

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**KALP DOKUSU KAYNAKLI BİYOMALZEMELERİN GELİŞTİRİLMESİ VE
HÜCRE KÜLTÜRLERİNDE KULLANILMASI**

Hatice ERCAN

KİMYA ANABİLİM DALI

**ANKARA
2014**

Her hakkı saklıdır

ETİK

Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez içindeki bütün bilgilerin doğru ve tam olduğunu, bilgilerin üretilmesi aşamasında bilimsel etiğe uygun davrandığımı, yararlandığım bütün kaynakları atıf yaparak belirttiğimi beyan ederim.

22.07.2014

Hatice ERCAN

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

KALP DOKUSU KAYNAKLI BİYOMALZEMELERİN GELİŞTİRİLMESİ VE HÜCRE KÜLTÜRLERİNDE KULLANILMASI

Hatice ERCAN

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Y. Murat ELÇİN

Bu çalışmada, sığır kalp dokusu kaynaklı bir biyomalzeme geliştirildi. Çeşitli deselülerizasyon protokolleri uygulanarak DNA içeriği, histokimya ve agaroz jel elektroforez analizleri ile en uygun deselülerizasyon protokolü belirlendi. Elde edilen deselülerize matriks, enzim yardımı ile parçalanarak, enjekte edilebilir miyokardiyal matriks yapısı elde edildi ve bu yapının özellikleri hücre kültüründe incelendi. Miyokardiyal matriks yapının jel oluşturma zamanı türbidimetrik ölçümlerle saptandı. Protein içeriği Lowry yöntemi ve SDS-PAGE analizleri ile belirlendi. *In vitro* çalışmalar için elde edilen miyokardiyal matriks yapıya insan adipoz mezenkimal kök hücreleri tohumlandı ve yapı üzerindeki hücre canlılığı MTT [3-(4,5-dimetildiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür] yöntemi ile belirlendi. Belirli zaman noktalarında alınan örnekler histokimyasal olarak incelendi. Sonuç olarak sığır kalp dokusu etkin bir biçimde hücreleştirilmiş ve enjekte edilebilir bir formu elde edildi. Elde edilen miyokardiyal matriks yapıda hücrelerin canlılığını devam ettirdiği belirlendi.

Temmuz 2014, 66 sayfa

Anahtar Kelimeler: Deselülerizasyon, Kalp doku mühendisliği, Doğal biyomalzemeler, Hücre dışı matriks

ABSTRACT

Master Thesis

DEVELOPMENT OF CARDIAC TISSUE-BASED BIOMATERIALS AND THEIR USE IN CELL CULTURES

Hatice ERCAN

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

Supervisor: Prof. Dr. Y. Murat ELÇİN

In this study, several decellularization protocols were evaluated, in order to develop a biomaterial derived from bovine cardiac tissue. The most suitable decellularization protocol was determined based on DNA content, histochemistry and agarose-gel electrophoresis analysis of the constructs. Decellularized matrix was subjected to enzymatic digestion to obtain an injectable myocardial matrix. The structure was later analysed in tissue culture settings. The gelation time of myocardial matrix was determined by turbidimetric analysis. Protein content was determined using the Lowry and SDS-PAGE methods. For the *in vitro* studies, myocardial matrix was seeded with human adipose mesenchymal stem cells, and the viability of the seeded cells was determined via MTT [3-(4 5-dimethylthiazol-2-yl)-2 5-diphenyltetrazolium bromide] assay. Samples that were taken on pre-determined time-points were analysed by histochemistry. Results indicated that bovine cardiac tissue was efficiently decellularized and an injectable form was successfully developed. Decellularized myocardial matrix structure was shown to support cell viability.

July 2014, 66 pages

Key Words: Decellularization, Cardiac tissue engineering, Naturally derived biomaterials, Extracellular matrix

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Yüksek lisans kapsamında bana bu tez konusunu veren ve araştırmalarımın her aşamasında engin fikirleriyle gelişmeme katkı sağlayan ve bana yol gösteren danışman hocam Sayın Prof. Dr. Y. Murat ELÇİN'e (Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı),

Histokimya ve hücre kültürü çalışmalarındaki yardımları için Sayın Prof. Dr. A. Eser ELÇİN'e (Ankara Üniversitesi Kök Hücre Enstitüsü),

Bu süreç boyunca bana destek olan ve yardımlarını esirgemeyen tüm laboratuvar arkadaşlarıma,

Ve hayatım boyunca aldığım her kararda yanımda olan babam Musa ERCAN ve annem Bediha ERCAN'a ve kardeşim Nuray ERCAN'a göstermiş oldukları sabır, anlayış ve fedakârlıklardan dolayı en içten teşekkürlerimi sunarım.

Hatice ERCAN

Ankara, Temmuz 2014

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY

ETİK.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT	iii
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR.....	iv
KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	4
2.1 Miyokard Enfarktüsü ve Kalp Yetmezliği.....	4
2.2 Tedavi Yaklaşımları.....	6
2.2.1 Doku Mühendisliği.....	8
2.2.2 Doku Mühendisliğinde biyomalzemelerin rolü	10
2.2.2.1 Sentetik biyomalzemeler.....	11
2.2.2.2 Doğal biyomalzemeler.....	12
2.2.2.3 Hücre Dışı Matriks.....	12
2.2.2.3.1 Deselülerizasyon	13
2.2.3 Kalp Doku Mühendisliği	15
2.2.3.1 Hücrel tedavi	16
2.2.3.2 Kardiyak yama	18
2.2.3.2.1 Hücre tabaka mühendisliği	18
2.2.3.3 Enjekte edilebilir biyomalzemeler.....	20
2.2.3.3.1 Enjekte edilebilir sentetik biyomalzemeler.....	21
2.2.3.3.2 Enjekte edilebilir doğal biyomalzemeler.....	22
2.2.3.3.3 Enjekte edilebilir deselülerize biyomalzemeler.....	23
3. KAYNAK ÖZETLERİ	25
4. MATERYAL ve YÖNTEM.....	31

4.1 Materyal	31
4.2 Yöntem	32
4.2.1 Deselülerizasyon	32
4.2.1.1 DNA içeriğinin belirlenmesi	33
4.2.1.2 Agaroz Jel Elektroforezi	34
4.2.1.3 Histokimya çalışması	35
4.2.2 Kalıntı deterjan içeriğinin belirlenmesi	36
4.2.3 Deselülerize k-HDM' in enzimatik parçalanması ve enjekte edilebilir miyokardiyal matriksin elde edilmesi	37
4.2.4 Miyokardiyal matriksin karakterizasyon çalışmaları	38
4.2.4.1 Türbidimetrik analiz	38
4.2.4.2 Miyokardiyal matriksin protein içeriğinin belirlenmesi	39
4.2.4.2.1 Miyokardiyal matriksin protein içeriğinin Lowry yöntemi ile tayini	39
4.2.4.2.2 Miyokardiyal matriksin protein içeriğinin SDS-PAGE ile belirlenmesi ..	39
4.2.4.3 Miyokardiyal matriksin GAG içeriğinin belirlenmesi	41
4.2.7 <i>In vitro</i> hücre kültürü çalışmaları	42
4.2.7.1 Adipoz Mezenkimal Kök Hücre kültürü	42
4.2.7.2 Hücrelerin tohumlanması	42
4.2.7.3 Hücrelerin çoğalma kapasitesinin belirlenmesi	43
4.2.7.4 Histokimya çalışmaları	43
5. BULGULAR	44
5.1 DNA İçeriği	44
5.2 Agaroz Jel Elektroforezi	45
5.3 Histokimya Çalışmaları	46
5.4 Kalıntı Deterjan İçeriğinin Belirlenmesi	48
5.5 Türbidimetrik Analiz	50
5.6 Miyokardiyal Matriksin Protein İçeriğinin Belirlenmesi	50
5.6.1 Miyokardiyal matriksin protein içeriğinin Lowry yöntemi ile tayini	50
5.6.2 Miyokardiyal matriksin protein içeriğinin SDS-PAGE ile belirlenmesi	52
5.7 Miyokardiyal Matriksin GAG İçeriğini Belirlenmesi	53
5.8 <i>In Vitro</i> Çalışmalar	53
5.8.1 MTT Bulguları	53

5.8.2 Histokimya Çalışmaları.....	54
6. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	56
KAYNAKLAR	60
ÖZGEÇMİŞ.....	66

KISALTMALAR DİZİNİ

BSA	Sığır Serum Albümin
CS-A	Kondroitin Sülfat-A
DMMB	1,9-Dimetil Metilen Mavisi
EDTA	Etilen Diammin Tetraasetik Asit
EtOH	Etil Alkol
FBS	Fötal Sığır Serum
GuHCl	Guanidin Hidroklorür
HDM	Hücre Dışı Matriks
H&E	Hematoksilin ve Eosin
iAMKH	İnsan Adipoz Mezenkimal Kök Hücreler
k-HDM	Kardiyak Hücre Dışı Matriks
Kİ-MKH	Kemik İliği Mezenkimal Kök Hücreler
MTT	[3-(4,5-dimetildiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür]
PAA	Perasetik Asit
PBS	Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi
P/S	Penisilin/Streptomisin
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SDS-PAGE	Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi
SEM	Taramalı Elektron Mikroskopisi
TEMED	Tetra Metil Etilen Diamin
UV	Mor Ötesi

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1 Çalışmanın akış şeması	3
Şekil 2.1 2012 yılında dünya genelinde ölüm sebepleri	4
Şekil 2.2 2012 yılında Türkiye genelinde ölüm sebepleri.....	5
Şekil 2.3 Kalp krizi sonrası miyokardiyum.....	5
Şekil 2.4 Dünya genelinde kalp nakli bekleyen ve kalp nakli gerçekleşen hastaların sayısı	7
Şekil 2.5 Doku mühendisliği yaklaşımı	9
Şekil 2.6 Doku mühendisliğinde üç temel parametre	10
Şekil 2.7 Hücresel tedavi yaklaşımı	16
Şekil 2.8 Hücre tabaka mühendisliği yaklaşımı	19
Şekil 2.9 Enjekte edilebilir biyomalzeme yaklaşımı.....	21
Şekil 3.1 Standart protein belirteci, miyokardiyal matriks ve kollajenin SDS-PAGE görüntüleri.....	25
Şekil 3.2.a. Miyokardiyal matriks jelin oda sıcaklığında ve b. 37°C'deki görüntüsü, c. miyokardiyal matriks jelin SEM görüntüsü.....	26
Şekil 3.3.a.Deselülerize perikardiyum, b. deselülerizasyondan sonra liyofilize edilmiş perikardiyum, c. toz haline getirilmiş perikardiyum ve d. enzimatik parçalanma sonucu elde edilen çözülebilir matriks yapı	27
Şekil 3.4 Naraghi ve arkadaşlarının 2010 yılındaki çalışmalarına ait SDS-PAGE görüntüleri.....	28
Şekil 3.5.a-c Enjekte edilen insan ve e-g domuz matriks jellerindeki damar oluşumu için yapılan floresan boyaması.....	29
Şekil 3.6 Kardiyak HDM hidrojel görüntüleri	29
Şekil 3.7 Kardiyak belirteçlerinin, farklı hidrojellerde, büyüme faktörü varlığında ve yokluğundaki konfokal mikroskop görüntüleri	30
Şekil 4.1.a. Sığır kalbi, b. küçük parçalara ayrılmış sol ventrikül, c. deselülerizasyon sonrası kalp dokusu	33
Şekil 4.2.a. Toz haline getirilmiş deselülerize k-HDM, b. enzimatik parçalanma sonucu elde edilen miyokardiyal matriks yapı.....	38

