gruptan oluşan deney planı içinde uygulanmıştır. İki boyutlu kültür koşullarında elde edilen hücreler üzerinde kardiyak farklılaşmanın hücresel düzeyde incelenmesi amacı ile immünohistokimyasal analizler gerçekleştirilmiştir. Deneyler sonunda elde edilen hücre peletleri, kantitatif eş-zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu ile gen ifadesi analizi yapılması amacı ile kullanıldı. Genler, erken, orta ve geç dönem kardiyomiyosit belirteçleri olmak üzere üç grupta incelendi. Bu amaçla literatürdeki kardiyak farklılaşmayı inceleyen çalışmalar dikkate alınarak; embriyonal dönemde kalp öncülü hücrelerde ifadelenen transkripsiyon faktörleri, yalnızca kalp dokusunun kasılma aparatı içinde ifadelenen belirteçler ve geç dönem belirteci olarak kardiyomiyosit hücre zarında bulunan kanal proteinlerine ilişkin genlerin ifadelенmesi incelendi. Elde edilen gen ifadesi analizi bulguları, gruplar arası bağıl gen ifadesi kıyaslaması yapılarak değerlendirildi.

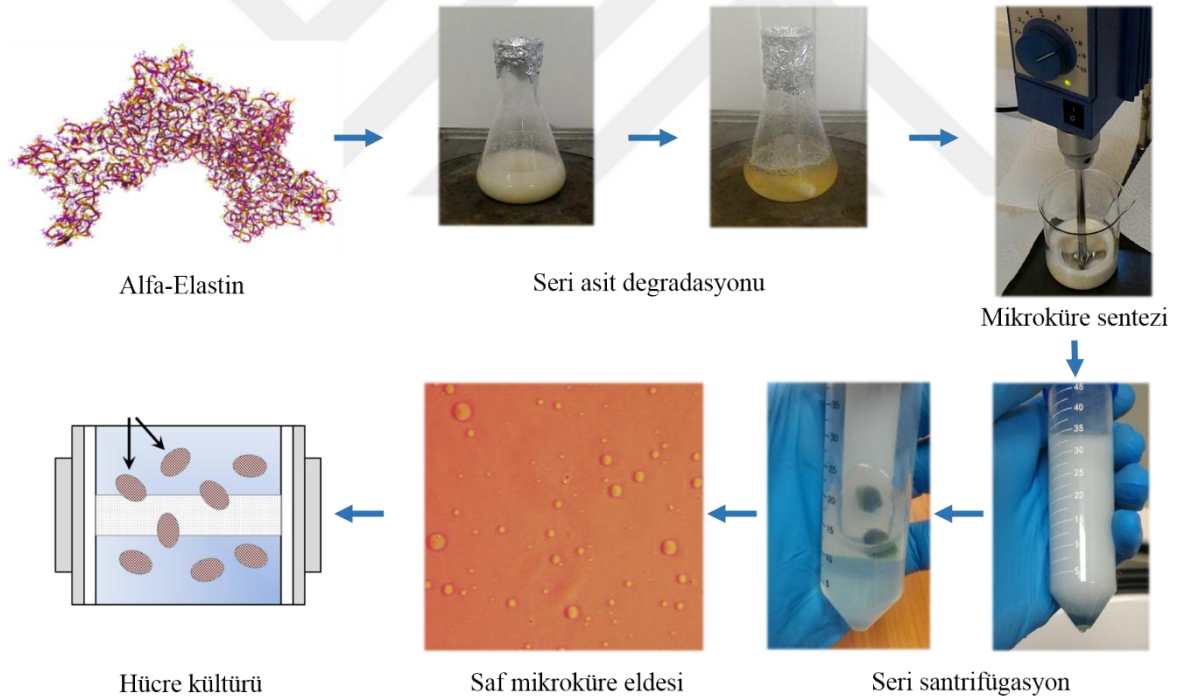
4. MATERYAL VE YÖNTEM

4.1. MATERYAL

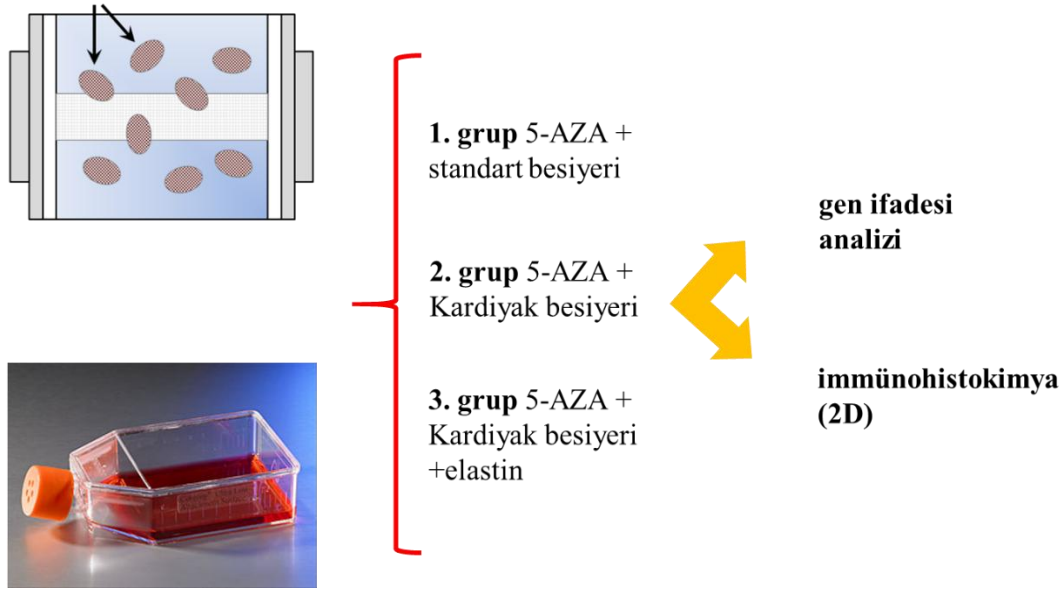
Kullanılan başlıca kimyasalların deney süresince tutarlılık ve tekrarlanabilirlik sağlaması amacıyla aynı marka ve lot numaralı ürünlerden olmasına dikkat edilmiştir. Kitler Roche (Almanya) ve Invitrogen (ABD)'den temin edilmiştir. Genel laboratuvar kimyasalları için Sigma Chemical Co. (St Louis, ABD), Merck (Darmstadt, Almanya) kullanıldı.

4.2. YÖNTEM

Şekil 4.1 ve 4.2'de şematize edilen deney aşamaları sonraki başlıklarda detaylı olarak sunulmuştur. Alfa-elastin temelli hidrojel mikrokürelerin sentezinin şematik sunumu şekil 4.1'de yer almaktadır. İki boyutlu ve üç boyutlu hücre kültüründe gerçekleştirilen deney basamaklarının organizasyonu şekil 4.2'de şematize edilmiştir.



Şekil 4.1. Elastin mikrokürelerin sentez aşamaları.



Şekil 4.2. İki ve üç boyutlu hücre kültürü gruplar ve analiz basamakları.

4.3. ELASTİN MİKROKÜRELERİN SENTEZİ

4.3.1. Mikroküre Sentezi Protokolünün Geliştirilmesi

Optimizasyon aşamasında etkinliği sınanan yöntemler arasında yağ içinde su emülsiyon tekniğinin örnek alındığı yaklaşım, amaca yönelik olarak modifiye edilerek uygulanmıştır. Kollajen mikrokürelerin oluşturulması esasına dayanan benzer nitelikli bir çalışma göz önünde bulundurularak optimizasyon aşamasında emülsiyon ile eş zamanlı olarak EDC/NHS sistemi ile çapraz bağlama optimize edilmiştir (141). Sıvı parafin yağının sıvı faza oranının ve çapraz bağlama için uygun protein konsantrasyonunun belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu çalışmada sürfaktan olarak kullanılan span 80'in elastin mikroküre sentezi için uygun nitelikte olmadığı tespit edilmiştir. Bir diğer yöntem olarak etkinliği denenilen yaklaşımda, span 20'nin, sürfaktan olarak elastin çapraz bağlaması için ideal sonuç verdiği görülmüştür. Bu amaçla sürdürülen çalışmalarda span 20'nin optimal konsantrasyonunun saptanması amaçlanmıştır (142). Yıkama için PBS tamponunun önerildiği bu çalışma dikkate alınarak, EDC/NHS sistemi ile çapraz bağlanma sonrasında PBS kullanılması protokole eklenmiştir (143). Protein yapıdaki mikropartiküllerin sentezi için glutaraldehit çapraz bağlayıcı olarak kullanılması denenmiştir. Elde edilen mikrokürelerin hücre kültüründe toksisite yapma olasılığı yüksek olduğundan bu yöntem terkedilmiştir (144). Mikrocamlştırma yöntemi yeni ortaya atılan bir yöntemdir. Yağ fazı olarak dekanol gibi viskozitesi yüksek alkol çözeltilerinin kullanıldığı bu yöntem, suda

çözünmüş protein çözeltilerinin çapraz bağlayıcı ile mikroküre oluşturmada kullanımını önermektedir. Ancak yapılan deneylerde, bu sistemin etkinliğinin yeterli olmadığı gösterilmiştir (145,146) Elastin proteinin degradasyonu amacı ile geliştirilen az sayıda yöntemden birisi olan (147,148) oksalik asit degradasyonu Partridge tarafından 1955 yılında önerilmiştir. Elde edilen çözünmüş proteinin koaservasyon özelliği üzerinde durulan bu çalışma ışığında, suda çözünme özelliği bulunmayan alfa elastinin sulu çözeltilere katılması sağlanmıştır. Şekil 4.1’de gösterilen seri asit degradasyonu basamağı bu esasa dayanmaktadır. Koaservasyon, sulu çözeltiler içinde hidrofobik etkileşimler sonucunda bir arada tutulan küresel agregatların oluşması sürecine verilen isimdir. Bu tez çalışmasında da elastin proteinin çözünür hale getirilmesi Partridge yöntemi modifiye edilerek gerçekleştirilmiştir. Elastinin koaservasyon özelliği mikrokürelerin sentezi amacı ile uygulanmış ancak sonuç alınamamıştır (149). Buna ek olarak bu çalışma kapsamında önerilen ve rutinde kullanılan sonikasyon yolu ile homojenizasyon yönteminin, elastin proteinin kohezyon kuvvetlerinin yüksek olması sebebi ile deney düzeni için uygun olmadığı saptanmıştır (148,150). Suda çözünmüş degrade elastinin hidrojel forma getirilmesi ile ilgili yaklaşımlar değerlendirilerek, optimal tuzluluk, ve tampon pH’sı ile ilgili denemeler gerçekleştirilmiştir (151). Partikül yüzeyinde gözeneklilik sağlayan yöntemler değerlendirilerek yüksek basınç altındaki CO₂ son ürün üzerine etkisi incelenmiştir. İkili sürfaktan kombinasyonları, düşük pH altında gerçekleştirilen çapraz bağlama reaksiyonları göz önüne alınarak mini emülsiyon tekniğinde tercih edilen elastin konsantrasyonları denenmiştir (152). Kimyasal çapraz bağlayıcıların kullanılmadığı yaklaşımlar göz önüne alınarak 37°C’de uzun süreli inkübasyonlar uygulanmıştır, ancak degrade elastinin mikroküre formunda polimerize olması mümkün olmamıştır (153,154).

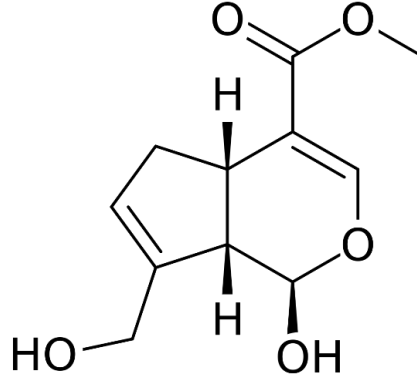
4.3.2. Etkinliği İspatlanmış Aşamalar Işığında Geliştirilen Yöntem

Önceki kısımda aktarılan denemeler ışığında geliştirilen yöntemle karşılaşılan sorunlar aşılmıştır. Degradasyon yöntemi Partridge’in 1955 (148) makalesinde kullanılan yöntemden modifiye edilmiştir. Sığır boyun ligamentinden saflaştırılan alfa-elastin (Sigma, ABD) 0,25M oksalik asit (Merck, ABD) çözeltisi içerisine eklendikten sonra ısıtıcı karıştırıcıda kaynama noktasına getirilmiştir. 1 saat süre ile karıştırılan solüsyon hemen buza geçirilip hızlıca soğutulmuştur. Karışım çöktürüldükten sonra, süpernatant ayrıldı. Pelet oksalik asit çözeltisinde tekrar süspanse edilerek sonraki ısıtma döngüsü başlatıldı.

Degradasyon aşaması buza geçirilerek durdurulduktan sonra, elde edilen süpernatant, önceki döngü sonunda elde edilen süpernatant ile birleştirilmiştir. Elde edilen pelet fraksiyonu ile sonraki döngü başlatıldı. Bu biçimde kaynama sonunda katı madde elde edilmeyene dek döngüler tekrarlandı. Deneyler kapsamında 3-5 döngü içerisinde katı maddenin tamamı degrade olarak sıvı çözelti halinde elde edilmiştir. Döngüler sonunda biriktirilerek elde edilen süpernatant 72 saat süresince distile suya karşı diyaliz edildi. Diyaliz amacı ile 14,000 kDa molekül ağırlığı cutoff derecesine sahip diyaliz membranı kullanılmıştır. Diyaliz sonucunda elde edilen su içinde degrade elastin çözeltisinin protein konsantrasyonu Lowry yöntemi ile ölçülmüştür.

Küresel yapıda elastin temelli mikroparçacıkların sentezlenmesi amacı ile yağ içinde su emülsiyon tekniğinden faydalanılarak çapraz-bağlama reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Yağ fazı yüksek saflıkta sıvı parafin yağından oluşmuştur (Merck, ABD), sulu faz ise tampon solüsyon, protein çözeltisi ve çapraz-bağlayıcıdan oluşmuştur. Sürekli karıştırılan reaksiyon ortamına öncelikle parafin yağı eklenerek karıştırma başlatıldı, sonrasında sırası ile protein çözeltisi ve çapraz-bağlayıcı eklenmiştir. Sürekli olarak 1200 rpm devirde karıştırma sonucu yağ fazı içinde oluşan mikrodamlar, karıştırma süresinde çapraz bağlanmaya maruz kaldığından mevcut formunda kalıcı yapılar oluşturmaktadır. Reaksiyon durdurulduktan sonra yapılan ayırıştırma aşamalarından sonra hidrojel yapıda mikroküreler elde edilmektedir. Araştırma-geliştirme aşamalarında; reaksiyon süresi, çapraz-bağlayıcı tipi, su fazı miktarı, yağ fazı miktarı, yağ fazı tipi, tampon sistemi, protein konsantrasyonu, reaksiyon durdurma yöntemi, ortam sıcaklığı, rpm, santrifüjasyon hızı ve süresi, liyofilizasyon yöntemi değişkenlerinde farklı seçenekler denenerek optimal sentez yöntemine ulaşılmıştır.

Genipin molekülü bilimsel literatürde protein yapısındaki moleküllerin çapraz-bağlanma reaksiyonlarında kullanılmaktadır. PBS çözeltisi içerisinde bulunan nükleofil OH^- , halka yapıdaki genipin molekülüne atak yaparak halkayı açar. Oluşan aldehit grupları aldol kondansasyonu aracılığıyla proteinlerin $-\text{NH}_2$ gruplarına bağlanmış olan ve açığındaki genipin molekülleri arasında polimerizasyona sebep olur. Genipin molekülleri bu yolla amino grubu içeren bileşiklerle bağlanarak ve diğer genipin molekülleri ile polimerizasyona uğrayarak uzun mesafeli intermoleküler çapraz-bağlar oluşturur (155).



Şekil 4.3. Genipin molekülünün yapısı.

Yağ fazı yüksek saflıkta sıvı parafin yağından oluşmuştur (Merck, ABD), sulu faz yoğunlaştırılmış degrade protein çözeltisi, %50 etanol içinde genipin çözeltisi karışımını içermektedir. 1200 rpm hızla karıştırılan (IKA RW16, Almanya) 40mL parafin yağının içine “tip streaming” tekniği ile 3-5 dakika süre içerisinde yavaş pipetaj ile eklenen 3.5 mL yoğunlaştırılmış degrade elastin çözeltisi, 10 dakika süre ile parafinle karıştırılır. 0,2 g/mL konsantrasyonunda 1,5 mL %50 (V/V) etanol içinde çözünmüş genipin, 3-5 dakika süre içerisinde “tip streaming” ile çözeltiye eklendi. 3 saat süre ile aynı devirde karıştırılan ortama bu süre sonunda 50 ml %70’lik etanol solüsyonu eklenerek reaksiyon durduruldu. Yağ fazının eliminasyonu için 5 dakika süre ile 27 derecede 4750 rpm (Beckman Coulter, CA, ABD) santrifügasyon yapılarak süpernatant atıldı. Sonrasında 0,2M pH 7,4 Tris tamponu içerisinde (Sigma) 15 dakika süre ile 27 derecede 4750 rpm hızda santrifügasyon yapıldı. Süpernatant atılmıştır ve aynı işlem Tris tamponu ile iki defa, distile su ile 3 defa tekrarlandıktan sonra pelet -80°C’de dondurulduktan sonra liyofilize edildi (Christ, ALPHA 1- 4 LD plus, Osterode am Harz, Almanya). Kültür aşaması öncesinde, hazırlanan malzeme 1 saat süre ile laminar akış kabininde UV lambası (254 nm) altında sterilize edildi.

4.4. ELASTİN MİKROKÜRELERİN KARAKTERİZASYONU

4.4.1. Faz-Kontrast Görüntüleme ve Boyut Dağılımı

Elde edilen liyofilize haldeki mikroküre örnekleri farklı distile su, PBS tamponu, karbonik asit tamponu, Tris-HCl çözeltisi gibi farklı çözücü ortamlarda, 25 ve 37°C sıcaklıklarda yeniden solüsyona katıldıktan sonra küre büyüklüğü, degradasyon olup olmadığı, şişme

hızı değişkenlerinin incelenmesi amacı ile faz kontrast mikroskop görüntüleme tekniğinden yararlanılmıştır. Görüntüler AxioVision Rel. 4.8 ve ImageJ programları ile dijitalize edilerek, küre büyüklükleri ve boyut dağılımları ölçülmüştür.

4.4.1.1. Atomik Kuvvet Mikroskop Görüntüleme

Elde edilen mikroküreler, su ortamında yeniden süspanse edildikten sonra mikropipet aspirasyonu tekniği ile atomik kuvvet mikroskop görüntüsü elde edildi. Kullanılan prob tipi Hertz Cone modeli prob ucu kullanılarak 5,15 N/m yay sabiti ile yapılan ölçümlerde su kolonu oluşturulması sonrasında yapılan 3 tekrarlı ölçümde ortalama elastik modül değeri ölçüldü.

4.4.1.2. Taramalı Elektron Mikroskobu Görüntüleme

Analiz öncesinde örnekler, mikroküre sentezi sonrasında elde edilen pelet formundaki örnekler, 5 nm kalınlığında altın tabaka ile kaplandı. Farklı büyütme değerlerinde FEI Instruments Quanta 400F (Oregon, A.B.D.) model taramalı elektron mikroskop cihazı ile mikrograflar, 10 kV voltaj altında elektron bombardımanı ile tarama yapılarak elde edildi.

4.4.1.3. Yüzey Yükü Analizi

Zeta potansiyel analizi partiküller arasındaki itme veya çekme değerinin ölçülmesi amacı ile gerçekleştirilmiştir. Belirli bir yüzey yüküne sahip partiküller, süspansiyon içerisindeki karşıt yükteki iyonları çekerek, partikül yüzeyinde bir bağ yüzeyi oluşmasına sebep olmaktadır. Bu yüzeyin oluşturduğu konveks alana kayma yüzeyi adı verilir. Dolayısıyla partiküllerin solüsyon içerisindeki davranışları aminoasit bileşiminden ileri gelen yüzey yükü yerine, yüzey yapısı ve solüsyonla ilişkisi tarafından belirlenen zeta potansiyeli değeri tarafından belirlenir. Bu amaçla MALVERN Nano ZS90 Zeta potansiyel EV mobilite ölçüm cihazı kullanılmıştır.

4.4.1.4. Örneklerin ATR FTIR Spektrum Ölçümü

Degrade elastin proteini kullanılarak çapraz-bağlayıcı kullanılarak elde edilen elastin mikroküre yapıların liyofilize edilmesi sonrasında FTIR ölçümleri gerçekleştirildi. Kontrol grubu olarak saf haldeki nativ alfa-elastin kullanıldı. İnfrared spektrumları Perkin Elmer 100 serisi ATR FTIR spektrofotometresi kullanılarak ölçüldü. Ölçümler 4,00 çözünürlük

değerinde ve 4 taramalı olarak 650-4000 cm⁻¹ dalga boyu aralığında, her bir örnek için 10 tarama yapılarak gerçekleştirildi.

4.4.1.5. Eş-Zamanlı Hücre Proliferasyon Analizi.

Eş-zamanlı hücre analiz (EZHA) sistemi (xCELLigence Real-Time Cell Analyzer; RTCA), hücre çoğalmasını işaretleme basamağı olmadan takip etmek amacı ile kullanılır. Bu teknik, empedans ölçüm ve analizinden faydalanarak hücre göçü, canlılığı, tutunması, farklılaşması ve hücre ölümü gibi hücresel davranışları eş zamanlı olarak kaydetmektedir. Sistem, çok kuyucuklu kültür kabı tabanına yerleştirilmiş altın mikro-elektrotlar (elektrot plakaları, e-plaka) aracılığı ile ölçüm alır. Bu elektrotlar üzerinde gerçekleşen hücresel aktivite, elektriksel empedansta değişime neden olmaktadır. Empedans bulgusu bilgisayara aktararak yazılımı tarafından anlık olarak işlenir. Elektriksel empedans değişimi hücre endeksine dönüştürülür (156). Kültür ortamının oluşturduğu empedans değeri, elektrot yüzeyi ve kültür besi yeri ara yüzündeki iyon bileşiminden kaynaklanmaktadır. Çoğalma ve tutunma aktivitesi gösteren hücreler, e-plakaya bağlanmaya ve başladığında, ara yüzdeki iyonik bileşim değişerek empedans değerini etkiler. E- plakalar yüzeyine tutunan hücre miktarında kaydedilen artış, empedansta artışa ve hücre endeksinin artmasına neden olmaktadır (157).

Bu çalışmada eş-zamanlı hücre analizi kullanılarak genipin çapraz-bağlama reaksiyonu ile sentezlenen mikrokürelerin artan konsantrasyonlarda uygulandığı gruplar arasında hücre canlılığı açısından farklılık olup olmadığı değerlendirilmiştir. Bu amaçla oluşturulan üç tekrarlı 6 kuyucuktan oluşan deney serisi oluşturulmuştur. İki boyutlu ve üç boyutlu adipoz kök hücre kültürü basamaklarında kullanılan elastin mikroküre konsantrasyonu 1630 µg/mL (1,63 mg/mL) olduğundan, olası toksisite etkisinin hücre canlılığına etkisinin görülebilmesi için 15 mg/mL, 7,5 mg/mL, 6 mg/mL, 3 mg/mL, 1,5 mg/mL son konsantrasyon değerine ulaşacak biçimde 200 µL kuyucuk hacminde uygulanmıştır. Eş Zamanlı Hücre Analiz sistemi 4 birimden oluşmaktadır: (1) EZHA birimi, (2) EZHA istasyonu, (3) EZHA yazılımı içeren ve bulguları anlık olarak işleyen bilgisayar ve (4) 96 kuyucuklu e-plaka (Şekil 4.5). E-plakayı taşıyan EZHA SP istasyonu, rutin hücre kültürü işlemlerinin uygulandığı inkübatöre yerleştirilir. Bilgisayar ve EZHA analizörü inkübatör dışında bulunur.



Şekil 4.4. Eş-zamanlı hücre analizi sistemi. (A) Bilgisayar ve EZHA analizörü, (B) EZHA SP istasyonu, (C) 96 kuyucuklu e-plaka. (D) EZHA istasyonu.

Çeşitli ekim yoğunluğundaki hücre gruplarının çoğalmasının eş-zamanlı olarak görüntülenebilmesi amacı ile öncelikle 96 kuyucuklu e-plaka üzerine 100'er μ L standart

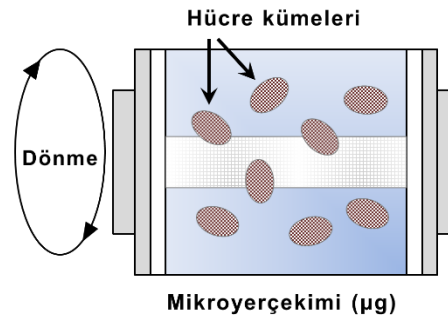
besi ortamı ilave edildi ve sonrasında oda sıcaklığında laminar kabin ortamında 30 dk süre ile inkübe edildi. Ardından inkübatöre aktarılan e-plaka 15-20 dk süre ile bekletildi. Hücre içermeyen kültür besiyeri ortamında empedans ölçümü alınarak geri plan sinyal düzeyi ölçüldü ve kuyucukların elektriksel bileşenlerinin temas kapasitesi değerlendirildi.

4.5. İKİ BOYUTLU HÜCRE KÜLTÜRÜ

T75 kültür kaplarına tohumlanan adipoz kök hücreler, %5 CO₂, 37°C ve >%90 bağıl nem koşullarında inkübe edildi. En az %80 bolluğa ulaşan hücreler tripsinizasyon yapıldıktan sonra 1:3 ya da 1:4 oranında seyreltilerek yeni kültür kaplarına ekilerek sonraki pasaj sayısına geçildi. Takip eden deneylerde adipoz kök hücrelerin karakteristik özelliklerinin baskın olduğu 6-10 numaralı pasaj hücre popülasyonu kullanıldı.

4.6. ÜÇ BOYUTLU MİKROYERÇEKİMİ BİYOREAKTÖRÜ

Mikroyerçekimi kültür kabı (Slow turning lateral vessel-STLV) 55 mL sıvı hacmi ile çalışmaktadır. Hücre kültürü iki boyutlu koşullarda gerçekleştirilen koşullara kıyasla önemli farklar taşımaktadır. İki boyutlu kültür koşullarında bolluğa oluşan hücreler tripsinizasyon yapıldıktan sonra biyoreaktör başına 9 milyon hücre (150000hücre/mL) olacak şekilde tohumlandı. Seri deterjan ve alkol yıkamaları sonrasında otoklavlanarak sterilize edilen biyoreaktör kapları, steril koşullar altında dik konumda açılarak hazır hale getirildi. Alt ve üst vidalar allen tornavidası ile sıkıştırılarak biyoreaktör su sızdırmaz hale getirildi. Hava kilitlerine steril üç yollu musluklar monte edildi. Doldurma girişi (Fill port) kullanılarak, hücreler eklenmeden önce 10 mL hücre içermeyen standart besi yeri eklendi, böylece biyoreaktörün iç yüzeylerinin ve oksijenatör membranın ıslanması sağlandı.



Şekil 4.5. Mikroyerçekimi biyoreaktöründe adipoz kök hücrelerden oluşan hücre kümelerinin şematik gösterimi.

Mikroyerçekimi kültürü yerçekimi ivmesinin yönünün sürekli olarak değişmesi dolayısı ile sürekli düşme ya da havada asılı kalma durumu ortaya çıkardığından hücreler veya solüsyon içinde asılı bulunan partiküller için toplam yerçekimi kuvvetinin oluşturduğu güç vektörü ortalama değeri sıfıra yakındır. Bağlı yerçekimsizlik durumunun hücre agregatları üzerindeki etkisi, dünya yörüngesinde bulunan uzay istasyonunda yapılan hücre kültürü deneylerinde görülen mikroyerçekiminin etkisi ile özdeştir. Mikroyerçekimi hücre agregatlarının kardiyosfer yapılarına benzer biçimde yüzeye tutunmayan hücre öbeği gibi davranmasını sağlamaktadır. Kök hücre karakterindeki hücrelerin mikroyerçekimi ortamında farklılaşma eğiliminde oldukları literatürde bulunan çalışmalar tarafından gösterilmiştir (158,159). Buna ek olarak tutunma ve hücre dışı matriks sentezi için hücrelerin normal koşullar altında harcadığı metabolik enerji harcanmayarak hücre karakterinin olgunlaşması ve hücre çoğalmasındaki artışla karşılanmaktadır. Üç boyutta besi ortamı ile temas edebilen hücreler, iki boyutlu hücre kültürüne kıyasla daha optimal oksijenizasyon ve besin/atık transferi sağladığından hücreler için farklılaşma açısından uygun bir durum teşkil eder.

Hücre kültürünün üç boyutlu koşullara ve mikroyerçekimi etkisine uyum sağlaması amacı ile tüm gruplar üç gün süre ile elastin ya da indüksiyon olmadan kültürü yapıldı.

4.7. ADİPOZ KÖK HÜCRE KÜLTÜRÜ

Ticari olarak temin edilen adipoz kök hücreler donmuş halde kuru buz içinde elde edildi (Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells; Normal, Human ATCC® PCS-500-011). Kültür ortamı tamamen dezenfekte edildikten sonra üreticinin önerileri doğrultusunda Bazal mezenkimal kök hücre besiyerinde aseptik teknik kullanılarak hücreler çözüldü. %2 FBS, 5 ng/mL bFGF, 5 ng/mL EGF ve 2.4 mM L-glutamin konsantrasyonunda destekleyici içeren ve %1 oranında penisilin-streptomisin çözeltisi içeren besi ortamı kullanıldı. Normal kültür koşullarında kültür yapılan hücreler, % 70-80 bolluğa ulaştıca Tripsin-EDTA çözeltisi ile hücre arası bağlar dağıtıldı. 7 dakika süre ile 1500 rpm 25°C sıcaklıkta yapılan sentrifügasyon sonrasında elde edilen pelet, %1 L-glutamin, %10 FBS, 100 U/mL penisilin, 100 mg/mL streptomisin içeren DMEM:F12 besi yeri ortamında (standart besiyeri) süspanse edilen hücreler 50000 hücre/mL konsantrasyonunda T75 (75 cm²) doku kültürü kaplarına ekildi. Hücre kültürü kapları %5'lik CO₂, %95 hava ve %90

bağıl nem koşullarında 37°C sabit sıcaklığa sahip aseptik hücre kültürü koşullarında inkübe edildi.

Sonrasında tam besiyeri eklenerek üç gün ara ile besi ortamı değiştirildi. Düzenli yapılan kontrollerde kültür ortamında kontaminasyon olup olmadığı, kültürün genel kalitesi ve sağlığı, hücre morfolojisi inversiyon mikroskopu aracılığı ile gözlemsel olarak kontrol edildi.

Yaklaşık olarak %80 bolluğa ulaşan kültür ortamı tripsin-EDTA (%0,05 tripsin/0,53 mM EDTA) (Sigma, ABD) çözeltisi ile inkübe edilmesi sonrasında hücre dışı matriks yapılarının dağıtılması ve hücrelerin plastik kap yüzeyinden ayrılması amacı ile yapılan bu işlem 5 mL TE çözeltisi kullanılarak 5-8 dakika sürdürülmektedir ve reaksiyon tripsinin optimal aktiviteyi gösterdiği 37°C ortam sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Kültür kabı yüzeyinden tamamen ayrılan hücreler serum içeren (tripsin inaktivasyonu amacı ile) besiyeri ortamında süspanse edilerek 15 mL'lik santrifüj tüpleri içerisinde 1100 rpm'de 25°C'de 7 dakika süre ile santrifüj edildi. Elde edilen pelet tam besiyeri içerisinde yeniden süspanse edildikten sonra, elde edilen hücre süspansiyonu 50000 hücre/mL konsantrasyonunda yeni T75 doku kültürü kaplarına aktarıldı ve önceden bahsedilen kültür koşullarında inkübe edildi. Pasaj geçişleri sırasında elde edilen hücre peletlerinin bir kısmı %10'luk DMSO (Sigma, ABD) içerisine aktarıldıktan sonra -80°C'de daha sonra değerlendirilmek üzere muhafaza edildi. İzole edilerek ekspanse edilen hücreler adipoz kök hücre karakterinin doğrulanması amacı ile yüzey belirteçlerinin incelenmesi için akım sitometri kullanılarak karakterize edildi.

4.7.1. Akım Sitometri Analizleri

%80 bolluğa ulaşan hücreler süspansiyon haline getirildikten sonra mezenkimal kök hücre fenotipinin belirlenmesi amacı ile floresans ile aktive edilen (fluorescence activated cell sorting; FACS) hücre ayırma analizleri gerçekleştirildi. Yüzey belirteçlerinden oluşan CD antijen paneli ve konjuge floresan işaretçileri CD105-PC7, CD29-FITC, CD90-PC5 CD133-PE, CD34-APC, LIN-APC,-A750 ve HLA-DR-ECD şeklinde belirlendi. Akım sitometri analizi Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji Anabilim Dalı'nda Beckman Coulter Navios FCM (ABD) cihaz ile uygulandıktan sonra Kaluza yazılımı ile hesaplama yapılmıştır.

İşlem detayları özetle; Tripsinizasyon sonrası sentrifüjleme ve hemasitometrede hücre sayımı yapıldı. Ardından hücreler %0,5 serum içeren PBS ile seyreltildi ve floresan moleküllerle konjuge haldeki CD antikoru ile inkübe edildi. Negatif kontrol olarak MoAb ile inkübe edilmemiş hücreler kullanıldı. İnkübasyon sonrasında işaretlenen hücreler çöktürülerek süpernatant atıldı. FACS cihazı yıkama çözeltisi ile yıkandı. % 0,1 sodyum azid, %1 formaldehit ve %0,5 BSA içeren akım tamponunda süspansiyon edilen hücreler okunduktan sonra Kaluza yazılımı kullanılarak değerlendirildi.

4.7.1.1. Koloni Oluşturan Fibroblastik Birim Analizi (CFU-f)

Üçüncü pasaj aşamasındaki insan adipoz kök hücreleri, 6 kuyucuklu kültür kaplarına 100, 1000 ve 10000 hücre/cm² yoğunluğunda tohumlanmıştır. Kültür aşaması 21 gün süre ile devam ettirilmiştir. Bu süre sonunda kolonileri içeren kültür alanı yüzeyi, PBS ile yıkandıktan sonra oda sıcaklığı koşullarında %1'lik kristal viyole çözeltisi ile 6-10 dakika süre ile inkübe edilerek boyanmıştır.

4.7.1.2. Üç Nesle Farklılaştırma Analizi (Tri-lineage)

3. Pasaj sayısındaki hücreler, 8 kuyulu odacıklı slaytlara (Labtek, Nunc, ABD) $1,0 \times 10^4$ hücre/odacık yoğunluğunda ekilerek 24 saat süre ile EM besi ortamında kültürü yapıldı. Bu süre sonunda ilgili besi ortamına geçildi. Temel farklılaşma ortamı (Basal Differentiation Medium) olarak L-glutamin içeren DMEM (düşük glukoz), %10 inaktif fetal bovin serumu, 100 U/mL penisilin, 100 µg/mL streptomisin içine her bir grup için belirlenen farklı katkıları eklendi. 3 hafta boyunca sürdürülen kültür basamağı sırasında, haftada iki kez besi ortamı değiştirilerek yenilendi. Osteojenik farklılaşma ortamında 10^{-8} M dekzametazon, 10mM β-gliserofosfat, 50 µg/mL askorbik asit-2 fosfat katkısı kullanılmıştır. Kondrojenik farklılaşma için katkı olarak 10 ng/mL TGFβ₃, 50 ng/mL BMP6, %1 ITS solüsyonu (5 µg/mL insülin, 5 µg/mL transferrin, 5 µg/mL selenöz asit), 50 µg/mL askorbik asit-2 fosfat, 10^{-7} M dekzametazon ve %1 oranında esansiyel olmayan aminoasit karışımı eklenmiştir. Adipojenik farklılaşmanın uyarılması amacı ile temel besi ortamına eklenen katkıda, 0,45 mM 3-izobütil-1-metil ksantin, 0,1 µM dekzametazon, 0,2 mM indometazin ve 0,1 U/mL insülin eklendi. 3 hafta sonunda fikse edilen kültür ortamı, kemik farklılaşması için von Kossa, adipogenez için Oil Red O ve kondrogenez için Alcian mavisi boyaları ile boyandı.

4.7.1.3. Farklılaşma İndüksiyonu ve Kardiyak Vasat

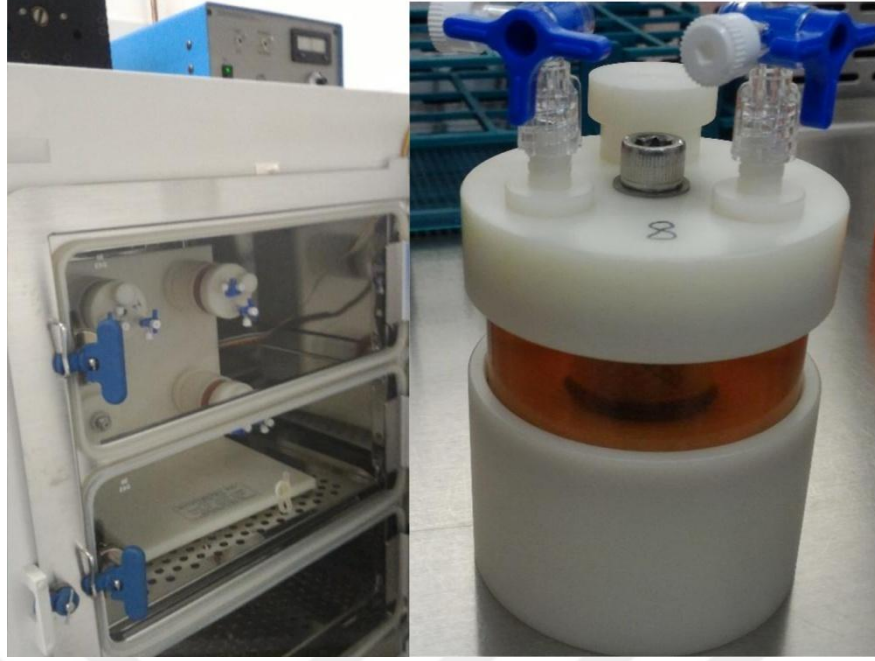
Adipoz kök hücrelerin farklı hücre tiplerine farklılaşması ile ilgili literatürde bulunan çok sayıda yayınlanmış bulgu, kardiyak yönde farklılaşma potansiyelinin bulunduğunu göstermektedir. Farklı indüksiyon yöntemleri (biyokimyasal, mekanik, ko-kültür vd.) ışığında çeşitli kardiyak karakteristik gösteren hücrelere farklılaşma gösterdikleri ispatlanmıştır. Çizelge 2.3'te çeşitli indüksiyon yöntemleri, farklılaşmanın değerlendirilmesi için kullanılan kardiyak belirteçler ve de farklılaşma yüzdeleri derlenmiştir. Bu bilgiler ışığında 5-azasitidin indüksiyon etkeni olarak seçilmiştir.

5-azasitidin DNA demetilasyonuna sebep olarak kardiyak gelişimden sorumlu transkripsiyon faktörlerini aktive etmektedir. Bu aktivasyon sonrasında kardiyak karakterdeki gen ifadesinin sürdürülmesi için kardiyak progenitörlerin farklılaşması ve özelliklerini devam ettirmesi için kullanılan (98,160,161) büyüme faktörleri, besi yeri katkıları ve mitojen karışımı bu çalışma ile beraber ilk defa adipoz kök hücrelerde uygulanmıştır.

Kardiyomiyojenik indüksiyon amacı ile son konsantrasyonu 10 μ M olan 5- azasitidin üçüncü günün sonunda eklenerek 24 saat süre ile inkübe edilmiştir. Uzun süreli maruziyet durumunda sitotoksik etki gösteren 5-azasitidin içeren besi ortamı 24 saat sonunda tamamen atıldıktan sonra deney grubunun özelliğine göre STLV biyoreaktöre %10 FBS içeren standart besiyeri, kardiyak besiyeri ve 90 mg elastin mikropartikül içeren kardiyak besiyeri konmuştur.

Kardiyak besi ortamı içeriği; %65 DMEM/F-12 (Lonza), %35 IMDM (Lonza) karışımı içinde %2 B27 (Lonza), %10 FBS, %0,05 ITS, %1 penisilin-streptomisin, %1 L-glutamin, 40 nM trombin, 20 ng/mL bFGF, 10 ng/mL EGF ve 40 nM kardiyotrofin. (Büyüme faktörleri, Peprotech ABD)

Besi ortamları 4. günde tamamen değiştirilmiştir ve indüksiyon sonrası 8. günde deney sonlandırılmıştır. Hücreler 4750 rpm hızda çöktürüldükten sonra 25 mM sodyum sitrat, 10 mM EDTA, 5,3M amonyum sülfat, bileşimine sahip olan RNeasy lysis reagent pH 5.2 solüsyonuna (Thermo Fisher Scientific, ABD) aktarılarak mRNA izolasyonu için -80°C soğutucuda saklanmıştır.



Şekil 4.6. Synthecon mikroyerçekimi biyoreaktörü sistemi.

4.8. KANTİTATİF EŞ ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU

4.8.1. mRNA İzolasyonu

mRNA izolasyonu için Roche ABD'nin High Pure RNA isolation Kit ürünü kullanılmıştır. Üreticinin talimatlarına göre aşamalar takip edilerek elde edilen mRNA'nın saflığı nanodrop nükleik asit ölçümü amaçlı spektrofotometre ile ve agaroz jel elektroforezi ile belirlenerek sonraki aşamalar planlanmıştır.

Çizelge 4.1. mRNA izolasyonu kitinin bileşenleri.

