

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**ADİPOZ MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN DAMAR DÜZ KAS
HÜCRELERİNE FARKLILAŞTIRILMASI VE DAMAR DOKU
MÜHENDİSLİĞİNDE KULLANIMI**

Yavuz Emre ARSLAN

KİMYA ANABİLİM DALI

**ANKARA
2013**

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Doktora Tezi

ADİPOZ MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN DAMAR DÜZ KAS HÜCRELERİNE
FARKLILAŞTIRILMASI VE DAMAR DOKU MÜHENDİSLİĞİNDE KULLANIMI

Yavuz Emre ARSLAN

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Y. Murat ELÇİN

İnsan adipoz mezenkimal kök hücreleri adipoz dokudan izole edilip immünotiplemesi yapılmış ve çeşitli büyüme faktörleri/kemokinler kullanılarak damar düz kas benzeri hücrelere ve damar endotel benzeri hücrelere farklılaştırılmış ve farklılaşma immünohistokimyasal olarak belirlenmiştir. Bu işlemin ardından 3 boyutlu doku mühendisliği damar greftinin (3B-DMDG'nin) lümen kısmı Poli-ε-kaprolakton'dan elektro-eğirme tekniği kullanılarak üretilmiştir. 3B-DMDG'nin *medya* ve *adventisya* tabakalarını oluşturmak amacı ile tip I kollajen ve elastinden gözenekli süngerimsi iskeleler elde edilmiştir. Üretilen 3B-DMDG'nin biyomekanik özellikleri ise mekanik test cihazı ile belirlenmiştir. Farklılaştırılmış hücre hatları statik ve dinamik koşullar altında iskelelerin üzerine/içine ekilmiş ve hücre canlılığı (MTT testi), tutunma/çoğalma (SEM analizi) ve protein ifadesi (immünohistokimya) gibi temel fizyolojik davranışlar incelenmiş ve sonuç olarak intima, medya ve adventisya tabakaları oluşturulmuştur (*Patent Başvurusu: TPE 2012/01600*).

Mayıs 2013, 128 sayfa

Anahtar Kelimeler: Damar doku mühendisliği, adipoz mezenkimal kök hücreler, biyomalzemeler, farklılaştırma, büyüme faktörleri, düz kas hücreleri, endotel hücreler, elektro-eğirme, nano/mikro lif, süngerimsi iskele, biyoreaktör, rejeneratif tıp.

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

DIFFERENTIATION OF ADIPOSE MESENCHYMAL STEM CELLS TO VASCULAR SMOOTH MUSCLE CELLS AND THEIR USE IN VASCULAR TISSUE ENGINEERING

Yavuz Emre ARSLAN

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Science
Department of Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. Y. Murat ELÇİN

Human adipose-derived mesenchymal stem cells were isolated, performed immunophenotypic analysis, and differentiated into smooth muscle *like* cells and endothelial *like* cells by using various growth factors/chemokines and differentiation were determined by using immunohistochemistry. Following this step, lumen layer of 3-Dimensional tissue engineered vascular graft (3D-TEVG) was fabricated from poly- ϵ -caprolactone by using electrospinning technique. To produce *media* and *adventitia* layers of 3D-TEVG, porous and spongy scaffolds were prepared from collagen type I and elastin. Bio-mechanical properties of fabricated 3D-TEVG were performed by using uniaxial tensile test. Differentiated cell lines were seeded outer/inner of the scaffolds under static and dynamic conditions and, basic physiological properties such as cell viability (MTT test), adhesion/growth (SEM analysis) and protein expression were determined and in conclusion *intima*, *media* and *adventitia* layers were created. (Patent Application: TPE 2012/01600).

May 2013, 128 pages

KeyWords: Vascular tissue engineering, adipose-derived mesenchymal stem cells, biomaterials, differentiation, growth factors, smooth muscle cells, endothelial cells, electrospinning, nano/micro fibers, spongy scaffolds, bioreactor, regenerative medicine.

TEŞEKKÜR ve ÖNSÖZ

Bana bu tez konusunu veren, çalışmalarımı yönlendiren, araştırmalarımın her aşamasında bilgi, öneri ve yardımlarını esirgemeyerek akademik ortamda olduğu kadar beşeri ilişkilerde de engin fikirleriyle yetişmeme ve gelişmeme katkıda bulunan danışman hocam sayın Prof. Dr. Y. Murat ELÇİN'e (Kök Hücre Enstitüsü),

İmmün/histokimya çalışmalarındaki yardımları için Prof. Dr. A. Eser ELÇİN'e (Kök Hücre Enstitüsü),

Desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen nişanlım Tuğba SEZGİN'e ve Aileme en derin duygularıyla teşekkür ederim.

Bu tez çalışması, **TÜBİTAK 111M336** numaralı proje ile desteklenmiştir.

Çalışmaların bir bölümü, **TPE 2012/01600** numaralı patent başvurusu kapsamındadır.

Yavuz Emre ARSLAN

ANKARA, Mayıs 2013

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR ve ÖNSÖZ.....	iii
SİMGELER DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER	4
2.1 Kök Hücreler.....	4
2.1.1 Kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücreler	6
2.1.2 Adipoz kaynaklı mezenkimal kök hücreler	7
2.2 Doku Mühendisliği	8
2.3 Doku Mühendisliğinde Kullanılan Polimerler	10
2.4 Elektro-eğirme Tekniği.....	14
2.5 Damarın Yapısı	15
2.5.1 Damar düz kas hücreleri.....	16
2.5.2 Damar endotel hücreleri	17
2.6 Kalp ve Damar Hastalıkları.....	20
2.7 By-Pass Ameliyatlarında Kullanılan Damar Yedekleri.....	23
2.8 Damar Doku Mühendisliğindeki Uygulamalar	26
3. MATERYAL ve YÖNTEM	40
3.1 Materyal	40
3.2 Yöntem	42
3.2.1 İnsan adipoz mezenkimal kök hücrelerin izolasyonu	42
3.2.1.1 iAMKH'lerin kültürü	43
3.2.1.2 iAMKH'lerin akım sitometri çalışmaları / kök hücre fenotipinin belirlenmesi	44
3.2.2 İnsan göbek bağı ve iç meme arteri düz kas hücrelerinin izolasyonu	45
3.2.2.1 iGBADKH'nin ve iMADKH'lerinin kültürü	45
3.2.3 iAMKH'lerin damar düz kas benzeri hücrelere farklılaşması	46
3.2.3.1 DDKbH'lerin immünojenotipik karakterizasyonu	47

3.2.4 İnsan iç meme arteri endotel hücrelerin izolasyonu	47
3.2.4.1 iİMAEH'lerin kültürü.....	48
3.2.5 iAMKH'lerin damar endotel benzeri hücrelere farklılaşması	48
3.2.5.1 DEbH'lerin immünofenotipik karakterizasyonu	49
3.2.6 Elektro-eğirme işlemi	49
3.2.7 Çok katlı hibrit damar doku mühendisliği iskelesinin hazırlanması	50
3.2.8 Hücrelerin proliferasyon kapasitesinin belirlenmesi	51
3.2.9 DEbH'lerin nano/mikro lifsi PCL tabaka üzerine ekimi.....	52
3.2.10 DDKbH'lerin gözenekli kollajen/elastin süngerimsi iskeleye ekilmesi.....	52
3.2.11 Güçlendirilmiş-Elastin/Kollajen/PCL çok katlı tübüler iskele üretimi.....	53
3.2.12 İskelelerin biyomekaniksel özelliklerinin incelenmesi	53
3.2.13 DDKbH'lerin ve DEbH'lerin Elastin/Kollajen/PCL çok katlı tübüler iskelesi üzerine ekimi (statik çalışmalar)	53
3.2.14 Gerçek zamanlı akış-basınç ölçümlü perfüzyon biyoreaktör sistemin kurulması ve damar hücre hatlarının 3B-DMDG'ne ekimi (dinamik çalışmalar)	54
3.2.15 İmmün/histokimya çalışmaları (statik ve dinamik çalışmalar)	55
4. BULGULAR.....	56
4.1 iAMKH'lerin Kültürü.....	56
4.1.1 Akım sitometri sonuçları.....	56
4.2 iGBADKH'nin ve iİMADKH'nin İzolasyonu ve Kültürü	57
4.3 iAMKH'lerin DDKbH'lere Farklılaşması.....	58
4.4 iAMKH'lerin DEbH'lere Farklılaşması.....	66
4.5 Farklılaşmanın Hücre Morfolojisi Üzerine Etkisi	69
4.6 Elektro-eğirme İşlemi	72
4.7 Çok Katlı Hibrit Damar Doku Mühendisliği İskelesinin Hazırlanması	76
4.8 Hücrelerin Proliferasyon Kapasitesinin Belirlenmesi.....	77
4.9 DEbH'lerin Nano/Mikro Lifsi PCL Tabaka Üzerine Ekimi	80
4.10 DDKbH'lerin Gözenekli Kollajen/Elastin Süngerimsi İskele Üzerine Ekimi	82
4.11 Güçlendirilmiş-Elastin/Kollajen/PCL Çok Katlı Tübüler İskele Üretimi.....	83
4.12 İskelelerin Biyomekaniksel Özelliklerinin İncelenmesi	84

4.13 DDKbH'lerin ve DEbH'lerin Elastin/Kollajen/PCL Çok Katlı Tübüler İskelesi Üzerine Ekimi (Statik Çalışmalar).....	91
4.14 Gerçek Zamanlı Akış-Basınç Ölçümlü Perfüzyon Biyoreaktör Sistemin Kurulması ve Damar Hücre Hatlarının 3B-DMDG'ne Ekimi (Dinamik Çalışmalar).....	92
4.15 İmmün/histokimya Çalışmaları 1 (Statik Çalışmalar).....	97
4.16 İmmün/histokimya Çalışmaları 2 (Dinamik Çalışmalar)	104
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	110
KAYNAKLAR.....	117
ÖZGEÇMİŞ	128

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

PCL	Poli-ε-kaprolakton
iAMKH	İnsan adipoz kaynaklı mezenkimal kök hücre
DDKbH	Damar düz kas benzeri hücre
DEbH	Damar endotel benzeri hücre
iGBADKH	İnsan göbek bağı arteri düz kas hücresi
iİMADKH	İnsan iç meme arteri düz kas hücresi
iİMAEH	İnsan iç meme arteri endotel hücresi
iGBA	İnsan göbek bağı arteri
iGB	İnsan göbek bağı
TGFβ1	Dönüşüm büyüme faktörü beta 1
BMP4	Kemik morfogenetik proteini 4
Ang II	Angiotensin II
EGM-2	Endotel çoğaltma besi yeri 2
rh-VEGF	Rekombinant insan damar endotel büyüme faktörü
αSMA	Alfa düz kas aktini
CALP	Kalponin
CADL	Kaldesmon, L
CADH	Kaldesmon, H
MY-HC	Ağır zincirli miyozin
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
MKH	Mezenkimal kök hücre
3B-DMDG	3 boyutlu doku mühendisliği damar grefti
ePTFE	Genişletilmiş poli(tetrafloretilen)

PU	Poliüretan
NO	Nitrik oksit
KHÇV	Kök hücre çoğaltma besi yeri
DKHÇV	Düz kas hücresi çoğaltma besi yeri
zDKHÇV	Zenginleştirilmiş düz kas hücresi çoğaltma besi yeri
EHÇFV	Endotel hücre çoğaltma ve farklılaştırma besi yeri
DKK	Doku kültür kabı
NK	Negatif kontrol
PK	Pozitif kontrol
H&E	Hematoksilin ve Eosin
PBS	Sodyum klorür içeren fosfat tamponu
FBS	Fetal buzağı serumu
m/v	Kütle/hacim
kV	Kilo volt
nm	nanometre
µm	mikrometre
UV	Mor ötesi

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Kök hücelere genel bir bakış	4
Şekil 2.2 Kök hücre plastitisesi	5
Şekil 2.3 Kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin plastitisesi.....	6
Şekil 2.4 Adipoz mezenkimal kök hücrelerin çoklu soy farklılaşma potansiyeli	7
Şekil 2.5 Doku mühendisliği yaklaşımı	9
Şekil 2.6 ϵ -kaprolaktonun halka açılma polimerizasyonu	11
Şekil 2.7 Elastin lif oluşumunun şematik gösterimi	12
Şekil 2.8 Kollajen liflerin biyo-sentezi	13
Şekil 2.9 Elektro-eğirme sistemi	14
Şekil 2.10 Orta ölçekli musküler arterin yapısı.....	15
Şekil 2.11 Kalp ve damar hastalıkları istatistikleri.....	21
Şekil 2.12 Erkeklerde kalp ve damar hastalıkları sonucu oluşan ölüm oranlarının küresel dağılımını gösteren dünya haritası	22
Şekil 2.13 Kadınlarda kalp ve damar hastalıkları sonucu oluşan ölüm oranlarının küresel dağılımını gösteren dünya haritası	22
Şekil 3.1 İnsan adipoz dokusundan hücre izolasyonu	43
Şekil 3.2 Nano/mikro lifsi tabaka ve tübüler iskele üretiminde kullanılan elektro eğirme düzeneğinin şematik gösterimi.....	50
Şekil 3.3 MTT reaktifinin mitokondri tarafından formazana indirgenme reaksiyonu	51
Şekil 4.1 İzolasyonlar sonrası kültürlerin inversiyon mikroskobu görüntüleri.....	58
Şekil 4.2 Damar düz kas hücresi kültürlerinin inversiyon mikroskobu görüntüleri.....	59
Şekil 4.3 7 gün boyunca kültüre edilen hücrelerin insana karşı farede üretilen α SMA, MY-HC, CALP, CADL ve CADH birincil antikorları ile boyanmasının ışık mikroskobu görüntüsü	60
Şekil 4.4 7 gün boyunca büyüme faktörleri ile muamele edilen hücrelerin insana karşı farede üretilen α SMA, MY-HC, CALP, CADL ve CADH birincil antikorları ile boyanmasının ışık mikroskobu görüntüsü	61

Şekil 4.5 7 gün boyunca büyüme faktörleri ve/veya kemokinle muamale edilen hücrelerin insana karşı farede üretilen α SMA, MY-HC, CALP, CADL ve CADH birincil antikorları ile boyanmasının mikroskobu görüntüsü	62
Şekil 4.6 14 gün boyunca kültüre edilen hücrelerin insana karşı farede üretilen α SMA, MY-HC, CALP, CADL ve CADH birincil antikorları ile boyanmasının ışık mikroskobu görüntüsü	63
Şekil 4.7 14 gün boyunca büyüme faktörleri ile muamale edilen hücrelerin insana karşı farede üretilen α SMA, MY-HC, CALP, CADL ve CADH birincil antikorları ile boyanmasının ışık mikroskobu görüntüsü.....	64
Şekil 4.8 14 gün boyunca büyüme faktörleri ve/veya kemokinle muamele edilen hücrelerin insana karşı farede üretilen α SMA, MY-HC, CALP, CADL ve CADH birincil antikorları ile boyanmasının ışık mikroskobu görüntüsü.....	65
Şekil 4.9 İzolasyon ve indüksiyon sonrası kültürlerin inversiyon mikroskobu görüntüleri.....	66
Şekil 4.10 7 gün boyunca farklı oranlarda VEGF içeren EGM-2 Bullet Kit ile kültüre edilen hücrelerin insana karşı farede üretilen CD31, CD34, CD144, Tie-2, vWF ve Flk-1 birincil antikorları ile boyanmasının ışık mikroskobu görüntüsü.....	67
Şekil 4.11 14 gün boyunca farklı oranlarda VEGF içeren EGM-2 Bullet Kit ile kültüre edilen hücrelerin insana karşı farede üretilen CD31, CD34, CD144, Tie-2, vWF ve Flk-1 birincil antikorları ile boyanmasının ışık mikroskobu görüntüsü	68
Şekil 4.12 İnsan iç meme arterinden izole edilen endotel hücrelerin inversiyon mikroskobu görüntüleri.....	69
Şekil 4.13 Farklı hücre tiplerinin inversiyon mikroskobu görüntüleri	70
Şekil 4.14 Farklı hücre tiplerinin inversiyon mikroskobu görüntüleri	71
Şekil 4.15 Uygulanan gerilimin PCL nano/mikro lif oluşumuna etkisi [(%10'luk (m/v) PCL ile)]	72
Şekil 4.16 Enjeksiyon hızının nano/mikro lif oluşumuna etkisi [(28 kV ve %10'luk (m/v) PCL şartlarında)]	73
Şekil 4.17 Enjektör iğnesi iç çapının PCL nano/mikro lif oluşum yüzdesine olan etkisi [(28 kV ve %10'lık (m/v) PCL şartlarında)]	74
Şekil 4.18 PCL derişiminin elektroğirme işleminde nanolif oluşumuna etkisi (28 kV'da).....	74
Şekil 4.19 Elektroğirme tekniğiyle elde edilen ve değişken lif çaplarına sahip tabakaların taramalı elektron mikroskobu görüntüleri	75

Şekil 4.20 Hazırlanan iskelelerin elektron mikroskobu görüntüleri.....	76
Şekil 4.21 Hücre canlılığının grafiksel gösterimi. iAMKH'lerinin doku kültür kabında (DKK), DEbH'lerin DDK, DDKbH'lerin DKK, DEbH'lerin PCL Nanolif üzerinde ve DDKbH'lerin süngerimsi iskele içinde 1, 3, 7 ve 14 gün boyunca çoğalması.....	77
Şekil 4.22 DKK çoğalan iAMKH'lerin MTT boyamalarının inversiyon mikroskobu görüntüleri (1, 3, 7 ve 14. günler)	78
Şekil 4.23 DKK ve nano lif üzerinde çoğalan DEbH'lerin MTT boyamalarının inversiyon mikroskobu görüntüleri (1, 3, 7 ve 14. günler)	79
Şekil 4.24 DKK ve süngerimsi iskele içerisinde çoğalan DDKbH'lerin MTT boyamalarının inversiyon mikroskobu görüntüleri (1, 3, 7 ve 14. günler)...	80
Şekil 4.25 DEbH'ler ekilmiş PCL tabakaların taramalı elektron mikroskobu görüntüleri.....	81
Şekil 4.26 DDKbH'ler ekilmiş çapraz elastin/kollajen süngerimsi iskelelerin elektron mikroskobu görüntüleri	82
Şekil 4.27 Güçlendirilmiş-Elastin/Kollajen/PCL çok katlı tübüler iskelesi.....	83
Şekil 4.28 Nano/mikro lifsi PCL tübe ait Gerilim (kPa) / Yüzde Uzama eğrileri (n=3)	84
Şekil 4.29 Kuru formda Elastin/Kollajen/PCL tübe ait Gerilim (kPa) / Yüzde Uzama eğrileri (n=3).....	85
Şekil 4.30 Islak formda Elastin/Kollajen/PCL tübe ait Gerilim (kPa) / Yüzde Uzama eğrileri (n=3).....	86
Şekil 4.31 Kuru formda Güçlendirilmiş-Elastin/Kollajen/PCL tübe ait Gerilim (kPa) / Yüzde Uzama eğrileri (n=3).	87
Şekil 4.32 Islak formda Güçlendirilmiş-Elastin/Kollajen/PCL tübe ait Gerilim (kPa) / Yüzde Uzama eğrileri (n=3)	88
Şekil 4.33 iGBA'ne ait Gerilim (kPa) / Yüzde Uzama eğrileri (n=3)	89
Şekil 4.34 iGBA'nin makroskobik görüntüsü	90
Şekil 4.35 DEbH'ler ekilmiş 3B-DMDG'nin elektron mikroskobu görüntüleri.....	91
Şekil 4.36 DDKbH'ler ekilmiş 3B-DMDG'nin elektron mikroskobu görüntüleri	92
Şekil 4.37 Perfüzyon/Sensör Ünitesine genel bir bakış	93
Şekil 4.38 Veri Kayıt ve İşlem Ünitesi	93
Şekil 4.39 Biyoreaktör Ünitesi	94

Şekil 4.40 21 gün boyunca dinamik koşullarda tutulan DDKbH'ler ve DEbH'ler ekili 3B-DMDG'nin elektron mikroskobu görüntüleri.....	96
Şekil 4.41 3, 7, 14 ve 21 gün boyunca 3B-DMDG içinde/üzerinde statik olarak ekilip kültüre edilen DEbH'lerin insana karşı farede üretilen CD31, CD34, CD144, Tie-2, vWF, Flk-1 birincil antikorları ve ilave olarak H&E ile boyanmasının ışık mikroskobu görüntüsü	98
Şekil 4.42 3, 7, 14 ve 21 gün boyunca 3B-DMDG içinde/üzerinde statik olarak ekilip kültüre edilen DDKbH'lerin insana karşı farede üretilen α SMA, MY-HC, CALP, CADL ve CADH birincil antikorları ve ilave olarak H&E ile boyanmasının ışık mikroskobu görüntüsü	100
Şekil 4.43 3, 7, 14 ve 21 gün boyunca 3B-DMDG içinde/üzerinde statik olarak ekilip kültüre edilen iAMKH'lerin insana karşı farede üretilen CD31, CD34, CD144, Tie-2, vWF, Flk-1 birincil antikorları ve ilave olarak H&E ile boyanmasının ışık mikroskobu görüntüsü	102
Şekil 4.44 3, 7, 14 ve 21 gün boyunca 3B-DMDG içinde/üzerinde statik olarak ekilip kültüre edilen iAMKH'lerin insana karşı farede üretilen α SMA, MY-HC, CALP, CADL ve CADH birincil antikorları ve ilave olarak H&E ile boyanmasının ışık mikroskobu görüntüsü	103
Şekil 4.45 11 gün boyunca biyoreaktör sisteminde 3B-DMDG'nin lümen kısmına dinamik koşullar altında ekilip kültüre edilen DEbH'lerin insana karşı farede üretilen CD31, CD34, CD144, Tie-2, vWF, Flk-1 birincil antikorları ve ilave olarak H&E ile boyanmasının ışık mikroskobu görüntüsü.....	106
Şekil 4.46 21 gün boyunca biyoreaktör sisteminde 3B-DMDG'nin medya ve adventisya tabakalarına statik olarak ekilip dinamik koşullarda kültüre edilen DDKbH'lerin insana karşı farede üretilen α SMA, MY-HC, CALP, CADL CADH birincil antikorları ve ilave olarak H&E ile boyanmasının ışık mikroskobu görüntüsü	109

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Vücut bölgesine göre klinikte kullanılan damar greftleri	24
Çizelge 2.2 Klinikte kullanılan biyolojik damar greftleri	25
Çizelge 4.1 iAMKH'lerin yüzey antijen paneli ve elde edilen bulgular.....	57
Çizelge 4.2 Nano/mikro lifsi yapıya sahip PCL tübe ait veriler (n=3)	84
Çizelge 4.3 Kuru formda Elastin/Kollajen/PCL tübe ait veriler (n=3).....	85
Çizelge 4.4 Islak formda Elastin/Kollajen/PCL tübe ait veriler (n=3)	86
Çizelge 4.5 Kuru formda Güçlendirilmiş-Elastin/Kollajen/PCL tübe ait veriler (n=3).....	87
Çizelge 4.6 Islak formda Güçlendirilmiş-Elastin/Kollajen/PCL tübe ait veriler (n=3).....	88
Çizelge 4.7 iGBA'ne ait veriler (n=3)	89
Çizelge 4.8 Biyomekanik test sonuçlarının toplu gösterimi	90
Çizelge 4.9 0-2. günler arasında sistemde ölçülen akış (ml/dakika) ve basınç (mmHg) değerleri	95
Çizelge 4.10 2-4. günler arasında sistemde ölçülen akış (ml/dakika) ve basınç (mmHg) değerleri	95
Çizelge 4.11 4-6. günler arasında sistemde ölçülen akış (ml/dakika) ve basınç (mmHg) değerleri	95

1. GİRİŞ

Kalp ve damar hastalıkları, özellikle arterioskleroz-kaynaklı koroner kalp hastalıkları, dünyada başta gelen ölüm nedenidir. Açık damar cerrahisi alanında halen kullanılmakta olan otolog greftler, sentetik protez greftler veya allogreftlerin, özellikle küçük-orta çaptaki damarların değişiminde, bazı yetersizlikleri ve/veya sınırlamaları bulunmaktadır. Doku mühendisliği yaklaşımıyla oluşturulacak damar greftlerinin, yeni bir rejeneratif tedavi seçeneği olma potansiyeli vardır. Ancak, oluşturulacak yapıların kendini yenileme, yeniden-modellenme ve yeterli mekanik özelliklere sahip olma şansının artması için, damarın *in vivo* şartlarda karşı karşıya kaldığı mekanik ve biyolojik sinyalizasyon ortamının *in vitro*da taklit edilmesi zorunludur.

Kök hücrelere dayalı rejeneratif tıbbın, mevcut geleneksel tedavilerde karşılaşılan sorunlara önemli çözümler getirmesi beklenmektedir. Son yıllarda uygulamaları giderek artan kök hücrelerin, damar grefti mühendisliği alanında da değerlendirilmesi konusu gündemdedir. Bu bağlamda, adipoz dokudan kolayca ve bol miktarda temin edilebilen mezenkimal kök hücrelerle yapılacak damar doku mühendisliği çalışmalarının bu sürecin gelişimine katkı sağlaması beklenmektedir.

Bu çalışmada, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurul izni ve hasta bilgilendirilmiş onamı kapsamında 1 Mart 2010 tarih ve 08-129 sayılı kararını takiben, uygun donörlerden uzman hekimlerin yardımı ile lipoektomi işlemi yapılmıştır. Çıkartılan yağ dokusu uygun taşıyıcı tamponlar ile laboratuvara getirilmiş ve adipoz kaynaklı mezenkimal kök hücreler izole edilmiştir. Pasaj 2-5 arasında çoğaltılmış insan adipoz kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin (iAMKH'lerin) floresan-aktifleşmiş hücre ayırma (fluorescence activated cell sorting; FACS) analizleri yapılmıştır. Bu işlem için CD29-FITC, CD90-PE, CD73-PE, CD34-FITC, HLA_ABC-PE, HLA_DR-FITC, CD166-PE, CD105-PE, CD133-PE, CD3-FITC, CD31-FITC, CD146-PE, CD45-FITC ve CD44-PE gibi antikorlar seçilmiştir.

Fenotipi belirlenmiş kök hücreler farklı bileşimlerde dönüşüm büyüme faktörü 1 (TGF β 1), kemik morfogenetik proteini 4 (BMP4) ve Angiotensin II (Ang II) gibi büyüme faktörleri ve kemokin kullanılarak damar düz kas benzeri hücrelere (DDKbH'lere) farklılaştırılmıştır. Bu işleme paralel olarak kök hücreler EGM-2 Bullet Kit ve farklı oranlarda rekombinant insan damar endotel büyüme faktörü (rh-VEGF) kullanılarak damar endotel benzeri hücrelere (DEbH'lere) farklılaştırılmıştır.

Farklılaşma immün/histokimya teknikleri ile karakterize edilmiştir. Belirli zaman noktalarında tesbit edilen DDKbH'ler alfa düz kas aktini (α SMA), kalponin (CALP), H-kaldesmon (CADH), L-kaldesmon (CADL) ve ağır zincirli miyozin (MY-HC) gibi immünhistokimya antikorları ile etkileştirilerek farklılaşma karakterize edilmiştir. Benzer şekilde tesbit edilen DEbH'leri CD31 (PECAM-1), CD34, VE-Cadherin (CD144), von Willebrand faktörü (vWF), Tie-2 ve Flk-1 (VEGF-R2) gibi endotel işaretçilerinin ifadelerindeki değişim incelenerek farklılaşma karakterize edilmiştir.

Hücre kültürü ve farklılaşma çalışmalarını takiben malzeme üretimine geçilmiş ve birinci aşama olarak poli- ϵ -kaprolakton (PCL)'dan elektro-eğirme tekniği yardımı ile tek tabaka ve tübüler yapıda nano/mikro lifsi örgüsel olmayan iskeleler elde edilmiştir. Elektro-eğirme tekniğinin parametreleri (*optimal polimer-çözücü sistemi, gerilim, pompa hızı vd.*) optimize edilmiştir. İkinci aşamada sodyum bikarbonat ile süspansiyon edilmiş elastin/kollajen hidrojelinden makro/mikro gözenekli yapıda süngerimsi iskeleler dondurarak-kurutma tekniği (DKT) kullanılarak üretilmiştir. Benzer şekilde hazırlanan süspansiyon nano/mikro lifsi tübüler formda PCL iskelenin çevresine dökülerek kalıplanmıştır. Oluşturan 3 boyutlu doku mühendisliği damar grefti (3B-DMDG) çapraz bağlanmış ve DKT yardımı ile son şeklini almıştır. Üretilen malzemelerin biyomekaniksel özellikleri tek yönlü çekme test cihazı ile morfolojik özellikleri ise taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile belirlenmiştir.

Üretilen malzemelere ve doku kültür kabına ekilmiş iAMKH'lerin, DDKbH'lerin ve DEbH'lerin hücre canlılığı mitokondriyal dehidrogenaz aktivite testi (MTT testi) ile belirlenmiştir.

İskelelerin içine/yüzeyine ekilen hücrelerin durgun koşullarda protein ifadelerinde meydana gelen değişimler immünohistokimya ile belirlenmiştir. İlave olarak malzeme içine/yüzeyine hücrelerin tutunması ve yayılması yine SEM analizleri ile karakterize edilmiştir.

Statik çalışmaları takiben dinamik koşullarda 3B-DMDG içine/yüzeyine kültüre edilen DDKbH'ler ve DEbH'ler ekilmiştir. DDKbH'ler iskelenin *medya* ve *adventisya* tabakalarına ekilirken DEbH'ler ise *intima* kısmına ekilmiştir. Sistemde oluşan akış ve basınç gerçek zamanlı olarak akış metreler ve basınç transdüserleri tarafından ölçülerek bir veri kayıt sistemi üzerinden bilgisayara aktarılmıştır. Belirlenen zaman noktasında tesbit edilen 3B-DMDG'nde hücre tutunması ve yönelmesi SEM analizleri ile dinamik koşullar altında protein ifadesindeki değişim ise immün/histokimya teknikleri ile karakterize edilmiştir.

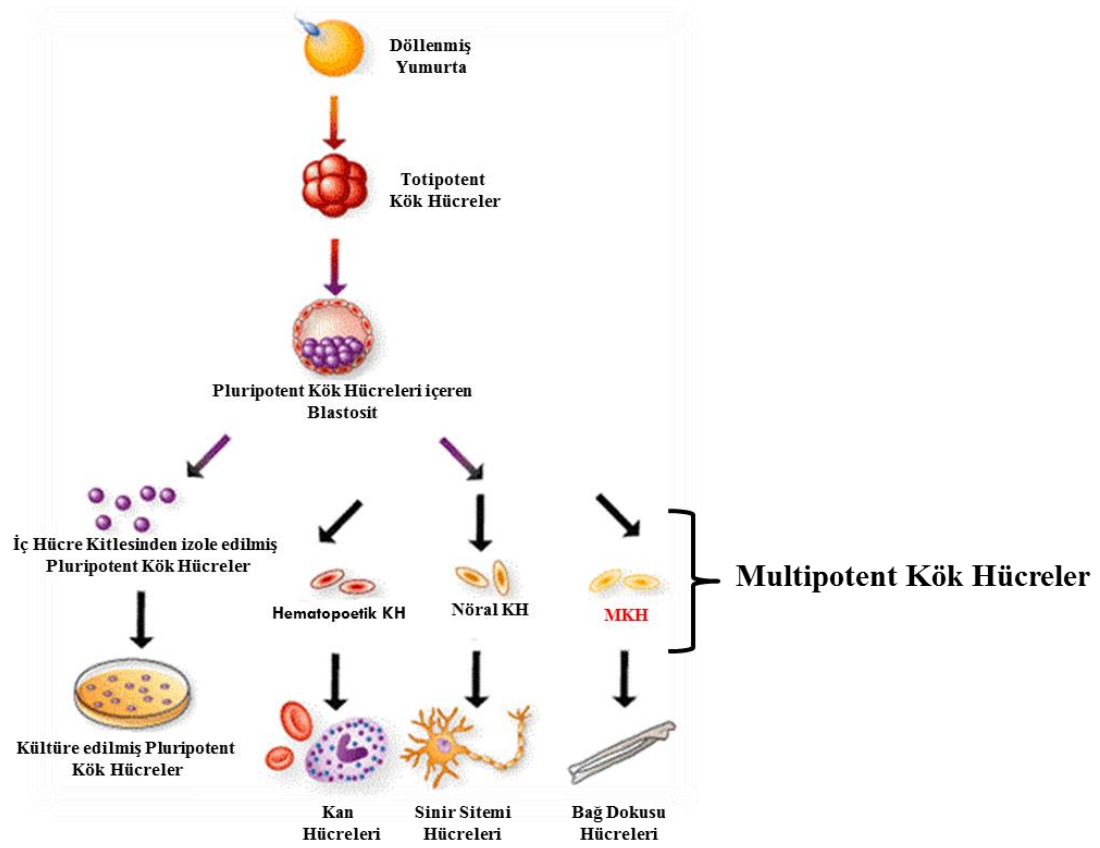
Elde edilen veriler ışığında iAMKH'ler laboratuvar koşullarında etkin bir şekilde DDKbH'lere ve DEbH'lere farklılaştırılmıştır. Biyouyumlu ve biyobozunur sentetik/doğal polimerlerden üretilen 3B-DMDG'nin yeterli biyomekaniksel özelliklere sahip olduğu belirlenmiştir. Dinamik koşullarda 3B-DMDG'ne ekilen hücre hatlarının 21. günün sonunda yapının *intima*, *medya* ve *adventisya* tabakalarını sararak kapattığı görülmüştür.

Son olarak, damar doku mühendisliği yaklaşımıyla geliştirilen 3B-DMDG'nin greftinin otolog kök hücrelerin kullanılacağı kişiye özgü tedavi yaklaşımı fikrini bir adım daha ileriye götürebileceği düşünülmektedir.

2. KURAMSAL TEMELLER

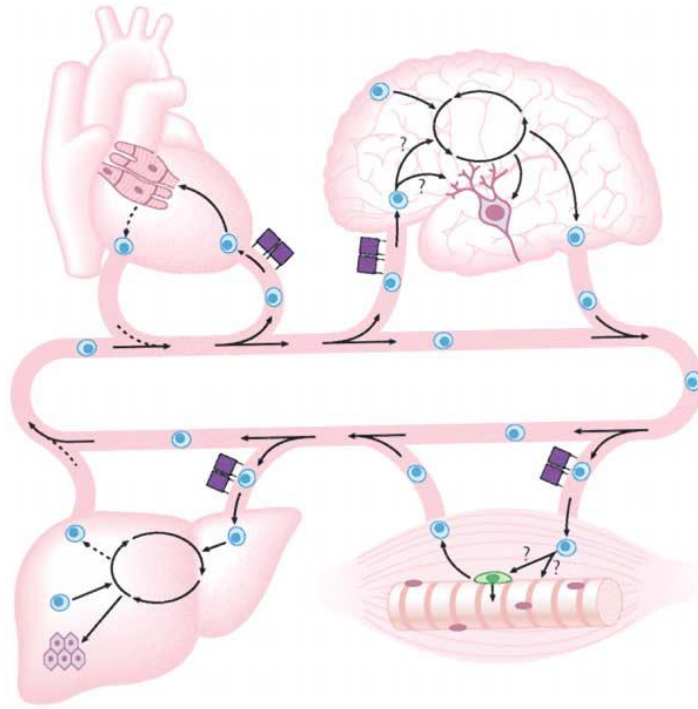
2.1 Kök Hücreler

Kök hücreler kendini yenileyebilen ve farklılaşma kabiliyetleri olan eşsiz hücre popülasyonlarıdır. Erişkin memeli dokularında bulunan kök hücreler “Erişkin Kök Hücreler” olarak adlandırılır ve sınırlı sayıda hücre tiplerine farklılaşabilmektedirler. Buna karşılık, “blastosist” veya “blastokist” aşamasındaki memeli embriyolarından elde edilen embriyonik kök hücreler tüm vücut hücrelerini oluşturma kapasitelerine sahiptirler. İlave olarak insan embriyonik kök hücreleri normal karyotipe sahip, yüksek telomeraz aktivitesini koruyan ve kültür koşullarında uzun vadeli proliferatif özellik sergileyen hücrelerdir (Odorico vd. 2001).



Şekil 2.1 Kök hücelere genel bir bakış (Chaudhry 2004)

Son yıllarda, doku ve organa özgün kök hücre kavramı yayınlanan birçok çalışmada ele alınmıştır. Bilim insanları yetişkin kök hücrelerin bulunduğu mikro çevreler (kök hücre nişi) tarafından düzenlendiğini ve sanılandan daha olağanüstü “plastisiteye” sahip olabileceklerini düşünmektedirler (Martin-Rendon ve Watt 2003). Kök hücre biyolojisinin ana dogması, belirli bir dokudan izole edilen hücrelerin kendini yenilemesi ve bulunduğu dokuda mevcut hücre hatlarına farklılaşabilmesi olmuştur. Birçok çalışmada dokuya özgü kök hücrelerin önemli plastisitelerinin olduğu ve diğer hücre hatlarına farklılaşabilecekleri gösterilmiştir (Lakshmipathy ve Verfaillie 2005).



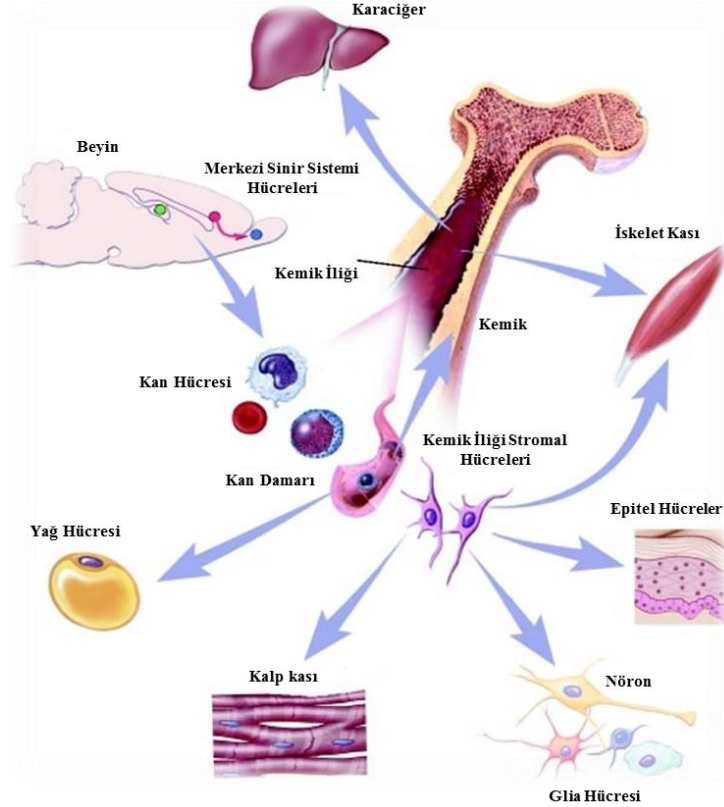
Şekil 2.2 Kök hücre plastitisesi (Blau vd. 2001)

Mezenkimal kök hücreler (MKH’ler) aynı embriyonik kök hücreler gibi çoklu potansiyele sahiptirler ve yağ hücresi, kıkırdak hücresi, kemik hücresi, tendon ve bağ dokusu, kas hücresi, deri hücresi ilave olarak da sinir hücrelerine *in vitro* ve *in vivo* koşullarda farklılaşabilme potansiyeline sahiptirler (Tuan vd. 2003). Embriyonik kök hücrelerin klinikte ve doku mühendisliği uygulamalarındaki kullanımıyla ilgili etik ve yasal itilaflardan ötürü, MKH’ler potansiyeli yüksek bir alternatif olarak karşımıza çıkmaktadır (Zuk vd. 2002).

Trabeküler kemik (Tuli vd. 2003), periosteum (De Bari vd. 2001), sinovyal membran (De Bari vd. 2001), kas (Bosch vd. 2000), dermis (Young vd. 2001), perisitler (Brighton vd. 1992), kan (Hattori vd. 2004), yağ dokusu (Rodriguez vd. 2004) ve kemik iliği (Kotobuki vd. 2004) erişkin mezenkimal kök hücre kaynağı olarak kullanılmaktadır.

2.1.1 Kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücreler

Kemik iliği kaynaklı MKH'lerin en önemli karakteristiği *in vivo* ve *in vitro* koşullarda birçok hücre tipine farklılaşabilme kapasitesine sahip olmalarıdır. Bu hücrelerin *in vitro* koşullarda çoğaltılması ilk olarak, kemirgen kemik iliği eksplantlarının tek hücre süspansiyonlarından izole edilen fibroblastoit hücrelerin doku kültür plastiklerine tutunabilme kabiliyetlerini gösteren Friedenstein ve çalışma arkadaşları tarafından 1970'lerde gerçekleştirilmiştir (Friedenstein vd. 1970).

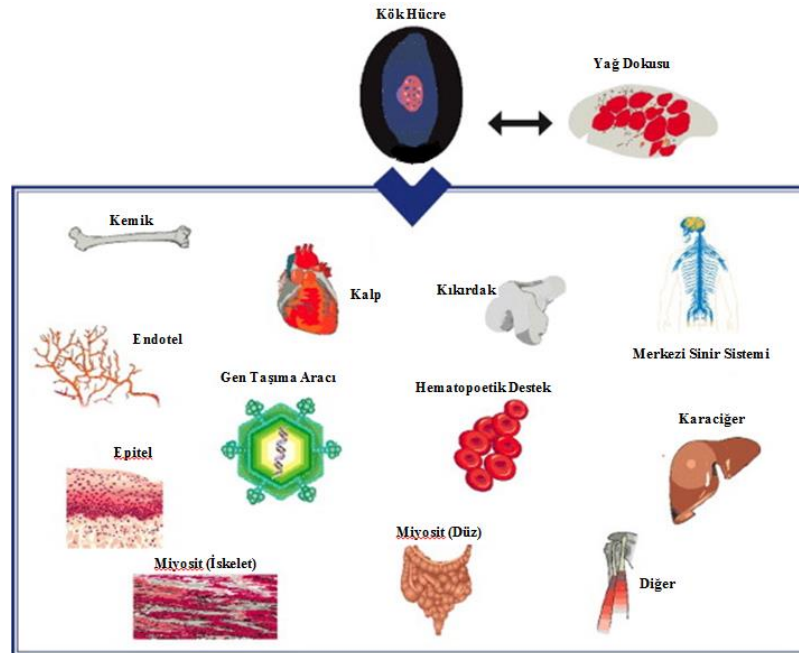


Şekil 2.3 Kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin plastitisesi (Winslow vd. 2001)

Morfolojik olarak MKH'ler iğsi formda kübik fibroblastik hücrelerdir ve kemik iliği aspiratında mevcut diğer hücrelerden ayırt edilmesi kolay değildir. Araştırmacılar MKH'leri ayırt etmek için iki strateji izlemektedirler. Bunlardan birincisi, MKH'lerin kültür plastiğine yapışma karakteristiğidir. Kemik aspiratında mevcut diğer hücre tipleri bu özelliği göstermezler. İkinci karakteristik özellikleri ise bazı özel yüzey antijenlerine pozitif olurken hematopoetik yüzey işaretçilerine negatif olmalarıdır (Wagner vd. 2005). MKH'ler CD105 (SH-2), CD166 (ALCAM), CD54 (ICAM-1), CD55, CD13 (APN), CD73 (SH-3, SH-4), CD90 (Thy-1) ve CD44 gibi yüzey işaretçilerine pozitif iken, CD34, CD45, CD14, CD31, CD133 ve CD50 gibi hematopoetik yüzey işaretçilerine negatiftir (Kassem 2004).

2.1.2 Adipoz kaynaklı mezenkimal kök hücreler

MKH'ler rejeneratif tıpta ve hücresel tedavi yaklaşımlarında ümit vaat etmektedir. Bu zamana kadar MKH'ler invazif işlemler aracılığı ile konvansiyonel olarak kemik iliğinden izole edilmiştir. Şimdilerde ise giderek artan bir ilgi ile adipoz doku ve kordon kanı gibi kaynaklardan izole edilebilmektedirler (Vishnubalaji vd. 2012).



Şekil 2.4 Adipoz mezenkimal kök hücrelerin çoklu soy farklılaşma potansiyeli (Bunnell vd. 2008)

İlave olarak yaşlanma, adipoz kaynaklı MKH'lere kemik iliği kaynaklı MKH'lere olduğundan daha az etki göstermektedir (Chen vd. 2012). Adipoz doku aynı kemik dokusu gibi embriyonun mezenkimal dokusundan köken alır ve kolay izole edilebilen bir stroma içermektedir. Terminolojide işlenmiş lipoaspirat hücreleri şeklinde adlandırılan bu hücre popülasyonu insan lipoaspiratlarından izole edilebilmekte ve aynı kemik iliği mezenkimal kök hücreleri gibi osteojenik, adipojenik, miyojenik ve kondrojenik soylara farklılaşabilmektedirler. İşlenmiş lipoaspirat hücreleri kemik iliği MKH'lerine benzer şekilde yüzey antijenlerini ifade etmektedirler. Akım sitometri analizlerine göre adipoz kaynaklı MKH'ler ile kemik iliği kaynaklı MKH'ler arasında iki CD işaretçisinin farklı olduğu görülmüştür. Bu işaretçiler CD49d ($\alpha 4$ integrin) ve CD106 (VCAM) olarak tespit edilmiştir. CD49d adipoz kaynaklı MKH'ler tarafından ifade edilirken aksine kemik iliği kaynaklı MKH'ler tarafından ifade edilmezler. CD106'nın ise kemik iliği kaynaklı MKH'ler tarafından ifade edildiği buna karşın adipoz kaynaklı MKH'ler tarafından ifade edilmediği yapılan analizler ile gösterilmiştir (Zuk vd. 2002).

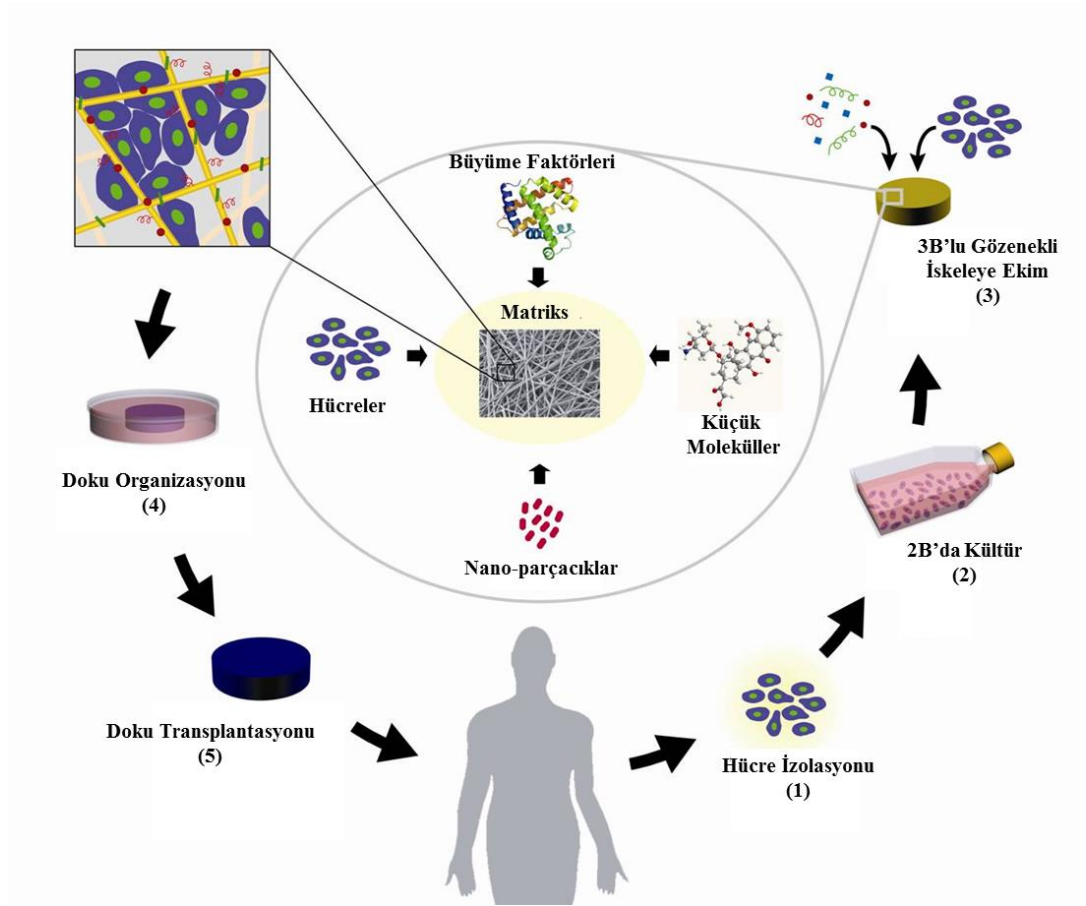
2.2 Doku Mühendisliği

Doku Mühendisliği, hastalıklı veya kaybedilmiş dokuların onarılması ya da değiştirilmesi amacıyla yeni biyolojik eşdeğerlerinin geliştirilmesini hedefleyen bir rejeneratif tıp alanıdır (Elçin 2003). Bu hücresel tedavi yaklaşımında, izole edilmiş hücreler *ex vivo* şartlarda üç boyutlu hücre dışı matriks molekülleriyle benzerlik taşıyan tasarlanmış yapı iskeleleri üzerine ekildikten sonra özel şartlar altında yeniden farklılaştırılarak çoğaltılmakta ve oluşan dokuya benzer yeni hibrit yapılar geri nakledilmektedir.

Organ yetmezliği veya doku kaybı yaşayan milyonlarca Amerikalıyı tedavi etmek için Birleşik Devletler'de yıllık 8 milyondan fazla cerrahi işlem yapılmaktadır (Lanza vd. 1997). Organ nakli ve rekonstrüksiyon cerrahisinin yaşam kalitesini arttırmasına ve bazı durumlarda hayat kurtarmasına rağmen bazı yetersizlikleri vardır. Çoğu durumda tedavi gören kişi ikincil bir cerrahi müdahaleye veya tekrar bir doku nakline ihtiyaç duyabilmektedir. Organ naklindeki en büyük problem ise uygun ve yeterli sayıda

donörün bulunamamasıdır. 1996 yılında 50.000 hasta için sadece 20.000 organ kullanılabilir durumdaydı.

Gerçekte, uygun kalp donörü bekleyen hastaların kalp transplantasyonunun ilk iki yılında olan hastalara göre ölme ihtimalleri daha yüksektir. İlave olarak organ transplantasyonunu bekleyen hastalarda oluşan ağrı ve hastalıklar ise ikincil riskleri oluşturmaktadır. Bu problemlerin bir sonucu olarak doku mühendisliği bilimi gelecekteki bir nakil için kullanıma hazır organ, doku ve sentetik malzemelerin vücut dışında üretimini gerçekleştirmek için ortaya çıkmıştır. Gelecekte doku mühendisliği ürünlerinin pazar payının yaklaşık olarak 5 milyar Amerikan doları olacağı tahmin edilmektedir (Oh vd. 2006).



Şekil 2.5 Doku mühendisliği yaklaşımı (Dvir vd. 2011)

İşlevsel doku gelişimini yönlendiren biyomalzeme iskelelerinin kontrol edilebilir bir süreçte biyobozunmasıyla geride sadece hücreler ve onların ürettikleri stroma kalmaktadır. Uygun mekanik ve biyolojik sinyalizasyon şartları altında oluşturulabilindiğinde ise doku mühendisliği yapılarının büyüme, kendini yenileme ve yeniden-modelleme (remodeling) potansiyeli bulunmaktadır (İnanç vd. 2008).

2.3 Doku Mühendisliğinde Kullanılan Polimerler

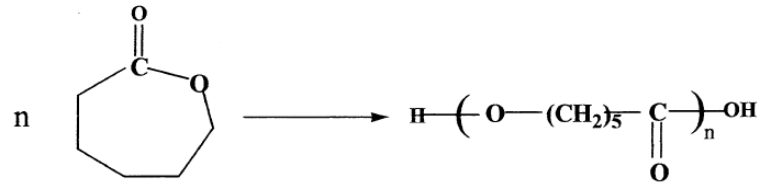
Neredeyse her gün hastalıklar veya travmalar sonucu dokuda meydana gelen hasarların tamiri veya eş değerinin nakli için binlerce cerrahi işlem yapılmaktadır. Gelişmekte olan doku mühendisliği alanı, vücuttan izole edilen hücreler ile doku yenilenmesinde şablon görevi gören ve yeni doku oluşumuna rehberlik edebilen yüksek gözenekli biyomalzeme iskelelerini kombine ederek hasarlı dokuların rejenerasyonu amaçlamaktadır (O'Brien 2011).