Şekil 5.1 Doğal doku ve çeşitli yöntemlerle hücresizleştirilmiş dokuların DNA içerikleri	48
Şekil 5.2 DNA belirteci, doğal kalp dokusu ve 4 yöneme göre deselülerize edilmiş kalp dokularındaki DNA kalıntılarının agaroz jel elektroforez görüntüsü	46
Şekil 5.3.a. Doğal kalp dokusu, b. deselülerize kalp dokusunun H&E boyaması mikroskopik görüntüleri	47
Şekil 5.4 İnkübasyon sonunda elde edilen vasatın ve normal vasatın kullanıldığı hücrelerin MTT testi ile belirlenen canlılık oranları	48
Şekil 5.5.a. İnkübasyon sonunda elde edilen vasatın kullanıldığı ve b. normal vasatın kullanıldığı MKH'lerin invert mikroskop görüntüsü	49
Şekil 5.6 Miyokardiyal matriksin jel oluşum hızını gösteren türbidimetrik kinetik ölçüm grafiği	50
Şekil 5.7 Lowry yöntemi için hazırlanan standart çözeltiler.....	51
Şekil 5.8 Lowry yöntemi standart grafiği	51
Şekil 5.9 Miyokardiyal matriksin SDS-PAGE görüntüsü	52
Şekil 5.10 CS-A standartlarına göre hazırlanan kalibrasyon grafiği.....	53
Şekil 5.11 Miyokardiyal matriks üzerine tohumlanan iAMKH'lerin belirli zaman noktalarında MTT testi ile belirlenen canlılık oranları	54
Şekil 5.12 iAMKH'lerinin tohumlandığı miyokardiyal matriks yapısının kültürün belirlenen zaman noktalarındaki H&E boyama görüntüleri.....	55

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Türkiye'de organ bağışının yıllara göre dağılımı	6
Çizelge 2.2 Avantajları ve dezavantajları ile hücresel tedavide kullanılan hücre türleri..	17
Çizelge 4.1 SDS-PAGE 'de kullanılan jel içerikleri.....	40
Çizelge 5.1 Kontrol ve deselülerize örneklerin DNA saflık oranları	45

1. GİRİŞ

Kardiyovasküler hastalıklar, dünya geneli ve ülkemizde ölüm sebepleri arasında ilk sırada yer almaktadır. Bu hastalıklar içinde özellikle iskemik kalp hastalığı ve kalp krizi (miyokard enfarktüsü) önemli bir yer tutmaktadır. Miyokard enfarktüsü, kalbi besleyen damarların tıkanması ile hücrelerin yeterli oksijen alamamasından dolayı bu hücrelerin bir kısmının ölmesi ile sonuçlanır. İnsanlarda kardiyomiyositlerin yenilenme kapasitesi çok sınırlıdır. Bu sebeple enfarktüs sonrası müdahale, kalp kası hasarını en düşük seviyede tutmak için çok önemlidir.

Son dönem kalp yetmezliği için en başarılı uygulama kalp naklidir. Ancak organ bağışının yetersiz olması, uygun verici bulunamaması ve doku reddi, klinik başarıyı kısıtlamaktadır. Mevcut tedaviler ise daha çok miyokard hasarını azaltmaya yöneliktir. Alternatif tedavi yaklaşımı arayışları bizi doku mühendisliği yaklaşımının kalp dokusu için olanına yönlendirmektedir.

“Kalp doku mühendisliği” terimi, kalp yetmezliğini ve kalp krizini ya da kalp krizi sonrasındaki hasarı önlemek için miyokardiyal dokunun (kalp kası) desteklenmesi, onarımı, yenilenmesi veya yerine konması gibi uygulamaları içeren doku mühendisliği stratejileri olarak tanımlanmaktadır (Naraghi ve Christman 2013). Kalp doku mühendisliği stratejileri üç gruba ayrılabilir. Bunlardan ilki olan hücresel tedavide, hücreler uygun bir sıvı ortamda hasarlı bölgeye enjekte edilir. Büyük çapta cerrahi bir prosedür gerektirmemesi ve kolay uygulanabilir olması hücresel tedavi yönteminin başlıca avantajıdır. Ancak enjekte edilen hücrelerin düşük hayatta kalım oranı yöntemin dezavantajıdır. Bir diğer yaklaşım kardiyak yama olup, bu yöntemde doğal veya sentetik kaynaklı biyomalzemeler hasarlı bölgeye implante edilir. Kalp doku mühendisliğinde kullanılacak biyomalzemeler, mekanik özellikleri, matriks bileşimleri ve vaskülerizasyon özelliklerini sağlayarak doğal kalp yapısına dönüşümü desteklemelidir. Hücre tabaka mühendisliğinde ise, sıcaklığa duyarlı kültür kapları kullanılarak, sıcaklık değişiminde hücrelerin ürettiği HDM enzimatik parçalanma olmaksızın tabaka halinde elde edilir ve hasarlı bölgeye uygulanır. Bu nedenle seçilecek

biyomalzeme özellikleri önemlidir. Son olarak, doğal ya da sentetik biyomalzemelerin enjekte edilebilir forma getirilip, hücre ile etkileştirildikten sonra hasarlı bölgeye enjekte edilmesini içeren yaklaşımlar da mevcuttur.

Enjekte edilebilir biyomalzemeler, hücrelerin tutunacağı, çoğalabileceği bir ortam sunmasının yanında, yeni damar oluşumunu da destekleyen bir matriks sağlar. Bu yöntemin yarı invazif olması ve açık göğüs ameliyatı gerektirmemesi avantajları arasındadır. Enjekte edilebilir biyomalzemeler sentetik, doğal ve HDM olarak sınıflandırılabilir. Sağlıklı dokuda hücre dışı çevre, hücre tutunmasını, çoğalmasını ve farklılaşmasını sağlayan bir ortam sunar. Bu kompleks çevrenin yerini alabilecek en uygun yapı HDM'in kendisidir. Kalp dokusunun deselülerizasyonu ile elde edilen HDM yapısının enjekte edilebilir formu kalp doku mühendisliğinde son zamanlarda sıklıkla kullanılmaktadır (Singelyn 2009, Naraghi 2010, Duan 2011).

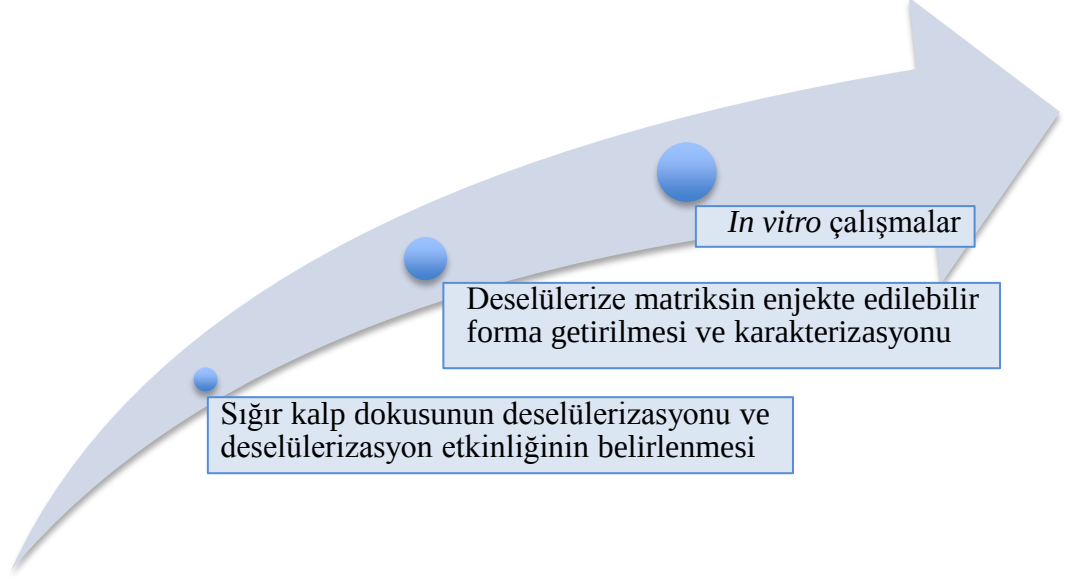
Bu çalışmada kalp doku mühendisliğinde uygulama alanı bulma potansiyeli olan doğal kaynaklı biyomalzeme geliştirme, karakterizasyonu ve *in vitro* çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Bu amaçla, ideal bir deselülerizasyon yöntemi ile büyük ölçüde hücrelerinden arındırılarak hazırlanan sığır kalp dokusundan, zengin protein içerikli ve doğal deselülerize matriks elde edilmiştir. Hücresizleştirme işleminin etkinliği, DNA içeriği, H&E boyaması ve agaroz jel elektroforez ile değerlendirilmiştir.

Deselülerize doku, enzimatik olarak parçalanarak hücre kültür çalışmaları için kullanılabilir bir forma getirilmiştir. Elde edilen miyokardiyal matriks yapının protein içeriği Lowry yöntemi ve SDS-PAGE ile belirlenmiştir. Hücre tutunması ve canlılığı için önemli bir bileşen olan GAG içeriği de 1,9 dimetil metilen mavisi deneyi ile tespit edilmiştir.

In vitro çalışmalarda, miyokardiyal matriks yapıya iAMKH'ler tohumlanmış ve MTT testi ile hücre canlılığına bakılarak, malzemenin hücreler için uygun bir ortam sağlayıp

sağlamayacağı belirlenmiştir. Hücre canlılığı ayrıca histokimya boyamaları ile de değerlendirilmiştir.