Tüp numarası	Solüsyon	İçerik
1	Lizis/bağlayıcı tamponu	4,5M guanidin-HCl, 50mM Tris HCl, %30 triton x-100(w/v), pH 6,6
2	Recombinant DNaz I	0,55mL Elüsyon tamponu içinde 10KU liyofilize DNaz I
3	DNaz inkübasyon tamponu	1MNaCl, 20mM Tris-HCl ve 10mM MnCl ₂ , pH 7,0

Çizelge 4.1. (devam)

Tüp numarası	Solüsyon	İçerik
4	Yıkama Tamponu I	5M guanidin-HCl, pH 6,6
5	Yıkama Tamponu II	10mL karışıma 40mL mutlak etanol eklendikten sonraki bileşim: 20mM NaCl, 2mM Tris-HCl, pH 7,5
6	Elüsyon Tamponu	PZR kalitesinde su
7	Filtre Tüpleri	700 mikrolitrelik Polipropilen tüpler
8	Toplama Tüpleri	2mL'lik polipropilen tüpler

1. Hücre peleti (1×10^6 hücre içeren) 200 μ L PBS içinde süspansiyon haline getirildi.
2. 400 μ L lizis/bağlayıcı tampon eklenerek 15 saniye süre ile vortekslendi.
3. Bir tüpe filtre kısmı takıldı, örneğin tamamı filtrenin üst kısmına eklendi.
4. Filtre ve tüp bileşimi tezgâh üstü sentrifüj (Beckman Coulter Microfuge Centrifuge 22R) kullanılarak 15 saniye süre ile 8000 x g hızında santrifüjlendi.
5. Eluat atıldı ve filtre tekrar tüpe takıldı.
6. Örnek başına 90 μ L DNaz inkübasyon tamponu steril reaksiyon tüpüne aktarıldıktan sonra 10 μ L DNaz I eklenerek karıştırıldı ve filtre tüpüne konulup 15 dakika süre ile oda sıcaklığında inkübe edildi.
7. 500 μ L yıkama tamponu I filtrenin üst kısmına eklendikten sonra 15 saniye 8000 x g hızda santrifüjlendi. Sonrasında eluat atılarak filtre kısmı tüple birleştirildi.
8. 500 μ L yıkama tamponu II filtrenin üst kısmına eklendi ve 15 saniye 8000 x g hızda santrifüjlendi. Sonrasında eluat atılarak filtre kısmı tüple birleştirildi.

9. 200 µL yıkama tamponu II filtrenin üst kısmına eklendi ve 2 dakika süre ile 13000 x g hızda santrifüjlenerek yıkama tamponu kalıntısı süzüldü.
10. Toplama tüpü atıldı, filtre 1,5mL hacimli mikrosantrifüj tüpüne monte edildi.
11. RNA elüsyonu için filtre tüpünün üst kısmına 50-100 µL elüsyon tamponu eklendi. Tüp bileşimi 1 dakika süre ile 8000 x g santrifüjlendi.
12. Elüat RNA içermektedir. Doğrudan Eş-zamanlı-PZR için kullanabilir ya da -80°C’de saklanarak ileri analizleri için saklandı.

4.8.2. cDNA Sentezi

İzole edilen mRNA dondurularak saklandığı aşamalarda çözülerek ya da saflaştırma sonrasında doğrudan cDNA sentezi amacıyla kullanılmıştır.

Çizelge 4.2. cDNA sentezi için kullanılan kitin bileşenleri.

Tüp numarası	Solüsyon	İçerik
1	Revers transkriptaz solüsyonu	55 µL, 110 µL, 220 µL hacimli üç vial. Saklama tamponu: 200mM potasyum fosfat, 2mM ditiotreitol, %0,2 Triton X-100 (v/v), %50 gliserol (v/v), pH 7,2
2	Revers transkripsiyon tamponu	1 mL’lik 4 vial. 5x konsantrasyon: 250mM Tris/HCl, 150mM KCl, 40mM MgCl ₂ , pH 8,5.
3	RNaz inhibitörü	20mM Hepes-KOH, 50mM KCl, 8mM ditiotreitol, %50 gliserol (v/v), pH 7,6.
4	Deoksinükleotit karışımı	10’ar mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP

Çizelge 4.2. (devam)

Tüp numarası	Solüsyon	İçerik
5	Sabitlenmiş-oligo (dT) ₁₈ primer	100 µL (50 µM), 200 µL (50 µM) ve 2x50 µL (50 µM)
7	DTT	0,1M DTT, 1mL'lik 1 tüp
8	PZR kalitesinde distile su	

Revers transkripsiyon işleminde, önceden izole edilen mRNA, cDNA'ya çevrildi. Bu çalışmada gene özgü primer kullanılarak, izole edilmiş olan mRNA'dan cDNA transkriptleri elde edildi. Gene özgü primer tabanlı revers transkripsiyonda tek bir hedefe özgü transkripsiyon gerçekleştirilir. Elde edilen cDNA incelenen gene özgül, tek aşamalı kantitatif PZR için kullanılmak üzere sentezlendi. İncelenen genler için kullanılan primer problemleri, NCBI gene ve OMIM veri tabanları aracılığı ile doğrulanmıştır. Bağlı gen ifadesinin incelenmesi için vekilharç genler referans olarak kullanılarak bağlı sayısallaştırma yapılmıştır. Bu yöntem özdeş koşullardaki örneklerin bir değişken açısından incelenmesi için kullanılmaktadır. Devamında bağlı gen ifadesinin değerlendirilmesi için analiz kısmında detaylandırılan hesaplamalar yapılmıştır.

1- cDNA tek bir tip primer kullanılarak sentezlendi. Donmuş haldeki tüm bileşenler çözüldü. Kullanım öncesinde santrifüjlendi. Reaksiyonlar hazırlanırken bütün bileşenler buz üzerinde karıştırıldı

2- Steril ve nükleaz içermeyen ince gövdeli PZR tüpleri buz üzerinde hazırlandı, 20 µL son hacimde kalıp-primer karışımı hazırlandı.

Çizelge 4.3. cDNA sentezinde kullanılan primer ve total RNA karışımının bileşimi.

Bileşen	Hacim	Son Konsantrasyon
Total RNA	***	***
Sabitlenmiş-oligo(dT)18 Primer 50 pmol/μL	1 μL	2,5 μM
PZR kalitesinde didistile su		Toplam hacim 11,4 μL
Toplam	11,4 μL	

3- Kalıp-primer karışımı 10 dk süre ile 65°C sıcaklıkta inkübe ederek denatüre edildi. Bu amaçla ısıtıcı kapaklı blok döngü ısıtıcı kullanıldı ve buharlaşma engellendi. Bu aşamada ikincil RNA yapıların denatürasyonu gerçekleştirildi. Sonrasında tüp buza aktarıldı.

4- Kalıp-primer karışımının bulunduğu tüpe revers transkripsiyon karışımının geri kalan bileşenleri aşağıda belirtilen sıra ile eklendi.

Çizelge 4.4. Revers transkripsiyon reaksiyonu için kullanılan bileşenler.

Bileşen	Hacim	Son Konsantrasyon
Revers Transkriptaz Reaksiyon tamponu, 5× kons	4 μL	1 × 8 mM MgCl ₂
RNaz inhibitörü 40 U/μl	0,5 μL	20 U
Deoksinükleotit karışımı, her bir deoksinükleotit tipinden 10 mM	2 μL	Her deoksinükleotit 1mM
DTT	1 μL	5mM
Revers transkriptaz	1,1 μL	10 U
Son hacim	20 μL	

5- Bileşenler dikkatlice karıştırıldı ve tüp, ısıtıcı kapaklı blok döngü ısıtıcıya yerleştirildi.

6- Reaksiyon 30 dakika süre ile 55°C sıcaklıkta inkübe edildi. Bu değerler, üreticinin önerisi doğrultusunda kullanılan problemler için önceden optimize edilmiştir.

Reaksiyon öncesinde ısıtıcı blok ısıtılarak hazırlandı.

7- Revers transkriptaz enzimi 5 dk süre ile 85°C’de inkübe edilerek inaktive edildi. Sonrasında tüp, buza kondu. Saklanmak üzere -20°C’de donduruldu

8- Elde edilen cDNA herhangi bir saflaştırma ya da ek RNaz kullanımına gerek olmadan kullanılmıştır.

4.8.3. Kantitatif Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Revers transkripsiyon, elde edilen mRNA moleküllerinin kopya sayısının ölçülebilmesi amacıyla komplementer DNA yapılarına dönüştürülmesidir. cDNA örnekleri incelenen genlere RNA transkripsiyonu yapıp yapılmadığını ve oluşan mRNA moleküllerinin bağıl oranlarına ulaşılmasını sağlamaktadır. DNA örneklerinden kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu LightCycler® 480 Probes Master protokolüne göre gerçekleştirildi. Kullanılmadan önce karıştırılan solüsyonlar mikrosantrifüjde kısa bir süre çöktürüldü. Bütün pipitleme işlemleri buz üzerinde gerçekleştirildi. Hidroliz probu ve PZR primerlerini içeren 10X konsantrasyonlu solüsyon hazırlandı. Çizelge 4.3’te 20 µl’lik bir kantitatif eş-zamanlı-PZR reaksiyonu için PZR karışımına eklenen bileşenler ve miktarları gösterilmektedir. PZR karışımı, buz üzerinde hazırlandı.

Çizelge 4.5. PZR Reaksiyonu için kullanılan bileşenler.

Bileşen	Hacim
dH ₂ O	3 µl
LightCycler® 480 Probes Master, 2X kons.	10 µl
Primer-prob karışımı, 10X kons.	2 µl
Toplam Hacim	15 µl

Hazırlanan PZR bileşenleri, vorteks kullanılmadan yavaşça pipetlenerek karıştırıldı.

LightCycler® 480 Çok Kuyulu Plakanın her bir kuyusuna 15 µl PZR karışımı konuldu ve her bir kuyuya 5 µl cDNA örneği eklendi. Optik film kullanılarak plakanın üst yüzeyi kapatıldı.

Çok Kuyulu Plaka, LightCycler® 96 Real-Time PCR System (Roche, ABD) cihazına yerleştirildi ve uygun koşullarda reaksiyon başlatıldı. Eş-zamanlı-PZR reaksiyonu için kullanılan döngü koşulları çizelge 4.4'te gösterildi.

Çizelge 4.6. Kantitatif eş zamanlı-PZR döngü koşulları

Program Adı	Döngü Sayısı	Analiz Yöntemi	Sıcaklık	Zaman
İnkübasyon Öncesi	1	Hiçbiri	95°C	10 dakika
Amplifikasyon	45	Kantifikasyon	95°C 60°C 72°C	10 saniye 30 saniye 1 saniye
Soğutma	1	Hiçbiri	40°C	30 saniye

Eş-zamanlı-PZR reaksiyonu bittikten sonra elde edilen veriler, LightCycler® 96 Real-Time PCR System cihazında bulunan yazılım programı kullanılarak analiz edildi.

4.8.4. İncelenen Kardiyak Genler

Çizelge 2.4'te derlenmiş olan çalışmalar esas alınarak yapılan literatür araştırmaları sonrasında, bu tez çalışmasının analiz basamaklarında değerlendirilmek üzere seçilmiş olan problemlerin detayları Çizelge 4.7'de sunulmuştur.

Çizelge 4.7 Tez çalışmasında incelenen eş-zamanlı PZR belirteçleri.

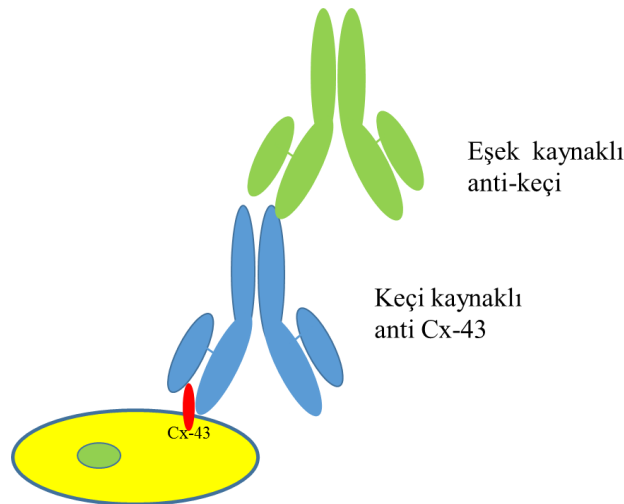
Sıra No	Gen Adı	Sembolü	Deney Kodu	Konfigürasyon Numarası
1	Homeobox Protein NK-2 Homolog E	NKX2-5	114583	100124165
2	GATA Binding Protein 4	GATA4	144088	100124299
3	T-Box Transcription Factor TBX5	TBX5	101204	100124280
4	Cadherin 2	CDH2	137066	100124271
5	Gap Junction Protein Alpha 1	GJA1	107330	100124262
6	Troponin I3, Cardiac Type	TNNI3	112140	100124253
7	Troponin T2, Cardiac Type	TNNT2	114181	100124244
8	Myosin Heavy Chain 7	MYH7	114934	100124235
9	Myosin Light Chain 7	MYL7	143285	100124226
10	T-Brachyury Transcription Factor	T	144639	100124217
11	Actin, Alpha 2, Smooth Muscle, Aorta	ACTA2	125175	100124208

4.8.5. Gen İfadesi Analizleri

Gerçekleştirilen kantitatif eş-zamanlı PZR analizleri için her bir grup için üç biyolojik replikanın üç deneysel tekrarı gerçekleştirildi. Elde edilen Ct değerleri tablolastırıldıktan sonra Livak deltadeltaCt yöntemi kullanılarak sayısallaştırıldı. Bu yolla gruplar arasındaki bağıl gen ifadesi ilişkisi elde edildi. Bu sonuçlar, grup içi varyansın homojenliği test etmek amacı ile tek yönlü ANOVA ile değerlendirildikten sonra gruplar Kruskal-Wallis testi ile karşılaştırıldı. Elde edilen p değerleri üzerinde Benjamini-Hochberg düzeltmesi yapılmıştır. $P < 0,05$ değeri anlamlı olarak belirlenmiştir. İstatistiksel analizler IBM SPSS 22. sürüm ve GraphPad Prism 5. sürüm kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

4.8.6. İmmünohistokimyasal Analizler

Bu teknik, streptavidin-biotin işaretçili immünoenzimatik antijen tespiti yapılması amacı ile kullanılmaktadır. Hazırlanan örnekler sıra ile hedef antijene özgüllük taşıyan bağlanmamış primer antikor, bu antikora bağlanma aktivitesi gösteren bağlı sekonder antikor, enzim işaretli streptavidin ve kromojen süstrat ile muamele edilmiştir. İncelenen antijene özgül antikor, biotin-işaretli sekonder antikor ile işaretlenir. Böylece dolaylı yolla, ilgilenilen proteinin bulunduğu bölge biyotin ile işaretlenmektedir. Sonrasında streptavidin-enzim konjugatı eklenerek, örnek içindeki biyotine bağlanma gerçekleşir. Birbirini takip eden bu basamaklar sonunda elde edilen antikor-sekonder antikor ve streptavidin-enzim kompleksi uygun süstrat/kromojen kullanılarak boyandı.



Şekil 4.7. İmmünohistokimyasal analiz ve antikorların kullanımı.

4.8.6.1. Örneklerin Boyanması

- 1- 8'li kuyucuk içeren kasetlere 100000 hücre ekildikten sonra konfluansa ulaşılmasını takiben deney koşullarına uygun bileşenler ile muamele edildi.
- 2- Endojen peroksidaz aktivitesine bağlı olarak nonspesifik boyama oluşmasını önlemek amacı ile slaytlar hidrojen peroksidaz blok solüsyonunda 10-15 dakika süre ile inkübe edildi.
- 3- 2 defa tamponla yıkama yapıldı.
- 4- Ultra v blok solüsyonunda oda sıcaklığında 5 dakika süre ile inkübe edilerek nonspesifik geri plan boyaması engellenir.
- 5- Örnekler durulandı.
- 6- Primer antikor çözeltisi, 1:100 veya 1:50 oranında uygulandıktan sonra inkübe edildi.
- 7- 4 defa PBS pH 7.4 tamponu ile yıkandı.
- 8- Streptavidin peroksidaz eklendikten sonra 10 dakika süre ile inkübe edildi.
- 9- 4 defa PBS pH 7.4 tamponu ile yıkandı.
- 10- 20-50 µl arasında AEC kromojen solüsyonu 1mL AEC süstratı ile iyice karıştırıldı ve elde edilen karışım örneğe uygulandı. 20 dakika süre ile karıştırıldı ve 5 ila 20 dakika süre ile inkübe edildi.
- 11- Karşı boyama yapılarak lamel ile kapatıldı.

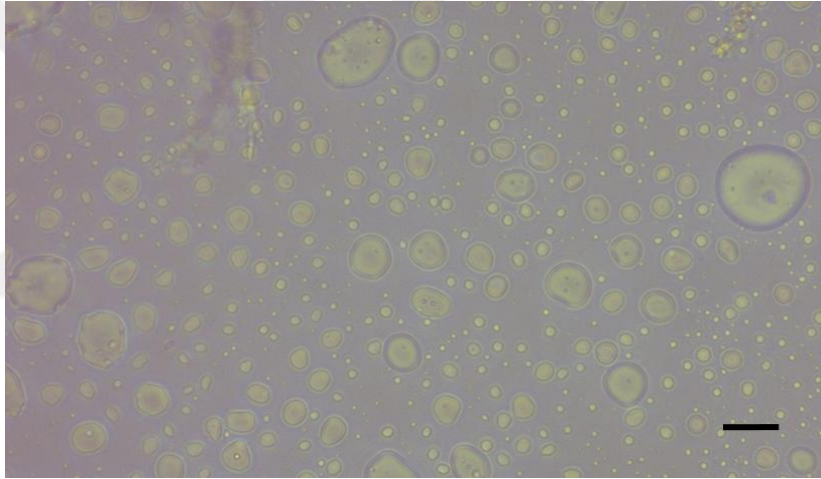
Elde edilen slaytlar ışık mikroskobu (Leica DM 4000B, Wetzlar, Almanya) kullanılarak görüntülendi.

5. ARAŞTIRMA BULGULARI

Elde edilen araştırma bulguları, üç aşamada değerlendirilebilir. Elastin mikrokürelerin sentez optimizasyonu ve karakterizasyonu ile ilgili sonuçlar, hücre kültürü basamaklarının öncesinde gerçekleştirilen fiziksel ve kimyasal analizleri içermektedir. İkinci aşamada kültür basamakları öncesinde hücrelerin karakterizasyonu ve kültür basamakları ile ilgili gözlemler yer almaktadır. Son kısımda iki boyutlu hücre kültürü ve mikroyerçekimi biyoreaktörü kullanılarak gerçekleştirilen deneyler sonrasında gerçekleştirilen immünohistokimyasal analizler ve gen ifadesi analizleri yer almaktadır.

5.1. ELASTİN MİKROKÜRELERİN KARAKTERİZASYON SONUÇLARI

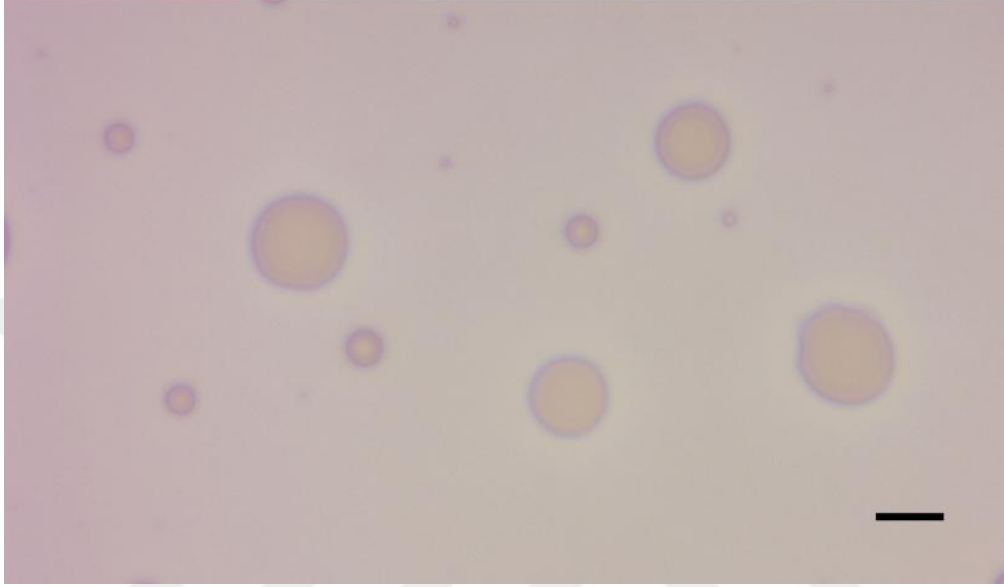
5.1.1. Boyut Dağılımı



Şekil 5.1. Elastin-temelli mikrokürelerin sentezlenmesinde optimizasyon ara basamaklarından bir inversiyon mikroskop görüntüsü.

Elastin mikrokürelerin sentez basamaklarının optimizasyonu sürecinde çapraz-bağlayıcı tipi (EDC/NHS, genipin), konsantrasyonu ve çapraz bağlama süresi değişkenleri sınanmıştır. Bu aşamaya gelmeden önce, optimal ortam pH derecesi, tampon çözelti tipi (ör: pH 5,5 MES tamponu, pH 7,4 PBS, pH 7,4 Tris tamponu, pH 10,4 Karbonat tamponu), yıkama döngüsü, santrifügasyon koşulları, reaksiyon sırasında ortam sıcaklığı (25 ve 37 °C), yağ fazının tipi (mineral yağ, sıvı parafin yağı), sürfaktan tipi (Tween 80, Span 20, Span 80) konsantrasyonu, karıştırıcı kuvveti, reaktiflerin çözelti ortamına eklenme süre ve biçimi değişkenleri sınanmıştır. Optimal sonuç için belirlenen kriterler, liyofilizasyon sonrası kalıntı olmadan tamamen çözeltiye katılabilen kuru ürün eldesi, çözeltiye

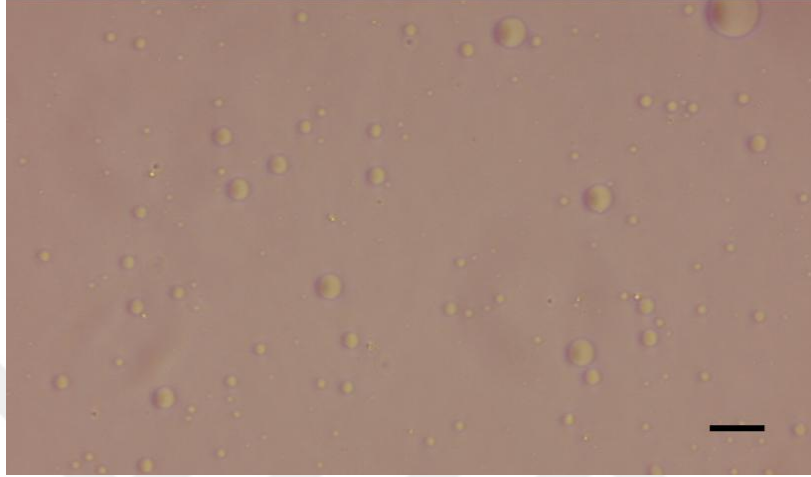
katıldığında çabuk biçimde su ile Şişerek süspanse olması, oluşan mikropartiküllerin küresel biçimli olması, oluşan mikroparçacıkların boyut dağılımının dar bir aralıktaki olması ve geliştirilen malzemenin sulu ortamda, fizyolojik pH ve sıcaklık koşullarında dağılmadan süspansiyonda varlığını sürdürmesi olarak belirlendi. Şekil 5.1’de homojen dağılım ve küresel form kriterine uymayan bir deney sonucu görülmektedir.



Şekil 5.2. Elastin-temelli mikrokürelerin sentezlenmesinde optimal sonuç gösteren grupların sonuçlarına ait bir inversiyon mikroskobu görüntüsü. (lek: 40μm).

Çapraz-bağlama reaksiyonuna katılan degrade elastin proteininin miktar ve konsantrasyonu arttırılarak sürdürülen deneyler sırasında EDC/NHS sistemi ve genipin çapraz bağlayıcı olarak uygulanmıştır. Son ürünün doku kültürü koşullarında sitotoksik etki yaratmaması amacı ile genipin ideal bir çapraz bağlayıcı olarak grlerek, sonraki sentez basamakları genipin kullanımına göre optimize edilmiştir. Genipin apraz bağlanma reaksiyonu EDC/NHS sistemine göre 3 kat daha uzun sürede etkili olmakla beraber, reaksiyon ortamı EDC/NHS için taze hazırlanmıŐ pH 5.5 MES tamponu olarak kullanılırken, genipin için %50 etanol içeren distile su ortamı yeterli olmuştur. Şekil 5.2’de görüldüğü üzere küresel formda ürün elde edilmiştir, ancak boyut dağılımı homojen olmadığından, ileri optimizasyon deneyleri gerçekleştirilerek hücre kültürü ortamında süspansiyon halinde bulunarak hücrelere bir tutunma yüzeyi sağlaması amacı ile kürelerin büyüklüğünün ortalama 40 mikrometre düzeyine gelmesi amaçlandı. Bu amaçla farklı karıştırma hızları, ve seçilen sürfaktan olan span 20’nin farklı konsantrasyonları uygulandı. nceki deneylerden farklı olarak su fazının yağ fazına oranları uygulanarak elde edilen liyofilize

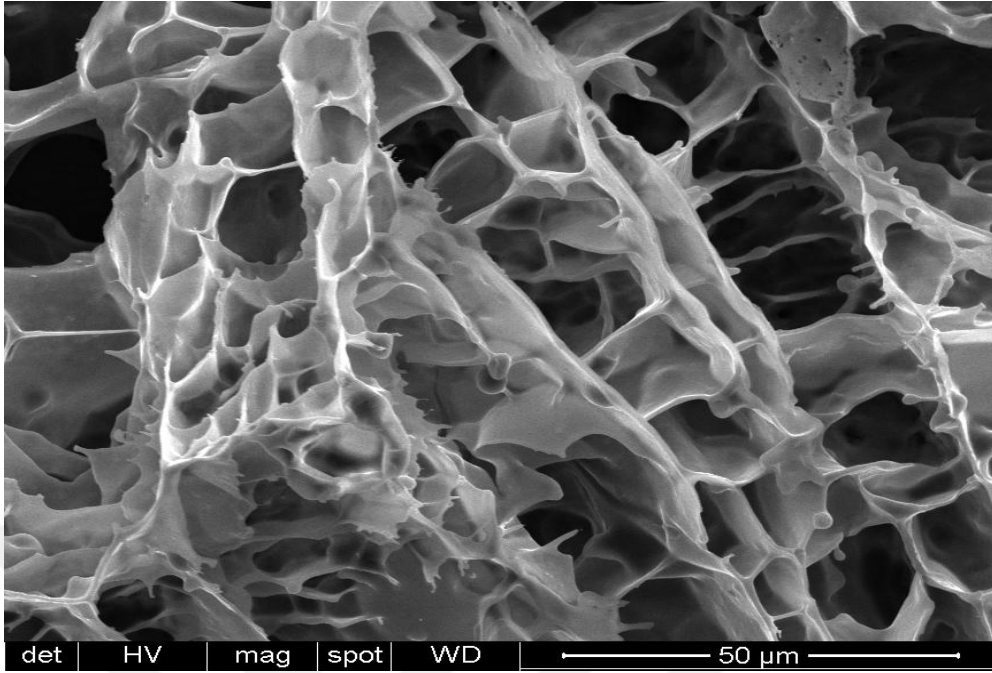
örnekler süspanse edildikten sonra sonuçlar görüntülenmiştir. Optimal karıştırma hızı, sürfaktan konsantrasyonu ve su/yağ fazı oranı belirlendikten sonra kürelerin istenen boyut dağılımına geldiği ancak düşük verim alındığı saptanmıştır. Sonraki deney aşamalarında reaksiyon, ara aşamalarda durdurularak verim kaybının sebepleri araştırılmıştır.



Şekil 5.3. Elastin-temelli mikrokürelerin sentezlenmesinde optimizasyon ara basamaklarından bir inversiyon mikroskop görüntüsü.

Bu deneyde elde edilen hidrojel mikroküreler (Şekil 5.3), genel olarak homojen büyüklükte olmasına karşın, süspanse edilen partiküllerden elde edilen mikrokürelerin çapı, hücre kültüründe kullanılması için uygun büyüklükte değildir (ölçek: 20µm). Elde edilmesi amaçlanan mikroparçacıkların, hücre tutunmasını sağlayarak, kalp dokusu eksplantlarından elde edilen 200-300 µm büyüklüğündeki kardiyosfer yapılarını taklit etmesi amacı ile, su bazlı çözeltide şişerek 50 µm büyüklüğe ulaşması amaçlanmıştır (162). Bu amaç doğrultusunda inversiyon mikroskop görüntüsü incelendiğinde, oluşan kürelerin sayıca uygun olduğu ancak 10µm ve altı ebattaki hidrojel mikrokürelerin çoğunlukta olduğu saptanmıştır. Retrospektif olarak yapılan gözlemler ile beraber değerlendirilerek deney koşulları modifiye edilmiştir. Sonraki deneylerde, sürfaktan konsantrasyonu arttırılarak ve başlangıç protein konsantrasyonu zıt-yönlü diyaliz ile 6 misli arttırılarak emülsiyon sistemi kurularak çapraz bağlama gerçekleştirilerek amaçlanan 40-50 µm çaplı hidrojel mikroküreler elde edilmiştir.

5.1.2. Tarayıcı Elektron Mikroskop Görüntüleme

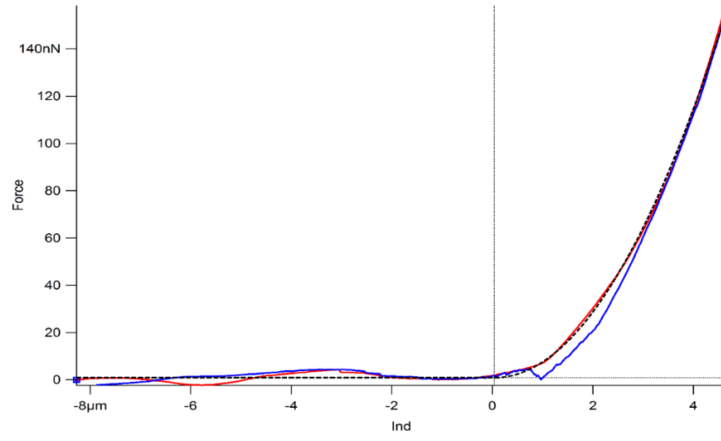


Şekil 5.4. Sentez basamakları sırasında ilk yıkama sonrası elde edilen elastin mikroküre peletin suda dağıtılmadan önceki görüntüsü.

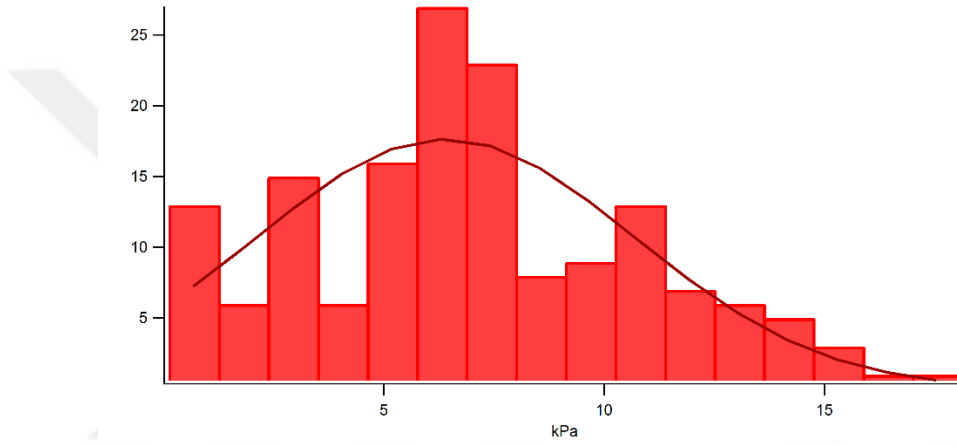
Elde edilen pelet, ıslak durumdayken yüksek derecede hidrofobik ve elastik özellikler göstermektedir. Liyofilizasyon sonrasında elde edilen yapıda (Şekil 5.4'te sunulmuştur) 20 mikron çaplı, birbiri ile etkileşim gösteren kavernöz yapılar ve porlar bulunmaktadır. Liyofilizasyon sonrası elde edilen kurutulmuş örnek, kırılgan özellikte olduğundan basınç uygulandığında toz haline gelmektedir. Oluşan bu toz tekrar sulu ortama (distile su, PBS tamponu veya besi ortamı gibi) eklendiğinde, partiküllerin sıvı ile temas sonucunda küresel yapıda hidrojellere dönüşmektedir.

5.1.3. Atomik Kuvvet Mikroskop Analizi

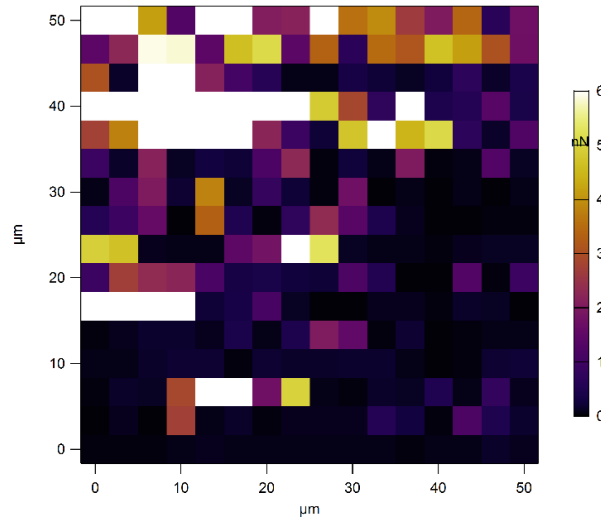
Elde edilen mikroküreler, su ortamında yeniden süspanse edildikten sonra mikropipet aspirasyonu tekniği ile atomik kuvvet mikroskop görüntüsü elde edildi. Kullanılan prob tipi Hertz Cone modeli prob ucu kullanılarak 5,15N/m yay sabiti ile yapılan ölçümlerde su kolonu oluturulması sonrasında yapılan 3 tekrarlı ölçümde 12,95 kPa ortalama elastik modül değeri ölçüldü. Bu ölçüm, elde edilen mikrokürelerin elastik özelliğini muhafaza ettiğini göstermektedir.



Şekil 5.5. Atomik kuvvet mikroskop analizi ölçümleri.



Şekil 5.6. Su içerisinde yeniden süspansiyon haline getirilen peletin çoklu ölçümde elastik modül dağılımını gösteren bir histogram.

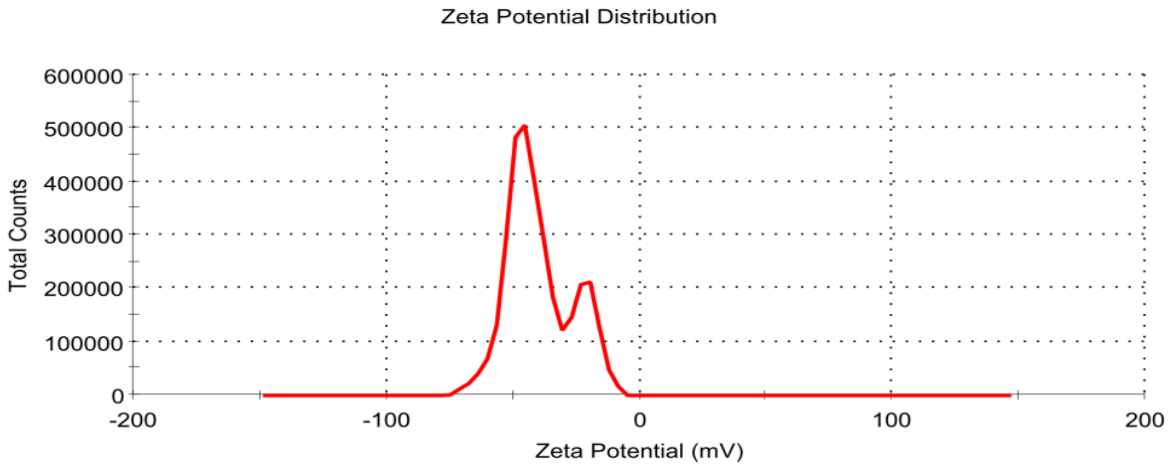


Şekil 5.7. Kompozit topografik görüntüleme sonucu.

Elde edilen liyofilize mikroküre örnekleri Tris içermeyen pH 7,4 PBS tamponunda ve distile su ortamında çözelti ve süspansiyon haline getirilerek atomik kuvvet mikroskobu ile incelenmiştir. Bu teknik normal şartlar altında suda asılı haldeki parçacıkların incelenmesi için uygun bir teknik olmamakla beraber, mikrokürelerin yüzey yükü ve hidrofobisite özelliğinden ötürü lam yüzeyine adsorbe olması sayesinde manivela (cantilever) yardımı ile inceleme yapılması mümkün olmuştur. Elastik modül ölçümünü sağlayan AFM tekniği, bu sebeple uygulanarak su ortamında dağıtılarak ve dağıtılmadan incelenen saf haldeki mikroküre örnekler üzerinde ölçümler gerçekleştirilmiştir. En az 10 tarama yapılarak oluşturulan kompozit olarak oluşturulan kompozit görüntüde kürelerin yaklaşık büyüklüğü görülürken debris yapısının üzerinde yapılan ölçümlerde elastisite ölçümünün sonuçları histogram şeklindeki grafikte sunulmaktadır.

5.1.4. Zeta Potansiyel Analizi

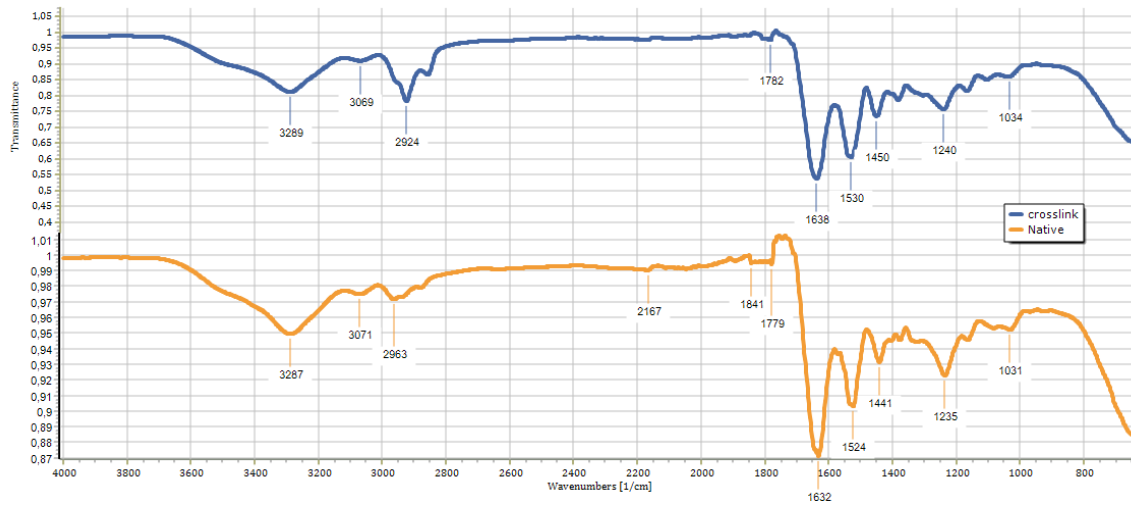
Elde edilen mikrokürelerin zeta potansiyel değeri iki pikte ifadenlenmektedir. Elde edilen biyomalzeme. negatif zeta potansiyel özelliğini göstermektedir. Ölçümler distile su ortamında gerçekleştirilmiştir (Şekil 5.8).



Şekil 5.8. Zeta potansiyel ölçümü. Elastin mikrokürelerin zeta potansiyeli -39,9 mV olarak ölçüldü.

Gerçekleştirilen Zeta potansiyel ölçümü mikropartiküllerin yüzeyindeki karboksil gruplarının genipin çapraz-bağlama reaksiyonu sonrasında iyonizasyona uğradığını göstermektedir.

5.1.5. FTIR spektrum analizi



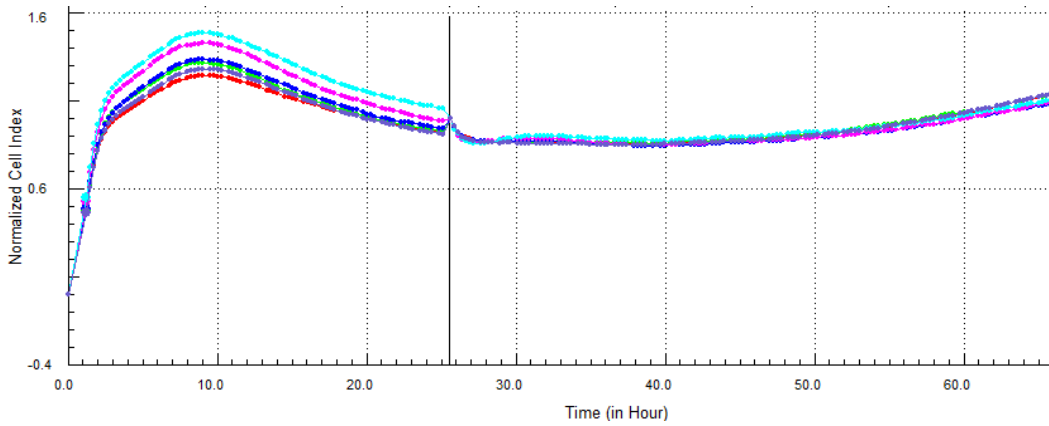
Şekil 5.9. Fourier Transform Infrared Spektrum analizi sonucu elde edilen spektrum görüntüleri.