Doku mühendisliği uygulamaları için biyomalzeme geliştirilmesi çalışmaları özel hücresel sinyallerin oluşmasına sebep olan ve içeriğindeki biyomoleküller sayesinde yeni doku oluşumunu yönlendiren biyotaklit malzemelerin tasarımı üzerine odaklanmıştır. Biyotaklit malzemeler potansiyel olarak hücre dışı matriksin birçok rolünü taklit edebilmektedir (Shin vd. 2003)

Doku mühendisliğinde kullanılan iskele malzemelerinin çoğunlukla biyobozunur özellikte olması istenir ve malzemenin ideal bir şablon görevi sunabilmesi için yıkılma hızının yeni doku oluşum hızına eşdeğer bir hızda olması beklenir (Ma 2005). Örneğin polilaktik asit (PLA), poliglolikolik asit (PGA) ve bunların kopolimeri olan polilaktik asit-ko-glikolik asit (PLGA) gibi düz zincirli alifatik polyesterler biyobozunur ve biyouyumluluk özelliklerinden ötürü iskele üretiminde sıklıkla kullanılırlar (Ma ve Langer 1995). Aksine, polietilen glikol (PEG) biyo-bozunur özellikte olmamasına rağmen biyo-uyumlu bir hidrojelidir ve kıkırdak gibi yumuşak dokularla benzer mekanik özelliklere sahiptir (Elisseff vd. 2002).

Kalp kası, kalp kapakçığı ve kan damarları gibi birçok doku belirgin bir elastomerik özelliğe sahiptir. Bu dokuların inşası için doku mühendisliği grupları sürekli bir çaba harcamaktadır (Shinoka vd. 1997). Gerekli elastomerik özellikleri yakalamak ve bu dokuların inşasında kullanabilmek amacıyla birçok elastomerik malzeme araştırılmaktadır.

Doğal hücre dışı matriks kaynaklı elastik malzemelere ilave olarak (Isenberg vd. 2006), PCL ve poliüretanlar (PU) bazı tipik sentetik polimerlerdir. Yarı kristal bir polimer olan PCL, düşük camsı geçiş sıcaklığına sahiptir (yaklaşık -62 °C) ve bu yüzden oda koşullarında ve vücutta yüksek elastikiyet göstermektedir (Ma 2008). Uzun bir yıkım sürecine (>24 ay toplam kütle kaybı) sahip PCL, biyomedikal uygulamalarda kullanılmak üzere 1970'lerden bu yana FDA (US Food and Drug Administration) tarafından onaylı ve birçok suture (ameliyat ipliği) bileşiminde bulunabilmektedir (Sravanthi 2009).

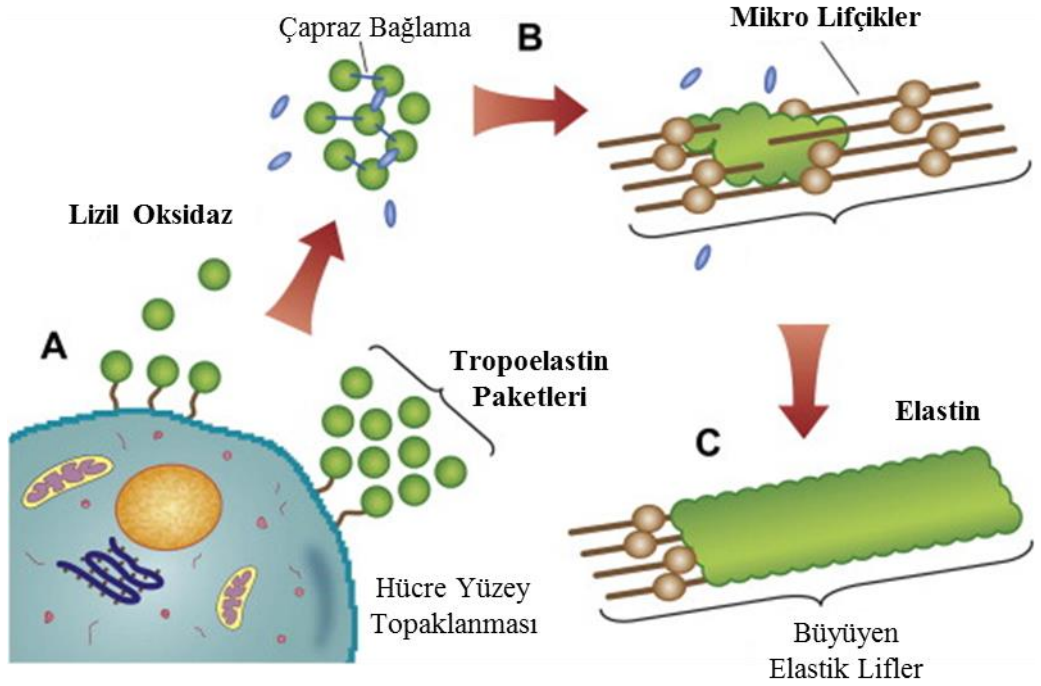


Şekil 2.6 ϵ -kaprolaktonun halka açılma polimerizasyonu (Barbier-Baudry vd. 2002)

Dilimlenmiş PU elastomerik özellikleri kazanabilmek için yapısal varyasyonlara izin verir (Lin vd. 1194). PU'nın biyomedikal uygulamalarda en önemli dezavantajı sentezinde kullanılan toksik başlatıcıları (tolüen ve diizosiyanat gibi) içermesidir. Biyo-bozunur PU veya üretan temelli polimerlerin üretimindeki ilerleme ancak daha az toksik diizosiyanatların kullanımıyla gerçekleştirilecektir (Skarja ve Woodhouse 2001). Bu polimerler damar ve diğer doku mühendisliği uygulamaları için araştırılmaya devam etmektedir (Guan vd. 2002).

Farklı dokuların inşasında gerekli elastomerik özellikleri oluşturmak amacıyla mevcut polimer teknolojilerine ilave olarak biyotaklit yaklaşımlar da mevcuttur. Elastin, esneyip büzülebilen ve vücudumuzda birçok organ ve dokunun bileşiminde var olan çözünmeyen polimerik bir hücre dışı matriks proteinidir (Bellingham vd. 2003).

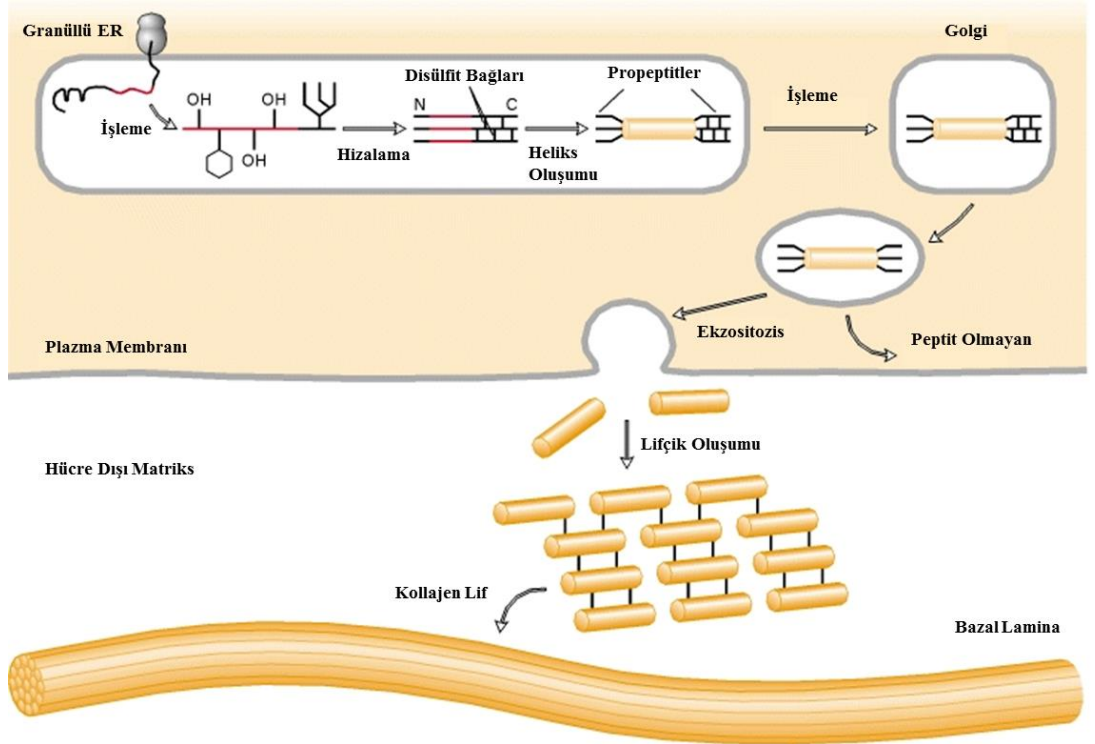
Elastin ve elastin kaynaklı molekülleri içeren biyomalzemeler doku mühendisliği uygulamaları için giderek artan bir oranda araştırılmaktadır. Bu yapısal proteinin elastikiyet, kendiliğinden düzenlenme, uzun süreli kararlılık ve biyolojik aktivite gibi dikkat çekici özellikleri bu proteine olan ilgiyi körüklemektedir. Elastin, çözünmeyen polimer lifleri, hidrolize çözünür elastin, rekombinant tropoelastin (fragmanları), sentetik peptit dizilerinin tekrarı ve diğer biyo(polimerler) ile birleştirilmesiyle elde edilen elastin blok kopolimeri şeklinde biyomalzemelere katılabilmektedir (Daamen vd. 2007).



Şekil 2.7 Elastin lif oluşumunun şematik gösterimi (Moore ve Thibeault 2012)

Birçok hücre dışı matriks proteini lifsi yapıya sahiptir ve bu liflerin çapı nanometre veya mikron altı ölçektir. Örneğin, kollajen (insan vücudunda en çok bulunan hücre dışı matriks proteini) 50-500 nm çaplarında lif demetleri içermektedir (Hay 1991).

Kollajen hücre dışı matriksin ve bağ dokusunun çözünmeyen en temel lifsi proteindir. Kollajenin en az 16 tipi vardır, ancak vücutta bulunan kollajenin %80 ila %90'ı tip I, II ve III'dür. Bu kollajen molekülleri birlikte uzun ince lifçikler şeklinde paketlenirler. Eskiden kollajenin sadece fibroblastlar tarafından salındığı düşünülürken, şimdilerde sayısız epitel hücresinin de kollajen tiplerini ürettiği bilinmektedir. Kollajen tipleri gerilimlere karşı dokulara yardımcı olmaktadır (Lodish vd. 2000).



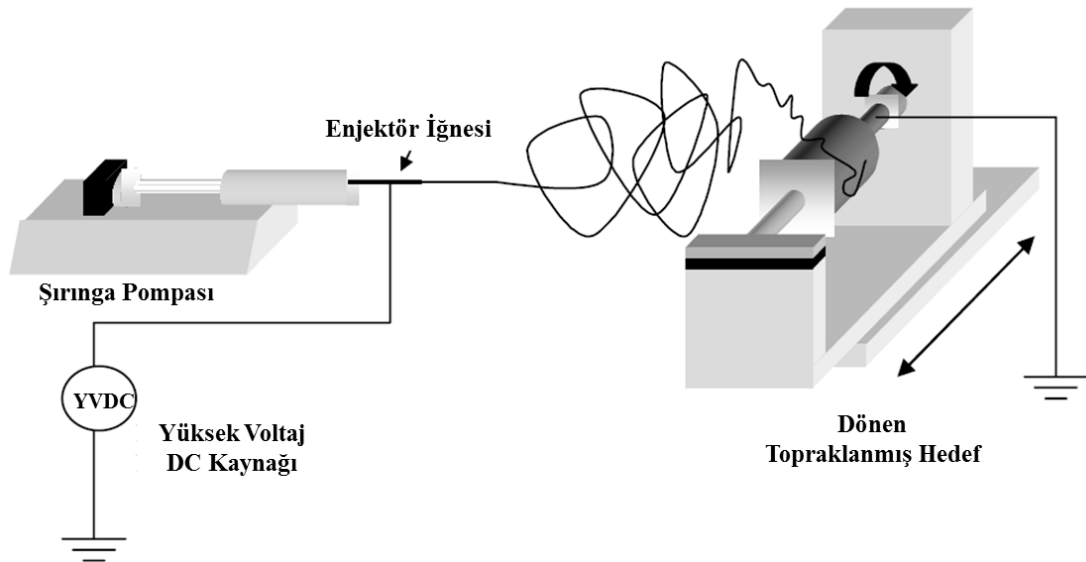
Şekil 2.8 Kollajen liflerin biyo-sentezi (Lodish vd. 2000)

Nano/mikro lifsi hücre dışı matriks yapılarını taklit eden malzemeleri üretmek için, çeşitli başarı derecelerinde birkaç teknoloji geliştirilmiştir.

2.4 Elektro-eğirme Tekniği

Elektro-eğirme tekniği literatürde 100 yılı aşkın bir süredir bulunmaktadır (Morton 1902). Teknik endüstriyel ve ev ölçeğinde dokunmamış kumaş üretiminde 1930'ların başlarına kadar kullanılmıştır (Formhals 1934). Elektro-eğirme tekniği nano veya mikron ölçeğinde liflerin üretimine olanak sağladığından ötürü son yıllarda yeniden ilgi görmeye başlanmıştır. Ayrıca diğer bir tekstil teknolojisi olan eriyikten çekme yöntemiyle benzerlikler göstermektedir. En basit şekliyle elektro-eğirme düzeneği bir polimer çözeltisi (eriyiği) haznesi, bir elektrik alan (yüksek gerilimde) ve topraklanmış bir toplayıcıdan oluşmaktadır.

Elektrik alan altında çekim gücü, polimer çözeltisinin yüzey gerilimini yener ve toplayıcı plakaya doğru yüklenmiş bir fışkırma oluşturur. Elektrik alan etkisiyle fışkıran polimer eğilir ve spiral şeklini alarak belirli mesafeye yerleştirilmiş toplayıcı plakaya doğru hareket eder. Çözücü yolda buharlaşır ve toplayıcı plaka yüzeyinde örgüsel olmayan lifsi yapıda polimer toplanır (Deitzel vd. 2001). Elektriksel olarak topraklanmış dönen teller veya silindir toplayıcılar isteğe göre hazırlanabilir (Matthews vd. 2002, Theron vd. 2001).

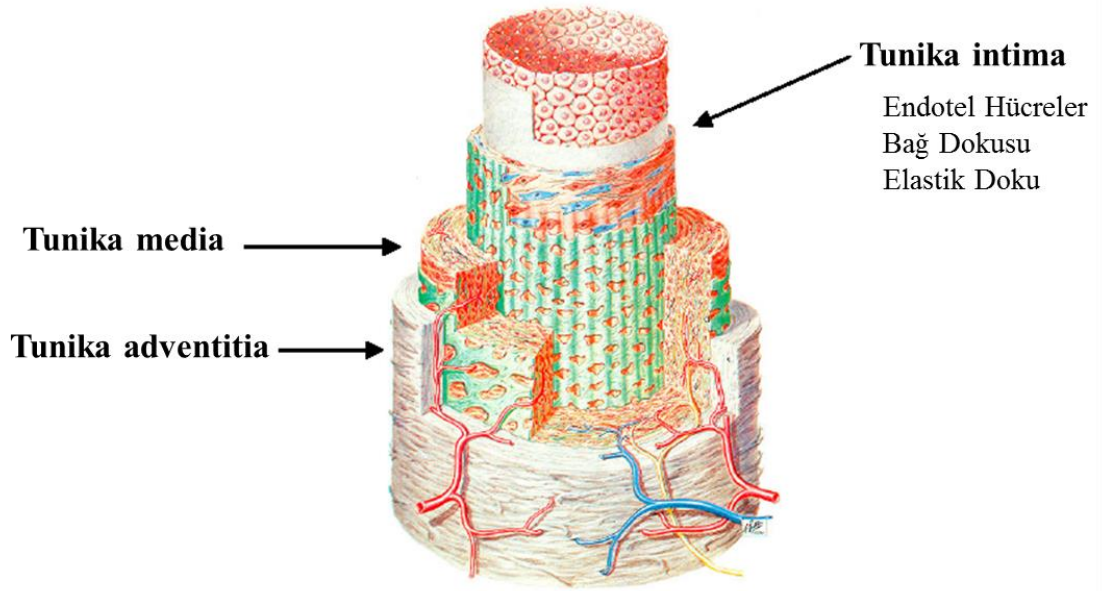


Şekil 2.9 Elektro-eğirme sistemi (Kenawy vd. 2003)

Birçok doğal makro moleküller (kollajen, ipek fibroini ve fibrinojen) ve sentetik polimerler (PGA, PLLA, PLGA ve PCL) doku mühendisliği araştırmalarında örgüsel olmayan kumaş formunda işlenebilmektedir (Boland vd. 2004). Çeşitli hücre tiplerinin üretilen bu elektro-eğirilmiş nano lifsi malzemeler üzerine tutunduğu, yayıldığı ve farklılaştığı rapor edilmiştir (Liv vd. 2001, Yang vd. 2005). İlave olarak, FDA onaylı biyobozunur polimerlerin elektro-eğirilmesi ile üretilen malzemelerde lif çapları genellikle mikrometre mertebesindedir.

2.5 Damarın Yapısı

İnsan vücudundaki arterler (Atardamarlar) dört farklı grupta incelenir. Bunlar sırasıyla elastik arterler, orta genişlikte musküler arterler, küçük arterler ve arteriollerdir. Radyal (dairese) arter orta genişlikteki musküler arter grubundadır. Bir musküler arter duvarının yapısı üç farklı tabakadan meydana gelmektedir. En iç tabaka tunika *intima*, orta tabaka tunika *medya* ve en dış tabaka ise tunika *adventisya* dır.



Şekil 2.10 Orta ölçekli musküler (dağıtıcı) arterin yapısı (Kangasniemi ve Opas 1997)

Tunika *intima* üç tabakadan oluşmaktadır. En iç tabakasında endotel hücreler, ortada ince bir areoler dokuya yerleşmiş alt endotel tabakayı içeren bağ dokusu ve en dış katmanda ise ince bir bağ dokusu yer almaktadır. Tunika *medya* en ince tabakadır ve bağ dokusu, düz kas hücreleri ve elastik dokudan meydana gelmektedir. Tunika *medyanın* yapısı arter türüne göre değişmektedir. Geniş arterler bağ dokusu, elastik doku ve elastik lifleri içermektedir. Bacak arterleri gibi küçük arterlerde elastik liflerin yerine düz kas hücreleri vardır. Tunika *medya* tabakası etkin olarak arter duvarının mekaniksel özelliklerini belirlemektedir. Tunika *adventisya* ise kollajen liflerden ve elastik dokudan meydana gelmektedir (Carola vd. 1990). Kollajen, elastin ve çapraz bağlı proteinler bir arterin mekanik özelliklerini belirlerler. Genel bir kural olarak, elastin oranı kollajen oranından daha fazla olursa elastik modül azalır ve gerilebilirlik artar (Doublin vd.1969).

Her bir tabakanın farklı bileşimi ve farklı fizyolojik rolü bulunmaktadır. *Intima* tabakası, ince bir bazal lamina üzerine yerleşmiş tek katmanlı endotel hücreler ve bu tabakaya komşu kollajen tip IV ve elastinden oluşan damar iç duvarıdır. Kan akışıyla temas halindeki bu tabaka, trombosit aktivasyonunun önündeki başlıca engeldir. Kalın *medya* tabakası, kollajen tip I ile tip III, elastin ve proteoglikanları içeren bir matriks içine gömülü birkaç damar düz kas hücresi katmanından oluşmaktadır. En dıştaki *adventisya* tabakası ise, fibroblastları ve dağınık kollajen tip I'i içerir. Doğal arterin ana protein bileşenleri olan kollajen ve elastin, gerilme desteği sağlayarak damarın yırtılmasını engeller ve atımlı deformasyona direnebilen bir elastiklik kazandırır. Kan akışına karşı damarın düşük mekanik gerilme gevşeme yanıtı vermesinde ve atım enerjisinin sıcaklık olarak dağılmasının engellenmesinde elastik yapılı elastin molekülü başroldedir (Huang vd. 2000).

2.5.1 Damar düz kas hücreleri

Damar düz kas hücreleri (DDKH'leri) kapiller damarlar hariç bütün damarların duvarında bulunan ve damarın kasılıp gevşeme fonksiyonunu sağlayan hücrelerdir. Orta ve büyük çaplı damarlar 3 tabakadan oluşur: *intima*, *medya* ve *adventisya*. DDKH'leri damarların medya tabakasında ve hücre dışı matriks içinde yerleşmiş olarak bulunurlar.

Gelişim sırasında DDKH'leri farklı birçok fenotip sergilerler. DDKH'lerini diğer damar hücrelerinden ayırmak amacıyla kasılmayla ilgili bazı proteinlerin ifadelerine bakılması esas alınmıştır. Damara özgünlükleri azalan sıraya göre verildiğinde bunlar; düz kas ağır zincirli miyozin, kalponin, kalsiyum, aktin bağlayan protein SM22 α ve alfa düz kas aktinidir. DDKH'nin birden fazla fenotipte bulunduğu ve damar düz kasının olgunlaşması sırasında veya zedelenmesini takiben DDKH'lerinde fenotip modülasyonu olduğu gözlenmektedir.

Bu konuda yapılan moleküler incelemeler damar duvarından izole edilen düz kas hücrelerinin en az 2 alt gruba ayrılabilceğini göstermektedir. Birinci grupta düz kasın tipik yapısını gösteren, uzun ve silindirik görünümde olan, kasılma yeteneğine sahip ve kontraktıl eleman proteinlerini içeren tip I hücreler vardır. Tip I hücrelerde proliferasyon, göç veya hücre-dışı matriks sentezleme yeteneği bulunmamaktadır. İkinci grupta ise izolasyon sonrasında küresel biçimde olduğu gözlenen, kasılma yeteneği olmayan ve sadece kültüre edildikten sonra düz kas aktinini ifade edebilen düz kas hücreleri vardır. Bu hücreler hücre-dışı matriksini oluşturan elastin, fibronektin, kollajen gibi proteinleri sentezleyen, proliferasyon ve migrasyon yeteneğine sahip tip 2 hücrelerdir. Belirtilen hücreler arasındaki başka bir fark da tip 2 hücrelerin plastik yüzeylere kolayca tutunmaları ve kolayca kültüre edilebilmeleridir. Yeni damar oluşumu veya damar duvarının tamiri sırasında başlangıçta tip 2 hücrelerin ortama hâkim olduğu ve olgunlaşma sonrasında tip 1 hücrelere dönüştükleri düşünülmektedir (Köksoy 2002).

2.5.2 Damar endotel hücreleri

Endotel; normal damar fizyolojisinin devamında fonksiyonları olan parakrin, otokrin ve intrakrin bir organdır. *İntima* tabakasında tek katlı hücrelerden oluşan önemli bir yapıdır. Endotel hücrelerinden pek çok faktör ve hormonun salınımı ile arteriyel tonüs ve kalp ve damar hemostazı ayarlanmaktadır. Endotel damar tonüsü, kan basıncı, kan akımı ve pıhtılaşma sistemi üzerinde etkili olan ve yaklaşık 1800 gr ağırlığında olan vücuttaki en büyük endokrin organdır. Endotelden salınan nitrik oksit vasküler devamlılığı sağlamaktadır. Endotel fonksiyon bozukluğunda salınan vazodilatatör ile

vazokonstriktör faktörler arasındaki denge değişmiştir. Esansiyel hipertansiyonda endotele bağlı vazodilatasyon cevabının bozulması ve vazokonstriktörlere olan hassasiyetin artması periferik damar direncini arttırabilmektedir.

Endotel fonksiyon bozukluğu olan hastalarda anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörleri, carvedilol, anjiyotensin-II ve endotelin reseptör antagonistler hakkında bazı olumlu sonuçlar bildirilmesine rağmen bu grup ilaçların etkinlikleri halen tartışılmaktadır. Ayrıca arteriyel tansiyonun düşürülmesi endotel fonksiyon bozukluğunun düzelmesi ile her zaman paralellik göstermemektedir. Gelecekte genetik çalışmalar ışığında, nitrik oksit salınımını arttıran gen tedavisi endotel fonksiyon bozukluğunu geriletmede daha etkin bir role sahip olacaktır. Endotel hücrelerinin başlıca önemli fonksiyonları ise;

- I. Düz kas tonüsü: Endotel hücreleri fizyolojik ve patolojik uyarılara karşı damar düz kas hücrelerinin tonüsünü ayarlar.
- II. Pıhtılaşmanın önlenmesi: Pıhtılaşma sisteminin çeşitli basamaklardaki denetimi endotelden salgılanan kolaylaştırıcı (thrombomodulin, von Willebrand faktörü, tromboxan A2) ya da engelleyen (doku plazminojen aktivatörü, plazminojen aktivatör inhibitörü gibi) faktörlerle sağlanmaktadır.
- III. Vazoaktif maddelerin salınımı ve enzimatik aktivite: EDRF (endothelium-derived relaxation factor), endotelin ve anjiyotensin-I gibi vazoaktif maddelerin ve muhtemelen anjiyotensin-II'nin açığa çıkmasını sağlar.
- IV. İmmün sistem üzerinde etkisi: İnterleukin-1 salınımında rol oynar ve immüno-kompetan hücrelere antijen sağlar.

Endotelden salınan en güçlü ve önemli mediyatörlerden biri nitrik oksit (NO) dir. İlk olarak 1980 yılında Furchgott ve Zawadzki (1980), izole tavşan aortasında asetilkoline bağlı gevşemenin ancak sağlam endotel hücrelerinin varlığında gerçekleşebileceğini gösterdiler. Endotele bağlı bu gevşeme endotelden salınan gevşetici faktör (EDRF) aracılığıyla gerçekleşmektedir. Endotel devamlılığı bozulduğunda ise asetilkoline bağlı vazodilatasyon yetersiz kalmaktadır. Daha sonraki yıllarda Palmer ve arkadaşları EDRF

ve nitrik oksidin benzer farmokolojik yapıda olduklarını ileri sürerken EDRF'yi NO olarak tanımladılar.

Endotelden salınan NO bir amino asit olan L-arjinin'den sentezlenir. Nitrik oksit daha sonra damar düz kaslarına geçerek hücre içi “guanilat siklaz” enzimine bağlanır (NO-haem GC) ve bu enzimi aktive ederek “guanozin monofosfat” (cGMP) yapımını artırır. Sarkoplazmik retikulumda cGMP kalsiyum derişimini azaltarak düz kasta gevşemeye neden olur. Normal şartlarda endotelden nitrik oksit ve prostasiklin gibi vazodilatatörler, endotelin ve EDHF gibi vazokonstriktör maddeler salınmaktadır. Damar tonüsü bu faktörlerin ve sempatik sinir sisteminin dengesine bağlıdır (Zoghi ve Nalbantgil 2002).

Endotel hücrelerin bölünme yetenekleri ölçüsünde çoğalarak ve göç ederek var olan damarlardan yeni kapillerler oluşturmaya anjiyogeneze denmektedir. Vaskülogenez ise dolaşımda bulunan endotel hücre öncüllerinin (endotel progenitör hücreler) daha önceden var olan herhangi bir damardan köken almadan olgun endotel hücrelere dönüşerek yeni bir damar oluşturmaya olarak bilinir. Yakın tarihe kadar postnatal süreçte organizmanın fizyolojik gereksinimlerini karşılamak veya iskemik dokulara veya tümörlere oksijen sağlamak amacıyla yeni kapiller damarların oluşmasında sadece anjiyogenezin rol aldığı düşünölmekteydi.

Vaskülogenezin ise sadece embriyonik dönemde yeni damar oluşumunu sağladığı sanılmaktaydı. Ancak, Asahara (1997) ve Shi (1998) yaptıkları deneylerle kemik iliğı kaynaklı hematopoetik progenitör hücrelerin endotel hücreye embriyonik dönemin dışında da dönüşebildiğini, iskemi sonrası endotel bütönlüğün tekrar sağlanmasında ve yeni kapiller oluşumunda bizzat rol aldıklarını bularak vaskülogenez ile ilgili yaygın kanıyı değıştirdiler (Tekeli ve Emerk 2007).

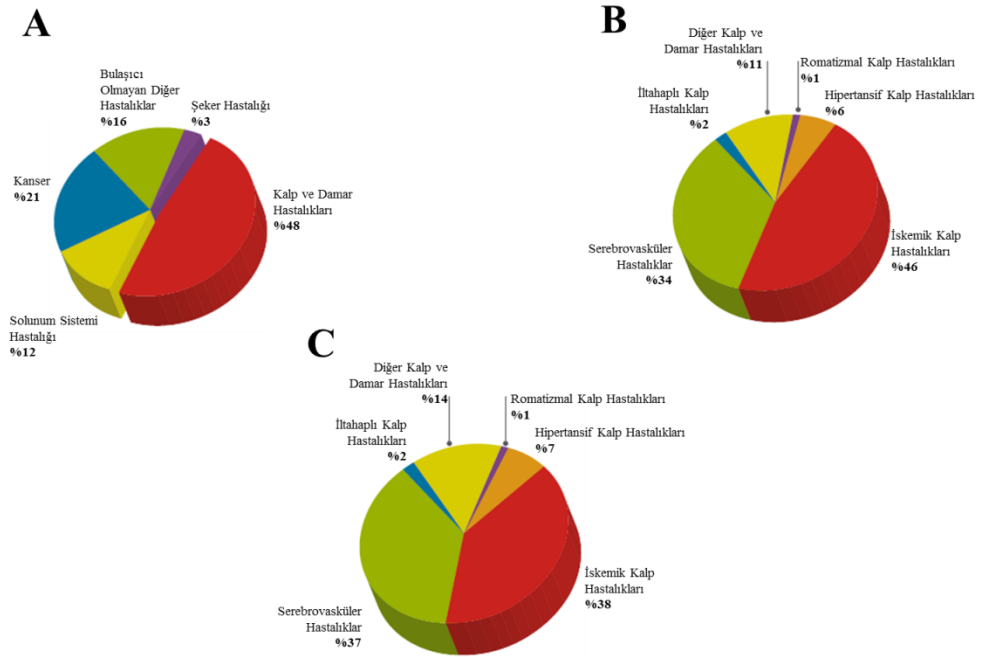
2.6 Kalp ve Damar Hastalıkları

Kalp ve damar hastalıkları, özel olarak arterioskleroz-kaynaklı koroner kalp hastalıkları, dünyada başta gelen ölüm nedeni olarak gösterilmektedir (Dünya Sağlık Örgütü, 2006). Sınırlı istatistiklere rağmen, ülkemizde de benzer durumun söz konusu olduğu kabul edilmektedir. Kalp ve damar cerrahisinin ilerlemesine, tanı yöntemlerindeki (EKG ve CT-anjiyogram gibi), ilaçlardaki (beta-blokerler ve statinler gibi) ve girişim araçlarındaki (kateter teknolojileri gibi) gelişmeler önemli katkılar sağlamıştır.

Diğer yandan, açık damar cerrahisi alanında büyük ilerlemeler gerçekleştirilememiştir. Bacaktan yapılan ilk vasküler by-pass (1948) veya ilk başarılı koroner arter by-pass (1967) uygulamalarıyla, modern periferik ve koroner by-pass teknikleri arasındaki farklılıklar sınırlı düzeylerde kalmıştır (Friedman, 2005).

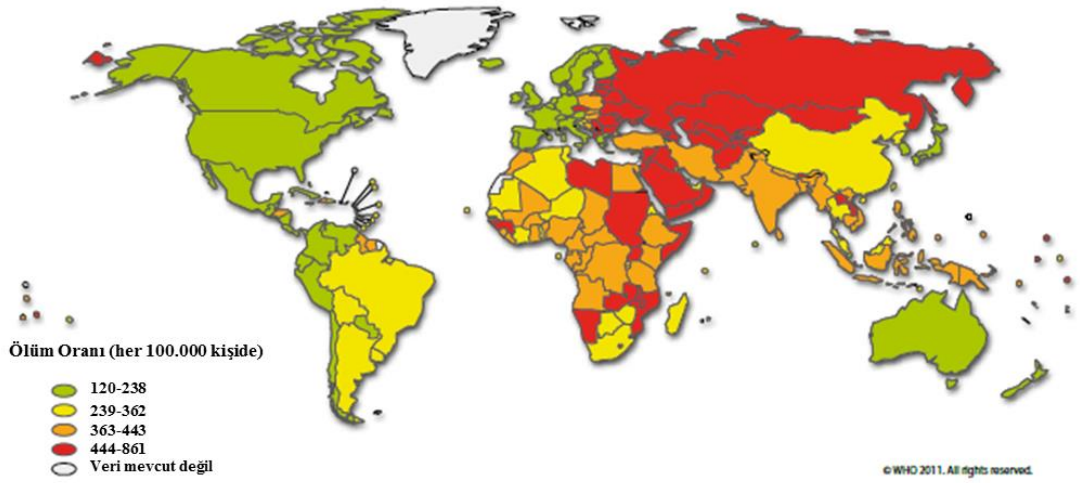
2009 yılında, 80 milyondan fazla Amerikalı kalp ve damar hastalıklarına yakalanmıştır. Ülke genelinde ise toplam ölümlerin %36'sının kalp ve damar hastalıkları sonucu olduğu saptanmıştır. Bu oran ölüm listesinde kalp ve damar hastalıkları dışında liderliğe oynayan beş ölüm sebebinin toplamından daha yüksektir (Thanh vd. 2010). Her yıl 250 bin hasta koroner arter by-pass ameliyatları olmaktadır. Maalesef hastaların %20-%30 by-pass ameliyatlarında kullanılan uygun otolog damarlara sahip değildirler (Beamish vd. 2010).

2009 yılında, Birleşik Devletler’de her altı ölümden bir tanesi koroner kalp hastalığı sonucunda oluşmuştur (Amerikan Kalp Derneği, Kalp hastalıkları ve Krizi İstatistikleri, 2013).

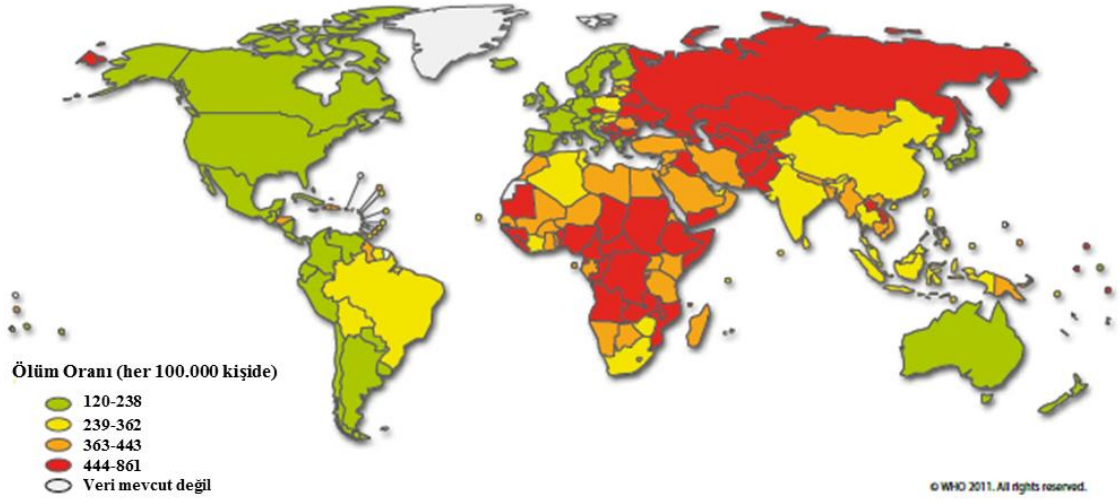


Şekil 2.11 Kalp ve damar hastalıkları istatistikleri (Kalp ve Damar Hastalıkları Üzerine Global Atlas, 2010)

A. Kalp ve damar hastalıklarını da içeren başlıca ölüm nedenlerinin dağılımı, B. Kalp krizi, felç ve diğer kalp ve damar hastalıkları sonucunda meydana gelen ölümlerin dağılımı (erkekler), C. Kalp krizi, felç ve diğer kalp ve damar hastalıkları sonucunda meydana gelen ölümlerin dağılımı (kadınlar)



Şekil 2.12 Erkeklerde kalp ve damar hastalıkları sonucu oluşan ölüm oranlarının küresel dağılımını gösteren dünya haritası (Kalp ve Damar Hastalıkları Üzerine Global Atlas, 2010)



Şekil 2.13 Kadınlarda kalp ve damar hastalıkları sonucu oluşan ölüm oranlarının küresel dağılımını gösteren dünya haritası (Kalp ve Damar Hastalıkları Üzerine Global Atlas, 2010)

2008 yılında 17,3 milyon insan kalp ve damar hastalıkları sonucu hayatını kaybetmiştir. Kalp ve damar hastalıkları sonucu oluşan ölümlerin %80'den fazlası düşük ve orta ölçekte geliri olan ülkelerde meydana gelmiştir. 2023 yılında ise ortalama yıllık 23 milyon insanın kalp ve damar hastalıkları sonucu öleceği düşünülmektedir.

2.7 By-Pass Ameliyatlarında Kullanılan Damar Yedekleri

Avrupa'daki tüm ölümlerin neredeyse yarısı arterioskleroz kaynaklıdır (Stehouwer vd. 2009). İleri farmakolojik ve minimal invaziv tekniklerin gelişmesine rağmen (Met vd. 2008), küçük ekstremitelerde ve kalpte yapay kan damarlarının cerrahi by-pass işlemleri birçok hasta için tercih edilmektedir (Guyton 2006, Norgren vd. 2007). Bu yaklaşım hem daha ucuzdur hem de hastanın yaşam kalitesini bacadan yapılan amputasyon işlemine göre daha fazla artırmaktadır (Cheshire vd. 1992).

Eğer hastanın kendisinde bir arter veya toplardamarı kullanılabilir durumda değil ise sentetik bir tüp veya bir damar protezi hastaya implante edilebilir. Greft geliştirme çalışmalarından yaklaşık yarım yüzyıl sonra elde edilen veriler ışığında, şu anda klinikte kullanılan mevcut malzemelerin iyileşme ve doku rejenerasyonu açısından optimal olmadığı gözlenmiştir (Chlupáč vd. 2009).

Büyük çaplı arterlerde (>8 mm) prostetik greftlerin uzun dönem açıklık oranları yeteri düzeydedir. Kan akışı bu ölçekteki damarlarda yüksek miktarda olduğundan trombojenisite (kanın pıhtılaşması) gerçekleşmez ve bu aort-iliak eşdeğerleri beş yıl süre ile %90 açıklık oranlarına sahip olabilmektedirler (Brewster 1997).

Karotid veya sıradan femoral arterler gibi orta çaplı damarların (6-8 mm) değişimde kullanılan prostetik ve otolog (hastanın kendinden alınan) greftlerin sonuçları arasında çok az farklılık vardır (Ricotta 2005).

Buna rağmen, koroner arterler, infrainguinal arterleri (kasık ligamentinin altında) ve özellikle düşük kan akışı olan infragenikulat arterleri (diz ekleminin altında) gibi küçük çaplı damarlar (<6 mm) için kullanılan damar protezlerinin sonuçları hayal kırıklığı yaratmıştır.

Çizelge 2.1 Vücut bölgesine göre klinikte kullanılan damar greftleri (Chlupáč vd. 2009)

<i>Damar eşdeğeri seçimi</i>	Damar Türleri				
	Büyük çaplı arterler (≥ 8 mm)	Orta çaplı arterler (6- 8 mm)	Küçük çaplı arterler (≤ 6 mm)	Venöz rekonstraksiyonu	Hemodializ arteriyovenöz kullanımı
	Aort, şah damarı, iliak ve yaygın femoral arterler	Karotid, subklavian, yaygın femoral, viseral ve diz üstü arterleri	Koroner, diz altı, tibiyal ve peroneal arterler	Üst ve iç vena cava, iliko-femoral venler, portal ven, viskeral venler	Yukarı > alt ekstremité
1. seçim	Protezler (Dacron, ePTFE)	Protezler ve otogreftler (eşit)	Arterler veya venöz otogreftler	Safen spiral ven greft, derin ven otogreft	Doğal malzemeler
2. seçim	Allogreft, derin venöz otogreft	Protezler veya otogreft	Kompozit greft, ven interpozisyonu, protezler (ePTFE, Dacron), allogreft, biyosentetik	Allogreftler, ePTFE, Dacron, biogreftler	ePTFE, PU, zenogreftler, biogreftler, doku mühendisliği ürünleri (klinik denemeler)

Diz altında femoropopliteal by-pass grefti olarak kullanılan ePTFE protezinin birinci beş yıllık açıklık oranının %39 gibi düşük bir seviyede kaldığı ve oto-venöz by-passda bu oranın %74’lerde olduğu tespit edilmiştir (Klinkert vd. 2004). Arter hastalıklarındaki endo-vasküler yaklaşım giderek önem kazanmakta ise de, tıkanan arterlerin greftler yardımıyla by-pass edilmesi periferik ve kalp ve damar hastalıklarının tedavisindeki önemi sürdürmektedir (Kannan vd. 2005).

Bu işlem için, otolog (kendisine ait) greftler, sentetik protez greftler veya biyolojik greftler (biyoprotezler) kullanılmaktadır. Son dönemlerde ise, dördüncü bir potansiyel seçenek olarak doku mühendisliği yaklaşımıyla greft geliştirilmesini hedefleyen araştırmalar sürdürülmektedir. Bilindiği gibi, by-pass işlemlerinde otolog greftler altın standart durumundadırlar.

Çizelge 2.2 Klinikte kullanılan biyolojik damar greftleri (Chlupáč vd. 2009)

Biyolojik Damar Graftleri					
	Otogreftler		Allogreftler (homogreftler)		Zenogreftler (heterogreftler)
	Arteriyel	Venöz	Arteriyel	Venöz	
<i>Avantajları</i>	En iyi yaklaşım, en az çap uyumsuzluğu, iç meme arteri anatomik olarak yakın, en iyi fonksiyon	Dayanıklı ve çok yönlü, iyi sonuçlar, enfeksiyona karşı direnç, bağıl uygunluk	Kullanıma hazır, enfeksiyona karşı en iyi direnç, transplant-duyarlı hastalar		
<i>Dezavantajları</i>	Bulunabilirliği, vasospazm (Radyal arter), donör tarafından hastalık	Bulunabilirliği, hasarlı damar, ven greft hastalığı	Antijenitise, greft bozulması, erken tıkanıklıklar, kronik ret, ilaç alımı, enfeksiyon riski		
<i>İyileşme</i>	İntimal kalınlaşma, miyointimal hiperplazi (Radyal arter)	Endotel deskuamasyon, ven dilatasyonu, duvar kalınlaşması, arteriyalizasyon, tekrar endotelizasyon	Endotel soyulması, immün tepki, fibrozitasyon		
<i>İlk kullanımı</i>	Jaboulay ve Briau 1896	Goyannes 1906	Gross vd. 1948	Linton 1955	
<i>Derleme</i>	Nezic vd. 2006	Cooper vd. 1996	Fahner vd. 2006	Dardik vd. 2002	Schmidt ve Baier 2000

Otolog greftler çoğunlukla büyük safen venden veya daha ender olarak iç meme veya radyal arterden elde edilmektedir. İkinci bir cerrahi işlemle alınabilen otolog greftler, istenilen kalite özelliklerini her zaman sağlayamamaktadırlar. Otolog greft temini mümkün olamadığında ise, vücutta absorbe olmayan protez greftler veya biyoprotezler (dondurularak saklanmış damar allogreftleri) alternatif olmaktadır. Ancak, bu greftlerle yapılan küçük-orta boyutlu (<6 mm çapta) arter by-pass işlemlerinde ulaşılan başarı tatmin edici düzeyde değildir (Friedman 2005).

Ayrıca, protez greftlerin gelişme potansiyeli bulunmadığından çocuk hastalarda zamanla değiştirilmeleri gerekmektedir. Kimyasal olarak modifiye edilmiş/tesbit edilmiş greftlerin ve hücrelerinden arındırılmış zenogreftlerin kronik enflamatuvar yanıtı uyatarak doku yıkımına yol açabildiği bildirilmektedir.

2.8 Damar Doku Mühendisliğindeki Uygulamalar

Düz kas insan dokularındaki ana bileşendir ve bağırsak, idrar yolları ve damar sistemi gibi organların normal fonksiyonlarını gösterebilmeleri için önemlidir. Kök hücrelerin hücreye dayalı doku mühendisliği ve rejenerasyon stratejilerinde kullanımı düz kas hasarlarının tamiri için alternatif bir yol olarak ortaya çıkmaktadır. Bu tür stratejilerin başarıya ulaşması için, düz kas öncül hücreleri için uygun bir kaynağın tanımlanması gerekmektedir. Adipoz doku, çoklu potansiyele (multipotent) sahip hücreleri yapısında bol miktarda barındırır. Bu çalışmada, adipoz kaynaklı kök hücrelerin fenotipik ve fonksiyonel düz kas hücrelerine farklılaşma kapasiteleri belirlenmiştir. Farklılaşmayı indüklemek amacıyla, adipoz kaynaklı kök hücreler düz kas farklılaşma besiyeri ile kültüre edilmiştir. Kök hücrelerden düz kas hücrelerine farklılaşan hücrelerde düz kas hücrelerine özel aktin (ASMA), kalponin, kaldesmon, SM22, ağır zincirli miyozin (MY-HC), ve smoothelin gibi proteinlerin ifadeleri artmıştır. Adipoz kaynaklı çoklu potansiyele sahip hücrelerin klonal çalışmaları üç germ tabakasına farklılaşma kapasitelerine ilave olarak düz kas hücrelerine de farklılaşabildikleri gösterilmiştir. Asıl önemlisi, düz kasa farklılaşmış hücreler, farmakolojik maddelere karşı doğrudan bir kasılma ve gevşeme gibi fonksiyonel özellikler göstermiştir. Sonuç olarak, adipoz kaynaklı kök hücreler fonksiyonel düz kas hücrelerine farklılaşma potansiyeline sahiptir ve bu nedenle, adipoz doku düz kasın önemli bir rol oynadığı hasarlı dokuların tedavisi için önemli bir hücre kaynağı olarak kullanılabilir (Rodriguez vd. 2006).

Düz kas tabakasının kan damarlarında homeostaziye önlemek gibi önemli bir görevi vardır. Bu nedenle, fonksiyonel bir düz kas tabakasının oluşturulması doku mühendisliği yaklaşımı ile üretilen kan damarının inşası için ön şarttır. Bu çalışmada, atımlı bir biyoreaktör sistemi altında insan adipoz dokusu kaynaklı kök hücrelerden farklılaştırılmış düz kas hücrelerinin kullanılmasıyla edilen küçük çapta (< 6 mm) elastik damar duvarlarının inşaa fizibilitesi incelenmiştir. Kök hücreler dönüşüm büyüme faktörü beta 1 (TGF- β 1) ve kemik morfogenetik proteini-4 (BMP4) ile 7 gün süreyle indüklendiğinde, düz kas hücreleri fenotipini alarak ASMA, kalponin, MY-HC gibi özel düz kas hücreleri işaretçilerini ifade ettiği bulunmuştur. Kök hücrelerden farklılaşan düz kas hücreleri örgüsel olmayan PGA meşine ekilmiş ve elde edilen hücre-iskele

kompleksi atımlı bir biyoreaktör sistemi içine alınarak 8 hafta boyunca takip edilmiştir. 8 hafta boyunca dinamik koşullara maruz bırakılan damar duvarlarının doğal damara benzer biçimde yoğun ve iyi organize olduğu gözlenmiştir. 3 boyutlu PGA iskelesine ekili düz kas hücrelerinin dinamik koşullar altında fenotipini koruduğu ve doğal eşdeğerlerine kıyasla yüksek oranda iskele içinde kollajen ürettiği belirlenmiştir. Statik koşullarda kültüre edilen örneklerde ise kasılmada görevli proteinlerin seviyelerinin düşük olduğu histolojik çalışmalarla gösterilmiştir. Asıl önemlisi, dinamik koşullara maruz bırakılan iskele-hücre yapısının mekanik özelliklerinin statik koşullara maruz bırakılan örneklerden dikkat çekiçi oranda iyi olduğu bulunmuştur. Sonuç olarak, adipoz kaynaklı kök hücreler damar doku mühendisliği uygulamalarında kullanılan düz kas hücreleri için yeni bir kaynak olabilir ve elastik küçük çaplı damar duvarları kök hücrelerden farklılaşan düz kas hücrelerinin ekildiği PGA iskelesinden üretilmesi mümkün olabilir (Wang vd. 2010).

Biyobozunur iskele, biyo-taklit bir perfüzyon sistemi ve farklı canlıların damarlarından izole edilmiş endotel ve düz kas hücrelerinin kullanılmasıyla laboratuvar koşullarında başarılı bir biçimde küçük çaplı damar greftler inşa edilmiştir. Buna rağmen, bu teknik insanlara uygulandığında türler arası farklılıklardan ve yaştan ötürü ciddi problemler oluşmaktadır. Yaşlı kişilerden elde edilen düz kas hücreleri limitli çoğalma kapasitesine sahiptirler ve kan damarlarının mekanik özellikleri için önemli olan kollajeni düşük oranda sentezlemektedirler. Alternatif bir hücre kaynağı olarak, erişkin insan kemik iliği kaynaklı MKH'lerin hem kültür kabında hem de biyoreaktör sisteminde düz kas hücrelerine farklılaşması kabiliyetleri çalışılmıştır. İndüksiyonun 14. gününden sonra MKH'lerin erken ve orta dönem düz kas işaretçileri olan ASMA ve kalponin ifade etmeye başladığı immünofloresans teknikler ile gösterilmiştir. Optimize şartlar altında üretilmiş damar duvarları histolojik ve moleküler teknikler ile incelenmiş ve doğal dokuya benzer özellikler gösterdiği bulunmuştur. Sonuç olarak, kemik iliği kaynaklı MKH'ler, damar mühendisliği alanına yeni bir kaynak olabilmektedir (Gong ve Niklason 2008).

Doku mühendisliği arterlerinin *in vitro* koşullarda üretimi ile ilgili geleneksel yaklaşımlar hücre kültürü ve malzeme hücre etkileşimine dayanmaktadır. Öngörülen

çoğu uygulamada, küçük otolog kan damarı eksplante edilir ve kan damarlarında mevcut hücre hatları için bir kaynak olarak kullanılır. Bu çalışmada, tasarlanmış arterlerin üretimi için küçük otolog greftlerin kullanılması amaçlanmıştır ve bununla cazip bir başlangıç noktası olduğu düşünülmüştür. Yavru domuzlardan (yaklaşık 30 kg) elde edilen karotid arterler perfüzyon sistemine *ex vivo* koşullar altında uzunlamasına yerleştirilmiş ve 9 gün boyunca perfüzyona maruz bırakılmıştır. Bu fizyolojik gerilme sayesinde arterin boyunda başlangıca göre %40'lık bir uzama meydana geldiği tespit edilmiştir (Clerin vd. 2003).

Adipoz doku bileşiminde endotel hücreler, yağ hücreleri, düz kas hücreleri ve Uluslararası Hücre Tedavileri Derneğinin ölçütlerini belirlediği mezankimal öncül ve stromal hücreleri içeren heterojen bir hücre popülasyonu içerir. Bu çalışmada, insan adipoz dokusundan stromal vasküler fraksiyonlar kullanılmış ve kantitatif RT-PCR, antijen ifadesi, protein parmak izi, çoğalma kinetikleri, *in vitro* 3 soy farklılaşması, düz kas hücreleri ile ilgili gelişimsel yolları modüle eden küçük moleküllere olan fonksiyonel tepkiler karakterize edilerek fonksiyonel olarak doğrulanmış mezankimal kök hücre kültürleri ile kıyaslanmıştır. Stromal vasküler fraksiyon kaynaklı ilk kültürler (P0) içeriğinde hiçbir büyüme faktörü veya rekombinant sitokin içermeyen ve mezankimal kök hücreler için optimize edilmemiş tanımlı bir besi yeri ile kültüre edilmiştir. Bu koşullar altında tutunan hücrelerin işlevsel olarak doğrulanmış mezankimal kök hücre kültürlerine göre belirgin fenotipik ve biyolojik özellikleri olduğu tespit edilmiştir (Basu vd. 2011).

Klinik olarak kullanıma uygun küçük çaplı doku mühendisliği damar greftlerinin geliştirilmesi önündeki en önemli engel iskele bileşimidir. Doğal damarlar ile benzer yapısal ve mekanik özellikler gösterebilen ve daha iyi bir hücre entegrasyonu, tutunması ve çoğalması sağlayan iskele gereksinimi vardır. Bu çalışmada, küçük çaplı, çift tabakalı, sentetik elastomerik biyobozunur bir iskele geliştirilmiştir. İskele, hücre tutunmasına ve çoğalmasına olanak sağlayan yüksek oranda gözenekli bir iç tabaka ve elektro-eğirme tekniği ile oluşturulmuş lifsi dış tabakadan oluşmaktadır. İskele morfolojisi ve mekanik özellikleri değerlendirilmiş ve doğal damarlar ile kıyaslanmıştır. İskele üzerine erişkin kök hücreleri ekilmiş ve dinamik koşullar altında 7 gün boyunca

kültür sürdürülmüştür. Bu yaklaşımla üretilen hücreli doku mühendisliği ürünlerinin gelecekte klinik uygulamalar için katkısının olabileceği düşünülmektedir (Soletti vd. 2010).