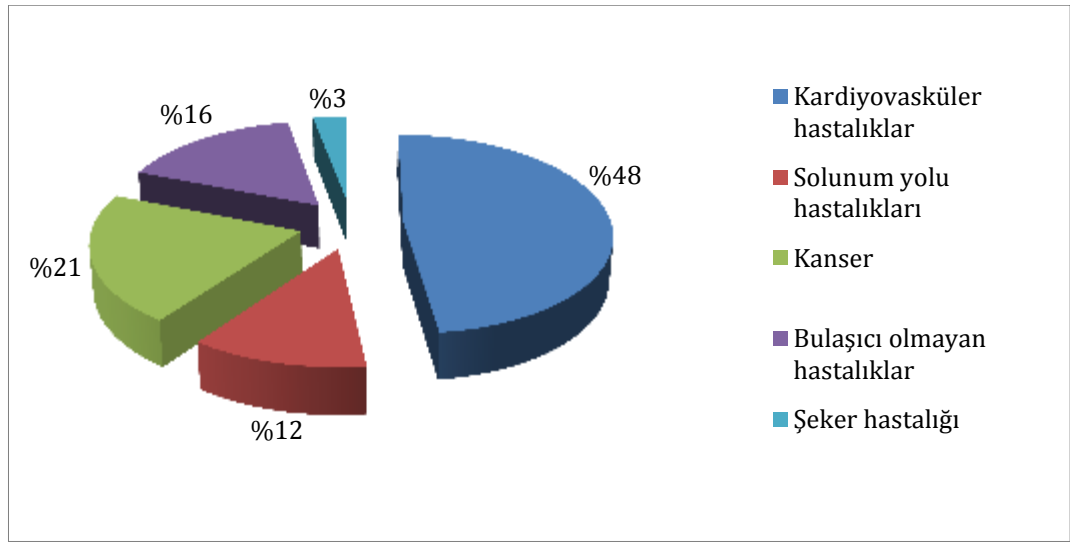
Şekil 1.1 Çalışmanın akış şeması

Enjekte edilebilir doğal kaynaklı bir biyomalzeme geliştirebilmek için deselüerize dokular, enzimatik olarak parçalanmış ve elde edilen miyokardiyal matriks yapının karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. Bu çalışmaların ardından miyokardiyal matriks yapının hücreler ile etkileşimleri *in vitro* çalışmalar ile değerlendirilmiştir.

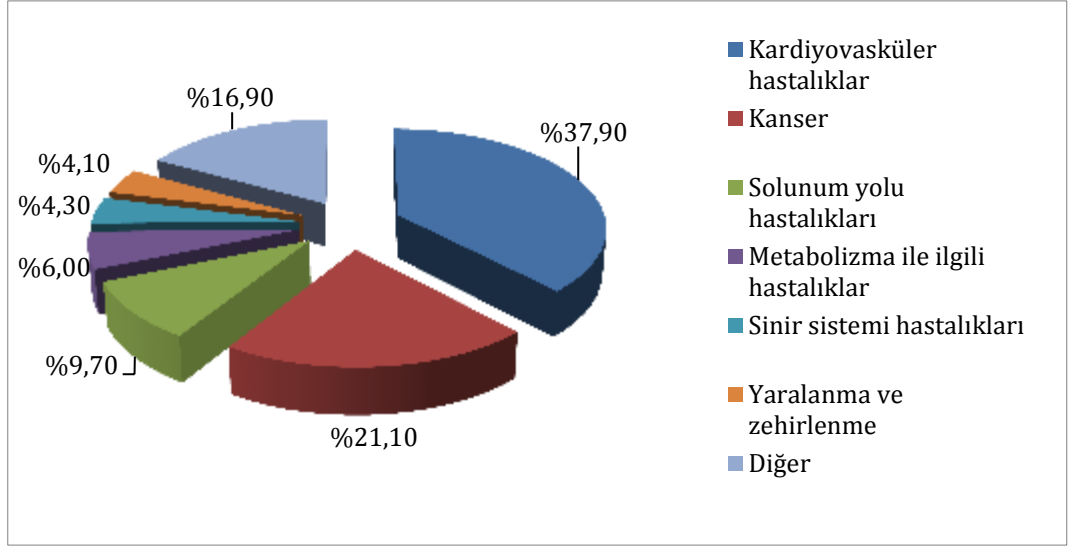
2. KURAMSAL TEMELLER

2.1 Miyokard Enfarktüsü ve Kalp Yetmezliği

Dünya geneli ve ülkemiz çapında ölüm nedenlerine bakıldığında ilk sırada kardiyovasküler hastalıklar görülmektedir (Şekil 2.1 ve Şekil 2.2). Her yıl ortalama 17,3 milyon insan kardiyovasküler hastalıklar sebebi ile hayatını kaybetmektedir. Ülkemizdeki ölüm nedenlerine bakıldığında benzer sonuçlara rastlanmaktadır. Kardiyovasküler hastalığa bağlı ölümler arasında iskemik kalp hastalığı ve kalp krizi önemli bir yer tutmaktadır (Wang ve Guan 2010, www.tuik.gov.tr 2012, www.who.int 2012).

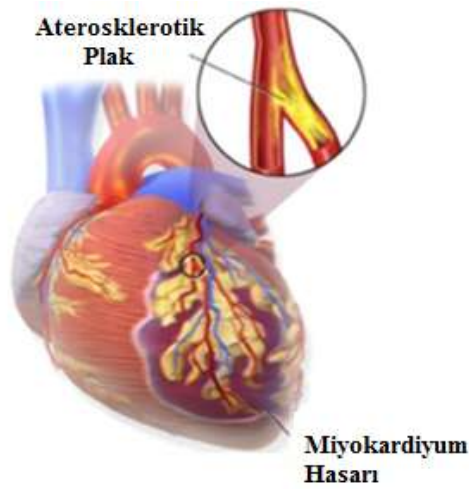


Şekil 2.1 2012 yılında dünya genelinde ölüm sebepleri (www.who.int)



Şekil 2.2 2012 yılında Türkiye genelinde ölüm sebepleri (www.tuik.gov)

Miyokard enfarktüsü, kalbi besleyen damarlardan biri veya birkaçının tıkanması ya da daralması ile kan akışının kritik derecede yavaşlaması sonucu hücrelere oksijen taşınamamasından dolayı o bölgedeki kalp kası hücrelerinin bir kısmının ölmesi durumudur (Şekil 2.3). İnsanlarda kardiyomiyositlerin çok sınırlı yenilenme kapasitesi vardır. Kalp krizinde ilk müdahale, kalp kası hasarını en düşük seviyede tutmak için çok önemlidir. Belirli bir süre sonra oksijen yetersizliği sebebiyle hücrel metabolizma bozulmaya başlar, bu da miyokardiyal dokunun hasarı ile sonuçlanır.



Şekil 2.3 Kalp krizi sonrası miyokardiyum (Abdin 2014)

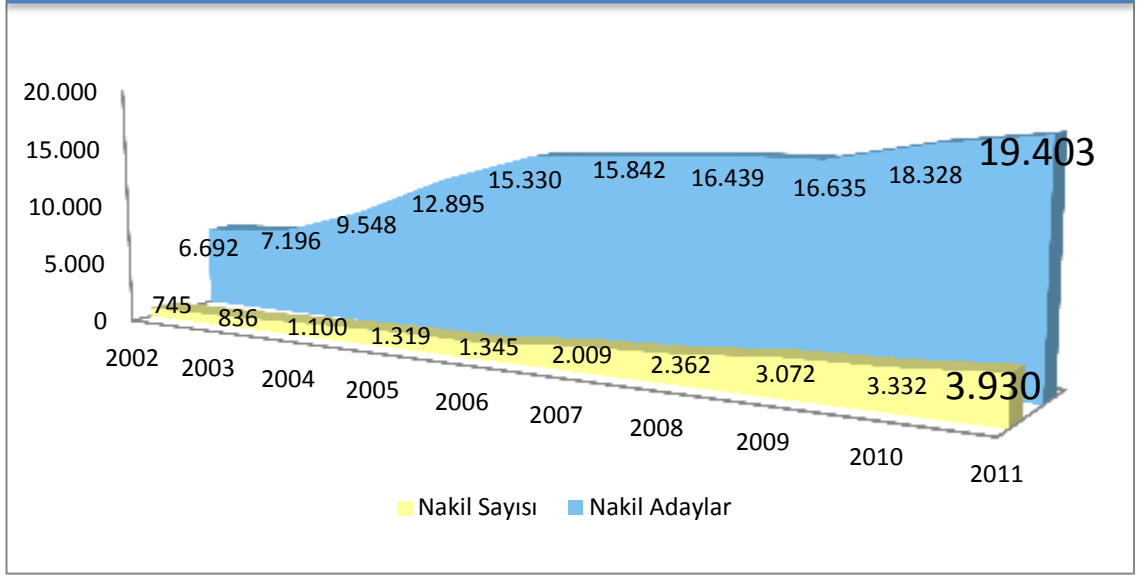
Kalp krizinden sonra kardiyomiyosit ölümü ve hücresel içeriğin salınması inflamatuvar yanıtı tetikler. İnflamatuvar yanıtın ilk aşamasında, makrofajlar, monosit nötrofiller hasarlı bölgeye ulaşır. Bu hücreler, hücre dışı matriks (HDM) yıkımında görev alan matriks metalloproteinazları (MMP) salar. HDM'nin bozunması kardiyomiyositlerin uzaklaşmasına ve hasarlı bölgenin genişlemesine sebep olur. İlk inflamatuvar yanıtın sonra, fibroblast ve miyofibroblastlar hızlı bir şekilde çoğalarak matriks makromoleküllerini üretmeye başlarlar, bu moleküller çoğunlukla kollajen tip I ve tip III' tür. Sonuçta gerilmeye ve şişmeye karşı dirençli, kasılma yeteneği olmayan sıkı bir skar doku oluşur. Kasılma yeteneği olmayan bu nedbe doku oluşumu, son organlara (beyin, iç organlar ve uzuvlar) ulaşan kanın debisinde önemli azalmalara neden olur. Bunun sonucu olarak da kalp, sol ventrikül büyümesi ve hipertrofiyi (kalp kas hücrelerinin hacimsel olarak büyümesini) de içeren bir dizi değişikliğe uğrar. Bu da nihayetinde kalp yetmezliği ve ölüm ile sonuçlanır (Pfeffer ve Braunwald 1990, Holmes vd. 2005).