Degradasyon sonrasında yeniden çapraz bağlanarak oluşturulan mikroküre yapılarının aktif gruplar, bağ yapısı ve bu kimyasal bağların oranları açısından nativ alfa elastine neredeyse özdeş nitelikte olduğu görülmektedir. Fonksiyonel grup bölgesi ve parmak izi bölgesi, 3289, 3069, 2924, 1782, 1638, 1530, 1450, 1240 ve 1034 dalga numarasında absorpsiyon sinyali içermektedir. Çapraz bağlanma gerçekleştirilen protein, şekil 5.9’da görüldüğü gibi çok yakın okuma değerleri ile doğal alfa-elastin proteini örnekleri ile çok yakın kimyasal bağ kompozisyonu özellikleri göstermektedir. Geliştirilen malzemenin maruz kaldığı geliştirme basamaklarının elastinin yapısal ve biyokimyasal özelliklerini ne düzeyde etkilediği FT-IR spektrumu kullanılarak incelenmiştir. Elde edilen IR spektrumu, degradasyon sırasında elastin moleküllerinin aminoasit dizisini büyük ölçüde koruduğu gösterir. Buna ek olarak çapraz bağlama aşaması ve mikropartiküllerin eldesi sırasında gerçekleştirilen kimyasal değişikliklerin elastin molekülünün kimyasal kompozisyonunu büyük ölçüde koruduğunu göstermektedir (Çizelge 5.1).

Çizelge 5.1. Dalga numaraları ve temsil ettikleri fonksiyonel gruplar.

Absorpsiyon (cm^{-1})	Titreşim Tipi	Fonksiyonel Grup
1034	Esnek (alkol)	C-O
1240	Esnek (amin)	C-N
1450	Bükülen (alkan)	-C-H
1530	Esnek (aromatik)	C=C
1638	Esnek (alken)	C=C
1782	Esnek (karbonil)	C=O
2924	Esnek (alkan)	C-H
3069	Esnek (alken)	=C-H
3289	Esnek, H-bağlı (alkol)	O-H

5.1.6. Eş-zamanlı Hücre Proliferasyon Analizi

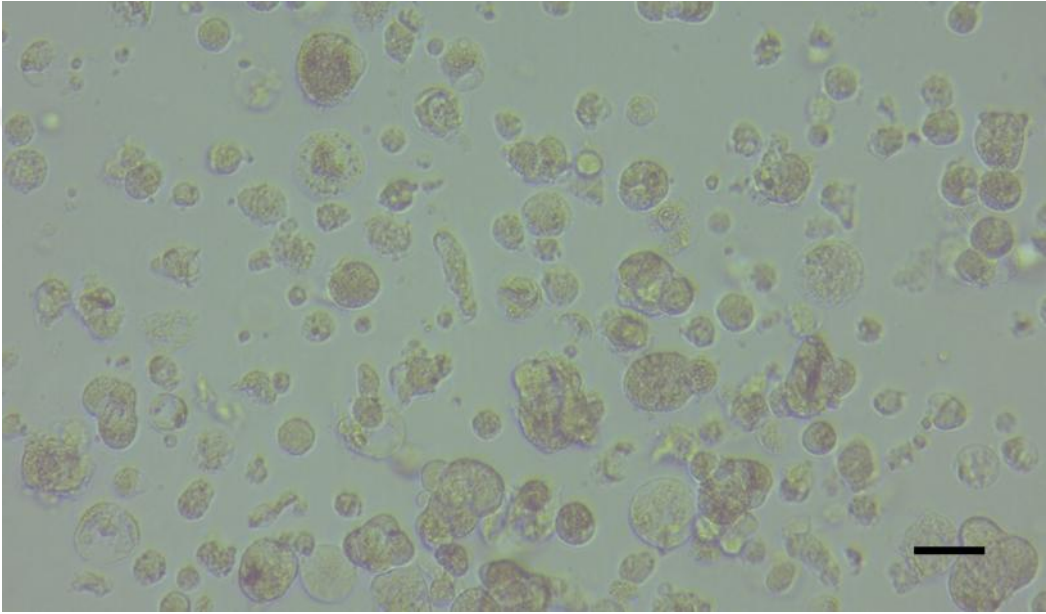


Şekil 5.10. Artan elastin mikroküre konsantrasyonunun hücre viabilitesine etkisi.

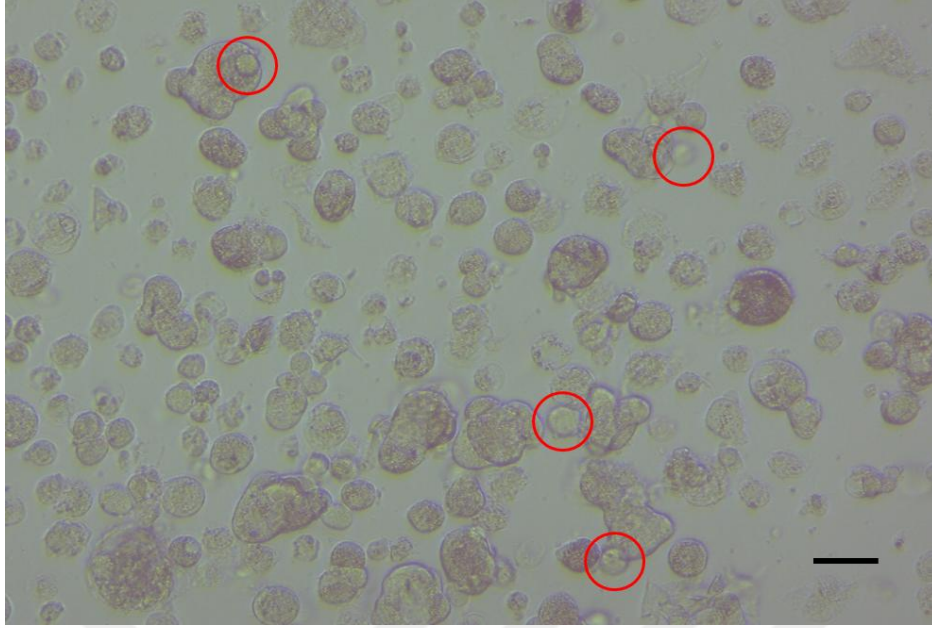
Genipin ile çapraz bağlama sonucunda açığa çıkan mikroküre yapılarının ve ortamda kalıntı olarak var olabilecek genipin moleküllerinin hücre kültürü ortamında toksik veya proliferasyonu olumsuz etkileyebilecek niteliklerinin olmadığı gözlenmiştir (Şekil 5.10).

5.2.2. Üç Boyutlu Mikroyerçekimi Biyoreaktörü ile Elde Edilen Hücre Öbekleri

Gerçekleştirilen kültür basamakları sonunda elde edilen inversiyon mikroskop görüntüleme sonuçlarına Şekil 5.11 ve 5.12’de yer verilmiştir. Oluşan hücre öbeklerinin büyüklüğü, yoğunluğu ve elastin mikrokürelerle ilişkisi bu yolla incelenmiştir. Şekil 5.12’de oluşan elastin mikroküre yapıların hücre öbekleriyle ilişkisi görülmektedir. Bu yapılar kültür süresince varlığını sürdürse de, hücre öbeklerinin oluşmasına doğrudan katkı sağlamadıkları, ancak kültür ortamında öbek yapılarıyla temas halinde oldukları görülmektedir.



Şekil 5.11. Üç boyutlu mikroyerçekimi biyoreaktöründe hücre öbeklerinin ışık mikroskop görüntüsü. (Ölçek 50µm)

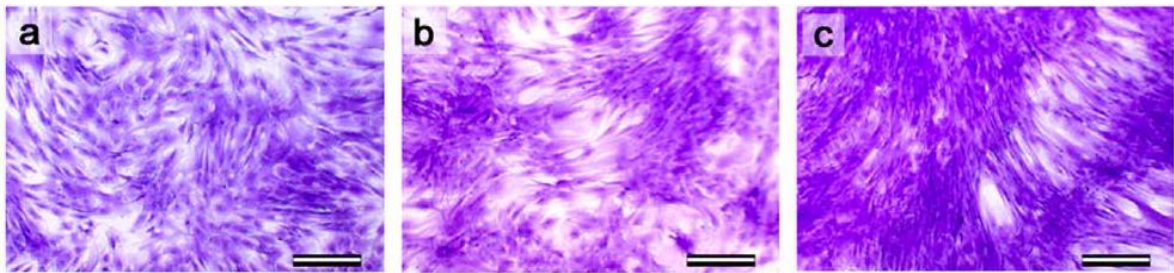


Şekil 5.12. Üç boyutlu mikroyerçekimi biyoreaktöründe oluşan hücre öbekleri ve elastin mikrokürelerin görünümü. (Ölçek 50µm).

5.2. ADİPOZ KÖK HÜCRE KARAKTERİZASYONU

5.2.1. Koloni Oluşturan Fibroblastik Birim Analizi (Colony-forming unit-fibroblast assay) CFU-f

iAKH'lerin kendi kendini yenileme özelliğinin varlığını belirlemek amacı ile gerçekleştirilmiştir. Elde edilen koloniler, dijital ışık mikroskobu aracılığı ile görüntülenmiştir (Leica DM 4000B, Wetzlar, Almanya).

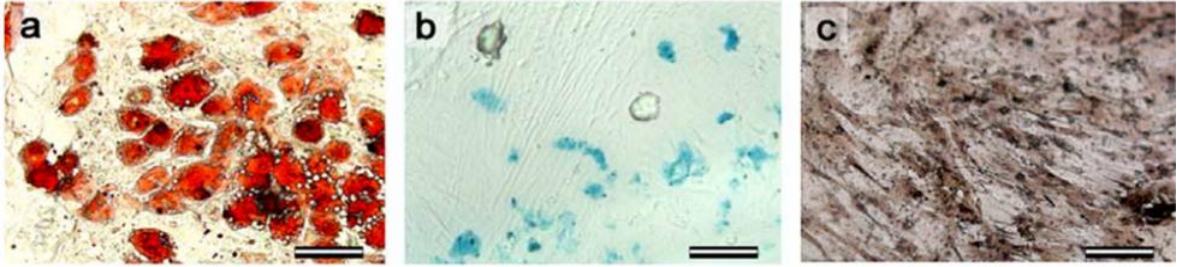


Şekil 5.13. CFU-f analizi görüntülemesi.

Koloni oluşturan fibroblastik birimler, kültürün 14. gününden itibaren görünür duruma gelmiştir. Bu yapıları iğ benzeri fibroblastoid morfolojiye sahiptir. Kristal viyole boyaması sonrasında ışık mikroskobu altında görüntülenerek elde edilen mikrograflar sırası ile a)100 hücre/cm², b) 1000 hücre/cm² ve c)10000 hücre/cm² gruplarına aittir. Ölçek 100µm.

5.2.2. Üç nesle Farklılaşma Analizi (Trilineage)

Elde edilen hücre popülasyonunun insan adipoz kök hücre özelliğini taşıdığının doğrulanabilmesi için farklılaşma potansiyeli taşıdığının kanıtlanması gereklidir. Bu amaçla hücreler, osteojenik, kondrojenik ve adipojenik farklılaşma için indüksiyona maruz bırakılmıştır.

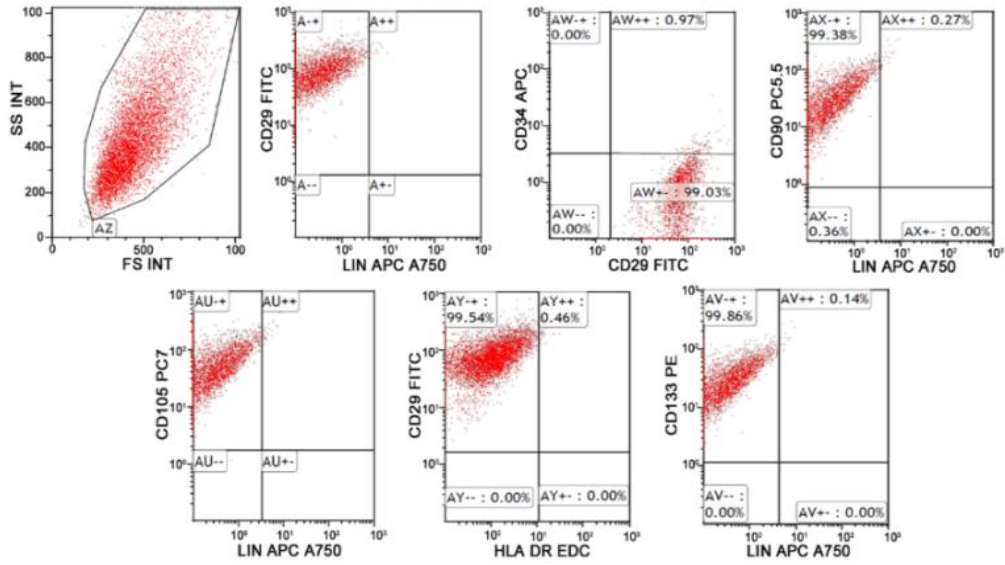


Şekil 5.14. Üç nesle farklılaşma analizi. a) Oil Red O, b) Alcian Blue ve c) Von Kossa

Slaytlar üzerinde yapılan histolojik boyamalarda farklılaşma sonuçları Şekil 5.14'te görülmektedir. a) lipid globüllerinin boyandığı Oil Red O boyaması, b) Kondrojenik farklılaşmanın gösterilmesi amacı ile glikozaminoglikanların boyandığı Alcian mavi boyaması ve c) von Kossa boyaması ile kalsiyum depozitlerinin gösterildiği osteojenik farklılaşma grubu görülmektedir (Ölçek 100µm).

5.2.3. Hücre Yüzey Belirteçleri

AKH'lerin immünofenotipleme analizi akım sitometri ile gerçekleştirilmiştir. Stromal hücrelerde ifadelenen CD29, CD73, CD90, CD105 yüzey belirteçlerinin kuvvetli ifadesinin yanı sıra CD31 ve CD34 yüzey belirteçlerini ifadesinin var olmadığı belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar hücrelerin adipoz kök hücre karakteristik özelliklerini taşıdığını göstermektedir.



Şekil 5.15. Hematopoietik hatta ilişkin yüzey belirteçlerini ifadelemediği belirlenmiştir. CD29, CD90, CD105 yüzey belirteçleri ifadenmektedir.

5.3. FARKLILAŞMA SONRASİ ANALİZLER

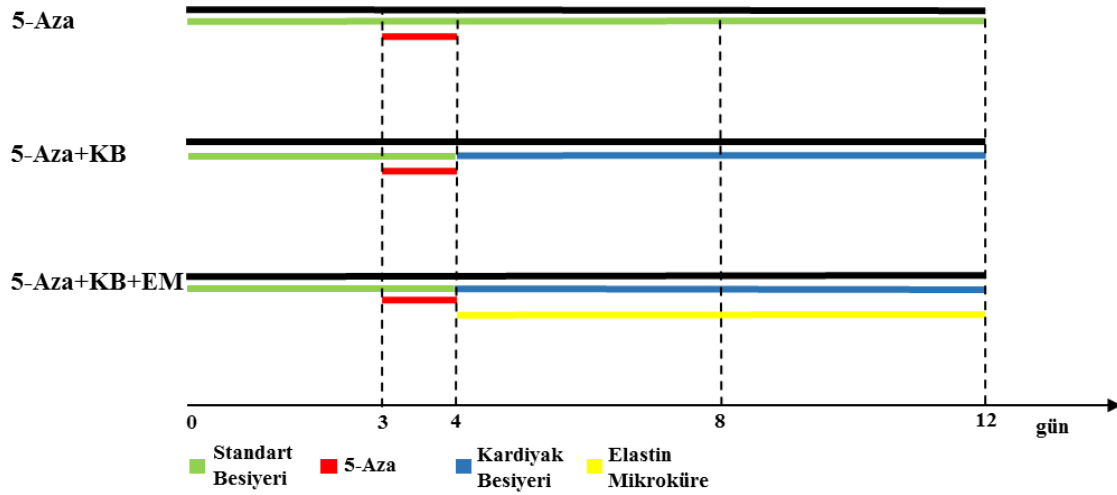
5.3.1. Gen İfadesi Analizi

Hücre kültürü deneyleri iki boyutlu standart hücre kültürü ve üç boyutlu mikroyerçekimi kültür koşullarında gerçekleştirilmiştir. Adipoz kök hücreler iki boyutlu hücre kültüründe 50000/mL ve üç boyutlu hücre kültüründe ise 150000 hücre/mL konsantrasyonunda tohumlandı. Üç boyutlu kültür koşullarında yapılan deneylerde, hücrelerin mikroyerçekimi koşullarına adapte olması için tripsinizasyon sonrasında 3 gün süresince standart koşullarda mikroyerçekimi biyoreaktöründe kültür sürdürüldü. Bir günlük indüksiyon aşamasından sonra kültür 8 gün süre ile devam etti. Mikroyerçekimi deneyleri 12. gün sonunda ve statik kültür grupları 9. Gün sonunda sonlandırılarak RNA saklama solüsyonunda -80°C’de donduruldu ya da doğrudan RNA izolasyonu yapıldı.

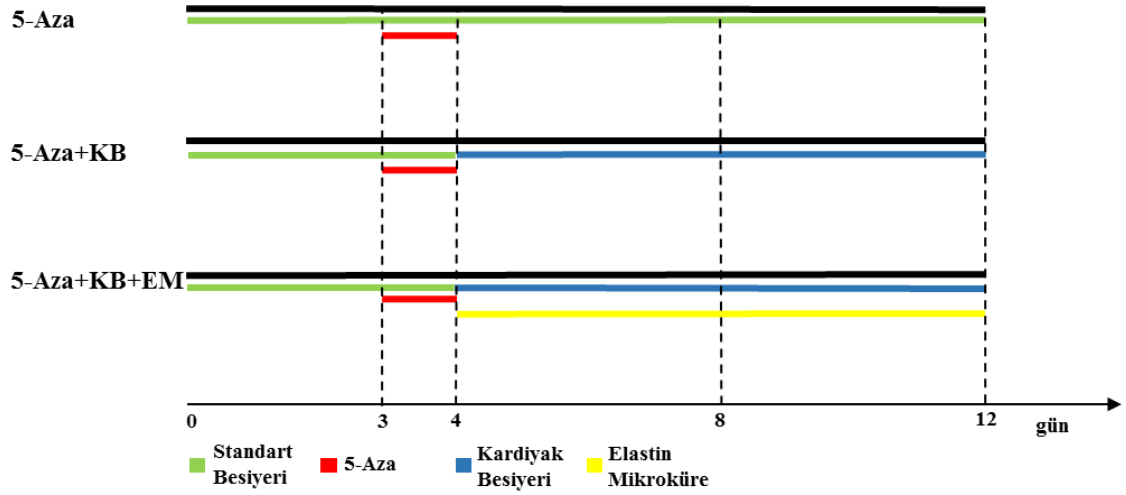
Deney gruplarının tasarımı şu şekildedir; birinci grupta %10 serum içeren standart besi ortamında 5-Azasitidin indüksiyonu varlığında kültür yapılmıştır. Bu grupta besiyeri değişimleri diğer gruplarla aynı zaman noktalarında gerçekleştirildi. 1. grup, standart vasat ile kültür yapıldı, kardiyak indüksiyon amacı ile 5-Azasitidin eklendi. Bu gruba 3. günün sonunda 24 saat süre ile son konsantrasyonu 10µM olacak biçimde 5-Azasitidin uygulandı, besiyeri değişimi devamında standart koşullarda kültür sürdürüldü. 2. gruptaki hücrelere, 5-Azasitidin indüksiyonu uygulandı ve hücreler indüksiyon sonrasında kardiyak vasat

içinde kültür yapıldı. 3. gruptaki hücrelere, 5-Azasitidin indüksiyonu sonrasında kardiyak vasat ve elastin mikroküre varlığında kültürü yapıldı. Gruplar arasında gen ifadesinin karşılaştırılabilmesi için, iki boyutlu ve üç boyutlu hücre kültürü yapılan gruplar, aynı sürelerle 5-Azasitidin ve büyüme faktörü karışımı ile muamele edilmiştir. Bunun yanı sıra indüksiyon ve kardiyak büyüme kültürü süreçlerinden önce üç boyutlu kültür gruplarında 3 gün mikroyerçekimine koşullandırma amacı ile kültür yapılmıştır. İki boyutlu hücre kültürü grupları için dokuzuncu gün sonunda; üç boyutlu hücre kültürü gruplarında onikinci gün sonunda hücreler 4750 rpm hızında 7 dakika santrifüjlenerek pelet haline getirilmiştir. Süpernatant atıldıktan sonra elde edilen pelet RNA saklama solüsyonuna aktarılıp 16 saat süre ile +4°C’de inkübe edildikten sonra -80°C soğutucuya aktarıldı. Sonrasında peletler, mRNA izolasyonu ve cDNA sentezi yapıldıktan sonra eş zamanlı PZR gerçekleştirildi.

Eş-zamanlı PZR sonucunda elde edilen eşik değerleri (Ct değeri), Livak yöntemi (163) ile normalize edilerek bağıl gen ifadesi düzeyleri elde edilmiştir. Bağıl gen ifadesi düzeyleri öncelikle varyansın homojenliğinin incelenmesi için tek yönlü ANOVA yöntemi ile, sonrasında nonparametrik Kruskal-Wallis analizi ile değerlendirilmiştir. P değerleri Benjamini-Hochberg düzeltmesi ile sıralanmıştır. 0,05’ten küçük p değeri anlamlı kabul edilmiştir.

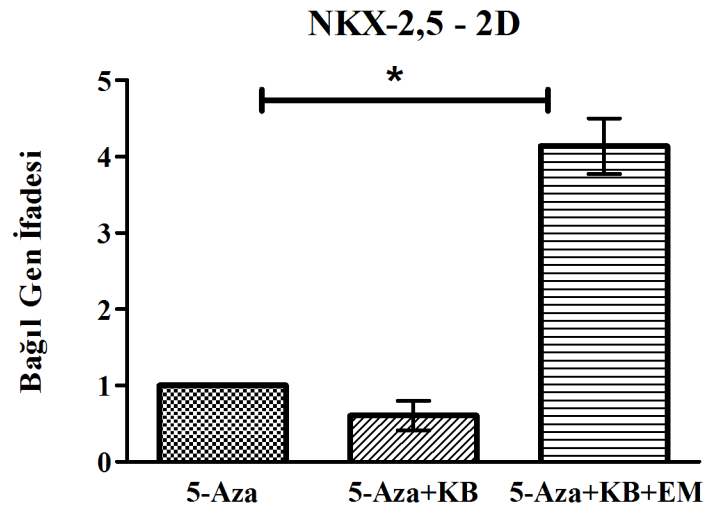


Şekil 5.16. İki boyutlu hücre kültürü deneylerinde uygulanan gruplar.



Şekil 5.17. Üç boyutlu hücre kültürü deneylerinde uygulanan gruplar.

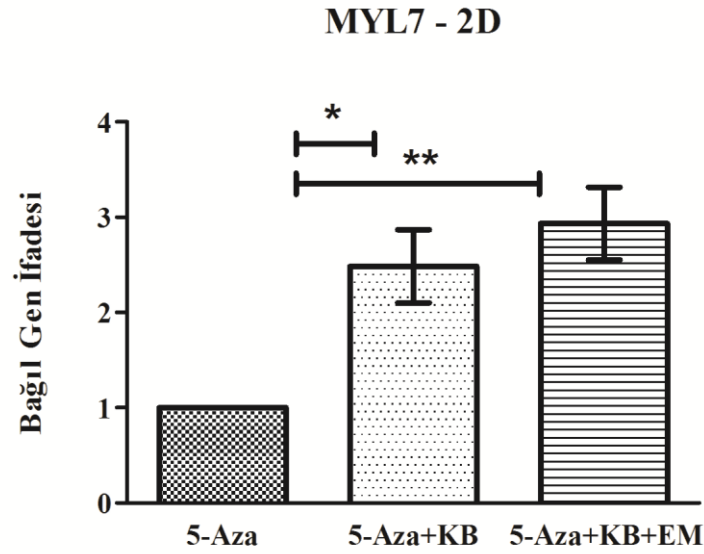
5.3.1.1. İki Boyutlu Kültür Sonucunda Gen İfadesi Değişimleri



Şekil 5.18. İki boyutlu hücre kültürü yapılan 3 grupta NKX2-5 gen ifadesinin değişimi. P=0,024.

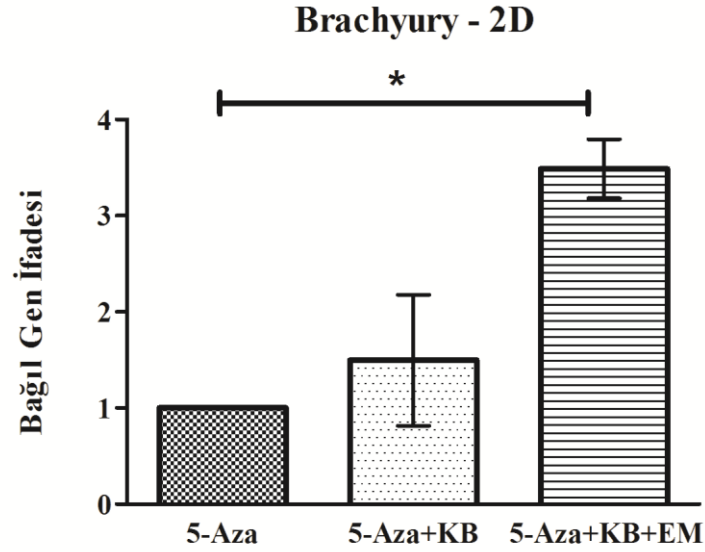
İki boyutlu kültür sonucunda gen ifadesi analizi yapılan örnekler için RPLP0 geni gruplar arasında en tutarlı ifade düzeyini göstermesinden ötürü (ribosomal protein lateral stalk subunit P0) vekilharç gen olarak kullanılmıştır. 10µM 5-Azasitidin induksiyonu uygulanan üç gruba ait kardiyak gen ifadesi yukarıda bahsedilen hesaplama yöntemleri ile incelenmiştir. Bazı genlerin ifadesinde istatistiksel açıdan anlamlı değişiklikler meydana gelmiştir. NKX2-5, GATA4, MYL7 ve T (Brachyury) genlerinin ifadesinde. Şekil 5.20’te ifade katsayılarındaki farklılık bağıl olarak gösterilmiştir. NKX2-5 gen ifadesi değişikliğinin rasgele gerçekleşmediğini ve mezenkimal karakterli adipoz kök hücrelerin

öncelikle mezodermal yönde farklılaşmaya başlayarak sonrasında kalbe özgü transkripsiyon faktörlerini ifade ettiklerini göstermektedir. Literatürde kalp bölgesinin oluşumu ve kalp gelişimi ile ilgili bilinen zamanlamada ifadelendiğinden ve miyozin hafif zincir 7 gibi yalnızca kalpte ifadelen genlerin ifade düzeylerindeki değişimleri ile bir arada değerlendirildiğinde kalp yönünde ilkin farklılaşma belirtisi olarak yorumlandığından çalışmada değişken olarak tercih edilmiştir (164).



Şekil 5.19. İki boyutlu hücre kültürü yapılan 3 grupta MYL7 gen ifadesinin değişimi. *P=0,037, **P=0,037.

Aynı biyokimyasal koşullar ve zaman noktaları kullanılarak gerçekleştirilen üç boyutlu hücre kültürü, 5-Azasitidin uygulamasının kardiyak gelişimi ve farklılaşmayı başlatma etkisinin üç boyutlu mikroyerçekimi koşulları altında etkilenip etkilenmediğinin saptanması amacı ile gerçekleştirilmiştir.



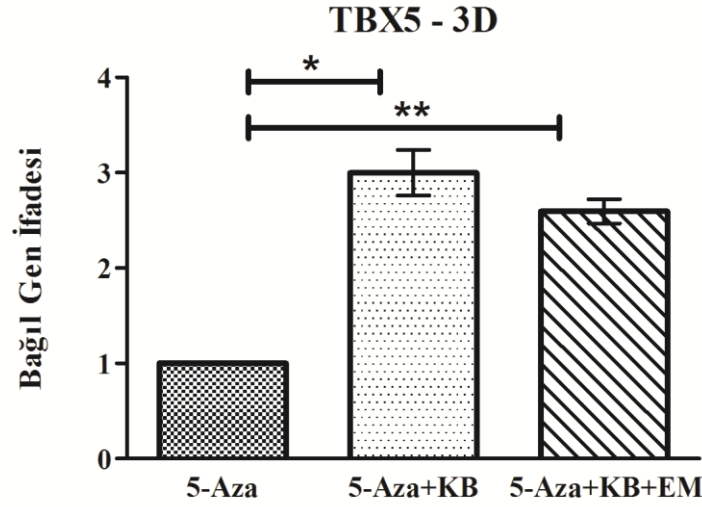
Şekil 5.20. İki boyutlu hücre kültürü yapılan 3 grupta Brachyury (T) gen ifadesinin değişimi. *P=0,034.

24 saat süreli 5-Azasitidin muamelesi sonrasında üçüncü ve dördüncü gruplar kardiyak besi ortamında sekiz gün süre ile kültür yapıldı. Kardiyak besi ortamı, içerdiği ITS, B27, trombin, kardiyotrofin, EGF ve bFGF içeriği ile aktive olan kardiyak gen transkripsiyonunun devamlılığına katkıda bulunması amacı ile kullanılmıştır. Kontrol grubu ile kıyaslandığında kardiyomiyosit progenitörlerinde ve kardiyomiyosit sitoplazmasında işlev gösteren proteinlere ilişkin genlerin ifadesinde toplamda anlamlı olmayan, ancak grup içinde NKX2-5 ve MYL7 genleri için istatistiksel açıdan anlamlı artış görülmüştür.

5-Azasitidin indüksiyonu ve kardiyak besi ortamı varlığında kültürü yapılan adipoz kök hücrelerin kardiyomiyosit ve kardiyak protenitörlere özgü miyozin hafif zincir 7 ve NKX2-5 genlerinin ifadesinde grup içinde anlamlı artış gerçekleştiği gözlemlenmiştir. Kardiyak besi ortamında gerçekleştirilen kültürün, kardiyak gen ifadesini etkileme potansiyelinin incelenmesi amacı ile yalnızca 5-Azasitidin uygulanan birinci grup ve 5-Azasitidin ile kardiyak besi ortamı uygulanan ikinci gruplar arasında gen ifadesi katsayısı farklılığı incelenerek kardiyak besi ortamının etkisinin ayrıca ölçülmesi amaçlanmıştır (bkz. Şekil 5.16 ve 5.17).

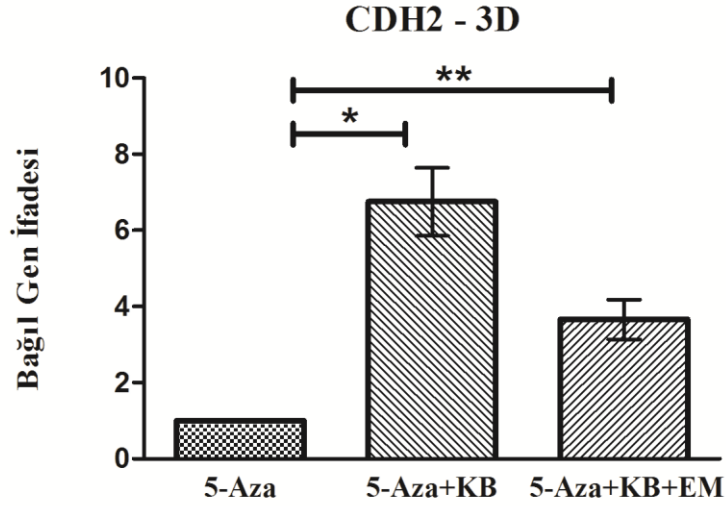
5.3.1.2. Üç Boyutlu Kültür Sonucunda Gen İfadesi Değişimleri

Kardiyomiyojenik farklılaşmanın başlatıldığı 5-Azasitidin kullanılan hücre gruplarının kardiyak besiyeri ortamında kültürü yapılması sonucunda TBX5 gen ifadesinde grup içinde anlamlı ifade düzeyi değişikliğine yol açtığı görülmektedir. Mezodermal gelişim süreçlerine ilişkin belirteçlerin ifadesinde ise düşük düzeyde artış vardır. Üç boyutlu kültür sonucunda elde edilen örneklerin gen ifadesi analizinde beta aktin proteinini kodlayan ACTB geni vekilharç gen olarak değerlendirilmiştir.



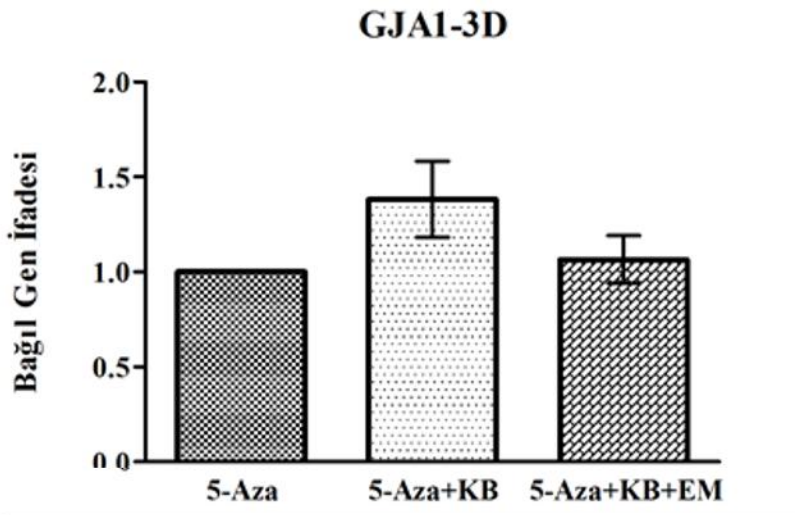
Şekil 5.21. İki boyutlu hücre kültürü yapılan 3 grupta TBX5 gen ifadesinin değişimi. *P=0,034, **P=0,037.

5-Azasitidin ile farklılaşmanın tetiklendiği ve kardiyak büyüme besi ortamında kültürü yapılan hücrelerin kültür süresi sonunda TBX5 gen ifadesinde artış gözlenmiştir. Mezodermal farklılaşma ve kalp alanı oluşumu ile ilgili olan bu genin ifade düzeyi artışı NKX2-5, TBX5 genlerindeki ifade değişimi ile beraber değerlendirildiğinde kardiyak farklılaşmanın ilk dönemlerine ilişkin hücresel aktivitenin varlığı görülmektedir. Üç boyutlu hücre kültürü koşullarında kaydedilemeyen ancak iki boyutlu hücre kültürü koşullarında ortaya çıkan MYL7 gen ifadesindeki artış, kardiyomiyositlerin kasılma aparatında bulunan bir proteine ilişkin gen ifadesi ile ilgili olduğu için anlamlı olması beklenmiştir.



Şekil 5.22. Üç boyutlu hücre kültürü yapılan 3 grupta CDH2 gen ifadesinin değişimi. *P=0,037, **P=0,05.

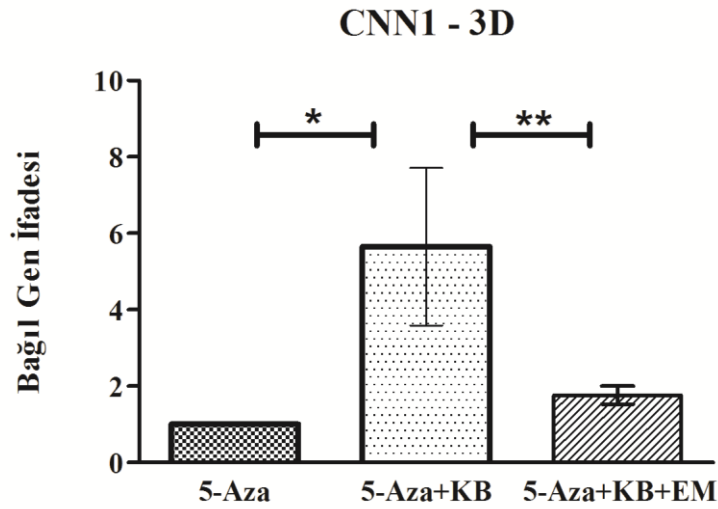
Kardiyak büyüme besi ortamının yalnızca 5-Azasitidin uygulanan gruplar arasında gen ifadesi açısından oluşturduğu farklılık tespit edilmiştir. Erken dönem kardiyak farklılaşmayı başlatan ve kalp oluşumu süresince ifadelenen NKX2-5 gen ifadesinde istatistiksel açıdan anlamlı bağıl artış görülmüştür. Bunun yanı sıra kasılma aparatına ilişkin bir belirteç olan ve yalnızca kardiyomiyosit sitoplazmasında ifadelenen miyozin hafif zincir 7 geninin ifadesinde artış olduğu saptanmıştır. Kardiyak büyüme besi ortamı içeren grubun miyozin hafif zincir 7 ifadesinde artışa sebep olduğu saptanmıştır.



Şekil 5.23. Üç boyutlu hücre kültürü yapılan 3 grupta GJA1 gen ifadesinin değişimi.

Elastin mikroküre varlığında yapılan üç boyutlu mikroyerçekimi kültürü sonundaki gen ifadesi düzeylerinin değişiminin diğer gruplardaki gen ifadesi ile kıyaslaması, elastin mikrokürelerin taşıyıcı ya da çekirdek oluşturma işlevini gösterip göstermediğinin anlaşılması amacı ile gerçekleştirilmiştir. 5-Azasitidin indüksiyonu sonrasında kardiyak büyüme besi ortamında ve elastin mikroküre varlığında gerçekleştirilen kültür ile yalnızca 5-Azasitidin indüksiyonu yapılmış olan grup ile karşılaştırmasını içermektedir.

5-Azasitidin indüksiyonu ve kardiyak büyüme besi ortamı uygulanan grupların elastin mikroküre varlığında gen ifadesinde görülen değişime Şekil 5.19, Şekil 5.20, Şekil 5.22’te yer verilmiştir. Elastin mikrokürelerin üç boyutlu mikroyerçekimi kültür ortamında hücre öbeklerinin oluşmasına ve kardiyak yönde farklılaşmaya etkisinin olup olmadığının değerlendirilmesi amacı ile yapılan bu hesaplamaların sonucunda kardiyomiyosit ve kardiyak progenitörlere özgü NKX2-5 ve TBX5 genlerinin ifadelerinde grup içinde artış olduğu saptanmıştır.



Şekil 5.24. Üç boyutlu kültürde CNN1 gen ifadesi değişimi. P=0,37

İki boyutlu hücre kültürü altında özdeş deneysel koşullarda yürütülen deneyler sonunda elde edilen gen ifadesi elastin proteininin taşıyıcı ya da hücre öbeği oluşturma etkisine bağlı olup olmadığının anlaşılması amacı ile gerçekleştirilmiştir. İki boyutlu standart kültür koşulları altında yalnızca 5-Azasitidin indüksiyonu gerçekleştirilen deney grubu gen ifadesi profili ile 5-Azasitidin indüksiyonu sonrasında kardiyak büyüme besi ortamı ve elastin mikroküre varlığında kültür yapılan üçüncü gruba ait gen ifadesi profilinin bağlı karşılaştırılması yapılmıştır. Üçüncü grupta erken dönem kalp farklılaşması ve gelişiminde

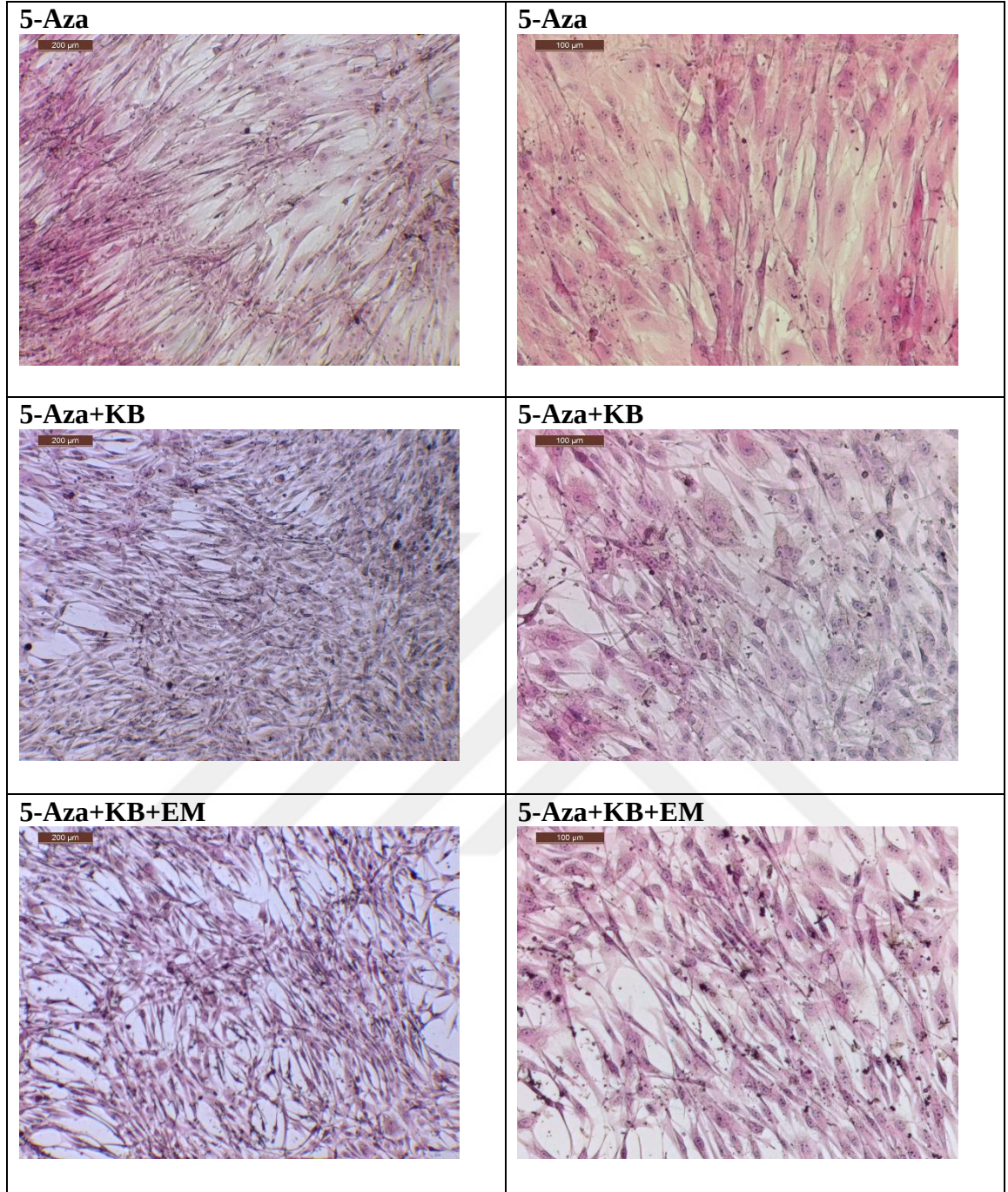
görev alan ve belirteç özelliği bulunan NKX2-5 ve TBX5 gen ifadesinde bağlı artış gözlenmiştir. Bunun yanı sıra CDH2 gen ifadesi düzeyinde grup içinde artış görülmüştür.