Küçük çaptaki (<5 mm) kan damarının doku mühendisliği yaklaşımı ile üretimi otolog damar greftlerine bir alternatif olarak karşımıza çıkmaktadır. Fonksiyonel, tutunmuş, kayma gerilimi olan endotel hücre tabakasının geliştirilmesi başarılı doku mühendisliği greft uygulamaları önündeki önemli engellerden bir tanesidir. Bu çalışma ile 3 boyutlu kardiyovasküler yapıda tam dolulukta endotel hücre tabakasının oluşturulması ve oluşan bu tabakanın hücre dışı matriks bileşimi ve yapının mekanik özellikleri üzerine etkisinin tanımlanması amaçlanmıştır. Kardiyovasküler yapılar fibrin jelin kullanıldığı PGA ve poli-4-hidroksi bütirat üzerine miyofibroblastlar ekilerek elde edilmiştir. 3-4 hafta sonra, endotel hücreler yapıya ekilmiş ve EGM-2 besi yeri kullanılarak 1-2 hafta süre ile ko-kültür yapılmıştır. Tam dolulukta endotel tabakası oluşturulabilmiş ve 2 hafta süre boyunca kültür sürdürülmüştür. EGM-2 besi yeri miyofibroblastların kollajen üretimini azaltmış ve bunun sonucu olarak daha zayıf bir iskele elde edilmiştir. Endotel hücreler ile ko-kültür işlemi kollajen içeriğini düşürmüştür ancak yapının mekanik özellikleri çok etkilenmemiştir. 3 boyutlu insan kardiyovasküler yapısında tam dolu bir endotel tabakası inşa edilmiştir. Endotel tabakası 1-2 hafta süre ile ko-kültüre alınmıştır. Miyofibroblast hücrelerinin ürettiği kollajen miktarında azalma olmasına rağmen 1 hafta süre endotel hücreler ile ko-kültüre edilen yapının yeterli mekanik özelliklere sahip olduğu görülmüştür (Pullens vd. 2009).

Bu çalışmada, endotel hücreler ve düz kas hücrelerinin *in vitro* koşullarda ko-kültürü için kan damarlarının sağlıklı ve hastalıklı durumunu taklit edebilen bir platform geliştirilmiştir. TGFβ1 ve heparin ile etkileştirilmiş düz kas hücrelerinde ASMA ve kalponin gibi düz kas işaretçilerinin ifadesi artmıştır (homotipik model). İlginç bir biçimde, neredeyse tam doluluk oranında endotel hücrelerin düz kas hücreleri üzerine ekilmesi (heterotipik model) ASMA ve kalponin ifadesini homotipik modele göre daha fazla arttırdığı gözlenmiştir. Sonuç olarak, geliştirilen bu yapının sağlıklı bir damar dokusu için önemli olduğu belirlenmiştir (Chatterji vd. 2010).

Doğal kan damarlarına kıyasla, klinikte kullanılan diğer tüm kan damarı yedekleri standardın altındadır. Doku mühendisliği yaklaşımı ile kan damarı üretiminde farklı iskele malzemeleri, hücre tipleri ve kültür koşulları takip edilmektedir. Arteriyel sistem uygulamalarından önce sistemde mevcut birçok problemin çözülmesi gerekmektedir. Bu çalışmada, koyun sistemik dolaşımına implantasyon için uygun canlı kan damarlarının doku mühendisliği yaklaşımı ile üretilmesi amaçlanmaktadır. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda, damar düz kas hücreleri eksplant teknik yardımı ile çoğaltılmaktadır. Buna rağmen bu çalışmada farklılaşmış damar düz kas hücrelerinin homojen popülasyonu enzimatik tekniklerle elde edilmiş ve düz kas hücrelerine özel proteinler ile karakterize edilmiştir. Eksplant tekniğin aksine daha az sayıda farklılaşmış miyofibroblast hücreleri oluşmuştur. Enzimatik teknik ile elde edilen damar düz kas hücreleri P-4-HB iskeleleri üzerine ekilmiş ve hem dinamik hem de statik koşullarda kültüre edilmiştir. Dinamik koşullarda kültüre edilen doku mühendisliği damar yedeği tam dolu doku tabakaları oluşturmuş ve tamamen su geçirmez özellik göstermiştir. Hücre dışı matriks sentezi, DNA ve damar düz kas hücrelerinin ifade ettiği işaretçilerin miktarı artmıştır. Biyoreaktörde kültüre edilen doku mühendisliği kan damarlarının mekanik özellikleri doğal aorta yaklaşmıştır. Sonuç olarak koyun kan damarı yedekleri enzimatik teknik kullanılarak elde edilen düz kas hücreleri, biyoemici iskeleler ve uygulanan kayma gerilimi ile başarılı bir biçimde üretilmiştir (Opitz vd. 2004).

Kalp ve damar cerrahisi alanındaki doku mühendisliği uygulamaları kalp ve damar hastalarının tedavisi için büyük umut vaat etmektedir. Şu anda kullanılan sentetik damar greftlerinin trombojenite, artan enfeksiyon riski ve düşük yenilenme potansiyeli gibi birçok sınırlamaları mevcuttur. Bu çalışmayla otolog kemik iliği kaynaklı mono nükleer hücrelerin biyobozunur tübüler iskelelerin üzerine ekilmesiyle oluşturulan doku mühendisliği damar grefti kullanımının fizibilitesinin değerlendirilmesi ile ilgili ilk klinik deneme tamamlanmıştır. Mükemmel bir güvenlik profiline karşın klinik denemelerden gelen verilere göre doku mühendisliği damar greftinin ilki ile ilgili komplikasyonun daralma olduğu ve greftlerin yaklaşık %16'sını implantasyon sonrası ilk yedi yıl içinde etkilendiği belirlenmiştir. Yeni damar dokusunun oluşumu altında yatan hücresel ve moleküler mekanizmalar hakkında devam eden araştırma temel anlayışımızı geliştirecek

ve ikinci nesil doku mühendisliği damar greftinin üretilmesi ilgili tasarımların altında yatan gerçekleri anlamamıza olanak sağlayacaktır (Naito vd. 2011).

Son yirmi yılda, doku mühendisliği damar yedeklerinin geliştirilmesi kalp ve damar doku mühendisliği alanındaki birçok araştırmaya konu olmuştur. Biyolojik fonksiyon gösterebilen kan damarı eş değerlerinin inşası için birçok yöntem ortaya konulmuştur. Bu yöntemler hücre ekilmiş kollajen jeller, hücre ekilmiş biyobozunur sentetik polimer iskeleler, kendiliğinden düzenlenen hücre ve hücrelerinden arındırma gibi teknikleri içermektedir (Nerem ve Seliktar 2001).

Damar düz kas hücrelerinin doğal arterde önemli fonksiyonların yerine getirilmesinde büyük payı vardır ve bu nedenle düz kas hücrelerinin doku mühendisliği kan damarları üretiminde mutlaka iskele içinde yer alması gerekmektedir. Doğal biyomalzemelerin kendilerine özgü mimarisi ve düşük gözenekli yapılarından ötürü, damar doku mühendisliği uygulamalarında düz kas hücrelerinin malzeme ile bütünleşmesi önünde problemler oluşmaktadır. Bu amaçla, hücrelerinden arındırılmış domuz karotid arteri üzerine damar düz kas hücrelerinin ekimi, yayılması ve olgunlaşması için etkili bir yöntemin geliştirilmesi amaçlanmıştır. *Adventisya* tabakasını içeren hücrelerinden arındırılmış damarlar üzerine statik koşullarda sıçan aortik düz kas hücreleri pipetleme yapılarak ekilmiştir. Hücre ekimini takiben, hücre tutunması, yayılması ve olgunlaşması için yeniden hücrelendirilen damar yapıları özel olarak tasarlanmış bir biyoreaktör sistemi içine 1-2 hafta süre ile yerleştirilmiştir. Damar düz kas hücreleri ilk olarak hücrelerinden arındırılmış domuz arterinin *adventisya* tabakasına tutunmuştur. İlave olarak, biyoreaktör koşulları (akış ve basınç) birinci hafta boyunca damar düz kas hücrelerinin proliferasyonunu arttırmış ve *adventisya* tabakası yokluğunda muskülerize bir orta tabakanın oluşumunu hızlandırmıştır. Bu çalışmanın en önemli bulgusunun biyoreaktör koşullarının özellikle *adventisya* tabakası soyulmuş olan hücrelerinden arındırılmış iskelelerde belirgin bir musküler tabakanın oluşumunun hızlanması olduğu bildirilmiştir (Yazdani vd. 2009).

Elastin sentezi ve fizyolojik uyum kan damarı doku mühendisliği uygulamaları için önemli bir zorluktur. Bu çalışmada, biyoyumlu elastomerik bir iskelenin yapıda

fizyolojik uyumu arttıran kollajen ve elastin gibi proteinlerin ortak ifadesindeki artışı destekleyebileceği bildirilmiştir. Biyobozunur bir elastomer olan poli(gliserol sebakat)'dan yüksek gözenekli tübüler iskeleler üretilmiştir. Primer babun arteriyel düz kas hücreleri iskelenin lümen kısmına ekilmiş ve kültür 1 hafta boyunca ılıman perfüzyon sistemi altında devam ettirilmiştir. Babun periferik kanından izole edilen endotel progenitor hücreler 8. günde doğrudan düz kas hücre tabakasına ekilmiştir. Yapı, atımlı bir akış sistemi altında 2 hafta daha kültüre edilmiştir. Diğer bir deney protokolünde, düz kas hücreleri 7 hafta boyunca kültüre edilmiş ve endotel progenitor hücreler ile 1 hafta boyunca ko-kültür yapılmıştır. Yapıda oluşan kollajen bantları Masson trikrom ile karakterize edilirken elastin ise Verhoeff boyaması ile karakterize edilmiştir. Düz kas ve endotel progenitor hücrelerin ko-kültürü ve mekanik şartlanmanın kombinasyonu sonucu oluşan yapı doğal hücre dışı matrikse yakın bir görüntü sergilemiştir. Elastomerik iskelenin kan damar doku mühendisliği uygulamalarında önemli bir zorluk olan fizyolojik uyum için rehberlik edebileceği düşünülmektedir (Gao vd. 2008).

Günümüzde, kalp ve damar cerrahisinde kullanılan biyobozunur olmayan sentetik polimer damar greftlerinin dokuya tam bütünleşme potansiyeli yoktur. Doku mühendisliği damar greftleri bu problemleri çözebilir. Bu çalışmada, hücrelerinden arındırılmış doku matriksleri ve otolog kemik iliği kaynaklı hücrelerin kullanılmasıyla bir doku mühendisliği damar grefti geliştirilmiş ve *in vivo* koşullarda doğal doku ile uyuma ve damar tekrar modellenme gibi özellikler test edilmiştir. Damar düz kas benzeri hücreler ve endotel benzeri hücreler kemik iliği mono nükleer hücrelerin *in vitro* farklılaştırılması ile elde edilmiştir. Doku mühendisliği damar greftleri hücrelerinden arındırılmış domuz abdominal aortu üzerine bu hücrelerin ekilmesi ile üretilmiş ve 4 yaşında kemik iliği donörü olarak kullanılan domuzların abdominal aortlarına transplante edilmiştir. Transplantasyondan 18 hafta sonra, üç boyutlu doku mühendisliği damar grefti doğal abdominal aortlara göre kıyaslanmıştır. Damar yeniden modellenmesi sonucu moleküllerin ifadelerindeki değişim RT-PCR ve immünohistokimya analizleri ile belirlenmiştir. Transplantasyondan 18 hafta sonra, tüm doku mühendisliği damar greftlerinin hiç birinde belirgin bir tromboz, dilatasyon ve stenoz oluşmamıştır. Kollajen ve elastin varlığında endotel ve düz kas tabakalarının

rejenere olduğu histolojik ve immünhistokimyasal analizlerle gösterilmiştir. Hücrelerinden arındırılmış doku matrikslerinin ve otolog kemik iliği mono nükleer hücrelerin kullanıldığı doku mühendisliği damar greftleri *in vivo* koşullarda doğal doku ile uyuşma ve yeniden modellenme göstermiştir (Cho vd. 2009).

Damar endotel hücrelerinin kanın pıhtılaşması gibi birçok doğal fonksiyonun düzenlenmesinde önemli görevleri vardır. İlave olarak endotel hücreler immünolojik hastalıkların aterojenezi ve tümör anjiyogenezi gibi görevler de üstlenmektedir. Bu hücreler şeker hastalığı sonucu oluşan arteriosklerotik hasarların geç dönem komplikasyonlarının patofizyoloji ve enflamatuvar hastalıklarda lökosit adezyonu gibi çalışmalarda sıklıkla kullanılır. Primer arteriyel ve venöz endotel hücre kültürleri üzerine otoptik malzeme uygunluğu ve hücre k lt rlерinin tekrarlanabilirliği gibi birçok problemli çalışma yapılmaktadır. Bu çalışmada, insan aortik endotel hücrelerin *in vitro* koşullarda uzun dönem kültürleri için yeni bir izolasyon ve karakterizasyon yöntemi tasarlanmıştır. İzole edilen hücreler t-PA ve PAI-1 gibi anti-trombotik ve trombotik faktörleri, enflamasyonda önemli olan TNF , nitrik oksit ve endothelin üretmektedir. Bu yeni sistem damar patojenlerindeki değişimlerin ve yaşlanmanın moleküler mekanizmalarını anlamamızda çok yararlı olabilir (Donnini vd. 2000).

Sıçan aortundan izole edilen endotel hücrelerinin ve düz kas hücrelerinin primer kültürleri, saflaştırılması ve biyolojik karakteristikleri arasındaki farklılıklar araştırılmıştır. Endotel hücreler damar halka tutunması, kollajenaz ile sindirme ve ileri damar halka tutunması gibi yöntemler ile elde edilirken düz kas hücreleri sıçan aortunun doku kesitlerinden izole edilmiştir. Endotel hücre klonları sınırlandırılmış dilüsyon testi ile seçilmiştir. Tüm hücre tipleri özel hücre immüno-floresans işaretçileri ve faz kontrast mikroskopisi ile hem tek hücre hem de koloni seviyesinde tanımlanmıştır. Hücre çoğalması, kit-8 ile tanımlanmıştır. Düz kas hücreleri ve endotel hücreleri arasındaki farklılıklar tripsine karşı duyarlılık zamanı, tutunma zamanı ve dondurulma-çözülme sonrası canlılık çalışmaları ile gösterilmiştir. Sonuç olarak primer sıçan endotel hücre ve damar düz kas hücre kültürleri farklı morfolojik karakteristikler, çoğalma hızı, tutunma zamanı, tripsine olan duyarlılık ve dondurulma-çözülme sonrası canlılık

göstermiştir. Bu araştırma kan damarlarının rejenerasyonu çalışmalarını konu olan uygulamalar için temel bir kaynak olabilir (Hu vd. 2009).

Adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin çoklu potansiyelde olduğu ve kemik, yağ, kıkırdak ve nöral hücreler gibi birçok hücre tipine farklılaşabildiği bildirilmiştir. Son yıllarda, birçok yazar *in vitro* koşullarda adipoz kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin damar endotel benzeri hücrelere farklılaşabileceğini rapor etmektedir. Buna rağmen, bu raporlar fetal buzağı serumu içeren besi yeri kullanılmasıyla endotel farklılaşmanın yapılabileceğini söylemektedir. Bu çalışmada, fare adipoz mezenkimal kök hücrelerinin serumsuz besi yeri ortamında damar endotel hücrelerine farklılaşması için yeni bir yöntem geliştirilmiştir. Farklılaşmanın ardından, hücrelerin %80'inden fazlasının damar endotele-özümlü işaretçi proteinleri ifade ettiği ve *in vitro* koşullarda düşük yoğunluklu lipo-protein endositozunda artışın olduğu belirlenmiştir. Bu protokol adipoz mezenkimal kök hücrelerin damar endotel hücre soylarına farklılaşmasının mekanizmalarını anlamamıza yardımcı olabilir (Konno vd. 2012).

Endotel progenitör hücreler nispeten nadir hücre popülasyonları oluşturur ve yeteri hücre sayılarına ulaşılması halen bir sorun olmaya devam etmektedir. Bunun aksine, insan adipoz kaynaklı mezenkimal kök hücreler kolay bir biçimde izole edilebilir ve endotel hücrelere farklılaşabilme yeteneğine sahiptir. Bu çalışmada, çoklu potansiyele sahip endotel benzeri hücrelerin izolasyonu ve uzun dönem damar progenitör özelliklerini koruma kapasiteleri karakterize edilmiştir. İnsan adipoz kaynaklı mezenkimal kök hücreler lipo-aspiratlardan izole edilmiş ve farklı kültür aşamaları takip edilerek içeriğindeki çoklu potansiyele sahip endotel progenitör hücrelerin çoğaltması sağlanmıştır. Bunun için DMEM-FBS (1. aşama), serumsuz DMEM (2. aşama), SFO3 besi yeri (3. aşama) ve son olarak kollajen tip IV kaplı doku kültür kaplarında EGM-2 besi yeri (4. aşama) kullanılmıştır. Çoklu potansiyele sahip endotel progenitör hücrelerinin endotel ve hematopoetik soy işaretçilerinde (CD45, KDR ve CXR4) artış meydana geldiği tespit edilmiştir. İlave olarak, endotel progenitör işaretçilerinin (CD34 ve CD133) ifadesinde artış olurken CD31 ifadesinin zayıf olduğu tespit edilmiştir. Önemli olarak, bu hücre hatlarının kalp kası benzeri hücrelerine farklılaşma kapasitelerinin olduğu tespit edilmiştir. Sonuç olarak bu yöntemle, lipoasiprat kaynaklı

adipoz kök hücrelerden etkili ve yüksek miktarlarda çoklu potansiyele sahip endotel benzeri hücrelerin elde edilebileceği ve hücrelere dayalı tedavilerin kullanıldığı kalp ve damar rejeneratif tıbbının açık bir potansiyel kaynağı olduğu düşünülmektedir. (Marchal vd. 2012).

Bu çalışmada, adipoz dokudan CD31, CD34 ve CD106 (VCAM-1) negatif ve fetal karaciğer kinazı (Flk-1) pozitif hücreler izole edilmiştir. Bu hücreler *in vitro* koşullarda osteojenik ve kondrojenik soylara farklılaştırılabilir ve literatürde adipoz kaynaklı erişkin kök hücreler olarak yer almaktadır. Bu hücrelerin endotel progenitör hücre karakterine sahip olduğu gösterilmiştir. VEGF ile kültüre edilen adipoz kök hücrelerin *in vitro* koşullarda endotel işaretçileri ifade ettiği tespit edilmiştir. Adipoz kaynaklı mezenkimal kök hücreler *in vivo* koşullarda bacak iskemi modelinde neo-anjiogeneze sorumlu endotel hücreleri tetiklemek için kullanılabilir. PI3 kinaz inhibitör LY294002 adipoz kök hücrelerin endotel hücrelere *in vitro* koşullarda farklılaşmasını bloke etmektedir. Sonuç olarak, hücreler pro-anjiogenik tedavilerde adipoz kaynaklı kök hücreler endotel hücreleri için potansiyel bir kaynak olabilir (Cao vd. 2005).

Amniyonik sıvı özellikle otolog hücrelerin izole edilip kullanıldığı neo-netal uygulamalarda umut verici bir kök hücre kaynağıdır. Bu çalışmada, çeşitli maddeler kullanılarak amniyonik sıvı kaynaklı kök hücreler endotel hücrelere farklılaştırılmış ve fonksiyonları belirlenmiştir. Farklılaşmamış amniyonik kaynaklı kök hücrelerin normal karyotipte olduğu ve embriyonik kök hücre işaretçisi olan SSEA-4, hematopoetik kök hücre işaretçisi c-kit ve mezenkimal kök hücre işaretçileri CD29, CD44, CD73, CD90 ve CD105 pozitif olduğu belirlenmiştir. İlave olarak bu hücreler, endotel işaretçisi CD31 ve hematopoetik farklılaşma işaretçisi CD45 negatiftir. Kök hücreler VEGF'in farklı derişimlerini içeren endotel çoğaltma besiyeri ile kültüre edilmiştir. 2 hafta sonra, farklılaşan kök hücreler von Willebrand faktör, endotel nitrik oksit sentaz, CD31, VE-Cadherin ve VEGF reseptörü 2'yi ifade etmişlerdir. CD31 ifadesindeki artış VEGF derişimi ile doğru orantılı olarak değişmiştir. Elde edilen deney sonuçlarına göre, amniyonik sıvı kaynaklı kök hücreler fonksiyonel endotel benzeri hücrelere farklılaşabilmekte ve rejeneratif tıp stratejilerinde kullanılan damar yedeklerinin inşası için potansiyel oluşturmaktadır (Benavides vd. 2012).

Özelliklerinden dolayı lifsi yapıda polimerik malzemeler doku mühendisliği iskeleleri, filtre cihazları, sensörler ve yüksek dayanıma sahip hafif malzemelerin geliştirilmesinde kullanılmaktadır. Elektro-eğirme polimerik nano lifsi malzemelerin üretiminde kullanılan yaygın ve etkili bir yöntemdir. Elektro-eğirilmiş nano lifler 2 paralel levha arasında toplanır. Bu iki levha arasındaki mesafe önemlidir ve toplanan liflerin uzunluğunu belirler. Elektro-eğirme tekniği parametrelerinin maksimum lif uzunluğu, ortalama lif çapı, homojenlik ve lif kalitesi üzerine etkisi incelenmiştir. Bu çalışmada, PCL'dan 350 nm ile 1 µm arasında değişen çaplarda lif elde edilmiştir. İki levha arasındaki mesafe ise 35-50 cm arasında çalışılmıştır. Deneysel sonuçlar göre paralel plakalar arasındaki mesafenin artmasıyla 50 cm'nin üzerinde tek parça nano liflerin elde edildiği belirlenmiştir. Polimer derişiminin, toplayıcı plaka boyutunun ve uygulanan gerilimin maksimum lif uzunluğu, lif çapı ve homojenite üzerinde etkili olduğu belirlenmiştir (Beachley ve Wen 2009).

Bu çalışmada, nano/mikro yapılı biyobozunur PLCL örgüsü elektro-eğirme tekniği ile hazırlanmıştır. Farklı kompozisyonda PLCL (70/30, 50/50 ve 30/70), PLL ve PCL metilen klorürde (diklorometan) çözölmüş ve elektro-eğirilmiş mikro lifsi örgüler elde edilmiştir. PLL mikro liflerden mamul tabakanın yüzeyinde ve alt yüzeyinde yaklaşık 200-800 nm gözenek çapında boşlukların olduğu ve bu özelliğın ise kaprolakton içeren diğer polimerlerde olmadığı gözlenmiştir. PLCL 50/50'den mamul mikro lifsi örgü elastomerik özellikler taşımaktadır. Nano ölçekte liflere sahip PLCL 50/50 (yaklaşık 0,3 veya 1,2 mm çapında) tabakası 1,1,1,3,3,3-hekzafloro-2-propanol'ün çözücü olarak kullanılmasıyla elektro-eğirilmişir. Lif çapındaki azalmanın gözenek boyutunu azalttığı ancak bunun aksine iskelenin lif yoğunluğunu ve mekanik özelliklerini arttığı civalı porozimetre ile belirlenmiştir. İnsan göbek bağı veni endotel hücrelerinin düşük çaplı lifsi tabaka (0,3 ve 1,2 mm çapında) üzerinde iyi bir biçimde tutunarak çoğaldığı, daha yoğun lifsi tabakalarda ise hücre tutunması ve yayılmasının ciddi oranda düştüğü ve büyük çaplı lifsi tabakalarda ise (7,0 mm çapında) hiçbir hücre tutunmasının gerçekleşmediği gözlenmiştir. Elektro-eğirilmiş PLCL 50/50'nin biyomedikal uygulamalarındaki potansiyeli tartışılmıştır (Kwon vd. 2005).

Doğal dokunun hücre dışı matriksine benzer özelliklerde biyobozunur PCL ve kollajenden 300-700 nm çapında nano liflere sahip tabakalar elektro-eğirme tekniğiyle üretilmiştir. İnsan koroner arter düz kas hücreleri bu nano lifsi matriksler üzerine ekilmiş ve nano liflerin rehberliğinde normal fenotipik şekillerini koruyarak çoğalmışlardır. Düz kas hücreleri ve nano lifsi matriks arasındaki etkileşim SEM, MTS testi, tripan mavisi dışlama testi ve lazer taramalı konfokal mikroskopisi ile karakterize edilmiştir. Sonuç olarak, kollajen kaplı PCL nano lifsi matriks ve doku kültür kabına tutunan hücrelerin yayılma ve çoğalma hızları arasında bir farklılık görülmemiştir. Düz kas hücrelerinin kollajen kaplı PCL nano lifsi matriks içine doğru göç ettiği ve düz kas doku yapısını aldığı belirlenmiştir. Bu yaklaşımın birçok doku mühendisliği uygulaması için farklı boyut ve şekillerde matriks üretimi için yararlı olabileceği düşünülmektedir (Venugopal vd. 2005).

P(LLA-CL) (75:25) polimerinden elektro-eğirme tekniği yardımı ile nano lifsi tabakalar elde edilmiştir. Elektro-eğirme parametreleri ve lif çapı arasındaki ilişki araştırılmıştır. Polimer derişimindeki azalma ve gerilimdaki artmanın oluşan liflerin çaplarında küçülmeye neden olduğu belirlenmiştir. X ışınları difraktometresi ve diferansiyel taramalı kalorimetre sonuçlarına göre elektro-eğrilmiş nano lifler işlem sırasında CL birimlerinin yüksek oranda yönlenmesi ile oluşmuştur. Nano lifsi iskeletin biyoyumluluğu hücre kültürü çalışmaları ile belirlenmiştir. Hem düz kas hücreleri hem de endotel hücreleri nano lifsi P(LLA-CL) iskelesi üzerine yüksek oranda tutunmuş ve yayılmıştır (Mo vd. 2004).

Eşsiz biyoyumlu P(LLA-CL) (75:25) kopolimerinden yönlendirilmiş nano lifsi iskele elektro-eğirme tekniği ile üretilmiştir. Oluşturulan liflerin çapı yaklaşık 500 nm civarındadır ve yönlenmiş topografi doğal arterin *medya* tabakasında mevcut lifçikleri taklit etmektedir. İskele ile insan koroner arteri arasındaki etkileşim MTS testi, faz kontrast ışık mikroskobu, taramalı elektron mikroskobu, immünohistoloji ve lazer taramalı konfokal mikroskobu ile ayrı ayrı belirlenmiştir. Doku kültür polistreni ve P(LLA-CL) filmleri kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Sonuçlara göre, düz kas hücreleri yönlenmiş nano lifsi yapıya tutunarak bir yön boyunca yayılmış ve iğsi gerilmiş fenotipini almıştır. Düz kas hücrelerinin hücre iskelet proteinleri lif hatları

boyunca yönlenmiştir. Hücrelerin yönlenmiş lifsi yapıya tutunma ve yayılma hızları film formuna göre belirgin bir biçimde farklı olduğu saptanmıştır. Yukarıda bahsi geçen sonuçlara göre, sentetik yönlenmiş lifsi matriks hücre dışı matriksi taklit edebilmekte ve *in vivo* benzeri damar yapıları oluşumuna olanak sağlamaktadır. Bu iskelenin özellikle damar doku mühendisliği uygulamalarında uygun bir doku mühendisliği yapısı olabileceği düşünülmektedir (Xu vd. 2004).

Doku mühendisliği ve klinik uygulamalarda sıklıkla kullanılan biyobozunur FDA onaylı polimerler poli(α -hidroksi) esterlerdir. Elektro-eğirme teknolojisi ile lifsi iskele üretiminde sıklıkla altı farklı poli(α -hidroksi) ester kullanılır. Bu elektro-eğrilmiş polimerlerin fiziksel ve biyolojik özellikleri de karakterize edilmiştir. Bu polimerlerin elektro-eğrilmesi ile elde edilen yapılar doğal hücre dışı matrikse benzer özellikler gösterdiğinden üretim parametrelerinin optimizasyonu gereklidir. Kullanılan polimerin tipine göre 300 nm-1.5 μ m arasında değişen lif çapların sahip yüksek gözenekli üç boyutlu iskelelerin üretilebileceği elektron mikroskobu verileri ile gösterilmiştir. PGA ve PLGA (50:50) lifsi yapıları PLA ve PCL polimerlerine göre daha serttir. İlave olarak, PLLA iskeleleri diğer polimerik iskelelere göre çok daha yüksek hızlarda hücre (kıkırdak ve mezenkimal kök hücreleri) çoğalmasını desteklemektedir. PLLA ve PCL temelli lifsi iskeleler kültür koşullarında hücreler için daha optimal destekler oluşturmaktadır. Bu verilerin ışığında, elektro-eğrilmiş polimerik lifsi yapıların doku mühendisliği biyomalzemeleri için umut vaat eden birer aday olacakları düşünülmektedir (Li vd. 2006).

Prostetik damar greft komplikasyonlarını önlemek ve damar rekonstrüksiyonunda kullanılmak üzere alternatif damar greftlerinin inşası araştırılmıştır. Bu amaçla damar doku mühendisliği iskelelerinin üretimi kilit rol oynamaktadır. Çünkü günümüzde mevcut seçenekler yeteri kadar hücre tutunmasına olanak sağlamamakta ve yetersiz mekaniksel özellikler sergilemektedir. Bu çalışmada, PCL/kollajen iskeleleri bir tavşan aort-iliak by-pass modelinde kullanılmış ve iskelelerin fizyolojik şartlara olan uyumu ve yapısında hücre çoğalmasını desteklemesi gibi özellikleri incelenmiştir. Elektro-eğrilmiş iskeleler fizyolojik koşullar altında damar hücrelerinin tutunmasını ve çoğalmasını desteklemiş ve endotelize greft kan akışı altında tromboz oluşumunu

engellemiştir. Sonuç olarak, damar hücreleri ile kombine edilmiş elektro-eğrilmiş iskelelerin damar rekonstrüksiyonunda prostetik greftlere bir alternatif olabileceği düşünülmektedir (Tillman vd. 2009).

Küçük çapa sahip sentetik damar greft malzemeleri, damar by-pass cerrahisinde insan damarlarına tam uyum sağlayamamaktadır. Yabancı yüzeyde endotelizasyon gerçekleşmez ve tromboz meydana gelirken, mekanik özelliklerinin yetersizliğinden ötürü de intimal hiperplazi oluşmaktadır. Rekombinant insan tropoelastinin kullanılmasıyla küçük çapa sahip sentetik bir damar kondüiti geliştirilmiştir. Tropoelastinin endotel hücrelerinin tutunmasını ve proliferasyonunu sağladığı gösterilmiştir. Tek tabaka oluşturabilen ve sentetik elastin ile çapraz bağlanan tropoelastin düşük trombojeniteye sahiptir. Plazma pıhtılaşma süresi ile ölçülen koagülasyonun intrinsik yolağının aktivasyonu tropoelastin kullanımı ile düşürülmüştür. Trombosit tutunması kollajene kıyasla daha düşüktür. Trombosit etkileşimlerindeki azalmalar çapraz bağlı elastin iskelelere yansımıştır. Daha sonra mekanik özellikleri, uyumu, elastik modülü ve patlama basıncı insan iç meme arteri için optimize edilen elastin/PCL kondüiti tropoelastin ile etkileştirilmiştir. Ayrıca, bu çok katmanlı kondüit kan akışına izin veren sentetik elastin bir lamina oluşturmuş ve küçük ölçekli bir tavşan karotid inter-pozisyonu modelinde dikiş tutabilme ve mekanik dayanıklılık göstermiştir (Wise vd. 2011).

3. MATERİYAL ve YÖNTEM

3.1 Materyal

Hücre kültürü çalışmalarında, hücrelerin ekilip çoğaltıldığı steril doku kültür kapları (Corning, NY, ABD), besi yeri olarak kök hücreler için DMEM:F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium/Ham's F-12) (Lonza, Basel, İsviçre), endotel hücreleri için EGM-2 Bullet Kit (Endotelial Cell Growth Medya Kit) (Lonza) ve düz kas hücreleri için Medium-231 (Smooth muscle cell medium)/SMGS (Smooth Muscle Growth Supplement) (Gibco, NY, ABD) kullanılmıştır. Besi yeri ekleri olarak L-glutamin, penisilin-streptomisin (antibiyotik-antimikotik) ve fetal sığır serumu (FCS) (Lonza), hücrelerin pasajlanma işleminde ise tripsin/EDTA çözeltisi (Sigma, MO, ABD) kullanıldı. Çalışmaların tamamı laminar akışlı steril kabinde (IVF Workstation L226, K Systems, Birkerød, Danimarka) yapılmış ve hücre kültürleri ise 37°C, %5 CO₂ ve %95 bağıl bağıl nem ortamı sağlayan bir karbondioksitli inkübatörde (HERAcell 150i, Waltham, MA, ABD) gerçekleştirildi.

Elektro-eğirme işleminde polimer çözeltisinden uygun boyutlarda lif elde etmek amacıyla 60kV DC güç kaynağı (FC60P02, Glassman, ABD), polimer çözeltisini gerilim bölgesine itmek için bir enjektör pompası (Harvard Apparatus, MA, ABD) kullanıldı. Ayrıca farklı boyutta iç çaplara sahip enjektör uçları (Ayset, İstanbul, Türkiye) ve cam şırıngalar (Injekta, İstanbul, Türkiye), PCL (Sigma) ve polimeri çözmek için diklorometan ve metanol gibi organik çözücüler (Sigma) kullanıldı. Toplayıcı plaka olarak alüminyum folyo, toplayıcı tel olarak ise 316L paslanmaz çelik çubuklar seçilmiştir. Elektro-eğrilmiş tabakalar hücre kültürü çalışmaları için iskele taşıyıcı kalıplara (CellCrownTM, Scaffdex, Tampere, Finlandiya) alındı. Hazırlanan nano/mikro lifsi iskelelerden çözücü sistemini tamamen uzaklaştırmak için vakumlu etüv (Shel Lab, Washington, ABD) kullanılmıştır.

İskelenin *medya* ve *advertisya* tabakalarının inşası için çözünür elastin (Sigma) ve kollajen (sıçan kuyruğundan izole edildi) kullanıldı. Elastin/kollajeni çözmek için fosforik asit (Sigma) ve gözenek oluşturuucu madde olarak ise sodyum bikarbonat

(Sigma) kullanıldı. İskelenin mekaniksel özelliklerini artırmak amacı ile çapraz bağlayıcılar N-hidroksi süksinimit (NHS) ve N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil) karbodiimit hidroklorür (EDC) (Sigma) kullanıldı. Silindirik yapıda elastin/kollajen süngerimsi iskeleler bir liyofilizatör (Christ, ALPHA 1- 4 LD plus, Osterode am Harz, Almanya) ile kurutularak elde edildi. Hazırlanan tüm iskeleler 1-2 saat süre ile harici UV lambası (254 nm) içeren laminar akış kabini (IVF Workstation L226) steril edildi.

İskeleler üzerine tohumlanmış hücrelerin belirli zaman noktalarındaki mitokondriyal dehidrogenaz aktivitelerinin belirlenmesinde MTT (3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il-2,5-difenil tetrazolyum bromür) kiti (Sigma) kullanıldı ve ölçümler UV çoklu plaka okuyucu (Biotrak II, Amersham Biosciences, ABD) cihazı ile alındı.

Hücre hatları 4-8 kuyucuklu slaytlara (Lab-Tek™, Thermo, ABD) ve hazırlanan iskeleler üzerine/içine ekildi. Kuyucuklara ekilen hücrelerin morfolojileri inversiyon mikroskobu (Nikon TS100, Tokyo, Japonya) yardımı ile görüntülendi. Örnekler belirli zaman noktalarında immün/histokimya çalışmaları için tesbit edildi. Hücre ekili iskeleler tesbit edildikten sonra dondurma çözeltisinde (Tissue Freezing Medium, Tissue-Tek, Sakura, Hollanda) donduruldu ve 5-8 µm kalındığında kesitler kriyo-mikrotom cihazı (Leica Microsystems CM1900, Nussloch, Almanya) ile alındı. Daha sonra örnekler hematoksilin ve eosin (H&E) (Sigma), αSMA (sc-56499), CALP (sc-52992), CADH (sc-58703), CADL (sc-25339) ve MY-HC (sc-65735) (Santa Cruz, Texas, ABD) gibi düz kas hücrelerine özel birincil antikorlar ile boyandı.

Benzer şekilde CD31 (sc-13537), vWF (sc-59810), Flk-1 (sc-6251), CD34 (sc-65261) (Santa Cruz), CD144 (555661) ve Tie-2 (557039) (BD biosciences, CA, ABD) gibi endotel hücrelerine özel birincil antikorlar ile boyandı. Boyanan örnekler ışık mikroskobu (Leica 4000B, Wetzlar, Almanya) ile görüntülenip fotoğraflandı.

Hazırlanan iskelelerin kuru ve ıslak formda mekanik özellikleri bir mekanik test cihazı (Shimadzu AGS-X, Kyoto Japonya) ile belirlendi. Hazırlanan iskelelerin hücreli ve

hücresiz üç boyutlu morfolojileri taramalı elektron mikroskobu (JEOL, JSM-6060 LV, Tokyo, Japonya) ile görüntülendi.

Perfüzyon işlemi için bir adet peristaltik pompa (MasterFlex®L/S®, Cole Parmer, IL, ABD), akış ölçerler (Model No: 32908-45, Cole Parmer), basınç transdüserleri (Model No: 68072-04, Cole Parmer), veri kayıt cihazları (UDL 100, Ordell Türkiye), perfüzyon hücresi (316L paslanmaz çelik, viton O-ring ve Fleksi cam), besiyeri kabı (Cam) ve silikon hortum sistemi (FDA § 177.2600, ISO 10993-1, Euro Pharm.) kullanıldı. İlave olarak veri toplama ve kayıt arayüzü için bir yazılım (Ordell) temin edildi.

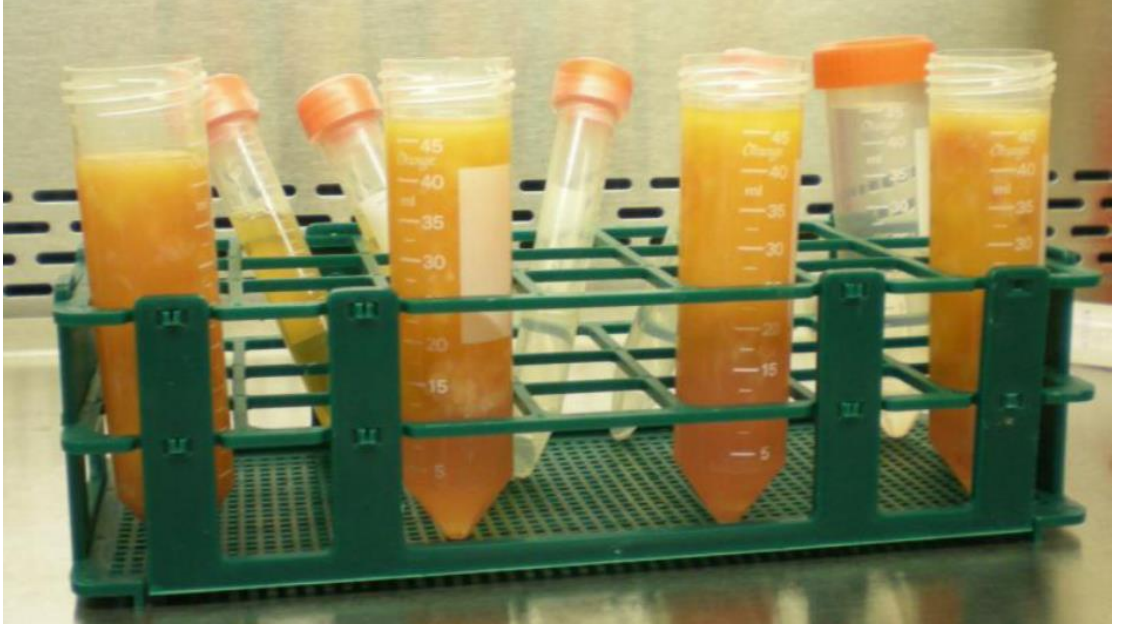
3.2 Yöntem

3.2.1 İnsan adipoz mezenkimal kök hücrelerin izolasyonu

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurul izni ve hasta bilgilendirilmiş onamı kapsamında 1 Mart 2010 tarih ve 08-129 sayılı kararını takiben, uygun donörlerden uzman hekimlerin yardımı ile lipoektomi işlemi yapıldı. Uygun doku taşıyıcı tamponu (PBS) (penisilin-streptomisin ile zenginleştirilmiş %0,9 NaCl içeren 0,1 M fosfat tamponu; pH 7,4) ile laboratuvara getirilen yağ dokusu (Şekil 3.1) çeşitli enzimatik işlemlerden geçirilerek içeriğinden MKH'ler izole edilmiştir.

Özetle; adipoz doku fibröz doku parçalarından ve diğer içeriklerden (kan vs.) ayıklanması için, steril ameliyat gereçleri kullanıldı ve PBS ile defalarca yıkandı. Bu işlemi takiben enzimatik parçalama (sindirme) verimini artırmak için adipoz doku, cerrahi makaslar yardımı ile çok ince parçalara kıyıldı. Daha sonra doku homojenatı PBS içindeki %0,1 tip I kollajenaz (Sigma) çözeltisi içeren 50 ml'lik santrifüj tüpüne aktarıldı ve karbondioksit inkübatörüne alınarak 45 dakika süreyle 37°C sıcaklıkta yavaşça çalkalanarak enzimatik olarak sindirildi. Daha sonra bu süspansiyon, %10 fetal buzağı serumu (FBS), 100 U/mL penisilin, 100 mg/mL streptomisin (Pen-Strep) içeren DMEM:F12 besiyeri (Kök Hücre Çoğaltma Besiyeri; KHÇV) tekrar süspansiyona alındı ve 7 dakika boyunca 25°C sıcaklıkta 1500 devir/dakikada santrifüj (Beckman Coulter SX4750, CA, ABD) edilip hücreler pellet olarak toplandı. Çözelti kısmı

atıldıktan sonra pellet KHÇV ile süspanse edilerek 100 µm gözenek çapında steril bir filtreden geçirildi. Bu şekilde sindirilmeyen doku parçalarından hücreler ayrıldı. Süspanse edilen hücreler $5,0 \times 10^5$ hücre/ml yoğunluğunda 75 cm²'lik doku kültür kaplarına ekildi (0. Pasaj). Daha sonra bu kaplar %5 CO₂, %95 hava ve %90 bağıl nem içeren 37°C sıcaklığa ayarlı inkübatöre yerleştirildi.



Şekil 3.1 İnsan adipoz dokusundan hücre izolasyonu (%0.1'lik tip I kollajenaz çözeltisinde enzimatik sindirim)

3.2.1.1 iAMKH'lerin kültürü

İzolasyon işleminden yaklaşık 24 saat sonra, kültür kaplarından yüzeye yapışmayan hücrelerin ayrılması için kaplar steril PBS ile birkaç kez yıkandı. Daha sonra tekrar kültür kaplarına KHÇV eklendi ve besi yeri değişimi her 3-4 günde bir yapıldı. Hücre morfolojisi inversiyon mikroskobu ile takip edildi.

Yaklaşık olarak %90 bolluğa ulaşmış hücreler tripsinleme işlemine tabi tutuldu. Bu işlem için hücreler ilk önce steril PBS ile birkaç tur yıkandıktan sonra (serumu uzaklaştırmak için) %0,05 tripsin/0,53 mM EDTA (etilendiamin tetraasetik asit) içeren 5 ml çözeltiyle yaklaşık olarak 8-10 dakika muamele edilerek yapışan hücrelerin kültür

kabından ayrılması sağlandı. Bu işlemin ardından doku kültür kabına serumlu KHÇV ilave edilerek hücre süspansiyonu 15 ml'lik santrifüj tüpüne alındı.

Hücre süspansiyonu 1100 devir/dakikada 25°C sıcaklıkta 7 dakika boyunca santrifüj edildi. Dibe pellet halinde çöken hücreler tekrar KHÇV ile muamele edilerek dağıtıldı. Hücreler $5,0 \times 10^5$ hücre/ml yoğunluğunda 1:3 seyreltme oranında yeni 75 cm² doku kültür kaplarına alındı ve kaplar %5 CO₂, %95 hava ve %90 bağıl nem içeren 37°C sıcaklığa ayarlı inkübatöre yerleştirildi. Her pasajda hücrelerin bir kısmı -80°C'da dondurularak saklandı. iAMKH'leri özel yüzey antijen işaretçi (CD işaretçi) profillerine göre karakterize edildi.

3.2.1.2 iAMKH'lerin akım sitometri çalışmaları / kök hücre fenotipinin belirlenmesi

Yaklaşık olarak %90 bolluğa ulaşan iAMKH'lerin fenotipinin belirlenmesi amacı ile floresan-aktifleşmiş hücre ayırma (fluorescence activated cell sorting; FACS) analizleri yapıldı. Bu işlem için seçilen CD antijen paneli, mezenkimal kök hücreler için bilinen panel olup, CD29-FITC, CD90-PE, CD73-PE, CD34-FITC, HLA_ABC-PE, HLA_DR-FITC, CD166-PE, CD105-PE, CD133-PE, CD3-FITC, CD31-FITC, CD146-PE, CD45-FITC, CD44-PE'den oluşmaktadır. MKH için geliştirilmiş olan bu CD antijen paneli izole edilip kültürde çoğaltılan hücreler için kullanıldı. Bu işlem Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları A.D. Hematoloji B.D. Kemik İliği Nakli Ünitesi Akım Sitometrisi Laboratuvarı'ndan hizmet alımı yapılarak gerçekleştirildi.

Özetle; hücreler yukarıda bahsedildiği gibi tripsinleme işlemine tabi tutularak doku kültür kabının yüzeyinden ayrılmaları sağlandı. Santrifüj işlemini takiben süpernatant atıldı ve hemositometre ile hücre sayımı yapıldı. Hücreler %2 insan serumu içeren PBS ile seyreltilmiştir. Hücreler protokolda önceden belirlenmiş oranlarda seyreltilip tüplere alındı ve 20 dakika boyunca floresan izotiyosiyanat ile konjüge edilmiş CD işaretçileri ile inkübe edildi. Negatif kontrol olarak boyanmamış hücre süspansiyonu kullanıldı. İnkübasyon işleminin ardından hücreler FACS cihazının yıkama çözeltisi ile birkaç kez yıkanıp, 1500 devir/dakikada oda sıcaklığında 5 dakika süre ile santrifüj edildi ve

süpernatant atıldı. Floresanlı antikorlarla işaretlenen hücreler her bir tüpe 200 µl olacak şekilde %1 formaldehit, % 0,1 sodyum azid ve % 0,5 BSA içeren akım tamponunda (flow buffer) süspanse edilerek sabitlendi. Süspanse edilen hücreler akım sitometri cihazında her sayımda 10.000 işlem (event) olacak şekilde Cell Quest (BD Biosciences, San Jose, CA, ABD) analiz programı kullanılarak tarandı.

3.2.2 İnsan göbek bağı ve iç meme arteri düz kas hücrelerinin izolasyonu

Taşıyıcı tampon içinde laboratuvara getirilen insan göbek bağı (iGB), laminar akış sağlayan Hepa filtreli bir kabin içine alındı. Taşıyıcı tampon uzaklaştırıldıktan sonra göbek bağı içinde yer alan iki adet plasental arter steril cerrahi aletlerin yardımı ile çıkartıldı ve daha küçük parçalara ayrıldı. Bu işlemleri takiben fungusit ihtiva eden steril PBS ile birkaç kez yıkama işlemi gerçekleştirildi. Steril cerrahi bir makasla küçük parçalara kıyılan plasental arter 6 kuyucuklu doku kültür kaplarına alındı. Üzerine serumsuz düz kas hücresi çoğaltma besiyeri (DKHÇV) ilave edildi ve eksplant kültür tekniği kullanılarak 24 saat süre %5 CO₂, %95 hava ve %90 bağıl nem içeren 37°C sıcaklığa ayarlı inkübatörde kültüre alındı (0. Pasaj).

Serumsuz besiyeri kullanılarak endotel hücrelerin kültüründe çoğalarak kültürü kontamine etme riski ortadan kaldırıldı. 24 saatin ardından besiyeri düz kas hücresi çoğaltma kokteyli ile zenginleştirilmiş DKHÇV (zDKHÇV) ile değiştirildi ve kültür bu şekilde sürdürüldü. Aynı şekilde taşıyıcı tampon içerisinde laboratuvara getirilen insan iç meme arteri yukarıda ayrıntıları tarif edilen yöntem ile kültüre alındı. İnsan göbek bağı arteri düz kas hücrelerinin (iGBADKH'lerinin) ve insan iç meme arteri düz kas hücrelerinin (iİMADKH'lerinin) morfolojileri inversiyon mikroskobu yardımı ile görüntülenip fotoğraflandı.

3.2.2.1 iGBADKH'nin ve iİMADKH'lerinin kültürü

Yeteri bolluğa ulaşan (%90) DDKH'leri tripsinleme işlemine tabi tutuldu. Bu işlem için hücreler ilk önce steril PBS ile birkaç tur yıkandıktan sonra (serumu uzaklaştırmak için)

%0,05 tripsin/0,53 mM EDTA içeren 5 ml çözeltiyle yaklaşık olarak 3-5 dakika muamele edilerek yapışan hücrelerin kültür kabından ayrılması sağlandı. Bu işlemin ardından doku kültür kabına zDKHÇV ilave edilerek hücre süspansiyonu 15 ml'lik santrifüj tüpüne alındı. Hücre süspansiyonu 1100 devir/dakikada 25°C sıcaklıkta 7 dakika boyunca santrifüj edildi. Dibe pellet halinde çöken hücreler tekrar zDKHÇV ile muamele edilerek dağıtıldı. Hücreler $5,0 \times 10^5$ hücre/ml yoğunluğunda 75 cm² doku kültür kaplarına alındı ve kaplar %5 CO₂, %95 hava ve %90 bağıl nem içeren 37°C sıcaklığa ayarlı inkübatöre yerleştirildi. Her pasajda hücrelerin bir kısmı -80°C'da dondurularak saklandı. Hücre çoğaltma işlemi pasaj 5'e kadar sürdürüldü.

3.2.3 iAMKH'lerin damar düz kas benzeri hücrelere farklılaşması

Kök hücre fenotipi akım sitometri çalışmaları ile belirlenmiş ve Pasaj 2-5 arasında dondurulmuş iAMKH'leri damar düz kas benzeri hücrelere (DDKbH'lere) farklılaştırma çalışmalarında kullanıldı. Özetle; pasaj 3'de kültürde olan iAMKH'leri steril PBS ile birkaç tur yıkandıktan sonra (serumu uzaklaştırmak için) %0,05 tripsin/0,53 mM EDTA içeren 5 ml çözeltiyle yaklaşık olarak 8-10 dakika muamele edilerek yapışan hücrelerin kültür kabından ayrılması sağlandı.

Bu işlemin ardından kültür kabına serumlu KHÇV ilave edilerek hücre süspansiyonu 15 ml'lik santrifüj tüpüne alındı. Hücre süspansiyonu 1500 devir/dakikada 25°C sıcaklıkta 7 dakika boyunca santrifüj edildi. Dibe pellet halinde çöken hücreler tekrar KHÇV ile muamele edilerek dağıtıldı ve 8 kuyucuklu slaytlara her bir kuyucuğa 1×10^5 hücre düşecek şekilde ekildi. Hücrelerin zemine yapışması için kültür 48 saat süre ile %5 CO₂, %95 hava ve %90 bağıl nem içeren 37°C sıcaklığa ayarlı inkübatörde sürdürüldü. 48 saatin ardından farklılaşma çalışmalarına geçildi. Farklılaşma için kök hücreler dönüşüm büyüme faktörü beta 1 (TGFβ1), kemik morfogenetik proteini 4 (BMP4) ve Anjiotensin II (Ang II) ile hem ayrı hem de aşağıda belirtilen ve literatürde yer almayan kombinasyonları ile etkileştirildi. zDKHÇV içerisine TGFβ1 (5 ng/ml), BMP4 (2,5 ng/ml) ve Ang II (1μM) ilave edildi. Farklılaştırma serisi olarak ise TGFβ1, BMP4, Ang II, TGFβ1/BMP4, TGFβ1/Ang II ve BMP4/Ang II seçildi ve indüksiyon 7 ve 14 gün boyunca takip edildi. Bu serilerin farklılaşma üzerine etkileri İHK ile belirlendi. Bu

çalışmada iAMKH'leri negatif kontrol (NK) olarak, iGBADKH'leri ve iİMADKH'leri birlikte pozitif kontrol (PK) olarak kullanıldı.

3.2.3.1 DDKbH'lerin immünofenotipik karakterizasyonu

Örnekler soğuk metanolde (-20°C'da) tesbit edilip havada kurutulduktan sonra bidestile su ile yıkandı, 10 dakika hidrojen peroksit blok ile muamele edildikten sonra bidestile su ile tekrar yıkayıp 5 dakika ultra V blok ile inkübe edildi, %1'lik FBS içeren PBS ile 1:50 oranında seyreltilerek hazırlanmış birincil antikorla (fare anti-insan α SMA, kalponin, CALP, CADH, CADL ve MY-HC) oda sıcaklığında 60-120 dakika süreyle etkileştirildi. Bidestile su ile yıkama sonrası, 10 dakika ikincil antikor (keçi anti-fare) ile inkübe edilen örnekler tekrar suyla yıkayıp streptavidin peroksidaz ile 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Son olarak, kromojen-AEC substrat karışımı ile 5-20 dakika kadar inkübe edilen hücreler yıkandı ve ışık mikroskobu altında görüntülenip fotoğraflandı.