2.2 Tedavi Yaklaşımları

Son dönem kalp yetmezliği için en başarılı uygulama kalp naklidir. Bununla birlikte verici yetersizliği ve doku reddi bu uygulamanın kabul edilen klinik başarısını kısıtlamaktadır (Çizelge 2.2, Şekil 2.4).

Çizelge 2.1 Türkiye'de organ bağışının yıllara göre dağılımı

	2007	2008	2009	2010	2011
Böbrek	2009	2362	3072	3336	3953
Karaciğer	1302	1665	2362	2502	2923
Kalp	61	50	54	86	93
Kalp kapakçığı	159	29	38	18	1



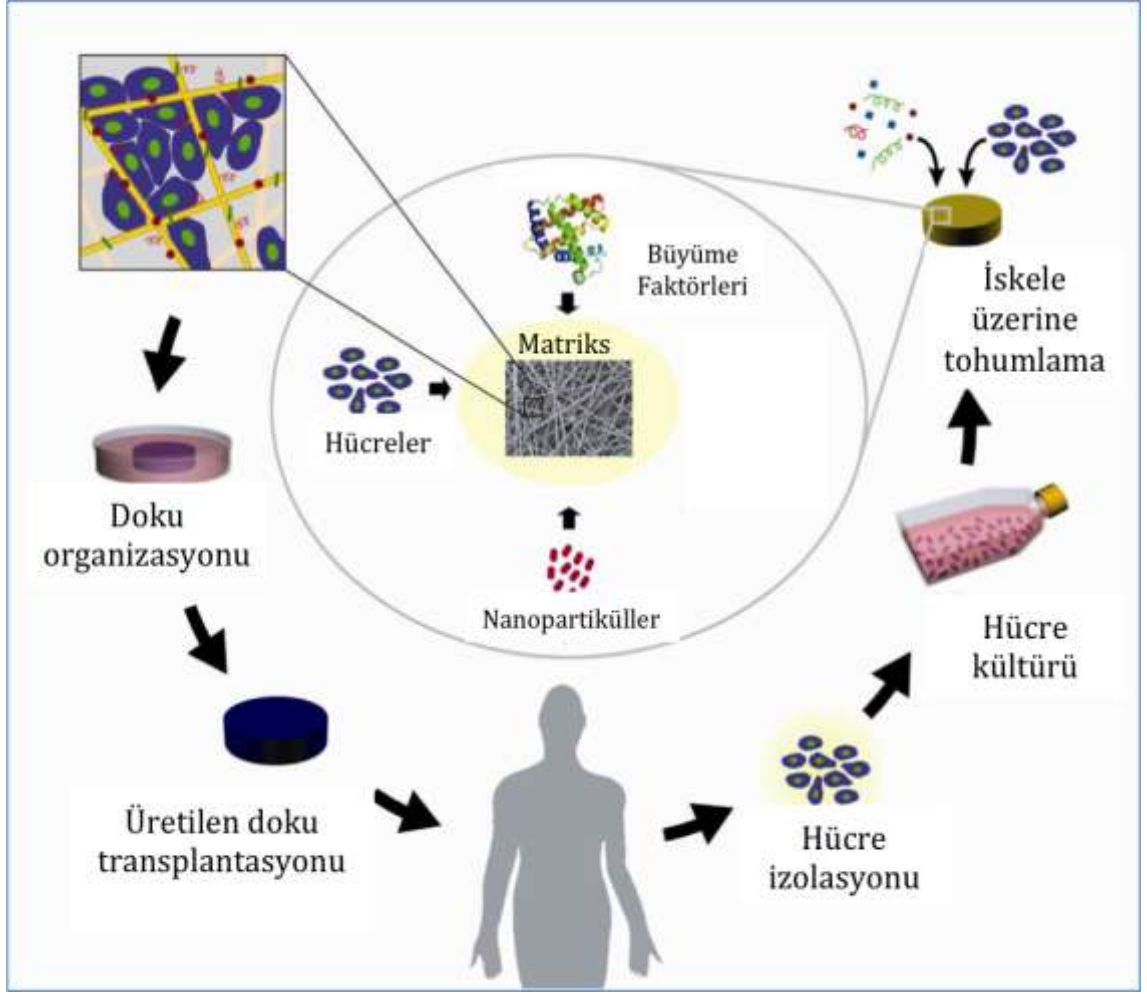
Şekil 2.4 Dünya genelinde kalp nakli bekleyen ve kalp nakli gerçekleşen hastaların sayısı (Stehlik vd. 2011)

Kalp krizi için başka tedaviler de mevcut olmasına rağmen bunlar iyileşmeyi desteklemekten çok, hasarı azaltmaya yöneliktir. Mevcut uygulamalar arasında önerilenler; koroner arter tıkanıklığına sebep olan kan pıhtılarını çözmek için, antikoagülanların kullanılması esasına dayanan tromboliz (fibrinolizis) ile sağlanan acil reperfüzyon, enfarktüs alanını azaltmak için kullanılan beta blokerlar, tıkanmış arterin acil reperfüzyonu için stent ya da bypass ameliyatlarıdır (Lonn ve McKelvie 2000). Bu acil reperfüzyon uygulamaları, iskemi zamanını azaltmayı, enfarktüsü ve kalbin nekrozunu sınırlandırmayı amaçlar. Bunların yanı sıra kalp yetmezliğinin tedavisi için sol ventrikül destek cihazı (left ventricular assist device-LVAD) kullanılmaktadır. Bu cihaz sol ventriküle takılan ve kan devaranına yardımcı olan bir pompa görevi görür. LVAD kan akışını düzenlemenin yanı sıra, enfeksiyon riskini artırma, iç kanama ve pompanın tıkanması gibi dezavantajları da mevcuttur (McCarthy vd. 1996). Mevcut tedavi yaklaşımlarının dezavantajları ve organ naklindeki yetersizlikler, alternatif bir yaklaşım ihtiyacını doğurmuştur.

2.2.1 Doku Mühendisliği

Doku mühendisliği fikri, kaybedilmiş doku ya da doku fonksiyonunu rejeneratif bir süreç ile yeniden düzenlemeyi amaçlar. Doku mühendisliği terimi ilk olarak 1987’de Dr. Y. C. Fung tarafından getirilmiştir. Ancak doku onarımı ya da yerine konması fikri çok daha eskilere dayanmaktadır. Vücut uzuvlarının yenilenme denemelerinin en eski kanıtları 2500 yıl öncesine dayanmaktadır. Etrüskler, eksik dişlerin yerini, sığır kemiğinden yapılmış köprülerle doldurmuşlardır. Çürük dişlerin onarımı için diş amalgamının ilk kullanımı Çin kaynaklarında 659 yılı olarak kaydedilmiştir. 20. yüzyılın ortalarında kalça ve diz eklemlerinin yenilenmesinde, kalp pili ve yapay kalp kapakçığı ile ilgili ileri düzeyde buluşlar yapılmıştır (Eisenbarth 2007).

Tanım olarak doku mühendisliği, “yaşam bilimleri ve mühendislik metot ve prensipleri doğrultusunda, memeli dokularındaki normal ve patolojik hallerdeki yapı-fonksiyon ilişkisinin anlaşılmasını ve doku fonksiyonunu onarmak, sürdürmek ve geliştirmek için biyolojik eşdeğerlerinin geliştirilmesini hedefleyen disiplinler arası bir rejeneratif tıp alanıdır” (Şekil 2.4). Doku mühendisliği alanı sürekli gelişmekte olduğundan, bilim insanları muhtemelen bu heyecan verici yolculuğun henüz başında bulunmaktadır(Elçin 2003, Lanza vd. 2007, Novakovic vd. 2010).



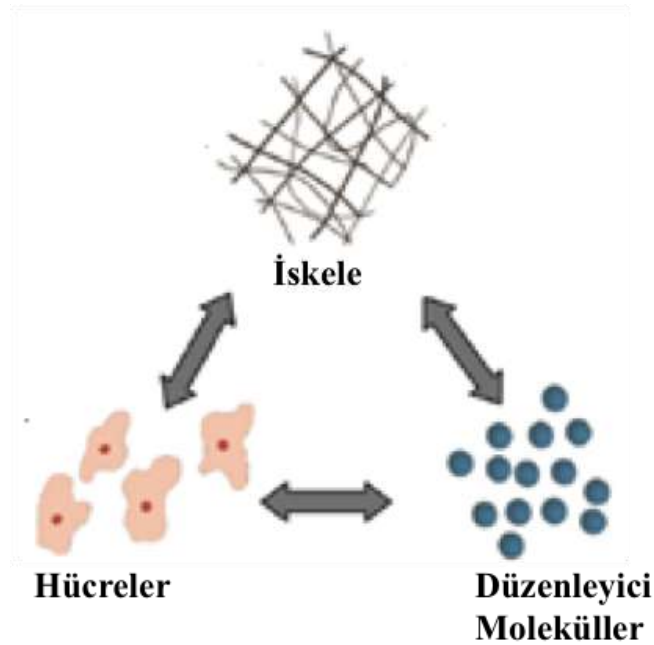
Şekil 2.5 Doku mühendisliği yaklaşımı

Doku mühendisliğini temel olarak 3 basamaklı bir süreç olarak düşünebiliriz;

- (1) İstenen özellikteki hücreler, hastadan küçük bir biyopsi ile izole edilir. Klasik hücre kültür teknikleri ile hücreler çoğaltılır.
- (2) İstenilen hücre sayısına ulaşıldıktan sonra bu hücreler biyolojik ortamda bozunabilen, üç boyutlu destek malzemeye tohumlanır. Biyomalzeme, hücelere işlevselorgan benzeri yapılar oluşturmaları için geçici olarak çoğalıp farklılaşacakları bir ortam sağlar.
- (3) İşlevsel doku kütlesi içerisinde hücre-biyomalzeme yapısı olgunlaşır. Biyomalzeme, hücre farklılaşmasını destekleyecek özelliklere sahip olmalıdır.

Hücre-biyomalzeme yapısının kültür koşulları hücre farklılaşması için uygun olmalıdır. Hücrelerin *in vitro* koşullarda geri farklılaşmasını (dediferansiyasyonunu) önlemek ve olgunlaşmasını sağlamak için ideal şartlarda olması gerekmektedir (Bell 1991, Eisenbarth 2007).

Doku mühendisliğinde üç temel parametre; hücreler, biyomalzemeler ve ekzojen biyoaktif faktörlerdir (Şekil 2.4). Genel olarak, ilgili doku ya da organın hedef işlevini iyileştirmek ya da yerine getirmek için, ekzojen biyomoleküllerle (VEGF, BMP-2 gibi) aktifleştirilmiş ve ilgili hücre tipinin tohumlandığı biyomalzeme iskele aracılığı ile sağlanır (Naraghi ve Christman 2013).