İki boyutlu hücre kültürü yapılan gruplar arasında elastin mikrokürelerin indüksiyon sonrası kardiyak büyüme besi ortamında kültür yapılan hücrelerin elastin mikroküre varlığında gen ifadesine etkisi Şekil 5.18, Şekil 5.19, Şekil 5.20, Şekil 5.21 ve Şekil 5.22’de yer almaktadır. Elastin mikroküre varlığında yapılan kültür sonucunda NKX2-5, TBX5, Brachyury ve MYL7 gibi kardiyomiyositlere ve kardiyak progenitörlere özgü genler açısından grup içi artışa sebep olmuştur.

5.3.2. İmmünohistokimyasal Analiz

5.3.2.1. Hematoksilin-Eozin Boyaması

İki boyutlu hücre kültüründe 3 deney grubu koşullarının tekrarlanarak sürdürüldüğü 5-Azasitidin uyarımı gerçekleştirilen birinci grup, 5-Azasitidin uyarımı ile kardiyak vasat varlığında kültür yapılan ikinci grup ve 5-Azasitidin uyarımı ile kardiyak vasata ek olarak elastin mikroküre varlığında kültürü yapılan üçüncü grup örneklerinin 8 günlük kültürü sonunda gerçekleştirilmiştir. Fikse edilen hücreler öncelikle, hücre çekirdeği, dizilimi, sitoplazma yapısı ve hücrelerin ekstraselüler matriksle ilişkisi gibi temel dokusal özelliklerinin incelenmesi için Hematoksilin-Eozin yöntemi kullanılarak boyanmıştır. Sonuçlar hücre gruplarının sağlıklı gelişim gösterdiğini ortaya koymaktadır. Birinci gruba ait hücre serisinin görüntüsü hücre dağılımı ve sıklığı, çekirdek büyüklüğü gibi belirteçler açısından sağlıklı bir görüntü sergilemektedir. İkinci grupta hücrelerin ebat olarak daha küçük olduğu ve birim alandaki hücre sayısının gruplar arasında artış gösterdiği görülmektedir. Bu durum, kardiyak vasat içeriğindeki büyüme faktörlerinin hücre proliferasyonunu tetikleyici bir etkisi olduğunu göstermektedir. Üçüncü grupta görülen değişim de bu gözlemi destekleyen niteliktedir. Üçüncü gruba ait boyamalarda küçük ebatlı hücrelerin sayıca çokluğu proliferasyon düzeyindeki bir artışa işaret ederken, hücrelerin öbeklenmesi ile oluşan boşluklar koloni oluşturma davranışının varlığını göstermektedir (Şekil 5.25).

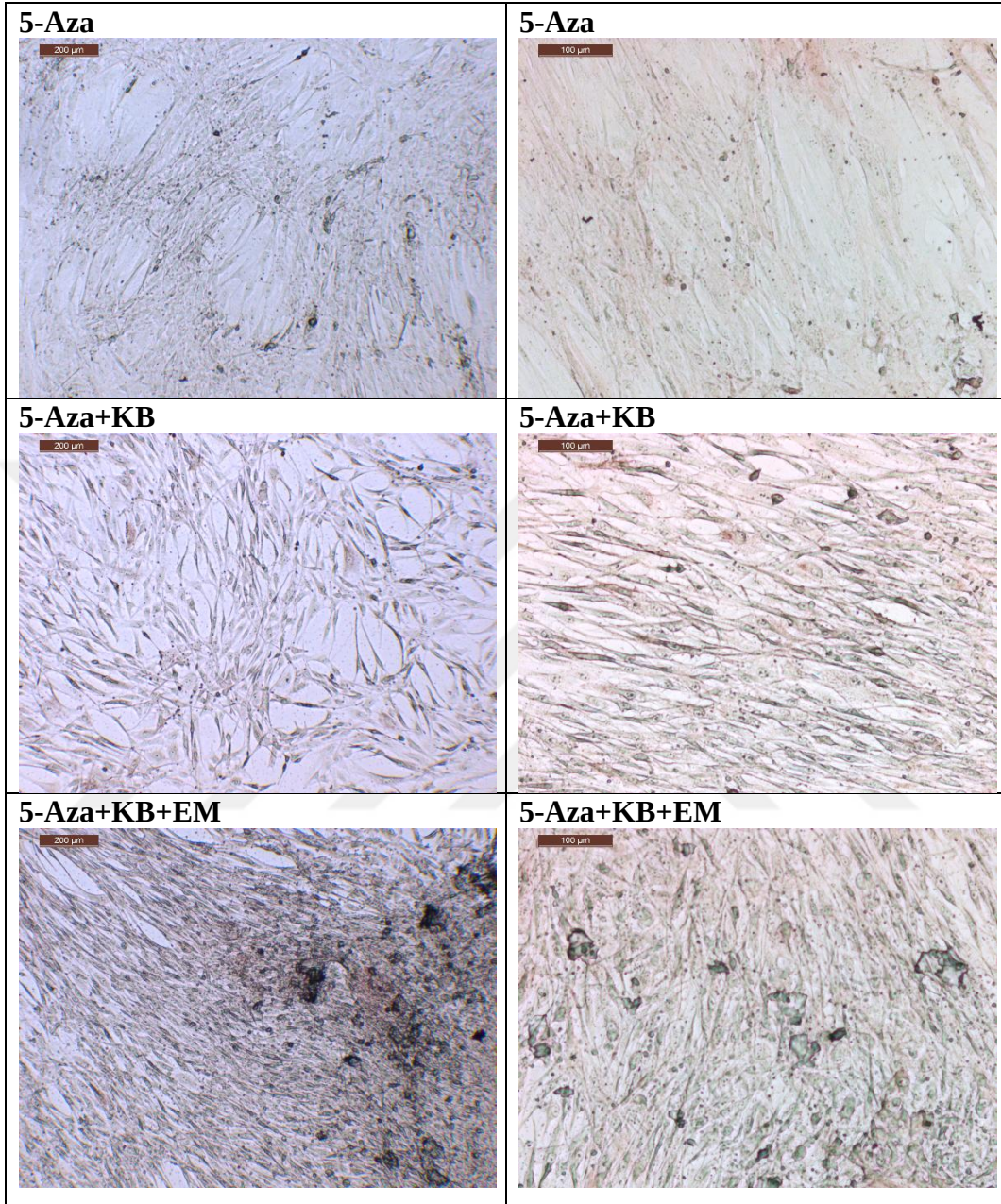


Şekil 5.25. Hematoksilin-Eozin boyaması sonuçları. Ölçek çubuğu solda 200µm, sağda 100 µm.

5.3.2.2. Aktin Boyaması

İki boyutlu hücre kültürü deneyleri sonunda Aktin proteininin immünohistokimyasal analizi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen boyamalar karşılaştırıldığında aktin proteininin ekspresyonu açısından kontrol ve deney grupları arasında anlamlı bir boyama derecesi farkı görülmemiştir. Buna karşın ikinci ve üçüncü gruplara ilişkin slaytlarda hücre

proliferasyonunun kontrole kıyasla daha yüksek düzeyde gerçekleştiğini gösteren bulgular mevcuttur (Şekil 5.26).

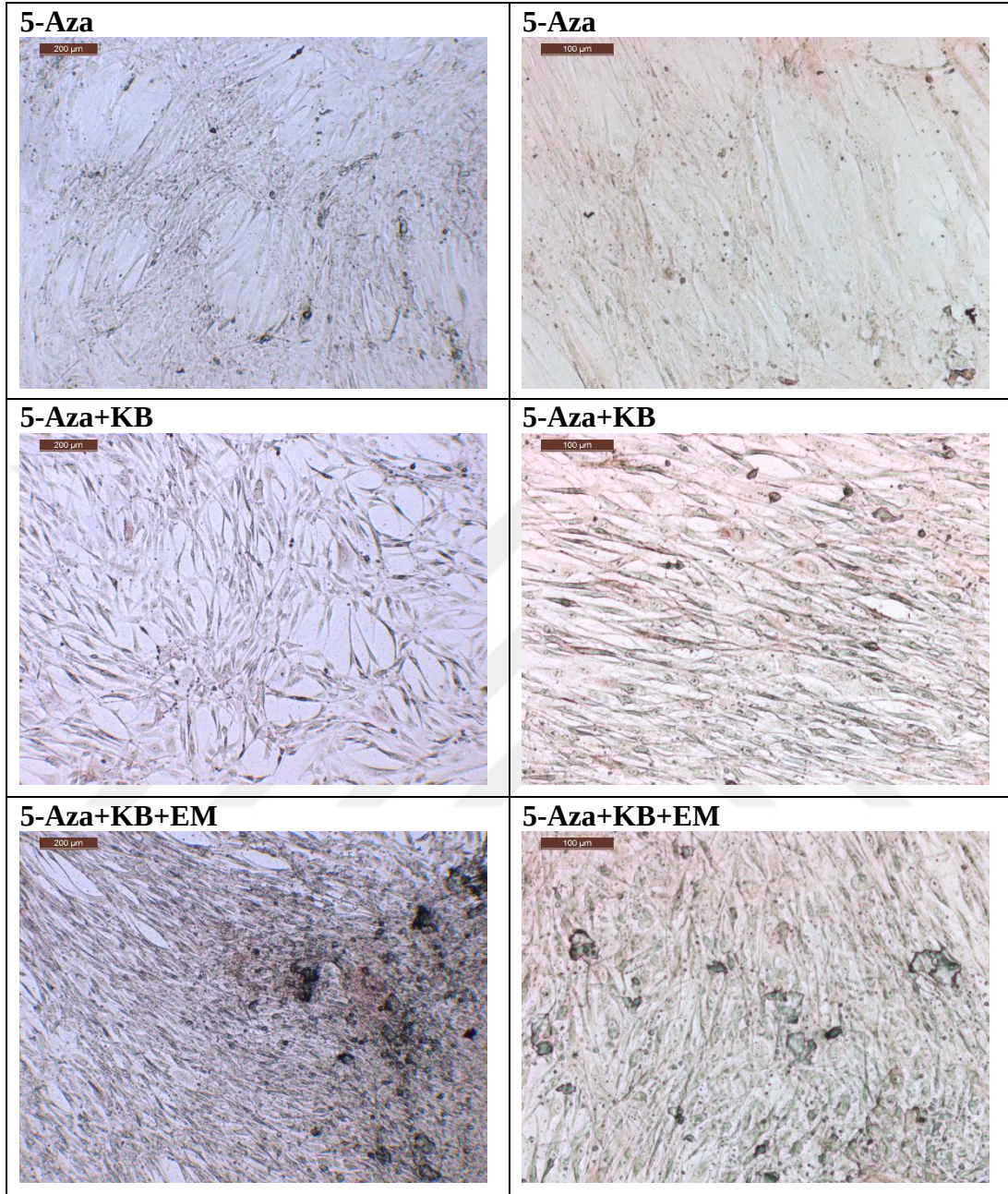


Şekil 5.26. Aktin boyaması sonuçları. Ölçek çubuğu solda 200µm, sağda 100 µm.

5.3.2.3. CD34 Boyaması

İki boyutlu hücre kültürü deneyleri sonunda CD34 proteininin immünohistokimyasal analizi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen boyamalar karşılaştırıldığında CD34 proteininin ekspresyonu açısından kontrol ve deney grupları arasında anlamlı bir boyama derecesi farkı görülmemiştir. Buna karşın ikinci ve üçüncü gruplara ilişkin slaytlarda, küçük ebatlı

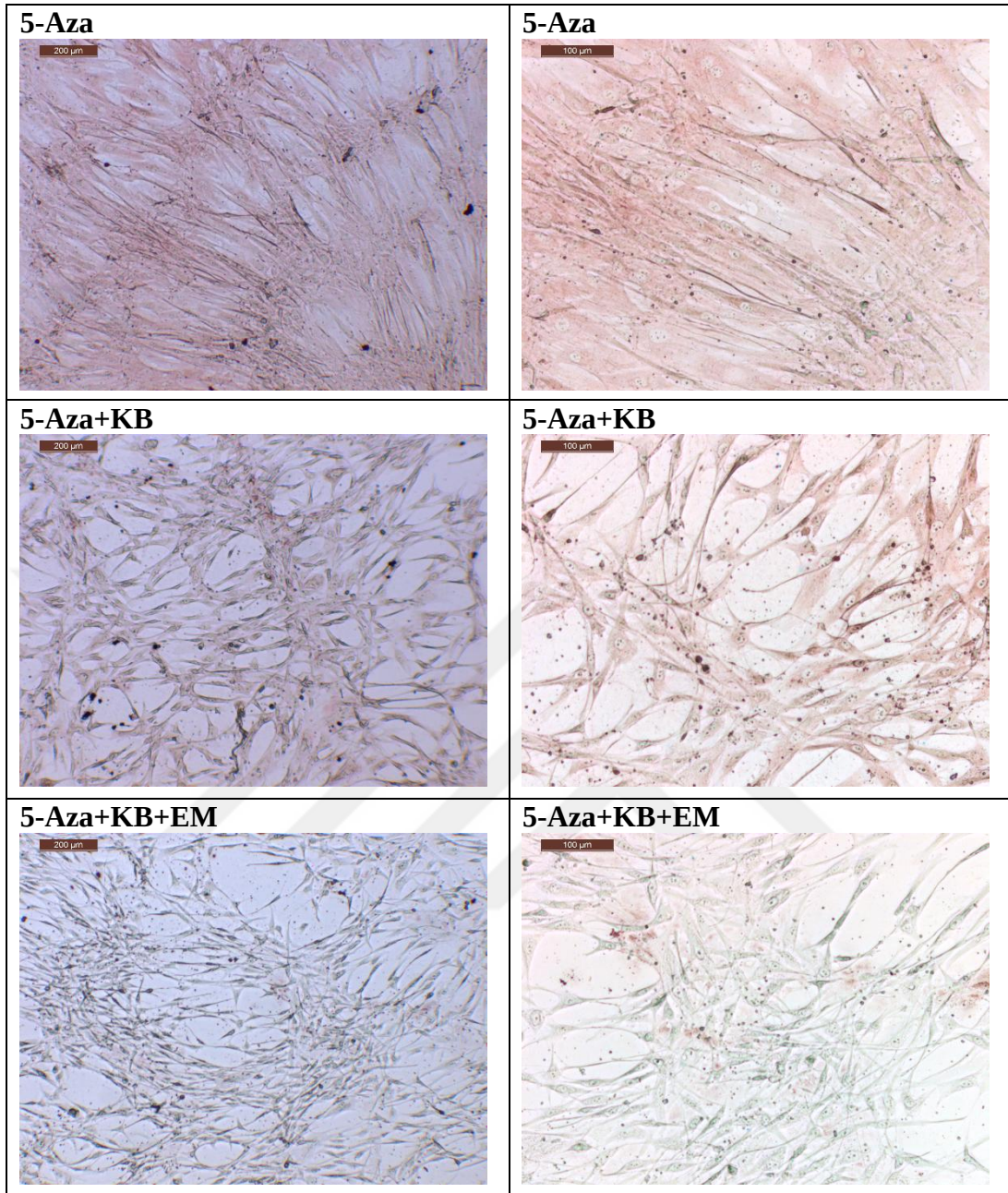
hücrelerin sayıca çokluğu ve kültür yüzeyinde oluşan boşluklar, hücre proliferasyonunun kontrole kıyasla daha yüksek düzeyde gerçekleştiğini göstermektedir (Şekil 5.27).



Şekil 5.28. CD34 boyaması sonuçları. Ölçek çubuğu solda 200µm, sağda 100 µm.

5.3.2.4. C-kit (CD117) Boyaması

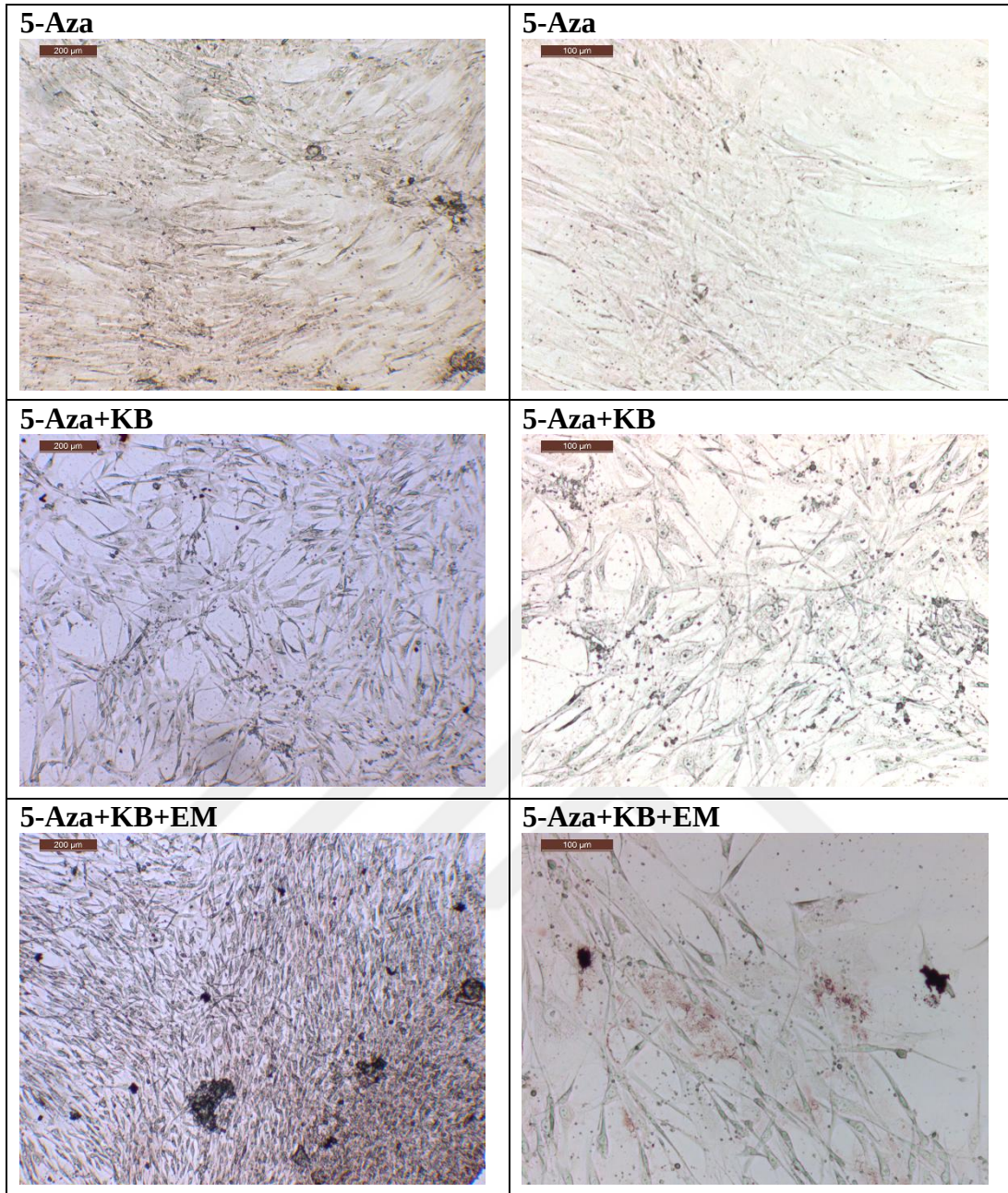
İki boyutlu hücre kültürü deneyleri sonunda C-kit proteininin immünohistokimyasal analizi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen boyamalar karşılaştırıldığında C-kit proteininin ekspresyonu açısından kontrol ve deney grupları arasında anlamlı bir boyama derecesi farkı görülmemiştir (Şekil 5.29).



Şekil 5.30. C-kit boyaması sonuçları. Ölçek çubuğu solda 200µm, sağda 100 µm.

5.3.2.5. GATA4 Boyaması

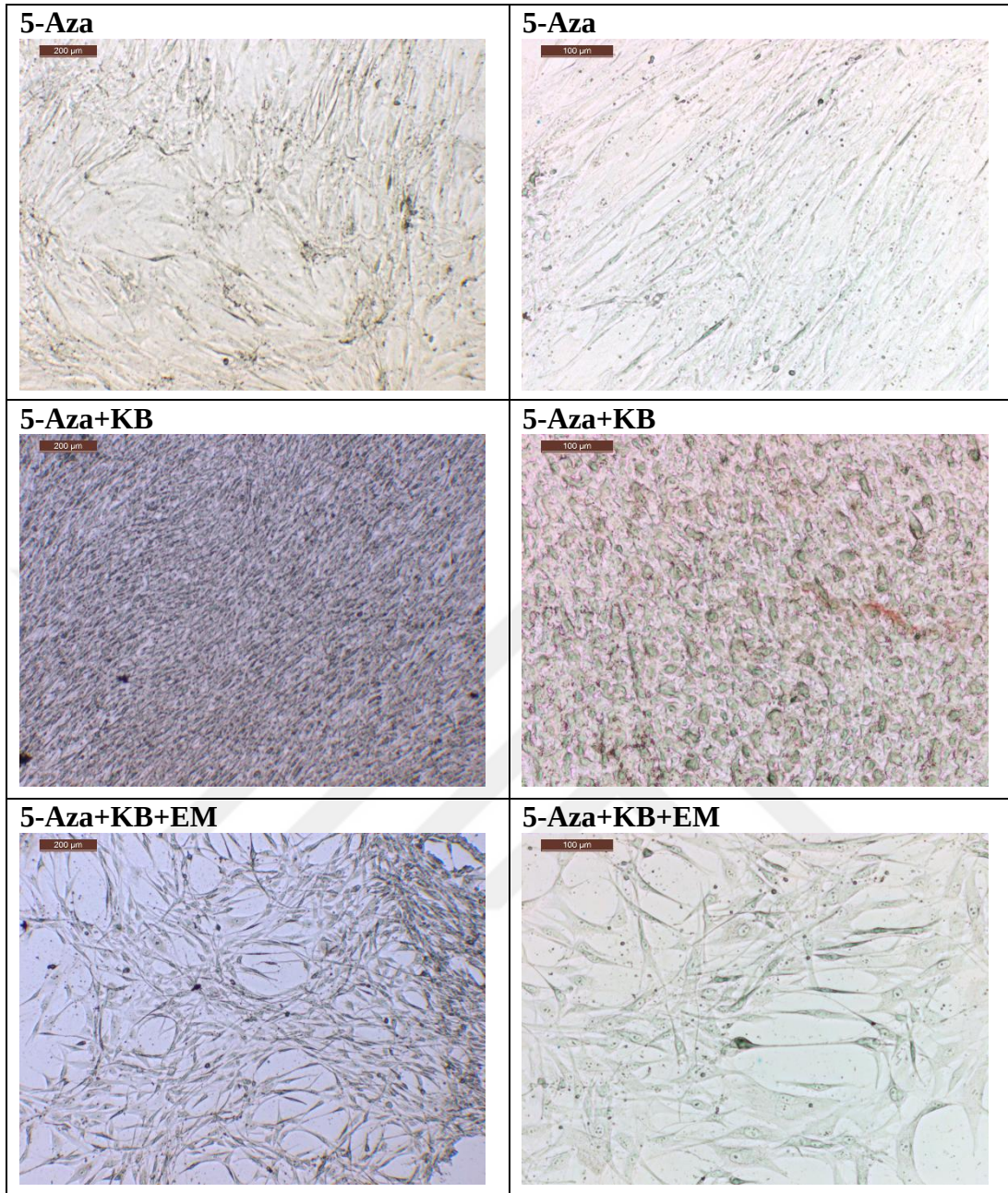
İki boyutlu hücre kültürü deneyleri sonunda GATA4 proteininin immünohistokimyasal analizi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen boyamalar karşılaştırıldığında GATA4 proteininin ekspresyonu açısından kontrol ve deney grupları arasında anlamlı bir boyama derecesi farkı görülmemiştir. Önemli bir kardiyak transkripsiyon faktörü olan GATA4 protein ifadesinde anlamlı bir değişim olmadığı görülmektedir (Şekil 5.31).



Şekil 5.32. GATA4 boyaması sonuçları. Ölçek çubuğu solda 200µm, sağda 100 µm.

5.3.2.6. NKX2-5 Boyaması

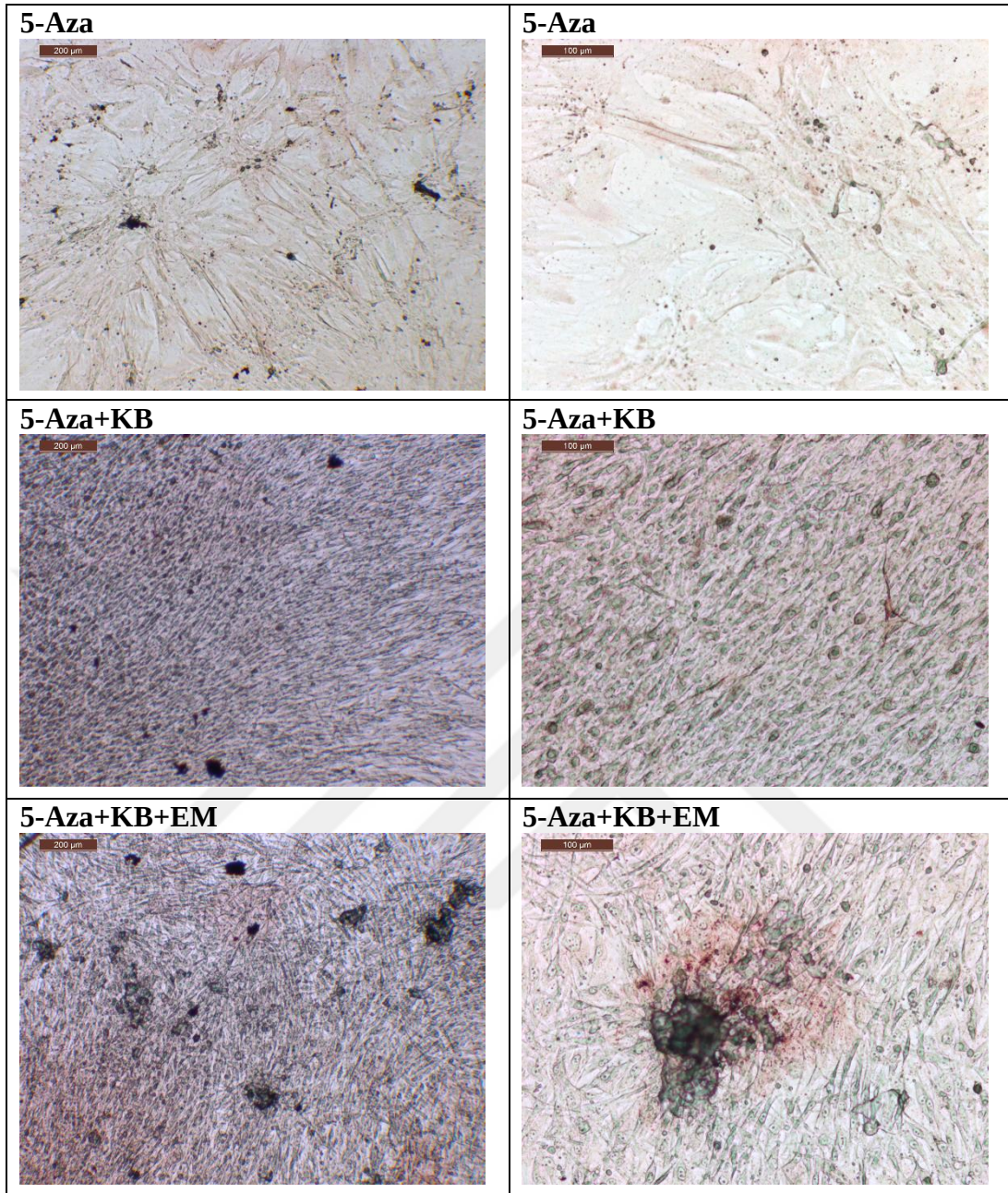
İki boyutlu hücre kültürü deneyleri sonunda NKX2-5 proteininin immünohistokimyasal analizi gerçekleştirilmiştir. NKX2-5 proteininin ekspresyonu açısından kontrol ve deney grupları arasında anlamlı bir ifade farkı kaydedilmemiştir (Şekil 5.33).



Şekil 5.34. NKX2-5 boyaması sonuçları. Ölçek çubuğu solda 200µm, sağda 100 µm.

5.3.2.7. Troponin I Boyaması

İki boyutlu hücre kültürü deneyleri sonunda Troponin-I proteininin immünohistokimyasal analizi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen boyamalar karşılaştırıldığında Troponin-I proteininin ekspresyonu açısından kontrol ve deney grupları arasında boyama derecesi açısından deney grubu yönünde orta düzeyde bir protein ifadesi artışı olduğu görülmektedir (Şekil 5.35).

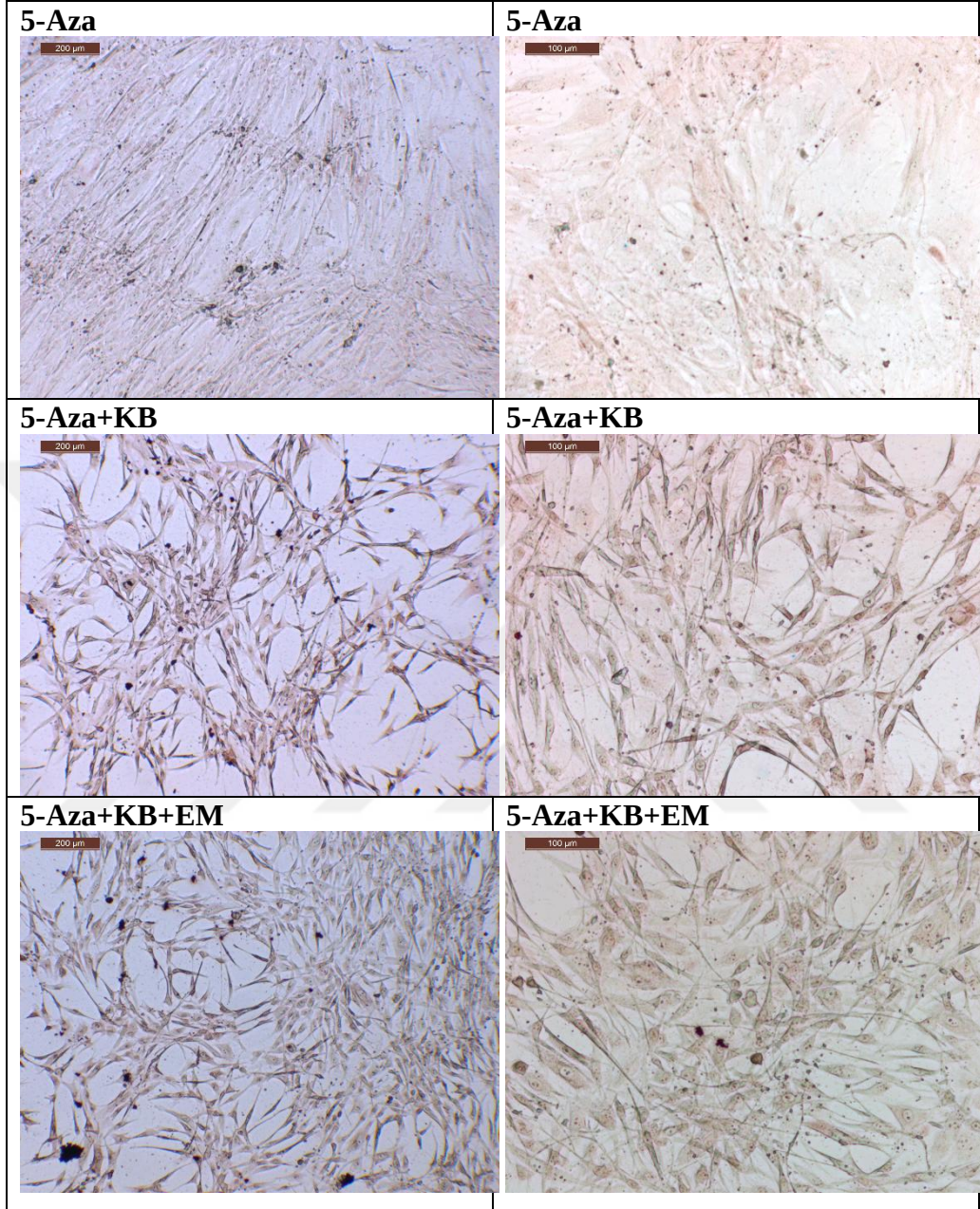


Şekil 5.36. Troponin-I boyaması sonuçları. Ölçek çubuğu solda 200µm, sağda 100 µm.

5.3.2.8. Troponin T Boyaması

İki boyutlu hücre kültürü deneyleri sonunda Troponin-T proteininin immünohistokimyasal analizi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen boyamalar karşılaştırıldığında Troponin-T proteininin ekspresyonu açısından kontrol ve deney grupları arasında boyama derecesi açısından belirgin düzeyde bir protein ifadesi artışı olduğu görülmektedir. Troponin-T izoformu kardiyomiyositlere özgü bir işlevsel bir protein olduğundan, Troponin-T

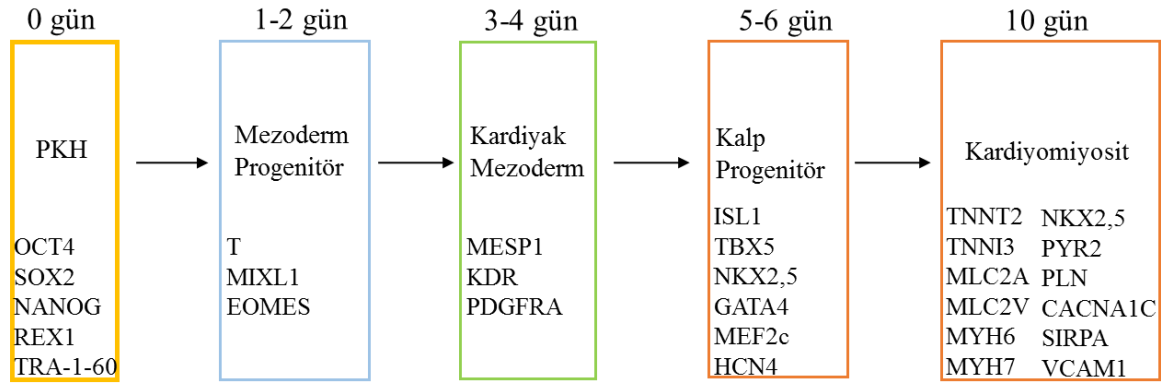
immünohistokimyasal boyama sonuçları farklılaşmaya ilişkin kısmî bir yönelim olduğu anlamını taşımaktadır (Şekil 5.37).



Şekil 5.38. Troponin-T boyaması sonuçları. Ölçek çubuğu solda 200µm, sağda 100 µm.

6. TARTIŞMA VE SONUÇ

Gerçekleştirilen adipoz kök hücre kültürü deneyleri sonucunda elde edilen hücre peletleri, başlıca kardiyomiyosit ve kardiyak progenitör belirteçlerinin gen ifadesi düzeyleri açısından incelenmiştir. Bu kısımda incelenen genler kalp oluşumu ve kardiyomiyosit farklılaşması ya da olgunlaşması açısından önemi ışığında incelenmektedir. Embriyonik dönemde öncelikle mezodermal transkripsiyon faktörlerinin ifadelenmesi ile beraber düzenleyici işleve sahip kalbe özgü transkripsiyon faktörlerine ilişkin genlerin aktivasyonu ve protein ifadelenmesi sonucunda kalbe ilişkin yapısal ve işlevsel genlerin ifadelenmesi süreçleri gerçekleşir. Bu sıralı aktivite, pluripotent kök hücreler ve mezenkimal hücreler için aynı öğelerin benzer zaman noktalarında ifadelenmesi ile in-vitro koşullar altında tekrarlanabilir. İki boyutlu ve üç boyutlu kültür koşullarının kardiyomiyosit farklılaşmasına etkisinin incelenmesi, çalışmanın temel bakış açılarından birisini teşkil etmektedir. Bu yaklaşımın başlıca gerekçesi, insan primer kardiyak kök hücresi kültürlerinde in vitro kültür koşullar altında kardiyosfer olarak adlandırılan, kültür kabı yüzeyine tutunmayan kalp öncülü öbekler oluşturmaktır. Tabaka halinde yerleşim gösteren hücrelerden farklı olarak, bu yapı içerisinde daha yüksek sayıda hücrelerarası bağlantı olması, yüzeye tutunma ile ilişkili hücre dışı matriks bileşenlerinin ifadelenmemesi ile metabolik enerjinin korunması sağlanabilmektedir. Son olarak, elastin mikrokürelerin kalp HDM'sine benzer nitelikli elastik modül özelliği taşımasından ötürü farklılaşmaya katkı sağlayıp sağlamadığının incelenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla mikroyerçekimi koşulları tercih edilerek, toplam yerçekimi vektörü niceliğinin sıfıra yakın olduğu bir kültür ortamında elastin mikrokürelerin sağlayacağı mekanik desteğin kardiyomiyosit farklılaşma süreçlerinin belirteci olan genlerin ifade düzeylerine etkisini izole etmek amaçlanmıştır. Çalışmanın kapsamında kardiyak farklılaşma literatürde örnekleri bulunan 5-Azasitidin indüksiyonu yolu ile tetiklenmiştir. Farklılaşmanın desteklenmesi amacı ile kardiyak büyüme besisi ortamında yapılan kültürler ile adipoz mezenkimal kök hücreler için literatürde bir arada etkisi tanımlanmamış koşullar kullanılarak kardiyak yönde farklılaşmaya etkileri incelenmiştir.



Şekil 6.1. Pluripotent ve progenitör hücrelerde kardiyak farklılaşma ve gelişim sürecinde aktivite gösteren proteinler ve belirteçler (139).

Adipoz kök hücrelerin kardiyomiyosit karakterli hücrelere farklılaştırılması uygulaması bilim dünyasında 2004 yılında gerçekleştirilen Planat-Benard ve arkadaşlarının çalışması ile başlamıştır(60). Bu çalışmada 5-Azasitidin etkisi ile farklılaşması tetiklenen AKH'ler çalışmada belirtildiği ifade ile atriyal ve ventriküler karakterli hücrelere farklılaşmaktadır ve sonuçta elde edilen hücrelerde pacemaker aktivitesi görüldüğü ifade edilmiştir. Adipoz kökenli hücrelerin kardiyomiyosite farklılaştırılması ile ilgili referans çalışma olan bu makalede, eş-zamanlı PZR belirteçleri olarak GATA4, NKX2-5, MLC 2a ve 2v, ANF gen ifadesi incelenmiştir. İki boyutlu hücre kültürü örnekleri üzerinde immünohistokimya deneylerinde ise konneksin-43, Mef2c, Mhc ve Mlc2v proteinlerine özgü antikorlar kullanılarak farklılaşma değerlendirilmiştir. Farklılaştırılan hücrelerin %0,05 kadarı kontraktile özelliği taşımaktadır. Bu hücrelerin gen ifadesi analizleri pozitif kontrol olarak kontraktile özellikli kalp hücreleri ile kıyaslanmış ve benzer düzeyde gen ifadesi elde edildiği gösterilmiştir (60).

Farklılaşan hücrelerin MEF2c, MLC-2v, MHC, konneksin 43 ve konneksin 40 protein ifadesi gösterdikleri immünohistokimya ile gösterilmiştir. İleri tetkiklerde elektrofizyoloji ve TEM görüntüleme ile bulgular desteklenmiştir. Farklılaşmanın düz kas veya iskelet kası yönünde gerçekleşmediği farklı pozitif kontrol hücreleri ve immünohistokimya antikorları kullanılarak gösterilmiştir. Belirgin kardiyak farklılaşma elde edilen araştırmanın, bu tez çalışmasından önemli farklarını sıralamak gerekirse, detaylı karakterizasyon yapılmamış olan fare kaynaklı adipoz kök hücresi kullanılmış olması, farklılaşma sonrası kültür sürecinin 24 gün sürmesi (6. günde morfolojik farklılıklar görülmüştür) ve farklılaşma sonrası besi ortamında büyüme faktörü olarak IL-3 ve IL-6 kullanılmış olması sayılabilir.

Hücre kaynağının insan olmaması önemli bir etken olmakla beraber, literatürde insan hücreleri ile gerçekleştirilmiş kardiyak farklılaşma çalışmalarına ön ayak olmuştur (60).