3.2.4 İnsan iç meme arteri endotel hücrelerin izolasyonu

Taşıyıcı tampon içinde laboratuvara getirilen insan iç meme arteri, laminer akış sağlayan Hepa filtreli bir kabin içine alındı. Taşıyıcı tampon uzaklaştırıldıktan sonra fungusit içeren steril PBS ile birkaç kez yıkama işlemi gerçekleştirildi. Steril cerrahi bir makasla küçük parçalara kıyılan iç meme arteri %2 sığır deri jelatini kaplı 6 kuyucuklu doku kültür kaplarına alındı. Daha sonra üzerine endotel hücre çoğaltma ve farklılaştırma besi yeri (EGM-2 Bullet Kit: bFGF, VEGF, IGF-I, heparin, EGF, hidrokortizon ve askorbik asit) (EHÇFV) ilave edildi ve eksplant kültür tekniği kullanılarak 24 saat süre %5 CO₂, %95 hava ve %90 bağıl nem içeren 37°C sıcaklığa ayarlı inkübatörde kültüre alındı (0. Pasaj). Yaklaşık 10. günün sonunda insan iç meme arteri endotel hücreleri (iİMAEH'leri) eksplanttan doku kültür kabına doğru göçe başladı ve 2. haftanın sonuna doğru %90 bolluğa ulaştı.

3.2.4.1 iİMAEH'lerin kültürü

Yeteri bolluğa ulaşan (%90) iİMAEH'leri tripsinleme işlemine tabi tutuldu. Bu işlem için hücreler ilk önce steril PBS ile birkaç tur yıkandıktan sonra (serumu uzaklaştırmak için) %0,05 tripsin/0,53 mM EDTA içeren 5 ml çözeltiyle yaklaşık olarak 3-5 dakika muamele edilerek yapışan hücrelerin doku kültür kabından ayrılması sağlandı. Bu işlemin ardından kültür kabına EHÇFV ilave edilerek hücre süspansiyonu 15 ml'lik santrifüj tüpüne alındı. Hücre süspansiyonu 1100 devir/dakikada 25°C sıcaklıkta 7 dakika boyunca santrifüj edildi. Dibe pellet halinde çöken hücreler tekrar EHÇV ile muamele edilerek dağıtıldı. Hücreler $5,0 \times 10^5$ hücre/ml yoğunluğunda 75 cm² doku kültür kaplarına alındı ve kaplar %5 CO₂, %95 hava ve %90 bağıl nem içeren 37°C sıcaklığa ayarlı inkübatöre yerleştirildi. Her pasajda hücrelerin bir kısmı -86°C'da dondurularak saklandı. Hücre çoğaltma işlemi Pasaj 5'e kadar sürdürüldü.

3.2.5 iAMKH'lerin damar endotel benzeri hücrelere farklılaşması

Pasaj 2-5 arasında dondurulmuş iAMKH'leri damar endotel benzeri hücrelere (DEbH'lere) farklılaştırma çalışmalarında kullanıldı. Özetle; pasaj 3'de kültürde olan iAMKH'leri steril PBS ile birkaç tur yıkandıktan sonra (serumu uzaklaştırmak için) %0,05 tripsin/0,53 mM EDTA içeren 5 ml çözeltiyle yaklaşık olarak 8-10 dakika muamele edilerek yapışan hücrelerin kültür kabından ayrılması sağlandı. Bu işlemin ardından kültür kabına serumlu KHÇV ilave edilerek hücre süspansiyonu 15 ml'lik santrifüj tüpüne alındı. Hücre süspansiyonu 1500 devir/dakikada 25°C sıcaklıkta 7 dakika boyunca santrifüj edildi. Dibe pellet halinde çöken hücreler tekrar KHÇV ile muamele edilerek dağıtıldı ve %2 sığır deri jelatini kaplı 8 kuyucuklu slaytlara her bir kuyucuğa 1×10^5 hücre düşecek şekilde ekildi. Hücrelerin zemine yapışması için kültür 48 saat süre ile %5 CO₂, %95 hava ve %90 bağıl nem içeren 37°C sıcaklığa ayarlı inkübatörde sürdürüldü. 48 saatin ardından farklılaşma çalışmalarına geçildi. Farklılaşma için kök hücreler ticari olarak mevcut EGM-2 Bullet Kit ile 7 ve 14 gün boyunca kültüre edildi.

3.2.5.1 DEbH'lerin immünojenotipik karakterizasyonu

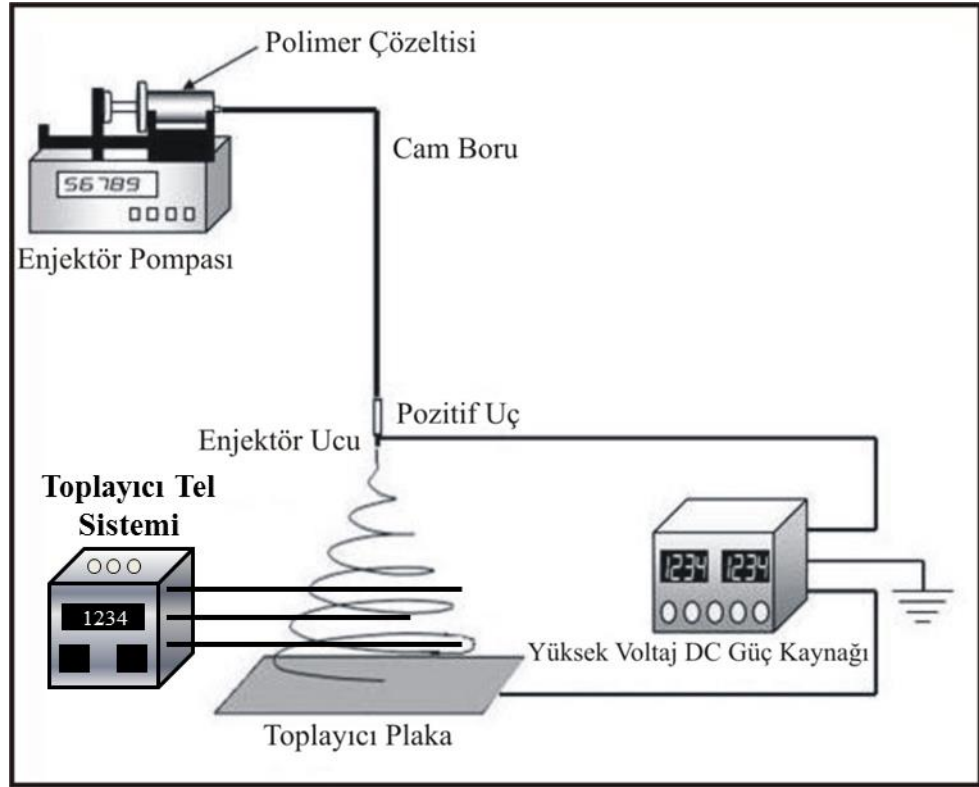
Örnekler soğuk metanolde (-20°C'da) tesbit edilip havada kurutulduktan sonra bidestile su ile yıkandı, 10 dakika hidrojen peroksit blok ile muamele edildikten sonra bidestile su ile tekrar yıkanıp 5 dakika ultra V blok ile inkübe edilip, %1'lik FBS içeren PBS ile 1:50 oranında seyreltilerek hazırlanmış birincil antikorla (fare anti-insan CD31, CD34, CD144, Tie-2, vWF, Flk-1) oda sıcaklığında 60-120 dakika süre ile etkileştirildi. Bidestile su ile yıkama sonrası, 10 dakika ikincil antikor (keçi anti-fare) ile inkübe edilen örnekler tekrar suyla yıkanıp streptavidin peroksidaz ile 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Son olarak, kromojen-AEC substrat karışımı ile 5-20 dakika kadar inkübe edilen hücreler yıkandı ve ışık mikroskobu altında görüntülenip fotoğraflandı.

3.2.6 Elektro-eğirme işlemi

Elektro-eğirme çalışmalarında ilk olarak yüksek gerilim güç kaynağının optimizasyonu gerçekleştirildi. Deneylere başlarken tüm kullanılan malzemeler topraklandı. Yüksek gerilim doğru akım (DC) güç kaynağı cihazı aracılığı ile elektro-eğirme işlemi yapıldı. Yüksek gerilim güç kaynağının pozitif ucu "+", enjektör ucuna bir krokodil (timsah) uçlu kablo (timsah ağzı) yardımı ile tutturuldu. Toplayıcı plaka ile cihazın geri dönüşü "-" aynı toprak hattı üzerinden verildi. Enjektör ucu ile toplayıcı plaka uygun bir mesafeye ayarlandı. Polimer çözeltisi 10 ml hacimli bir cam enjektör içerisinden bir enjektör pompası yardımıyla kontrollü bir hızda güç kaynağının pozitif kutbu üzerinden elektrik alan oluşturulan bölgeye gönderildi.

Uygun çapta lif elde etmek için farklı gerilim değerleri (0-33 kV) ve ejektör pompası hızı çalışmaları yapıldı. Polimer çözeltisi, pompa hızı 5-500 µl/dakika arasında değiştirilerek pozitif ana yükleme merkezine gönderildi. Farklı enjektör iç çaplarının (20-30G) nano/mikro lif oluşumu üzerine etkisi araştırıldı. Nano/mikro lif tabanlı hücre iskelesi hazırlamak için FDA tarafından onaylı bir biyopolimer olan PCL elektro-eğirme sistemine uygulandı.

PCL, %0,6 NaCl içeren diklorometan/metanol (7:3) çözücü sistemi içinde sırasıyla %1, %2, %5, %10 (m/v)'lik derişimler de çözümlenerek elektro-eğirme için en uygun derişim araştırıldı. Elektro-eğirme işleminin tüm parametreleri çalışılarak sistem optimize edildi. Tübüler formda lifsi iskele hazırlamak için ise polimer fışkırığı, 2 mm çapında dönen paslanmaz çelik tellere sarılarak toplandı. Tellerin dönüş hızı yaklaşık olarak 100 rpm'ye ayarlandı (TPE 2012/01600).



Şekil 3.2 Nano/mikro lifsi tabaka ve tübüler iskele üretiminde kullanılan elektro-eğirme düzeneğinin şematik gösterimi

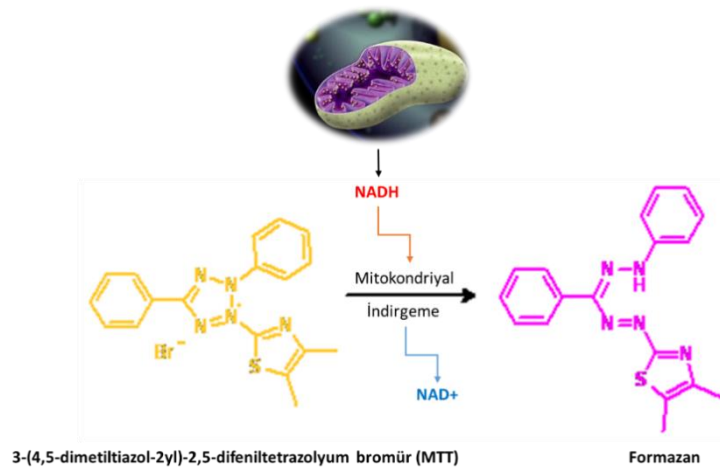
3.2.7 Çok katlı hibrit damar doku mühendisliği iskelesinin hazırlanması

İskelenin *medya* ve *adventisya* tabakalarının inşası için tip I kollajen ve elastin kullanıldı. Özetle; Elektro-eğrilmiş PCL tübüler iskele bir kalıp içine yerleştirildi ve gözenek oluşturmaya madde (sodyum bikarbonat kütlece-%40) içeren elastin/kollajen (1/1,5 kütlece-%) hidrojel bu tübüler yapı etrafına döküldü. Kalıp daha sonra hızlı bir şekilde -80 °C'a ayarlı bir dondurucu içine yerleştirildi. Yaklaşık olarak bir gün süre ile

kalıp bu dondurucu içinde bekletildi. Bu sürenin ardından dondurucudan çıkartılan kalıp 24 saat süre ile liyofilize edildi. Elastin/Kollajen/PCL çok katlı tübüler iskele N-hidroksi süksinimit (NHS) ve N-Etil-N'-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidroklorür (EDC) kullanımıyla çapraz bağlandı. Birkaç yıkama işleminin ardından çok katlı bu tübüler iskele tekrar liyofilize edildi ve kullanılacağı zamana kadar + 4°C'da saklandı (TPE 2012/01600).

3.2.8 Hücrelerin proliferasyon kapasitesinin belirlenmesi

iAMKH'lerin, DDKbH'lerin ve DEbH'lerin proliferasyon kapasitelerinin doku kültür kabı ve üretilen biyomalzemeler üzerindeki canlılık ve çoğalma düzeyleri incelenerek araştırıldı. Bu işlem için canlı hücrelerde etkin olan mitokondriyal dehidrogenaz enziminin tetrazolyum tuzu MTT'yi parçalamasına dayanan kolorimetrik proliferasyon ve canlılık belirleme yöntemi olan MTT testi kullanıldı. $5,0 \times 10^4$ hücre/ml yoğunluğunda 24 kuyucuklu doku kültür kaplarına ve malzemeye ekilen hücreler 270 µL besi yeri içerisine 30 µl taze MTT çözeltisi (5 mg/ml) içeren reaktif ile 37°C ve %5 CO₂ ortamı sağlayan inkübatörde 4 saat süreyle inkübe edildi. Hücreler tarafından alınarak mitokondriyal işlemle çözünmeyen mavi-mor bir boya olan formazana dönüştürülen MTT ürünü invert mikroskopta görüntülendi. Spektrofotometrik ölçümler 570 nm dalga boyunda gerçekleştirildi. Deneyler 1, 3, 7, 14. günler boyunca takip edildi.



Şekil 3.3 MTT reaktifinin mitokondri tarafından formazana indirgenme reaksiyonu

3.2.9 DEbH'lerin nano/mikro lifsi PCL tabaka üzerine ekimi

Elektro-eğirme tekniği kullanılarak elde edilen ve 3 Boyutlu-Doku Mühendisliği Damar Grefti (3B-DMDG)'nin *intima* bölgesini oluşturan nano/mikro lifsi yapıya sahip PCL tabakalar uygun iskele taşıyıcı kalıplara alınarak 1-2 saat süre ile laminer akış sağlayan bir kabin içerisinde steril edildi. Ardından 24 kuyucuklu doku kültür kaplarına alınan yapılar üzerine EGM-2 Bullet Kit ilave edildi ve 5-10 dakika %5 CO₂, %95 hava ve %90 bağıl nem içeren 37°C sıcaklığa ayarlı bir inkübatöre yerleştirilerek tabakaların ıslanması sağlandı.

Daha sonra yeteri bolluğa ulaşmış (%90) DEbH'leri tripsinleme işlemine tabi tutuldu. Bu işlem için hücreler ilk önce steril PBS ile birkaç tur yıkandıktan sonra (serumu uzaklaştırmak için) %0,05 tripsin/0,53 mM EDTA içeren 5 ml çözeltiyle yaklaşık olarak 3-5 dakika muamele edilerek yapışan hücrelerin doku kültür kabından ayrılması sağlandı. Bu işlemin ardından kültür kabına besi yeri ilave edilerek hücre süspansiyonu 15 ml'lik santrifüj tüpüne alındı. Hücre süspansiyonu 1100 devir/dakikada 25°C sıcaklıkta 7 dakika boyunca santrifüj edildi. Dibe pellet halinde çöken hücreler tekrar besi yeri ile muamele edilerek dağıtıldı. Hücreler 5,0 x 10⁴ hücre/ml yoğunluğunda nano/mikro lifsi yapıya sahip PCL tabakalar üzerine ekildi. Farklı zaman noktalarında tesbit edilen örnekler taramalı elektron mikroskobu ile görüntülendi.

3.2.10 DDKbH'lerin gözenekli kollajen/elastin süngerimsi iskeleye ekilmesi

Dondurarak-kurutma tekniği kullanılarak işlenmiş ve 3B-DMDG'nin *medya-advertisya* tabakalarını oluşturan kollajen/elastin süngerimsi yapı 1-2 saat süre ile laminer akış sağlayan bir kabin içerisinde steril edildi. Ardından 24 kuyucuklu doku kültür kaplarına alınan süngerimsi iskeleler üzerine yeteri bolluğa ulaşan (%90) DDKbH'ler kısım 3.2.9'da tarifi verilen biçimde tripsinlenip ekilerek %5 CO₂, %95 hava ve %90 bağıl nem içeren 37°C sıcaklığa ayarlı bir inkübatöre alındı. Hücreler 5.0 x 10⁴ hücre/ml yoğunluğunda kollajen/elastin süngerimsi iskeleler üzerine ekildi. Farklı zaman noktalarında tesbit edilen örnekler taramalı elektron mikroskobu yardımı ile görüntülendi.

3.2.11 Güçlendirilmiş-Elastin/Kollajen/PCL çok-katlı tübüler iskele üretimi

Elastin/Kollajen/PCL çok-katlı tübüler formdaki iskelenin mekanik özelliklerini arttırmak için üretim protokolü revize edildi. Özetle; Elektro-eğrilmiş PCL tübüler iskele bir kalıp içine yerleştirilmiş ve çevresi Poli(glikolik-ko-L-laktit)[Glaconer91] (PGLA) (4/0) örgülü sentetik emilebilir suture ile simetrik olacak şekilde örgü içine alındı. Ardından bu yapı %2 elastin içeren bir çözeltiye birkaç tur daldırılarak kurutuldu. Bu işlemlerin ardından kısım 3.2.7’de tarif edildiği biçimde iskele üretim protokolü takip edildi.

3.2.12 İskelelerin biyomekaniksel özelliklerinin incelenmesi

İskele hazırlama aşamasının çeşitli evrelerinde alınan örneklerin ıslak ve kuru formunun mekaniksel özellikleri tek yönlü yükleme hücresine sahip bir mekanik test cihazı kullanılarak incelendi. Kuru formda nano/mikro lifsi PCL tüp, kuru formda Elastin/Kollajen/PCL tüp, ıslak formda Elastin/Kollajen/PCL tüp, kuru formda Güçlendirilmiş-Elastin/Kollajen/PCL tüp, ıslak formda Güçlendirilmiş-Elastin/Kollajen/PCL tüp ve kontrol grubu olarak insan göbek bağı arteri (iGBA) tek yönlü çekme testine tabi tutuldu. Sonuçlar USB ara yüzü üzerinden bilgisayara aktarılıp bir yazılım (Trapezium X, Shimadzu) yardımı ile işlendi.

3.2.13 DDKbH’lerin ve DEbH’lerin Elastin/Kollajen/PCL çok katlı tübüler iskelesi üzerine ekimi (statik çalışmalar)

Tarif edilen biçimde hazırlanan ve önceden steril edilen Elastin/Kollajen/PCL’den mamul 3B-DMDG üzerine/içine DDKbH’ler (1×10^6 hücre/ml) ve DEbH’ler (1×10^6 hücre/ml) ayrı ayrı olacak şekilde ekilerek %5 CO₂, %95 hava ve %90 bağıl nem içeren 37°C sıcaklığa ayarlı bir inkübatörde kültüre alındı. Farklı zaman noktalarında tesbit edilen DEbH’lerin etkileştirildiği 3B-DMDG’ne ve DDKbH’lerin etkileştirildiği 3B-DMDG’ne ait örnekler taramalı elektron mikroskobu yardımı ile görüntülendi.

3.2.14 Gerçek zamanlı akış-basınç ölçümlü perfüzyon biyoreaktör sistemin kurulması ve damar hücre hatlarının 3B-DMDG'ne ekimi (dinamik çalışmalar)

Peristaltik tarafından oluşturulan iç-dış akış ve basınç, sisteme seri olarak bağlanan akış ölçerler ve basınç transdüserleri tarafından takip edildi. Oluşan sinyaller USB ara yüze sahip 8 kanallı veri kayıt cihazları ile bilgisayara gönderilip bir yazılım üzerinden gerçek zamanlı olarak akış (ml/dakika) ve basınç (mmHg) kayıt altına alındı. Biyoreaktör sisteminde perfüzyon hücresi, besi yeri kabı ve ölçüm cihazları birbirlerine 2 mm iç çaplı silikon hortum sistemi ile bağlanmıştır.

Biyoreaktör sisteminin steril koşullarda kurulumunu takiben hazırlanan 3B-DMDG'ne hücre ekimi çalışmalarına geçildi. Steril edilen 3B-DMDG perfüzyon ünitesine teflon iplikler aracılığı ile sıkıca bağlandı. Bu işlemin ardından iskele bağlı perfüzyon ünitesi UV ışık altında tekrar steril edildi (25-30 dakika). 3B-DMDG'nin *medya-advertisya* tabakasına statik olarak DDKbH'leri ekilerek (5×10^3 hücre/mm³) perfüzyon ünitesi kapatıldı. Peristaltik pompa ve cihazlar dışında kalan tüm parçalar %5 CO₂, %95 hava ve %90 bağıl nem içeren 37°C sıcaklığa ayarlı inkübatöre alındı ve hücrelerin yapıya tutunmaları için 2-4 saat aralığında beklendi. Süre sonunda dış akış hızı 400 µL/dakika olacak şekilde peristaltik pompa çalıştırıldı. Perfüzyon ünitesinin dış kısmından DDKbH'lerin besi yeri geçirilirken lümen kısmından ise DEbH'lerin besi yeri geçirildi. Yaklaşık 10 gün süre ile sistem bu şekilde çalıştırıldı. Hız 7-10. günler arasında 1,0 ml/dakika olacak şekilde tekrar değiştirildi. 10. günün sonunda DEbH'ler (6×10^6 hücre) dinamik olarak akışta 3B-DMDG'ne ekildi. Bunun için iç akış hızı 400 µL/dakika olacak şekilde peristaltik pompa programlandı. Yaklaşık 5 gün daha sistem bu şekilde çalıştırıldıktan sonra hız gradientli olarak artırıldı ve akış-basınç değerleri gerçek zamanlı (6 gün boyunca) olarak kayıt altına alındı. 21. gününün sonunda 3B-DMDG perfüzyon sisteminden çıkartılarak %2,5'lik glutraldehit (PBS içinde hazırlanan) içinde tesbit edildi. Daha sonra alkol serilerinden geçirilen örnekler taramalı elektron mikroskobu ile fotoğraflandı.

3.2.15 İmmün/histokimya çalışmaları (statik ve dinamik çalışmalar)

%2,5'luk gluteraldehit çözeltisi ile en az 2 gün süre ile tesbit edilen Statik-3 Boyut ve Dinamik-3 Boyut örnekleri kriyo tamponu (potasyum hidrojen fosfat, sakkaroz ve su) ile 2 kez 10 dakika yıkandı. Yıkama işleminin ardından örnekler 0,2 M potasyum fosfat stok çözeltisi içeren kaplara alınarak 15-20 dakika süre ile bekletildi. Süre sonunda alınan örnekler doku dondurma çözeltisi ile kaplanıp yaklaşık 15 dakika süre bu çözelti içerisinde tutuldu. Doku dondurma çözeltisinin donması ile birlikte 5-8 µm kalındığında kesitler kriyo-mikrotom cihazı ile alındı.

Alınan kesitler öncelikle bidestile su ile yıkandı, 10 dakika hidrojen peroksit blok ile muamele edildikten sonra bidestile su ile tekrar yıkanıp 5 dakika ultra V blok ile inkübe edilip, DDKbH'ler ekilmiş örnekler %1'lik FBS içeren PBS ile 1:50 oranında seyreltilerek hazırlanmış birincil antikorla (fare anti-insan αSMA, CALP, CADH, CADL ve MY-HC), DEbH'ler ekilmiş örnekler %1'lik FBS içeren PBS ile 1:50 oranında seyreltilerek hazırlanmış diğer birincil antikorla (fare anti-insan CD31, CD34, CD144, Tie-2, vWF, Flk-1) ve iAMKH'ler ekilmiş örnekler ise bu iki hücre hattı için seçilmiş birincil antikorlar ile oda sıcaklığında 60-120 dakika süreyle etkileştirildi.

Bidestile su ile yıkama sonrası, 10 dakika ikincil antikor (keçi anti-fare) ile inkübe edilen örnekler tekrar suyla yıkanıp streptavidin peroksidaz ile 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Son olarak, kromojen-AEC substrat karışımı ile 5-20 dakika kadar inkübe edilmiş olan hücreler yıkandı. Histokimya çalışmaları için örnekler bidestile su ile yıkandıktan sonra Mayer hematoksilin çözeltisi ile 8 dakika boyandı. Süre sonunda kesitler önce bidestile su ile daha sonra %95'lik etanol ile 10 dakika yıkandı. Daha sonra Eozin-Pholxine B çözeltisi ile 30-60 saniye karşıt boyama yapıldı. Boyamanın ardından kesitler %95'lik etanol ile yıkanıp havada kurutulmuş ve ışık mikroskobu altında görüntülenip fotoğraflandı.

4. BULGULAR

4.1 iAMKH'lerin Kùltürü

Hücrelerin -86°C'dan alınıp çözüldükten yaklaşık 24 saat sonra tutunup yayılmaya başladıkları gözlemlendi. 10. günün sonunda yaklaşık %80 bolluğa ulaşan hücreler pasajlanarak alt kùltürlere geçildi. Hücre morfolojisi inversiyon mikroskobu altında düzenli olarak takip edildi (Şekil 4.1).

4.1.1 Akım sitometri sonuçları

Adipoz dokudan izole edilerek çoğaltılan ve yapışan hücrelerin yüzey antijen paneli çizelge 4.1'de verilmiştir. Uluslararası Hücresel Terapi Derneği'nin Mezenkimal ve Doku Kök Hücre Komitesi'nin "mezenkimal kök hücreler" için belirlemiş olduğu CD kriterlerine göre CD73, CD90, CD105 pozitif olurken, hematopoietik hücre hattı belirteçlerinden c-kit, CD14, CD11b, CD34, CD45, CD19, CD79 ve (HLA)-DR antijenleri negatif olmalıdır.

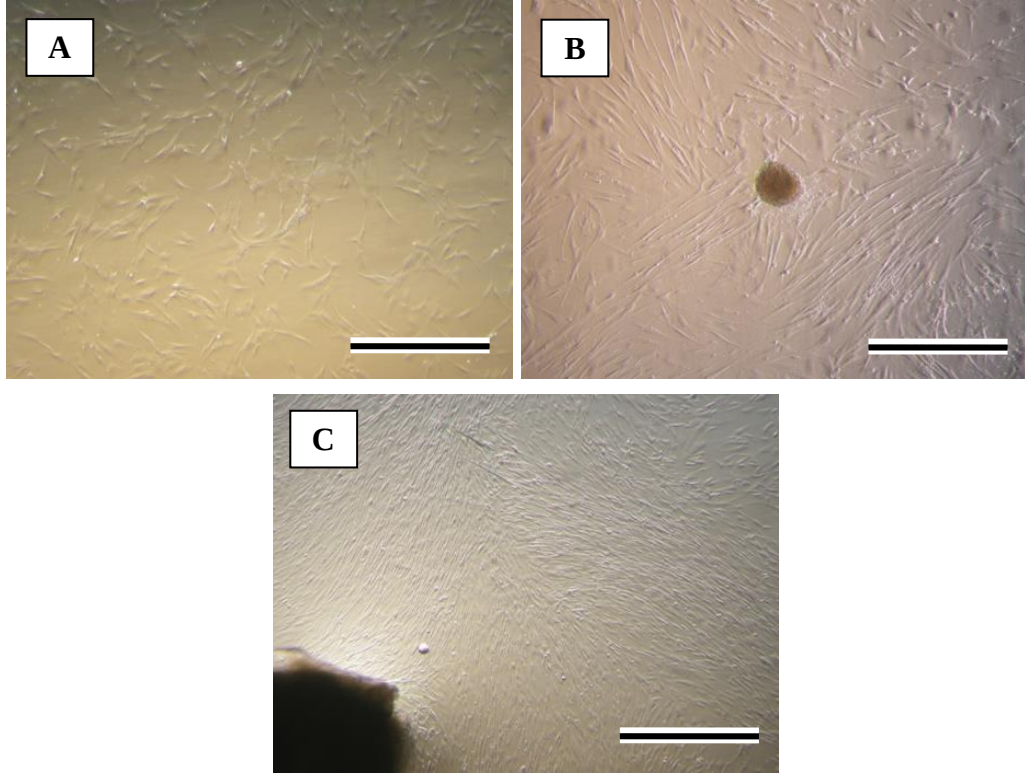
Çizelge 4.1 incelendiğinde hücrelerin CD73 (%91,9), CD90 (%98,4), CD105 (%96)"in yanı sıra, CD29 (%95,4), HLA-ABC (%89,9), CD166 (%91,2) ve CD44 (%98,3)"ü yüksek düzeyde ifade ettiği gör÷lmektedir. Diğer yandan, CD34 (%5,9), CD45 (%5,6), HLA-DR (%4,9), CD133 (%2,6), CD3 (%3,0), CD31 (4,0) ve CD146 (%6,0) ise bu hücreler tarafından ihmal edilebilecek düzeyde ifade edilmektedir.

Çizelge 4.1 iAMKH'lerin yüzey antijen paneli ve elde edilen bulgular

Antijen	Sonuç	Oran (-/+)
CD29-FITC	%95.4	Pozitif
CD90-PE	%98.4	Pozitif
CD73-PE	%91.9	Pozitif
CD34-FITC	%5.9	Negatif
HLA_ABC-PE	%89.9	Pozitif
HLA_DR-FITC	%4.9	Negatif
CD166-PE	%91.2	Pozitif
CD105-PE	%96	Pozitif
CD133-PE	%2.6	Negatif
CD3-FITC	%3	Negatif
CD31-FITC	%4	Negatif
CD146-PE	%6	Negatif
CD45-PE	%5.6	Negatif
CD44-PE	%98.3	Pozitif

4.2 iGBADKH'nin ve iİMADKH'nin İzolasyonu ve Kültürü

Kültüre alınan iGBADKH'lerinin eksplanttan doku kültür kabına doğru 7. günün sonunda göçe başladığı ve 14. günün sonuna doğru ise %90 bolluğa ulaştığı gözlemlendi. iGBADKH'lerinin fibroblastik içsi morfolojileri inversiyon mikroskobu yardımı ile görüntülenip fotoğraflandı (Şekil 4.1). Benzer şekilde iİMADKH'lerinin eksplanttan doku kültür kabına doğru göç etmesi ve doluluk noktasına gelmesi inversiyon mikroskobu yardımı ile görüntülenip fotoğraflandı (Şekil 4.1).



Şekil 4.1 İzolasyonlar sonrası kültürlerin inversiyon mikroskobu görüntüleri (Boyut çubukları 100 μ m)

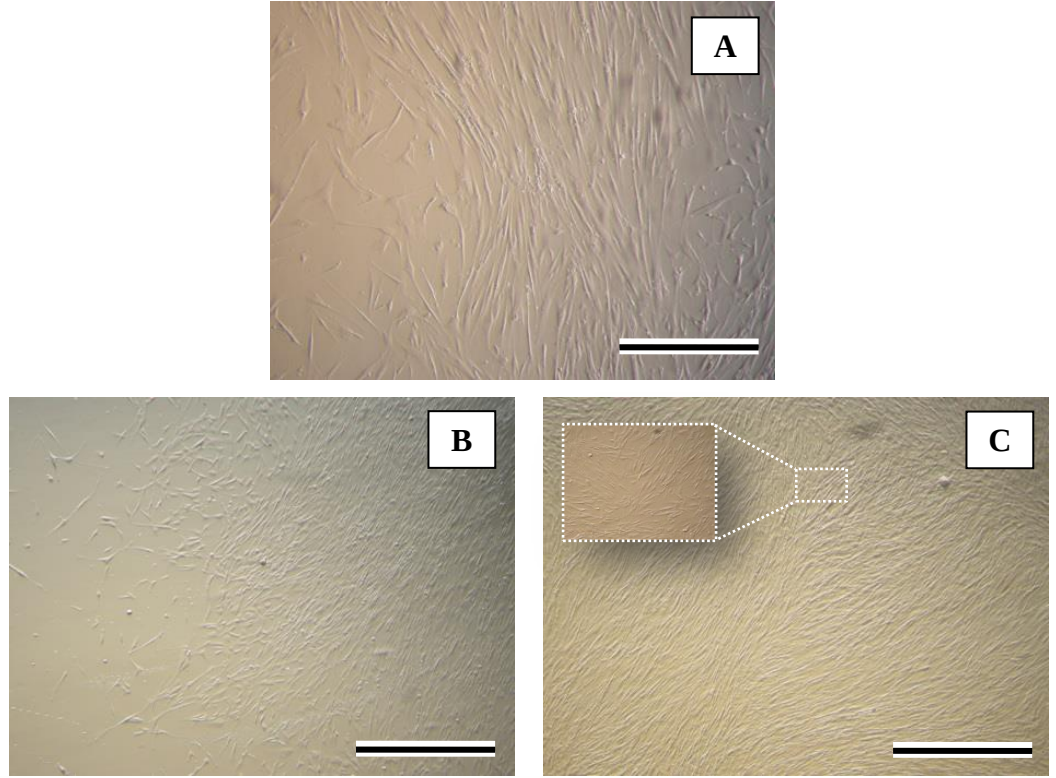
A. Adipoz kaynaklı mezenkimal kök hücreler, B. Göbek bağından izole edilen ve eksplanttan çoğalan damar düz kas hücreleri, C. İç meme arteri eksplant parçasından çoğalan düz kas hücreleri

4.3 iAMKH'lerin DDKbH'lere Farklılaşması

Çalışmalarda iki farklı pozitif kontrol (PK) kullanıldı. Bu iki farklı düz kas hücresi ve iAMKH'lerden DDKbH'lere farklılaşan hücrelerin fibroblastik morfolojileri inversiyon mikroskobu yardımı ile görüntülenip fotoğraflandı (Şekil 4.2). Şekil 4.2'de görüldüğü üzere DDKbH'ler iğsi morfolojik özellikleriyle PK olarak kullanılan arter düz kas hücrelerine benzerlik göstermektedir.

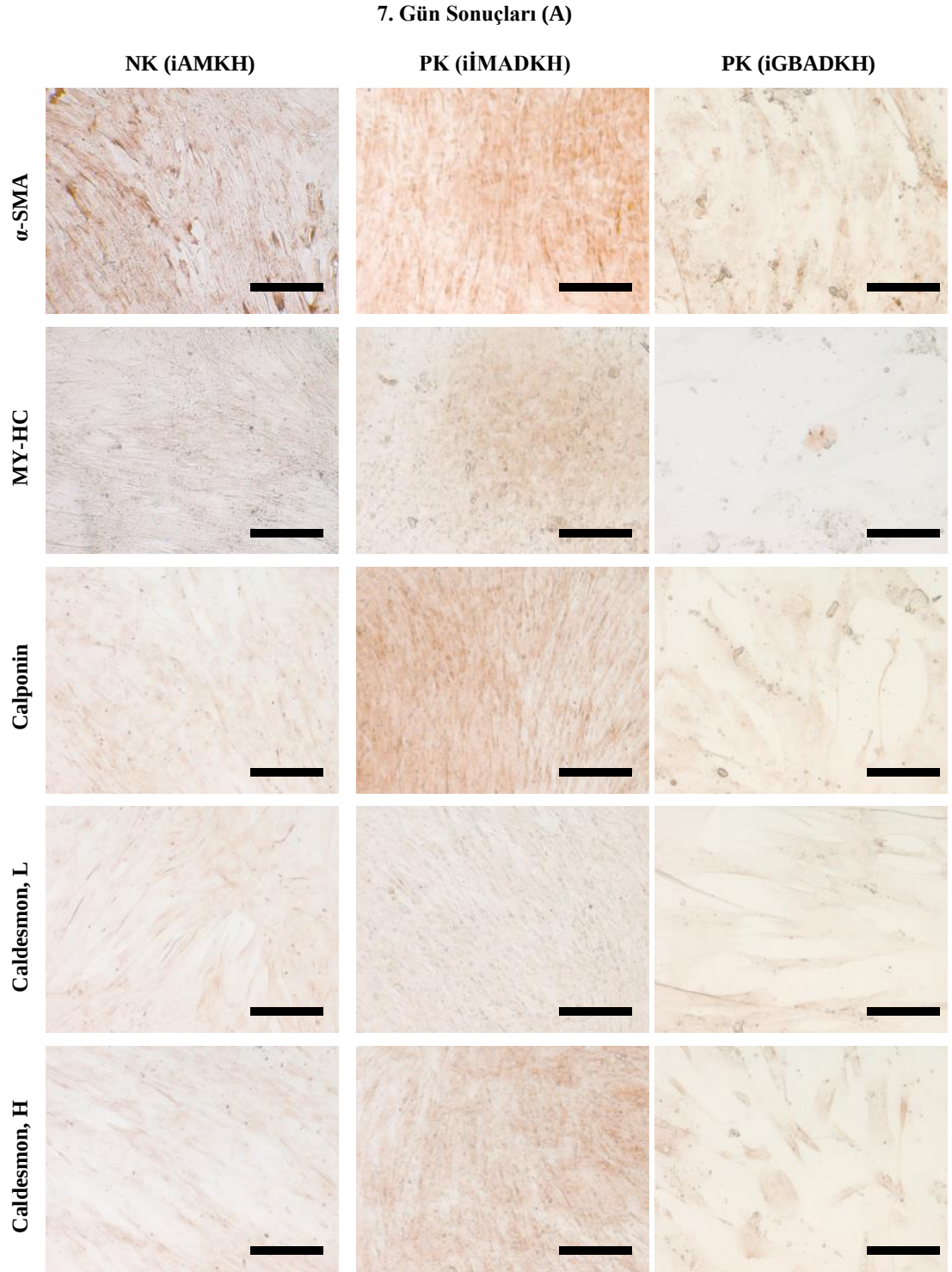
Şekil 4.4-4.5 ve şekil 4.7-4.8 incelediğinde en iyi indükleme kombinasyonunun TGF β 1/BMP4 olduğu görülmektedir. 7 gün boyunca yapılan indüksiyonda α SMA, CALP ve CADH gibi düz kas hücresine özel proteinlerin ifadesinde NK'e göre bariz bir artışın olduğu, 14. günün sonunda ise ifadelerin artarak devam ettiği görülmüştür. Bunun aksine yine düz kas hücresine özgü bir belirteç olan MY-HC ifadesinde ise çok

net bir değişim görülmemiştir. Bunun sebebinin ise MY-HC'nin geç dönem bir düz kas h creti işaretçisi olması ve statik koşullarda ifade edilememesi olarak düşünülmektedir. Bu sonuçlara ilave olarak CADH'un düz kas h creti olmayan hücrelerde (NK'de) düz kas h creti olan hücrelere göre ifadesinin daha yüksek olduğu g r lmektedir. DDKbH'lerin ifade ettiği işaretçilerin PK olarak kullanılan i MADKH'lerine benzer özellikler gösterdiği şekil 4.3 ve şekil 4.6'de g r lmektedir.



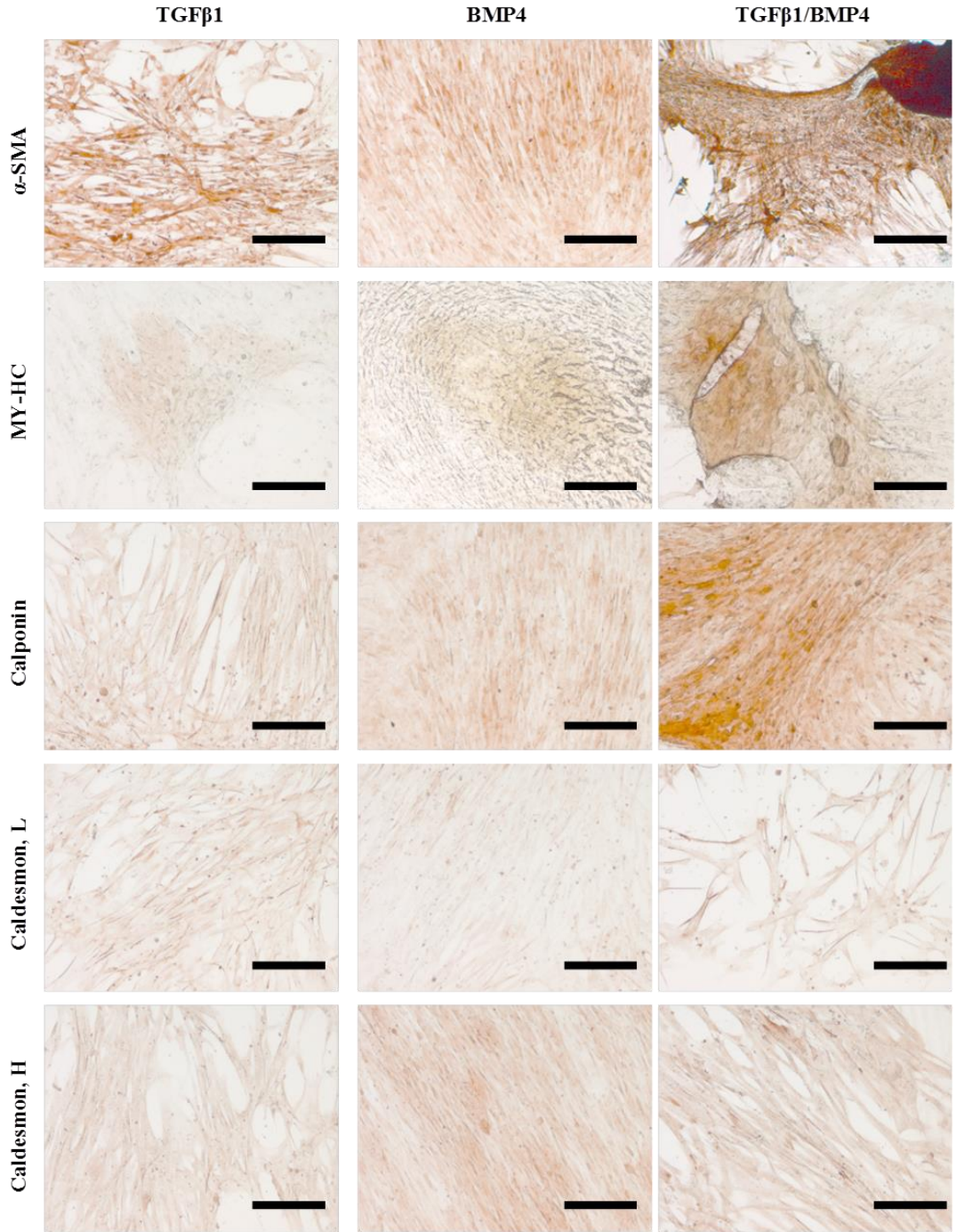
şekil 4.2 Damar düz kas h creti kültürlerinin inversiyon mikroskobu görüntüleri (Boyut ubukları 100  m)

A. iGBADKH, B. i MADKH, C. iAMKH'sinden farklılaşan DDKbH'ler



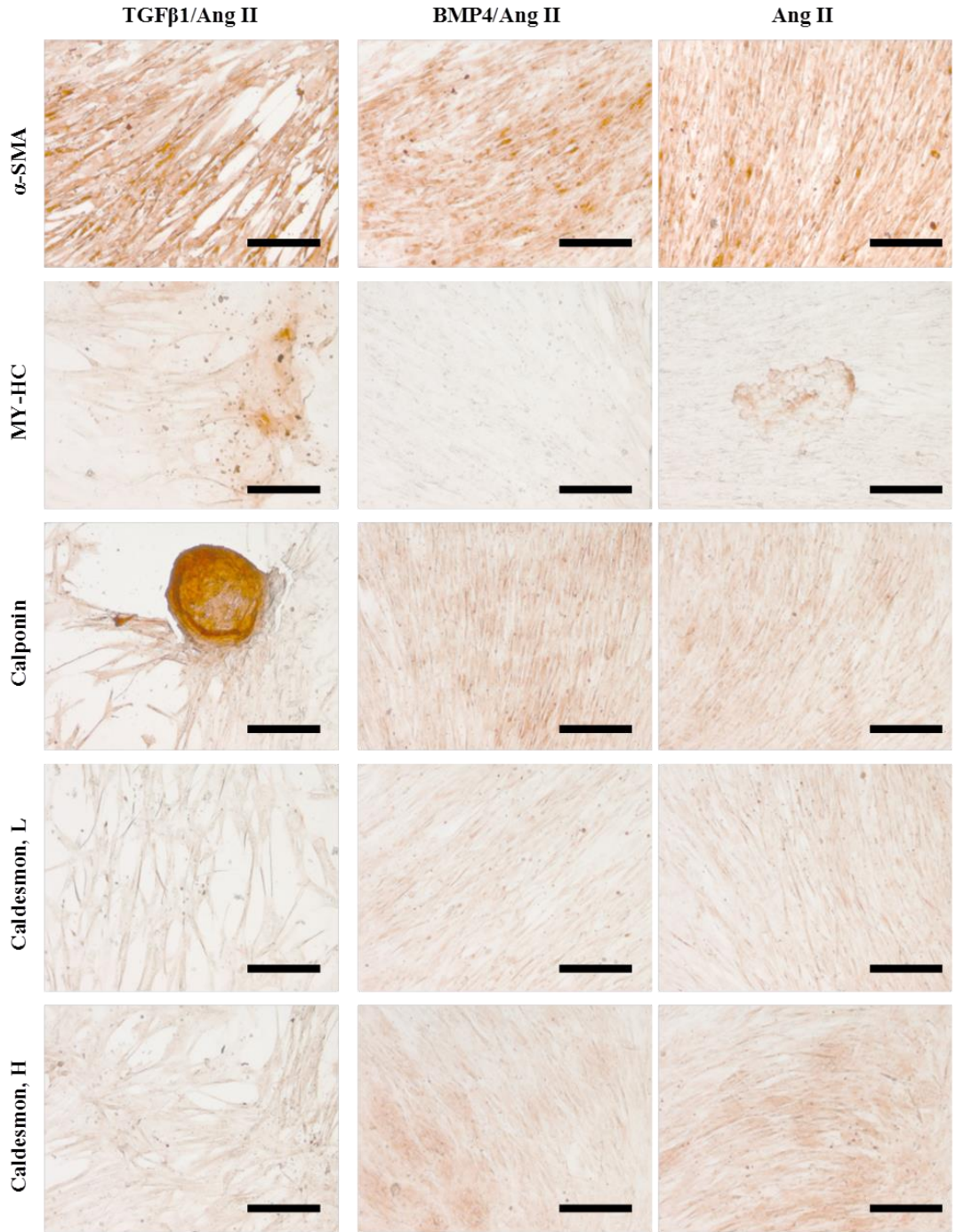
Şekil 4.3 7 gün boyunca kültüre edilen hücrelerin insana karşı farede üretilen α SMA, MY-HC, CALP, CADL ve CADH birincil antikorları ile boyanmasının ışık mikroskobu görüntüsü (Boyut çubukları 25 μ m)

7. Gün Sonuçları (B)



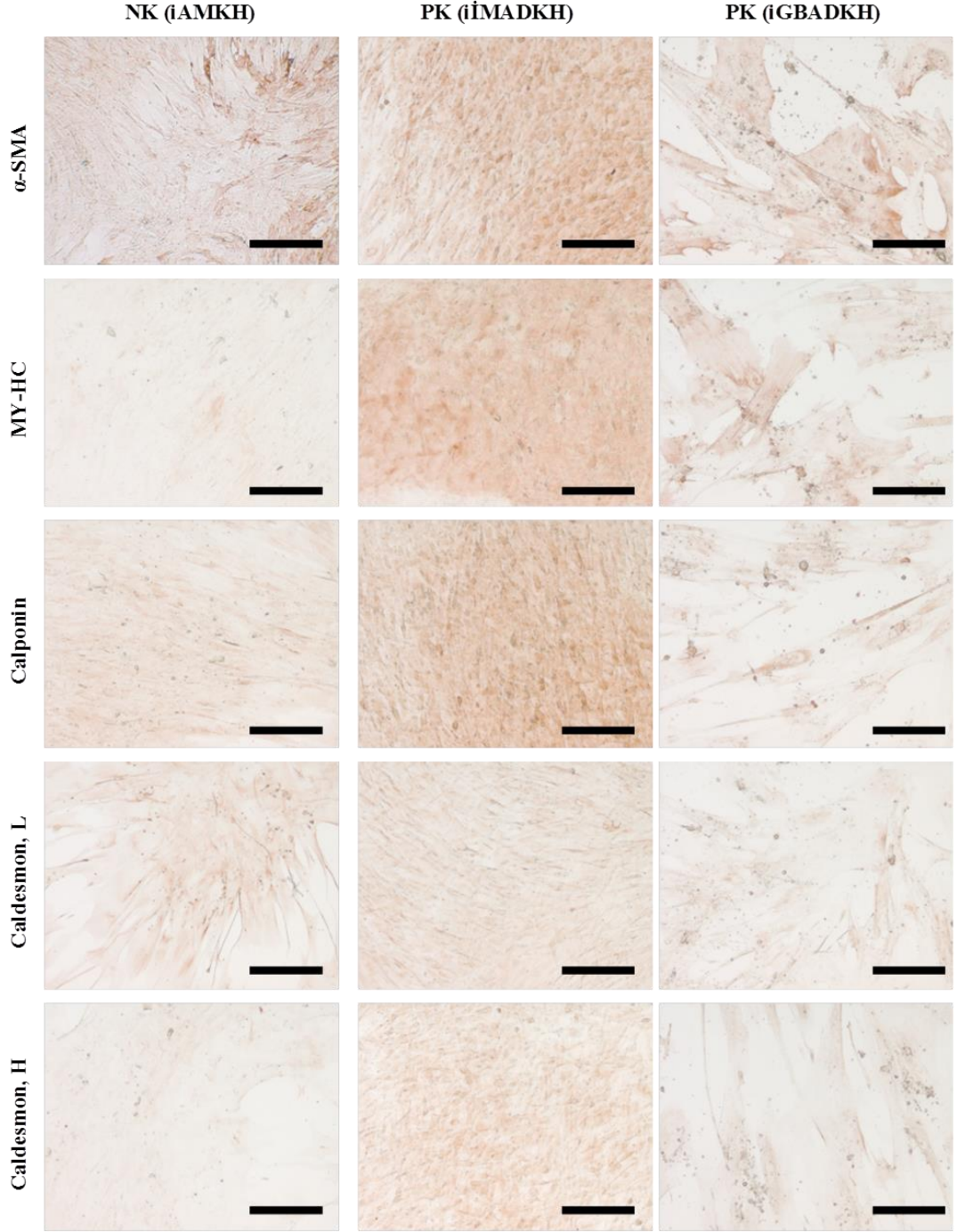
Şekil 4.4 7 gün boyunca büyüme faktörleri ile muamele edilen hücrelerin insana karşı farede üretilen αSMA, MY-HC, CALP, CADL ve CADH birincil antikorları ile boyanmasının ışık mikroskobu görüntüsü (Boyut çubukları 25 µm)