Şekil 2.6 Doku mühendisliğinde üç temel parametre

2.2.2 Doku Mühendisliğinde biyomalzemelerin rolü

Biyomalzemeler doku mühendisliği stratejilerinde anahtar bir role sahiptir. Biyomalzeme, hücreler için fiziksel destek sağlamanın yanı sıra işlevsel dokuların oluşumu için gerekli olan kimyasal ve biyolojik ipuçlarını içermelidir (Langer ve Tirrell 2004). Doku mühendisliği ile ilgili en önemli unsurlardan birisi uygun biyomalzemenin

seçimidir. Uygun bir biyomalzemede aranan özellikler şu şekilde sıralanabilir;

- (1) Biyouyumlu olmalı (istenmeyen doku yanıtı oluşturmamalı, aynı zamanda hücre tutunması ve çoğalmasını desteklemeli),
- (2) Biyobozunur olmalı(toksik olmayan ürünlere parçalanmalı),
- (3) Hücre tutunmasını, farklılaşmasını, çoğalmasını ve göçünü sağlayacak uygun yüzey kimyasına sahip olmalı,
- (4) Hücrelere mekanik destek sağlamalı, mekanik ve geçici olarak kayıp doku ile eşleşebilmeli,
- (5) Hücre tutunması, çoğalması, göçü ve beslenebilmesi için gözenekli yapıya sahip olmalıdır (Eisenbarth 2007, Chen vd. 2008).

Bu özellikleri içeren biyomalzemeler; sentetik biyomalzemeler, doğal olarak elde edilen biyomalzemeler ve hücre dışı matriks olmak üzere üç sınıfa ayrılmaktadır (Yang vd. 2001).

2.2.2.1 Sentetik biyomalzemeler

Sentetik biyomalzemeler; çok iyi işlenebilme özelliklerinin yanı sıra büyük miktarlarda üretilibilmeleri gibi avantajlarından dolayı doku mühendisliği için öncelikli malzemelerdendir. Poli(laktik asit) (PLA), poli(glikolik asit) (PGA), poli(etilen glikol) (PEG), poliüretan, politetrafloroetilen (PTFE), poli(N-izopropilakrilamit) (poli(NIPAAm)), biyomalzeme yapımında yaygın olarak kullanılan sentetik polimerlerdir. Sentetik biyomalzemelerin sertlik, gözeneklilik, bozunma, ligand yoğunluğu gibi özellikleri ayarlanabilir ve yüksek hassasiyetle üretilbilirler. Buna rağmen yeterince uyumlu olmama veya konak doku ile bütünleşememe gibi eksik yanları da mevcuttur. Malzeme tamamen bozunmadığında yabancı cisim yanıtı oluşturma potansiyeli vardır. Diğer yandan sentetik malzemelerle ilgili bir başka endişe de, bozunma ürünlerinin biyouyumluluğu sorunudur (Chen vd. 2008, Christman 2013).

2.2.2.2 Doğal biyomalzemeler

Teoride doğal olarak elde edilen biyomalzemeler implante edildiğinde yabancı malzeme yanıtına sebep olmamalıdır. Bu malzemeler, hücre tutunması, çoğalması ve farklılaşması için doğal esaslı bir substrat sağlarlar (Badylak vd. 2009). Kollajen, kitosan, alginat, fibrin, elastin, laminin, heparin sülfat ve hyaluronik asit gibi doğal biyopolimerler de biyomalzeme olarak sıklıkla kullanılmaktadır. Bu doğal biyopolimerler biyouyumlu bozunma ürünleri açısından avantajlıdır. Bu malzemeler kimyasal olarak modifiye edilmedikçe çok hızlı bir şekilde bozunur, tabii ki bu durumun avantaj ya da dezavantaj olması uygulamaya bağlı olarak değişecektir. Hidroksiapatit ya da kalsiyum karbonat gibi polimerik olmayan doğal biyomalzemeler bozunmaya karşı daha dayanıklıdır (Glowacki ve Mizuno 2008).

2.2.2.3 Hücre Dışı Matriks

Hücre dışı matriks (HDM), yapısal ve fibröz proteinlerden, proteoglikanlardan ve glikozamino glikanlardan oluşan, ayrıca hücre iletişimini, göçünü, çoğalmasını, farklılaşmasını, tutunmasını ve sinyalleşmesini de sağlayan, karmaşık yapılı doğal bir iskelelerdir (Leor vd. 2005). HDM'nin doğal dokudaki fonksiyonları şu şekilde sıralanabilir;

- Hücreler için yapısal destek sağlar,
- Dokunun mekanik özelliklerine katkıda bulunur,
- Hücrelerin mikroçevrelerine yanıt vermesinde biyoaktif işaretler sağlar,
- Büyüme faktörü rezervi gibi işlev görür,
- Yara iyileşmesi gibi dinamik doku süreçlerinde yeniden modellenmeye izin veren esnek bir fiziksel çevre sağlar (Chan ve Leong 2008).

Hücre dışı matriks, kalp, kalp kapakçığı, damar, deri, sinir, iskelet kası, tendon, ince barsak submukozası, karaciğer gibi bir çok farklı organdan elde edilebilir. Hücre dışı matriks-iskelenin bileşimi biyolojik veya yapısal özelliklere aracılık eden kompleks bir

moleküler karışımdan oluşur. Bu moleküller üç boyutlu yapıda düzenlenir ve hücre dışı matriksin elde edildiği dokuya uyum sağlar.

HDM iskeleler, her bir doku veya organdaki hücreler tarafından salgılanan yapısal ve işlevsel proteinlerden meydana gelir (Badyalak vd. 2009). HDM'nin yapısında her bir dokuya özgü olmak üzere, başta kollajen, elastin, fibronektin, vitronektin, laminin gibi proteinler yer alır. Bu proteinlerin yanı sıra hücreler ve onların HDM'leri arasındaki etkileşimleri sağlayan proteoglikanlar, büyüme faktörleri ve basınç dayanımını sağlayan heparin sülfat, dermatan sülfat ve hyaluronik asit gibi glikozamino glikanlar yer almaktadır. HDM'den oluşan biyolojik iskeleler, hayvan ön çalışmalarında ve klinik uygulamalarda bir çok farklı dokunun yapıcı yeniden modellenmesini kolaylaştırmaktadır.

HDM ile doğal olarak elde edilmiş biyomalzemelerin kombinasyonu da bir başka alternatiftir. Doğal HDM'nin kompleks yapısından yararlanmak için bir diğer yaklaşımda, kültürdeki hücreler tarafından salınan örgüyü/ağı kullanmaktır. Bu yaklaşıma göre, sentetik polimer bir iskele, hücrelerin HDM'lerini depolayabileceği geçici bir kalıp olarak kullanılabilir. Eğer orijinal polimer kalıbı bozunursa, en sonunda, hücreler ve onların HDM'sinden meydana gelen bir yapıya yeniden modellenir. Son zamanlarda kullanılan deselülerizasyon teknikleri, doğal doku ile başlanabilmesi, hücresel bileşenlerin kaldırılması ve HDM iskelenin biyomalzeme olarak kullanılması için olanak sağlamaktadır (Naraghi ve Christman 2013).

2.2.2.3.1 Deselülerizasyon

Deselülerize doku ve organlardan elde edilen biyolojik iskeleler, hem hayvan ön-klinik çalışmalarında hem de insan klinik uygulamalarında başarılı bir şekilde kullanılmaktadır. Hücrelerin bir doku veya organdan uzaklaştırılması ile HDM'yi oluşturan yapısal ve işlevsel proteinlerin bir karışımı elde edilir. Doku deselülerizasyonu sırasında doğal yapının ve HDM bileşiminin korunması çok önemlidir. HDM'nin elde edildiği dokunun kökeni, deselülerizasyon yöntemi ve bu

iskelelerin son sterilizasyon işlemi oldukça çeşitlidir. Her bir değişken HDM'nin yapısını ve bileşimini değiştirir, benzer şekilde HDM iskelenin implantasyonundan sonra konak doku yanıtını da etkiler. Deselülerizasyon işlemi neredeyse tüm doku ve organlara uygulanmaktadır. Doku kaynaklarının ve deselülerizasyon tekniklerinin hızlı çeşitlendirilmesi ve klinik uygulama listesinin genişlemesi, HDM'deki hücre kalıntılarının kantitatif olarak belirlenmesi ile gerçekleştirilebilir (Crapo vd. 2011).

Zenogenik ve allojenik hücrel antijenler, konak tarafından yabancı olarak tanımlanır bu nedenle inflamatuvar yanıtı veya dokunun immünolojik reddine neden olur. Deselülerizasyon işleminin amacı, tüm hücrel ve çekirdeğe ait materyali etkili bir biçimde uzaklaştırırken, kalan HDM'nin mekanik bütünlüğüne, biyolojik aktivitesine ve bileşimine olan olumsuz etkiyi en aza indirmektir.

Hücreleri uzaklaştırmak amacıyla yapılan herhangi bir işlem HDM'nin üç boyutlu yapısını değiştirecektir. Doku deselülerizasyonu, yaygın olarak fiziksel ve kimyasal uygulamaların kombinasyonunu içerir. Fiziksel uygulamalar, karıştırma veya sonikasyon, mekanik masaj ya da basınç ve dondurup çözmedir. Bu yöntemlerin kullanımıyla, hücre zarının zedelenmesi sonucunda hücre içeriği salınır ve yıkama ile HDM'den hücrel kalıntıların uzaklaşması sağlanır. Fiziksel yöntemler tek başına yeterli değildir. Fiziksel, kimyasal ve enzimatik uygulamaları içeren deselülerizasyon işlemleri en etkili yöntemlerdir. Bir deselülerizasyon protokolü genellikle fiziksel uygulamalar veya iyonik çözeltiler aracılığıyla hücre membranının lizisi ile başlar, ardından enzimatik yöntemler kullanılarak HDM'den hücrel bileşenlerin ayrılması, deterjanlar kullanılarak sitoplazmik ve çekirdeğe ait bileşenlerin çözünür hale getirilmesi ile devam eder, son olarak hücrel kalıntı dokudan uzaklaştırılır. Enzimatik (tripsin gibi) ve kimyasal (iyonik çözeltiler ve deterjanlar) uygulamalar hücre zarı ile hücre içi ve hücreler arası bağları parçalar (Gilbert vd. 2006).