Sonuçları değerlendirilmesi gereken bir diğer çalışmada Van Dijk ve arkadaşları, insan kaynaklı adipoz kök hücrelerin kardiyomiyosite farklılaştırılmasını çalışmıştır (65). 24 saatlik 10 μ M konsantrasyonunda 5-Azasitidin indüksiyonu ile farklılaşma başlatılmıştır. Farklılaşmanın saptanması amacı ile eş-zamanlı PZR ile MLC2 α , SERCA2 α ve α -aktinin mRNA ekspresyonu düzeyleri incelenmiştir. Kardiyak ilişkili proteinlerin ifade edilip edilmediğini incelemek amacı ile gerçekleştirilen immünolojik boyama ile desmin, α -aktinin, MLC-2 α ve Troponin T antikolları ile yapılmıştır. Farklılaşmanın başlatılması sonrasında hücre öbekleri oluştuğu gözlenmiştir. 24 saatlik 5-Azasitidin uyarımı sonrasında kültür koşulları 5 hafta (35 gün) süre ile devam ettirilmiştir. MLC-2 α ve SERCA2 α bağıl gen ifadesi düzeyinde istatistiksel açıdan anlamlı artış gözlenmiştir.

İfadelenen kalbe özgü genlerin düzeylerindeki artış, kardiyomiyosit yönünde farklılaşmanın başarı ile tetiklendiğinin göstergesi olarak kabul edilmiştir. Buna ek olarak gerçekleştirilen immünositokimyasal görüntüleme çalışmalarında Troponin T boyamasında anlamlı sonuç görülmezken, α -aktinin ve MLC-2 α protein ifadesinde anlamlı artış gözlenmiştir. Bu yayının mevcut tez çalışmasından bazı önemli farklılıkları bulunmaktadır. Elde edilen istatistiksel açıdan anlamlı düzeydeki bağıl gen ifadesi değişimi indüksiyon sonrası üçüncü hafta sonunda görülmektedir. Buna ek olarak, iki boyutlu standart hücre kültürü deneylerinde laminin ve fibronektin yüzey kaplaması kullanılmış ve de yüzey kaplaması olmadan gerçekleştirilen farklılaşma deneylerine kıyasla farklılaşan hücre yüzdesi açısından önemli düzeyde fark kaydedilmiştir. Gözlemlenen bu fark, MLC-2 α ifadeleyen hücreler için birinci hafta sonunda yaklaşık olarak 3 misli daha çoktur.

5-Azasitidin indüksiyonunun kullanıldığı bir diğer önemli yayında Choi ve arkadaşları, insan AKH ile 10 μ M konsantrasyonunda 5-Azasitidin varlığında 24 saat süre ile inkübasyon yapmıştır. Üç hafta süren kültür basamakları sonunda, hücre peletleri Troponin T ve kardiyak aktin gen ifadesi düzeyleri açısından eş-zamanlı PZR kullanılarak incelenmiştir. Bu çalışmada ek olarak immünositokimya çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu aşamada NKX2-5, Troponin I, kardiyak aktin, MHC ve GATA4 gibi mevcut tez çalışmasında da değerlendirilmiş olan değişkenler kullanılmıştır. Çalışma, 21 gün süre ile

sürdürülmüştür, buna karşın kardiyak aktin gen ifadesi açısından anlamlı düzeyde artış, 3. günden itibaren belirgin hale gelmiş ve 7. günden sonra sabit düzeyde sürdürülmüştür. Çalışmada 5-Azasitidin ile tek başına yapılan indüksiyonda, kardiyak aktin gen ifadesinde düşük düzeyde ancak istatistiksel açıdan anlamlı artış varken, modifiye kardiyak ortam kullanılan grupta birinci ve ikinci hafta sonunda 1,5 kat artış görülmüştür. 5-Azasitidin kullanımı, incelenen değişkenler, hücre kaynağı noktaları, anlamlı farkın görüldüğü kültür süresi açısından bu tez çalışması ile ortak özellikler barındırmaktadır. Buna karşın Choi ve arkadaşlarının çalışmasında primer kök hücre izolasyonu ile elde edilmiş hücreler üzerinde çalışılmıştır. Ek olarak kardiyak besi ortamında çalışmamızdan farklı olarak 0,47 µg/mL linoleik asit ve 10⁻⁹M konsantrasyonda deksametazon içermektedir (52).

Yeh ve arkadaşlarının çalışmasında bu tez çalışmasına benzer biçimde, yetişkin AKH kullanılarak küresel formda organoidlerin oluşması amaçlanmıştır (66). Bu amaçla sıçan kaynaklı AKH saflaştırılmıştır ve farklı yapılarıdaki kitosan temelli membranlar üzerinde kültür yapılmıştır. Eş-zamanlı PZR’de incelenen kardiyak gen seçkisi, GATA4, NKX2-5, TNNT2, N-Cadherin ve MYH6 genlerini içermektedir. Kardiyak farklılaşma amacı ile 10µM konsantrasyonunda 5-Azasitidin inkübasyonu yapılmıştır ve sonrasında kültür koşulları 12 gün süre ile devam ettirilmiştir. Son aşamada “solvent casting” yöntemi ile sentezlenen kitosan membran üzerinde indüksiyona maruz kalan hücre grubunda istatistiksel açıdan anlamlı olarak GATA4, NKX2-5, TNNT2 ve MYH6 bağıl gen ifadesi düzeyinde sırası ile ortalama 150, 400, 150 ve 1000 kat artış olduğu ifade edilmektedir. Ancak bulgular detaylı immünohistokimyasal çalışma ile desteklenmemiş olup, söz konusu çalışma intrasölüler kalsiyum düzeyi, adipoz kök hücre öbeklerinin sayısı, büyüklüğü ve sentezlenen biyomalzemenin karakterizasyonu gibi değişkenler üzerinde durmaktadır. Bu çalışma, incelenen genler açısından tez çalışması ile örtüşmektedir. Ek olarak Wnt11, Icam1, Sox2 ve Vcam1 gen ifadesi düzeyleri incelenmiştir. Çalışmada herhangi bir destekleyici besi ortamı kullanılmazken, bu tez çalışmasına kıyasla en önemli farkı hücre kaynağı olarak insan yerine sıçan tercih edilmiş olması ve akım-sitometri esaslı bir AKH karakterizasyonu yapılmamış olmasıdır (66).

Song ve arkadaşlarının 2013 yılında yayınladığı araştırmada, insan kaynaklı erişkin AKH kullanılarak kardiyak farklılaşma yönünde indüksiyon yapılmıştır. Bu çalışmada anjiyotensin 2’nin kardiyak farklılaşma üzerine etkinliği araştırılırken, 5-Azasitidin

indüksiyonu yapılan grup, standart farklılaştırma sağlayan pozitif kontrol grubu olarak uygulanmıştır. İndüksiyon sonrası, farklılaşmanın değerlendirilmesi amacı ile immünohistokimya kullanılmıştır (63).

Bu aşamada, tez çalışması kapsamında da değerlendirilmiş olan MHC, troponin I ve konneksin-43'e karşı geliştirilmiş antikorlar kullanılarak immünboyama yapılmıştır. İndüksiyon sonrasında 4 hafta süre ile hücre kültürü yürütülmüştür ve 5-Azasitidin indüksiyonu yapılan grupta %21 oranında MHC protein ifade eden hücre popülasyonu saptandığı belirtilmektedir. Gerçekleştirilen immüno floresan boyama sonucunda konneksin-43 ve kardiyak troponin için anlamlı sonuç verdiği ifade edilmiştir. Buna ek olarak kardiyak troponin I ifadesinin gerçekleşmediği western blot analizi sonucunda gösterilmiştir. Çalışmada kullanılan hücreler akım sitometri analizi ve trilineage farklılaşma deneyleri ile karakterize edilmiştir. Buna karşın, farklılaşma yalnızca immüno floresans yöntemi kullanılan görüntüler ile gösterilmiş ve immünohistokimyasal analizlerin kıyaslamaya elverişli fotoğraflar halinde sunulmamıştır ve PZR ile gen ifadesi analizi yapılmamıştır.

Bu tez çalışmasında elde edilen sonuçlara göre insan adipoz kök hücreleri 5-Aza uyarımı sonucunda istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılaşma profili göstermemektedir. Yukarıda bahsedilen adipoz kök hücrelerin kardiyomiyosite farklılaşması ile ilgili olan çalışmalar, farklı etkinliklerde kardiyomiyosit belirteçlerinin ifade edilmesinde artış kaydetmişlerdir, ancak metodolojik olarak farklılıklar, elde ettiğimiz sonucu açıklamakta yeterli değildir. Adipoz kök hücrelerin yüksek verimlilikle kardiyomiyosit farklılaşmasına girdiği çalışmaların ortak yönü, bu çalışmalarda insan dışı model organizmalar kullanılmış olmasıdır. Bununla beraber insan AKH kullanılan çalışmalarda istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılaşma rapor edilmektedir. 5-Azasitidinin bu etkisini ve çalışmamızdaki sonucun beklenti dışında oluşunun açıklanabilmesi için, 5-Azasitidinin etkinliği ile ilgili mezenkimal karakterdeki farklı hücre tipleri ile yapılan farklılaştırma çalışmaları ve mikroyerçekimi kültürünün kardiyomiyosit farklılaşmasına etkileri ile ilgili yayınlar incelenmiştir.

Mezenkimal kök hücrelerin kardiyomiyosit yönünde farklılaşması Wnt/Beta-Katenin sinyal yolağının inhibe edilmesi ile başlatılır (165). Bu inhibisyon sonucunda

sitoplazmadaki β -katenin miktarı artarak nükleusa ulaşan β -katenin miktarında artışa sebep olur. Nükleusta β -katenin ile etkileşime giren TCF/LEF1 (transkripsiyon faktörü/lymphoid enhancer-binding factor 1), kardiyak gelişim ile ilgili gen ifadesinin artışını tetikler ve bazı transkripsiyon faktörleri ile etkileşimi sonucu gen ifadesi baskılanmasının inhibisyonuna neden olarak kardiyak gen ifadesinde artışa sebep olur (166). Bu yolağa müdahale ederek kardiyak yönde mezenkimal kök hücre farklılaşmasının çalışıldığı erken dönem çalışmalar arasında Fukuda ve ekibinin çalışmaları önemli yer tutmaktadır. Fare ve sıçan kaynaklı AKH'ler üzerinde uygulanan farklılaştırma protokolü, indüksiyon sonrasındaki ikinci hafta içinde ventriküler hücre karakteristiğinde senkronize kasılma özelliği gösteren hücreler saptanmıştır (167).

Yapılan gen ifadesi analizinde NKX2-5 GATA4, TEF1, MEF2c genlerinin indüksiyondan önce de ifadelendiği, indüksiyon sonrasında ise bu genlere MEF2a ve MEF2d'nin de eklendiği ifade edilmektedir. Hücrelerin kasılma aparatı bileşenleri açısından fetal dönem kardiyomiyositlerine morfolojik olarak benzerliğine dikkat çekilmiştir. Yapılan elektrofizyoloji analizleri, farklılaşan hücrelerin sinüs düğümü hücrelerine veya ventriküler kardiyomiyositlere benzer özellikte aksiyon potansiyeli oluşturduğunu göstermektedir. İncelenen genlerin kardiyak indüksiyon öncesinde de ifadelenmesi çalışmada gen ifadesi değişimi açısından seçilen belirteçlerin kardiyak farklılaşma açısından geçerliliğini azaltmaktadır (168,169). Buna karşın bu genler kalp dokusuna yüksek özgüllük gösteren genler olduğundan ötürü, insan AKH'leri ile yapılan çalışmalarda görülmeyen bu kuvvetli indüksiyonun sebebi tercih edilen indüksiyon yöntemi ya da kültür koşulları yerine AKH elde edilen organizmanın türü olduğu söylenebilir. Fare ve sıçandan elde edilen AKH'lerin yüksek düzeyde farklılaşma ve hatta kontraktilite göstermesine karşın insan yetişkin AKH ile gerçekleştirilen çalışmalarda kardiyak farklılaşma anlamlı ancak fare ve sıçan hücrelerine kıyasla daha düşük düzeyde görülmektedir. İnsandan elde edilen AKH'ler ile 5-Azasitidin aracılı kardiyak yönde farklılaşma sonrası kontraktilite elde edildiği rapor edilmiştir (52), aynı hücre grubu ve indüksiyon etkeni ile gerçekleştirilen başka bir çalışmada, 5-Azasitidin farklılaşmayı başlatmada yeterli olmadığı ifade edilmektedir (170).

5-Azasitidin molekülünün insan kaynaklı mezenkimal kök hücrelerde kardiyomiyosit benzeri hücrelere farklılaştığını gösteren çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Bir sitidin

analoğu olan 5-Azasitidin, temel olarak NKX2-5 ve GATA4 promotor bölgesinde bulunan H3K9 histon proteinin asetilasyonu ev metilasyonuna yol açarak epigenetik bir modifikasyonla bu kardiyak transkripsiyon faktörlerinin gen ifadesini stimüle ederek kardiyomiyosite farklılaşma sürecini başlatmaktadır (171). Ek olarak DNA üzerindeki CpG adalarının metilasyonu ile aynı farklılaşma yönünde etkiye sebep olmaktadır. Benzer bir etkinin uPKH, EKH ve bazı progenitor hücre tiplerinde aynı sonuca yol açtığı bilinmektedir.

P19 fare embriyonal karsinoma hücrelerinin 5-Azasitidin aracılığı ile kardiyomiyosit farklılaşmasının incelendiği bir araştırmada immünohistokimya, akım sitometri ve eş-zamanlı PZR teknikleri kullanılarak 5-Azasitidin etkinliği gösterilmiştir. Farklı dozlarda ve sürelerde 5-Azasitidine maruz kalan hücrelerin kardiyak troponin T, alfa aktinin, ve kardiyak miyozin ağır zincir gen ifadesinde anlamlı düzeyde artış olduğu belirtilmiştir (172). Bir diğer araştırmada erişkin sıçan kemik iliği mezenkimal kök hücrelerinde GATA4 ve NKX2-5, konneksin-43, kardiyotrofin-1, troponin I ve protein T protein ifadesinde artış görülmüştür. Sonuçlar immüno floresans analizi ile desteklenmektedir (173,174). In-vitro koşullar altında ikinci pasaj sayısındaki insan kemik iliği mezenkimal hücreleri üzerinde yapılan bir çalışmada, 24 saatlik 10µM 5-Azasitidin muamelesi 28 gün süre ile standart koşullar altında kültür yapılmıştır. Farklılaşma, eş-zamanlı PZR, immünohistokimya yöntemleri ile doğrulanmıştır. Troponin-T, MHC, α-kardiyak aktin düzeylerinde belirgin artış gözlenmiştir (174). Aynı ekibin bir diğer çalışmasında, koroner baypas ameliyatına alınan hastaların kemik iliğinden izole edilen mezenkimal nitelikli kök hücrelerden elde edilen alfa kardiyak aktin ifadesinde belirgin artış olduğu not edilmiştir. Düşük düzeyde kardiyak Troponin-T ve MHC gen ifadesinde artış görülmüştür. Araştırmacılar, ilerleyen pasaj numaralarında farklılaşma potansiyelinde düşüş olduğunu belirtmişlerdir.

İnsan kaynaklı mezenkimal kök hücreler kullanılarak kardiyomiyosit yönünde farklılaşma amaçlayan dikkat çekici bir çalışmada, Martin-Rendon ve arkadaşları, in-vitro koşullar altında kardiyomiyosite farklılaşma frekansının ve potansiyelinin düşük olduğu ifade etmektedir. Bu çalışmada, araştırmacılar, göbek kordonu, kordon kanı ve kemik iliği mezenkimal kök hücreleri karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir. 5-Azasitidin indüksiyonu sonrasında, kemik iliği mezenkimal kök hücrelerinde %0,1'den düşük

seviyede farklılaşma kaydedilirken, göbek kordonu ve kordon kanı hücrelerinde kardiyak belirteçlerin ifade edilmediği belirtilmiştir (175). Farklı indüksiyon sürelerinin kullanıldığı bu çalışmada, 24 saat 10 μ M 5-Azasitidin ile indüksiyon sonrası 1 ve 4 hafta süre ile yapılan kültür sonunda bağıl NKX2-5 ifadesinde ortalama 2,5 kat artış görülmüştür. 3 gün süre ile yapılan indüksiyonda ise bu değer 4 hafta sonunda ortalama 7 kata kadar artış göstermektedir. Buna karşın konneksin-43 deltaCt değerleri, 1 gün süre ile 5-Azasitidin yapılan grupta daha yüksek olarak saptanmıştır (175). Martin-Rendon ve arkadaşlarının çalışması ile çelişir nitelikte bulgular sunan bir çalışmada 3. pasaj insan göbek kordonu mezenkimal hücrelerinin, 5-Azasitidin uyarımının 4 hafta sonrasında NKX2-5 gen ifadesinde ortalama 4,7 kat ve GATA4 ifade katsayısında 3,7 kat artış görüldüğünü belirtmiştir. Bu bulgular, aynı farklılaştırıcı ajan ve kardiyak belirteçler tercih edilse bile, karakterizasyonu yapılmış bir hücre tipi için kardiyomiyojenik farklılaşma açısından birbirinden çok farklı sonuçlara ulaşılabildiğini göstermektedir (176).

Belirgin düzeyde kardiyak farklılaşmaya işaret eden bulgular sunan bir başka araştırmada, Choi ve arkadaşları, insan kaynaklı adipoz kök hücrelerle gerçekleştirilen ve 24 saat süre ile 10 μ M 5-Azasitidin indüksiyonu uygulanarak farklılaşma tetiklenen bir çalışmada ise, yüksek yüzdelerde kardiyak gen ifadesi artışı elde edilmiştir. Primer kültür yöntemi ile elde edilen pasaj numaraları 4 ve 7 arasında bulunan adipoz kök hücreler kullanılarak gerçekleştirilen çalışmada, dekzametazon ve linoleik asit destekli modifiye kardiyomiyojenik besi ortamı tercih edilmiştir. 3 hafta süren indüksiyon sonrası kültür aşamasında kardiyak belirteçlerin (kardiyak aktin ve troponin T) ikinci hafta noktasında en yüksek düzeyde ifadelendiği görülmektedir. Kardiyak belirteçlerin yanı sıra, proliferasyon belirteci olan Ki67 ifade düzeyleri de değerlendirilmiştir. 5-Azasitidin uyarımı sonrasında kardiyak aktin ve NKX2-5 protein ifadesi gösteren hücrelerin oranının %10 civarında olduğu belirtilmiştir (52). Mevcut çalışmada sürdürülen kültür süresinin, belirteçlerin düzeyinde değişiklik saptamak açısından yeterli olabildiğini göstermektedir.

5-Azasitidin indüksiyonunun insan kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin kardiyak yönde farklılaşmasında etkili olduğunu gösteren çalışmalar arasında standart kültür koşulları altında (177-179), hiperyerçekimi koşulunda (180), farklı büyüme faktörleri ve etkenler ile kombinasyon halinde (181-184) etkinliğini gösteren çok sayıda çalışma bulunmaktadır. 5-Azasitidin AKH üzerindeki kardiyomiyojenik farklılaşma etkileri ile ilgili yayınlarda

(185,186) mevcut tez çalışmasında kullanılan koşullarla çok sayıda temel nokta ortaktır. Bununla beraber mevcut tez çalışmasına benzer nitelikte verimsiz farklılaşma sonucuna ulaşan araştırma kayıtları da vardır. Wan Safwani ve arkadaşlarının *Journal of Negative Results in BioMedicine* dergisinde yayınlanan çalışmasında, 5. pasaj sayısında 5-Azasitidin ile kardiyomiyojenik farklılaşma indüksiyonu uygulanan hücrelerde, 3 hafta süren kültür sonrasında konneksin-43 düzeyinde değişiklik görülmemiştir, Troponin I, MLC ve MHC gen ifadelerinde ise indüksiyon olmayan kontrol grubuna kıyasla düşüş görüldüğü belirtilmiştir. GATA4 ve NKX2-5 gen ifadesi düzeyinde iki katlık bir artış görülürken, 10 numaralı pasajla gerçekleştirilen indüksiyon deneyleri sonrasında kardiyak transkripsiyon faktörlerine ilişkin genlerin ifade düzeyinde değişiklik olmadığı belirtilmiştir. Bu çalışmada kardiyak yönde indüksiyon sonrasında gerçekleştirilen kültürde kardiyomiyojenik besi ortamı elemanlarına yer verilmemiştir. Farklılaşmanın gerçekleşmemesine dair önemli etkenlerden birisi olabilir. Buna ek olarak, araştırmacıların çalışmayı pasaj sayıları arasında farklılaşma potansiyelini kıyaslamak üzere planlamış olmaları önemli bir bakış açısı sağlamaktadır. Çalışmada, pasaj 5 ve 10 seviyesindeki hücre popülasyonları 5-Azasitidin varlığında kardiyomiyojenik yönde etkilenmektedir. Çalışmamızda kullanılan hücre popülasyonlarının pasaj 9 ve sonrasına ait olması farklılaşma eğiliminin azlığını ve literatürdeki AKH'lerin kardiyomiyojenik farklılaşma potansiyeline dikkat çeken çalışmalara kıyasla alınan farklı sonucu açıklamakta yardımcı olabilir. Mevcut çalışma, literatürde daha önce uygulanmamış yöntemlerin etkinliğini sınaması bakımından özgünlük değeri arz etmektedir.

Mevcut çalışmanın özgün bir yaklaşımı olan kardiyak büyüme besi ortamı, kardiyak progenitörlerin, primer kültürde kardiyomiyositlerin ve kardiyak fibroblastların kardiyak karakterinin korunması ve farklılaşmanın desteklenmesi amacı ile kullanılmaktadır (98,160,161). Buna karşın mezenkimal kök hücrelerin ve özel olarak adipoz kök hücrelerin kardiyomiyojenik yönde farklılaştırılmasında kullanımı bu çalışma ile beraber ilk defa uygulanmaktadır. Planat-Benard makalesinde büyüme ortamı olarak tercih edilen karışımda interlökin türevleri biyokimyasal olarak destekleyici işlevi için değerlendirilirken (60), Choi ve arkadaşlarının 2010 (187) çalışmasında linoleik asit ve kortikosteroid desteği tercih edilmiştir. Choi araştırmasında kullanılan besi ortamı, sodyum selenit, insülin, askorbik asit (B27'nin kompozisyonunda bulunduğundan ötürü) içeriği açısından çalışmamızdaki besi ortamı ile benzerlikler içermektedir. Bununla beraber, bir

çok pozitif sonuç sunan çalışmada destekleyici bir besi ortamı yerine standart hücre kültürü kompozisyonu tercih edilmiştir (66,177-179). Bu bilgi ışığında, çalışmalarda kardiyomiyojenik farklılaşmayı sağlayan başlıca etkenin besi ortamı içeriği olmadığı söylenebilir. Pozitif sonuçların anlaşılması kadar, istatistiksel olarak negatif sonuçların sebeplerinin saptanması bilimsel yöntemin gereklerinden birisi olduğundan, mevcut çalışmada değerlendirilen kardiyak besi ortamı ve bileşenlerinin kısa bir incelemesi yapılmalıdır.

Kardiyak besi ortamında bulunan fibroblast büyüme faktörünün kardiyak progenitör karakterlerinin muhafaza edilmesindeki işlevinin (188) yanı sıra, bir diğer çalışmada mezenkimal kök hücrelerin kardiyomiyojenik farklılaşma önünde ön koşullanması amacı ile etkinliği saptanmıştır. Kardiyomiyositler üzerinde sitoprotektif etkilerinin yanı sıra farklılaşma aşamalarında konneksin-43 ifadesinde artışa sebep olduğu görülmektedir (189). Erk1/2 sinyal yolağının tetiklenmesi ile sağlanan bu farklılaşma, fare embriyonik kök hücrelerinde (190), insan kardiyak progenitörleri üzerinde (191), insan kemik iliği mezenkimal hücrelerinde (192) olumlu farklılaşma tetikleyici etkisinin yanı sıra insan kordon kanı mezenkimal hücrelerinde kardiyomiyojenik farklılaşmayı başlatmadığı kaydedilmiştir (191). Kardiyak büyüme besi ortamının bir diğer bileşeni olan epidermal büyüme faktörü kardiyak progenitörlerin hücre fenotipinin kararlı hale gelmesine katkıda bulunur (193) ve insan kardiyosfer hücrelerinin fenotipik modülasyonunda etkin görev aldığı bilinmektedir (194). Buna ek olarak FGF ile beraber, hasarlı miyokard dokusunun *in vivo* kardiyak onarımda ve rejenerasyonunda işlevli olduğu gösterilmiştir (195).

Kardiyak büyüme besi ortamının bileşenlerinden trombin, insan kemik iliği mezenkimal hücrelerinin miyokard enfarktüsünün tedavisi amacı ile kardiyomiyosit farklılaştırılmasında (196), insan mezenkimal hücrelerinden kardiyopoietik popülasyonların elde edilmesinde (197), progenitör hücrelerin kardiyak yönde farklılaşmasında (198) ve kardiyosfer kaynaklı progenitörlerin fenotipik karakterlerini muhafaza etmelerinde (199) destekleyici özelliğe sahip olduğundan, kullanılan kardiyak besi ortamında kardiyomiyojenik farklılaşmanın tetiklenmesine katkıda bulunmak ve de oluşan kardiyak fenotip özelliklerinin sürdürülmesini sağlamak amacı ile eklenmiştir.

Kardiyotrofin molekülü, son dönemde önem kazanan bir büyüme faktörüdür. Kalbin gelişiminde, kardiyovasküler sistem hücrelerin davranışlarının parakrin etki ile modifikasyonunda görev alan bir sitokindir (200). Kardiyotrofin molekülünün kardiyovasküler hastalıkların gelişim aşamalarında (201) ve miyokard enfarktüsünün onarımsal tedavilerinde işlevi olabileceğine dair kanıtlar bulunmaktadır (202). Kardiyotrofin-1 molekülünün fare embriyonik kök hücrelerinden elde edilen kardiyomiyositlerin proliferasyon davranışını arttırdığı ispatlanmıştır (203). Son olarak, 5-Azasitidin kullanılarak yapılan kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin farklılaşma çalışmasında kardiyotrofin molekülünün besi ortamındaki varlığının, farklılaşma sürecinin etkinliğini arttırdığı ve GATA4, NKX2-5, alfa-kardiyak aktin ve MHC ifade düzeylerinde anlamlı derecede artış sağladığı belirtilmektedir (204).

Kardiyak büyüme besi ortamının bileşim ve içeriğinde mezenkimal kök hücrelerin ve kardiyak progenitörlerin farklılaşmasını tetikleyici ve destekleyici nitelikteki etkin moleküller bulunması ile kardiyomiyojenik farklılaşmanın desteklenmesi amaçlanmıştır. Literatürde bulunan çok sayıda kaynak değerlendirilerek adipoz kök hücrelerin kardiyomiyojenik farklılaştırması için yeni bir yöntem geliştirilmesi amaçlanmıştır. Elde edilen sonuçlar, materyal ve metod bölümünde detaylandırılan koşullar altında bu büyüme faktörlerinin anlamlı bir kardiyak farklılaşmaya yol açmadığını göstermektedir.

Mevcut çalışmanın başlıca özgün yanlarından bir diğeri mikroyerçekimi koşullarında kültür yapılan adipoz kök hücrelerin kardiyomiyojenik yönde farklılaştırılmasıdır. Literatürde mikroyerçekimi koşulları kullanılarak kök hücre farklılaşması konusunu aydınlatan çalışmaların çoğunluğu embriyonik kök hücreler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. uPKH ve kemik iliği mezenkimal hücreleri ile sürdürülen çalışmalar var olmakla beraber, detaylı veri tabanı aramaları sonucunda adipoz kök hücrelerle yapılan kardiyak farklılaşma çalışması bulunamamıştır. Mikroyerçekimi koşullarının indüklenmiş AKH'lerin farklılaşmasına etkisinin aydınlatılması açısından özgün bir çalışmadır. Mikroyerçekimi ve hiperyerçekimi koşullarının kardiyak yönde farklılaşmaya ve kardiyak karakterlerin korunmasına katkılarının olduğu, eksplant kalp hücresi kültürü ile gösterilmiştir (205). Çalışmamızda kullanılan STLV sistemi ile sağlanan mikroyerçekimi koşullarında kültür yapılan fare embriyonik hücrelerinin kardiyak yönde farklılaşmasının arttığı (206) ve embriyoid gövde oluşumunun arttığı belirtilmektedir (207).

İnsan kemik iliği mezenkimal kök hücreleri ile sürdürülen mikroyerçekimi deneyleri sırasında hücrelerin öbeklenerek kürecik yapısı oluşturduğu ve bu yapıların oluşumunun farklılaşma eğilimini arttırdığı belirtilmektedir (208). Mezenkimal kök hücrelerin kondrojenik farklılaşma eğiliminin, mikroyerçekimi koşulları altında, iki boyutlu statik kültüre kıyasla daha fazla olduğu kanıtlanmıştır (209). Benzer biçimde, mezenkimal hücrelerin endotel farklılaşmasının mikroyerçekimi koşullarında desteklendiği bilinmektedir (210).

Mikroyerçekimi koşullarının kardiyak progenitörlerde parakrin faktörlere ilişkin transkriptlerin düzeyinde artışa neden olduğu, yetişkin kardiyak progenitörlerin hücre karakterinde kararlılığa etkili olmazken, neonatal kardiyovasküler progenitörlerin mikroyerçekimi kültürü sonunda dediferensiyasyon ile ilgili miRNA ifadesinde artış görüldüğü kaydedilmiştir (211). Jha ve arkadaşları tarafından yürütülen ve insan pluripotent kök hücrelerinden elde edilen kardiyak progenitörlerin proliferasyon, farklılaşma ve canlılık yüzdesinin üç boyutlu mikroyerçekimi kültürü koşullarında artış gösterdiği belirtilen bir çalışmada, kardiyak progenitörlerin küresel öbekler oluşturması sağlanmıştır. Sonrasında bu hücre öbeklerinden kardiyomiyosit eldesi veriminin mikroyerçekimi koşullarında 4 kat daha fazla miktarda anlamlı artış gösterdiği belirtilerek, üç boyutlu mikroyerçekimi koşullarının rejeneratif uygulamalar için kardiyomiyosit eldesi amacı ile kullanılabileceği sonucuna ulaşmıştır (212). Bu tez çalışması ile ortak amaç ve yaklaşıma sahip olan bu çalışma, anlamlı düzeyde kardiyomiyosit benzeri hücre eldesini takiben, hücreler üzerinde mikroeletrot analizör temelli elektrofizyolojik analizler gerçekleştirerek, hücrelerin impuls iletim kapasitesini doğrulamıştır.

Mikroyerçekiminin farklılaşmayı indükleyici etkilerini belgeleyen çalışmaların yanı sıra, aksi yönde bulgular sunan çalışmalar da mevcuttur. 48 saat süre ile mikroyerçekimi koşulları altında kültürü yapılan kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücrelerin proliferasyon ve farklılaşma kapasitesinin düştüğü ve hücre döngüsünün G2/M aşamasında bloke olması ile apoptoz yolağının aktive olduğu kaydedilmiştir (213). Mezenkimal kök hücreler ile gerçekleştirilen bir diğer çalışmada, mikroyerçekimi koşullarının hücrelerin göç kapasitesini düşürdüğünü ve hücre iskeletinin yapısal değişikliğini tetikleyerek sertliği arttırdığını saptamıştır (214). Mikroyerçekimi koşulları altında mezenkimal kök hücre kültür süresinin farklılaşma potansiyelini ve yönelimini etkilediğine dair kanıtlar

mevcuttur. Xue ve arkadaşlarının çalışmasına göre 72 saat süreli üç boyutlu mikroyerçekimi kültürü, MKH'lerin endotelial, nöronal ve adipojenik yönde farklılaşma potansiyelini artırırken, 10 gün süreli kültürün osteoblast karakterli hücelere farklılaşmayı tetiklediği görülmüştür (215).

Farklı çalışmaların sonuçlarına göre, mikroyerçekimi etkeninin yüksek verimde kardiyomiyosit elde edilmesini sağlamak üzere değerlendirilmesi yaklaşımı, uPKH ve EKH kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Benzer bir yöntemin AKH veya MKH kullanılarak uygulandığı bir çalışma bulunmadığından ve de otolog AKH elde edilmesinin kemik iliği mezenkimal kök hücrelerine kıyasla daha güvenli olması ve farklılaşma sonucu elde edilen hücrelerin klinik koşullarda kullanımı ile ilgili güvenlik açısından olumlu sonuçlar sunan klinik çalışmaların var olmasından dolayı, AKH kullanılarak mikroyerçekimi kültüründe yüksek verim ve miktarda kardiyomiyosit üretilmesinin bilim dünyasına önemli bir katkı sağlayacağı düşünülmüştür. Mikroyerçekimi kültür koşullarında mezenkimal kök hücrelerin farklılaşmasını konu alan ve yukarıda yer verilen araştırmalar geniş bir yelpazede olumlu ve olumsuz sonuçlar sağlamaktadır. Pluripotent hücrelerle elde edilen sonuçlar ve mezenkimal kök hücrelerin üç boyutlu mikroyerçekimi kültürünün yapıldığı çalışmalar bir arada değerlendirildiğinde, bu tez çalışmasında istatistiksel açıdan anlamlı sonuçların elde edilememiş olmasının olası gerekçeleri üzerinde çıkarımlar yapılabilmektedir. İki boyutlu hücre kültürü koşullarında anlamlı değişime sebep olmamış olan indüksiyon ve kardiyak büyüme besi ortamı kombinasyonunun üç boyutlu mikroyerçekimi koşulları altında da anlamlı düzeyde bir farklılaşmaya yola açmamış olduğu görülmektedir. Mikroyerçekimi koşulları mezenkimal kök hücrelerde proliferasyonun baskılanmasına sebep olabilmektedir. Bunun yanı sıra mikroyerçekimi kültürünün süresi, mezenkimal kök hücrelerin farklılaşma kapasitesini ve yönelimini etkileyebilmektedir. Buna göre, mikroyerçekimi basamağı anlamlı fark yaratabilmek için fazla erken ya da geç sonlandırılmış olabilir. Mevcut çalışmada mikroyerçekimi kültürünün süresi bir değişken olarak değerlendirilmemiştir. Bunun yanı sıra AKH kültürünün adipojenik yönde uyarılmış olması mümkündür. Ancak incelenen değişkenlerin kardiyak ve düz kas açısından ayırt edici olmasından ötürü bu hipotezin değerlendirilmesi mümkün olmamıştır (216). AKH kültürünün farklılaşma yöneliminde hangi hücre tipine dönüştüğünün ya da, literatürde kardiyak progenitörlerde gözlemlendiği üzere, dediferansiyasyon sürecine girip girmediğinin anlaşılması için, bu çalışmanın farklı zaman

noktalarında ve çok sayıda transkriptin aynı koşullar altında değerlendirilmesine imkân verecek olan mikrodizin yaklaşımı ile değerlendirilmiş olması nihai bir sonuç için gereklidir.

Büyüme faktörlerinin AKH kültüründe farklılaşmaya etkilerinin değerlendirildiği ve yukarıda yer verilen çalışmalar da göz önünde bulundurularak, çalışmanın kültür basamaklarının 21 veya 28. gün noktasına kadar sürdürülmesi ile anlamlı sonuç alma olasılığı arttırılabilir. Ancak üç boyutlu mikroyerçekimi kültürü başlangıç aşamasından itibaren iki boyutlu hücre kültürüne kıyasla çok daha yüksek bir konsantrasyonla başlatıldığından, uzayan kültürün olumsuz etkilere yol açması da mümkündür. Zamanla ölü hücre artıklarının membran yüzeyini kaplamasına bağlı olarak kültür ortamında çözünen oksijenin azalması, azalan oksijen düzeylerine bağlı olarak küresel yapıdaki hücre öbeklerinin merkez kısmındaki hücrelerin hipoksiye bağlı olarak apoptoz sürecine girmesi olasılık dâhilindedir.

Tercih edilen büyüme faktörlerinin kardiyak fenotip oluşumunu destekleme açısından etkinliği, farklı hücre tipleri kullanılarak yapılan araştırmalarda gösterilmiştir. Ancak, bu tez çalışmasında uygulanan büyüme faktörü kombinasyonu literatürde ilk defa AKH kültüründe değerlendirilmiştir. Yaklaşım, parakrin uyarım mekanizmasından faydalanan kardiyak transkripsiyon faktörlerinin ifade edilmesini tetiklemek mantığı çerçevesinde uygulanmış, ancak incelenen kardiyak belirteçler özelinde istatistiksel açıdan anlamlı sayılabilecek bir değişime yol açmamıştır.

Literatürde AKH'lerin kardiyomiyojenik indüksiyonunun yüksek oranda verim alındığı çalışmalarda, fare ve sıçan gibi insan haricindeki model organizmalardan elde edilen hücrelerin kullanılmış olduğu görülmektedir. İnsan AKH'leri ile anlamlı düzeyde kardiyak yönde farklılaşma elde edilen çalışmalardan yukarıdaki paragraflarda bahsedilmektedir. Buna karşın, bu çalışmalar sonucunda elde edilen farklılaşmanın düzeyi ve farklılaşma gösteren hücrelerin toplam hücre sayısına oranı, insan AKH'leri kullanılan çalışmalarda klinik bir tedavide ya da ilaç geliştirme çalışmasında kullanılacak sayı ve kalitede kardiyomiyosit elde edilemediğini göstermektedir. Yüksek oranlarda farklılaşan hücre elde edilen çalışmalarda tercih edilen fare ve sıçan AKH'leri bazı çalışmalarda neonatal döneme aittir. Bu aşamadaki hücreler yüzeye bağlı olmayan kültürde spontan olarak

organize olarak kardiyak yönde farklılaşma özelliği göstermektedirler. Mevcut tez çalışmasında incelenen kardiyak belirteçlerin fare ve sıçan kaynaklı AKH'lerde bazal koşullarda bile ifade edildiği görülmektedir. Sıçandan elde edilecek adipoz kök hücrelerin, mikroyerçekiminde kardiyomiyosit farklılaşmasının çalışılması durumunda istatistiksel açıdan anlamlı sonuç alınması olasılığı daha yüksektir.



7. KAYNAKLAR

1. Elcin YM. Stem cells and tissue engineering. In: Hasirci N, Hasirci V, eds. *Biomaterials: From Molecules to Engineered Tissues*. Vol 553.2004:301-316.
2. Celebi B, Elcin YM. Proteome analysis of rat bone marrow mesenchymal stem cell subcultures. *J Proteome Res*. 2009;8(5):2164-2172.
3. Lynch J. *What are stem cells? Definitions at the intersection of science and politics*. Tuscaloosa, AL: University of Alabama Press.; 2011.
4. Elçin YM. *Kök hücrelere bakış: Tanımlar, kavramlar ve sınıflandırmalar; Türkiye Bilimler Akademisi (TÜBA) Raporları*. 2016.
5. Inanc B, Elcin AE, Elcin YM. In vitro differentiation and attachment of human embryonic stem cells on periodontal tooth root surfaces. *Tissue engineering Part A*. 2009;15(11):3427-3435.
6. Inanc B, Elcin AE, Elcin YM. Human embryonic stem cell differentiation on tissue engineering scaffolds: Effects of NGF and retinoic acid induction. *Tissue Engineering Part A*. 2008;14(6):955-964.
7. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. 1998;282(5391):1145-1147.
8. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006;126(4):663-676.
9. Elcin YM, Dixit V, Gitnick T. Extensive in vivo angiogenesis following controlled release of human vascular endothelial cell growth factor: Implications for tissue engineering and wound healing. *Artificial organs*. 2001;25(7):558-565.
10. Yoshihara M, Hayashizaki Y, Murakawa Y. Genomic instability of iPSCs: Challenges towards their clinical applications. *Stem Cell Reviews and Reports*. 2017;13(1):7-16.
11. Spear BB, Heath-Chiozzi M, Huff J. Clinical application of pharmacogenetics. *Trends Mol Med*. 2001;7(5):201-204.
12. Frishman WH. Beta-adrenergic receptor blockers in hypertension: alive and well. *Prog Cardiovasc Dis*. 2016;59(3):247-252.
13. Braam SR, Passier R, Mummery CL. Cardiomyocytes from human pluripotent stem cells in regenerative medicine and drug discovery. *Trends in pharmacological sciences*. 2009;30(10):536-545.

14. Caspi O, Itzhaki I, Kehat I, et al. In vitro electrophysiological drug testing using human embryonic stem cell derived cardiomyocytes. *Stem Cells and Development*. 2009;18(1):161-172.
15. Matsa E, BurrIDGE PW, Wu JC. Human stem cells for modeling heart disease and for drug discovery. *Sci Transl Med*. 2014;6(239):239ps236.
16. DiMasi JA, Hansen RW, Grabowski HG. The price of innovation: new estimates of drug development costs. *Journal of health economics*. 2003;22(2):151-185.
17. Mordwinkin NM, Lee AS, Wu JC. Patient-specific stem cells and cardiovascular drug discovery. *Jama*. 2013;310(19):2039-2040.
18. Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2004;89(6):2548-2556.
19. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Molecular Biology of the Cell*. 2002;13(12):4279-4295.
20. Gimble JM, Bunnell BA, Chiu ES, Guilak F. Concise review: Adipose-derived stromal vascular fraction cells and stem cells: let's not get lost in translation. *Stem Cells*. 2011;29(5):749-754.
21. Ricquier D. Uncoupling protein 1 of brown adipocytes, the only uncoupler: a historical perspective. *Frontiers in endocrinology*. 2011;2:85.
22. Oberbauer E, Steffenhagen C, Wurzer C, Gabriel C, Redl H, Wolbank S. Enzymatic and non-enzymatic isolation systems for adipose tissue-derived cells: current state of the art. *Cell regeneration (London, England)*. 2015;4:7.
23. Shah FS, Wu X, Dietrich M, Rood J, Gimble JM. A non-enzymatic method for isolating human adipose tissue-derived stromal stem cells. *Cytotherapy*. 2013;15(8):979-985.
24. Kuroda Y, Dezawa M. Mesenchymal stem cells and their subpopulation, pluripotent muse cells, in basic research and regenerative medicine. *Anatomical record*. 2014;297(1):98-110.
25. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999;284(5411):143-147.
26. Planat-Benard V, Silvestre JS, Cousin B, et al. Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells - Physiological and therapeutic perspectives. *Circulation*. 2004;109(5):656-663.
27. Puissant N, Barreau C, Bourin P, et al. Immunomodulatory effect of human adipose tissue-derived adult stem cells: comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. *British Journal of Haematology*. 2005;129(1):118-129.