7. Gün Sonuçları (C)



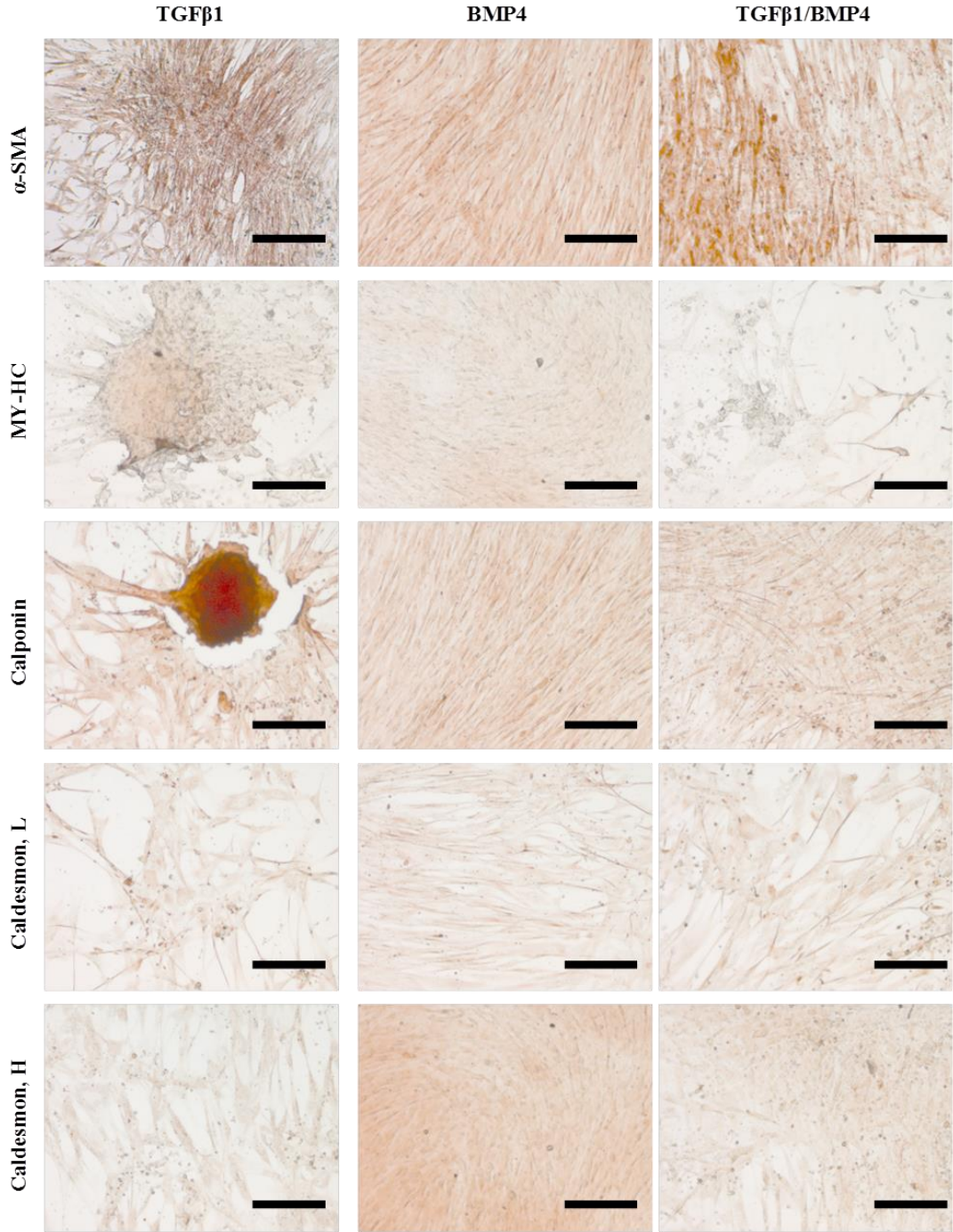
Şekil 4.5 7 gün boyunca büyüme faktörleri ve/veya kemokinle muamale edilen hücrelerin insana karşı farede üretilen αSMA, MY-HC, CALP, CADL ve CADH birincil antikorları ile boyanmasının ışık mikroskobu görüntüsü (Boyut çubukları 25 µm)

14. Gün Sonuçları (A)



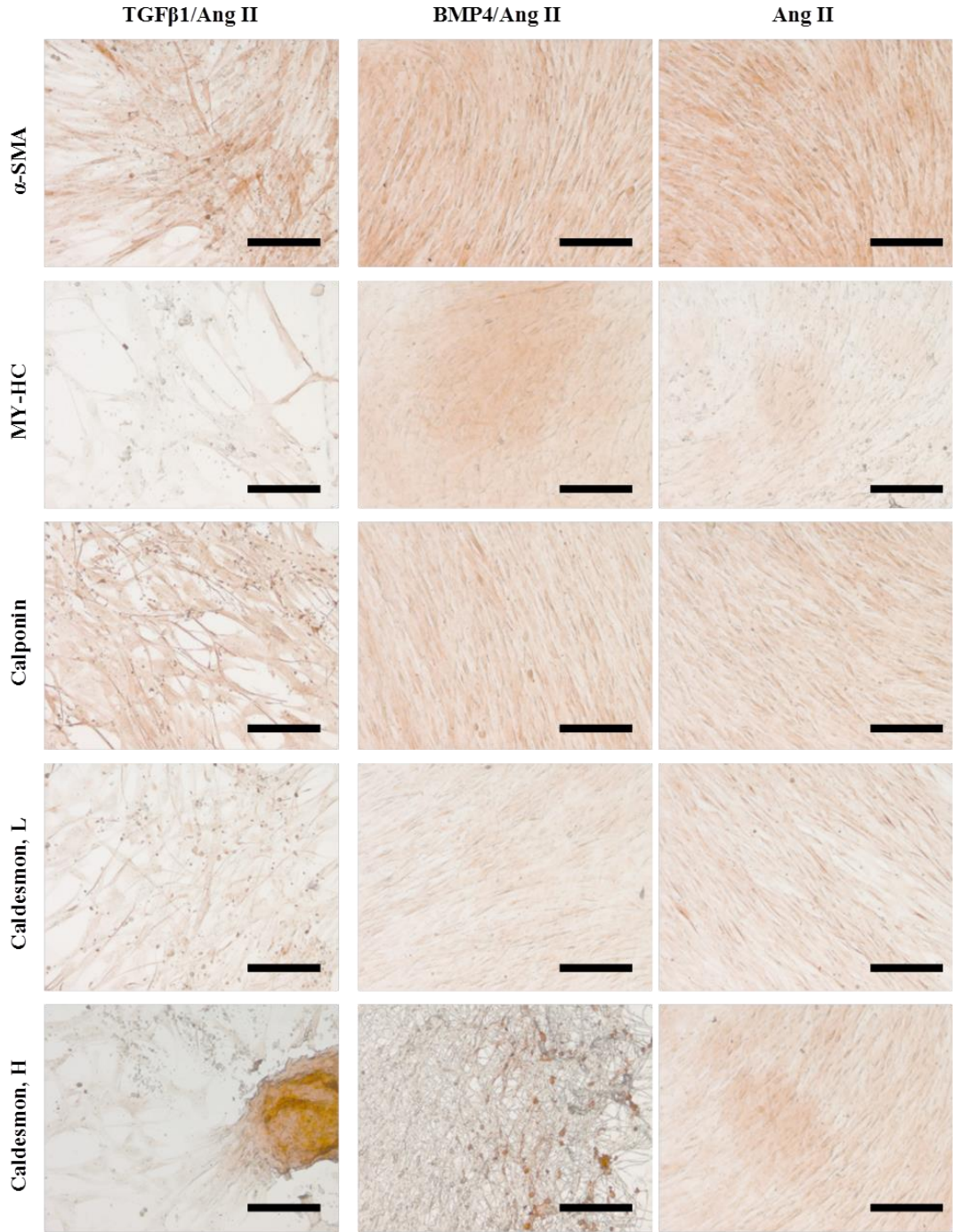
Şekil 4.6 14 gün boyunca kültüre edilen hücrelerin insana karşı farede üretilen α SMA, MY-HC, CALP, CADL ve CADH birincil antikorları ile boyanmasının ışık mikroskobu görüntüsü (Boyut çubukları 25 μ m)

14. Gün Sonuçları (B)



Şekil 4.7 14 gün boyunca büyüme faktörleri ile muamale edilen hücrelerin insana karşı farede üretilen αSMA, MY-HC, CALP, CADL ve CADH birincil antikoru ile boyanmasının ışık mikroskobu görüntüsü (Boyut çubukları 25 µm)

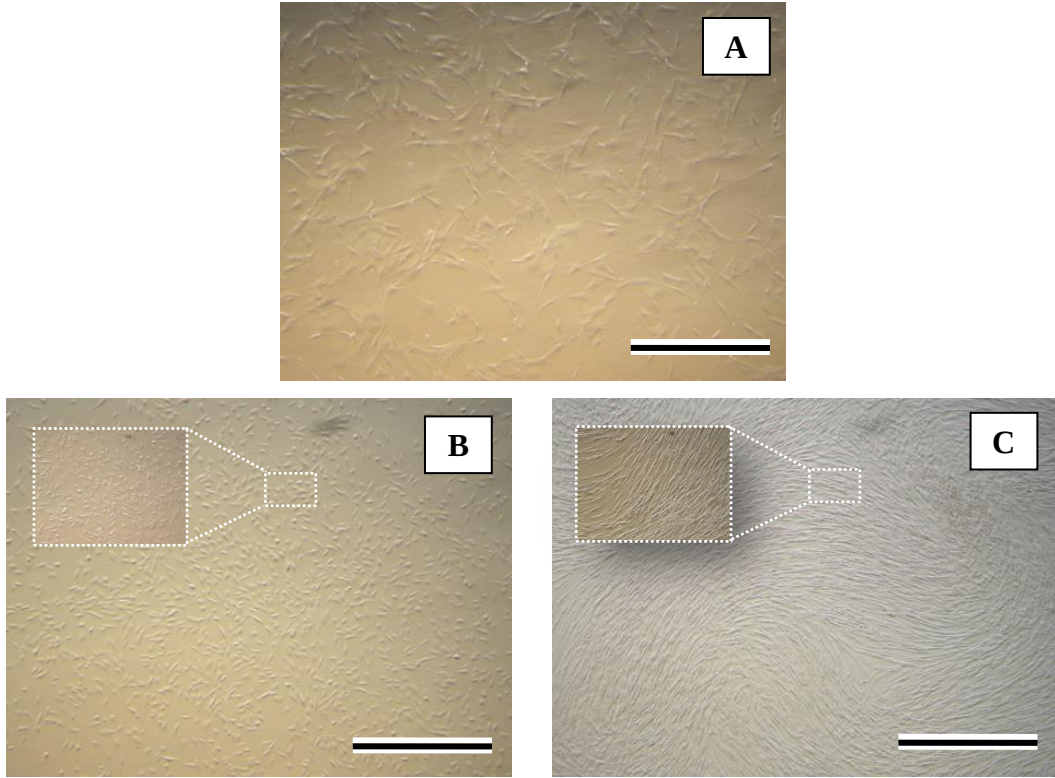
14. Gün Sonuçları (C)



Şekil 4.8 14 gün boyunca büyüme faktörleri ve/veya kemokinle muamele edilen hücrelerin insana karşı farede üretilen αSMA, MY-HC, CALP, CADL ve CADH birincil antikörleri ile boyanmasının ışık mikroskobu görüntüsü (Boyut çubukları 25 µm)

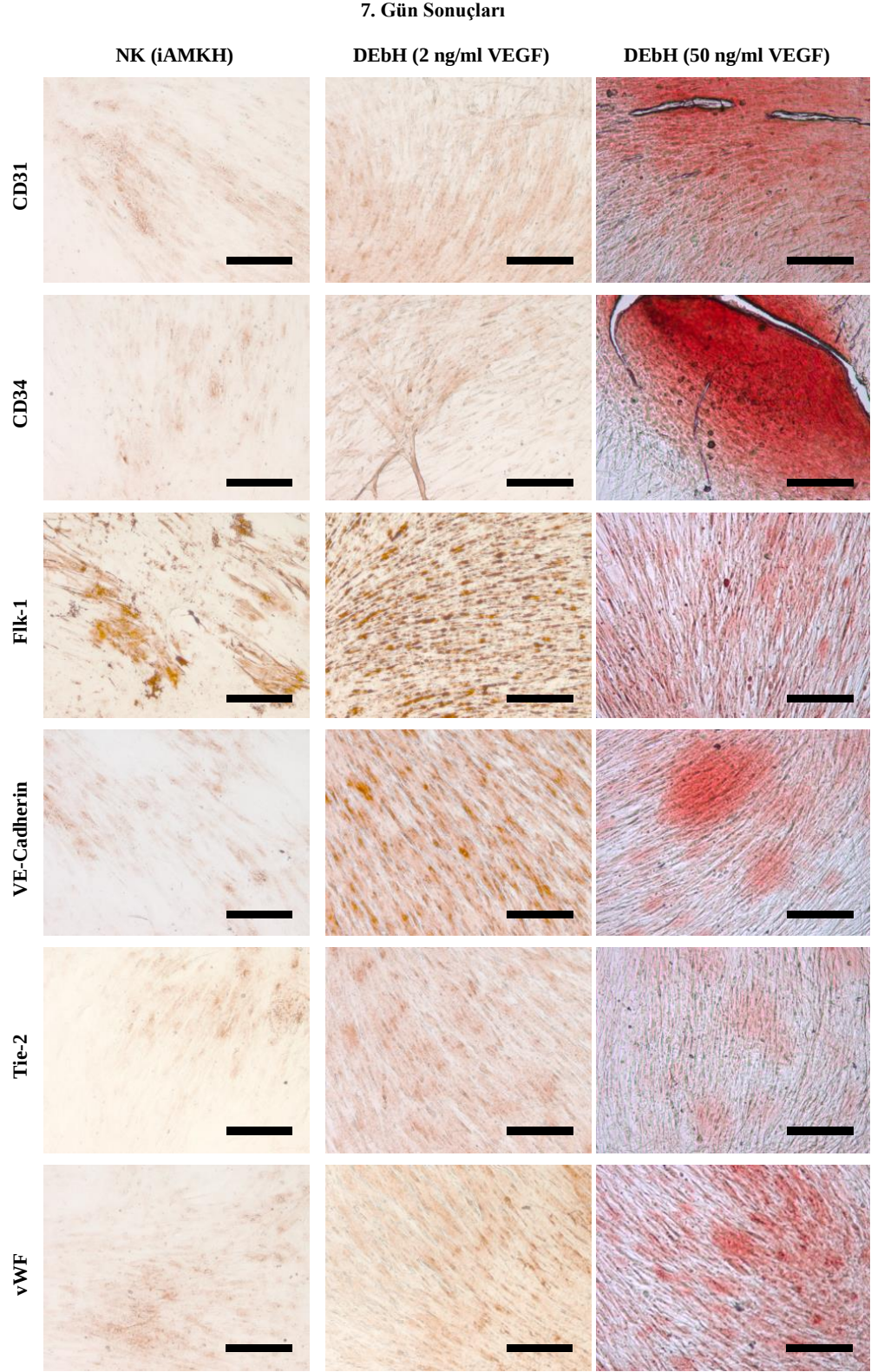
4.4 iAMKH'lerin DEbH'lere Farklılaşması

iAMKH'lerinin iğsi yapısı ve endotel hücrelerin (iMAEH'leri ve DEbH'ler) morfolojileri inversiyon mikroskobu yardımı ile görüntülenip fotoğraflandı (Şekil 4.9). Şekil 4.9'de görüldüğü gibi iç meme arterinden izole edilen endotel hücreler “parke-taşı” morfolojisine sahipken 50 ng/ml VEGF içeren EGM-2 Bullet Kit etkisiyle endotel hücre benzeri hücrelere farklılaşan iAMKH'leri birkaç pasajın ardından literatürde sıklıkla rastlanılan uzun ince ikincil yapılarına dönüşmektedir. Şekil 4.10 incelendiğinde iAMKH'lerin EGM-2 Bullet Kit ile kültüre edilmesiyle CD31, CD34, CD144, vWF, Tie-2 ve Flk-1 gibi endotel işaretçilerin ifadelerinde artışın olduğu görülmektedir.

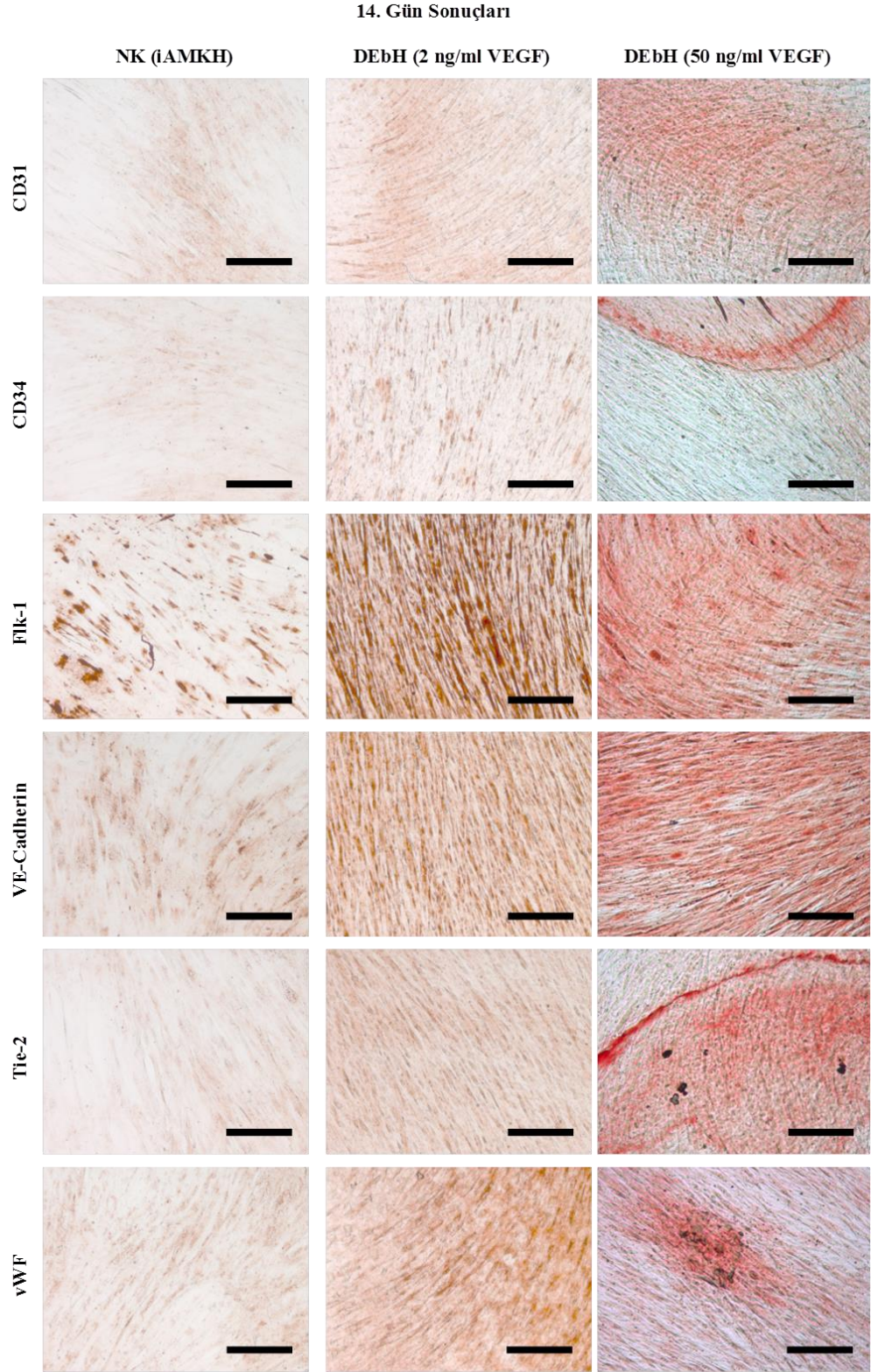


Şekil 4.9 İzolasyon ve indüksiyon sonrası kültürlerin inversiyon mikroskobu görüntüleri (Boyut çubukları 100 μ m)

A. Adipoz kaynaklı mezenkimal kök hücreler (NK), B. İç meme arterinden izole edilen ve eksplanttan çoğalan damar endotel hücreleri, C. iAMKH'lerden EGM-2 Bullet Kit kullanılarak farklılaştırılan damar endotel benzeri hücreler



Şekil 4.10 7 gün boyunca farklı oranlarda VEGF içeren EGM-2 Bullet Kit ile kültüre edilen hücrelerin insana karşı farede üretilen CD31, CD34, CD144, Tie-2, vWF ve Flk-1 birincil antikorları ile boyanmasının ışık mikroskobu görüntüsü (Boyut çubukları 25 µm)

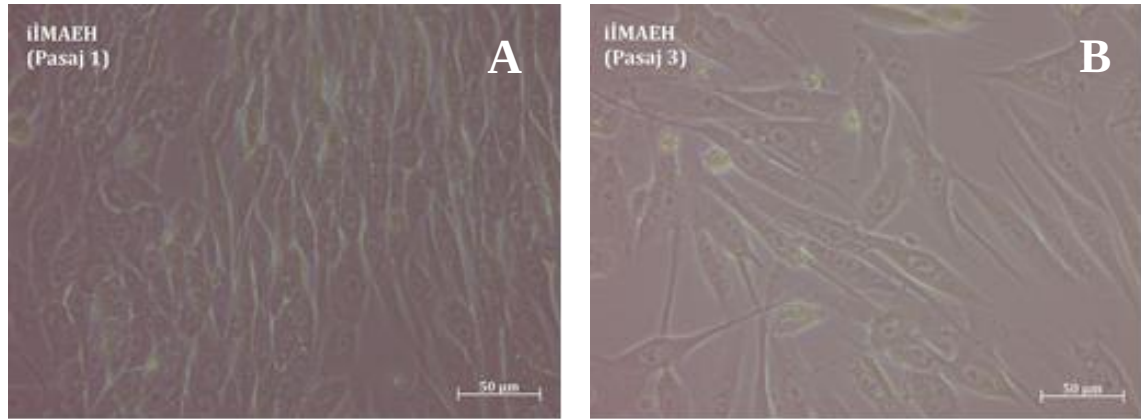


Şekil 4.11 14 gün boyunca farklı oranlarda VEGF içeren EGM-2 Bullet Kit ile kültüre edilen hücrelerin insana karşı farede üretilen CD31, CD34, CD144, Tie-2, vWF ve Flk-1 birincil antikorları ile boyanmasının ışık mikroskobu görüntüsü (Boyut çubukları 25 µm)

Özellikle 50 ng/ml VEGF kullanılmasıyla özellikle 7. günde CD31 ve CD34 gibi önemli endotel iaritlerinde artışın daha yüksek olduğu belirlendi. 7. ve 14. günler kıyaslandığında 14. günde ifadenin 7. güne göre biraz daha ileri safhalarda olduğu tespit edildi (Şekil 4.10-4.11).

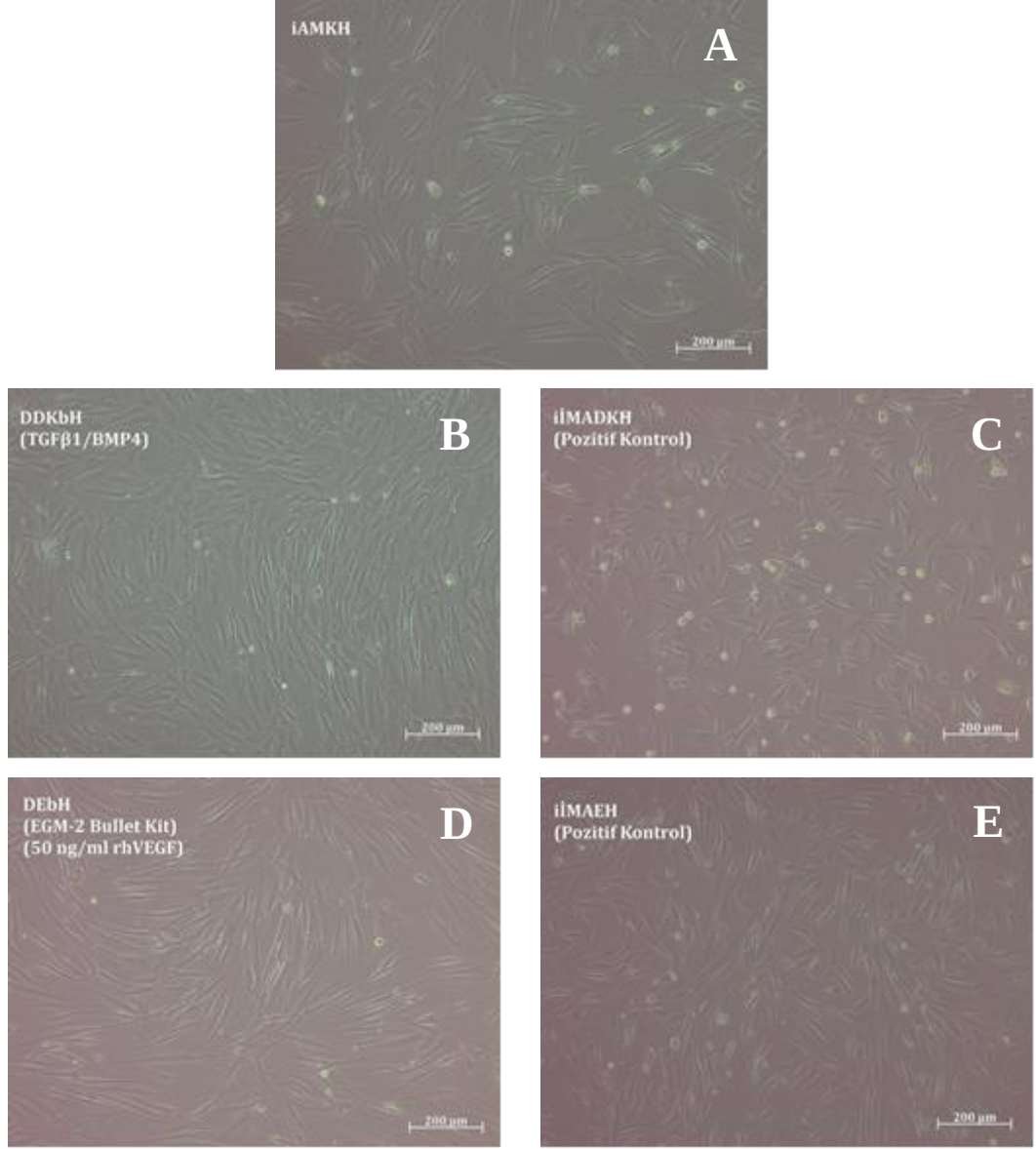
4.5 Farklılaşmanın Hücre Morfolojisi zerine Etkisi

Şekil 4.13-4.14 incelendiğinde, iAMKH'lerin TGFβ1/BMP4 etkisiyle DDKbH'lere farklılaşması sırasında mevcut fibroblastik morfolojileri değişerek DDKbH'ler için PK olarak seçilen iMADKH'lerine benzer şekilde tepe-vadi morfolojisi aldıkları gözlenmiş olup benzer şekilde 50ng/ml rh-VEGF içeren EGM-2 Bullet Kit ile etkileştirilen iAMKH'lerin ise DEbH'ler için PK olarak seçilen iMAEH'lerin ilk pasajlarda parke-taşı morfolojisine (Şekil 4.12) sahip iken daha sonra kullanılan besi yerinin etkisiyle morfolojisini değiştiren ikincil iğsi yapıya (Şekil 4.12) evirdiği tespit edilmiştir.



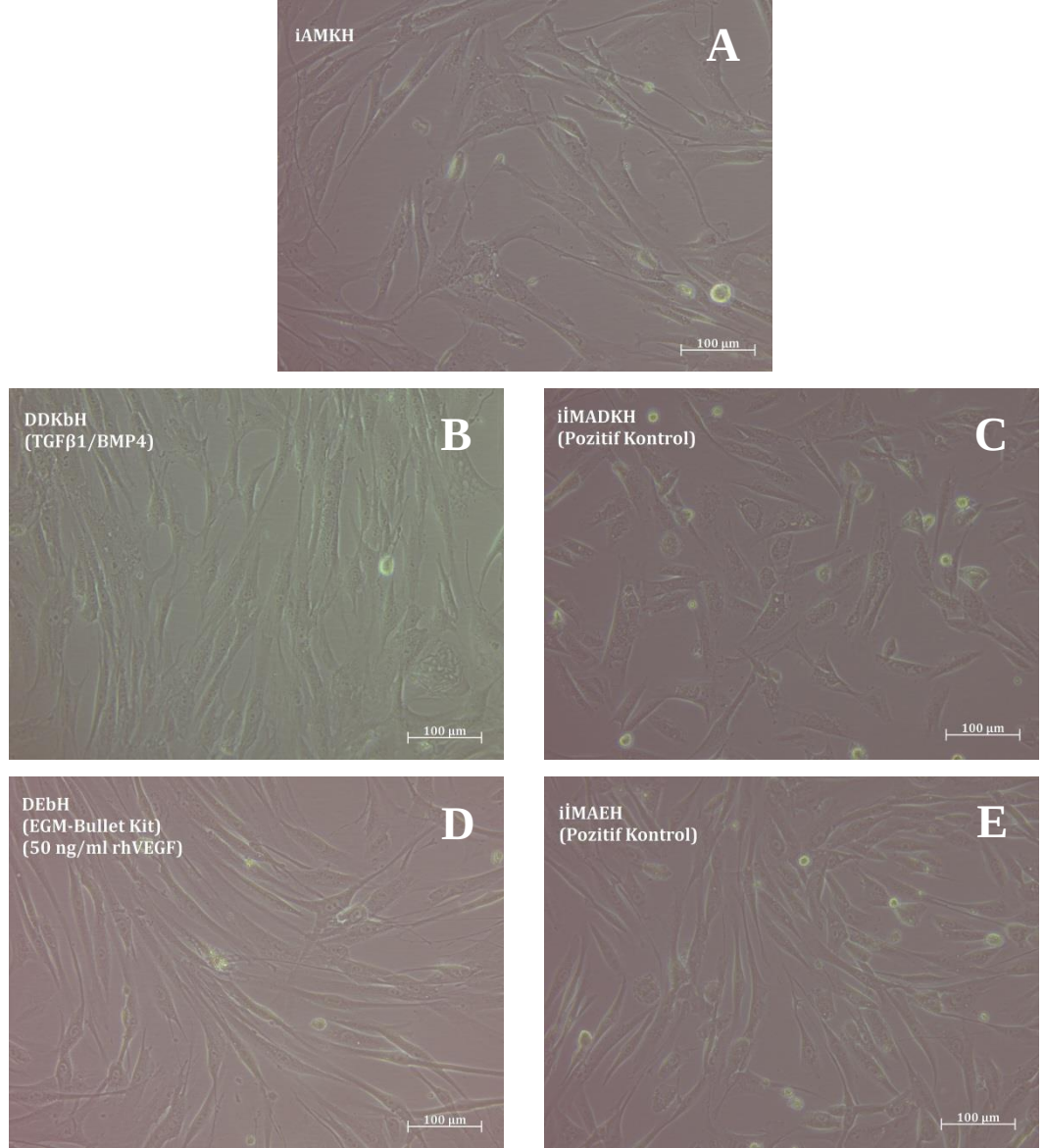
Şekil 4.12 İnsan i meme arterinden izole edilen endotel hücrelerin inversiyon mikroskobu görüntüleri (40 kat büyütmede)

A. Pasaj 1, parke-taşı morfolojisi, B. Pasaj 3 iğsi ikincil yapıları.



Şekil 4.13 Farklı hücre tiplerinin inversiyon mikroskobu görüntüleri (10X)

A. iAMKH'leri, B. TGFβ1/BMP4 etkisiyle farklılaşmış DDKbH'ler, C. İnsan iç meme arterinden izole edilen damar düz kas hücreleri, D. 50 ng/ml rh-VEGF içeren EGM-2 Bullet Kit etkisiyle farklılaşmış DEbH'ler, E. İnsan iç meme arterinden izole edilen damar endotel hücreleri

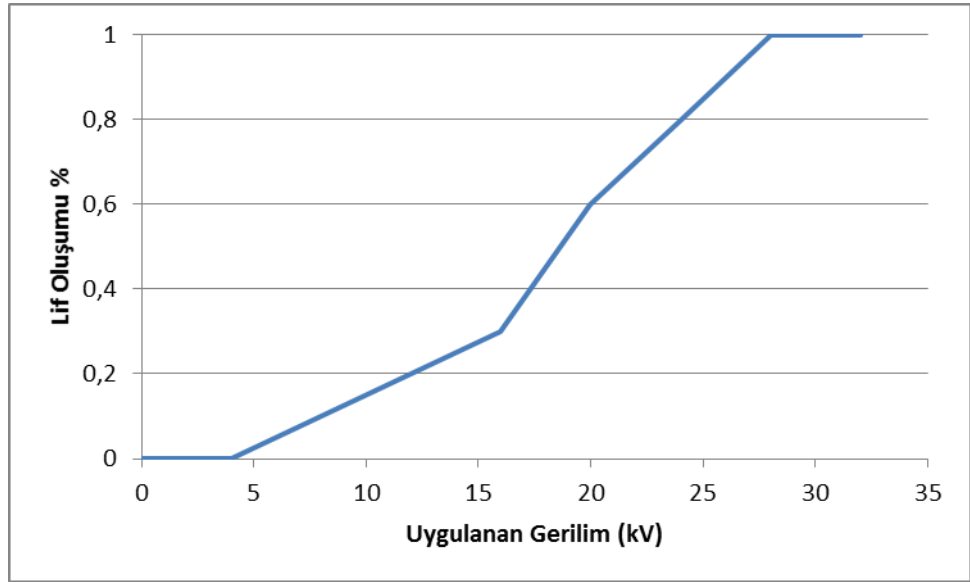


Şekil 4.14 Farklı hücre tiplerinin inversiyon mikroskobu görüntüleri (20X)

A. iAMKH'leri, B. TGFβ1/BMP4 etkisiyle farklılaşmış DDKbH'ler, C. İnsan iç meme arterinden izole edilen damar düz kas hücreleri, D. 50 ng/ml rh-VEGF içeren EGM-2 Bullet Kit etkisiyle farklılaşmış DEbH'ler, E. İnsan iç meme arterinden izole edilen damar endotel hücreleri

4.6 Elektro-eğirme İşlemi

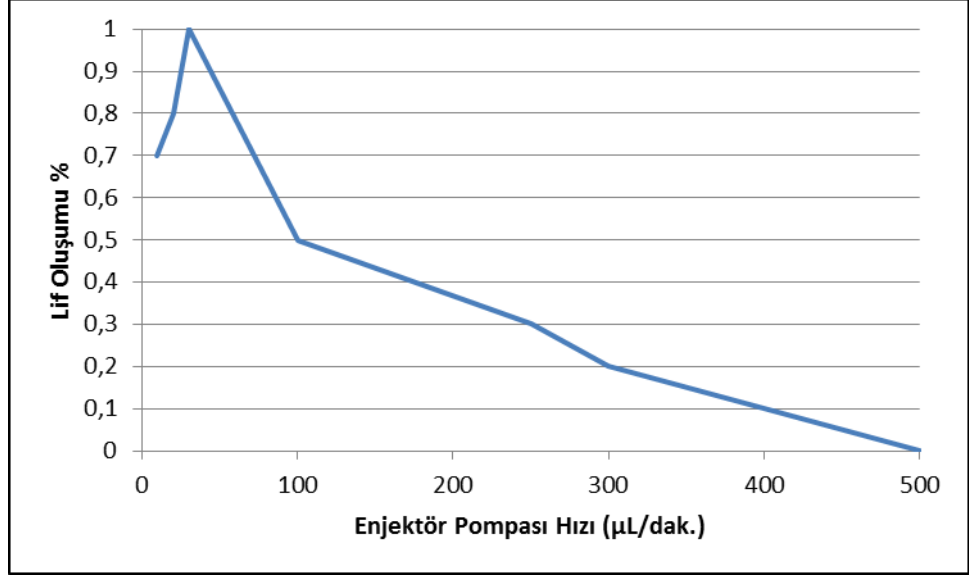
Elektro-eğirme sisteminin tüm parametreleri çalışıldı ve sistem PCL için optimize edildi. Prosesde uygulanan gerilimin etkisinin lif oluşumunda temel etkenlerden biri olduğu saptandı. Polimer derişimi sabit tutulduğunda belirli gerilim değerlerine kadar lif oluşumu gözlenmezken uygun gerilim eşiğı aşıldığında ise rastgele yönlenmiş nano/mikro mertebede liflerin örgüsel olmayan bir ağ yapısı meydana getirerek toplayıcı plaka üzerinde biriktiğı görüldü. Gerilim ile lif oluşumu arasındaki ilişki Şekil 4.15’de verilmiştir. Şekilde de görüldüğü üzere 5 kV’a kadar lif oluşumu gözlenmezken bu eşik değeri aşıldığında artan oranlarda lif oluşumu gözlendi ve optimal değeri 28 kV olduğu belirlendi.



Şekil 4.15 Uygulanan gerilimin PCL nano/mikro lif oluşumuna etkisi [(%10'luk (m/v) PCL ile)]

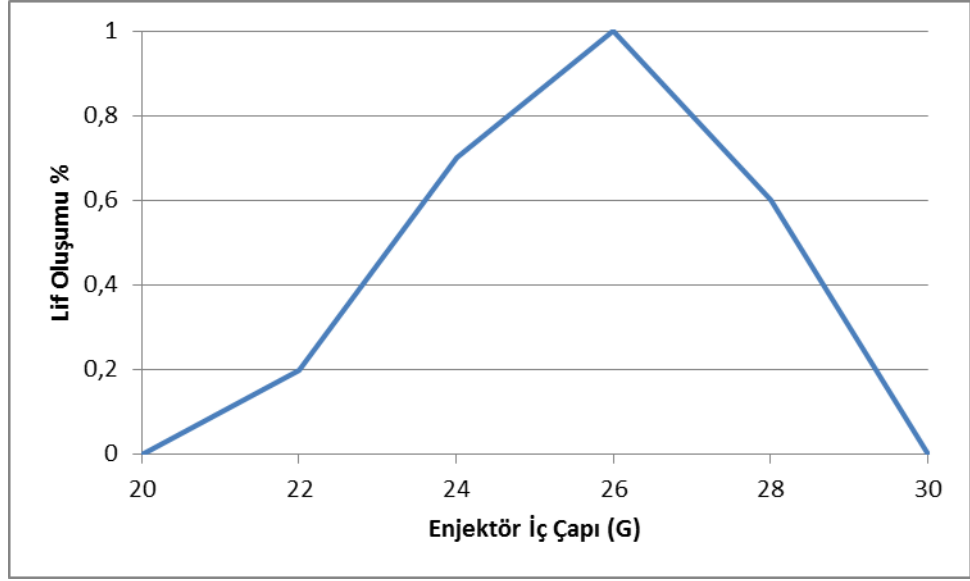
Düşük gerilim değerlerinde lif oluşumu gözlenmezken gerilim yükseldikçe enjektör ucunda damla şeklinde birikmiş polimer eriğinin küre yapısının bozularak elips şeklini almaya başladığı ve daha yüksek gerilimlere çıkıldıkça bu yapının sivrilerek doğrusal tek bir çizgi haline geldiğı gözlendi. Bu gözlemlere ilave olarak lifsi yapının oluşup oluşmadığı pozitif kutup çevresinde biriken örgüsel ağlardan da anlaşılabilir olduğu görüldü.

Uygun boyutlarda lif elde etmek için diğer önemli parametre olan enjektör pompasının hızının optimizasyonu çalışmaları da gerçekleştirildi. Şekil 4.16’da farklı pompa hızlarının lif oluşumu üzerine etkisi verilmiştir.

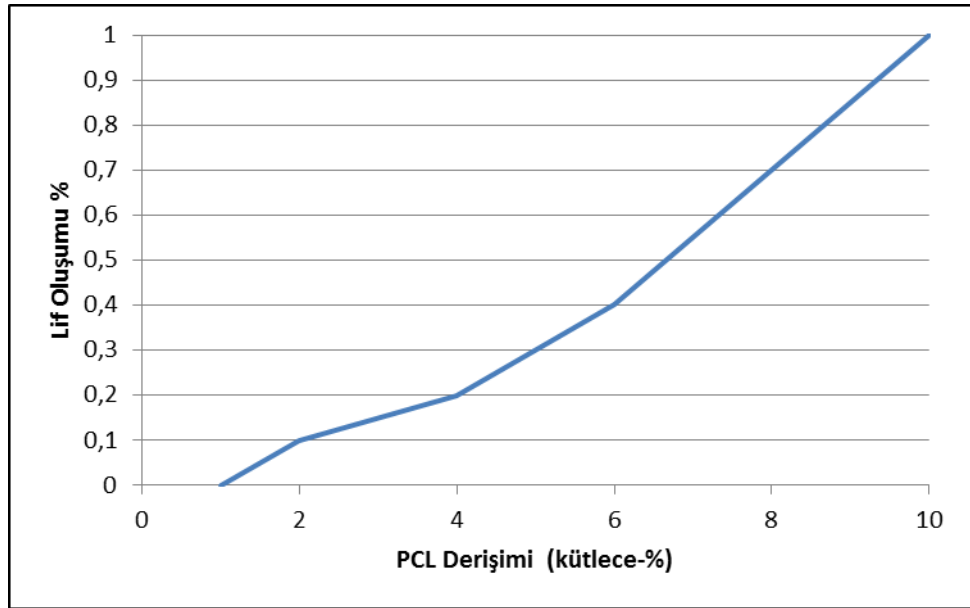


Şekil 4.16 Enjeksiyon hızının nano/mikro lif oluşumuna etkisi [(28 kV ve %10’luk m/v) PCL şartlarında)]

PCL için en uygun enjeksiyon hızının yaklaşık olarak 10 µl/dakika olduğu yapılan çalışmalar sonucunda tespit edildi. Düşük hızlarda polimer çözeltisinden lif elde edilmiş, yüksek hızlara çıkıldığında ise lif oluşum yüzdesinin düştüğü ve boncuk şeklinde yapıların oluştuğu görüldü. 26G uçla optimal sonuçlar elde edildi. Ayrıca daha iyi lif elde edebilmek için enjektör iğne ucu törpülenerek düz hale getirilmiştir. Enjektör iğnesi iç çapının nano/mikro lif oluşum üzerine etkisi Şekil 4.17’de verilmiştir.

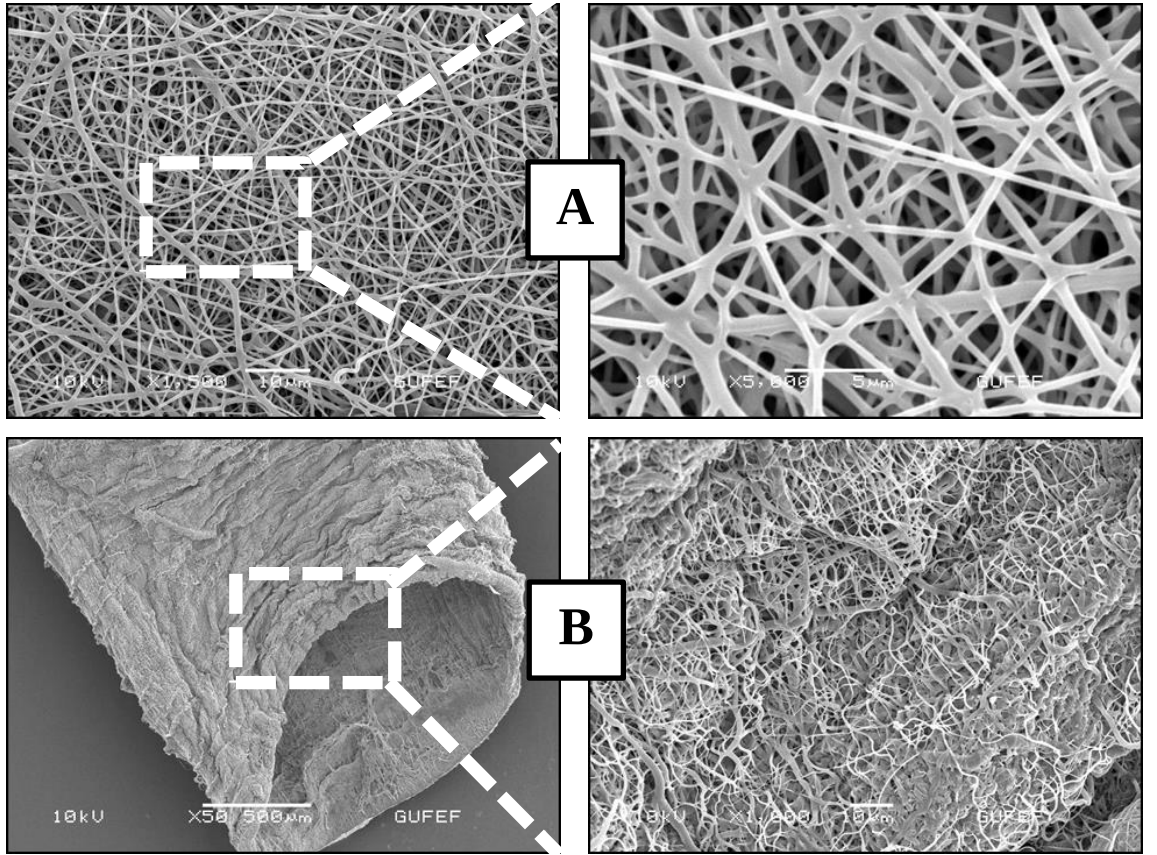


Şekil 4.17 Enjektör iğnesi iç çapının PCL nano/mikro lif oluşum yüzdesine olan etkisi [(28 kV ve %10'lık (m/v) PCL şartlarında)]



Şekil 4.18 PCL derişiminin elektroëirme işleminde nanolif oluşumuna etkisi (28 kV'da)

PCL, diklorometan/metanol (7:3) (v/v) içinde %10 (m/v) olacak şekilde kolaylıkla çözüldü. Elektro-eğirme verimini artırmak için sisteme %0,6 NaCl ilavesi gerçekleştirildi. Tuz ilavesi çözeltinin iletkenliğini artırarak uygulanan gerilimin etkinliğini arttırmıştır. Şekil 4.18 incelendiğinde düşük derişimler de lif oluşumu görçekleşmezken, “boncuk” şeklinde yapıların olduğu belirlendi. Polimer derişimi yükseldikçe ise daha düzgün yapıda tabakalar elde edildi. Elektro-eğrilmiş PCL liflerinin 400-600 nm aralığında değıştığı elektron mikroskobu görüntüleri ile belirlendi (Şekil 4.19).



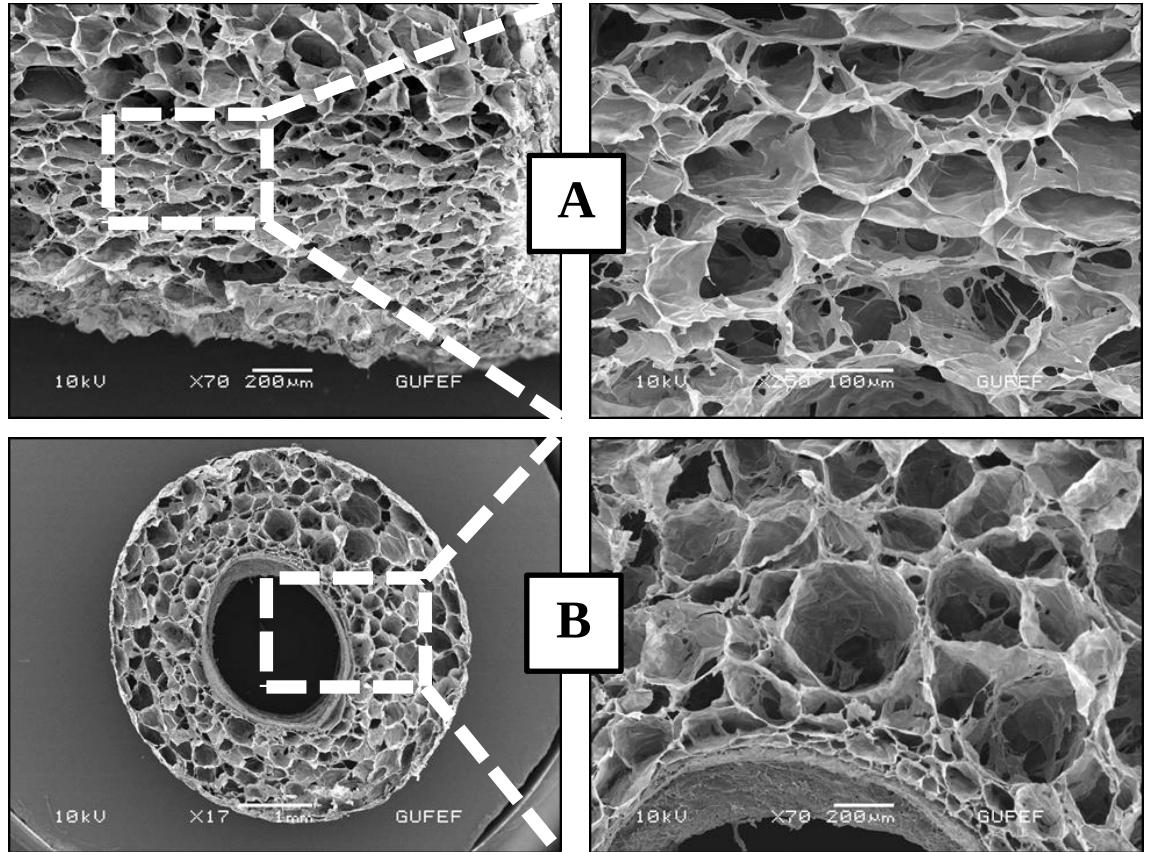
Şekil 4.19 Elektroeğirme tekniğıyle elde edilen ve değışken lif çaplarına sahip tabakaların taramalı elektron mikroskobu görüntüleri

A. PCL nano/mikro lif tabaka, B. Tübüler yapıda iskele

Optimize edilen şartlar altında oluşturulan PCL nano/mikro lif iskelelerde lifler birbirini rastgele doğrultularda kesmekte ve üst üste birikerek birbirleriyle irtibat halinde gözenekli üç boyutlu iskeleler meydana getirmekte olduğu görölmektedir (Şekil 4.19).

4.7 Çok Katlı Hibrit Damar Doku Mühendisliği İskelesinin Hazırlanması

Tarif edildiği şekilde FDA onaylı PCL polimeri optimize çözücü sisteminde çözülmüş ve elektro-eğirme tekniğinden yararlanılarak nano/mikro ölçekte liflere sahip 2 mm iç çapında tübüler formda endotel hücrelerin tutunmasına ve çoğalmasına olanak sağlayan ve *intima* tabakasını taklit eden yapı elde edildi (Şekil 4.19). Hazırlanan bu öncül iskele daha sonra kalıba alınarak dış kısmına gözenek oluşturmucu madde olarak sodyum bikarbonat içeren elastin/kollajen hidrojel dökülmüş ve dondurucu içine alındı. Bu işlemleri takiben liyofilizasyon ve yıkama basamakları takip edildi ve düz kas hücreleri için medya ve adventisya tabakaları inşa edilmiş oldu. Hazırlanan elastin/kollajen süngerimsi iskelelerin 50-150 µm arasında birbiri ile bağlantılı kanalları içerdiği elektron mikroskobu ile belirlendi (Şekil 4.20).



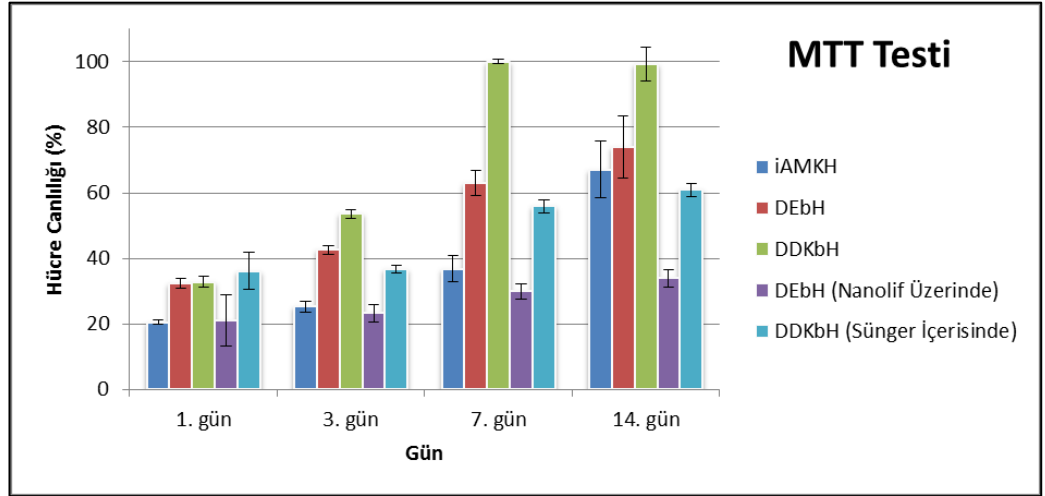
Şekil 4.20 Hazırlanan iskelelerin elektron mikroskobu görüntüleri

A. Elastin/Kollajen makro/mikro gözenekli süngerimsi iskele, B. Elastin/Kollajen/PCL çok katlı tübüler iskele

Şekil 4.20 incelediğinde makro/mikro gözenekliliğe sahip *medya* ve *advertisya* tabakaları ve nano/mikro liflerden mamul lümen kısmı açık bir şekilde görülmektedir. Makro/mikro gözenekli süngerimsi dış kabuk aynı zamanda birbirini ile bağlantılı iç kanallara sahiptir.