HDM, deselülerizasyon işlemi sırasında tüm hücrelerin kaotropik (yıkıcı) ajanlara maruz kalması sonucu hücrel materyalin dokudan uzaklaştırılabilmesi işlemi esnasında zarar görür. Çoğu deselülerizasyon işleminin amacı, hasarı en aza indirmek ve doğal mekanik ve biyolojik özellikleri yapıda tutabilmektir (Crapo vd. 2011).

2.2.3 Kalp Doku Mühendisliği

Kalp duvarı sıkı bir şekilde istiflenmiş miyosit ve fibroblastlardan, yoğun destekleyici damarlardan ve kollajen bazlı HDM'den oluşmaktadır. Hücrelerin metabolik gereksinimleri ve yüksek yoğunluğundan dolayı miyokardiyum çok yüksek oranda oksijen tüketir ve hipoksiyi (oksijen yetmezliği) tolere edemez (Novakovic vd. 2010). Akut miyokardiyal infarksiyon, kalbe kan desteği eksik olduğunda gerçekleşir ve geri dönüşümsüz olarak miyokardiyal iskemiye, kalp kas hücrelerinin (kardiyomiyosit) kaybına ve kasılma yetisi olmayan skar doku oluşumuna sebep olur. Sonuç olarak, etkilenen dokunun hızlı bir biçimde yeniden yapılanmasını ve kasılma yeteneğinin etkili bir şekilde yenilenmesini destekleyecek doku mühendisliği stratejilerine gereksinim vardır (Gálvez-Montón vd. 2013). “Kalp doku mühendisliği” terimi, kalp yetmezliğini ve kalp krizini ya da kalp krizi sonrasındaki hasarı önlemek veya en aza indirmek için miyokardiyal dokunun (kalp kası) desteklenmesi, onarımı, rejenerasyonu ya da yenilenmesi (yerine konması) gibi uygulamaları içeren doku mühendisliği stratejileri olarak tanımlanmaktadır (Naraghi ve Christman 2013).

Kalp doku mühendisliği yaklaşımları üç temel başlık altında toplanabilir;

- *in situ* doku mühendisliği; hücreler enjekte edilebilir biyomalzemeler ile kombine edilerek hasarlı miyokardiyuma enjekte edilir,
- *in vitro* doku mühendisliği; kasılabilen doku yapılarının geliştirilmesi için üç boyutlu doku yapılarına kardiyomiyositler tohumlanır veya *in vivo* miyokardiyum yenilenmesi için kök hücreler doku yapılarına yüklenir ve implante edilir,
- İskelesiz doku mühendisliği; kardiyak yenilenme için hücre tabakaları ve kümeleri kullanılır (Wang ve Guan 2010).

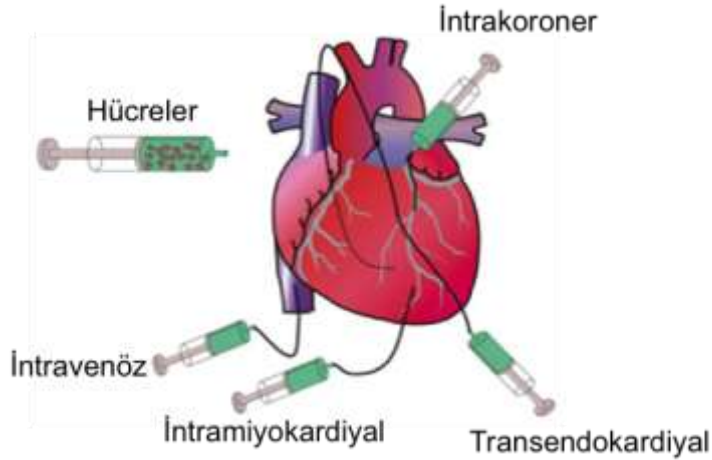
Kalp doku mühendisliğinde kullanılacak biyomalzemeler, mekanik özellikleri, matriks bileşimleri ve vaskülerizasyon yönü ile doğal kalp yapısına benzemelidir. Ayrıca kullanılacak matriks; pratik olarak uygulanabilme, hücreler ve onları çevreleyen mikroçevre arasında besin ve oksijen akışını sağlayabilme, biyobozunur olma, bozunma

sonucunda toksik ürün oluşturmama ve canlı dokunun yerini alabilme gibi özelliklere sahip olmalıdır (Gálvez-Montón vd. 2013).

Kalp dokusunun yenilenmesi, onarımı ve desteklenmesini içeren kalp doku mühendisliği stratejileri aşağıdaki gibi sınıflandırabilir.

2.2.3.1 Hücresel tedavi

Hücresel tedavinin amacı, hücrelerin hasarlı miyokardiyuma farklı şekillerde implante edilerek hasarlı bölgenin iyileştirilmesidir (Arnal-Pastor vd. 2013). Bu yöntemde hücrelerin uygun bir sıvı ortamdaki (tuz çözeltisi veya vasat) süspansiyonu, intermiyokardiyal olarak veya koroner enjeksiyon ile uygulanır (Radisic ve Sefton 2011) (Şekil 2.5).



Şekil 2.7 Hücresel tedavi yaklaşımı

Hayvan modellerinde, fetal ya da neonatal kardiyomiyositlerin enjeksiyonu, sol ventrikül işlevini ve ventrikül kalınlığını geliştirmiştir böylelikle patolojik ventrikül yeniden modellenmesi azalır (Reinecke vd. 1999; Müller-Ehmsen vd. 2002a). Farklılaşmış kardiyomiyositler de enjeksiyon için ideal hücre kaynaklarındandır.

Bununla birlikte büyük miktarlarda otolog kardiyomiyosit eldesi mümkün olmadığından farklı hücre tipleri de hücresel tedavilerde kullanılmaktadır. Çeşitli kök hücrelerin çoğalma yeteneği ve plastisitesinin keşfi, potansiyel kullanımlarına olan ilgiyi uyandırmıştır. Her hücre tipinin kendine özgü avantaj ve dezavantajları mevcuttur (Çizelge 2.2) (Joggerst ve Hatzopoulos 2009).

Çizelge 2.2 Avantajları ve dezavantajları ile hücresel tedavide kullanılan hücre türleri

Hücre Türü	Avantaj	Dezavantaj
Embriyonik kök hücreler	Teorik olarak kendini yenileme yeteneği sınırsız	Etik kaygılar, teratom oluşumu, graft-versus-host hastalığı
Kemik iliği mononükleer hücreler, hematopoietik kök hücreler, dolaşımdaki öncül hücreler	Kolay izole edilebilir, nakil için güvenli ve uygulanabilir olduğu kanıtlanmış	Doğru kardiyovasküler farklılaşmayı gerçekleştirip gerçekleştirmediği belirsiz
Mezenkimal kök hücreler	Kolay izole edilebilir ve kültürde çoğaltılabilir, diğer hücre hatlarından daha az immünojenik özellikte	Geniş heterojenite, hetetropik farklılaşma riski
İskelet miyoblastları	Kararlılık, iskemiye direnç, teratom oluşumu yok	Aritmi potansiyeli, kardiyomiyosit farklılaşma kapasitesinin düşüklüğü
Kardiyak kök hücreler	Güçlü kardiyovasküler farklılaşma potansiyeli, tümör oluşumunda azalma	Kök hücre havuzu yaşlanma (senesens) belirtileri gösterir, bilgi azlığı

Büyük çapta cerrahi bir prosedür gerektirmemesi ve kolay uygulanabilir olması hücresel tedavi yönteminin başlıca avantajıdır. Ancak enjekte edilen hücrelerin düşük hayatta

kalım oranı ve bu hücrelerin %90'ının enjeksiyondan sonra tutunamayıp kısa sürede canlılıklarını kaybetmesi yöntemin dezavantajlarından (Müller-Ehmsen vd. 2002b).

2.2.3.2 Kardiyak Yama

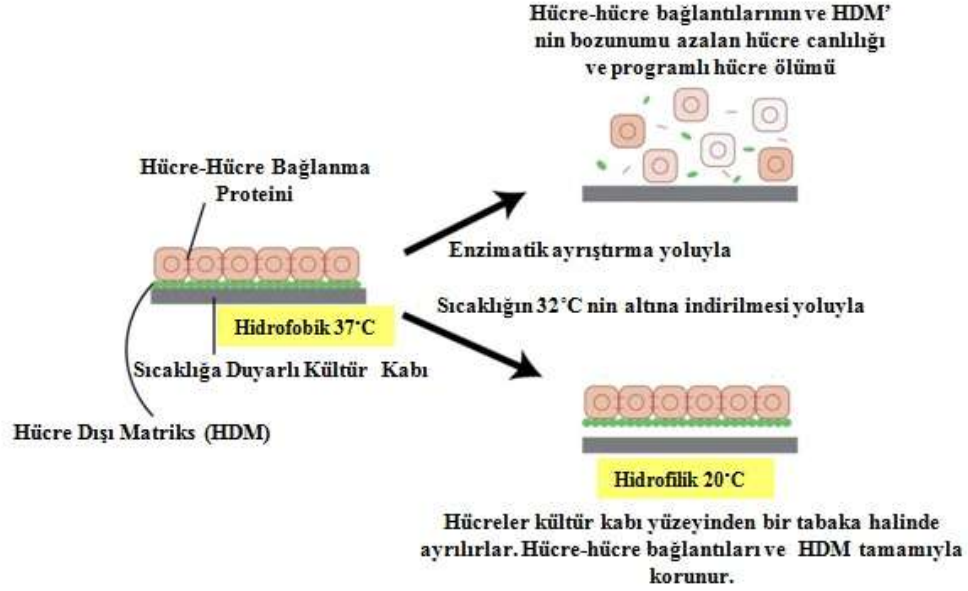
Kardiyak yama kalp krizi sonrası kalp kasının yerine geçmek ya da dokuyu desteklemek suretiyle, kardiyomiyopatili çocuk veya hastalardaki doğuştan olan kardiyak kusurları (malformasyon) düzeltmeyi amaçlar. Kardiyak yamalar doğal HDM'yi taklit edebilir ve belli kalınlıktaki bir yama makul ölçüde kalp yenilenmesini sağlayabilir. Ayrıca kardiyak yamalar, kalbin sistolik basıncına dayanabilmek için yüksek mekanik özelliklere sahip olmak zorundadır. Doğal olarak elde edilen polimer malzemeler insanlara implantasyonda yabancı malzeme yanıtı göstermemesi yönüyle avantajlıdır ancak fiziksel ve mekanik özellikleri zayıftır. Bozunma özellikleri de, ikinci bir cerrahi operasyonun önlenmesi açısından bir diğer önemli konudur. Substratın konak dokudan fizyolojik olarak uzaklaştırılabilmesi, malzeme açısından avantajlı bir durumdur (Chen vd. 2008).