28. Keyser KA, Beagles KE, Kiem HP. Comparison of mesenchymal stem cells from different tissues to suppress T-cell activation. *Cell Transplant*. 2007;16(5):555-562.
29. Yanez R, Lamana ML, Garcia-Castro J, Colmenero I, Ramirez M, Bueren JA. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have in vivo immunosuppressive properties applicable for the control of the graft-versus-host disease. *Stem Cells*. 2006;24(11):2582-2591.
30. Park H-K, Cho K-S, Park H-Y, et al. Adipose-derived stromal cells inhibit allergic airway inflammation in mice. *Stem Cells and Development*. 2010;19(11):1811-1818.
31. Jee MK, Im YB, Choi JI, Kang SK. Compensation of cATSCs-derived TGFbeta1 and IL10 expressions was effectively modulated atopic dermatitis. *Cell death & disease*. 2013;4:e497.
32. Kim WS, Park BS, Kim HK, et al. Evidence supporting antioxidant action of adipose-derived stem cells: protection of human dermal fibroblasts from oxidative stress. *Journal of dermatological science*. 2008;49(2):133-142.
33. McIntosh K, Zvonic S, Garrett S, et al. The immunogenicity of human adipose-derived cells: temporal changes in vitro. *Stem Cells*. 2006;24(5):1246-1253.
34. Cherubino M, Rubin JP, Miljkovic N, Kelmendi-Doko A, Marra KG. Adipose-derived stem cells for wound healing applications. *Annals of plastic surgery*. 2011;66(2):210-215.
35. Deveza L, Choi J, Imanbayev G, Yang F. Paracrine release from nonviral engineered adipose-derived stem cells promotes endothelial cell survival and migration in vitro. *Stem Cells Dev*. 2013;22(3):483-491.
36. Diez-Tejedor E, Gutierrez-Fernandez M, Martinez-Sanchez P, et al. Reparative therapy for acute ischemic stroke with allogeneic mesenchymal stem cells from adipose tissue: a safety assessment: a phase II randomized, double-blind, placebo-controlled, single-center, pilot clinical trial. *Journal of stroke and cerebrovascular diseases : the official journal of National Stroke Association*. 2014;23(10):2694-2700.
37. Houtgraaf JH, den Dekker WK, van Dalen BM, et al. First experience in humans using adipose tissue-derived regenerative cells in the treatment of patients with ST-segment elevation myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*. 2012;59(5):539-540.
38. Chen L, Qin F, Ge M, Shu Q, Xu J. Application of adipose-derived stem cells in heart disease. *Journal of Cardiovascular Translational Research*. 2014;7(7):651-663.
39. Zhao L, Johnson T, Liu D. Therapeutic angiogenesis of adipose-derived stem cells for ischemic diseases. *Stem Cell Research & Therapy*. 2017;8:125.

40. Ma T, Sun J, Zhao Z, et al. A brief review: adipose-derived stem cells and their therapeutic potential in cardiovascular diseases. *Stem Cell Research & Therapy*. 2017;8:124.
41. Kuroda Y, Kitada M, Wakao S, et al. Unique multipotent cells in adult human mesenchymal cell populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(19):8639-8643.
42. Nassiri SM, Khaki Z, Soleimani M, et al. The similar effect of transplantation of marrow-derived mesenchymal stem cells with or without prior differentiation induction in experimental myocardial infarction. *Journal of biomedical science*. 2007;14(6):745-755.
43. Shim WS, Jiang S, Wong P, et al. Ex vivo differentiation of human adult bone marrow stem cells into cardiomyocyte-like cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;324(2):481-488.
44. Yoon J, Min BG, Kim YH, Shim WJ, Ro YM, Lim DS. Differentiation, engraftment and functional effects of pre-treated mesenchymal stem cells in a rat myocardial infarct model. *Acta cardiologica*. 2005;60(3):277-284.
45. Rangappa S, Entwistle JW, Wechsler AS, Kresh JY. Cardiomyocyte-mediated contact programs human mesenchymal stem cells to express cardiogenic phenotype. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*. 2003;126(1):124-132.
46. Jin M-s, Shi S, Zhang Y, et al. Icaritin-mediated differentiation of mouse adipose-derived stem cells into cardiomyocytes. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2010;344(1-2):1-9.
47. Rebelatto CK, Aguiar AM, Senegaglia AC, et al. Expression of cardiac function genes in adult stem cells is increased by treatment with nitric oxide agents. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009;378(3):456-461.
48. Jones PA, Taylor SM. Cellular differentiation, cytidine analogs and DNA methylation. *Cell*. 1980;20(1):85-93.
49. Christman JK. 5-Azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy. *Oncogene*. 2002;21:5483.
50. Arminan A, Gandia C, Carmen Bartual M, et al. Cardiac differentiation is driven by NKX2.5 and GATA4 nuclear translocation in tissue-specific mesenchymal stem cells. *Stem Cells and Development*. 2009;18(6):907-917.
51. Chang W, Lim S, Song BW, et al. Phorbol myristate acetate differentiates human adipose-derived mesenchymal stem cells into functional cardiogenic cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012;424(4):740-746.

52. Choi YS, Dusting GJ, Stubbs S, et al. Differentiation of human adipose-derived stem cells into beating cardiomyocytes. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2010;14(4):878-889.
53. Gaustad KG, Boquest AC, Anderson BE, Gerdes AM, Collas P. Differentiation of human adipose tissue stem cells using extracts of rat cardiomyocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2004;314(2):420-427.
54. Gwak S-J, Bhang SH, Yang HS, et al. In vitro cardiomyogenic differentiation of adipose-derived stromal cells using transforming growth factor-beta 1. *Cell Biochemistry and Function*. 2009;27(3):148-154.
55. Jumabay M, Zhang R, Yao Y, Goldhaber JJ, Bostrom KI. Spontaneously beating cardiomyocytes derived from white mature adipocytes. *Cardiovascular research*. 2010;85(1):17-27.
56. Madonna R, Willerson JT, Geng Y-J. Myocardin A enhances telomerase activities in adipose tissue mesenchymal cells and embryonic stem cells undergoing cardiovascular myogenic differentiation. *Stem Cells*. 2008;26(1):202-211.
57. Metzle R, Alt C, Bai X, et al. Human adipose tissue-derived stem cells exhibit proliferation potential and spontaneous rhythmic contraction after fusion with neonatal rat cardiomyocytes. *Faseb Journal*. 2011;25(3):830-839.
58. Palpant NJ, Yasuda S, MacDougald O, Metzger JM. Non-canonical Wnt signaling enhances differentiation of Sca1⁺/c-kit⁺ adipose-derived murine stromal vascular cells into spontaneously beating cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol*. 2007;43(3):362-370.
59. Peran M, Lopez-Ruiz E, Gonzalez-Herrera L, Bustamante M, Valenzuela A, Antonio Marchal J. Cellular extracts from post-mortem human cardiac tissue direct cardiomyogenic differentiation of human adipose tissue-derived stem cells. *Cytotherapy*. 2013;15(12):1541-1548.
60. Planat-Benard V, Menard C, Andre M, et al. Spontaneous cardiomyocyte differentiation from adipose tissue stroma cells. *Circulation research*. 2004;94(2):223-229.
61. Rebelatto CK, Aguiar AM, Senegaglia AC, et al. Expression of cardiac function genes in adult stem cells is increased by treatment with nitric oxide agents. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2009;378(3):456-461.
62. Sliwa A, Balwierz A, Kiec-Wilk B, Polus A, Knapp A, Dembinska-Kiec A. Differentiation of human adipose tissue SVF cells into cardiomyocytes. *Genes and Nutrition*. 2009;4(3):195-198.
63. Song K, Wang Z, Li W, Zhang C, Lim M, Liu T. In vitro culture, determination, and directed differentiation of adult adipose-derived stem cells towards cardiomyocyte-like cells induced by angiotensin II. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2013;170(2):459-470.

64. Song Y-H, Gehmert S, Sadat S, et al. VEGF is critical for spontaneous differentiation of stem cells into cardiomyocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2007;354(4):999-1003.
65. van Dijk A, Niessen HWM, Doulabi BZ, Visser FC, van Milligen FJ. Differentiation of human adipose-derived stem cells towards cardiomyocytes is facilitated by laminin. *Cell and Tissue Research*. 2008;334(3):457-467.
66. Yeh H-Y, Liu B-H, Hsu S-h. The calcium-dependent regulation of spheroid formation and cardiomyogenic differentiation for MSCs on chitosan membranes. *Biomaterials*. 2012;33(35):8943-8954.
67. Zanetti BF, Gomes WJ, Han SW. Identification, Selection, and Enrichment of Cardiomyocyte Precursors. *Biomed Research International*. 2013.
68. Zhu Y, Liu T, Song K, Ning R, Ma X, Cui Z. ADSCs differentiated into cardiomyocytes in cardiac microenvironment. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2009;324(1-2):117-129.
69. Zhu Y-X, Liu T-Q, Song K-D, Ma X-H, Cui Z-F. Adipose Tissue-derived Stem Cells Differentiated into Cardiomyocytes in Cardiac Microenvironment. *Progress in Biochemistry and Biophysics*. 2009;36(5):624-632.
70. Mecham RP. Methods in elastic tissue biology: Elastin isolation and purification. *Methods (San Diego, Calif)*. 2008;45(1):32-41.
71. Dogan A, Parmaksiz M, Elcin AE, Elcin YM. Extracellular matrix and regenerative therapies from the cardiac perspective. *Stem cell reviews*. 2016;12(2):202-213.
72. Annabi N, Mithieux SM, Camci-Unal G, Dokmeci MR, Weiss AS, Khademhosseini A. Elastomeric recombinant protein-based biomaterials. *Biochemical engineering journal*. 2013;77:110-118.
73. Minato A, Ise H, Goto M, Akaike T. Cardiac differentiation of embryonic stem cells by substrate immobilization of insulin-like growth factor binding protein 4 with elastin-like polypeptides. *Biomaterials*. 2012;33(2):515-523.
74. Hsiong SX, Boonthekul T, Huebsch N, Mooney DJ. Cyclic arginine-glycine-aspartate peptides enhance three-dimensional stem cell osteogenic differentiation. *Tissue Engineering Part A*. 2009;15(2):263-272.
75. Rachdi L, Aiello V, Duvillie B, Scharfmann R. L-leucine alters pancreatic beta-cell differentiation and function via the mTor signaling pathway. *Diabetes*. 2012;61(2):409-417.
76. Huh JE, Choi JY, Shin YO, et al. Arginine enhances osteoblastogenesis and inhibits adipogenesis through the regulation of Wnt and NFATc signaling in human mesenchymal stem cells. *Int J Mol Sci*. 2014;15(7):13010-13029.

77. Trappmann B, Gautrot JE, Connelly JT, et al. Extracellular-matrix tethering regulates stem-cell fate. *Nature materials*. 2012;11(7):642-649.
78. Nivison-Smith L, Weiss A. Elastin Based Constructs. In: Eberli D, ed. *Regenerative medicine and tissue engineering - cells and biomaterials*. Rijeka: InTech; 2011:Ch. 15.
79. Ozsvar J, Mithieux SM, Wang R, Weiss AS. Elastin-based biomaterials and mesenchymal stem cells. *Biomaterials science*. 2015;3(6):800-809.
80. Sutton MG, Sharpe N. Left ventricular remodeling after myocardial infarction: pathophysiology and therapy. *Circulation*. 2000;101(25):2981-2988.
81. Ott HC, Matthiesen TS, Goh SK, et al. Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart. *Nature medicine*. 2008;14(2):213-221.
82. Eschenhagen T, Fink C, Remmers U, et al. Three-dimensional reconstitution of embryonic cardiomyocytes in a collagen matrix: a new heart muscle model system. *Faseb Journal*. 1997;11(8):683-694.
83. de Lange WJ, Hegge LF, Grimes AC, et al. Neonatal mouse-derived engineered cardiac tissue: a novel model system for studying genetic heart disease. *Circulation research*. 2011;109(1):8-19.
84. Gaffey AC, Chen MH, Venkataraman CM, et al. Injectable shear-thinning hydrogels used to deliver endothelial progenitor cells, enhance cell engraftment, and improve ischemic myocardium. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*. 2015;150(5):1268-1276.
85. Caspi O, Huber I, Kehat I, et al. Transplantation of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes improves myocardial performance in infarcted rat hearts. *J Am Coll Cardiol*. 2007;50(19):1884-1893.
86. Citro L, Naidu S, Hassan F, et al. Comparison of human induced pluripotent stem-cell derived cardiomyocytes with human mesenchymal stem cells following acute myocardial infarction. *PLoS One*. 2014;9(12):e116281.
87. Mandai M, Watanabe A, Kurimoto Y, et al. Autologous Induced Stem-Cell-Derived Retinal Cells for Macular Degeneration. *New England Journal of Medicine*. 2017;376(11):1038-1046.
88. Mann DL, Lee RJ, Coats AJ, et al. One-year follow-up results from AUGMENT-HF: a multicentre randomized controlled clinical trial of the efficacy of left ventricular augmentation with Algisyl in the treatment of heart failure. *European journal of heart failure*. 2016;18(3):314-325.
89. Sonnenberg SB, Rane AA, Liu CJ, et al. Delivery of an engineered HGF fragment in an extracellular matrix-derived hydrogel prevents negative LV remodeling post-myocardial infarction. *Biomaterials*. 2015;45:56-63.

90. Sawa Y, Miyagawa S, Sakaguchi T, et al. Tissue engineered myoblast sheets improved cardiac function sufficiently to discontinue LVAS in a patient with DCM: report of a case. *Surg Today*. 2012;42(2):181-184.
91. Elcin YM, Dixit V, Gitnick G. Extensive in vivo angiogenesis following controlled release of human vascular endothelial cell growth factor: implications for tissue engineering and wound healing. *Artificial organs*. 2001;25(7):558-565.
92. Elcin AE, Elcin YM. Localized angiogenesis induced by human vascular endothelial growth factor-activated PLGA sponge. *Tissue Eng*. 2006;12(4):959-968.
93. Colton CK. Implantable biohybrid artificial organs. *Cell Transplant*. 1995;4(4):415-436.
94. Dogan A, Elcin E, Elcin YM. Translational applications of tissue engineering in cardiovascular medicine. *Curr Pharm Des*. 2016.
95. Dorland WAN. *Dorland's illustrated medical dictionary*. Philadelphia, PA: Saunders/Elsevier; 2012.
96. Betts JG, OpenStax C, Rice U. *Anatomy & physiology*. 2013.
97. Gray H, Carter HV, Davidson G. *Gray's anatomy*. 2016.
98. Koninckx R, Daniels A, Windmolders S, et al. The cardiac atrial appendage stem cell: a new and promising candidate for myocardial repair. *Cardiovascular research*. 2013;97(3):413-423.
99. Pocock G, Richards CD. *Human physiology : the basis of medicine*. Oxford; New York: Oxford University Press; 2006.
100. Netter FH. *Atlas of human anatomy*. 2014.
101. Zhu X. *Surgical Atlas of Cardiac Anatomy*. 2015.
102. Filipoiu FM. *Atlas of heart anatomy and development*. 2014.
103. Saremi F. *Revisiting cardiac anatomy : a computed-tomography-based reference and atlas*. 2011.
104. Dilsizian V, Narula J. *Atlas of cardiac innervation*. 2017.
105. Rosenthal N, Harvey RP. *Heart development and regeneration*. 2010.
106. Menihan CA, Kopel E. *Point-of-care assessment in pregnancy and women's health : electronic fetal monitoring and sonography*. 2014.
107. Harvey RP. Patterning the vertebrate heart. *Nature reviews Genetics*. 2002;3(7):544-556.

108. Paige SL, Plonowska K, Xu A, Wu SM. Molecular Regulation of Cardiomyocyte Differentiation. *Circulation research*. 2015;116(2):341.
109. WHO. *World health statistics*. Geneva, 2012.
110. Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS, et al. Heart disease and stroke statistics--2015 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*. 2015;131(4):e29-322.
111. TÜİK. Ölüm nedeni istatistikleri, 2013 *Türkiye İstatistik Kurumu Haber Bülteni* 2014(16162).
112. Laflamme MA, Murry CE. Heart regeneration. *Nature*. 2011;473(7347):326-335.
113. Sun Q, Zhang Z, Sun Z. The potential and challenges of using stem cells for cardiovascular repair and regeneration. *Genes & diseases*. 2014;1(1):113-119.
114. Frishman WH. β -Adrenergic blockade in cardiovascular disease. *Journal of cardiovascular pharmacology and therapeutics*. 2013;18(4):310-319.
115. Matsa E, Burrige PW, Wu JC. Human stem cells for modeling heart disease and for drug discovery. *Science translational medicine*. 2014;6(239):239ps236-239ps236.
116. Lund LH, Edwards LB, Kucheryavaya AY, et al. The registry of the international society for heart and lung transplantation: thirty-first official adult heart transplant report--2014; focus theme: retransplantation. *The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation*. 2014;33(10):996-1008.
117. Alcon A, Cagavi Bozkulak E, Qyang Y. Regenerating functional heart tissue for myocardial repair. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2012;69(16):2635-2656.
118. Bruneau BG, Nemer G, Schmitt JP, et al. A murine model of Holt-Oram syndrome defines roles of the T-box transcription factor Tbx5 in cardiogenesis and disease. *Cell*. 2001;106(6):709-721.
119. Moskowitz IP, Pizard A, Patel VV, et al. The T-Box transcription factor Tbx5 is required for the patterning and maturation of the murine cardiac conduction system. *Development (Cambridge, England)*. 2004;131(16):4107-4116.
120. Basson CT, Bachinsky DR, Lin RC, et al. Mutations in human TBX5 [corrected] cause limb and cardiac malformation in Holt-Oram syndrome. *Nat Genet*. 1997;15(1):30-35.
121. Oh H, Bradfute SB, Gallardo TD, et al. Cardiac progenitor cells from adult myocardium: homing, differentiation, and fusion after infarction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(21):12313-12318.

122. Brandenberger R, Wei H, Zhang S, et al. Transcriptome characterization elucidates signaling networks that control human ES cell growth and differentiation. *Nature biotechnology*. 2004;22(6):707-716.
123. Straub BK, Boda J, Kuhn C, et al. A novel cell-cell junction system: the cortex adhaerens mosaic of lens fiber cells. *Journal of cell science*. 2003;116(Pt 24):4985-4995.
124. Barallobre-Barreiro J, Gupta SK, Zoccarato A, et al. Glycoproteomics reveals decorin peptides with anti-myostatin activity in human atrial fibrillation. *Circulation*. 2016;134(11):817-832.
125. Fishman GI, Moreno AP, Spray DC, Leinwand LA. Functional analysis of human cardiac gap junction channel mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1991;88(9):3525-3529.
126. Kleber AG, Rudy Y. Basic mechanisms of cardiac impulse propagation and associated arrhythmias. *Physiological reviews*. 2004;84(2):431-488.
127. Saffitz JE, Laing JG, Yamada KA. Connexin expression and turnover : implications for cardiac excitability. *Circulation research*. 2000;86(7):723-728.
128. Yamauchi-Takahara K, Sole MJ, Liew J, Ing D, Liew CC. Characterization of human cardiac myosin heavy chain genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1989;86(10):3504-3508.
129. Kraft T, Witjas-Paalberends ER, Boontje NM, et al. Familial hypertrophic cardiomyopathy: functional effects of myosin mutation R723G in cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol*. 2013;57:13-22.
130. Walsh R, Rutland C, Thomas R, Loughna S. Cardiomyopathy: a systematic review of disease-causing mutations in myosin heavy chain 7 and their phenotypic manifestations. *Cardiology*. 2010;115(1):49-60.
131. Hailstones D, Barton P, Chan-Thomas P, et al. Differential regulation of the atrial isoforms of the myosin light chains during striated muscle development. *The Journal of biological chemistry*. 1992;267(32):23295-23300.
132. Huang M, Jiao J, Wang J, Xia Z, Zhang Y. Exposure to acrylamide induces cardiac developmental toxicity in zebrafish during cardiogenesis. *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)*. 2017;234:656-666.
133. Nishigaki R, Shinohara T, Toda T, et al. An extra human chromosome 21 reduces mlc-2a expression in chimeric mice and Down syndrome. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002;295(1):112-118.
134. Vandekerckhove J, Weber K. The complete amino acid sequence of actins from bovine aorta, bovine heart, bovine fast skeletal muscle, and rabbit slow skeletal muscle. A protein-chemical analysis of muscle actin differentiation. *Differentiation*. 1979;14(3):123-133.

135. Khodyuchenko T, Zlotina A, Pervunina T, Zverev D, Malashicheva A, Kostareva A. Congenital heart defects are rarely caused by mutations in cardiac and smooth muscle actin genes. *Biomed Res Int*. 2015;2015:127807.
136. Monserrat L, Hermida-Prieto M, Fernandez X, et al. Mutation in the alpha-cardiac actin gene associated with apical hypertrophic cardiomyopathy, left ventricular non-compaction, and septal defects. *Eur Heart J*. 2007;28(16):1953-1961.
137. James J, Zhang Y, Osinska H, et al. Transgenic modeling of a cardiac troponin I mutation linked to familial hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation research*. 2000;87(9):805-811.
138. Satou Y, Satoh N. Gene regulatory networks for the development and evolution of the chordate heart. *Genes Dev*. 2006;20(19):2634-2638.
139. Bondue A, Tännler S, Chiapparo G, et al. Defining the earliest step of cardiovascular progenitor specification during embryonic stem cell differentiation. *The Journal of cell biology*. 2011;192(5):751.
140. Hiroi Y, Kudoh S, Monzen K, et al. Tbx5 associates with Nkx2-5 and synergistically promotes cardiomyocyte differentiation. *Nat Genet*. 2001;28(3):276-280.
141. Yang CR, Wang JH. Preparation and characterization of collagen microspheres for sustained release of steroidal saponins. *Materials Research-Ibero-American Journal of Materials*. 2014;17(6):1644-1650.
142. Yao L, Phan F, Li Y. Collagen microsphere serving as a cell carrier supports oligodendrocyte progenitor cell growth and differentiation for neurite myelination in vitro. *Stem Cell Res Ther*. 2013;4(5):109.
143. Nagai N, Kumasaka N, Kawashima T, Kaji H, Nishizawa M, Abe T. Preparation and characterization of collagen microspheres for sustained release of VEGF. *Journal of materials science Materials in medicine*. 2010;21(6):1891-1898.
144. Rossler B, Kreuter J, Scherer D. Collagen microparticles: preparation and properties. *Journal of microencapsulation*. 1995;12(1):49-57.
145. Aniket, Gaul DA, Bitterfield DL, et al. Enzyme dehydration using Microglassification preserves the protein's structure and function. *Journal of pharmaceutical sciences*. 2015;104(2):640-651.
146. Aniket, Gaul DA, Rickard DL, Needham D. Microglassification: a novel technique for protein dehydration. *Journal of pharmaceutical sciences*. 2014;103(3):810-820.
147. Starcher BC, Urry DW. Elastin coacervate as a matrix for calcification. *Biochem Biophys Res Commun*. 1973;53(1):210-216.

148. Partridge SM, Davis HF, Adair GS. The chemistry of connective tissues. 2. Soluble proteins derived from partial hydrolysis of elastin. *The Biochemical journal*. 1955;61(1):11-21.
149. Starcher BC, Saccomani G, Urry DW. Coacervation and ion-binding studies on aortic elastin. *Biochimica et biophysica acta*. 1973;310(2):481-486.
150. Cox BA, Starcher BC, Urry DW. Coacervation of alpha-elastin results in fiber formation. *Biochimica et biophysica acta*. 1973;317(1):209-213.
151. Annabi N, Mithieux SM, Weiss AS, Dehghani F. Cross-linked open-pore elastic hydrogels based on tropoelastin, elastin and high pressure CO₂. *Biomaterials*. 2010;31(7):1655-1665.
152. Singh S, Topuz F, Albrecht K, Groll J, Möller M. Stimuli-sensitive microgels from native elastin: An easy approach for a drug release system. In: Percec V, ed. *Hierarchical Macromolecular Structures: 60 Years after the Staudinger Nobel Prize II*. Cham: Springer International Publishing; 2013:415-430.
153. Naumann C, Mithieux SM, Szekely D, Tu Y, Weiss AS, Kuchel PW. "Setting paint" analogy for the hydrophobic self-association of tropoelastin into elastin-like hydrogel. *Biopolymers*. 2009;91(5):321-330.
154. Vrhovski B, Jensen S, Weiss AS. Coacervation characteristics of recombinant human tropoelastin. *European Journal of Biochemistry*. 1997;250(1):92-98.
155. Liang H-C, Chang W-H, Liang H-F, Lee M-H, Sung H-W. Crosslinking structures of gelatin hydrogels crosslinked with genipin or a water-soluble carbodiimide. *Journal of Applied Polymer Science*. 2004;91(6):4017-4026.
156. Martinez-Serra J, Gutierrez A, Munoz-Capo S, et al. xCELLigence system for real-time label-free monitoring of growth and viability of cell lines from hematological malignancies. *OncoTargets and therapy*. 2014;7:985-994.
157. Urcan E, Haertel U, Styllou M, Hickel R, Scherthan H, Reichl FX. Real-time xCELLigence impedance analysis of the cytotoxicity of dental composite components on human gingival fibroblasts. *Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials*. 2010;26(1):51-58.
158. Barzegari A, Saei AA. An update to space biomedical research: tissue engineering in microgravity bioreactors. *BioImpacts : BI*. 2012;2(1):23-32.
159. Freed LE, Vunjak-Novakovic G. Spaceflight bioreactor studies of cells and tissues. *Advances in space biology and medicine*. 2002;8:177-195.
160. Messina E, De Angelis L, Frati G, et al. Isolation and expansion of adult cardiac stem cells from human and murine heart. *Circulation research*. 2004;95(9):911-921.

161. Smith RR, Barile L, Cho HC, et al. Regenerative potential of cardiosphere-derived cells expanded from percutaneous endomyocardial biopsy specimens. *Circulation*. 2007;115(7):896-908.
162. Barile L, Gherghiceanu M, Popescu L, et al. Human cardiospheres as a source of multipotent stem and progenitor cells. *Stem Cells International*. 2013;2013:10.
163. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif)*. 2001;25(4):402-408.
164. Lian X, Zhang J, Azarin SM, et al. Directed cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells by modulating Wnt/ β -catenin signaling under fully defined conditions. *Nat Protocols*. 2013;8(1):162-175.
165. Parikh A, Wu J, Blanton RM, Tzanakakis ES. Signaling Pathways and Gene Regulatory Networks in Cardiomyocyte Differentiation. *Tissue engineering Part B, Reviews*. 2015;21(4):377-392.
166. Lian X, Hsiao C, Wilson G, et al. Robust cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells via temporal modulation of canonical Wnt signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012;109(27):E1848-E1857.
167. Fukuda K. Reprogramming of bone marrow mesenchymal stem cells into cardiomyocytes. *Comptes rendus biologiques*. 2002;325(10):1027-1038.
168. Fukuda K. Molecular characterization of regenerated cardiomyocytes derived from adult mesenchymal stem cells. *Congenital anomalies*. 2002;42(1):1-9.
169. Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, et al. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *Journal of Clinical Investigation*. 1999;103(5):697-705.
170. Wan Safwani WK, Makpol S, Sathapan S, Chua KH. 5-Azacytidine is insufficient for cardiogenesis in human adipose-derived stem cells. *Journal of negative results in biomedicine*. 2012;11:3.
171. Xu H, Yi Q, Yang CM, Wang Y, Tian J, Zhu J. Histone modifications interact with DNA methylation at the GATA4 promoter during differentiation of mesenchymal stem cells into cardiomyocyte-like cells. *Cell proliferation*. 2016;49(3):315-329.
172. Choi SC, Yoon J, Shim WJ, Ro YM, Lim DS. 5-azacytidine induces cardiac differentiation of P19 embryonic stem cells. *Experimental & molecular medicine*. 2004;36(6):515-523.
173. Kruglyakov PV, Sokolova IB, Zin'kova NN, et al. In vitro and in vivo differentiation of mesenchymal stem cells in the cardiomyocyte direction. *Bulletin of experimental biology and medicine*. 2006;142(4):503-506.

174. Antonitsis P, Ioannidou-Papagiannaki E, Kaidoglou A, Papakonstantinou C. In vitro cardiomyogenic differentiation of adult human bone marrow mesenchymal stem cells. The role of 5-azacytidine. *Interactive cardiovascular and thoracic surgery*. 2007;6(5):593-597.
175. Martin-Rendon E, Sweeney D, Lu F, Girdlestone J, Navarrete C, Watt SM. 5-azacytidine-treated human mesenchymal stem/progenitor cells derived from umbilical cord, cord blood and bone marrow do not generate cardiomyocytes in vitro at high frequencies. *Vox Sanguinis*. 2008;95(2):137-148.
176. Ruan ZB, Zhu L, Yin YG, Chen GC. The mechanism underlying the differentiation of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells into myocardial cells induced by 5-azacytidine. *Indian journal of medical sciences*. 2010;64(9):402-407.
177. Gao Q, Guo M, Jiang X, Hu X, Wang Y, Fan Y. A cocktail method for promoting cardiomyocyte differentiation from bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells Int*. 2014;2014:162024.
178. Qian Q, Qian H, Zhang X, et al. 5-Azacytidine induces cardiac differentiation of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells by activating extracellular regulated kinase. *Stem Cells Dev*. 2012;21(1):67-75.
179. Supokawej A, Kheolamai P, Nartprayut K, et al. Cardiogenic and myogenic gene expression in mesenchymal stem cells after 5-azacytidine treatment. *Turkish journal of haematology : official journal of Turkish Society of Haematology*. 2013;30(2):115-121.
180. Ling SK, Wang R, Dai ZQ, et al. Pretreatment of rat bone marrow mesenchymal stem cells with a combination of hypergravity and 5-azacytidine enhances therapeutic efficacy for myocardial infarction. *Biotechnol Prog*. 2011;27(2):473-482.
181. Chen Y, Wang C, Huang Q, et al. Caveolin-1 plays an important role in the differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells into cardiomyocytes. *Cardiology*. 2017;136(1):40-48.
182. Deng F, Lei H, Hu Y, et al. Combination of retinoic acid, dimethyl sulfoxide and 5-azacytidine promotes cardiac differentiation of human fetal liver-derived mesenchymal stem cells. *Cell and tissue banking*. 2016;17(1):147-159.
183. Hou J, Lu AL, Liu BW, et al. Combination of BMP-2 and 5-AZA is advantageous in rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells differentiation into cardiomyocytes. *Cell Biol Int*. 2013;37(12):1291-1299.
184. Li J, Zhu K, Wang Y, et al. Combination of IGF1 gene manipulation and 5AZA treatment promotes differentiation of mesenchymal stem cells into cardiomyocytelike cells. *Mol Med Rep*. 2015;11(2):815-820.

185. Carvalho PH, Daibert AP, Monteiro BS, et al. Differentiation of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells into cardiomyocytes. *Arq Bras Cardiol.* 2013;100(1):82-89.
186. Lee WC, Sepulveda JL, Rubin JP, Marra KG. Cardiomyogenic differentiation potential of human adipose precursor cells. *Int J Cardiol.* 2009;133(3):399-401.
187. Choi YS, Dusting GJ, Stubbs S, et al. Differentiation of human adipose-derived stem cells into beating cardiomyocytes. *J Cell Mol Med.* 2010;14(4):878-889.
188. Rosenblatt-Velin N, Lepore MG, Cartoni C, Beermann F, Pedrazzini T. FGF-2 controls the differentiation of resident cardiac precursors into functional cardiomyocytes. *Journal of Clinical Investigation.* 2005;115(7):1724-1733.
189. Hahn JY, Cho HJ, Kang HJ, et al. Pre-treatment of mesenchymal stem cells with a combination of growth factors enhances gap junction formation, cytoprotective effect on cardiomyocytes, and therapeutic efficacy for myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol.* 2008;51(9):933-943.
190. Ronca R, Gualandi L, Crescini E, Calza S, Presta M, Dell'Era P. Fibroblast growth factor receptor-1 phosphorylation requirement for cardiomyocyte differentiation in murine embryonic stem cells. *J Cell Mol Med.* 2009;13(8a):1489-1498.
191. Roura S, Farre J, Hove-Madsen L, et al. Exposure to cardiomyogenic stimuli fails to transdifferentiate human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells. *Basic research in cardiology.* 2010;105(3):419-430.
192. Hafez P, Jose S, Chowdhury SR, Ng MH, Ruszymah BH, Abdul Rahman Mohd R. Cardiomyogenic differentiation of human sternal bone marrow mesenchymal stem cells using a combination of basic fibroblast growth factor and hydrocortisone. *Cell Biol Int.* 2016;40(1):55-64.
193. Goldman B, Mach A, Wurzel J. Epidermal growth factor promotes a cardiomyoblastic phenotype in human fetal cardiac myocytes. *Experimental cell research.* 1996;228(2):237-245.
194. Lee HJ, Cho HJ, Kwon YW, Park YB, Kim HS. Phenotypic modulation of human cardiospheres between stemness and paracrine activity, and implications for combined transplantation in cardiovascular regeneration. *Biomaterials.* 2013;34(38):9819-9829.
195. Lewis FC, Kumar SD, Ellison-Hughes GM. Non-invasive strategies for stimulating endogenous repair and regenerative mechanisms in the damaged heart. *Pharmacol Res.* 2017.
196. Behfar A, Yamada S, Crespo-Diaz R, et al. Guided cardiopoiesis enhances therapeutic benefit of bone marrow human mesenchymal stem cells in chronic myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol.* 2010;56(9):721-734.

197. Behfar A, Terzic A. Derivation of a cardiopoietic population from human mesenchymal stem cells yields cardiac progeny. *Nature clinical practice Cardiovascular medicine*. 2006;3 Suppl 1:S78-82.
198. Reinecke H, Minami E, Zhu W-Z, Laflamme MA. Cardiogenic differentiation and transdifferentiation of progenitor cells. *Circulation research*. 2008;103(10):1058-1071.
199. Fabrizio C, Angelini F, Chimenti I, et al. Thrombin and thrombin-derived peptides promote proliferation of cardiac progenitor cells in the form of cardiospheres without affecting their differentiation potential. *Journal of biological regulators and homeostatic agents*. 2011;25(2 Suppl):S43-51.
200. Latchman DS. Cardiotrophin-1: a novel cytokine and its effects in the heart and other tissues. *Pharmacol Ther*. 2000;85(1):29-37.
201. Calabro P, Limongelli G, Riegler L, et al. Novel insights into the role of cardiotrophin-1 in cardiovascular diseases. *J Mol Cell Cardiol*. 2009;46(2):142-148.
202. Freed DH, Cunningham RH, Dangerfield AL, Sutton JS, Dixon IM. Emerging evidence for the role of cardiotrophin-1 in cardiac repair in the infarcted heart. *Cardiovascular research*. 2005;65(4):782-792.
203. Sauer H, Neukirchen W, Rahimi G, Grunheck F, Hescheler J, Wartenberg M. Involvement of reactive oxygen species in cardiotrophin-1-induced proliferation of cardiomyocytes differentiated from murine embryonic stem cells. *Experimental cell research*. 2004;294(2):313-324.
204. Xinyun C, Zhi Z, Bin Z, et al. Effects of cardiotrophin-1 on differentiation and maturation of rat bone marrow mesenchymal stem cells induced with 5-azacytidine in vitro. *Int J Cardiol*. 2010;143(2):171-177.
205. Lwigale PY, Thurmond JE, Norton WN, Spooner BS, Wiens DJ. Simulated microgravity and hypergravity attenuate heart tissue development in explant culture. *Cells Tissues Organs*. 2000;167(2-3):171-183.
206. Rungarunlert S, Klincumhom N, Bock I, et al. Enhanced cardiac differentiation of mouse embryonic stem cells by use of the slow-turning, lateral vessel (STLV) bioreactor. *Biotechnol Lett*. 2011;33(8):1565-1573.
207. Rungarunlert S, Klincumhom N, Tharasanit T, Techakumphu M, Purity MK, Dinnyes A. Slow turning lateral vessel bioreactor improves embryoid body formation and cardiogenic differentiation of mouse embryonic stem cells. *Cellular reprogramming*. 2013;15(5):443-458.
208. Cerwinka WH, Sharp SM, Boyan BD, Zhau HE, Chung LW, Yates C. Differentiation of human mesenchymal stem cell spheroids under microgravity conditions. *Cell regeneration (London, England)*. 2012;1(1):2.

209. Wu X, Li SH, Lou LM, Chen ZR. The effect of the microgravity rotating culture system on the chondrogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells. *Molecular biotechnology*. 2013;54(2):331-336.
210. Zhang X, Nan Y, Wang H, et al. Model microgravity enhances endothelium differentiation of mesenchymal stem cells. *Naturwissenschaften*. 2013;100(2):125-133.
211. Fuentes TI, Appleby N, Raya M, et al. Simulated Microgravity Exerts an Age-Dependent Effect on the Differentiation of Cardiovascular Progenitors Isolated from the Human Heart. *PLoS One*. 2015;10(7):e0132378.
212. Jha R, Wu Q, Singh M, et al. Simulated microgravity and 3D culture enhance induction, viability, proliferation and differentiation of cardiac progenitors from human pluripotent stem cells. *Sci Rep*. 2016;6:30956.
213. Yan M, Wang Y, Yang M, et al. The effects and mechanisms of clinorotation on proliferation and differentiation in bone marrow mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015;460(2):327-332.
214. Mao X, Chen Z, Luo Q, Zhang B, Song G. Simulated microgravity inhibits the migration of mesenchymal stem cells by remodeling actin cytoskeleton and increasing cell stiffness. *Cytotechnology*. 2016;68(6):2235-2243.
215. Xue L, Li Y, Chen J. Duration of simulated microgravity affects the differentiation of mesenchymal stem cells. *Mol Med Rep*. 2017;15(5):3011-3018.
216. Meyers VE, Zayzafoon M, Douglas JT, McDonald JM. RhoA and cytoskeletal disruption mediate reduced osteoblastogenesis and enhanced adipogenesis of human mesenchymal stem cells in modeled microgravity. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2005;20(10):1858-1866.

8. EKLER

8.1. KULLANILAN MAKİNE-TEÇHİZAT LİSTESİ

Kullanılan Makine – Teçhizat Listesi	
Adı/Modeli	Kullanım Amacı
Perkin Elmer 100 serisi ATR FT-IR. Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi Kimya Bölümü. Kimya Merkez Laboratuvarı.	Degrade elastin kullanılarak çapraz bağlama yöntemiyle elde edilen mikrokürelerin, fonksiyonel grup bileşiminin doğal elastinin yapısıyla kıyaslanması amacıyla kullanılmıştır. Ölçümler, Ankara Üniversitesi Kimya Bölümü’nde gerçekleştirilmiştir.
Atomik kuvvet mikroskobu (Asylum). Bilkent UNAM Tesisleri Bilkent	Geliştirilen elastin-temelli mikrokürelerin ve çapraz-bağlanmış yapıdaki peletlerin elastik modül ölçümü amacıyla kullanılmıştır.
Zeta Potansiyel ve Mobilite Ölçüm Cihazı MALVERN Nano ZS90 ODTÜ Merkez Laboratuvarları.	Elastin-temelli mikrokürelerin yüzey yükü analizi amacıyla kullanılmıştır. Bu ölçümler Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Merkez Laboratuvarında

8.2. KULLANILAN HÜCRELERİN ÖZELLİKLERİ

Identification number: ATCC PCS-500-011

Species: Human (*Homo sapiens*)

Cell Type: Adipose Mesenchymal Stem

Biosafety Level: 1

Specific Staining: Positive for CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, and CD166.

Negative for CD14, CD31, CD34, and CD45.

Reference: Merfeld, Clauss B.S. et al, Tissue Engineering: Part A. 2010, 16: 2953-2966

9. ÖZGEÇMİŞ

ARIN DOĞAN

İletişim Bilgileri:

Adres: Mustafa Kemal Mahallesi, Barış Sitesi, 2086. Sokak No. 25
Eskişehir yolu Çankaya, Ankara

Telefon: 0 533 4222754

E-posta: arindogan@gmail.com, arindogan@ankara.edu.tr

Kişisel Bilgiler:

Doğum tarihi: 7 Eylül 1982

Doğum Yeri: Ankara

Uyruk: Türkiye Cumhuriyeti

Cinsiyet: Erkek

Medeni hal: Bekar

Ünvan: Yüksek Biyolog

Derece: Biyokimya Yüksek Lisans

Akademik ilgi alanları:

Biyokimya, kardiyovasküler doku mühendisliği, biyomateryal ve hücre-tabanlı translasyonel tedaviler, kök hücre farklılaşması, mekanotransdüksiyon.

Sınav Puanları:

ALES (2012 sonbahar): 73.65, ÜDS (2008 bahar): 93.75, TOEFL IBT: 107 /120,

YDS (2014 Bahar): 91.25

Askerlik Durumu:

Yükümlülük yoktur.

Eğitim:

2010- Halen	Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü'nde doktora eğitimi. Danışman: Prof. Dr. Y. Murat Elçin
2005-2008	Yüksek Lisans Diploması, Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Anabilim Dalı, Sıhhiye, Ankara.
1999-2004	Biyoloji Lisans Diploması, Hacettepe Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Beytepe, Ankara.
1999	Lise diploması, ODTÜ Geliştirme Vakfı Özel Lisesi, Ankara.