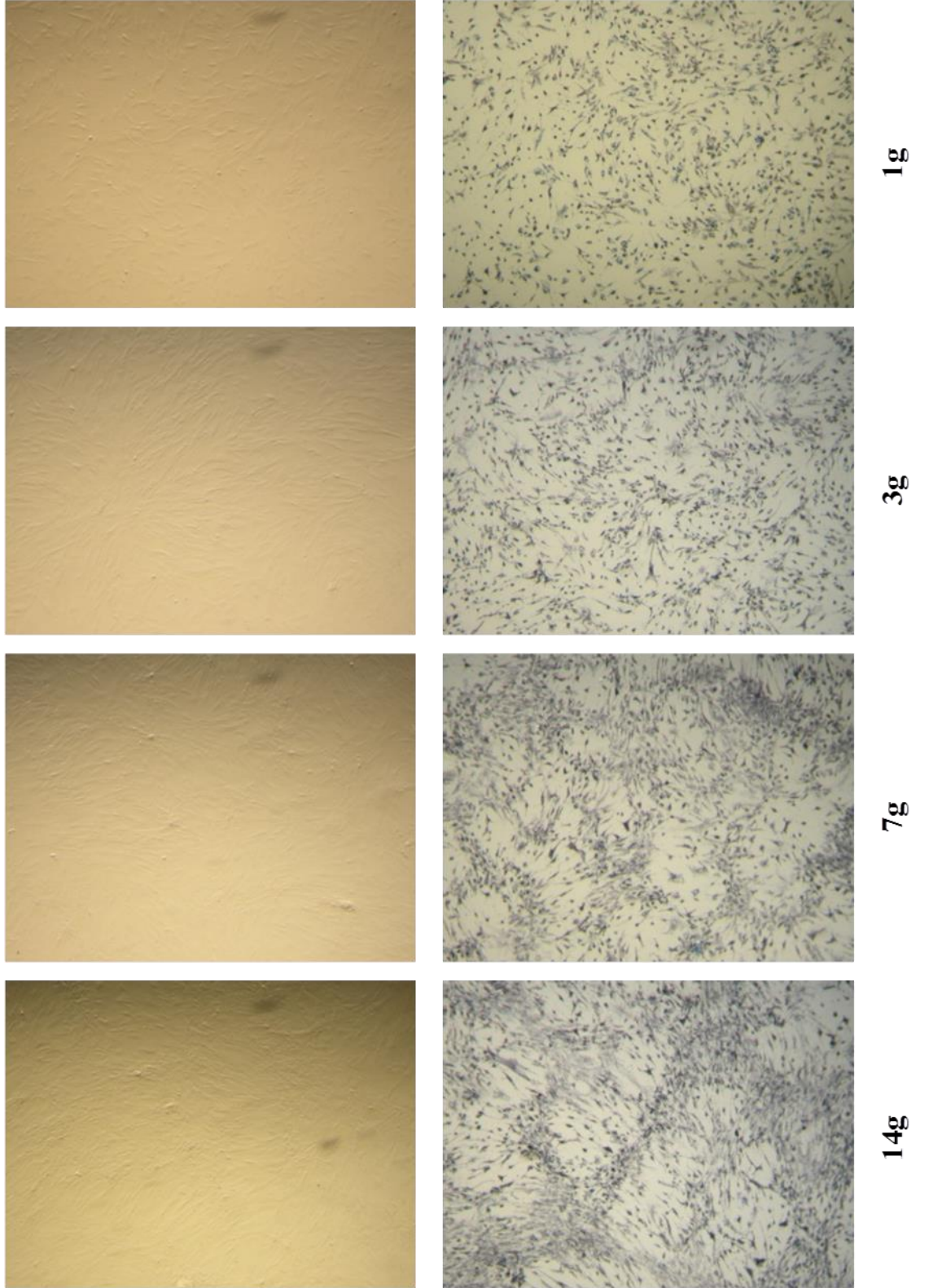
4.8 Hücrelerin Proliferasyon Kapasitesinin Belirlenmesi

MTT testi ile hücrelerin doku kültür kabında ve üretilen iskeleler üzerindeki canlılık ve çoğalma düzeyleri belirlendi. Şekil 4.21 incelendiğinde DDKbH'lerin diğer hücre tiplerine göre doku kültür kabı yüzeyinde daha yüksek oranda canlılık ve çoğalma gösterdiği görülmektedir. Ayrıca DDKbH'ler doku kültür kabında süngerimsi iskeleye göre daha yüksek canlılık göstermektedir. DEbH'ler ise DDKbH'ler gibi doku kültür kabına daha çok tutunup çoğaldığı görülmektedir. İnversiyon mikroskobu görüntüleri şekil 4.22-4.23 ve şekil 4.24'de verilmiştir.



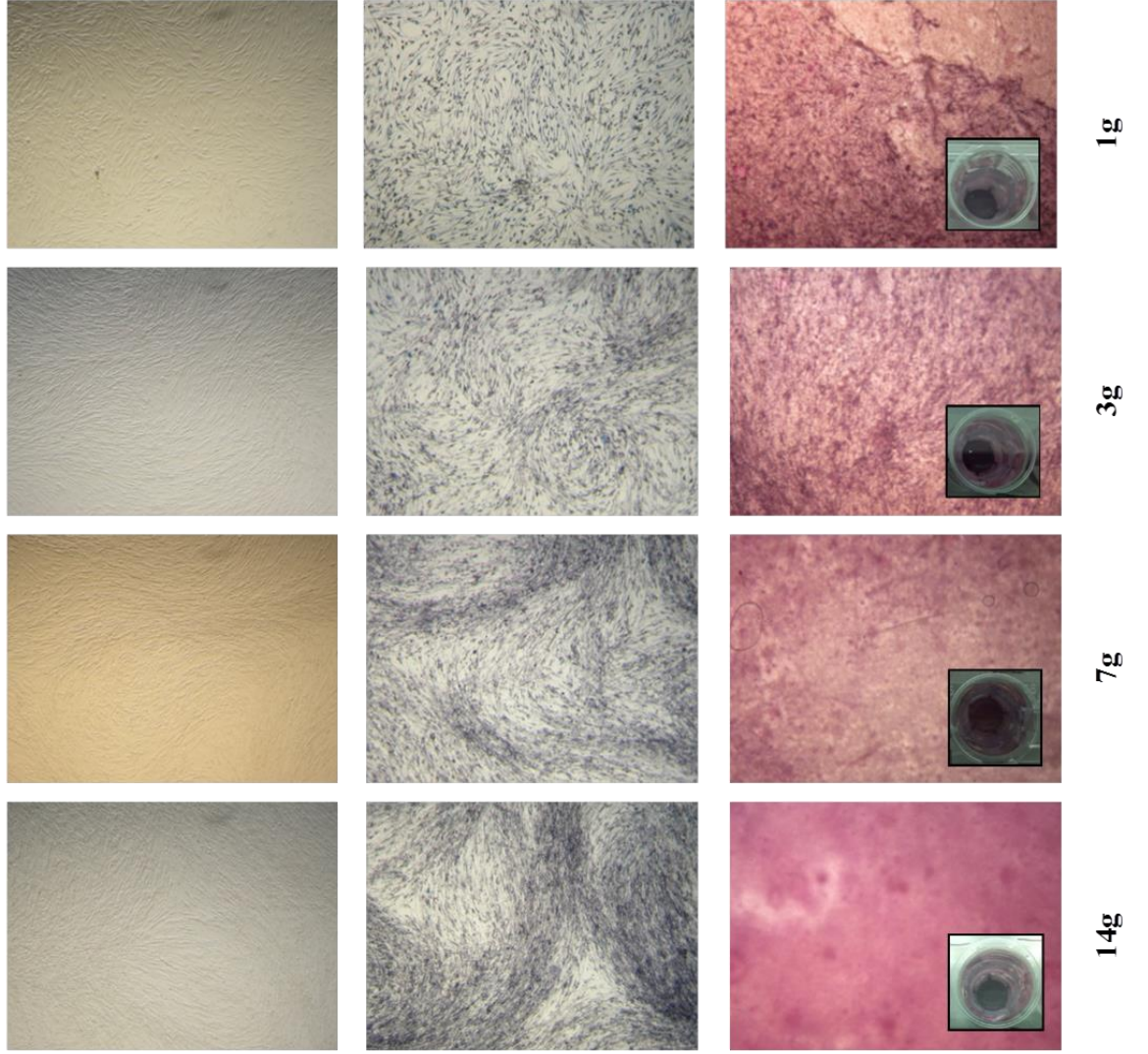
Şekil 4.21 Hücre canlılığının grafiksel gösterimi. iAMKH'lerinin doku kültür kabında (DKK), DEbH'lerin DDK, DDKbH'lerin DKK, DEbH'lerin PCL Nanolif üzerinde ve DDKbH'lerin süngerimsi iskele içerisinde 1, 3, 7 ve 14 gün boyunca çoğalması

iAMKH (DKK yüzeyinde)



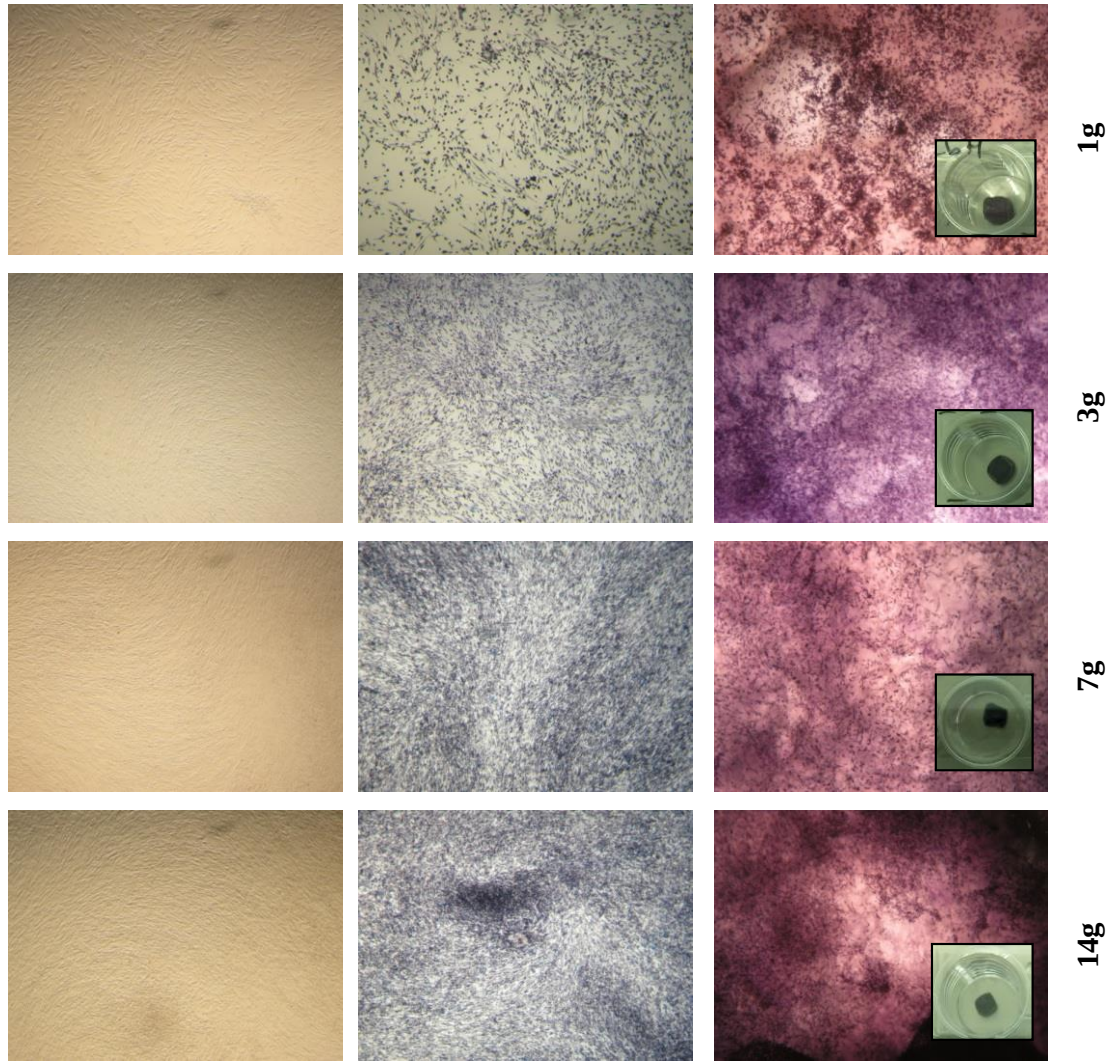
Şekil 4.22 DKK çoğalan iAMKH'lerin MTT boyamalarının inversiyon mikroskobu görüntüleri (1, 3, 7 ve 14. günler)

DEbH (DKK ve Nanolif Üzerinde)



Şekil 4.23 DKK ve nano lif üzerinde çoğalan DEbH'lerin MTT boyamalarının inversiyon mikroskobu görüntüleri (1, 3, 7 ve 14. günler)

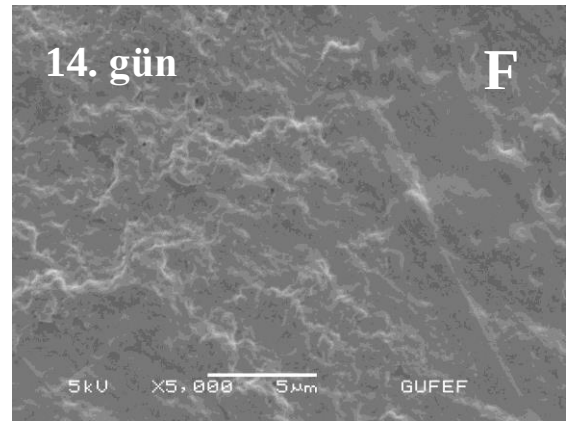
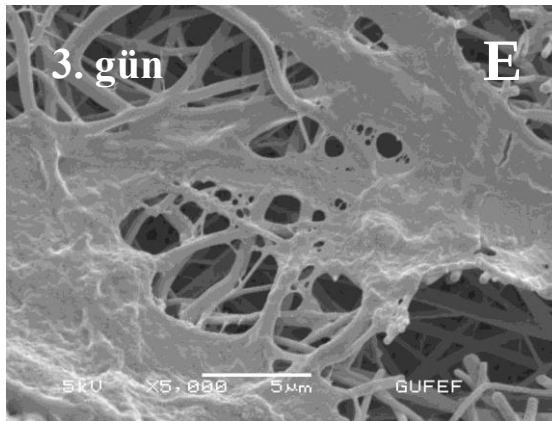
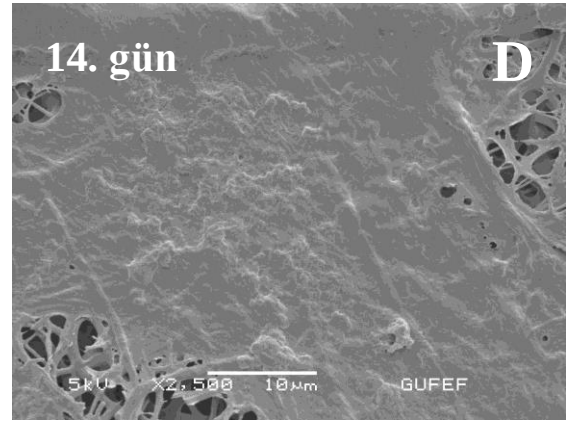
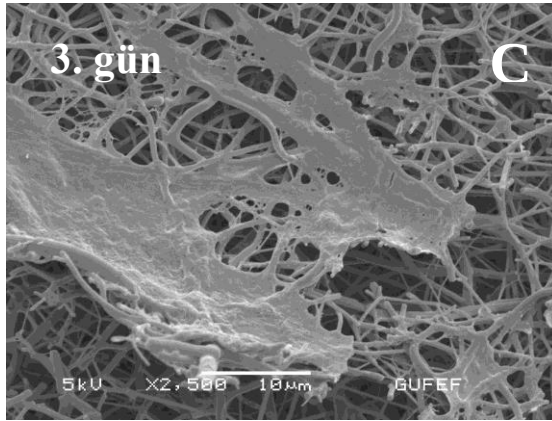
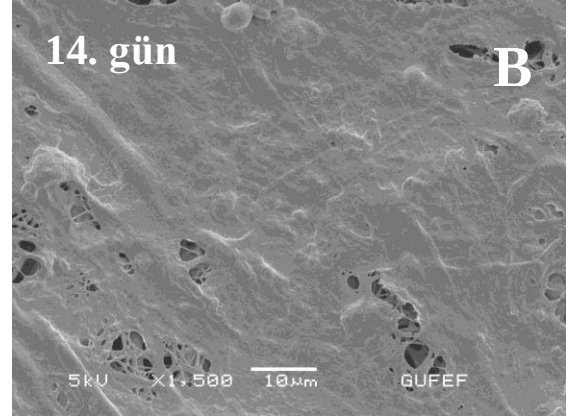
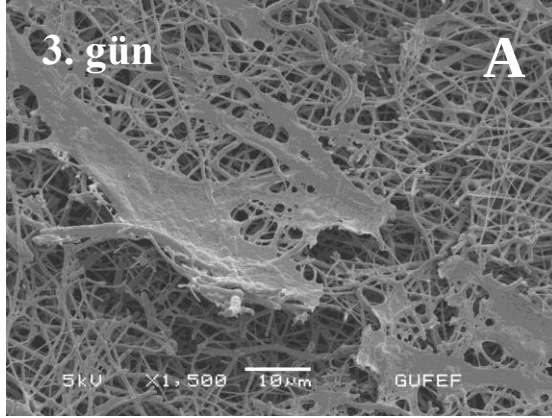
DDKbH (DKK ve Sünger İçerisinde)



Şekil 4.24 DKK ve süngerimsi iskele içerisinde çoğalan DDKbH'lerin MTT boyamalarının inversiyon mikroskobu görüntüleri (1, 3, 7 ve 14. günler)

4.9 DEbH'lerin Nano/Mikro Lifsi PCL Tabaka Üzerine Ekimi

3B-DMDG'nin *intima* bölgesini oluşturan nano/mikro lifsi yapıya sahip PCL tabakalar üzerine DEbH'ler ekildi ve örnekler 3. günde ve 14. günde (Şekil 4.25) tesbit edilerek taramalı elektron mikroskobu ile hücre adezyonu ve yayılması görüntülendi. Şekil 4'de de görüldüğü üzere birinci zaman noktasında tutunan DEbH'ler 14. günün sonuna doğru lifsi yapıya tamamıyla entegre olarak yüzeyi kapatmıştır.

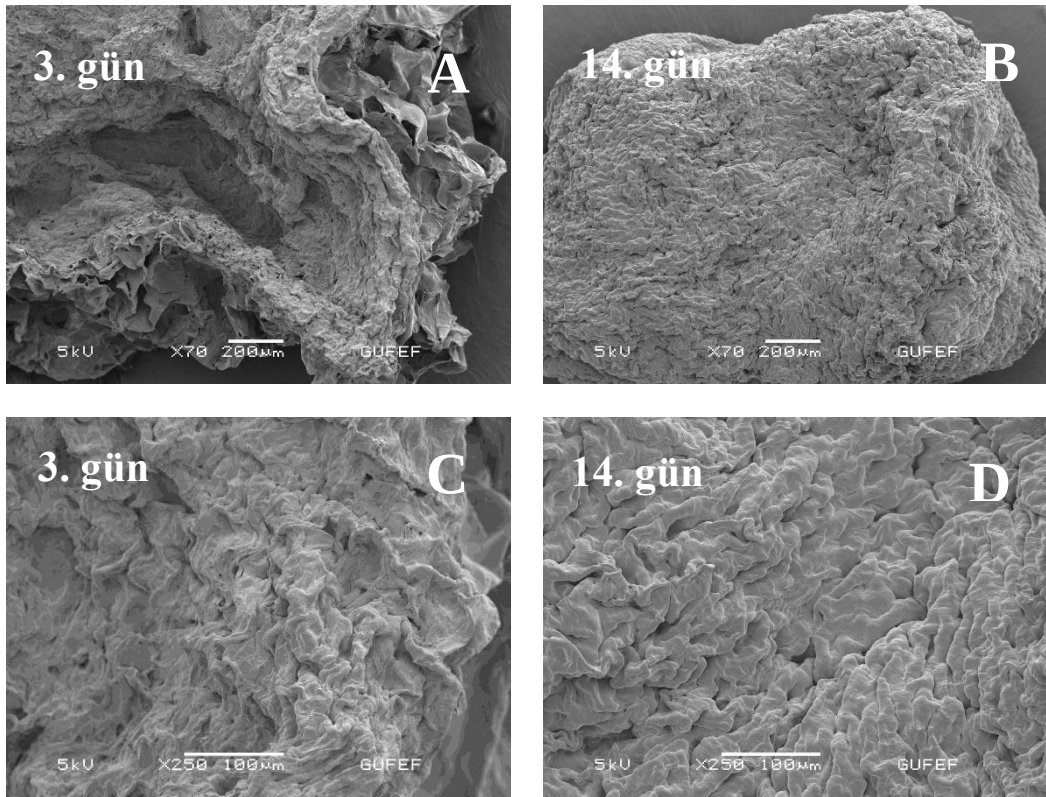


Şekil 4.25 DEbH'ler ekilmiş PCL tabakaların taramalı elektron mikroskobu görüntüleri

A., C., E. 3. günler, B., D., F. 14. günler

4.10 DDKbH'lerin Gözenekli Kollajen/Elastin Süngerimsi İskele Üzerine Ekimi

3B-DMDG'nin *medya* ve *advertisya* tabakalarını oluşturan çapraz bağlı kollajen/elastin süngerimsi yapıya ekilen DDKbH'lerinin 3. gün ve 14. günde (Şekil 4.26) iskele üzerine/içine olan göçü, tutunması ve yayılması taramalı elektron mikroskobu ile görüntülendi. 3. günde iskele yüzeyinin neredeyse tamamını örtmeyi başaran DDKbH'lerin 14. güne gelindiğinde iskelenin her yönüne hareket ederek yüzeyi tamamen kapattığı şekil 4.26'da görülmektedir.

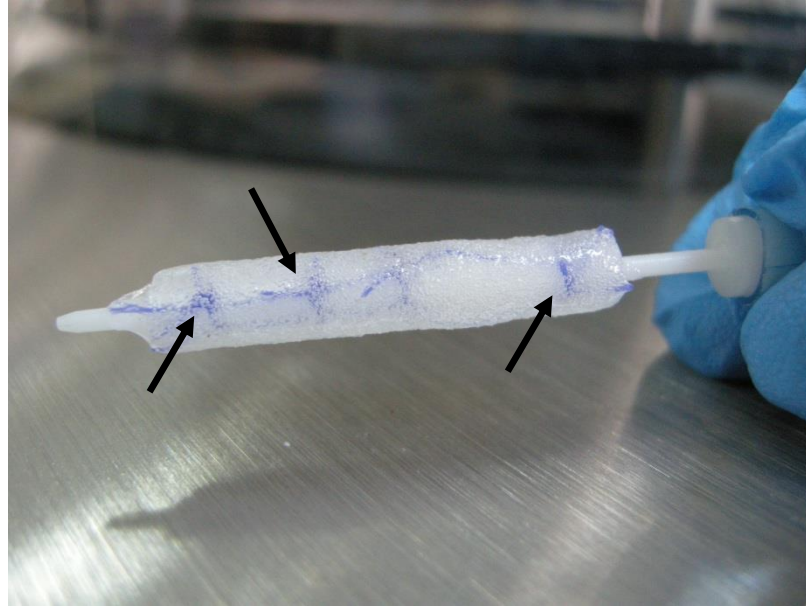


Şekil 4.26 DDKbH'ler ekilmiş çapraz elastin/kollajen süngerimsi iskelelerin elektron mikroskobu görüntüleri

A., C. 3. günler, B., D. 14. günler

4.11 Güçlendirilmiş-Elastin/Kollajen/PCL Çok Katlı Tübüler İskele Üretimi

Elastin/Kollajen/PCL çok katlı hibrit tübüler yapıdaki iskelenin mekanik özelliklerini arttırmak için PGLA sutür (mavi) ile iskelenin çevresi belirli bir simetride örüldü. Tübüler iskele çevresindeki örgünün makroskobik görüntüsü şekil 4.27’de verilmiştir. Şekil 4.27’de mavi renkte görülen sutür yapıya entegredir ve iskele üretim aşamasında olumsuz bir etki göstermemiştir.

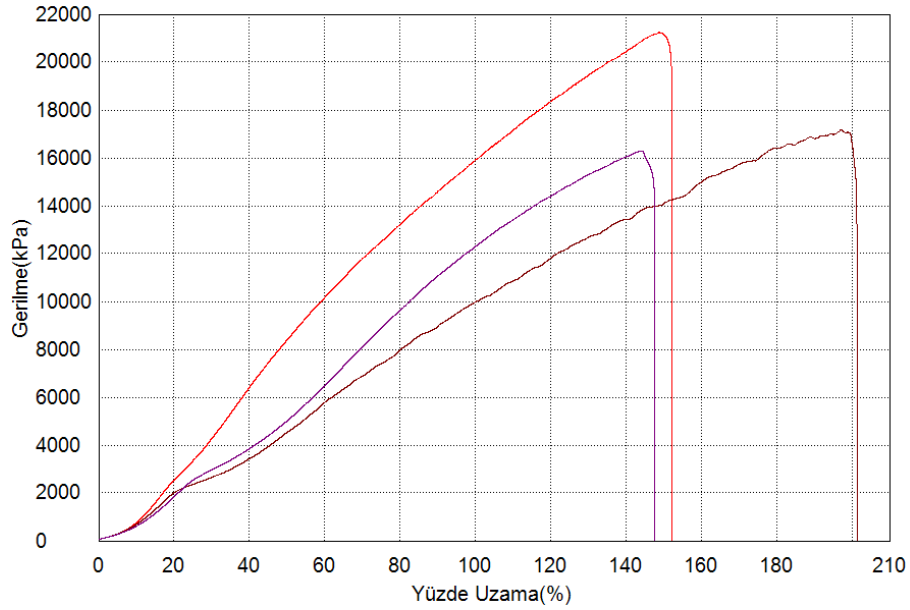


Şekil 4.27 Güçlendirilmiş-Elastin/Kollajen/PCL çok katlı tübüler iskelesi

Siyah oklar PGLA stürünü işaret etmektedir

4.12 İskelelerin Biyomekaniksel Özelliklerinin İncelenmesi

Hazırlanan iskelelerin biyomekaniksel özellikleri tek yönlü çekme testi uygulayan bir mekanik test cihazı ile belirlendi. Nano/mikro lifsi yapıya sahip PCL tübün (n=3) ortalama $18226,9 \pm 2642,3$ kPa'lık bir gerilime dayandığı tespit edildi. Şekil 4.28 incelendiğinde ise maksimum gerilimin yaklaşık 22000 kPa olduğu görülmektedir.



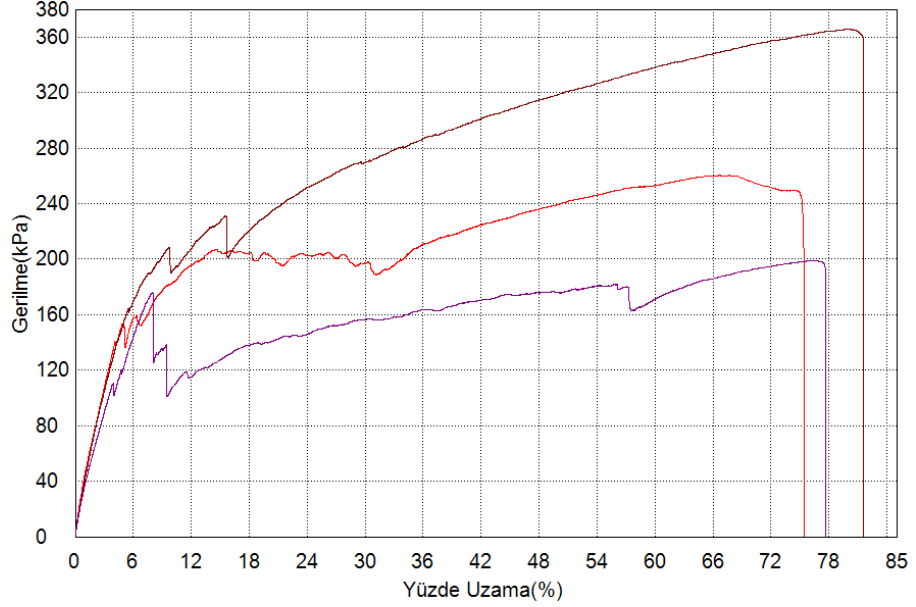
Şekil 4.28 Nano/mikro lifsi PCL tübe ait Gerilim (kPa) / Yüzde Uzama eğrileri (n=3)

İlave olarak çizelge 4.2'de görüldüğü üzere bu iskelenin ortalama $167,1 \pm 29,8$ 'lik bir uzama yüzdesine sahip olduğu bulundu.

Çizelge 4.2 Nano/mikro lifsi yapıya sahip PCL tübe ait veriler (n=3)

	Gerilme (kPa)	Uzama (mm)	Yüzde Uzama (%)
PCL Tüp (1)	21235,8	22,8	152,2
PCL Tüp (2)	17160,8	30,2	201,4
PCL Tüp (3)	16284,2	22,1	147,6
Ortalama	18226,9	25,1	167,1
Standart Sapma	$\pm 2642,3$	$\pm 4,4$	$\pm 29,8$

İskele üretim aşamasının diğer bir evresinde elde edilen Elastin/Kollajen/PCL tübün hem kuru formunun hem de ıslak formunun biyomekaniksel özellikleri belirlendi. Kuru formdaki Elastin/Kollajen/PCL tübün (n=3) ortalama $274,8 \pm 84,2$ kPa'lık bir gerilime dayandığı tespit edildi. Şekil 4.29 incelendiğinde ise maksimum gerilimin yaklaşık 370 kPa olduğu görülmektedir.



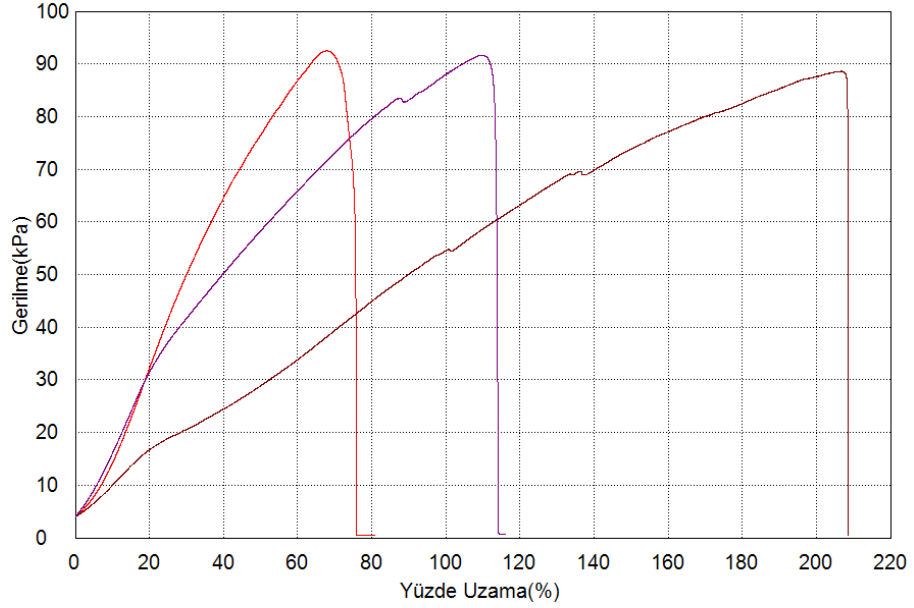
Şekil 4.29 Kuru formda Elastin/Kollajen/PCL tübe ait Gerilim (kPa) / Yüzde Uzama eğrileri (n=3)

İlave olarak çizelge 4.3'de görüldüğü üzere bu iskelenin ortalama $78,2 \pm 3,1$ 'lik bir uzama yüzdesine sahip olduğu bulundu.

Çizelge 4.3 Kuru formda Elastin/Kollajen/PCL tübe ait veriler (n=3)

	Gerilme (kPa)	Uzama (mm)	Yüzde Uzama (%)
Elastin/Kollajen/PCL Tüp (1)	260,2	11,3	75,4
Elastin/Kollajen/PCL Tüp (2)	365,4	10,6	81,6
Elastin/Kollajen/PCL Tüp (3)	198,8	11,6	77,7
Ortalama	274,8	11,1	78,2
Standart Sapma	$\pm 84,2$	$\pm 0,5$	$\pm 3,1$

Benzer şekilde hazırlanan Elastin/Kollajen/PCL tüp tam besi yeri içinde %5 CO₂, %95 hava ve %90 bağıl nem içeren 37°C sıcaklığa ayarlı inkübatörde 48 saat bekletildi. İnkübasyon süresinin ardından alınan iskeleler ıslak formda mekanik test cihazının yük hücrelerine tutturularak çekme testi yapıldı. Islak formdaki Elastin/Kollajen/PCL tübün (n=3) ortalama $90,9 \pm 2,1$ kPa’lık bir gerilime dayandığı tespit edildi. Şekil 4.30 incelendiğinde ise maksimum gerilimin yaklaşık 93 kPa olduğu görülmektedir.



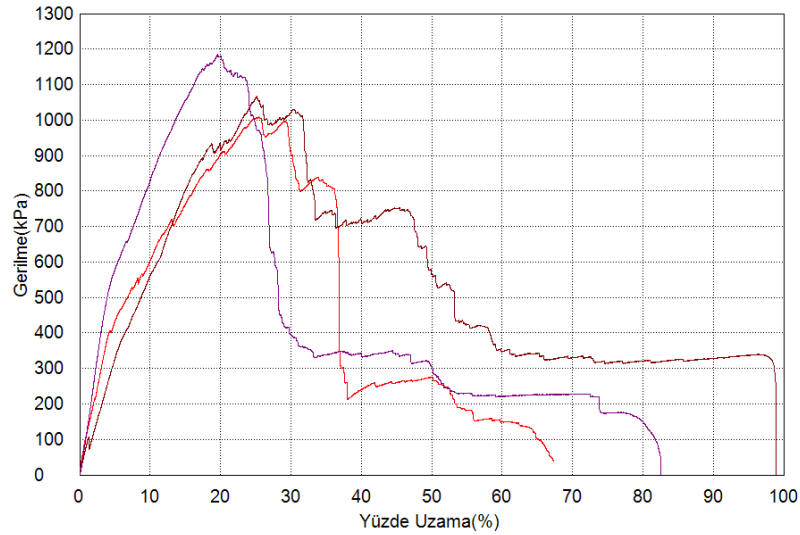
Şekil 4.30 Islak formda Elastin/Kollajen/PCL tübe ait Gerilim (kPa) / Yüzde Uzama eğrileri (n=3)

İlave olarak çizelge 4.4’de görüldüğü üzere bu iskelenin ortalama $135,1 \pm 65,9$ ’luk bir uzama yüzdesine sahip olduğu bulundu.

Çizelge 4.4 Islak formda Elastin/Kollajen/PCL tübe ait veriler (n=3)

	Gerilme (kPa)	Uzama (mm)	Yüzde Uzama (%)
Elastin/Kollajen/PCL Tüp (1)	92,5	12,1	80,7
Elastin/Kollajen/PCL Tüp (2)	88,6	31,2	208,4
Elastin/Kollajen/PCL Tüp (3)	91,6	17,4	109,5
Ortalama	90,9	20,2	135,1
Standart Sapma	$\pm 2,1$	$\pm 9,8$	$\pm 65,9$

Güçlendirilmiş-Elastin/Kollajen/PCL tübün benzer şekilde kuru ve ıslak formunun mekanik özellikleri belirlendi. Kuru formda Güçlendirilmiş-Elastin/Kollajen/PCL tübün (n=3) ortalama $1086,4 \pm 89,7$ kPa'lık bir gerilime dayandığı tespit edildi. Şekil 4.31 incelendiğinde ise maksimum gerilimin yaklaşık 1185 kPa olduğu görülmektedir.



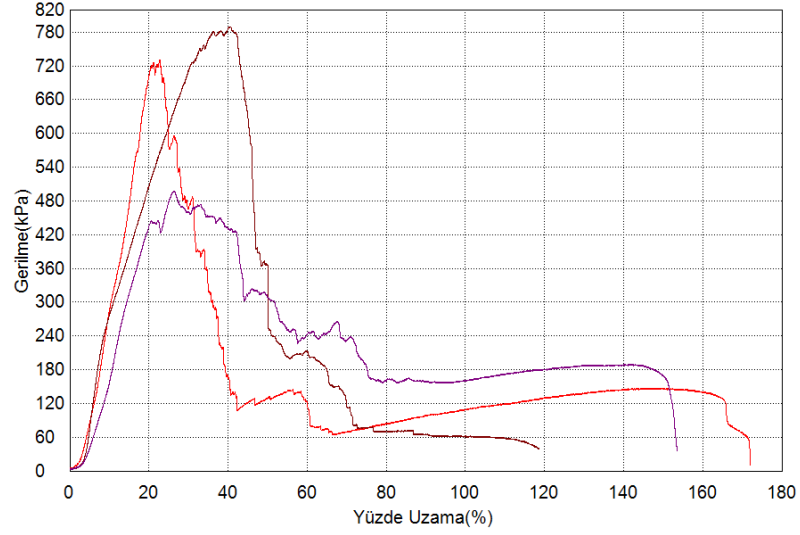
Şekil 4.31 Kuru formda Güçlendirilmiş-Elastin/Kollajen/PCL tübe ait Gerilim (kPa) / Yüzde Uzama eğrileri (n=3)

İlave olarak çizelge 4.5’de görüldüğü üzere bu iskelenin ortalama $82,9 \pm 15,8$ ’lik bir uzama yüzdesine sahip olduğu bulunmuştur.

Çizelge 4.5 Kuru formda Güçlendirilmiş-Elastin/Kollajen/PCL tübe ait veriler (n=3)

	Gerilme (kPa)	Uzama (mm)	Yüzde Uzama (%)
Güçlendirilmiş- Elastin/Kollajen/PCL Tüp (1)	1008,4	8,1	67,3
Güçlendirilmiş- Elastin/Kollajen/PCL Tüp (2)	1066,3	11,8	98,9
Güçlendirilmiş- Elastin/Kollajen/PCL Tüp (3)	1184,5	9,9	82,5
Ortalama	1086,4	9,9	82,9
Standart Sapma	$\pm 89,7$	$\pm 1,8$	$\pm 15,8$

Islak formda Güçlendirilmiş-Elastin/Kollajen/PCL tübün (n=3) ortalama $672,3 \pm 154,5$ kPa’lık bir gerilime dayandığı tespit edildi. Şekil 4.32 incelendiğinde ise maksimum gerilimin yaklaşık 789 kPa olduğu görülmektedir.



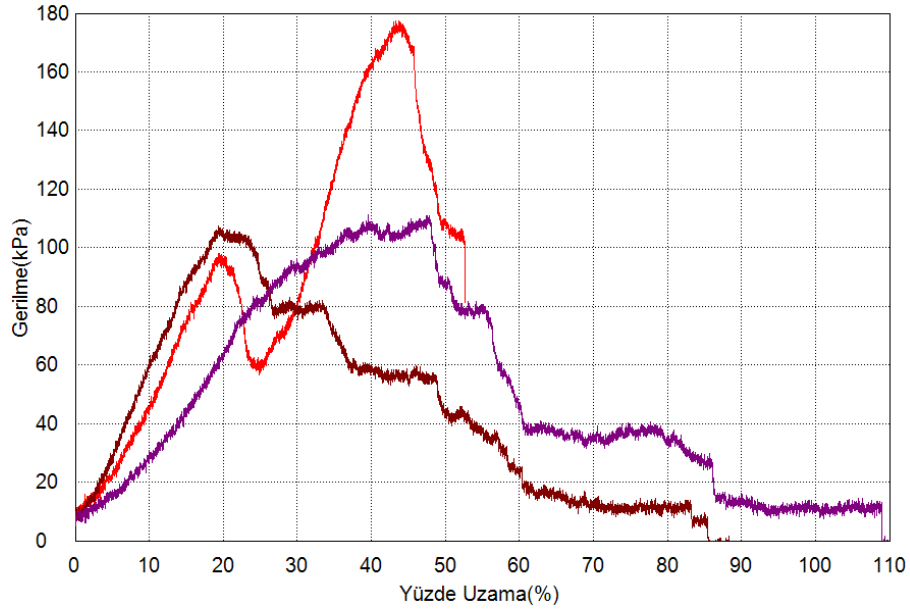
Şekil 4.32 Islak formda Güçlendirilmiş-Elastin/Kollajen/PCL tübe ait Gerilim (kPa) / Yüzde Uzama eğrileri (n=3)

İlave olarak çizelge 4.6’da görüldüğü üzere bu iskelenin ortalama $147,9 \pm 27,1$ ’lik bir uzama yüzdesine sahip olduğu bulundu.

Çizelge 4.6 Islak formda Güçlendirilmiş-Elastin/Kollajen/PCL tübe ait veriler (n=3)

	Gerilme (kPa)	Uzama (mm)	Yüzde Uzama (%)
Güçlendirilmiş- Elastin/Kollajen/PCL Tüp (1)	730,8	17,1	171,9
Güçlendirilmiş- Elastin/Kollajen/PCL Tüp (2)	789,1	9,4	118,5
Güçlendirilmiş- Elastin/Kollajen/PCL Tüp (3)	497,1	15,3	153,5
Ortalama	672,3	14,0	147,9
Standart Sapma	$\pm 154,5$	$\pm 4,0$	$\pm 27,1$

iGBA (Şekil 4.34) biyomekaniksel test çalışmalarında kontrol grubu olarak seçildi. Islak formda iGBA (n=3) ortalama $132,0 \pm 39,4$ kPa'lık bir gerilime dayandığı tespit edilmiştir. Şekil 4.33 incelendiğinde ise maksimum gerilimin yaklaşık 178 kPa olduğu görülmektedir.

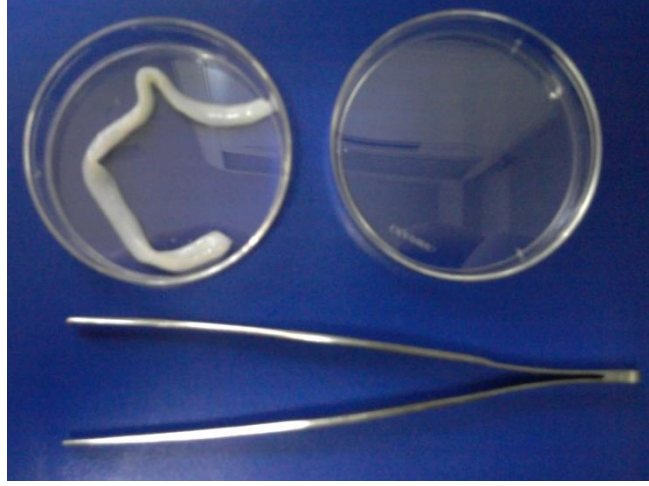


Şekil 4.33 iGBA'ne ait Gerilim (kPa) / Yüzde Uzama eğrileri (n=3)

İlave olarak çizelge 4.7'de görüldüğü üzere bu iskelenin ortalama $84,7 \pm 29,4$ 'lük bir uzama yüzdesine sahip olduğu bulundu.

Çizelge 4.7 iGBA'ne ait veriler (n=3)

	Gerilme (kPa)	Uzama (mm)	Yüzde Uzama (%)
iGBA (1)	177,5	10,0	52,6
iGBA (2)	107,3	17,2	90,7
iGBA (3)	111,1	18,8	110,6
Ortalama	132,0	15,3	84,7
Standart Sapma	$\pm 39,4$	$\pm 4,6$	$\pm 29,4$



Şekil 4.34 iGBA'nin makroskobik görüntüsü

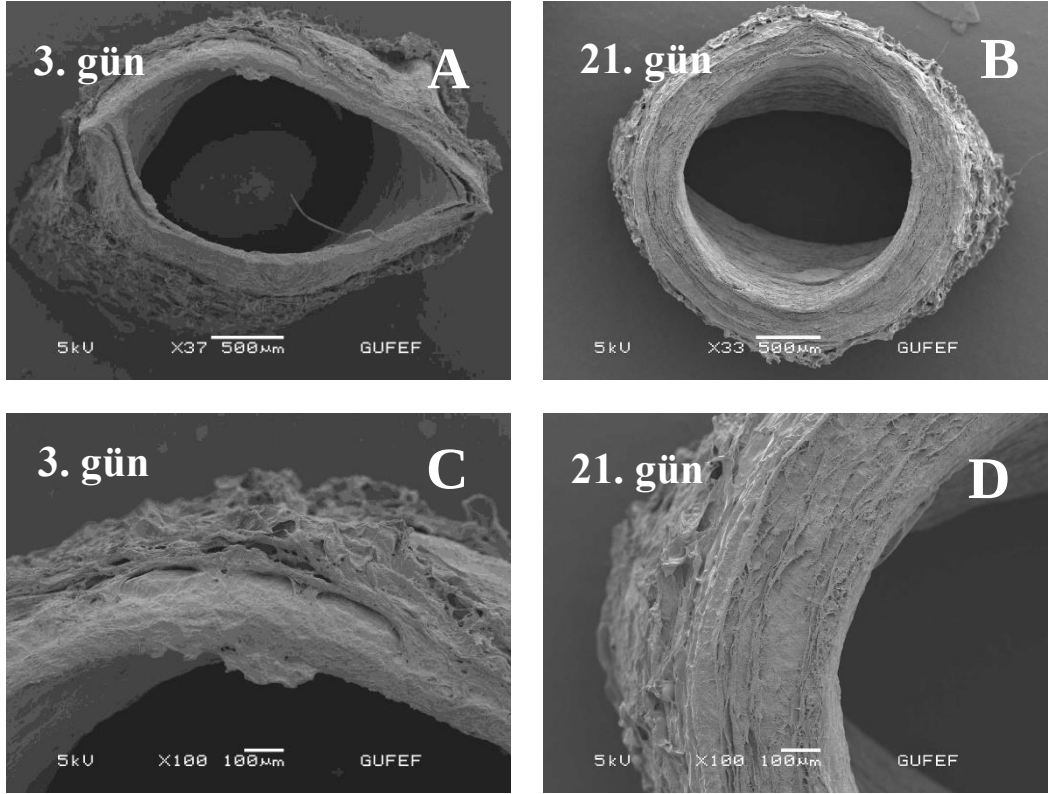
İlave olarak biyomekanik test sonuçlarının toplu gösterimi çizelge 4.8'de görülmektedir.

Çizelge 4.8 Biyomekanik test sonuçlarının toplu gösterimi

	Gerilme (kPa)	Uzama (mm)	Yüzde Uzama (%)
iGBA (kontrol)	132,0 ± 39,4	15,3 ± 4,6	84,7 ± 29,4
PCL Tüp	18226,9 ± 2642,3	25,1 ± 4,4	167,1 ± 29,8
Elastin/Kollajen/PCL Tüp (kuru form)	274,8 ± 84,2	11,1 ± 0,5	78,2 ± 3,1
Elastin/Kollajen/PCL Tüp (ıslak form)	90,9 ± 2,1	20,2 ± 9,8	135,1 ± 65,9
Güçlendirilmiş- Elastin/Kollajen/PCL Tüp (kuru form)	1086,4 ± 89,7	9,9 ± 1,8	82,9 ± 15,8
Güçlendirilmiş- Elastin/Kollajen/PCL Tüp (ıslak form)	672,3 ± 154,5	14,0 ± 4,0	147,9 ± 27,1

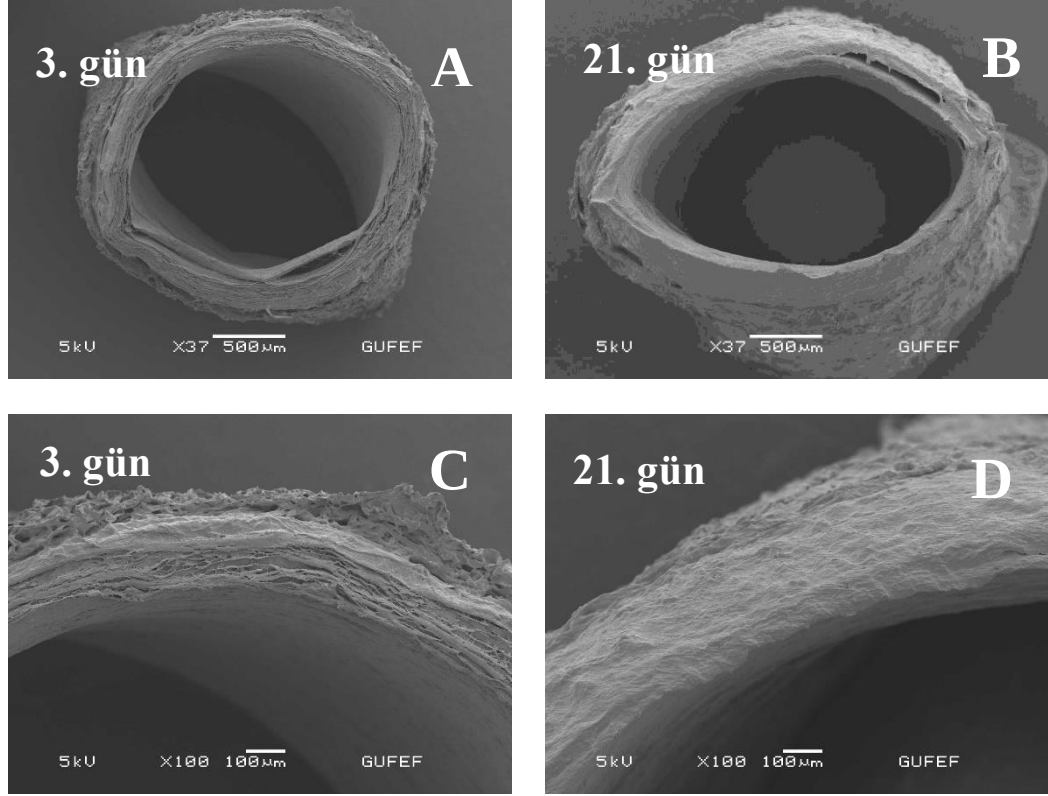
4.13 DDKbH'lerin ve DEbH'lerin Elastin/Kollajen/PCL Çok Katlı Tübüler İskelesi Üzerine Ekimi (Statik Çalışmalar)

Hazırlanan ve önceden steril edilen Elastin/Kollajen/PCL'den üretilen 3B-DMDG'nin üzerine/içine ekilen DEbH'lerin 3. günde (Şekil 4.35) iskele yüzeyini kapladığı ve 21. günün (Şekil 4.35) sonuna doğru ise tamamen yayılarak tüm iskele yüzeyini örtüğü görüldü. Benzer şekilde DDKbH'lerin 3. günde (Şekil 4.36) iskele içine/yüzeyine tutunmuş ve 21. günde (Şekil 4.36) ise iskele etrafında tamamen yayıldığı taramalı elektron mikroskobu mikrograftlarında görülmektedir.



Şekil 4.35 DEbH'ler ekilmiş 3B-DMDG'nin elektron mikroskobu görüntüleri

A., C. 3. günler B., D. 21. günler

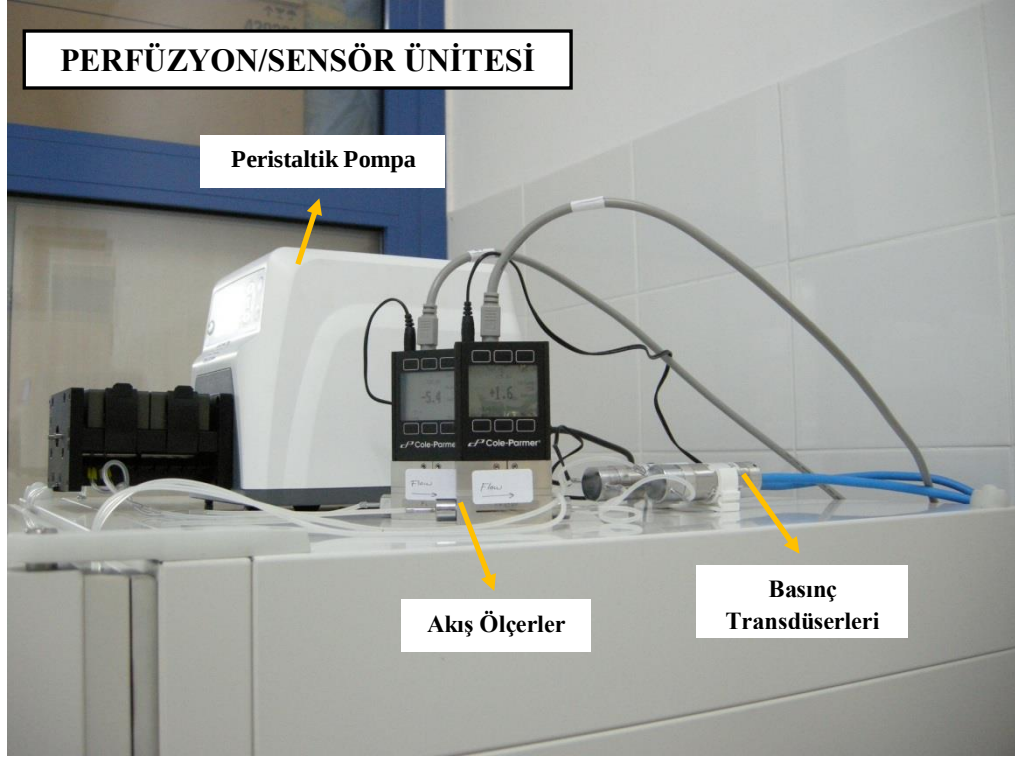


Şekil 4.36 DDKbH'ler ekilmiş 3B-DMDG'nin elektron mikroskobu görüntüleri

A., C. 3. günler B., D. 21. günler

4.14 Gerçek Zamanlı Akış-Basınç Ölçümlü Perfüzyon Biyoreaktör Sistemin Kurulması ve Damar Hücre Hatlarının 3B-DMDG'ne Ekimi (Dinamik Çalışmalar)

Kurulan biyoreaktör sisteminde akış-basınç bir peristaltik pompa yardımı ile sağlandı. Peristaltik pompanın ilk çıkışına seri olarak iç-dış akışı ölçebilen akış metreler ayrı ayrı bağlandı. Akış metreler ise doğrudan iç-dış basıncı ölçebilen basınç transdüserleri seri olarak ayrı ayrı bağlandı. Peristaltik pompayı, akış metreleri ve basınç transdüserlerini içeren Perfüzyon/Sensör Ünitesi şekil 4.37'da görülmektedir.