Kalp doku mühendisliğinde bir greft tasarlarken, öncelikle diastolik özellikler göz önüne alınmalıdır. Kardiyak yama konak miyokardiyumun elektriksel ritmi ile uyum içinde olmalı ve aritmiye neden olmamalıdır (Prabhakaran vd. 2011).

2.2.3.2.1 Hücre tabaka mühendisliği

Bu yöntemin temeli; poli(N-izopropilakrilamit) (PIPAAm) gibi sıcaklığa duyarlı polimerlerle kaplanmış kültür yüzeyleri kullanılarak, hücrelerin kendi ürettikleri HDM'in enzimatik olmayan yollarla elde edilmesine dayanır (Chan ve Leong 2008). Sıcaklığa duyarlı kültür kaplarının yüzeyi 37°C'de hidrofobiktir ve bu sıcaklıkta hücreler kap yüzeyine tutunup çoğalırlar. Sıcaklığın 32°C'nin altına düşürülmesi, yüzeyin hidrofilik özellik kazanması ile sonuçlanır. Gerçekleşen hızlı hidrasyon ve aşırı polimerin şişmesi hücrelerin yüzeye tutunmasını engeller. Bunun sonucunda hücre-

hücre etkileşimlerinin ve HDM yapısının korunduğu bir tabaka elde edilir (Matsuura vd. 2013).



Şekil 2.8 Hücre tabaka mühendisliği yaklaşımı

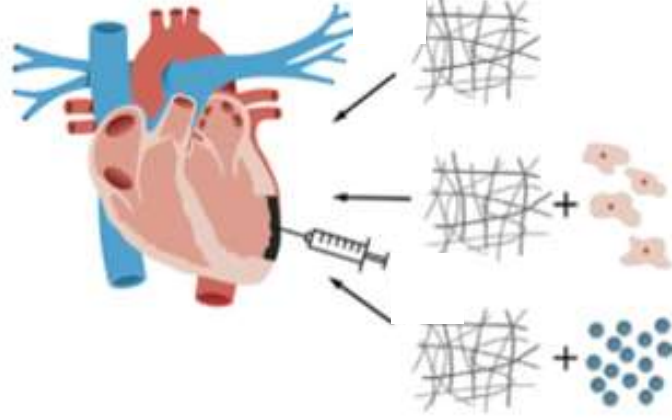
Bu yaklaşım kullanılarak, neonatal rat kardiyomiyositleri üç boyutlu yapı elde etmek için katmanlandırılmıştır. Hücre tabakaları, vaskülerizasyon gerçekleşmediği için 3 veya 4 katman ile sınırlandırılmıştır. Elde edilen veriler, oluşturulan doku yapısının, gerekli elektriksel iletişimi sağladığını ve makroskobik olarak atım yaptığını göstermiştir. (Sekiya vd. 2006).

Kardiyomiyositlerin yanı sıra, kardiyak fonksiyon gelişimi için yararlı çoklu hatlara farklılaşabilen AMKH ve MKH de kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalar bu hücre kaynaklarından hazırlanan doku yapısının implantasyonunun kardiyak fonksiyonunu geliştirdiği ve hücre tabakalarının konak miyokardiyum ile bütünleştiğini göstermiştir (Miyahara vd. 2006). Yapı iskelesi kullanılmadığı için yöntem, biyomalzeme kullanımında ortaya çıkabilen biyouyumluluk veya biyobozunma sonrası

bozunma ürünlerinin olumsuz etkilerinden bağımsızdır. Bununla birlikte hücre tabakalarının düşük mekanik özellikleri, vaskülarizasyonun eksikliği ve benzer sonuçları insan kalbi için verme garantisinin olmayışı gibi yöntemin dezavantajları da mevcuttur (Wang ve Guan 2010).

2.2.3.3 Enjekte edilebilir biyomalzemeler

Enjekte edilebilir biyomalzemeler de kalp doku mühendisliği yaklaşımları arasında hücre iletim araçlarından biridir. Hücreler genellikle işlevlerini ve geleceklerini belirleyen bir mikroçevrede bulunurlar ve ideal enjekte edilebilir biyomalzeme de, doğal kardiyak HDM yapısını taklit edebilmelidir (Chen vd. 2008). Kullanılacak biyomalzeme biyouyumlu olmalı, hücre tutunması, çoğalması ve olgunlaşması için uygun hücre-matriks etkileşimini sağlamalıdır. Bu açıdan doğal hücre dışı çevre hücreler için protein ve polisakkaritlerin kompleks bir kombinasyonu ile kimyasal ve biyofiziksel ipuçlarını sağlar (Singelyn ve Christman 2010). Bu yarı invazif yaklaşım, açık göğüs ameliyatı risklerini önler ve hem hastalar hem de cerrahi uygulama açısından daha avantajlıdır. Enjekte edilebilir biyomalzemeler, hücrelerin tutunacağı, göç edebileceği ve yeni damar oluşumunu destekleyen bir matriks sağlayarak enfarktüstten sonra onarımı kolaylaştırır (Leor vd. 2005). İdeal enjekte edilebilir biyomalzemeler, “minimum invazif” kateter temelli işlemler ile iletim için uygun hale getirilmiş olmalıdır. Bu malzemeler, ilgili bölgeye iletildiğinde kendiliğinden toplanabilmeli ve tedavi etkisi gösterebilmelidir. Enjekte edildiğinde hasarlı bölgenin şeklini alabilmelidir. Enjekte edilebilir biyomalzemeler tek başına uygulanabildiği gibi, hücreler veya büyüme faktörleri ile de kombine edilerek uygulanabilir.



Şekil 2.9 Enjekte edilebilir biyomalzeme yaklaşımı

Enjekte edilebilir biyomalzeme kullanımının hücre iletimini artırma potansiyeli, ilk kez Christman ve ekibi tarafından iskelet miyoblastları varlığında ve yokluğunda fibrin yapıştırıcının intramiyokardiyal enjeksiyonu ile gösterilmiştir. Kardiyak fonksiyonunda gelişmelerin yanı sıra, tuz çözeltisi içerisinde iletilen hücreler ile karşılaştırıldığında hücresel tutunmanın ve canlı kalma oranının arttığı belirlenmiştir. Aynı zamanda hücresiz fibrin enjeksiyonu da kardiyak fonksiyonunun gelişiminde benzer sonuçlar vermiştir (Christman vd. 2004).

Enjekte edilebilir biyomalzemeler; sentetik, doğal olarak elde edilenler ve deselülerize malzemeler olarak gruplandırılabilir.

2.2.3.3.1 Enjekte edilebilir sentetik biyomalzemeler

Sentetik malzemelerin avantajı; gözeneklilik, mekanik kararlılık ve bozunma özellikleri uygun bir malzeme tasarımına olanak sağlamasıdır. Poli(N-izopropilakrilamit) (PNIPAAm) ve poli(etilen glikol) (PEG) gibi enjekte edilebilir sentetik malzemeler fizyolojik sıcaklığın altında faz geçişine uğrayıp, oda sıcaklığında sıvı fazda olduğu ve 37°C’de jel formunu aldığı için avantajlıdır. PIPAAm türevleri olan, biyobozunur Dekstran aşılantı polimeri poli(ϵ -kaprolakton)-2-hidroksietil metakrilat (PCL-

HEMA)/PIPAAm (Deks-PCL-HEMA/PIPAAm) ve NIPAAm, akrilik asit (AAc) ve hidroksietil metakrilat-poli(trimetilen karbonat) (HEMAPTMC) kopolimerizasyonu ile elde edilen poli(NIPAAm-ko-AAc-ko-HEMAPTMC) gibi malzemelerin de, küçük hayvan enfarktüs modellerinde kardiyak fonksiyonunu koruduğu ve geliştirdiği gösterilmiştir (Wang vd. 2009,Fujimoto vd. 2009). Sentetik malzemeler ayarlanabilme avantajını sunarken, kardiyak yenilenmesinde anahtar rol oynayan; hücresel tutunma, çoğalma ve büyüme için önemli doğal biyoaktiflikten yoksundur (Singelyn ve Christman 2010).

2.2.3.3.2 Enjekte edilebilir doğal biyomalzemeler

Doğal olarak elde edilen malzemeler, hücre canlılığını geliştirmek veya kardiyak fonksiyonunu korumak için geliştirilmiştir. Bu malzemelerin avantajı; immün yanıt oluşturmamalarıdır, yani bileşenlerinin vücut tarafından tanınması ve bozunma ürünlerinin tehlikesiz olmasıdır.

Fibrin; biyouyumlu, toksik ya da inflamatuvar özellik göstermeyen doğal bir biyopolimerdir. İlk kez fibrin yapıştırıcı ile; enjekte edilebilir bir biyomalzemenin hücre canlılığını geliştirdiği, vaskülerizasyonu tetiklediği ve hücreli veya hücreless kullanımın kardiyak fonksiyonunu koruduğu gösterilmiştir (Christman vd. 2004). Yara iyileşmesinde geçici matriks görevi görür ve anjiyogenezi destekler. Hücre tutunmasını kolaylaştıran bozunma ürünleri verir. Ayrıca kontrollü salım sistemlerinde de kullanılmaktadır. Jel formundaki fibrin hücre tutunması ve canlılığını arttırıcı etki sağlar (Guo vd. 2011).

Kitosan; yumuşakçalar, kabuklular ve böceklerdeki kitinin deasetilasyonundan elde edilen doğal katyonik bir polisakkarittir. Biyouyumludur, immünojenik değildir ve polisakkarit iskeletindeki amino grupları sayesinde çeşitli moleküllere bağlanabilir. Fizyolojik sıcaklıkta faz değişimine uğraması, kitosanın miyokardiyuma hücreli ya da hücreless enjeksiyonda jelleşmesini sağlar (Lu vd. 2009). Kitosan kullanımındaki potansiyel engel, nötral çözeltilerdeki çözünürlük sorunudur (Huang vd. 2005).

Alginat; kahverengi deniz yosunundan elde edilir. Alginat, düz zincir yapıda (1-4) bağlı mannuronik asit ve α -L-gluronik asit birimlerinden oluşan ve negatif yüklü yapısal bir polisakkarittir. Konsantrasyonun yükseltilmesi malzemenin mekanik özelliklerini arttırırken aynı zamanda viskozitesini ve bozunma zamanını da arttırır. Alginatın enjekte edilebilir malzeme olarak kullanımı akut ve kronik rat MI modellerinde, skar kalınlığını ve sistolik ve diastolik sınırlılıkları azaltarak pozitif sonuçlar vermiştir (Landa vd. 2008). Alginatın çeşitli büyüme faktörlerinin farklı afinitelerine dayanarak kontrollü iletim sistemlerinde de kullanıldığı rapor edilmiştir. (Ruvinov vd. 2011).