Burslar:

2015-2016	“Hematolojik Maligniteli Hastalarda Haploidentik Allojeneik Kök Hücre Nakillerinde Mezenkimal Kök Hücre Uygulaması” Başlıklı TÜBİTAK projesinde araştırmacı bursu.
2013-2014	“Nanoyapılı Jellerde Adipoz Mezenkimal Kök Hücre Farklılaşmasının İncelenmesi (EuroNanoMed Projesi)” 111-S-497 Başlıklı TÜBİTAK projesinde araştırmacı bursu.
2011-2013	"Kardiyomiyojenik Farklılaşma Potansiyeli Olan Kök/Öncül Hücrelerin Diferansiyasyon Sürecinde Gen Ekspresyon Profiline Transkriptom Ve Proteom Ebadında Araştırılması (Ex Vivo Deneysel Çalışma)" 109S454 Başlıklı TÜBİTAK projesinde araştırmacı bursu.
2007-2008	Amerika Birleşik Devletleri Ulusal Sağlık Enstitüsü (National Institutes of Health-NIH) yüksek lisans öğrencisi bursu. Moleküler Gerontoloji Laboratuvarı, Ulusal Yaşlanma Enstitüsü (National Institute on Aging-NIA), NIH, Baltimore, MD, Amerika Birleşik Devletleri.

Kullandığı Araştırma Teknikleri:

- Kolon kromatografisi yöntemi ile protein saflaştırma.
- Enzim kinetiği ölçüm ve hesaplama teknikleri.
- Konfokal Mikroskopi kullanımı ve LEICA görüntüleme yazılımının kullanımı.
- Hücre kültürü ve gen "knockdown" teknikleri.
- Deney hayvanlarının beyin, karaciğer ve böbrek dokularından mtDNA ve nDNA saflaştırılması.

- Protein tespit ve tanımlama teknikleri: Western Blotting, IP ve co-IP.
- 2D-PAGE.
- ³²P ile işaretlenmiş oligodeoksinükleotit sentezi.
- ³²P ile işaretlenmiş oligodeoksinükleotit substratlar kullanılarak yapılan DNA glikozilaz ve DNA "trapping" deneyleri.
- Doku takibi.

İş ve Araştırma Deneyimi:

2013-Halen	Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü'nde doktora eğitimi çerçevesinde Fen Fakültesi Kimya Bölümü Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Doku Mühendisliği, Biyomalzemeler ve Nanobiyoteknoloji Laboratuvarı (DMBNL) ElçinLab Biyomalzeme ve kalp dokusu ile ilgili yenileyici tıp temel araştırmaları.
2010-2013	Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü'nde doktora eğitimi çerçevesinde kardiyovasküler kök hücreler, sol kalp destek sistemleri ve insanda kalp nakli üzerine sürdürülen projelerde görevler. "Kardiyomiyojenik Farklılaşma Potansiyeli Olan Kök/Öncül Hücrelerin Diferansiyasyon Sürecinde Gen Ekspresyon Profiline Transkriptom Ve Proteom Ebadında Araştırılması (Ex Vivo Deneysel Çalışma)" başlıklı (109S454) TÜBİTAK destekli araştırma projesinde burslu araştırmacı.
2010-2013	Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kalp Merkezi'nde, Ventrikül Destek Sistemleri Koordinatörlüğü.
2007-2008	Cockayne Sendromu B proteininin baz kesip-çıkarma mekanizmasıyla oksidatif yolla oluşan DNA hasarının onarımındaki işlevinin incelenmesi konulu projede burslu araştırmacı. Moleküler Gerontoloji Laboratuvarı, Ulusal Yaşlanma Enstitüsü (NIA), Ulusal Sağlık Enstitüsü (NIH), Baltimore, MD, Amerika Birleşik Devletleri.
2006-2008	Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi: Rat Beyin ve İncebağırsağından Glutasyon S-Transferaz Enziminin Saflaştırılması ve İzoenzimlerinin Hiperisin Bileşiğine ve Trisiklik Antidepresanlara Bağlanma Özelliklerinin İncelenmesi başlıklı projede araştırmacı. Proje no: H.Ü.B.A.B. 06. D06. 101. 1001 Proje Danışmanı Prof. Dr. Nazmi Özer Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Biyokimya Araştırma Laboratuvarları, Sıhhiye, Ankara.
2001-2004	<i>Anopheles</i> , <i>Phlebotomous</i> ve <i>Aedes</i> genuslarına ait alttürlerin morfolojik farklılaşma eğilimlerinin belirlenmesi. <i>Lucilia sericata</i> 'nın kültürü. Özel çalışma öğrencisi olarak. Ekolojik

Yüksek Lisans Döneminde Alınan Dersler:

- Biyokimyaya Giriş 1,2.
- Biyokimyada Veri Analizleri.
- Biyoistatistik.
- Optofizyoloji.
- Biyokimyada Kinetik.
- Biyokimyada Araştırma Teknikleri
- Klinik Laboratuvar Teknikleri 1,2

Doktora Eğitimi Sırasında Alınan Dersler:

- Temel Biyoteknoloji
- Tıpta Proteomik Analiz Teknikleri.
- Moleküler Genetik
- Biyokimya
- Mikrobiyoloji
- Biyoteknolojide Araştırma Teknikleri
- Bio-etik
- Biyo-girişimcilik

A.B.D. Ulusal Sağlık Enstitüsü'nde Alınan Eğitim Sertifikaları:

- Laboratuvar güvenliği.
- Enformasyon güvenliği farkındalık eğitimi.
- Etik eğitimi.
- Çeşitlilik idaresi eğitimi.
- Engellilerle ilgili farkındalık eğitimi.
- Araştırma laboratuvarında HIV ve diğer kan yoluyla bulaşan patojenlerle, güvenli olarak çalışma eğitimi.
- Laboratuvarda radyasyon güvenliği.
- Radyoaktif maddelerle çalışma eğitimi.

Yayınlar:

Yüksek Lisans Tezi:

The Effects of Human Cockayne Syndrome B Protein on the Neil1 Enzyme Activities. Advisor: Prof Dr. Nazmi Özer, co-Advisor: Doç. Dr. Meltem Müftüoğlu, Hacettepe University, 2008. (Metin İngilizce yazılmıştır)

Yayınlanmış araştırma ve derleme makaleleri:

Şeker Ş, Vurat MT, **Doğan A**, Elçin AE, Elçin YM. Sensor Systems For Label-Free Detection Of Biomolecular Interactions: Quartz Crystal Microbalance (Qcm) And Surface Plasmon Resonance. In: “*Low Power Devices, Circuits And Systems*” (Accepted 2017), Iniewski K, Kurinec S (Eds.), Crc Press, Boca Raton, FL

Elçin AE, Parmaksız M, **Doğan A**, Şeker Ş, Durkut S, Dalva K, Elçin YM. Differential gene expression profiling of human adipose stem cells differentiating into smooth muscle-like cells by TGFb1/BMP4. *Experimental Cell Research*, 2017, 352, 207–217. DOI:10.1016/j.yexcr.2017.02.006

Dogan A, Elçin AE, Elçin YM. Translational Applications Of Tissue Engineering In Cardiovascular Medicine. *Current Pharmaceutical Design*. [Epub Ahead Of Print]. 11 Kasım 2016. Pubmed Id: 27834123

Ergin E, **Dogan A**, Parmaksiz M, Elcin AE, Elcin YM. Time Resolved Fluorescence Resonance Energy Transfer [Tr-FRET] Assays For Biochemical Processes. *Current Pharm Biotechnology*. 2016 Aug 9. [Epub Ahead Of Print] Vol 17. Doi: 10.2174/1389201017666160809164527

Dogan A, Parmaksiz M, Elçin AE, Elçin YM. Extracellular Matrix and Regenerative Therapies from the Cardiac Perspective. *Stem Cell Reviews and Reports*. 2016 Apr 12(2):202-13

Parmaksiz M, **Dogan A**, Odabas S, Elçin AE, Elçin YM. Clinical Applications Of Decellularized Extracellular Matrices For Tissue Engineering And Regenerative Medicine. *Biomed Mater*. 17 Mar 2016 Mar 17;11(2):022003

Deniz GC, Durdu S, Karadag A, Zaim C, **Dogan A**, Dastouri R, Akar AR. Cell Therapy for Peripheral Arterial Disease: Cellular and Molecular Aspect. (Invited Review Article). *Damar Cer Derg* 2012;21(2):101-9

Durdu S, Deniz GC, Balci D, Zaim C, **Dogan A**, Can A, Akcali KC, Akar AR. Apoptotic Vascular Smooth Muscle Cell Depletion via BCL2 Family of Proteins in Human Ascending Aortic Aneurysm and Dissection. *Cardiovascular Therapeutics*. 15 Eylül 2012.

Durdu S, Deniz GC, **Dogan A**, Zaim C, Karadag A, Dastouri MR, Akar AR. Stem cell mediated cardiovascular repair. *Canadian Journal of Physiology Pharmacology*; 90(3):337-51. 6 Mart 2012. [Epub ahead of print]

Kulaksiz-Erkmen G, Dalmizrak O, Dincsoy-Tuna G, **Dogan A**, Ogus IH, Ozer N. Amitriptyline may have a supportive role in cancer treatment by inhibiting glutathione S-transferase pi (GST- π) and alpha (GST- α). *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 7 Aralık 2011. [Epub ahead of print]

Baran C, Durdu S, Dalva K, Zaim C, **Dogan A**, Ocakoglu G, Gürman G, Arslan O, Akar AR. Effects of Preoperative Short Term Use of Atorvastatin on Endothelial Progenitor Cells after Coronary Surgery: A Randomized, Controlled Trial. *Stem Cell Reviews*, Kasım 2011. [Epub ahead of print]

Akar AR, Kurtcephe M, Sener E, Alhan C, Durdu S, Kunt AG, Güvenir HA; **Group for the Turkish Society of Cardiovascular Surgery and Turkish Ministry of Health**. Validation of the EuroSCORE risk models in Turkish adult cardiac surgical population. *European Journal of Cardio-thoracic Surgery*, Eylül 2011 ;40(3):730-5.

Tuna G, Erkmen GK, Dalmizrak O, **Dogan A**, Ogus IH, Ozer N. Inhibition characteristics of hypericin on rat small intestine glutathione-S-transferases. *Chemico Biological Interactions*, 6;188 (1):59-65. Ekim 2010.

Muftuoglu M, de Souza-Pinto NC, **Dogan A**, Aamann M, Stevnsner T, Rybanska I, Kirkali G, Dizdaroglu M, Bohr VA. Cockayne syndrome group B protein stimulates repair of formamidopyrimidines by NEIL1 DNA glycosylase. *Journal of Biological Chemistry*, 3;284(14):9270-9. Nisan 2009.

Konferans Makaleleri:

G Kulaksiz-Erkmen, O Dalmizrak, G Dincsoy-Tuna, **A Dogan**, IHO Ogus, N Ozer. Evaluation of the inhibition kinetics of amitriptyline on rat small intestine glutathione S-transferase alpha. *FEBS Journal*, 279; 220-220. Eylül 2012.

G Dincsoy-Tuna, G Kulaksiz-Erkmen, O Dalmizrak, **A Dogan**, H Ogus, N Ozer. The inhibition kinetics of hypericin on glutathione-S-transferase-alpha from rat small intestine. *FEBS Journal*, 278; 398-398. Haziran 2011.

G Kulaksiz-Erkmen, O Dalmizrak, G Dincsoy-Tuna, **A Dogan**, IH Ogus, N Ozer. Inhibition kinetics of glutathione S-transferase pi by amitriptyline. *FEBS Journal*, 278; 399-400. Haziran 2011.

G Dincsoy-Tuna, O Dalmizrak, G Kulaksiz-Erkmen, A Dogan, H Ogus, N Ozer. Characterization of the inhibitory behaviour of hypericin on glutathione-S-transferase-pi from rat small intestine. *FEBS Journal*, 278; 392-393. Haziran 2011.

Davetli Konuşmacı:

Doğan A. Sol Ventrikül Destek Cihazlarında Son Dönem Yenilikler. Türk Kalp ve Damar Cerrahisi Derneği 12. Ulusal Kongresi, 8-11 Kasım 2012, Antalya.

Sözlü Sunumlar:

Doğan A, Elçin AE, Elçin YM. Development of Biomimetic Microcarriers for the Cardiovascular Differentiation of Human Adipose Stem Cells Under Microgravity Conditions. 22. Uluslararası Biyomedikal Bilim ve Teknoloji Sempozyumu, BIOMED 2017. 12-14 Mayıs Ankara.

Dastouri M, Karadağ A, Balcı D, Deniz GC, Durdu S, **Doğan A**, AR, Can A. Uyarılmış Pluripotent Kök Hücrelerin (uPKH) Flk-1+ Öncü Hücrelere Farklılaştırılması ve Tanımlanması. 3. Kök Hücre Sempozyumu, 30 Kasım 2012-1 Aralık 2012, İstanbul.

Durdu S, İnan MB, **Doğan A**, Şırlak M, Eryılmaz S, Yazıcıoğlu L, Kaya CT, Kılıçkap M, Sayın T, Akar AR. Yüksek Pulmoner Vasküler Dirençli Olgularda Uzun Süreli Sol

Ventrikül Destek Sistemi Uygulamaları. Türk Kalp ve Damar Cerrahisi Derneği 12. Ulusal Kongresi, 8-11 Kasım 2012, Antalya.

Deniz GC, Durdu S, Alakoç YD, Zaim Ç, Özkeserli Z, **Doğan A**, rdal H, Erdemli E, Akar AR. Dejeneratif Ciddi Mitral Yetmezliği Olan Atriyal F Ritimli Hastaların Atriyal Dokularında Gen İfade Değişimlerinin Genom Ebadında Karşılaştırılması. Türk Kalp ve Damar Cerrahisi Derneği 12. Ulusal Kongresi, 8-11 Kasım 2012, Antalya.

Dastouri MR, Karadağ A, Balcı D, Deniz GC, Durdu S, **Doğan A**, Can A, Akar AR. Uyarılmış Pluripotent Kök Hücrelerin (Upkh) Flk1+ Öncül Hücelere Farklılaştırılması Aşamasında Optimum Zamanlama. Türk Kalp ve Damar Cerrahisi Derneği 12. Ulusal Kongresi, 8-11 Kasım 2012, Antalya.

Durdu S, Deniz GD, Deniz Balcı D, Zaim C, **Doğan A**, Can A, Akcalı KC, Akar AR. Çıkan Aort Anevrizması ve Diseksiyonu Hastalarının Vasküler Düz Kas Hücrelerinde Apoptoz İlişkili Bcl-2 Ailesi Proteinlerinin Etkisi. 6. Cerrahi Araştırma Kongresi, 8-10 Aralık 2011, Ankara.

Çetinkaya F, Eğin Y, Özkeserli Z, **Doğan A**, Uysal S, Deniz GD, Alakoç YD, Durdu S, Özdağ H, Akar AR, Akar N. Antikoagülan Kullanım Endikasyonu Olan Hastalarda VKORC1 C1173T Ve G-1639A Gen Polimorfizmlerinin Farmakogenetik Etkisinin Araştırılması. 36. Ulusal Hematoloji Kongresi, 3-6 Kasım 2010, Antalya.

Çetinkaya F, Eğin Y, **Doğan A**, Deniz GÇ, Alakoç YD, Durdu S, Özdağ H, Akar AR, Özyurda Ü, Akar N. Warfarin Kullanan Türk Hastaların İlaç Yanıtında VKORC1 (G-1639A), (C1173T) ve Protrombik Gen Polimorfizmlerinin Değerlendirilmesi. Türk Kalp ve Damar Cerrahisi Derneği 11. Ulusal Kongresi, 27-31 Ekim 2010, Antalya.

Poster Sunumları:

Involvement of Bcl-2 Family of Proteins in Vascular Smooth Muscle Cell Apoptosis in Patients with Ascending Aortic Aneurysm and Dissection. Durdu S, Deniz GÇ, Zaim Ç, **Doğan A**, Balcı D, Can A, Akçalı KC, Akar AR. Kardiyovasküler Hastalıklarda Yeni Yaklaşımlar, Uluslararası Sempozyum, 4-8 Mayıs 2011, Ankara.

Evaluation of VKORC1 and Thrombotic Gene Polymorphisms in Cardiovascular Patients on Oral Anticoagulation. Çetinkaya F, Eğin Y, **Doğan A**, Durdu S, Coşgun E, Özdağ H, Kılıçkap M, Akar AR, Akar MN. Kardiyovasküler Hastalıklarda Yeni Yaklaşımlar, Uluslararası Sempozyum, 4-8 Mayıs 2011, Ankara.

First Successful Implantation of Heartmate II Lvas in Türkiye. **Ankara University Cardiac Transplant and Ventricular Assist Systems Team**. Kardiyovasküler Hastalıklarda Yeni Yaklaşımlar, Uluslararası Sempozyum, 4-8 Mayıs 2011, Ankara.

Characterization of the inhibitory behaviour of hypericin on glutathione-S-transferase pi from rat small intestine. Dincsoy-Tuna G, Dalmizrak O, Kulaksiz-Erkmen G, **Dogan A**, Ogus H and Ozer N. FEBS Journal 278 (Suppl. 1) 74–445, 2011, 36. Uluslararası FEBS Kongresi, 25-30 Haziran 2011, Torino.

The inhibition kinetics of hypericin on glutathione-S-transferase-alpha from rat small intestine. Dincsoy-Tuna G, Dalmizrak O, Kulaksiz-Erkmen G, **Dogan A**, Ogus H and Ozer N. FEBS Journal 278 (Suppl. 1) 74–445, 2011. 36. Uluslararası FEBS Kongresi, 25-30 Haziran 2011, Torino.

Inhibition kinetics of glutathione S-transferase pi by amitriptyline. Dincsoy-Tuna G, Dalmizrak O, Kulaksiz-Erkmen G, **Dogan A**, Ogus H and Ozer N. FEBS Journal 278 (Suppl. 1) 74–445, 2011. 36. FEBS Kongresi, 25-30 Haziran 2011, Torino.

Tuna GD, Kulaksız GD, Dalmızrak Ö, **Doğan A**, Ögüş H, Özer N. Hiperisinin Sıçan İncebağırsağı Glutatyon-STransferaz- Pi İzozimi Üzerindeki İnhibitör Etkisinin Gösterilmesi. 20. Ulusal Biyokimya Kongresi, Ekim 2008, Nevşehir.

Tuna GD, Kulaksız GD, Dalmızrak Ö, **Doğan A**, Ögüş H, Özer N. Hiperisinin Sıçan İncebağırsak Glutatyon-S-Transferaz Alfa Üzerindeki İnhibisyon Kinetiği. 20. Ulusal Biyokimya Kongresi, Ekim 2008, Nevşehir.

Kongreler:

- Hacettepe Üniversitesi Kök Hücre Günü, 8 Kasım 2013, Ankara.
- Türk Kalp ve Damar Cerrahisi Derneği 12. Ulusal Kongresi, 8-11 Kasım 2012, Antalya.

- 17. Uluslararası Biyomedikal Bilimler ve Teknolojiler Sempozyumu (BIOMED). 23-25 Kasım 2011, Ankara.
- Kardiyovasküler Hastalıklarda Yeni Yaklaşımlar, Uluslararası Sempozyum, 4-8 Mayıs 2011, Ankara.
- 2. Ulusal Hücresel Tedavisi Onarımsal Tıp Kongresi, 11-13 Şubat 2011, Çeşme.
- 11. Ulusal Kalp ve Damar Cerrahisi Kongresi, 27-31 Ekim 2010, Antalya.
- 20. Ulusal Biyokimya Kongresi, 29 Ekim-1 Kasım 2008, Nevşehir.
- 31. FEBS kongresi, 24-29 Haziran 2006, İstanbul.
- 19. Ulusal Biyokimya kongresi ve Klinik Enzimoloji Çalıştayı, 22-25 Nisan 2005, Antalya.
- 8. Ulusal Biyoloji Öğrenci Kongresi, 10-13 Ekim 2001, Düzenleyici olarak.

Yaşam bilimleri dışındaki ilgi alanları: Edebiyat ve klasik müzik.

Yaşam bilimleri dışındaki yayınları: "Göl" başlıklı öykü. Sözcükler Dergisi, Sayı: 27, Eylül-Ekim 2010. İstanbul.

Extracellular Matrix and Regenerative Therapies from the Cardiac Perspective

Arin Dogan¹ · Mahmut Parmaksız¹ · A. Eser Elçin¹ · Y. Murat Elçin¹

© Springer Science+Business Media New York 2015

Abstract Cardiovascular diseases are the leading cause of death and a major cause of financial burden. Regenerative therapies for heart diseases bring the promise of alternative treatment modalities for myocardial infarction, ischemic heart disease, and congestive heart failure. Although, clinical trials attest to the safety of stem cell injection therapies, researchers need to overcome the underlying mechanisms that are limiting the success of future regenerative options. This article aims to review the basic scientific concepts in the field of mechanobiology and the effects of extracellular functions on stem cell fate.

Keywords Extracellular matrix · Mechanotransduction · Heart · Stem cell therapy · Cardiac tissue engineering · Heart failure · Myocardial infarction · Tensegrity

Abbreviations

NADPH	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
MAPK	mitogen-activated protein kinase
ERK1 and 2	serine/threonine kinase1/2
JNK	c-Jun N-terminal kinases
CD31	cluster of differentiation 31 protein
CD34	cluster of differentiation 34 protein
vWF	von Willebrand Factor

✉ Y. Murat Elçin
elcinmurat@gmail.com

¹ Tissue Engineering, Biomaterials and Nanobiotechnology Laboratory, Ankara University Faculty of Science, and Ankara University Stem Cell Institute, Degol Caddesi, Tandogan, 06100 Ankara, Turkey

Fli-1	Friend leukemia integration 1 transcription factor
GATA-4	transcription factor GATA family -4
MEF2c	myocyte-specific enhancer factor 2C
SERCA2	sarco/endoplasmic reticulum Ca ²⁺ + -ATPase
TRPC	transient receptor potential cation channel
TIMP	tissue inhibitor of metalloproteinases
MesP1	mesoderm posterior 1 homolog (mouse) protein
Nkx-2.5	homeobox protein Nkx-2.5
Tbx5	T-box transcription factor TBX5
Hand2	heart- and neural crest derivatives-expressed protein 2

Introduction

According to the World Health Organization (WHO), cardiovascular diseases constituted the 30 % of total deaths in the year 2008, 7.3 million of which were due to coronary heart disease. WHO predicts 25 million annual deaths due to cardiovascular diseases by the year 2030 [1]. Current medical treatment of heart diseases involves pharmaceutical, surgical and medical device-related solutions. These treatments ameliorate a vast number of cases, although health statistics also attest to the need for alternative treatment options, especially for congestive heart failure and ischemic heart disease. Regenerative medicine supports an alternative realm of thought, aiming functional recovery and healing of the defect or even replacement with a whole bioartificial organ [2, 3]. Most candidate treatment options are at a pre-clinical and clinical research stage. Regenerative options are mostly on initial research phases, however, whole-organ decellularization, acellular grafts, stem cell injection therapies, three-dimensional (3D) biomaterial scaffolds and cardiac patches have

conceptual advantages over some of the conventional methods proven in pre-clinical studies. Personalized therapy, lack of adverse host immune reactions, customizable physical properties and elimination of donor availability as a factor are few examples. While these advances have paved the way for further clinical use of biomaterial technologies, they also have outlined the need for new clinical trials involving biodegradable materials and stem cells. Regenerative therapies aim to induce self-repair, reinstate function or replace unhealthy tissue that is otherwise beyond the remedy of conventional medicine. Tissue engineered solutions were successfully applied to humans, in cases of the bladder, trachea, and skin graft applications [2, 4]. In comparison, there are factors limiting the success of regenerative treatment of heart, such as complex mechanical properties, need for prompt functional recovery, and the need for overcoming negative effects of pathological remodeling [5]. Injection of stem cells to the myocardium is a well-documented approach, widely studied in clinical settings. Clinical outcomes are insufficient, due to low retention and low viability of grafted cells. Along with differentiated cells, adult stem cells are a favorable candidate for cell therapy.

Extracellular matrix (ECM) is a key component of the stem cell niche. It fundamentally influences the fate choices and cell identity. Differentiation of cells and maintenance of intended cell characteristics during in vitro expansion, seeding, and engraftment steps are subject to the intricate mechanical, and biochemical needs of stem cells [6]. This review aims to focus on the effects of extracellular matrix on stem cell fate, with examples from heart tissue and its regenerative therapies.

Factors Affecting Cell Fate and Tissue Structure

Basic Concepts in Cell-ECM Interactions

Cell Attachment

Cell to ECM attachment is facilitated by integrin molecules. Integrins localize transversely in the cell membrane. Forces concentrated at the focal adhesion points induce clustering of the transmembrane domain of the integrin (dimeric $\alpha\beta$). Integrins serve both as a receptor and an activator by transmitting the force across the cytoskeletal linkages. Integrins conjoin ECM proteins with focal adhesion proteins, talin, paxillin and vinculin to cytoplasmic elements, microtubules, and microfilaments. The cytoskeletal complex senses tensional forces, activating the integrin associated signaling cascades (e.g. focal adhesion kinase) [7]. Growth, cell survival, and proliferation are dependent on anchoring via integrin receptor activities since many soluble growth factors are only active if adhered to a particular substrate/surface. Integrins function in cell cycle, transcriptional control, and cytoskeletal

development in tissues. They also work as signal transduction receptors for epidermal growth factor, platelet-derived growth factor, lysophosphatidic acid, and thrombin [8]. Gene knock-out studies reveal their role in homeostasis and tissue morphogenesis, by sensing mechanical cues. These studies also confirm a very important passive cytoskeletal function [9]. Integrin activation is a conformational change which induces the recruitment of cytoplasmic proteins such as kindlins and talins. The large protein complex2 interacts with actin cytoskeleton. The formed protein complex activates important protein kinase functions (i.e. focal adhesion kinase and Src kinase) which in turn activates canonical signaling pathways (JNK, ERK, Rho GTPases). The signaling activity influences vitally important cellular activities such as proliferation, migration and gene expression related to increased survival [9].

Cells organize in a single layer under tissue culture settings. In nature, cells interact with each other on the three-dimensional level. Cell culture conditions can be manipulated by using mechanical strain to mimic natural conditions. For example, embryoid bodies cultured on flexible mechanical surfaces initiate cardiovascular differentiation [10]. The mechanical strain may induce up-regulation of NADPH oxidases, which in turn, increases the production of reactive oxygen species (ROS). Increased concentrations of ROS initiate phosphorylation of MAPK, which consequently phosphorylate ERK1, ERK2 and JNK for vasculogenesis/angiogenesis, and ERK1, ERK2, JNK and p38 in the case of cardiomyogenic differentiation [10].

Substrate Stiffness

Substrate stiffness is one of the most studied cues that affect stem cell fate. It is defined by Young's modulus (E , measured in Pascals) which is the force needed to stretch a material. On ECM coated hydrogel matrices, mesenchymal stem cell (MSC) populations react to a different degree of bulk stiffness, accordingly [11]. Stiffness is a function of the concentration of cross-linking for artificial biomaterials. Studies performed with a variety of polymer substrates have shown the effect of relative surface stiffness on stem cell fate. For example, MSCs adapt to the stiffness of materials such as synthetic polymer networks, poly(dimethylsiloxane) (PDMS), hyaluronic acid gels, and collagen [12]. Embryonic cardiomyocyte function and characteristics are dependent on a mechanical match between cells and the matrix [13]. In cardiomyocyte culture, contraction frequency is optimal only in a corresponding degree of rigidity or elasticity of the matrix ($E \leq 11$ kPa). Investigations on newly born rat hearts have shown that the elastic modulus of the epicardium changes during the prenatal period, from the embryonic value of 12 ± 4 kPa to the neonatal level of 39 ± 7 kPa. This significant alteration causes functional changes and influences the development of neonatal rat cardiomyocytes [14].

Different cell types respond variably to the stiffness of the ECM environment. The response against stiffness affects cell behavior, however bulk stiffness does not always translate into cell fate changes. For example, human epidermal stem cells undergo changes related to the varying stiffness and porosity levels of poly(acrylamide) but not to more rigid PDMS [15]. The porosity of the material is a prerequisite for cell adherence [11, 15]. It allows cells to react differently to ECM molecules organized into a rigid network rather than free aggregates of the same ECM cues [16]. It is important to take into consideration that stem cell proliferation is a natural process in embryonic development and an integral part of regenerative functions of the human body. This process is a result of physical and spatial modifications.

Remodeling

MMPs are matrix metalloproteinases; more specifically zinc carrying proteinases with conserved methionine domains. Most MMPs function outside the cells. MMP proteolysis targets a broad range of ECM proteins, digestion of which could lead to varying cellular and extracellular responses. MMP activity also functions in cancer-cell invasion and metastasis [17]. Degradation of ECM molecules is a constructive process that has a regulatory and remodeling purpose. MMP proteolysis reshapes the pericellular space, and the cleaved ECM fragments have independent signaling functions. Also, MMPs can activate or deactivate the signaling molecules by degrading the cell-ECM and cell-cell junctions [18]. MMPs affect cell functions by disrupting the contact of surface receptors with the ECM. MMP expression and function shows modifications in the life span of tissue, starting at the embryonic stage through development and in disease states, contributing greatly to the remodeling activities, hence affecting tissue functions noticeably. Many *in vivo* studies utilizing knockout models have underlined the function of integrins in the maintenance of tissue and livelihood [18]. Incorporation of integrin recognition sequences (e.g. RGD) into the artificial constructs may increase the probability of cell survival and graft success.

Mechano-Responsiveness

Mechanical transduction of force is an overall process that includes both active and passive transmission. The signaling cascades, gated channels, membrane bilayer, ECM and the cytoskeleton (Fig. 1) transmit force. Outside forces travel through ECM via collagen, fibronectin, laminin. And later transmitted into cell by stretch-activated channels. Integrins play an important role in transducing the force carried by collagen fibers, through the membrane bilayer (sarcolemma) to the cytoskeletal elements via talin and vinculin [19].

Cytoskeleton of cardiomyocytes has a densely arranged belt of cortical layer that supports membrane bilayer. This cortical (sub-membrane) cytoskeleton provides mechanical integrity and conduction between the cell membrane (with other cells) and the contractile apparatus via costameres. The sub-cellular structure-function assembly generates and transduces the force through the cardiac tissue. N-cadherin molecules couple myocytes by connecting the actin cytoskeleton to the membrane at the fascia adherens and desmosomes, which attach intermediate filaments to the intercalated disk to form a syncytium [20].

Sarcomere is the smallest functional unit of the muscle. The length-dependent activation of cardiac muscle is a momentary action that enables the heart to respond to the circulatory demand. Actin filaments attach to the Z line, and the myosin filaments connect to titin protein. Sarcomere connects to sarcolemmal elements such as integrins and dystroglycans, by the cytoskeletal components. Lastly, the sarcomere is connected to the nucleus by desmin and LINC complex. This connectivity allows the generated force to be transmitted through the whole cell and to the ECM by interconnecting filaments enabling responsivity, both mechanically, and by activating the molecular signaling cascades [21].

Shear Stress

Shear stress affects the calcium levels, which is a regulator of down-stream signaling mechanisms, differentiation, and proliferation. Shear is a dynamic force that affects most tissue types. Mechanical load forms pressure gradients creating shear stress on the interstitial fluid. This influences the structure of the endothelium by affecting the shape, density, alignment and elongation of cells, organization of the cytoskeletal elements and affecting cell-to-cell adhesions, and cell-to-ECM junctions. Also, shear stress may control gene expression, and stimulate epigenetic modifications (for a detailed review see [22]). During the embryonic phase, prior to the shear-force generating circulatory activity (a *similé* for static culturing conditions), some venous and arterial gene expressions are present in the respective early-stage tissues. The maturation of the tissue character is a result of mutual inputs of genetic and environmental factors [23]; thus, physical conditions are a necessity for artificial culture environments for maintaining tissue characteristics. Local mechanical forces are important environmental factors for culturing endothelial cells *in vitro*. Major endothelial surface markers CD31, CD34, vWF, and Fli-1, are expressed highly in tissues with higher fluid shear stress [24]. Similarly, endothelial progenitor cells undergo differentiation, proliferation and tube formation in the presence of laminar shear stress [25]. A mouse mesenchymal progenitor cell line was shown to undergo endothelial differentiation with a marked decrease in smooth muscle gene expression and an up-regulation of angiogenic growth

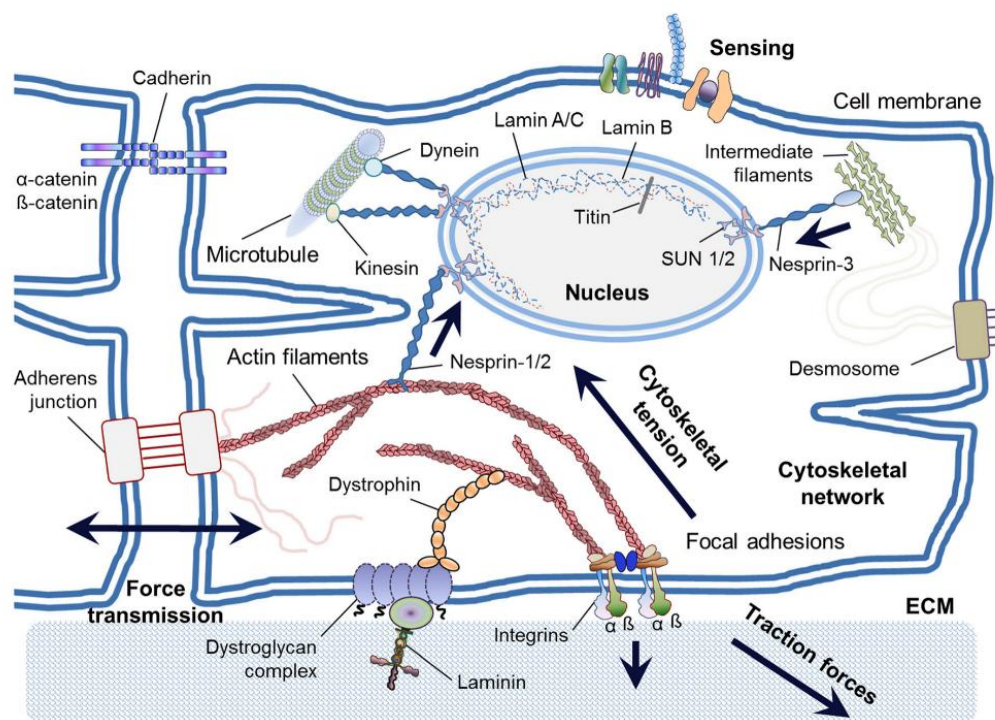


Fig. 1 Force transmission between cardiomyocytes and extracellular matrix. Cardiac functions are closely governed by physical forces applied to the heart and forces generated by the heart muscle. The nucleo-cytoskeletal complex translates the outside force into cytoskeletal tension and facilitates response against the tension exerted onto the cell through the ECM. Mechanical tension transmitted by the ECM components is conveyed into the cell through focal adhesion complexes localized in the sarcolemma, binding the cardiomyocyte to the ECM. Myotubules and fibrillar cytoskeletal components, such as actin pass the force to the nuclear envelope via nesprin interconnections. The force is transferred by SUN to nuclear lamina composed of lamin fibrils of the nucleoskeleton. Nesprin and SUN proteins connect nuclear envelope and

cytoskeleton. SUN1-2 interacts with nuclear pore complex proteins, lamins and nuclear interior. Nesprin 1–2 contains N-terminal actin-binding domain that enables cytoskeletal actin connections. By this way, extracellular forces can reach into the nucleus without disrupting cellular integrity, also facilitating interaction between the cell and the extracellular milieu. Lamin also functions in the organization of chromatin influencing gene expression (e.g. synthesis of titin isoforms in response to modifications in the ECM stiffness). Contractile apparatus (*not shown*) generates force conducted through costamere complexes to the ECM. Sarcoplasmic filamentous proteins mediate the transduction of force between the neighboring cardiomyocytes

factors under shear conditions [26]. Shear stress effects on ECM are established [27, 28], although they have not been entirely uncoupled from the effect of perfusion, which readily provide nutrients and dissolved oxygen to the tissue. Increasing shear-force induces vascular characteristics for ECM, stromal cells and stem cells alike.

Mechanical Tension and Tensegrity in Tissue

From early on in development, cells create a pre-stress via their adhesions to the ECM environment and connections to the neighboring cells. Every *force vector* of pre-stress is balanced with an opposite tension with equal magnitude, which results in mechanical stabilization, an ever-present influence by which tissue maintains its tensional integrity [29]. Tensile pre-stress is probably the common force that stabilizes cytoskeletal form. The tension force transmitted from the

cytoskeleton travels through the cell membrane and connects to the network of ECM proteins. Several biomechanical and enzymatic mechanisms overlook morphogenesis, which is a glacial process that takes days to lead to a noticeable functional change in the microenvironment. A living tissue seems stable only under a constant isometric tension. The tension travels via connections between the cell and ECM.

Fibroblasts synthesize the ECM components. They produce the intercellular substrate, which contains the mechanical cues, growth factors and other soluble signals specific to the tissue type that have innate forces for tissue maintenance. Transduction of mechanical stimuli affects the expression of ECM related genes in an adaptive fashion. Mechanical signals indirectly activate available transcription factors, which bind to a regulatory element in the ECM gene promoter region. Alternatively, a mechanical signal may cause the expression of a nuclear factor as a regulatory element. Cyclic stretching

induces secretion of transforming growth factor- β (TGF- β) or connective tissue growth factor from the fibroblasts. The autocrine feedback loop is one of the ways fibroblasts contribute to the defining and maintaining of the tissue [30, 31]. Mechanical stimuli may induce synthesis or secretion of a growth factor to regulate ECM gene expression in the fibroblasts.

Mechanical Properties of the Heart

Large perimysial collagen fibers align parallel with the myocytes, preventing them from damage during the filling phase of the heart by limiting the extent of passive elongation of the tissue [32]. Levels of transmural collagen types increase during the progress of heart failure pathology. In “pressure overload hypertrophy”, the increase in ventricular stiffness, correlates with over-expression of collagen types and abnormal cross-linking of collagen, causing gradual stiffening of the myocardium, leading to the enlargement of cardiomyocytes and overall deterioration in ventricle function.

Microtubules are larger polymers that provide resistance to the cell nucleus and exert pressure against the cell membrane. Intermediate filaments form flexible lines from the surface and travel the cytoplasm to nestle the nucleus. Microfilaments are actin molecules that actively generate tension in coexistence with myosin. Ingber [29] proposed that living cells maintain the cellular architecture and control the shape and structure of the cell via Tensegrity phenomenon, initially put forward by Buckminster Fuller as an architectural term. By disrupting the stress fibers, researchers proved the existence of an ever-present tension on microtubules. The nano-scale damage occurred on the stress fiber caused the remaining section to unravel [33].

The filling of the heart chamber during diastole determines the extent of elongation, and the incoming blood volume determines the strength of contraction. This mechanism enables the body to adapt to changing needs of cardiac output with Henry-Gauer and Bainbridge reflexes, which are stretch activated mechanisms stimulated by atrial distension sensed by baroreceptors. Sympathetic stimulation of α and β receptors regulate the contractile force [21]. Key components elastin and collagen, functions in maintaining the elasticity of heart ECM.

Cardiac extracellular matrix comprises of glycosaminoglycans (GAGs), glycoproteins, and proteoglycans. GAGs are the most negatively charged molecules of the ECM, which interact with the matrix proteins, growth factors, and receptors. Hyaluronan is a high-molecular-weight polysaccharide and the largest GAG present in the cardiac matrix; it forms non-covalent complexes with proteoglycans. Heparan sulfate, chondroitin sulfate, and dermatan sulfate function in cardiac development and pathogenesis of valvular cardiomyopathy [34]. Proteoglycans have limited function in cardiac cell

surface and ECM. For example, syndecans and hyalactans bind to the matrix components and inflammatory mediators. Collagens and elastin are the most abundant structural proteins. Elastin is a highly cross-linked, hydrophobic protein with fibrillar and amorphous components. Elastin functions in load-bearing and resumes initial shape after stretching and contraction. The elasticity of the heart ECM ensures critical function during passive filling and beating [14, 30].

Extracellular matrix element expressions in the heart changes through the lifespan of organisms. Different elements have different regulatory, mechanic and biochemical functions. Moreover, these functions affect the contractile and non-contractile cell behavior. The importance of ECM elements is most obvious in cardiomorphogenesis. As shown in mice and chick embryos, perturbations in ECM related gene expressions cause malformations in the four-chambered heart. Also mutations in cardiac ECM genes cause prenatal lethality and/or congenital cardiac malformations in humans. In addition to cell-cell signaling, ECM is involved in regulation of cell proliferation, differentiation and migration. The results of genetic anomalies in protein expressions gives us valuable information on the functions of ECM elements such as proteoglycans, elastin, tenascin, laminins, hyaluronan, fibronectins and collagen types [35].

Hyaluronan is the most abundant type of glycosaminoglycans in the heart. It consists of alternating UDP glucuronic acid moieties with UDP-N-acetylglucosamine, arranged in chain-like form. Other abundant hyaluronan types are heparan sulfate/heparin, keratin sulfate, and chondroitin sulfate/dermatan sulfate. Injection of hyaluronidase into the atrioventricular cushion or cardiac jelly at specific time-points, causes drastic aberrations in the formation of heart structure in chick embryos [36].