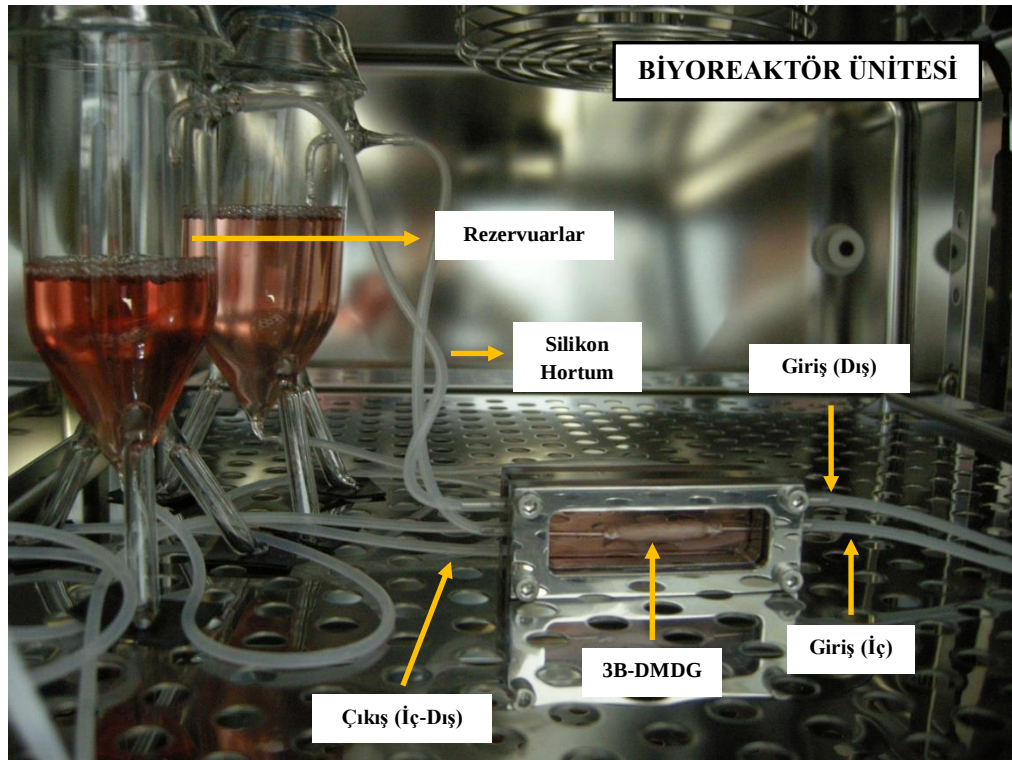
Şekil 4.37 Perfüzyon/Sensör Ünitesine genel bir bakış

Akış metreler ve basınç transdüserlerinden alınan sinyaller akım ve gerilim duyarlı veri kayıt cihazları ile bir bilgisayara gönderildi. Veri kayıt cihazlarını ve bilgisayarı içeren Veri Kayıt ve İşlem Ünitesi Şekil 4.38’de görülmektedir.



Şekil 4.38 Veri Kayıt ve İşlem Ünitesi

Peristaltik pompa, rezervuarlarından çektiği besi yerini akış ölçerler ve basınç transdüserleri üzerinden doğrudan perfüzyon ünitesine doğru iletmıştır. Perfüzyon ünitesinin iç ve dış girişinden içeri dolan besi yeri teflon iplerler yardımı ile tutturulmuş 3B-DMDG'nin içinden ve dışından akarak tekrar ilgili rezervuarlara doğru akmıştır. Rezervuarları ve perfüzyon hücrelerini içeren Biyoreaktör Ünitesi Şekil 4.39'de verilmiştir.



Şekil 4.39 Biyoreaktör Ünitesi

Dinamik kültürün ilk günlerinde akış, hücrelerin tutunması ve yayılması için düşük hızlarda tutuldu. Bu süre DDKbH'ler için yaklaşık 10 gün iken, DEbH'ler için ise 5 gündür. 15. günden itibaren ise akış gradientli olarak artırıldı ve buna bağlı sistemde oluşan basınç gerçek zamanlı olarak kayıt altına alındı. Günlere göre değişen akış-basınç ile ilgili veriler çizelge 4.9-4.10 ve çizelge 4.11'de sunulmuştur.

Çizelge 4.9 0-2. günler arasında sistemde ölçülen akış (ml/dakika) ve basınç (mmHg) değerleri

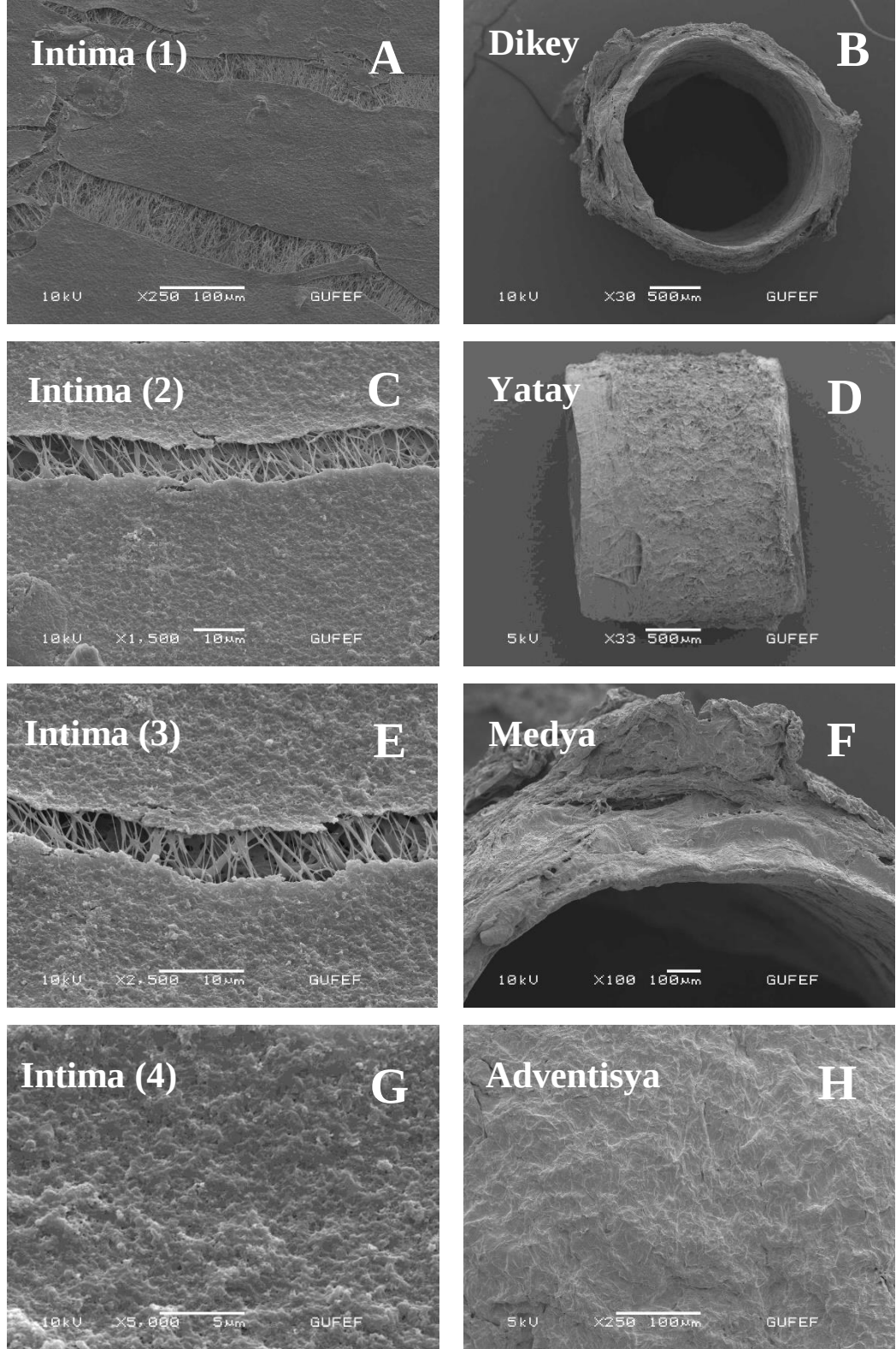
İstatistik	Akış Dış (ml/min) (ml/dak)	Akış İç (ml/min) (ml/dak)	Basınç Dış (mmHg) (mmHg)	Basınç İç (mmHg) (mmHg)
Ortalama	1,0	2,3	0,0	0,0
Minimum	0,7	1,6	0,0	0,0
Maksimum	1,3	2,8	0,0	0,0
Medyan	1,0	2,4	0,0	0,0
S. Sapma	0,2	0,3	0,0	0,0

Çizelge 4.10 2-4. günler arasında sistemde ölçülen akış (ml/dakika) ve basınç (mmHg) değerleri

İstatistik	Akış Dış (ml/min) (ml/dak)	Akış İç (ml/min) (ml/dak)	Basınç Dış (mmHg) (mmHg)	Basınç İç (mmHg) (mmHg)
Ortalama	2,0	4,5	0,0	18,8
Minimum	0,2	0,1	0,0	0,0
Maksimum	7,0	8,6	8,6	46,2
Medyan	2,0	4,5	0,0	23,2
S. Sapma	0,6	1,2	0,1	8,9

Çizelge 4.11 4-6. günler arasında sistemde ölçülen akış (ml/dakika) ve basınç (mmHg) değerleri

İstatistik	Akış Dış (ml/min) (ml/dak)	Akış İç (ml/min) (ml/dak)	Basınç Dış (mmHg) (mmHg)	Basınç İç (mmHg) (mmHg)
Ortalama	2,5	5,9	0,0	34,1
Minimum	1,5	0,1	0,0	0,2
Maksimum	3,4	37,7	0,0	119,0
Medyan	2,5	5,5	0,0	27,5
S. Sapma	0,3	3,3	0,0	14,3



Şekil 4.40 21 gün boyunca dinamik koşullarda tutulan DDKbH'ler ve DEbH'ler ekili 3B-DMDG'nin elektron mikroskobu görüntüleri

A., C., E., G. DEbH'lerin tutunup yayıldığı *intima* tabakası, B. Graftın dikey görünümü, D. Graftın yatay görünümü, F., H. DDKbH'ler ekili *medya* ve *adventisya* tabakaları

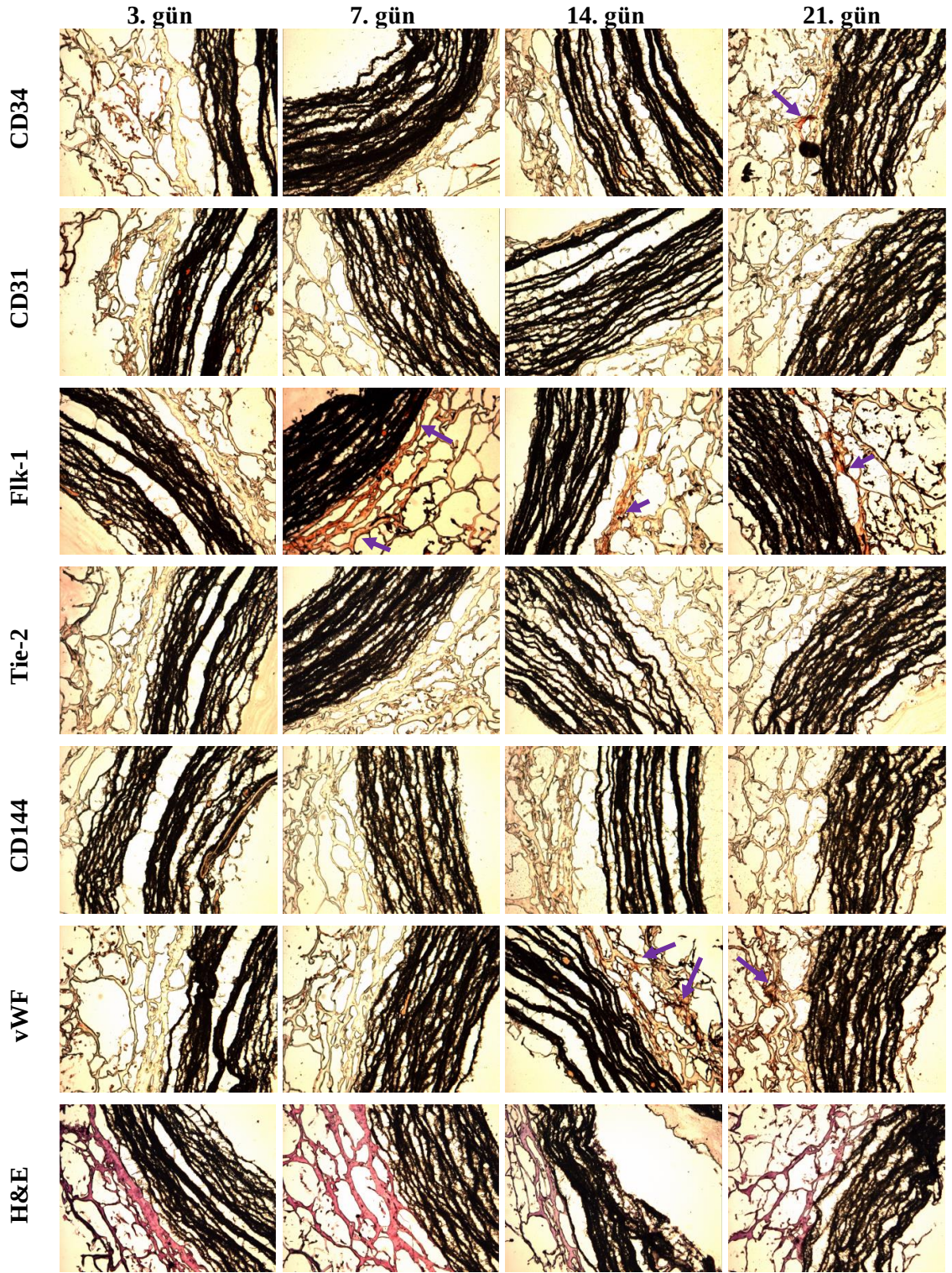
6 gün boyunca toplamda 518.400 kayıt alındı. Çizelgeler 4.9 - 4.11 incelendiğinde ortalama iç akış hızının 1,0 ml/dakikalarda olduğu sürede iç basıncın okunamadığı ancak ortalama hızın 2,0 ml/dakika ve üzerine çıktığında ise iç basıncın 34,1 mmHg seviyelerinde okunduğu görülmektedir. Aksine ortalama dış akış hızı 5,9 ml/dakikalara kadar çıkmıştır ancak buna karşılık bir basınç değeri okunamadı.

21 gün boyunca dinamik koşullarda 3B-DMDG içinde/yüzeyinde kültüre edilen DDKbH'ler ve DEbH'lerin iskelenin her yanını sardığı görüldü. DEbH'lerin, iskelenin lümen kısmına tutunduğu ve dinamik olarak ekilmelerini takiben 11 günlük süre zarfında tamamen lifsi *intima* tabakasını örterek pürüzsüz bir endotelyumu oluşturduğu taramalı elektron mikroskobu mikrograftlarında görülmektedir. İlave olarak 3B-DMDG üzerine statik olarak ekilen DDKbH'lerin 21 gün boyunca iskelenin medya ve adventisya tabakalarını sardığı ve kapattığı da yine elektron mikroskobu mikrograftlarında görülmektedir (Şekil 4.40).

4.15 İmmün/histokimya Çalışmaları 1 (Statik Çalışmalar)

DEbH'ler statik koşullarda 3B-DMDG üzerine/içine ekildi ve örnekler farklı zaman noktalarında tesbit edildi. Tesbit edilen örnekler kriyo kesit çalışmaları için çeşitli çözeltiler ve tamponlar ile etkileştirildi ve daha sonra kriyo mikrotom cihazı ile örneklerden kesitler alındı. Alınan kesitler endotel hücrelere özel antikorlar ve H&E ile boyandı ve ışık mikroskobu yardımı ile görüntülendi (Şekil 4.41).

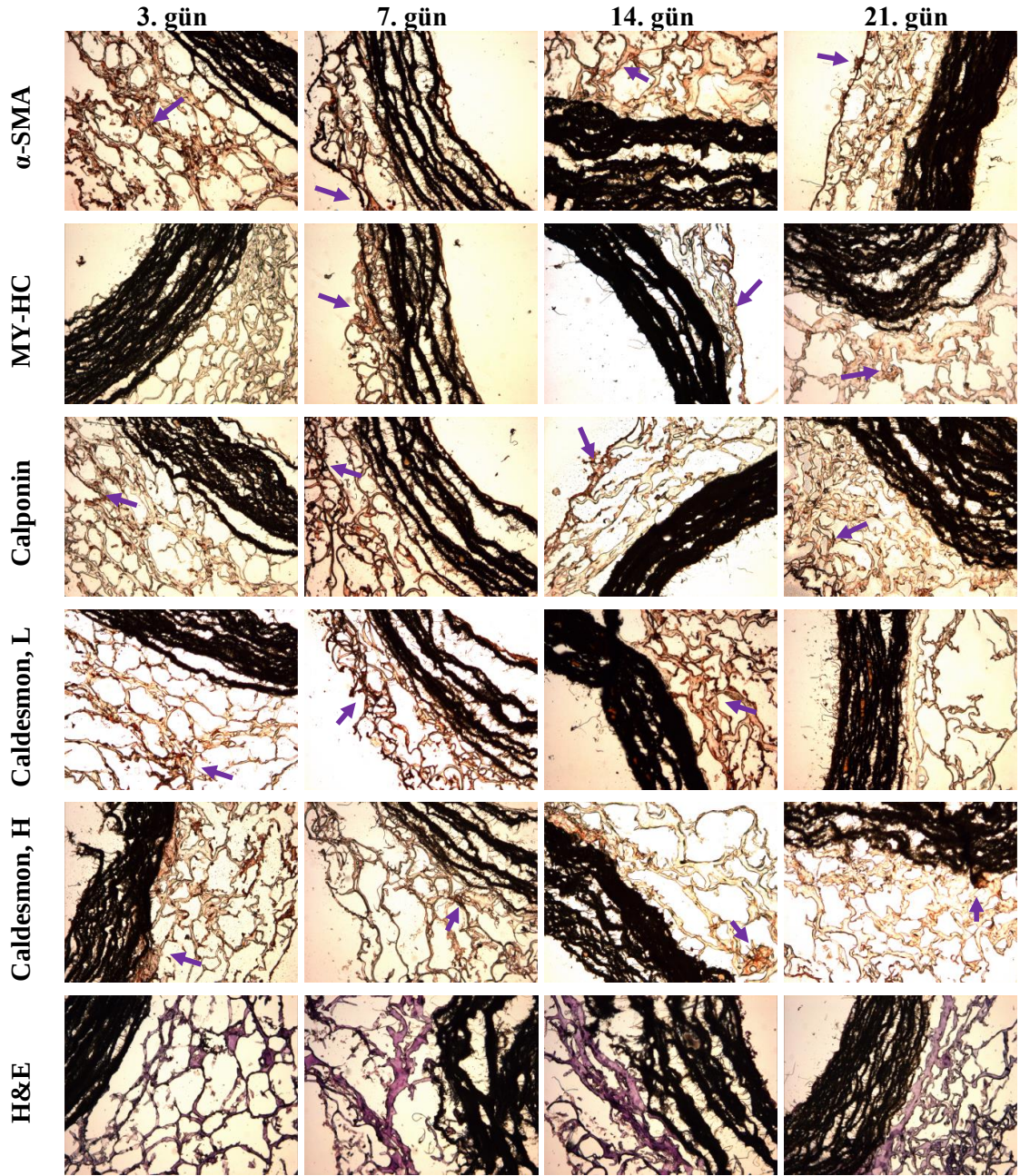
Statik olarak 3B-DMDG üzerine/içine ekilen ve bu şekilde kültüre edilen DEbH'lerin protein ifadelerindeki değişim incelendiğinde CD34 ifadesinde iki hafta boyunca bir değişim olmazken 21 günde ifadede kısmen bir artışın olduğu, CD31 ifadesinde görünür bir değişimin olmadığı, Flk-1 ifadesinin ilk günlerde oluşmadığı ancak takip eden kültür süresinde arttığı, Tie-2 ifadesinde deney süresi boyunca bir değişimin olmadığı, CD144 ifadesinde ise yine belirgin bir farkın olmadığı ve son olarak ise vWF ifadesinde ilk haftada bir değişim görünmez iken takiben eden 2 hafta boyunca ifadenin yoğun şekilde arttığı görüldü (Şekil 4.41).



Şekil 4.41 3, 7, 14 ve 21 gün boyunca 3B-DMDG içinde/üzerinde statik olarak ekilip kültüre edilen DEbH'lerin insana karşı farede üretilen CD31, CD34, CD144, Tie-2, vWF, Flk-1 birincil antikorları ve ilave olarak H&E ile boyanmasının ışık mikroskobu görüntüsü

DDKbH'ler statik koşullarda benzer biçimde 3B-DMDG üzerine/içine ekildi, örnekler farklı zaman noktalarında tesbit edildi ve kesitleri alındı. Alınan kesitler damar düz kas hücrelerine özel antikorlar ve H&E ile boyandı ve ışık mikroskobu yardımı ile görüntüldendi (Şekil 4.42).

Statik olarak 3B-DMDG üzerine/içine ekilen ve bu şekilde kültüre edilen DDKbH'lerin protein ifadelerindeki değişim incelendiğinde α SMA ifadesinin ilk günlerden son güne kadar yoğun bir şekilde olduğu, MY-HC ifadesinin ilk üç günde oluşmadığı ama 3. günden itibaren kısmen de olsa oluşmaya başladığı, kalponin ifadesinin de α SMA ifadesine benzer biçimde ilk günlerden son güne kadar yoğun bir şekilde olduğu, CADL ifadesinin ilk 3 hafta oluştuğu ama sonraki haftada azaldığı ve son olarak ise CADH ifadesinin ilk günlerden son güne kadar belirgin bir biçimde oluştuğu şekil 4.42'de görölmektedir.

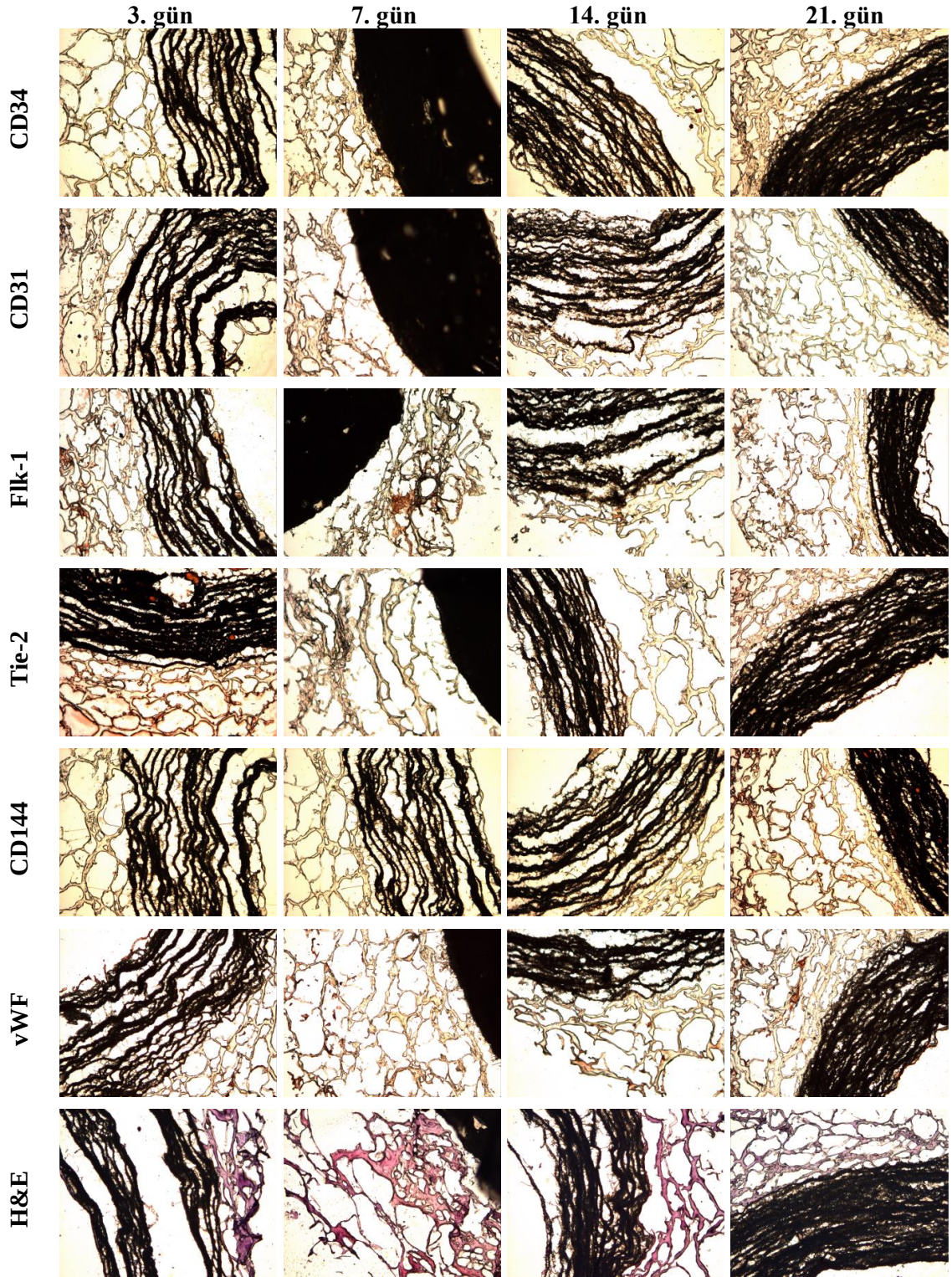


Şekil 4.42 3, 7, 14 ve 21 gün boyunca 3B-DMDG içinde/üzerinde statik olarak ekilip kültüre edilen DDKbH'lerin insana karşı farede üretilen α SMA, MY-HC, CALP, CADL ve CADH birincil antikoları ve ilave olarak H&E ile boyanmasının ışık mikroskobu görüntüsü

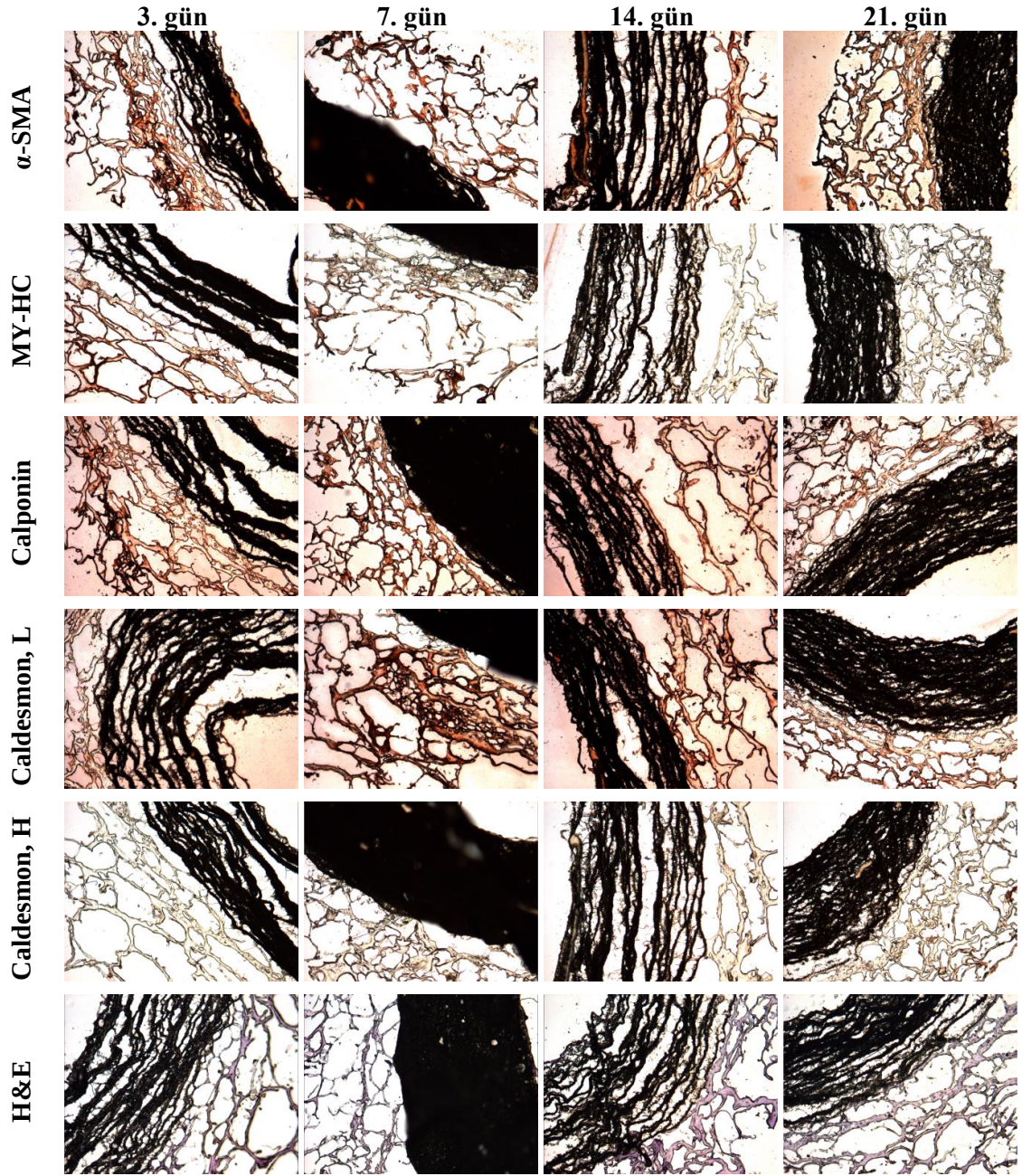
iAMKH'leri de statik olarak 3B-DMDG içine/üzerine ekilerek endotel hücrelere (Şekil 4.43) ve düz kas hücrelerine (Şekil 4.44) özel yukarıda sıralan birincil antikorların hepsi ve H&E ile boyanarak ışık mikroskobu altında görüntülendi. Bu çalışma ile kullanılan kök hücrelerin ifadesi ile kök hücrelerden farklılaşmış hücre hatlarının ifadeleri arasındaki benzerlikler ve/veya farklılıklar ortaya konuldu.

Statik olarak 3B-DMDG üzerine/içine ekilen ve bu şekilde kültüre edilen iAMKH'lerin protein ifadelerindeki değişim incelendiğinde CD34 ve CD31 ifadesinde 3. günden 21. güne kadar bir değişim olmadığı, Flk-1 ifadesinin düşük seviyelerde olduğu, Tie-2 ve CD144 ifadelerinde deney süresi boyunca bir değişimin olmadığı ve son olarak ise vWF ifadesinin ise yine düşük seviyelerde olduğu şekil 4.43'de görülmektedir.

Yine benzer şekilde statik olarak 3B-DMDG üzerine/içine ekilen ve bu şekilde kültüre edilen iAMKH'lerin protein ifadelerindeki değişim incelendiğinde α SMA ifadesinin ilk günlerden son güne kadar belirli düzeylerde olduğu, MY-HC ifadesinde bir değişimin olmadığı, CALP ifadesinin olduğu, CADL ifadesinin ilk günlerden son günlere kadar belirgin biçimde olduğu ve son olarakta CADH ifadesinin ilk günlerden son güne kadar oluşmadığı şekil 4.44'de görülmektedir.



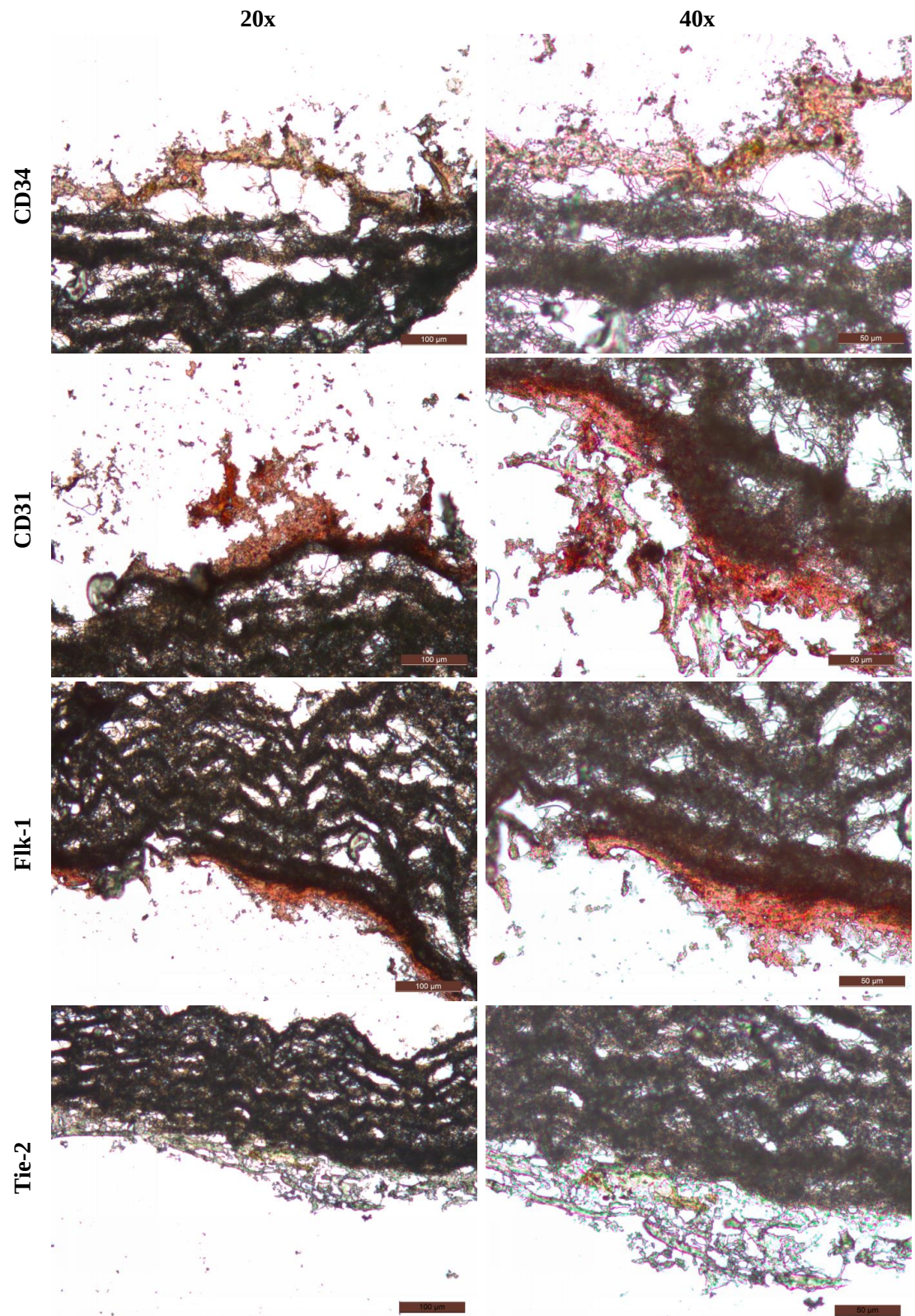
Şekil 4.43 3, 7, 14 ve 21 gün boyunca 3B-DMDG içinde/üzerinde statik olarak ekilip kültüre edilen iAMKH'lerin insana karşı farede üretilen CD31, CD34, CD144, Tie-2, vWF, Flk-1 birincil antikorları ve ilave olarak H&E ile boyanmasının ışık mikroskobu görüntüsü

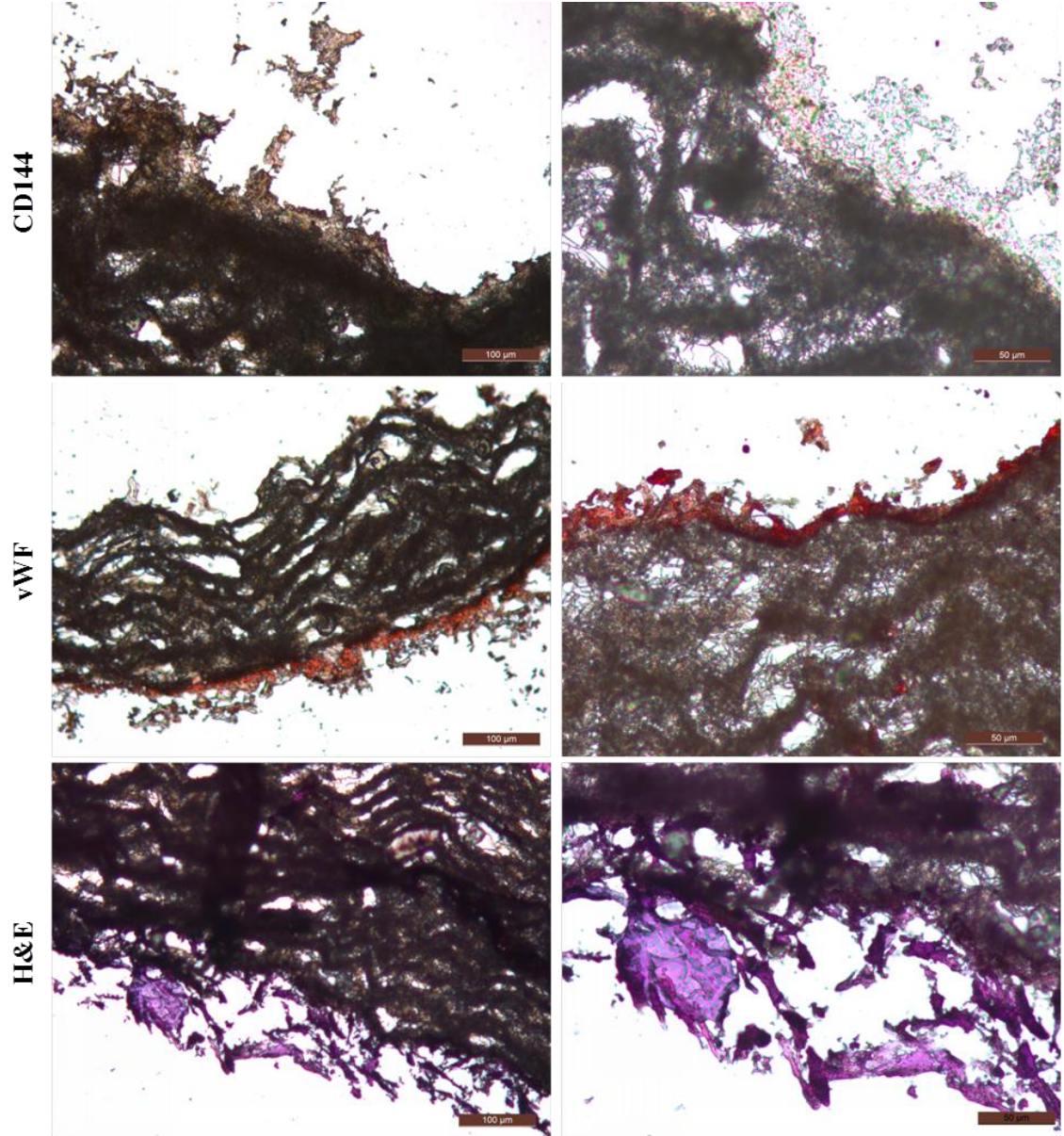


Şekil 4.44 3, 7, 14 ve 21 gün boyunca 3B-DMDG içinde/üzerinde statik olarak ekilip kültüre edilen iAMKH'lerin insana karşı farede üretilen α SMA, MY-HC, CALP, CADL ve CADH birincil antikörleri ve ilave olarak H&E ile boyanmasının ışık mikroskobu görüntüsü

4.16 İmmün/histokimya Çalışmaları 2 (Dinamik Çalışmalar)

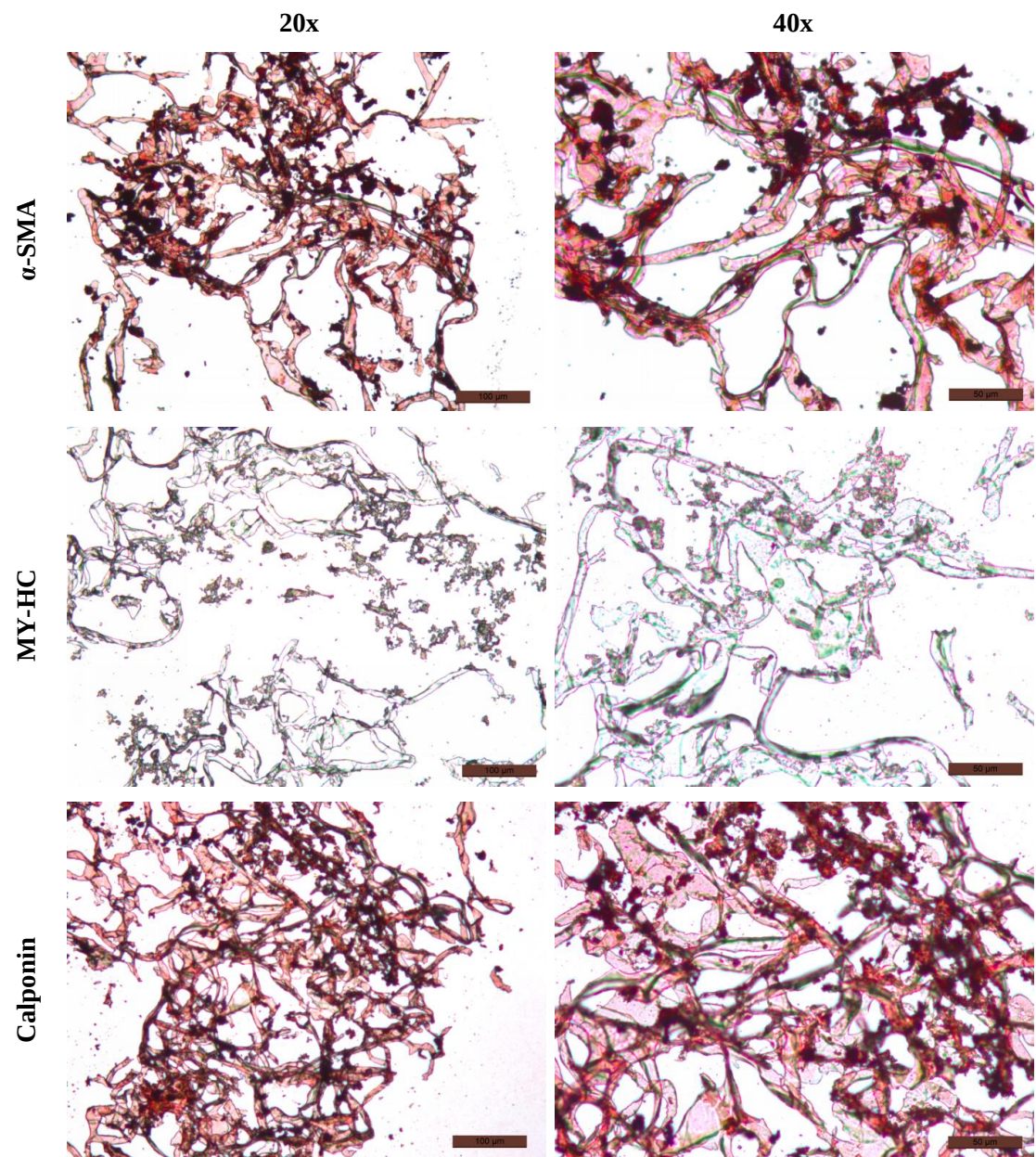
Statik çalışmaları takiben dinamik çalışmalara geçildi ve dinamik koşullar altında 3B-DMDG içine ekilip kültüre edilen DEbH'lerin ifadelerindeki değişim incelendi (Şekil 4.45). Bunun için 21. günün sonunda biyoreaktörden çıkartılıp tesbit edilen 3B-DMDG kriyo kesit çalışmaları için çeşitli çözeltiler ve tamponlar ile etkileştirildi ve daha sonra kriyo mikrotom cihazı ile bu iskeleden kesitler alındı. Dinamik olarak 3B-DMDG'nin lümen kısmına ekilen DEbH'ler yaklaşık olarak 11 gün boyunca perfüzyona maruz bırakıldı. Bu hücre hattının protein ifadelerindeki değişim incelendiğinde statik kültüre göre CD31, CD34, Flk-1 ifadelerinde bariz bir artışın olduğu bununla birlikte CD144 ifadesinin oluşmaya başladığı görüldü. Ancak Tie-2 ifadesinde statik kültüre göre bir değişim saptanmadı (Şekil 4.45). H&E dahil diğer boyamalardan da görüldüğü üzere DEbH'ler 3B-DMDG'nin lümen kısmını ince bir hat şeklinde sararak kapattığı belirlendi. Taramalı elektron mikroskobu ile alınan görüntüler de bu tezi savunmaktadır (Şekil 4.40).

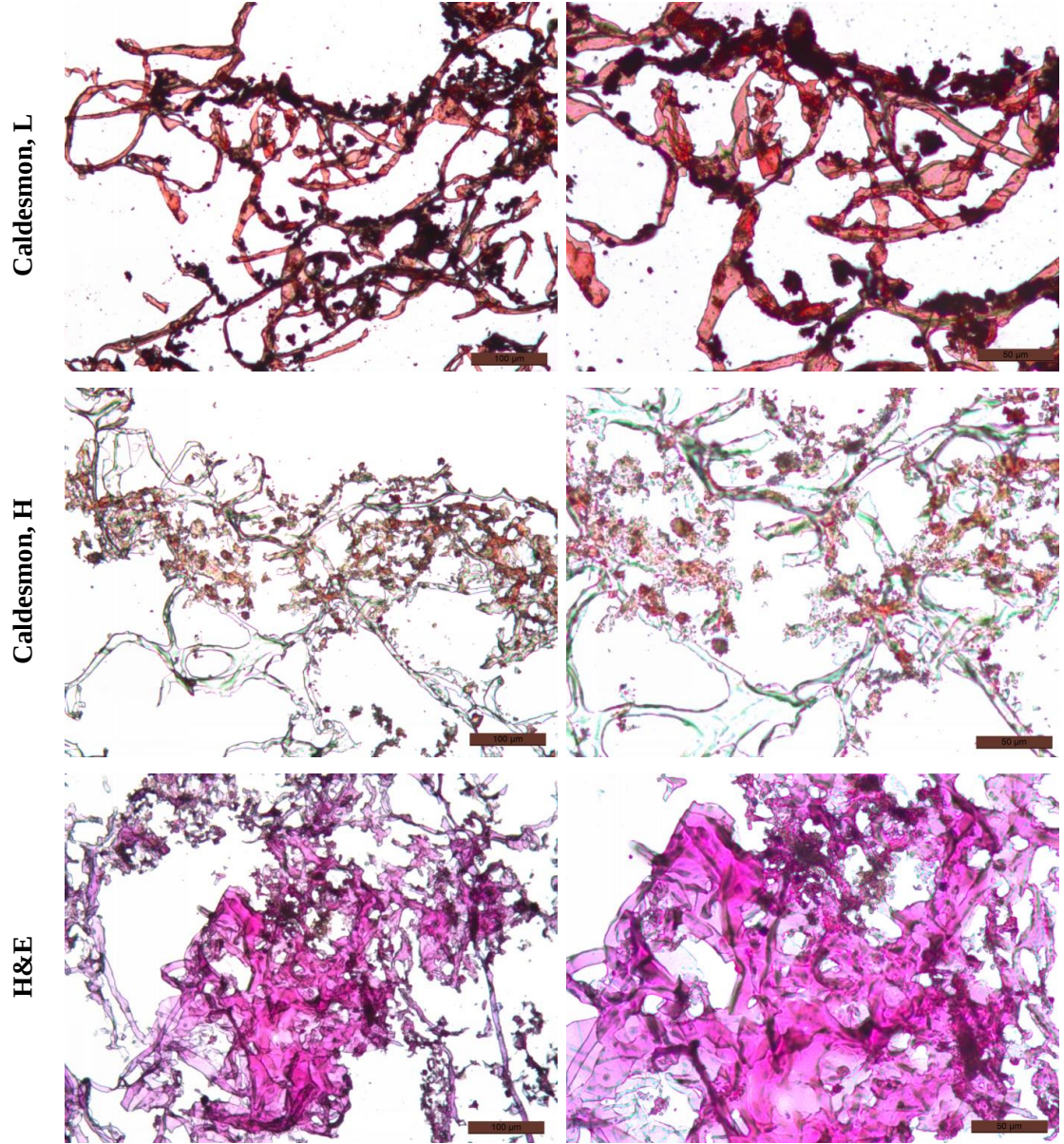




Şekil 4.45 11 gün boyunca biyoreaktör sisteminde 3B-DMDG'nin lümen kısmına dinamik koşullar altında ekilip kültüre edilen DEBH'lerin insana karşı farede üretilen CD31, CD34, CD144, Tie-2, vWF, Flk-1 birincil antikorları ve ilave olarak H&E ile boyanmasının ışık mikroskobu görüntüsü (Boyut çubukları 100 µm ve 50 µm)

Benzer şekilde dinamik koşullar altında 3B-DMDG üzerinde (medya ve adventisya tabakalarında) kültüre DDKbH'lerin ifadelerindeki değişim incelendi (Şekil 4.46). Statik olarak 3B-DMDG'nin medya ve adventisya tabakalarına ekilen DDKbH'ler 21 gün boyunca perfüzyona maruz bırakıldı. Bu hücre hattının protein ifadelerindeki değişim incelendiğinde statik kültüre oranla α SMA, CALP, CADH ve CADL ifadesinde bir artış olduğu aksine MY-HC ifadesinde bariz bir değişimin olmadığı görüldü (Şekil 4.46). H&E dahil diğer boyamalardan da görüldüğü üzere DDKbH'ler 3B-DMDG'nin *medya* ve *adventisya* tabakaları içinde tamamen yayılarak bu tabakaları örtmüştür. Taramalı elektron mikroskobu ile alınan görüntüler de bu tezi savunmaktadır (Şekil 4.40).





Şekil 4.46 21 gün boyunca biyoreaktör sisteminde 3B-DMDG'nin medya ve adventisya tabakalarına statik olarak ekilip dinamik koşullarda kültüre edilen DDKbH'lerin insana karşı farede üretilen α SMA, MY-HC, CALP, CADL CADH birincil antikörleri ve ilave olarak H&E ile boyanmasının ışık mikroskobu görüntüsü (Boyut çubukları 100 µm ve 50 µm)

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışmada, iAMKH'lerinin izolasyonu, izole edilen hücrelerin kök hücre fenotipinin belirlenmesi, fenotipi belirlenen kök hücrelerin TGF β 1, BMP4 ve Ang II gibi büyüme faktörleri ve kemokinin kullanılmasıyla DDKbH'lere ve farklı derişimlerde rh-VEGF içeren EGM-2 Bullet kit kullanılmasıyla DEbH'lere farklılaştırılması, doğal damarın üç katmanını aynı anda taklit edebilen tübüler formda iskelelerin üretilmesi, üretilen iskelelerin biyomekaniksek özelliklerinin belirlenmesi, iAMKH'lerinin, DDKbH'lerinin ve DEbH'lerinin doku kültür kabının yüzeyinde ve üretilen iskeleler üzerinde/içinde canlılık ve çoğalma kapasitelerinin belirlenmesi, tek tabakada (iki boyut), statik (üç boyut) ve dinamik (üç boyut) koşullarda kültüre edilen hücrelerin immünfenotipinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

İnsan adipoz dokusu tip I kollajenaz varlığında enzimatik olarak sindirilmiş ve lipo-aspirat hücreleri kültüre alınmıştır. Kemik iliği kaynaklı MKH'lerin izolasyonu ve kültürüne benzer şekilde (Gong ve Niklason 2008) hiçbir ek ilave katılmadan kültür devam ettirilmiştir. İzolasyondan yaklaşık bir hafta sonra dibe yapışan ve fibroblastik morfolojiye sahip hücreler gözlenmeye başlanmıştır (Şekil 4.1). “International Society for Cellular Therapy'nin” mezenkimal kök hücreleri için belirlediği CD paneline göre, izole edilen hücrelerin CD73, CD90 ve CD105 gibi işaretçilere yüksek oranda pozitif, aksine hematopoetik CD işaretçilerine ise yüksek oranda negatif olduğu yapılan akım sitometri çalışmaları ile görülmüştür (Çizelge 4.1).

Son zamanlarda yapılan birçok damar doku doku mühendisliği çalışmasında bulunabilirlik ve farklılaşma potansiyelinin gücünden ötürü adipoz kaynaklı MKH'lerin kemik iliği kaynaklı MKH'lere bir alternatif olarak ortaya çıkmata olduğu bildirilmiştir (Rodriguez vd. 2006). İlave olarak mezenkimal kök hücre fenotipine sahip lipoaspirat hücreleri *in vitro* koşullarda damar düz kas benzeri ve endotel benzeri hücrelere farklılaşabilme kabiliyetlerinin olduğu belirlenmiştir (Cao vd. 2005).