Proteoglycans are core proteins associated with a glycosaminoglycan. Chondroitin sulfate proteoglycans are versican, aggrecan and neurocan are all expressed during the development phase of the heart. Deficiencies of chondroitin sulfate proteoglycans do not necessarily cause cardiac malformations, however mutations in enzymes processing these structures cause cardiac defects [37]. Heparan sulfate proteoglycans are located at the cell surface and ECM of the heart as with many other tissue types. They have important roles in cardiac development and homeostasis, due to their ability to bind cytokines and growth factors (BMPs, FGFs, TGF- β and VEGF) related to cardiac development at their heparan sulfate chains. Perlecan is an important heparan sulfate located at the ECM and basement membranes of various tissues. They interact with laminins and integrins and at the same time with fibroblast growth factors. Other prominent heparan sulfate proteoglycans are glypicans, agrin and syndecans.

Different collagen types are expressed on different stages of cardiac morphogenesis in the vertebrates. Collagen types

have distinct functional properties and are expressed at different locations of the developing heart; types I, III, V and VI in ventricle structure, II, IV, XI and XIII in atrioventricular valve leaflet formation. Collagens are one of the most abundant structural elements of the heart ECM and aortic wall. Fibrillar, network-forming and multi-domain structures serve in providing structural integrity and elasticity, as well as association with specific GAG chains [38].

Periostin, which has TGF- β 3-responsive functions, is a secreted ECM component involved in the maturation of heart, through inducing mesenchymal cell differentiation to fibroblast types. Fibulins belong to a different group of ECM elements comprised of repeating EGF-like domains. Fibulin deletions generally cause serious defects during heart formation. Fibronectin is an important ECM protein with structural and functional properties. They interact with collagens, heparan sulfate proteoglycans and integrins [39]. Fibrillin is in microfibrillar form with important elastic properties. It is expressed in the basal surface of the early endocardium. Heart valve prolapses are common in patients with Marfan's syndrome which is caused by fibrillin1 mutation. This shows the developmental importance of fibrillin1 for heart tissue [34].

Mechanical Forces and Cardiac Fate

The structure of the heart ECM dynamically changes in the presence of mechanical and electrical impulses. In the developmental period, stem cell differentiation and tissue-specific expression of cardiac proteins are stimulated in the presence of mechanical cues.

Static stretching of embryonic stem cells (ESCs) induces the expression of sarcomeric α -actinin, GATA-4 and MEF2c [10]. Similarly, cyclic mechanical strain increases expressions of α -cardiac actin, myosin heavy chain and myocyte enhancer factor in ESC-derived cardiomyocytes in a frequency dependent fashion [40].

Maturation of fetal heart tissue is a fast process accompanied by changes in expression levels of extracellular proteins and matrix proteinases [18]. There is a significant rise in the expression levels of Collagen Type IV in the early stages of embryonic heart development. This is followed by an increase in Collagen Type I towards the end of the development period [41]. Stiffness (or compliance) of the heart ECM alters during the formation of the heart. *In situ* zymography assays have shown that rat heart MMPs function during different days of development and that structure of the heart is under constant remodeling through the development period [42]. Softer substrates cause neonatal rat cardiomyocytes to beat with higher frequency. As a fate controlling environmental cue, stiffness influences both differentiation and maturation of the cardiac myocytes [43–45]. Also, embryonic cardiomyocytes contract optimally on a matrix with heart-like rigidity compared to scar-like rigidity [46]. Substrate stiffness by itself does not

shape the overall tissue structure. Contractile forces create the stress that shapes the tissue by counter-acting against the ECM. This interplay of mechanical forces refines the embryogenesis of heart and the whole embryo during numerous morphogenetic processes through the development period. The stiffness of the heart ECM changes through the course of embryonic development [11, 15].

Expression levels of titin is modified during the progress from fetus to adult, together with the increased stiffness, resulting in an increase in cardiac output [47, 48]. Titin protein maintains the sarcomere homeostasis by mechanically limiting the stretch of sarcomere units during the passive filling of the heart. Together with the support of the ECM elements elastin and collagen, titin initiates the contraction by its recoil action, protecting the sarcomere from the negative effects of excessive stretching and determining the stroke volume through Frank-Starling principle. Additionally, recoil contributes to the cyclic nature of contraction (synchronicity between the atria and ventricles) [21]. The mechanical role of elastic proteins serves both at a cellular level and in the macro-scale and constitutes a dynamic example of a tensegrity structure [49].

Mechanical Properties in Myocardial Infarction

Myocardial infarction (MI) causes alterations in the ECM structure by leading to scar tissue formation. Acute MI causes adverse remodeling of the cardiac ECM. Functional cardiomyocyte number decreases, collagen deposition increases, and cardiac tissue transforms into a dense and less compliant form. This necrotic tissue is an inapt substrate for the remaining cardiomyocytes. Overall organ function suffers due to fibrotic rigidity, with correlation to the size of the infarct zone [50]. Cardiomyocyte necrosis and apoptosis, together with progressive fibrosis cause an overall loss of function, leading to heart failure. Engler first described the relationship between stem cell fate and surface or matrix stiffness in 2006. Naive MSCs differentiate into muscle, neural or bone cells in varying substrate stiffness values. Substrate stiffness is defined by Young's modulus which is the force needed to stretch a material sample. [51]. Cardiac progenitors express troponin I on softer substrates compared to stiff substrates, which implies an optimal stiffness is necessary both for contractile function and stem cell identity [52]. MI increases the stiffness in the infarcted areas from healthy levels of 18 ± 2 kPa, up to 55 ± 14 kPa. Injection of MSCs at the infarct zone causes an increase in compliance parallel to improved ventricular function [53]. Stem cell engraftment therapy benefits by contributing to the viscoelasticity of the ECM of heart tissue. MSCs differentiate into muscle cells on biomaterials with elastic modulus of 10 kPa [51]. Lower stiffness may restore calcium stores and improve contractility.

Conventional treatment of MI focuses on re-sustaining perfusion of the ischemic myocardial area through drug treatment

and revascularization. Drug therapy slows adverse remodeling and prevents arrhythmias caused by the disruption of impulse conduction due to tissue loss. However, functional impairment due to cardiomyocyte loss is impossible to overcome by the intrinsic resources of the heart, or in some cases, by the *-state of the art-* medical treatment [54].

Mechanical Properties in Atrial Fibrillation

Atrial fibrillation (AF) is the most common form of arrhythmia. It is the uncoordinated contraction of atrial muscles, due to the faulty and uneven propagation of the contractile wave. AF increases the risk of stroke and premature death [55]. This condition manifests with histological changes in the atria, such as fibroblast proliferation, myocyte hypertrophy and alterations of the ECM. Adverse electrical, contractile and structural remodeling of the atrial ECM accompanies some AF cases, such as altered expression levels of MMPs, transient receptor potential channels, stable anchoring contact, collagen, and connexin [56]. Interstitial fibrosis contributes to the symptoms of AF, as the reversal of electrical remodeling does not always remedy the clinical state [57].

Mechano-responsiveness of cardiomyocytes translates the pressure into cellular excitation. Canonical TRP (TRPC) subunits are one of the proposed stretch-activated depolarization of cation channels. Voltage-gated K⁺ channels, chloride, and non-selective ion channels may respond to some mechanical stimuli [58]. Electrical remodeling is a result of alterations in sarcolemmal ion-channel gene expression and changes in connexin structure, which provides electrical coupling of the cardiomyocytes [59]. In permanent AF patients, ECM of the heart is remodeled due to increased expression of MMP-2, accompanied by down-regulation of TIMP-2 [60].

Mechanical Properties in Heart Failure

Model studies report that the dilated cardiomyopathy phenotype may result from disruptions in the contractile equipment. Alterations in the structure of titin, and disruptions of certain cytoskeletal proteins, vinculin, desmin, and N-cadherin, can also contribute to the pathology [61]. Disruption of force transmission within the ECM can alter ventricular function and lead to chamber dilation.

Altered mechanical signaling caused by cytoskeletal defect can lead to altered force transmission and/or altered mechanical signaling. Cytoskeletal elements carry the force exerted by the myosin and troponin filaments and transmit the force to the nuclear membrane with lamin, emerin, nesprin [62]. The conduction of force, in turn, leads to the alteration of mechano-signalling. These alterations in biomechanical sensing lead to failing muscle mechanics, and compensatory hypertrophy, a maladaptive remodeling of the ECM and myocytes [30, 31].

Regenerative Approaches

Current Stem Cell-Based Regenerative Options

Stem cell therapy alters the stiffness of the infarct zone by inducing changes in the expressions of cardiac ECM elements. MSC engraftment functions by modifying the gross structure of the infarct scar, into a more compliant and heterogeneous structure, which eventually leads to increased cellularity compared to vehicle control [53]. Stem cell therapy aims to restore heart function by reinstating the cardiomyocyte population. Many alternative cell therapies and candidate treatment modalities are under investigation in pre-clinical studies and phase-I trials. As a prerequisite, the graft should not cause any infarction, inflammation and it should be free of any undifferentiated cells or immature myocytes following injection [61].

Pre-treatment aims to condition graft cells to increase viability or to prevent cell loss by inhibiting cell death pathways. Heat treatment induces production of heat shock proteins which have cytoprotective properties against low oxygen and nutrient levels. Heat shock proteins drastically lower cell death during injection and at the initial weeks. Hence, they increase cell viability of the grafted cells in the ischemic myocardium [63]. Diazoxide and isoflurane preconditioning increases the viability of cardiomyocytes under ischemic conditions, by opening ATP-dependent potassium channels [64]. Hypoxic stress applied before injection pre-conditions the cells against the ischemic state of the infarct zone prior to engraftment. Studies on ESCs, MSCs, and adipose stem cells have demonstrated ample evidence of hypoxia, causing up-regulation of an arteriogenic cytokine expression [65]. Pluripotent cells express hypoxia-inducible factor (HIF-1) as an adaptive response against hypoxia. This response promotes cell proliferation and angiogenesis in hypoxic cultures, and in ischemic conditions *in vivo* [64]. This increases the probability of graft success. Human ESCs cultured in low-oxygen conditions produce embryoid bodies with high angiogenic properties. Besides, hypoxic conditioning of cardiomyocytes prior to engraftment, increases the chance of cell survival in the peri-infarct zone with poor circulation. Hypoxia influences better engraftment of murine cardiac progenitors by influencing the expression of CXCR4, a chemokine receptor, which interacts with stromal-derived growth factor (SDF-1) [64]. Ischemic conditions induce the release of cytoprotective factors such as IGF, IL-1 β , and VEGF [64]. Compared with their normoxic counterparts, bone marrow MSCs pre-conditioned with hypoxia have higher survival and enhanced capacity for cardiac repair [64–66].

Results of most of the clinical studies involving stem cell therapy for ischemic heart disease only evaluate medical end-points. The fate of the introduced cells remains ambiguous in these studies. Histopathological assessment of human hearts

following allogeneic stem cell treatment is not feasible due to ethical and methodological constraints. However, there are some large-animal studies providing valuable findings on the effects of human cells on heart tissue ECM [67]. Lack of information limits our understanding of stem cell therapies regarding their effects on ECM components.

Tissue Engineering Scaffolds

Cell source and construct size are the most important limitations of cardiac tissue engineering. The stiffness of human myocardium ranges from 20 kPa at the end-diastole to higher values at the end of systole. Stiffness stimulates differentiation of stem cells. Similarly, as previously mentioned, cyclic stretching of the cardiac constructs results in better contractile properties and a more mature phenotype [68]. Only a small percentage of proposed biodegradable scaffolds (usually made up of natural polymers) can match the physical needs of the cardiac tissue [52, 58, 62, 69, 70].

A cardiac construct must endure the forces exerted during the cardiac cycle. Successful coupling with the host tissue is an important goal for treatment [71]. The choice of material vastly varies, according to the micromechanical, and functional properties of the tissue type, since arteries, myocardium or the heart valves each have distinct physical characteristics [72–74].

Decellularized heart matrix is a good candidate for tissue engineering approaches, since it has biologically active MMP-sensitive peptide sequences, spatial cues for cell adhesion, tissue-specific signal molecules and growth factors. In theory, these properties should induce the attachment of cells, neovascularization, and maturation of the tissue graft, enabling adaptation, migration and proliferation of host cells and perfusion of the graft [75, 76]. The tissue source can be allogeneic or xenogeneic, as the process eliminates cellular antigens that might generate an immune response. A decellularized ECM biological scaffold holds tissue-specific ultrastructure and composition, presenting the benefits of *in vivo* development during embryogenesis [2, 75]. These type of scaffolds present numerous tissue-specific cues of microstructure and ultrastructure [77]. The effect of natural cues is challenging to replicate with artificial polymers. Decellularized heart ECM has a tissue-specific combination of surface texture, pore size and density. In addition, it has biochemical cues such as hydrophilic and hydrophobic moieties, spatial presentation of the surface ligands, concentration of tissue-specific ECM elements (e.g. collagen types, laminin, fibronectin) [75, 76]. Biomaterial scaffolds should be able to produce and convey adequate contractile force (ca. 20–50 mN/mm) and successfully propagate electrical impulses (25 cm/s) [78]. Biomaterial constructs with relatively higher elastic modulus can induce differentiation of stem cells into the cardiovascular lineage, and provide durability during the cardiac cycle. On the other hand, it

can restrict diastolic relief, which is just as crucial as contraction for heart function.

An important limitation of construct thickness is the metabolic and oxygen supply in the core region. For adult human hearts, epimyocardial capillary density is higher than that of the endomyocardial density, and minimum inter-capillary distance is around 20 μm [79]. Indirectly, this information specifies the optimum distance between the cell and perfusion surface. Hence, the maximal thickness of an ideal cardiac construct is $\sim 200 \mu\text{m}$ [80]. In a study investigating the maximum thickness for cardiac grafts, researchers found that 400 μm was the highest feasible thickness to maintain viability [81]. The maximum diffusion distances limit the size of an avascular myocardial construct. Vascularization of the construct is an option for higher diffusion distances.

Injectable Biomaterials

Injectable biomaterials provide a percutaneous option for implantation with considerable success in small and large animal models. Hydrogel-based materials yield encouraging results [82]. Cardiac-specific ECM is a good candidate for combination with stem cells or other therapeutic agents [83]. Acellular matrices circumvent immune reactions. In the future, a timely delivery of a standardized biomaterial system could be feasible for treatment of MI cases; preventing or limiting ventricle remodeling and delaying the onset of congestive heart failure [76, 84–86].

A simplistic acellular approach can prevent ventricular wall thinning and dilation of the myocardium and suffice in preventing heart failure. Injectable collagen biomaterial improves ventricular remodeling and function. This method has potential use in myocarditis cases and ischemic heart disease, for which a prompt physical durability is imperative [87]. Some studies on animal models have documented favorable results for the delivery of injectable self-assembling peptides together with stem cells [85]. This approach may be beneficial for increasing cell retention and improving the expected outcomes of the stem cell treatment of the myocardium.

Cell Sheets

Cardiomyocytes cultured in sheet form is an option for repairing transmural defects. For the production of cardiomyocyte sheets, a single layer of cardiomyocytes is cultured on poly(*N*-isopropylacrylamide). Cell layers detach in a temperature-responsive manner, and can be stacked upon each other to construct a thicker graft [88]. This method can overcome the difficult task of coupling introduced cardiomyocytes for electroconductivity, immediately upon engraftment. Although the method widely utilizes skeletal muscle cells, it is also useful for endothelial progenitors, heart progenitors, adipocytes, cardiomyocytes, stromal cells and MSCs on different

model organisms in treating MI. These studies report improvement in ejection fraction, inhibition of left ventricle dilation and stabilization of fractional shortening. Moreover, notable inhibition of fibrosis and increase in angiogenesis, points to a general alleviation of heart failure symptoms. The contractility of the constructs should add to the myocardial function. Okano's group [89, 90] has reported successful transplantation of an autologous myoblast sheet manufactured in thermo-responsive culture dishes to a dilated cardiomyopathy patient receiving left ventricle assist device treatment [89, 91]. Cardiomyocytes cultured in sheet form, may contribute to the regeneration of the infarct zone upon implantation to the infarcted area, as these cells would already have functional intercellular connections, extracellular protein networks and contractile synchronicity. Researchers have reported new capillary formation and new cardiomyocytes on the implanted construct, and thickening of the sheet, through the course of the experiment [92]. A single cell sheet composed of cardiomyocytes constitutes a 2D structure, as the cells of the graft connect with each other on a single plane. In theory, stacking of these sheets can amount to a 3D structure that has adequate functional properties if the cells have enough perfusion. Arguably, the 3D structure of stacked cell sheets resembles that of the native heart [93]. Cell-sheet cardiomyocytes display anisotropy, organized cell-to-cell arrangements, and functional unison.

In Situ Reprogramming

Failing myocardium loses cardiomyocyte population while the fibroblast population stays viable. Direct reprogramming or partial programming therapies target non-myocyte populations in the myocardium. These therapies aim to differentiate the resident cell population into functional cardiomyocytes. Researchers used viral transfection for the delivery of transcription factors, MesP1, Nkx2-5 GATA4, Tbx5, MEF2C, and Hand2 which are effective for reprogramming mouse fibroblasts into cardiomyocyte-like cells [94]. Further experiments using cardiac fibroblasts of adult mice have resulted in cardiomyocyte-like cells expressing a heart-specific protein, cardiac troponin I, and sarcomere-like phenotype. Further, upon optimization of factors, researchers have proven the concept on cardiac fibroblasts in MI animal models [95]. The newly formed cardiomyocytes formed gap junctions with the resident cardiomyocytes. Notably, researchers have observed higher functional reprogramming *in vivo*, which is probably related to the favorable properties of the native ECM. Other contributing factors are the presence of contracting neighbor cells, ECM elements, tensile forces, and local paracrine factors.

According to more recent work on in situ reprogramming, delivery of the cardiac specific transcription factors GATA4, mef2c, and Tbx5 with optimal stoichiometry, increases the

efficiency of induced cardiomyocyte generation in vivo. The optimal ratio of combined delivery causes a 10-fold higher beating activity in induced cardiomyocytes [96]. Another recent study used lentiviral delivery of microRNA sequences as an alternative to transcription factor delivery. In this study, effective viral delivery of microRNA sequences led to mature cardiac phenotype and significant mid-term improvement in ventricle function [97].

Conclusions

Simply put, the tissue is composed of cells (parenchymal and stromal) and the surrounding ECM. Whether it involves cells, biomaterial injections or application of scaffolds, regenerative treatments aim to assist or facilitate regeneration of the ailing tissue. Recent basic scientific research has yielded a plethora of new findings that support the importance of mechanical factors of ECM in normal physiology, disease etiology, and regenerative treatments. To successfully set the future perspective for cell-based regenerative treatments; new approaches must address the effects of mechanical forces on stem cell fate, and the role of ECM in tissue health. Advents of *in situ* reprogramming of cardiac fibroblasts, cell sheet cardiac tissue engineering and the use of decellularized matrices for both injectable interventions and whole-organ engineering, may influence the future of regenerative medicine.

Acknowledgments YME was supported by the Turkish Academy of Sciences (TÜBA, Ankara, Turkey) as an associate member.

Author Disclosure No competing financial interests exist.

References

- 1 World Health Organization (2012). *World health statistics*. Geneva: WHO.
- 2 Badyalak, S. F., Weiss, D. J., Caplan, A., & Macchiarini, P. (2012). Engineered whole organs and complex tissues. *Lancet*, 379(9819), 943–952.
- 3 Elcin, Y. M. (2003). *Tissue engineering, stem cells and gene therapies* (1st ed.,). New York and London: Kluwer Academic-Plenum Publishers.
- 4 Atala, A., Bauer, S. B., Soker, S., Yoo, J. J., & Retik, A. B. (2006). Tissue-engineered autologous bladders for patients needing cystoplasty. *Lancet*, 367(9518), 1241–1246.
- 5 Segers, V. F. M., & Lee, R. T. (2008). Stem-cell therapy for cardiac disease. *Nature*, 4517181, 937–942.
- 6 Lane, S. W., Williams, D. A., & Watt, F. M. (2014). Modulating the stem cell niche for tissue regeneration. *Nature Biotechnology*, 32(8), 795–803.
- 7 Ingber, D. E., & Tensegrity, I. I. (2003). How structural networks influence cellular information processing networks. *Journal of Cell Science*, 116(Pt 8), 1397–1408.
- 8 Sheppard, D. (2000). *In vivo* functions of integrins: lessons from null mutations in mice. *Matrix Biology*, 19(3), 203–209.

- 9 Bouvard, D., Pouwels, J., De Franceschi, N., & Ivaska, J. (2013). Integrin inactivators: balancing cellular functions *in vitro* and *in vivo*. *Nat Rev Mol Cell Bio*, 14(7), 430–442.
- 10 Schmelter, M., Ateghang, B., Helmig, S., Wartenberg, M., & Sauer, H. (2006). Embryonic stem cells utilize reactive oxygen species as transducers of mechanical strain-induced cardiovascular differentiation. *The FASEB Journal*, 20(8), 1182–1184.
- 11 Wen, J. H., Vincent, L. G., Fuhrmann, A., Choi, Y. S., Hribar, K. C., Taylor-Weiner, H., et al. (2014). Interplay of matrix stiffness and protein tethering in stem cell differentiation. *Nature Materials*, 13(10), 979–987.
- 12 Gilbert, P. M., Havenstrite, K. L., Magnusson, K. E., Sacco, A., Leonardi, N. A., Kraft, P., et al. (2010). Substrate elasticity regulates skeletal muscle stem cell self-renewal in culture. *Science*, 329(5995), 1078–1081.
- 13 Engler, A. J., Carag-Krieger, C., Johnson, C. P., Raab, M., Tang, H., & Speicher, D. W. (2008). *et al.* Embryonic cardiomyocytes beat best on a matrix with heart-like elasticity: scar-like rigidity inhibits beating. *Journal of Cell Science*, 121(22), 3794–3802.
- 14 Jacot, J. G., McCulloch, A. D., & Omens, J. H. (2008). Substrate stiffness affects the functional maturation of neonatal rat ventricular myocytes. *Biophysical Journal*, 95(7), 3479–3487.
- 15 Trappmann, B., Gautrot, J. E., Connelly, J. T., Strange, D. G., Li, Y., Oyen, M. L., et al. (2012). Extracellular-matrix tethering regulates stem-cell fate. *Nature Materials*, 11(7), 642–649.
- 16 Choquet, D., Felsenfeld, D. P., & Sheetz, M. P. (1997). Extracellular matrix rigidity causes strengthening of integrin-cytoskeleton linkages. *Cell*, 88(1), 39–48.
- 17 Egeblad, M., & Werb, Z. (2002). New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nature Reviews. Cancer*, 2(3), 161–174.
- 18 Page-McCaw, A., Ewald, A. J., & Werb, Z. (2007). Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Bio*, 8(3), 221–233.
- 19 Imanaka-Yoshida, K., Enomoto-Iwamoto, M., Yoshida, T., & Sakakura, T. (1999). Vinculin, talin, integrin alpha 6 beta 1 and laminin can serve as components of attachment complex mediating contraction force transmission from cardiomyocytes to extracellular matrix. *Cell Motil Cytoskel*, 42(1), 1–11.
- 20 Chopra, A., Tabdanov, E., Patel, H., Janmey, P. A., & Kresh, J. Y. (2011). Cardiac myocyte remodeling mediated by N-cadherin-dependent mechanosensing. *Am J Physiol-Heart C*, 300(4), H1252–H1266.
- 21 Calaghan S, White E. The role of the sarcomere and cytoskeleton in cardiac mechanotransduction. In: Cardiac mechanotransduction, eds. Weckström M, Tavi P, Springer Science + Business Media, 2007; 28–47.
- 22 Stolberg, S., & McCloskey, K. E. (2009). Can shear stress direct stem cell fate? *Biotechnology Progress*, 25(1), 10–19.
- 23 Jones, E. A., le Noble, F., & Eichmann, A. (2006). What determines blood vessel structure? Genetic prespecification vs. hemodynamics. *Physiology (Bethesda)*, 21, 388–395.
- 24 Pusztaszeri, M. P., Seelentag, W., & Bosman, F. T. (2006). Immunohistochemical expression of endothelial markers CD31, CD34, von willebrand factor, and Fli-1 in normal human tissues. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 54(4), 385–395.
- 25 Yamamoto, K., Takahashi, T., Asahara, T., Ohura, N., Sokabe, T., & Kamiya, A. (2003). *et al.* Proliferation, differentiation, and tube formation by endothelial progenitor cells in response to shear stress. *Journal of Applied Physiology*, 95(5), 2081–2088.
- 26 Wang, H., Riha, G. M., Yan, S., Li, M., Chai, H., Yang, H., et al. (2005). Shear stress induces endothelial differentiation from a murine embryonic mesenchymal progenitor cell line. *Arterioscl Throm Vas*, 25(9), 1817–1823.
- 27 Chiquet, M. (1999). Regulation of extracellular matrix gene expression by mechanical stress. *Matrix Biology*, 18(5), 417–426.
- 28 Gupta, V., & Grande-Allen, K. J. (2006). Effects of static and cyclic loading in regulating extracellular matrix synthesis by cardiovascular cells. *Cardiovascular Research*, 72(3), 375–383.
- 29 Ingber, D. E., Wang, N., & Stamenovic, D. (2014). Tensegrity, cellular biophysics, and the mechanics of living systems. *Reports on Progress in Physics*, 77(4), 046603.
- 30 Hein, S., Kostin, S., Heling, A., Maeno, Y., & Schaper, J. (2000). The role of the cytoskeleton in heart failure. *Cardiovascular Research*, 45(2), 273–278.
- 31 Barry, S. P., Davidson, S. M., & Townsend, P. A. (2008). Molecular regulation of cardiac hypertrophy. *Int J Biochem Cell B*, 40(10), 2023–2039.
- 32 Fomovsky, G. M., & Holmes, J. W. (2010). Evolution of scar structure, mechanics, and ventricular function after myocardial infarction in the rat. *Am J Physiol-Heart C*, 298(1), H221–H228.
- 33 Kumar, S., Maxwell, I. Z., Heisterkamp, A., Polte, T. R., Lele, T. P., Salanga, M., et al. (2006). Viscoelastic retraction of single living stress fibers and its impact on cell shape, cytoskeletal organization, and extracellular matrix mechanics. *Biophysical Journal*, 90(10), 3762–3773.
- 34 Rienks, M., Papageorgiou, A., Frangogiannis, N. G., & Heymans, S. (2014). Myocardial extracellular matrix: an ever-changing and diverse entity. *Circulation Research*, 114, 872–888.
- 35 Bowers, S. L., Banerjee, I., & Baudino, T. A. (2010). The extracellular matrix: at the center of it all. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 48(3), 474–482.
- 36 Nakamura, A., & Manasek, F. J. (1981). An experimental study of the relation of cardiac jelly to the shape of the early chick embryonic heart. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, 65, 235–256.
- 37 Dundar, M., Muller, T., Zhang, Q., Pan, J., Steinmann, B., Vodopituz, J., et al. (2009). Loss of dermatan-4-sulfotransferase 1 function results in adducted thumb-clubfoot syndrome. *American Journal of Human Genetics*, 85(6), 873–882.
- 38 Lockhart, M., Wrigg, E., Phelps, A., & Wessels, A. (2011). Extracellular matrix and heart development. *Birth Defects Research. Part A, Clinical and Molecular Teratology*, 91(6), 535–550.
- 39 Pankov, R., & Yamada, K. M. (2002). Fibronectin at a glance. *Journal of Cell Science*, 115(20), 3861–3863.
- 40 Shimko, V. F., & Claycomb, W. C. (2008). Effect of mechanical loading on three-dimensional cultures of embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. *Tissue Eng Pt A*, 14(1), 49–58.
- 41 Thompson, R. P., Fitzharris, T. P., Denslow, S., & LeRoy, E. C. (1979). Collagen synthesis in the developing chick heart. *Texas Reports on Biology and Medicine*, 39, 305–319.
- 42 Ratajska A, Cleutjens JP. Embryogenesis of the rat heart: the expression of collagenases. *Basic Research in Cardiology* 2002; 97(3): 189–197.
- 43 Shapira-Schweitzer, K., & Seliktar, D. (2007). Matrix stiffness affects spontaneous contraction of cardiomyocytes cultured within a PEGylated fibrinogen biomaterial. *Acta Biomaterialia*, 3(1), 33–41.
- 44 Kharaziha, M., Nikkhah, M., Shin, S.-R., Annabi, N., Masoumi, N., Gaharwar, A. K., et al. (2013). PGS:gelatin nanofibrous scaffolds with tunable mechanical and structural properties for engineering cardiac tissues. *Biomaterials*, 34(27), 6355–6366.
- 45 Jacot, J. G., Kita-Matsuo, H., Wei, K. A., Chen, H. S. V., Omens, J. H., Mersola, M., et al. (2010). Cardiac myocyte force development during differentiation and maturation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1188, 121–127.
- 46 Ezzell, R. M., Goldmann, W. H., Wang, N., Parashurama, N., & Ingber, D. E. (1997). Vinculin promotes cell spreading by mechanically coupling integrins to the cytoskeleton. *Experimental Cell Research*, 231(1), 14–26.
- 47 Walker, J. S., & de Tombe, P. P. (2004). Titin and the developing heart. *Circulation Research*, 94(7), 860–862.

- 48 Lahmers, S., Wu, Y., Call, D. R., Labeit, S., & Granzier, H. (2004). Developmental control of titin isoform expression and passive stiffness in fetal and neonatal myocardium. *Circulation Research*, 94(4), 505–513.
- 49 Ingber, D. E. (2002). Mechanical signaling and the cellular response to extracellular matrix in angiogenesis and cardiovascular physiology. *Circulation Research*, 91(10), 877–887.
- 50 Segura, A. M., Frazier, O. H., & Buja, L. M. (2014). Fibrosis and heart failure. *Heart Failure Reviews*, 19, 173–185.
- 51 Engler, A. J., Sen, S., Sweeney, H. L., & Discher, D. E. (2006). Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell*, 126, 677–689.
- 52 Krachenbuehl, T. P., Zammaretti, P., Van der Vlies, A. J., Schoenmakers, R. G., Lutolf, M. P., Jaconi, M. E., et al. (2008). Three-dimensional extracellular matrix-directed cardioprogenitor differentiation: systematic modulation of a synthetic cell-responsive PEG-hydrogel. *Biomaterials*, 29, 2757–2766.
- 53 Berry, M. F., Engler, A. J., Woo, Y. J., Piroli, T. J., Bish, L. T., Jayasankar, V., et al. (2006). Mesenchymal stem cell injection after myocardial infarction improves myocardial compliance. *American Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology*, 290(6), H2196–H2203.
- 54 Chen, W., & Frangogiannis, N. G. (1833). Fibroblasts in post-infarction inflammation and cardiac repair. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2013, 945–953.
- 55 Alex, Y., Tan, A. Y., & Zimetbaum, P. (2011). Atrial fibrillation and atrial fibrosis. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 57, 625–629.
- 56 Takahashi, K., Kakimoto, Y., Toda, K., & Naruse, K. (2013). Mechanobiology in cardiac physiology and diseases. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 17(2), 225–232.
- 57 Yu, W. C., Lee, S. H., Tai, C. T., Tsai, C. F., Hsieh, M. H., Chen, C. C., et al. (1999). Reversal of atrial electrical remodeling following cardioversion of long-standing atrial fibrillation in man. *Cardiovascular Research*, 42(2), 470–476.
- 58 Friedrich, O., Wagner, S., Battle, A. R., Schürmann, S., & Martinac, B. (2012). Mechano-regulation of the beating heart at the cellular level-mechanosensitive channels in normal and diseased heart. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 110, 226–238.
- 59 Nattel, S. (2002). New ideas about atrial fibrillation 50 years on. *Nature*, 415(6868), 219–226.
- 60 Xu, J., Cui, G., Esmailian, F., Plunkett, M., Marelli, D., Ardehali, A., et al. (2004). Atrial extracellular matrix remodeling and the maintenance of atrial fibrillation. *Circulation*, 109(3), 363–368.
- 61 Seth, S., Narang, R., Bhargava, B., Ray, R., Mohanty, S., Gulati, G., et al. (2006). Percutaneous intracoronary cellular cardiomyoplasty for nonischemic cardiomyopathy: clinical and histopathological results: the first-in-man ABCD (autologous bone marrow cells in dilated cardiomyopathy) trial. *Journal of the American College of Cardiology*, 48(11), 2350–2351.
- 62 Westermann, D., Lindner, D., Kasner, M., Zietsch, C., Savvatis, K., Escher, F., et al. (2011). Cardiac inflammation contributes to changes in the extracellular matrix in patients with heart failure and normal ejection fraction. *Circulation. Heart Failure*, 4, 44–52.
- 63 Zhang, M., Methot, D., Poppa, V., Fujio, Y., Walsh, K., & Murry, C. E. (2001). Cardiomyocyte grafting for cardiac repair: graft cell death and anti-death strategies. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 33(5), 907–921.
- 64 Don, C. W., & Murry, C. E. (2013). Improving survival and efficacy of pluripotent stem cell-derived cardiac grafts. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 17(11), 1355–1362.
- 65 Kinnaird, T., Stabile, E., Burnett, M. S., Lee, C. W., Barr, S., Fuchs, S., et al. (2004). Marrow-derived stromal cells express genes encoding a broad spectrum of arteriogenic cytokines and promote *in vitro* and *in vivo* arteriogenesis through paracrine mechanisms. *Circulation Research*, 94(5), 678–685.
- 66 Takahashi, M., Li, T. S., Suzuki, R., Kobayashi, T., Ito, H., Ikeda, Y., et al. (2006). Cytokines produced by bone marrow cells can contribute to functional improvement of the infarcted heart by protecting cardiomyocytes from ischemic injury. *American Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology*, 291, H886–H893.
- 67 Chong, J. J., Yang, X., Don, C. W., Minami, E., Liu, Y. W., & Weyers, J. J. (2014). *et al.* Human embryonic-stem-cell-derived cardiomyocytes regenerate non-human primate hearts. *Nature*, 510(7504), 273–277.
- 68 Mihic, A., Li, J., Miyagi, Y., Gagliardi, M., Li, S. H., Zu, J., et al. (2014). The effect of cyclic stretch on maturation and 3D tissue formation of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. *Biomaterials*, 35(9), 2798–2808.
- 69 Pego, A. P., Siebum, B., van Luyn, M. J., van Seijen XJ, G. y., Poot, A. A., et al. (2003). Preparation of degradable porous structures based on 1,3-trimethylene carbonate and D,L-lactide (co)polymers for heart tissue engineering. *Tissue Engineering*, 9, 981–994.
- 70 Stout, D. A., Basu, B., & Webster, T. J. (2011). Poly(lactic-co-glycolic acid): carbon nanofiber composites for myocardial tissue engineering applications. *Acta Biomaterialia*, 7, 3101–3112.
- 71 Elcin, A. E., & Elcin, Y. M. (2006). Localized angiogenesis induced by human vascular endothelial growth factor-activated PLGA sponge. *Tissue Engineering*, 12(4), 959–968.
- 72 Bouten, C. V., Dalkers, P. Y., Driessen-Mol, A., Pedron, S., Brizard, A. M., & Baaijens, F. P. (2011). Substrates for cardiovascular tissue engineering. *Adv Drug Deliver Rev*, 63(4–5), 221–241.
- 73 Martins, A. M., Eng, G., Caridade, S. G., Mano, J. F., Reis, R. L., & Vunjak-Novakovic, G. (2014). Electrically conductive chitosan/carbon scaffolds for cardiac tissue engineering. *Biomacromolecules*, 15(2), 635–643.
- 74 Reis, L. A., Chiu, L. L. Y., Feric, N., Fu, L., & Radisic, M. (2014). Biomaterials in myocardial tissue engineering. *J Tissue Eng Regen M*. doi:10.1002/term.1944.
- 75 Wainwright, J. M., Czajka, C. A., Patel, U. B., Freytes, D. O., Tobita, K., Gilbert, T. W., et al. (2010). Preparation of cardiac extracellular matrix from an intact porcine heart. *Tissue Eng Pt C-Meth*, 16(3), 525–532.
- 76 Ott, H. C., Matthies, T. S., Goh, S. K., Black, L. D., Kren, S. M., Netoff, T. I., et al. (2008). Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart. *Nature Medicine*, 14(2), 213–221.
- 77 Parmaksiz, M., Elcin, A. E., & Elcin, Y. M. (2015). Decellularization of bovine small intestinal submucosa and its use for the healing of a critical-sized full-thickness skin defect, alone and in combination with stem cells, in a small rodent model. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. doi: 10.1002/term.2071.
- 78 Radisic, M., & Christman, K. L. (2013). Materials science and tissue engineering: repairing the heart. *Mayo Clinic Proceedings*, 88(8), 884–898.
- 79 Rakusan, K., Flanagan, M. F., Geva, T., Southern, J., & Van Praagh, R. (1992). Morphometry of human coronary capillaries during normal growth and the effect of age in left ventricular pressure-overload hypertrophy. *Circulation*, 86(1), 38–46.
- 80 Elcin, Y. M., Dixit, V., & Gitnick, G. (2001). Extensive *in vivo* angiogenesis from the controlled release of human vascular endothelial cell growth factor: implications for tissue engineering and wound healing. *Artificial Organs*, 25(7), 558–565.
- 81 Riegler, J., Gillich, A., Shen, Q., Gold, J. D., & Wu, J. C. (2014). Cardiac tissue slice transplantation as a model to assess tissue-engineered graft thickness, survival, and function. *Circulation*, 130(11 Suppl 1), S77–S86.
- 82 Seif-Naraghi, S. B., Singelyn, J. M., Salvatore, M. A., Osborn, K. G., Wang, J. J., Sampat, U., et al. (2013). Safety and efficacy of an injectable extracellular matrix hydrogel for treating myocardial infarction. *Science Translational Medicine*, 5(173), 10.

- 83 Singelyn, J. M., Sundaramurthy, P., Johnson, T. D., Schup-Magoffin, P. J., Hu, D. P., Faulk, D. M., et al. (2012). Catheter-deliverable hydrogel derived from decellularized ventricular extracellular matrix increases endogenous cardiomyocytes and preserves cardiac function post-myocardial infarction. *Journal of the American College of Cardiology*, 59(8), 751–763.
- 84 Eitan, Y., Sarig, U., Dahan, N., & Machluf, M. (2010). Acellular cardiac extracellular matrix as a scaffold for tissue engineering: *in vitro* cell support, remodeling, and biocompatibility. *Tissue Eng Pt C-Meth*, 16(4), 671–683.
- 85 Lin, Y. D., Yeh, M. L., Yang, Y. J., Tsai, D. C., Chu, T. Y., Shih, Y. Y., et al. (2010). Intramyocardial peptide nanofiber injection improves postinfarction ventricular remodeling and efficacy of bone marrow cell therapy in pigs. *Circulation*, 122(11 Suppl), S132–S141.
- 86 Zimmermann, W. H., Melnychenko, I., Wasmeier, G., Didié, M., Naito, H., Nixdorff, U., et al. (2006). Engineered heart tissue grafts improve systolic and diastolic function in infarcted rat hearts. *Nature Medicine*, 12, 452–458.
- 87 Christman, K. L., Vardanian, A. J., Fang, Q., Sievers, R. E., Fok, H. H., & Lee, R. J. (2004). Injectable fibrin scaffold improves cell transplant survival, reduces infarct expansion, and induces neovasculation formation in ischemic myocardium. *Journal of the American College of Cardiology*, 44(3), 654–660.
- 88 Shimizu, T., Yamato, M., Isoi, Y., Akutsu, T., Setomaru, T., Abe, K., et al. (2002). Fabrication of pulsatile cardiac tissue grafts using a novel 3-dimensional cell sheet manipulation technique and temperature-responsive cell culture surfaces. *Circulation Research*, 90(3), e40.
- 89 Haraguchi, Y., Shimizu, T., Sasagawa, T., Sekine, H., Sakaguchi, K., Kikuchi, T., et al. (2012). Fabrication of functional three-dimensional tissues by stacking cell sheets *in vitro*. *Nature Protocols*, 7(5), 850–858.
- 90 Matsuura, K., Utoh, R., Nagase, K., & Okano, T. (2014). Cell sheet approach for tissue engineering and regenerative medicine. *Journal of Controlled Release*, 190, 228–239.
- 91 Sawa, Y., Miyagawa, S., Sakaguchi, T., Fujita, T., Matsuyama, A., Saito, A., et al. (2012). Tissue engineered myoblast sheets improved cardiac function sufficiently to discontinue LVAS in a patient with DCM: report of a case. *Surgery Today*, 42(2), 181–184.
- 92 Miyahara, Y., Nagaya, N., Kataoka, M., Yanagawa, B., Tanaka, K., Hao, H., et al. (2006). Monolayered mesenchymal stem cells repair scarred myocardium after myocardial infarction. *Nature Medicine*, 12(4), 459–465.
- 93 Farouz Y, Chen Y, Terzic A, Menasche P. Growing hearts in the right place: on the design of biomimetic materials for cardiac stem cell differentiation, *Stem Cells* 2014; doi:10.1002/stem.1929. [Epub ahead of print].
- 94 Qian, L., Huang, Y., Spencer, C., Foley, A., Vedantham, V., Liu, L., et al. (2012). *In vivo* reprogramming of murine cardiac fibroblasts into induced cardiomyocytes. *Nature*, 485(7400), 593–598.
- 95 Song, K., Nam, Y. J., Luo, X., Qi, X., Tan, W., Huang, G. N., et al. (2012). Heart repair by reprogramming non-myocytes with cardiac transcription factors. *Nature*, 485(7400), 599–604.
- 96 Wang, L., Liu, Z., Yin, C., Asfour, H., Chen, O., Li, Y., et al. (2015). Stoichiometry of Gata4, Mef2c, and Tbx5 influences the efficiency and quality of induced cardiac myocyte reprogramming. *Circulation Research*, 116, 237–244.
- 97 Jayawardena, T. M., Finch, E. A., Zhang, L., Zhang, H., Hodgkinson, C. P., Pratt, R. E., et al. (2015). MicroRNA induced cardiac reprogramming *in vivo*. Evidence for mature cardiac myocytes and improved cardiac function. *Circulation Research*, 116, 418–424.