Fonsiyonel bir düz kas tabakasının inşası damar doku mühendisliği çalışmaları için çok önemlidir (Yazdani vd. 2009). Fenotipi belirlenmiş iAMKH'leri *in vitro* koşullarda

DDKbH'lere farklılaştırılmıştır. Kök hücrelerin damar düz kas hücrelerine farklılaşmasını konu alan birçok çalışmada TGF β 1, BMP4 ve Ang II gibi büyüme faktörleri ve kemokinin çeşitli kombinasyonları kullanılmıştır (Villiers vd. 2009, Kim vd. 2008). Bu çalışmada, iAMKH'leri TGF β 1, BMP4, Ang II, TGF β 1/BMP4, TGF β 1/Ang II, BMP4/Ang II ile ayrı ayrı etkileştirilmiş ve bu büyüme faktörü/kemokinlerin iAMKH'leri damar düz kas hücrelerine farklılaştırma güçleri belirlenmiştir. Farklılaşma 7 ve 14 gün boyunca takip edilmiştir. Öncelikle, indüksiyon parametrelerinin tümünde α SMA ifadesinde negatif kontrole göre gözle görünür bir artış meydana geldiği, CALP ve CADH artışında TGF β 1/BMP4'ün etkin olduğu, Ang II ve kombinasyonlarının α SMA ifadesinin artışına neden olduğu ve tüm indüksiyon parametreleri içinde TGF β 1/BMP4 kombinasyonunun en etkin indükleme aracı olduğu belirlenmiştir. İlave olarak zamanla CADH ifadesindeki artışa paralel olarak CADL ifadesindeki azalış görülmektedir. MY-HC ifadesinde ise bir değişim gözlenmemiştir. Tek tabaka (2 boyut) kültürde hücrelerde bir gevşeme-kasılma hareketi olmadığından bu geç düz kas ifadesinin oluşmadığı düşünülmektedir (Heydarkhan-Hagvall vd. 2008). Doku kültür kabının yüzeyinde kültüre edilen ve pozitif kontrol olarak kullanılan iIMADKH'leri benzer yoğunlukta α SMA, CALP ve CADH gibi proteinlerin ifade etmiştir (Şekil 4.3 ve Şekil 4.6). Benzer şekilde TGF β 1/BMP4 kombinasyonunun iAMKH'lerinin damar düz kas hücrelerine farklılaşması için etkili bir indükleme aracı olduğu birçok grup tarafından da bildirilmektedir (Wang vd. 2010).

Damar doku mühendisliği çalışmalarındaki bir diğer önemli parametre ise sağlam ve fonksiyonel bir endotel tabakasının inşasıdır (Opitz vd. 2004). Bu amaçla, iAMKH'leri DEbH'lere farklılaştırılmıştır. Farklılaşma için ticari olarak mevcut olan EGM-2 Bullet kit kullanılmıştır. Kullanılan kit endotel hücreler için birçok önemli biyomolekülü içermektedir. Endotel hücrelerine farklılaşmada bFGF ve rh-VEGF gibi büyüme faktörleri çok önemlidir (Konno vd. 2010). Özellikle kullanılan rh-VEGF miktarı iyi ayarlanmalıdır. Bu çalışmada, 2ng/ml ve 50ng/ml olacak şekilde iki derişimin endotel hücrelerine farklılaşma üzerine etkisi belirlenmiştir. İçeriğinde 50ng/ml rh-VEGF bulunan EGM-2 Bullet kit ile kültüre edilen iAMKH'lerinin CD31, CD34, Flk-1, Tie-2, CD144 ve vWF gibi endotel hücre işaretçilerini negatif kontrole göre daha yoğun bir biçimde ifade ettiği immünohistokimya çalışmaları ile görülmüştür (Şekil 4.10-4.11).

Bu alanda yapılan çalışmalar incelendiğinde kullanılan rh-VEGF miktarının farklılaşma için yeterli olduğu bulunmuştur (Cao vd. 2005). Ayrıca EGM-2 Bullet kit ile kültüre edilen hücrelerin zamanla parke-taşı morfolojisini bırakarak iğsi ikincil yapıları aldığı (şekil 4.12) gözlenmiştir (Donnini vd. 2000).

iAMKH'lerin, DDKbH'lerin ve DEbH'lerin morfolojileri, dondurma-çözme sonrası canlılıkları ve tripsine karşı duyarlılıklarının farklılıklar gösterdiği belirlenmiştir. iAMKH'leri fibroblastik iğsi (Banas vd. 2007), DDKbH'ler tepe-vadi (Jeong vd. 2005) ve DEbH'lerin parke-taşı (Fischer vd. 2009) morfolojisine sahip olduğu inversiyon mikrokobu ile gözlenmiştir (şekil 4.13-4.14). Dondurma-zme sonrası canlılıkları incelendiğinde ilk sırada DDKbH'ler yer almakta ve bunu sırası ile DEbH'ler ve iAMKH'ler izlemektedir. Benzer şekilde tripsine karşı duyarlılıkta ilk sırada DEbH'ler (20-30 saniye) yer almakta ve bunu sırası ile DDKbH'ler (1-2 dakika) ve iAMKH'leri (3-5 dakika) takip etmekte olduğu ve bu sonuçların literatür ile benzerlikler gösterdiği bulunmuştur (Hu vd. 2009).

Hücre kültürü çalışmalarını takiben malzeme üretimi aşamasına geçilmiştir. Öncellikle, inşa edilecek 3B-DMDG'nin *intima* tabakasını oluşturacak nano/mikro lifsi tübüler iskele elektro-eğirme tekniği yardımı ile PCL'dan üretilmiştir. PCL biyomekaniksel özelliklerinden ötürü damar doku mühendisliği çalışmalarında sıklıkla kullanılan biyouyumlu ve biyobozunur bir polimerdir (Liv vd. 2006). Nano/mikro lifsi yapıda iskele üretiminde kullanılan en yaygın teknik elektro-eğirme tekniğidir (Bhardwaj ve Kundu 2010). İskele retim aşamasından öncelikle sistem parametrelerinin optimizasyonu yapılmıştır. Bunun için öncellikle çözücü sistemi ve polimer derişimi çalışılmıştır. PCL, %0.6 NaCl içeren diklorometan/metanol (7:3) zc sistemi içerinde sırasıyla %1, %2, %5, %10 (m/v)'lik derişimler de çözülerek elektro-eğirme için en uygun derişim araştırılmıştır. Çözücü sistemi olarak seçilen diklorometan/metanol PCL'dan elektro-eğirme işlemi ile nano/mikro lifsi iskele üretiminde sıklıkla kullanılmaktadır. Ortama ilave edilen tuz ise polimer çözeltisinin elektriksel iletkenliğinin artmasına ve daha düz liflerin elde edilmesine olanak sağlamaktadır (Beachley ve Wen 2009). Yapılan alışmalar doğrultusunda en uygun derişimin %10 (m/v) olduğu tespit edilmiştir (şekil 4.18). Bu derişimin üzerine

çıkıldığında enjektör ucunda tıkanmalar meydana gelmiştir. Diğer önemli bir parametre ise uygulanan gerilim ve oluşan elektrik alanın şiddetidir. 0-33 kV aralığında denemeler yapılmış ve en uygun gerilimin 28 kV olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.15). Enjektör pompa hızı ve enjektör iç çapı gibi parametreler de çalışılıp optimal değerler belirlenmiştir (Şekil 4.16-4.17). Sistem optimize edildikten sonra PCL'dan tek tabaka ve tübüler yapıda nano/mikro lifsi örgüsel olmayan iskeleler elde edilmiştir (Şekil 4.19). Elde edilen bu iskele hücrelerin tutunmasına ve lifler boyunca yönlendirilmesine olanak sağlamaktadır (Xu vd. 2004).

3B-DMDG'nin *intima* tabakasının inşasını takiben elastin/kollajenden mamül makro/mikro gözenekli süngerimsi iskelelerin üretimine geçilmiştir. Elastin ve kollajen seyreltik asit varlığında çözölmüş ve daha sonra bir kalıba alınarak 3B-DMDG'nin *medya* ve *adventisya* tabakaları oluşturulmuştur. Elde edilen makro/mikro gözenekli sahip iskele (Şekil 4.20) hücrelerin tutunmasına ve çoğalmasına olanak sağlamaktadır (Bilodeau ve Mantovani 2006). Ayrıca yapısındaki mevcut gözenekler sayesinde besin yeri iskelelerin her noktasına ulaşmaktadır.

İskele üretim aşamasının ardından elde edilen iskeleler üzerine/içine iAMKH'leri, DDKbH'ler ve DEbH'ler ekilmiş ve hücrelerin üretilen iskeleler üzerinde canlılıkları, çoğalmaları ve yayılmaları incelenmiştir. Şekil 4.21 incelendiğinde DDKbH'lerin diğer hücre tiplerine göre doku kültür kabı yüzeyinde daha yüksek canlılık ve çoğalma gösterdiği bu DEbH'lerinin ve iAMKH'lerinin takip ettiği görölmektedir. Daha yüksek yüzey alanına sahip sünger içinde DDKbH'lerin nano/mikro lifsi tabaka yüzeyine ekili DEbH'lere göre daha yüksek oranda canlılık gösterdiği belirlenmiştir. DEbH'lerin 3. günde nano/mikro lifsi iskele yüzeyine tutunduğu ve 14. Günü sonuna doğru iskeleyi tamamen kapatarak sardığı taramalı elektron mikroskobu mikrograftlarında görölmektedir (Şekil 4.25). Benzer biçimde makro/mikro gözenekli sahip elastin/kollajen süngerimsi iskele üzerine ekilen DDKbH'ler de 3. Günden 14. Güne kadar iskele üzerine/içine tutunup çoğaldığı ve mevcut gözeneklerin tamamını kapattığı elektron mikroskobu mikrograftlarından görölmektedir (Şekil 4.26). Nano/mikro lifsi PCL tek tabaka iskelesi ve makro/mikro gözenekli süngerimsi elastin/kollajen DEbH'ler ve DDKbH'lerin tutunup yayılabilmesine olanak sağlamaktadır.

Üretilen iskelelerin biyomekaniksel özelliklerinin belirlenmesi için tüm iskeleler kuru ve ıslak formda tek yönlü çekme testine tabi tutulmuştur. Doğal damara benzer mekanik özelliklere sahip iskelelerin üretilmesi için yoğun bir çalışma yapılmaktadır (Naito vd. 2011). Nano/mikro lifsi yapıya sahip PCL tübün ortalama $18226,9 \pm 2642,36$ kPa'lık bir gerilime dayandığı tespit edilmiştir (Şekil 4.28). Güçlendirilmiş-Elastin/Kollajen/PCL iskelesi ıslak formda yaklaşık olarak ortalama $672,352 \pm 154,548$ kPa'lık bir gerilime dayandığı tespit edilmiştir (Çizelge 4.6). Hazırlanan iskelede ana yükü nano/lifsi PCL tübüler iskelesi çekmektedir (Çizelge 4.2). *Medya* ve *adventisya* tabakasını oluşturan makro/mikro gözenekli elastin/kollajen süngerimsi yapının iskelenin biyomekaniksel özelliklerine bir katkı sağlamadığı belirlenmiştir. Koroner arterin biyomekaniksel testi ile ilgili çalışmaları içeren yayınlar incelendiğinde koroner arterin 250-300 kPa gerilime dayanabildiği görülmüştür (Kathryn A. McKenna vd. 2012, Mehmet H.Kural vd. 2012, E. Claes vd. 2010). Kontrol grubu olarak seçilen iGBA ise yaklaşık 132 kPa'lık bir gerilime dayanabilmektedir (Çizelge 4.7).

3B-DMDG üzerine/içine iAMKH'leri, DDKbH'leri ve DEbH'leri ayrı ayrı ekilerek statik koşullarda (3 boyut) kültür sürdürülmüştür. Belirli zaman noktalarında tesbit edilen örnekler immün/histokimyasal olarak karakterize edilmiştir. DDKbH'ler ekili 3B-DMDG kesitleri düz kas hücrelerine özel birincil antikorlar ile boyanmıştır. İskele üzerine ekilmiş DDKbH'lerinin ilk günlerden son güne kadar yoğun bir şekilde α SMA ifade ettiği, MY-HC ifadesinin ilk günlerde oluşmadığı ama daha sonraki zaman noktalarında kısmen de olsa oluşmaya başladığı, CALP ifadesinin de α SMA ifadesine benzer biçimde ilk günlerden son güne kadar yoğun bir şekilde olduğu, CADL ifadesinin ilk 3 haftada oluştuğu ama sonraki haftada azaldığı ve son olarak ise CADH ifadesinin ilk günlerden son güne kadar belirgin bir biçimde oluştuğu Şekil 4.41'de görülmektedir. İskele üzerine/içine ekilmiş DDKbH'ler statik koşullarda MY-HC ifadesini değiştirmemiştir.

Benzer şekilde kültüre edilen DEbH'lerin protein ifadelerindeki değişim incelendiğinde CD34 ifadesinde ilk iki hafta boyunca bir değişim olmazken 21 günde ifadede kısmen bir artışın olduğu, CD31 ifadesinde görünür bir değişimin olmadığı, Flk-1 ifadesinin ilk günlerde oluşmadığı ancak takip eden kültür süresinde arttığı, Tie-2 ifadesinde deney

süresi boyunca bir değişimin olmadığı, CD144 ifadesinde ise yine belirgin bir farkın olmadığı ve son olarak ise vWF ifadesinde ilk haftada bir değişim görünmez iken takiben eden 2 hafta boyunca ifadenin yoğun şekilde arttığı görülmüştür (Şekil 4.40).

iAMKH'leri hazırlanan 3B-DMDG üzerine/içine statik koşullarda ekilmiş ve kontrol grubu olarak sonuçlar değerlendirilmiştir. Endotel hücrelere özgü protein ifadeleri incelendiğinde CD34 ve CD31 ifadesinde ilk günlerden 3. haftaya kadar bir değişim olmadığı, Flk-1 ifadesinin düşük seviyelerde olduğu, Tie-2 ve CD144 ifadelerinde deney süresi boyunca bir değişimin olmadığı ve son olarak ise vWF ifadesinin ise yine düşük seviyelerde olduğu Şekil 4.42'de görülmektedir. Yine benzer şekilde kültüre edilen iAMKH'lerinin damar düz kas hücrelerine özgü protein ifadelerindeki değişim incelendiğinde α SMA ifadesinin ilk günlerden son güne kadar belirli düzeylerde olduğu, MY-HC ifadesinde bir değişimin olmadığı, CALP ifadesinin olduğu, CADL ifadesinin ilk günlerden son günlere kadar belirgin biçimde oluştuğu ve son olarak da CADH ifadesinin ilk günlerden son güne kadar oluşmadığı Şekil 4.43'de görülmektedir.

Taramalı elektron mikroskobu mikrograftları incelendiğinde kullanılan hücre hatlarının statik koşullarda 3B-DMDG'nin *intima*, *medya* ve *adventisya* tabakalarına ilk günlerde tutunmaya başladığı ve takip eden üç hafta boyunca iskelenin tüm katmanlarını sardığı görülmüştür (Şekil 4.34-4.35).

Statik kültür çalışmalarını takiben dinamik kültür çalışmalarına geçilmiştir. Damar doku mühendisliğinde hücre/iskele etkileşimini arttırmak ve hücrelerin akış ve basınç altında (mekanotransdüksiyon etki) hücre iskelet ve hücre dışı matris proteinlerini yoğun bir biçimde sentezlemesini indüklemek amacı ile hücre/iskele yapısı perüzyon sistemi içine alınarak dinamik koşullarda kültüre edilir (Lowery vd. 2010). Mekanotransdüksiyon etki altında hücreler doğal damar dokusuna benzer biçimde şekillenebilmektedir (Yazdani vd. 2009). Hücreler akış ve basınç altında iskele üretiminde kullanılan doğal ve sentetik polimerleri yeniden modelleyebilmektedir. Dinamik kültür çalışmalarında, ilk olarak hazırlanan iskelenin *medya* ve *adventisya* tabakaları üzerine statik koşullarda DDKbH'ler ekilmiştir. Bu şekilde kültür 10 gün boyunca düşük hızlarda sürdürülmüş ve hücrelerin tutunup yayılması sağlanmıştır (Goa vd. 2008). Bu aşamadan sonra

DEbH'ler hazırlanan iskelenin lümen kısmına dinamik koşullarda ekilmiştir. 15-21. günler arasında ise akış hızı gradientli olarak arttırılmış ve buna bağlı sistem içimde oluşan basınç değerleri kayıt edilmiştir (Çizelgeler 4.9-4.11).

Taramalı elektron mikroskobu mikrograftlarına göre dinamik koşullarda kültüre edilen DDKbH'ler iskelenin *medya* ve *adventisya* tabakasına tutunmuş ve 3 hafta içinde iskelenin dış kabuğunu tamamen sararak bazal membran görevi gören nano/mikro lifsi PCL tabakasına ulaşmıştır (Şekil 4.39). Benzer şekilde dinamik koşullarda ekilen ve kültüre edilen DEbH'ler iskelenin lümen kısmına tutunup çoğaldığı ve pürüzsüz bir endotel tabakasını oluşturduğu görülmektedir (Şekil 4.39). Dinamik koşullarda kültüre edilen DDKbH'lerin protein ifadelerindeki değişim incelendiğinde statik kültüre oranla α SMA, CALP, CADH ve CADL ifadesinde bir artışın olduğu aksine MY-HC ifadesinde bariz bir değişimin olmadığı tespit edilmiştir (Şekil 4.45). Benzer şekilde endotel hücrelerin protein ifadelerindeki değişim incelendiğinde statik kültüre göre CD31, CD34, Flk-1 ifadelerinde bariz bir artışın olduğu bununla birlikte CD144 ifadesinin oluşmaya başladığı görülmüştür. Ancak Tie-2 ifadesinde statik kültüre göre bir değişim saptanmamıştır (Şekil 4.44). Elde edilen sonuçlar literatür ile benzerlikler gösterdiği görülmüştür (Cho vd. 2006).

Sonuç olarak bu çalışmanın, damar doku mühendisliğinde kullanılabilecek otolog hücre kaynağı, üç boyutlu yapı iskelesi ve kültür sistemlerinin kombinasyonu ile kişiye özgü tedavi yaklaşımı fikrini ve kliniğe rehberlik edebilecek çevrilebilir bilgi birikimine katkı sağlayabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Ahmann, K.A., Weinbaum, J.S., Johnson, S.L. and Tranquillo, R.T. 2010. Fibrin degradation enhances vascular smooth muscle cell proliferation and matrix deposition in fibrin-based tissue constructs fabricated in vitro. *Tissue Engineering : Part A*, Vol. 16(10); pp. 3261-3270.
- Bashur, C.A., Venkataraman, L. and Ramamurthi, A. 2012. Tissue engineering and regenerative strategies to replicate biocomplexity of vascular elastic matrix assembly. *Tissue Engineering : Part B*, Vol. 18(3); pp. 203-217.
- Bashur, C.A., Venkataraman, L. and Ramamurthi, A. 2012. Tissue engineering and regenerative strategies to replicate biocomplexity of vascular elastic matrix assembly. *Tissue Engineering: Part B : Reviews*, Vol. 18(6); pp. 203-217.
- Basu, J., Genheimer, C.W., Guthrie, K.I., Sangha, N., Quinlan, S.F., Bruce, A.T., Reavis, B., Halberstadt, C., Ilagan, R.M. and Ludlow, J.W. 2011. Expansion of the human adipose-derived stromal vascular cell fraction yields a population of smooth muscle-like cells with markedly distinct phenotypic and functional properties relative to mesenchymal stem cells. *Tissue Engineering: Part C*, Vol. 17(8); pp. 843-860.
- Baudry, D.B., Brachais, L., Cretu, A., Gattin, R., Loupy, A. and Stuerge, D. 2003. Synthesis of polycaprolactone by microwave irradiation –an interesting route to synthesize this polymer via green chemistry. *Environ Chem Lett*, Vol. 1; pp. 19-23.
- Beachley, V. and Wen, X. 2009. Effect of electrospinning parameters on the nanofiber diameter and length. *Materials Science and Engineering C*, Vol. 29; pp. 663–668.
- Beamish, J.A., He, P., Kottke-Marchant, K. and Marchant, R.E. 2010. Molecular regulation of contractile smooth muscle cell phenotype: implications for vascular tissue engineering. *Tissue Engineering: Part B*, Vol. 16(5); pp. 467-491.
- Beamish, J.A., He, P., Kottke-Marchant, K. and Marchant, R.E. 2010. Molecular Regulation of Contractile Smooth Muscle Cell Phenotype: Implications for Vascular Tissue Engineering. *Tissue Engineering: Part B*, Vol. 16(5); pp. 467-491.
- Bellingham, C.M., Lillie, M.A., Gosline, J.M., Wright, G.M., Starcher, B.C., Bailey, A.J., Woodhouse, K.A. and Keeley, F.W. 2003. Recombinant human elastin polypeptides self-assemble into biomaterials with elastin like properties. *Biopolymers*, Vol. 70, pp. 445–455.

- Benavides, O.M., Petsche, J., Moise, K.J., Johnson, A. and Jacot, J.G. 2012. Evaluation of Endothelial Cells Differentiated from Amniotic Fluid-Derived Stem Cells. *Tissue Engineering : Part A*, Vol. 18(11,12); pp. 1123-1131.
- Bhardwaj, N. and Kundu, S.C. 2010. Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique. *Biotechnology Advances*, Research review paper, pp. 1-23.
- Blau, H.M., Brazelton, T.R., and Weimann, J.M. 2001. The Evolving Concept Review of a Stem Cell: Entity or Function? *Cell*, Vol. 105, pp. 829–841.
- Boland, E.D., Matthews, J.A., Pawlowski, K.J., Simpson, D.G., Wnek, G.E. and Bowlin, G.L. 2004. Electrospinning collagen and elastin: preliminary vascular tissue engineering. *Frontiers in Bioscience*, Vol. 9; pp. 1422-1432.
- Borschel, G.H., Huang, Y., Calve, S., Arruda, E.M., Lynch, J.B., Dow, D.E., Kuzon, W.M., Dennis, R.G. and Brown, D.L. 2005. Tissue Engineering of Recellularized Small-Diameter Vascular Grafts. *Tissue Engineering*, Vol. 11(5,6); pp. 778-786.
- Bouten, C.V.C., Dankers, P.Y.W., Driessen-Mol, A., Pedron, S., Brizar, A.M.A. and Baaijens, F.P.T. 2011. Substrates for cardiovascular tissue engineering. *Advanced Drug Delivery Reviews*, Vol. 63; pp. 221-241.
- Bunnell, B.A., Flaat, M., Gagliardi, C., Patel, B. and Ripoll, C. 2008. Adipose-derived stem cells: Isolation, expansion and differentiation. *Methods*, Vol. 45; pp. 115–120.
- Cao, Y., Sun, Z., Liao, L., Meng, Y., Han, Q. and Zhao, R.C. 2005. Human adipose tissue-derived stem cells differentiate into endothelial cells in vitro and improve postnatal neovascularization in vivo. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol. 332; pp. 370–379.
- Carola, R., Harley, J.P. and Noback, C.R. 1990. *Human Anatomy and Physiology*. McGraw-Hill, New York.
- Chaterji, S., Park, K. and Panitch, A. 2010. Scaffold-free in vitro arterial mimetics: the importance of smooth muscle–endothelium contact. *Tissue Engineering: Part A*, Vol. 16(6); pp. 1901-1912.
- Chaudhry G.R., Yao, D., Smith, A. and Hussain A. 2004. Osteogenic cells derived from embryonic stem cells produced bone nodules in three-dimensional scaffolds. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, Vol. 2004, Issue 4, pp. 203-210.
- Chen, H.T., Lee, M.J., Chen, C.H., Chuang, S.C., Chang, L.F., Ho, M.L., Hung, S.H., Fu, Y.C., Wang, Y.H., Wang, H.I., Wang, G.J., Kang, L. and Chang, J.K. 2012. Proliferation and differentiation potential of human adipose-derived mesenchymal stem cells isolated from elderly patients with osteoporotic fractures. *J. Cell Mol. Med.*, Vol. 16(3), pp. 582-593.

- Cheshire, N.J.W., Wolfe, M.S., Noone, M.A., Davies, L. and Drummond, M. 1992. The economics of femorocrural reconstruction for critical limb ischaemia with and without autologous vein. *J. Vasc. Surg.* Vol. 15, pp. 167-175.
- Chlupáč, J., Filová, E. and Bačáková, L. 2009. Blood Vessel Replacement: 50 years of Development and Tissue Engineering Paradigms in Vascular Surgery. *Physiol. Res.*, Vol. 58; pp. 120-139.
- Cho, S., Jeon, O., Lim, J.E., Gwak, S., Kim, S., Choi, C.Y., Kim, D. and Kim, B. 2006. Preliminary experience with tissue engineering of a venous vascular patch by using bone marrow-derived cells and a hybrid biodegradable polymer scaffold. *Journal Of Vascular Surgery.*, Vol. 44; pp. 1329-1340.
- Cho, S., Kim, K., Kang, J.M., Song, K.W., Kim, H.S., Park, C.H., Yoo, K.J. and Kim, B. 2009. Evidence for In Vivo Growth Potential and Vascular Remodeling of Tissue-Engineered Artery. *Tissue Engineering : Part A.*, Vol. 15(4); pp. 901-912.
- Cirillo, P., Golino, P., Ragni, M., Guarino, A., Calabro, P. and Chiarriello, M. 1999. A simple method for the isolation, cultivation, and characterization of endothelial cells from rabbit coronary circulation. *Thrombosis Research.*, Vol. 96; pp. 329-333.
- Clerin, V., Nichol, J.W., Petko, M., Myung, R.J., Gaynor, J.W. and Gooch, K.J. 2003. Tissue Engineering of Arteries by Directed Remodeling of Intact Arterial Segments. *Tissue Engineering.*, Vol. 9(3); pp. 461-472.
- Daamen, W.F., Veerkamp, J.H., van Hest, J.C., and van Kuppevelt, T.H. (2007). Elastin as a biomaterial for tissue engineering. *Biomaterials* 28, pp. 4378-4398.
- Deitzel, J.M., Kleinmeyer, J., Harris, D. and Tan, N.C.B. 2001. The effect of processing variables on the morphology of electrospun nanofibers and textiles. *Polymer*, Vol. 42, pp. 261-272.
- Donnini, D., Perrella, G., Stel, G., Ambesi-Impiombato, F.S. and Curcio, F. 2000. A new model of human aortic endothelial cells in vitro. *Biochimie.*, Vol. 82; pp. 1107-1114.
- Dvir, T., Timko, B.P., Kohane, D.S. and Langer R. 2011. Nanotechnological strategies for engineering complex tissues. *Nature Nanotechnology*, Vol. 6, pp. 13-22.
- Elçin, Y.M. 2003. *Tissue Engineering, Stem Cells and Gene Therapies, Advances in Experimental Medicine and Biology Series* Vol. 534, NY and London, Kluwer Academic-Plenum Press.
- Elisseeff, J.H., Lee, A., Kleinman, H.K. and Yamada, Y. 2002. Biological response of chondrocytes to hydrogels. *Annals of the New York Academy of Sciences*, Vol. 961, pp. 118-122.

- Fischer, L.J., McIlhenny, S., Tulenko, T., Golesorkhi, N., Zhang, P., Larson, R., Lombardi, J., Shapiro, I. and DiMuzio, P.J. 2009. Endothelial differentiation of adipose-derived stem cells: effects of endothelial cell growth supplement and shear force. *Journal of Surgical Research.*, Vol. 152; pp. 157–166.
- Formhals, A. 1934. Process and apparatus for preparing artificial threads. U.S. Patent No. 1, 975, 504.
- Friedenstein, A.Y., and Lalykina, K.S. 1970. Lymphoid cell populations are competent systems for induced osteogenesis. *Calcif Tissue Res.*, pp. 105-106.
- Friedman, S.G. 2005. *A History of Vascular Surgery*, 2nd Ed. Malden, MA, Futura.
- Fuchs, S., Hofmann, A. and Kirkpatrick, C.J. 2007. Microvessel-like structures from outgrowth endothelial cells from human peripheral blood in 2-Dimensional and 3-dimensional co-cultures with osteoblastic lineage cells. *Tissue Engineering.*, Vol. 13(10); pp. 2577-2588.
- Go, A.S., Mozaffarian, D., Roger, V.L., Benjamin, E.J., Berry, J.D., Borden, W.B., Bravata, D.M., Dai, S., Ford, E.S., Fox, C.S., Franco, S., Fullerton, H.J., Gillespie, C., Hailpern, S.M., Heit, J.A., Howard, V.J., Huffman, M.D., Kissela, B.M., Kittner, S.J., Lackland, D.T., Lichtman, J.H., Lisabeth, L.D., Magid, D., Marcus, G.M., Marelli, A., Matchar, D.B., McGuire, K.D., Mohler, E.R., Moy, C.S., Mussolino, M.E., Nichol, G., Paynter, N.P., Schreiner, P.J., Sorlie, P.D., Stein, J., Turan, T.Y., Virani, S.S., Wong, N.D., Turner, M.B. Heart Disease and Stroke Statistics. 2013-update. A Report From the American Heart Association., pp. 1-243.
- Gong, Z. and Niklason, L.E. 2008. Small-diameter human vessel wall engineered from bone marrow-derived mesenchymal stem cells (hMSCs). *The FASEB Journal.*, Vol. 22; pp. 1635-1648.
- Gong, Z., Calkins, G., Cheng, E., Krause, D. and Niklason, L.E. 2009. Influence of culture medium on smooth muscle cell differentiation from human bone marrow–derived mesenchymal stem cells. *tissue engineering : Part A.*, Vol. 15(2); pp. 319-330.
- Gray, C., Oliva, T., Christakis, A., Rolle, M. and Billiar, K. 2009. Design of a versatile, inexpensive vessel burst pressure measurement device. *Conference Publications.*, pp. 1-2.
- Guan, J.J., Sacks, M.S., Beckman, E.J. and Wagner W.R. 2002. Synthesis, characterization, and cytocompatibility of elastomeric, biodegradable poly(ester-urethane)ureas based on poly(caprolactone) and putrescine. *Journal of Biomedical Materials Research*, Vol. 61, pp. 493–503.

- Guillemette, M.D., Gauvin, R., Perron, C., Labbe', R., Germain, L. and Auger, F.A. 2010. Tissue-Engineered Vascular Adventitia with Vasa Vasorum Improves Graft Integration and Vascularization Through Inosculation. *Tissue Engineering: Part A*, Vol. 16(8); pp. 2617-2626.
- Guyton, R.A. 2006. Coronary artery bypass is superior to drug-eluting stents in multivessel coronary artery disease. *Ann. Thorac Surg.* Vol. 81, pp. 1949-1957.
- Hay, E.D 1991. *Cell biology of extracellular matrix*. New York, Plenum Press.
- Heiko , M., Groothuis, A., Sayegh, M.H. and Edelman, E.R. 2007. Matrix adherence of endothelial cells attenuates immune reactivity: induction of hyporesponsiveness in allo- and xenogeneic models. *The FASEB Journal*., Vol. 21; pp. 1-12.
- Hong, Y., Ye, S., Nieponice, A., Soletti, L., Vorp, D.A. and Wagner, W.R. 2009. A small diameter, fibrous vascular conduit generated from a poly(ester urethane)urea and phospholipid polymer blend. *Biomaterials*., Vol. 30; pp. 2457–2467.
- Hu, S., Song, Z., Zheng, Q. and Nie, J. 2009. Differences in the primary culture, purification and biological characteristics between endothelial cells and smooth muscle cells from rat aorta. *Journal of Nanjing Medical University*., Vol. 23(4); pp. 241-246.
- Huang, L., McMillan, R.A. and Apkarian, R.P. 2000. Generation of Synthetic Elastin-Mimetic Small Diameter Fibers and Fiber Networks. *Macromolecules*, Vol. 33, pp. 2989-2997.
- Huynh T.N., and Tranquillo, R.T. 2010. Fusion of Concentrically Layered Tubular Tissue Constructs Increases Burst Strength. *Annals of Biomedical Engineering*., Vol. 38(6); pp. 2226–2236.
- İnanç B., Arslan, Y.E., Şeker, Ş., Elçin, A.E. and Elçin, Y.M. (2008). Periodontal ligament cellular structures engineered with electrospun poly(DL-lactide-co-glycolide) nanofibrous membrane scaffolds. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, pp. 1549-1552.
- Jeon, E., Moon, H., Lee, M.J., Song, H.Y., Kim, H.Y., Bae, Y.C., Jung, J.S. and Kim, J. 2006. Sphingosylphosphorylcholine induces differentiation of human mesenchymal stem cells into smoothmuscle-like cells through a TGF- β -dependent mechanism. *Journal of Cell Science*., Vol. 119(23); pp. 4994-5005.
- Jeong, S., Kim, S.Y., Cho, S.K., Chong, M.S., Kim, K.S., Kim, H., Lee, S.B. and Lee, Y.M. 2007. Tissue-engineered vascular grafts composed of marine collagen and PLGA fibers using pulsatile perfusion bioreactors. *Biomaterials*., Vol. 28; pp. 1115-1122.

- Jeong, S., Kwon, J.H., Lim, J., Cho, S., Jung, Y., Sung, W.J., Kim, S.H., Kim, Y., Lee, Y.M., Kim, B., Choi, C.Y. and Kim, S. 2005. Mechano-active tissue engineering of vascular smooth muscle using pulsatile perfusion bioreactors and elastic PLCL scaffolds. *Biomaterials.*, Vol. 26; pp. 1405–1411.
- Kassem, M. 2004. Mesenchymal stem cells: biological characteristics and potential clinical applications. *Cloning Stem Cells*, Vol. 6(4) pp. 369-374.
- Kenawy, R., Layman, J.M., Watkins, J.R., Bowlin, G.L., Matthews, J.A., and Simpson, D.G. 2003. Electrospinning of poly (ethylene-co-vinyl alcohol) fibers. *Biomaterials*, Vol. 24, pp. 907–913.
- Konno, M., Hamazaki, T.S., Fukuda, S., Tokuhara, M., Uchiyama, H., Okazawa, H., Okochi, H. and Asashima, M. 2010. Efficiently differentiating vascular endothelial cells from adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in serum-free culture. *Biochemical and Biophysical Research Communications.*, Vol. 400; pp. 461–465.
- Köksoy, A.A. 2002. Damar düz kası proliferasyonunda sinyal iletimi. *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası.*, Vol. 55(4); pp. 297-306.
- Kwon, K., Kidoaki, S. and Matsuda, T. 2005. Electrospun nano- to microfiber fabrics made of biodegradable copolyesters: structural characteristics, mechanical properties and cell adhesion potential. *Biomaterials.*, Vol. 26; pp. 3929–3939.
- Lakshmipathy, U. And Verfaillie, C. 2005. Stem cell plasticity. *Blood Reviews*, Vol. 19, Issue 1, pp. 29–38.
- Lanza, R., Langer, R. and Vacanti J.P. 1997. *Principles of Tissue Engineering*, San Diego, Elsevier Academic Press.
- Lee, J.L., Oh, S.H., Liu, J., Soker, S., Atala, A. and Yoo, J.J. 2008. The use of thermal treatments to enhance the mechanical properties of electrospun poly(ϵ -caprolactone) scaffolds. *Biomaterials.*, Vol. 29; pp. 1422-1430.
- Li, W., Cooper, J.A., Mauck, R.L. and Tuan, R.S. 2006. Fabrication and characterization of six electrospun poly(α -hydroxyester)-based Wbrous scaVolds for tissue engineering applications. *Acta Biomaterialia.*, Vol. 2; pp. 377–385.
- Li, W.J., Laurencin, C.T., Caterson, E.J., Tuan, R.S. and Ko, F.K. 2002. Electrospun nanofibrous structure: novel scaffold for tissue engineering. *J. Biomed. Mater. Res.* Vol. 60, 613–621.
- Lin, H.B., Sun, W., Mosher, D.F., Garcia-Echeverria, C., Schaufelberger, K., Lelkes, P.I. and Cooper, S.L. 1994. Synthesis, surface, and cell-adhesion properties of polyurethanes containing covalently grafted RGD peptides. *J. Biomed. Mater. Res.* Vol. 28, 329–342.

- Lodish H., Berk, A., Zipursky, S.L. 2000. Molecular Cell Biology, New York, W. H. Freeman and Company.
- Luong-Van, E., Grøndahl, L., Chua, K.N., Leong, K.W., Nurcombe, V. and Cool, S.M. 2006. Controlled release of heparin from poly(e-caprolactone) electrospun fibers. *Biomaterials.*, Vol. 27; pp. 2042-2050.
- Ma, P.X. 2008. Biomimetic Materials for Tissue Engineering. *Advanced Drug Delivery Reviews.* Vol. 60(2); pp. 184-198.
- Ma, P.X. and Langer, R. 1995. Degradation, structure and properties of fibrous poly(glycolic acid) scaffolds for tissue engineering. *Polymers in Medicine and Pharmacy*, pp. 99-104.
- Marchal, J.A., Pico'n, M., Pera'n, M., Bueno, C., Jime'nez-Navarro, M., Carrillo, E., Boulaiz, H., Rodri'guez, N., A'lvarez, P., Menendez, P., Teresa, E. and Ara'negu, A. 2012. Purification and long-term expansion of multipotent endothelial-like cells with potential cardiovascular regeneration. *Stem Cells And Development.*, Vol. 21(4); pp. 562-574.
- Matthews, J.A., Wnek, G.E., Simpson, D.G. and Bowlin, G.L. 2002. Electrospinning of collagen nanofibers. *Biomacromolecules*, Vol. 3, 232–238.
- Mccloskey, K.E., Gilroy, M.E. and Nerem, R.M. 2005. Use of Embryonic Stem Cell-Derived Endothelial Cells as a Cell Source to Generate Vessel Structures in Vitro. *Tissue Engineering.*, Vol. 11(3,4); pp. 497-505.
- Mendis, S., Puska, P. and Norrving, B. 2011. Global Atlas on cardiovascular disease prevention and control. The World Health Organization in collaboration with the World Heart Federation and the World Stroke Organization, 164.
- Methe, H. and Edelman, E.R. 2006. Cell–matrix contact prevents recognition and damage of endothelial cells in states of heightened immunity. *Circulation*, Vol. 114; pp. 233-238.
- Miranville, A., Heeschen, C., Sengenès, C., Curat, C.A., Busse, R. and Bouloumié, A. 2004. Improvement of postnatal neovascularization by human adipose tissue-derived stem cells. *American Heart Association.*, Vol. 110; pp. 349-355.
- Mo, X.M., Xu, C.Y., Kotaki, N. and Ramakrishna, S. 2004. Electrospun P(LLA-CL) nanofiber: a biomimetic extracellular matrix for smooth muscle cell and endothelial cell proliferation. *Biomaterials.*, Vol. 25; pp. 1883-1890.
- Moore J. and Thibeault S. 2012. Insights into the role of elastin in vocal fold health and disease. *J. Voice*, Vol. 26(3), pp. 269-275.
- Morton, W.J. 1902. Method of dispersing fluids. US Patent Specification 705691.

- Naito, Y., Shinoka, T., Duncan, D., Hibino, N., Solomon, D., Cleary, M., Rathore, A., Fein, C., Church, S. and Breuer, C. Vascular tissue engineering: Towards the next generation vascular grafts. 2011. *Advanced Drug Delivery Reviews.*, Vol. 63(4,5); pp. 312-323.
- Norgren, L., Hiatt, W.R., Dormandy, J.A., Nehler, M.R., Harris, K.A. and Fowkes, F.G. 2007. TASC II Working Group. Inter-Society Consensus for the Management of Peripheral Arterial Disease (TASC II). *J. Vasc. Surg.* Vol. 45, pp. 5–67.
- Norotte, C., Marga, F.S., Niklason, L.E. and Forgacs, G. 2009. Scaffold-free vascular tissue engineering using bioprinting. *Biomaterials.*, Vol. 30; pp. 5910–5917.
- O’Cearbhaill, E.D., Punchard, M.A., Murphy, M., Barry, F.P., McHugh, P.E. and Barron, V. 2008. Response of mesenchymal stem cells to the biomechanical environment of the endothelium on a flexible tubular silicone substrate. *Biomaterials.*, Vol. 29; pp. 1610-1619.
- O'Brien, F.J. 2011. Biomaterials and scaffolds for tissue engineering. *Materials Today*, Vol. 14(3) pp. 88-95.
- Odorico, J.S., Kaufman D.S. and Thomson J.A. 2001. Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. *Stem Cells*, Vol. 19, Issue 3, pp. 193–204.
- Oh, S., Oh, N., Appleford, M. and Ong, J.L. 2006. Bioceramics for Tissue Engineering Applications – A Review. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology.*, Vol. 2(2); pp. 49-56.
- Opitz, F., Schenke-Layland, K., Richter, W., Martin, D.P., Degenkolbe, I., Wahlers, T. and Stock, U.A. 2004. Tissue Engineering of Ovine Aortic Blood Vessel Substitutes Using Applied Shear Stress and Enzymatically Derived Vascular Smooth Muscle Cells. *Annals of Biomedical Engineering.*, Vol. 32(2); pp. 212–222.
- Perre’ e, J., Leeuwen, T.G., Kerindongo, R., Spaan, J.A. and Bavel, E. 2003. Function and Structure of Pressurized and Perfused Porcine Carotid Arteries Effects of in Vitro Balloon Angioplasty. *American Journal of Pathology.*, Vol. 163(5); pp. 1743-1750.
- Planat-Benard, V., Silvestre, J., Cousin, B., André, M., Nibbelink, M., Tamarat, R., Clergue, M., Manneville, C., Saillan-Barreau, C., Duriez, M., Tedgui, A., Levy, B., Pénicaud, L. and Casteilla, L. 2004. Plasticity of Human Adipose Lineage Cells Toward Endothelial Cells Physiological and Therapeutic Perspectives. *American Heart Association.*, Vol. 109; pp. 656-663.
- Pullensl, R.A.A., Stekelenburg1, M., Baaijens, F.P.T. and Post, M.J. 2009. The influence of endothelial cells on the ECM composition of 3D engineered cardiovascular constructs. *J Tissue Eng Regen Med.*, Vol. 3; pp. 11-18.

- Re'my-Zolghadri, M., Laganie`re, J., Oligny, J., Germain, L. and Auger, F.A.2004. Endothelium properties of a tissue-engineered blood vessel for small-diameter vascular reconstruction. *Journal Of Vascular Surgery.*, Vol. 39(3); pp. 613-620.
- Reneker, D.H., Kataphinan, W., Theron, A., Zussman, E. and Yarin, A.L. 2002. Nanofiber garlands of polycaprolactone by electrospinning. *Polymer.*, Vol. 43; pp. 6785–6794.
- Riboldi, S.A., Sampaolesi, M., Neuenschwander, P., Cossu, G. and Mantero, S. 2005. Electrospun degradable polyesterurethane membranes: potential scaffolds for skeletal muscle tissue engineering. *Biomaterials.*, Vol. 26; pp. 4606–4615.
- Rodri'guez, L.V., Alfonso, Z., Zhang, R., Leung, J., Wu, B. and Ignarro, L.J. 2006. Clonogenic multipotent stem cells in human adipose tissue differentiate into functional smooth muscle cells. *PNAS.*, Vol. 103(32); pp. 12167–12172.
- Seker, S., Arslan, Y.E. and Elcin, Y.M. (2010). Electrospun Nanofibrous PLGA/Fullerene-C60 Coated Quartz Crystal Microbalance for Real-Time Gluconic Acid Monitoring. *IEEE SENSORS JOURNAL*, Vol., 10(8) pp. 1342-1348.
- Seliktar, D., Nerem, R.M and Galis, Z.S. 2001. The Role of matrix metalloproteinase-2 in the remodeling of cell-seeded vascular constructs subjected to cyclic strain. *Annals of Biomedical Engineering.*, Vol. 29; pp. 923–934.
- Shin, H., Jo, S. and Mikos, A.G. 2003. Biomimetic materials for tissue engineering. *Biomaterials.*, Vol. 24; pp. 4353–4364.
- Shinoka, T., Shum-Tim D., Ma, P.X., Tanel, R.E., Langer, R., Vacanti, J.P. and Mayer, J.E Jr. 1997. Tissue-engineered heart valve leaflets: does cell origin affect outcome? *Circulation*, Vol. 96, pp. 102.
- Skarja, G.A. and Woodhouse, K.A. 2001. In vitro degradation and erosion of degradable, segmented polyurethanes containing an amino acid-based chain extender. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, Vol. 12 pp. 851–873.
- Smits, A., Driessen-Mol, A., Bouten, V.C. and Baaijens, F.P. 2012. A Mesofluidics-Based Test Platform for Systematic Development of Scaffolds for In Situ Cardiovascular Tissue Engineering. *Tissue Engineering: Part C.*, Vol. 18(6); pp. 1-11.
- Sobczak, M., Dargatz, J. and Chrzanowska-Wodnicka, M. 2010. Isolation and Culture of Pulmonary Endothelial Cells from Neonatal Mice. *Journal of Visualized Experiments.*, Vol. 46; pp. 1-4.
- Soletti, L., Hong, Y., Guan, J., Stankus, J.J., El-Kurdi, M.S., Wagner, W.R. and Vorp D.A. 2010. A bilayered elastomeric scaffold for tissue engineering of small diameter vascular grafts. *Acta Biomaterialia.*, Vol. 6; pp. 110–122.

- Sravanthi, R. 2009. Preparation and characterization of poly (ϵ -caprolactone) PCL scaffolds for tissue engineering applications. Master of Technology Department of Biotechnology and Medical Engineering National Institute of Technology., pp. 1-59.
- Tekeli, S.Ö., Emerk, K. 2007. Endotel Progenitor Hücreler. Marmara Medical Journal., Vol.20(1); pp. 59-65.
- Theron, S.A., Yarin, A.L., Zussman, E. and Kroll, E. 2005. Multiple jets in electrospinning: experiment and modeling. Polymer, Vol. 46, pp. 2889–2899.
- Tillman, B.W., Yazdani, S.K., Lee, S.J., Geary, R.L., Atala, A. and Yoo, J.J. 2009. The in vivo stability of electrospun polycaprolactone-collagen scaffolds in vascular reconstruction. Biomaterials., Vol. 30; pp. 583–588.
- Udelsman, B., Hibino, N., Villalona, G.A., McGillicuddy, E., Nieponice, A., Sakamoto, Y., Matsuda, S., Vorp, D.A., Shinoka, T. and Breuer, C.K. 2011. Development of an Operator-Independent Method for Seeding Tissue-Engineered Vascular Grafts. Tissue Engineering : Part C., Vol. 11(7); pp. 731-736.
- Valarmathi, M.T., Davis, J.M., Yost, M.J., Goodwin, R.L and Potts, J.D. 2009. A three-dimensional model of vasculogenesis. Biomaterials., Vol. 30; pp. 1098-1112.
- Vara, D.S., Salacinski, H.J., Kannan R.Y., Bordenave, L., Hamilton, G. and Seifalian A.M. 2005. Cardiovascular tissue engineering: state of the art. Pathol. Biol., Vol. 53, pp. 599-612.
- Venugopal, J., Ma, L.L., Yong, T. and Ramakrishna, S. 2005. In vitro study of smooth muscle cells on polycaprolactone and collagen nanofibrous matrices. Cell Biology International., Vol. 29; pp. 861-867.
- Venugopal, J., Ma, L.L., Yong, T. and Ramakrishna, S. 2005. In vitro study of smooth muscle cells on polycaprolactone and collagen nanofibrous matrices. Cell Biology International., Vol. 29; pp. 861-867.
- Villiers, J.A., Houreld, N. and Abrahamse, H. 2009. Adipose derived stem cells and smooth muscle cells: implications for regenerative medicine. Stem Cell Rev and Rep., Vol. 5; pp. 256-265.
- Vivanco, F., Mas, S., Darde, V.M., Cuesta, F., Alvarez-Llamas, G. and Barderas, M.G. 2007. Vascular proteomics. Proteomics Clin. Appl., Vol. 1; pp. 1102–1122.
- Wang, C., Cen, L., Yin, S., Liu, Q., Liu, W., Cao, Y. and Cui, L. 2010. A small diameter elastic blood vessel wall prepared under pulsatile conditions from polyglycolic acid mesh and smooth muscle cells differentiated from adipose-derived stem cells. Biomaterials., Vol. 31; pp. 621–630.

- Wang, C., Yin, S., Cen, L., Liu, Q., Liu, W., Cao, Y. and Cui, L. 2010. Differentiation of adipose-derived stem cells into contractile smooth muscle cells induced by transforming growth factor- β 1 and bone morphogenetic protein-4. *Tissue Engineering : Part C*, pp. 1-14.
- Wang, Y., Lam, J., Zhang, B., Tomlins, P.E., LI, X., Alpar, O., Wertheim, D.F., Jones, A.S. and Coombes, G.A. 2010. Biomechanical characterization of a micro/macroporous polycaprolactone tissue integrating vascular graft. *Biomedical Engineering Society*, Vol. 1(3); pp. 202-215.
- Winslow, T., Kibiuk, L. and Duckwall C. 2001. Preliminary Evidence of Plasticity Among Nonhuman Adult Stem Cells. *National Institutes of Health, The Adult Stem Cells*.
- Wise, S.G., Byrom, M.J., Waterhouse, A., Bannon, P.G., Ng, M.K.C. and Weiss A.S. 2011. A multilayered synthetic human elastin/polycaprolactone hybrid vascular graft with tailored mechanical properties. *Acta Biomaterialia*, Vol. 7; pp. 295–303.
- Wu, K., Wu, C. and Chang, J. 2007. Biodegradability and mechanical properties of polycaprolactone composites encapsulating phosphate-solubilizing bacterium *Bacillus* sp. PG01. *Process Biochemistry*, Vol. 42; pp. 669–675.
- Xu, C.Y., Inai, R., Kotaki, M. and Ramakrishna, S. 2004. Aligned biodegradable nanofibrous structure: a potential scaffold for blood vessel engineering. *Biomaterials*, Vol. 25; pp. 877-886.
- Xu, Z.C., Zhang, W.J., Li, H., Cui, L., Cen, L., Zhou, G.D., Liu, W. and Cao, Y. 2008. Engineering of an elastic large muscular vessel wall with pulsatile stimulation in bioreactor. *Biomaterials*, Vol. 29; pp. 1464-1472.
- Yang, F., Murugan, R., Wang, S. and Ramakrishna, S. 2005. Electrospinning of nano/micro scale poly (L-lactic acid) aligned fibers and their potential in neural tissue engineering. *Biomaterials*, Vol. 26, pp. 2603–2610.
- Yazdani, S.K., Watts, B., Machingal, M., Jarajapu, Y.P., Dyke, M.E. and Christ, G.E. 2009. Smooth muscle cell seeding of decellularized scaffolds: the importance of bioreactor preconditioning to development of a more native architecture for tissue-engineered blood vessels. *Tissue Engineering: Part A*, Vol. 15(4); pp. 827-840.
- Zhang, W., Liu, W., Cui, L. and Cao, Y. 2007. Tissue engineering of blood vessel. *J. Cell. Mol. Med.*, Vol. 11(5); pp. 945-957.
- Zuk, P.A., Zhu, M., Ashjian, P., De Ugarte, D.A., Huang, J.I., Mizuno, H, Alfonso, Z.C., Fraser, J.K., Benhaim, P. and Hedrick, M.H. 2002. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol. Biol. Cell*, Vol. 13(12) 4279-4295.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Yavuz Emre ARSLAN

Doğum Yeri : Ankara

Doğum Tarihi : 14.10.1983

Medeni hali : Bekar

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Ömer Seyfettin Anadolu Lisesi (2001)

Lisans : Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü (2005)

Yüksek Lisans : Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya (Biyokimya)
Anabilim Dalı (2008)

SCI Kapsamındaki Bilimsel Araştırma Makaleleri

Arslan, YE., Elcin AE., Elcin YM. (2012). Blood vessel engineering using a novel biomimetic compartmented tubular scaffold and human adipose mesenchymal stem cells. Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine, Volume: 6, Special Issue: SI, Supplement: 1, Pages: 297-297.

Parmaksiz M., **Arslan, YE.**, Elcin AE., Elcin YM. (2012). Preparation of bovine small intestinal submucosa and application as a wound dressing alone or seeded with mesenchymal stem cells in a full-thickness rat skin defect. Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine, Volume: 6, Special Issue: SI, Supplement: 1, Pages: 177-177.

Seker S., **Arslan YE.**, Elcin YM. (2010). Electrospun Nanofibrous PLGA/Fullerene-C60 Coated Quartz Crystal Microbalance for Real-Time Gluconic Acid Monitoring. IEEE SENSORS JOURNAL. 10(8): 1342:48.

Inanç B., **Arslan Y. Emre.**, S. Sükran., Elçin A. Eser., Elçin Y. Murat. (2008). Periodontal ligament cellular structures engineered with electrospun poly(DL-lactide-co-glycolide) nanofibrous membrane scaffolds. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 1549-1552.