Kollajen; çoğu HDM'in temel protein bileşenidir. Tanımlanmış amino asit kalıpları ile sarmal bir yapıya sahip olması vucüt tarafından kolayca tanınmasını sağlar. *In vitro* koşullarda yapılan çalışmalar kardiyomiyosit büyümesini ve canlılığını desteklediğini göstermiştir. Hayvan modellerinde de kollajen implantasyonunun ventriküler kardiyak fonksiyonunu ve geometrisini geliştirdiği gözlenmiştir (Dai vd. 2005).

2.2.3.3.3 Enjekte edilebilir deselülerize biyomalzemeler

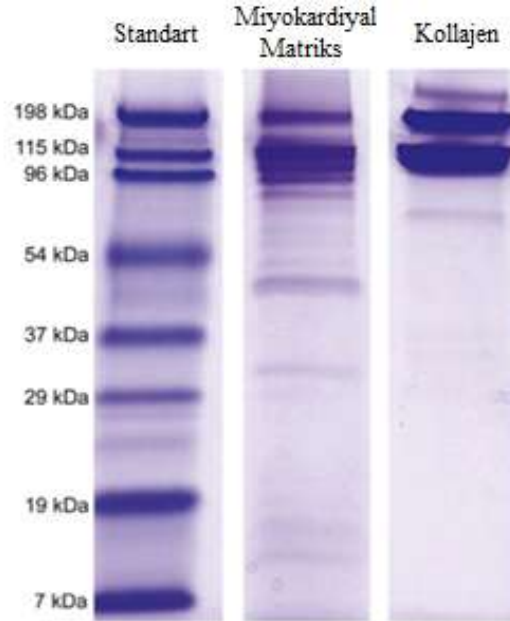
Doğal sağlıklı dokuda hücre dışı çevre, hücre tutunmasını, canlılığını, göçünü, çoğalmasını ve farklılaşmasını sağlayan protein ve proteoglikanların kompleks bir bileşimini içerir (Leor vd. 2005, Badylak vd. 2009). Bu kompleks çevrenin yerini alabilecek en iyi yapı doğal HDM'nin kendisidir. Bu nedenle, kardiyak onarımını da içeren, deselülerize HDM'nin bir çok medikal uygulaması değerlendirilmektedir. Deselülerizasyon, dokunun ya da organın kimyasal, fiziksel ve enzimatik yollarla hücresel içeriğinden arındırılması olup, böylelikle geriye sadece HDM kalır. Bununla birlikte HDM'nin kimyasal ve yapısal bileşimi değişebilir. Deselülerizasyon, potansiyel nakil reddi, inflamasyon veya yabancı vücut yanıtına neden olabilecek hücresel antijenleri uzaklaştırdığı için yararlıdır (Gilbert vd. 2006). Böylelikle kardiyak dokuya özgü deselülerize dokuların kullanımı daha uygun bir seçenek haline gelmektedir. Yapılan çalışmalarda sıçan ve domuz kalbinin çeşitli yöntemlerle deselülerizasyonu ile hücresel içerikleri uzaklaştırılmış, elde edilen deselülerize HDM'nin liyofilizasyonundan sonra enzimatik yöntemlerle çözülebilen sıvı form elde edilmiştir

(Singelyn vd. 2009, Naraghi vd. 2010). Elde edilen miyokardiyal matriks fizyolojik pH ve sıcaklıkta *in vitro* ortamda nanofibröz ve gözenekli bir yapı göstermiştir. Ayrıca yapılan çalışmalarda miyokardiyal matriks insan koroner arter endotel hücrelerinin ve sıçan aortik düz kas hücrelerinin göçünü destekleyen bir yapıya sahip olduğu gösterilmiştir (Singelyn vd. 2009).

3. KAYNAK ÖZETLERİ

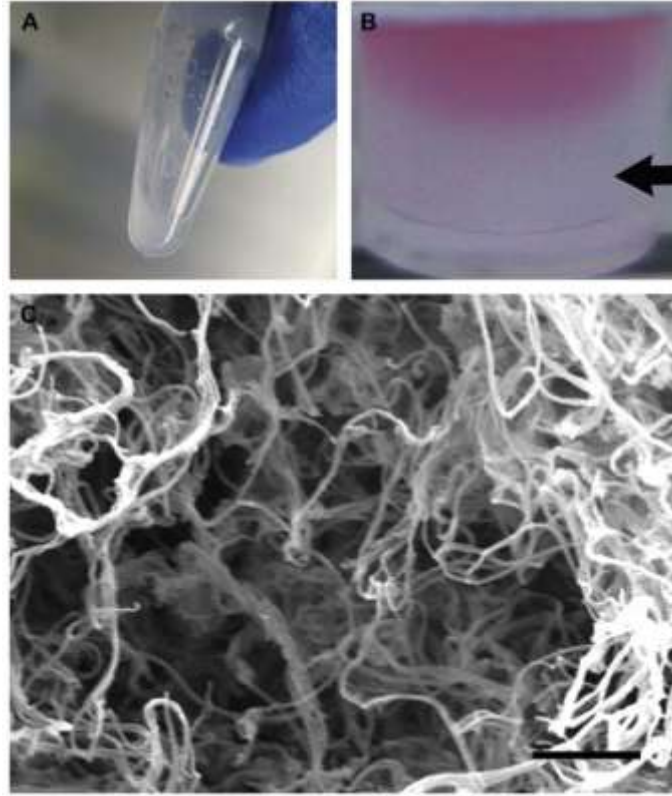
Kalp doku mühendisliği için geliştirilen doğal kaynaklı biyomalzemeler, bu biyomalzemelerin enjekte edilebilir formu ve karakterizasyonuna yönelik bazı çalışmalar aşağıdadır.

Singelyn vd. 2009 yılında yaptıkları bir çalışmada, domuz kalbinin ventriküler dokusunu küçük parçalara ayırdıktan sonra %1 SDS ve %1 Triton-X100 kullanarak deselülerize etmişlerdir. Hücresizliği H&E boyaması ile doğrulamışlardır. Elde edilen HDM'in pepsin ile enzimatik parçalanması sonucu çözülebilir bir formu elde edilmiştir. SDS-PAGE ile peptit ve HDM kısımları gösterilmiştir (Şekil 3.1). GAG içeriği belirlenmiştir.



Şekil 3.1 Standart protein belirteci, miyokardiyal matriks ve kollajenin SDS-PAGE görüntüleri

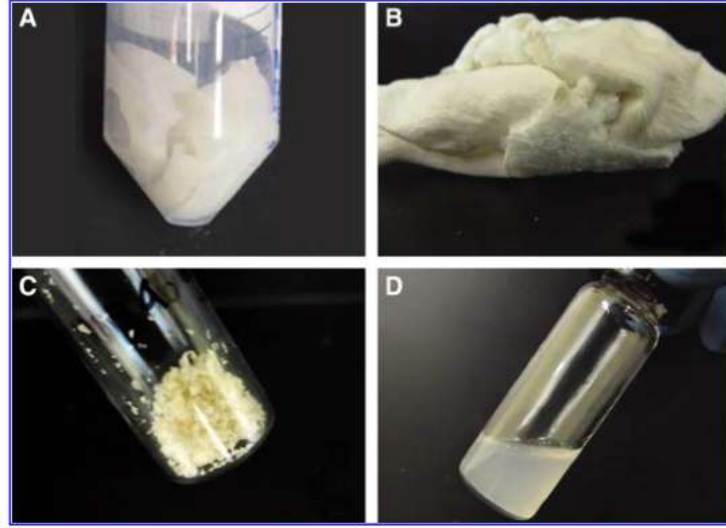
Yapının 37°C’de inkübasyonu ile jel formu elde edilmiştir. Elde edilen miyokardiyal matriks jelin yapısı SEM ile görüntülenmiştir. SEM görüntüleri yapının nanofibröz ve gözenekli yapıda olduğunu göstermiştir (Şekil 3.2). *In vitro* çalışmalarda, miyokardiyal matriks, kollajen kaplı kültür kapları ve kollajen üzerine neonatal rat kardiyomiyositleri tohumlanmış ve hücre canlılıkları karşılaştırılmıştır. Hücrelerin miyokardiyal matriks yapıda tutundukları ve canlı kalabildikleri görülmüştür. *In vivo* çalışmalarda çözülebilir matriks yapı sıçanlara enjekte edilmiş ve belirli zaman noktalarında alınan örnekler ile yapının jel oluşum hızı gözlenmiştir. Enjeksiyondan sonra 30 dk içerisinde jel oluşumunun gerçekleştiği görülmüştür.



Şekil 3.2.a.Miyokardiyal matriks jelin oda sıcaklığında ve b. 37°C’deki görüntüsü, c. miyokardiyal matriks jelin SEM görüntüsü

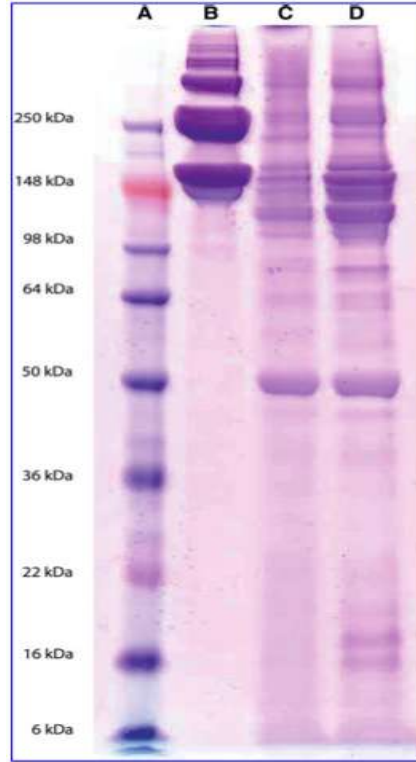
Naraghi vd. (2010) domuz ve insan perikardiyumunu deselülerize ettikten sonra H&E boyaması ile hücresizleştirmeyi değerlendirmişlerdir. Liyofilize edilen deselülerize

perikardiyumlar, mil yardımıyla toz hale getirilip pepsin enzimi ile parçalanarak, çözülebilir HDM elde edilmiştir (Şekil 3.3).



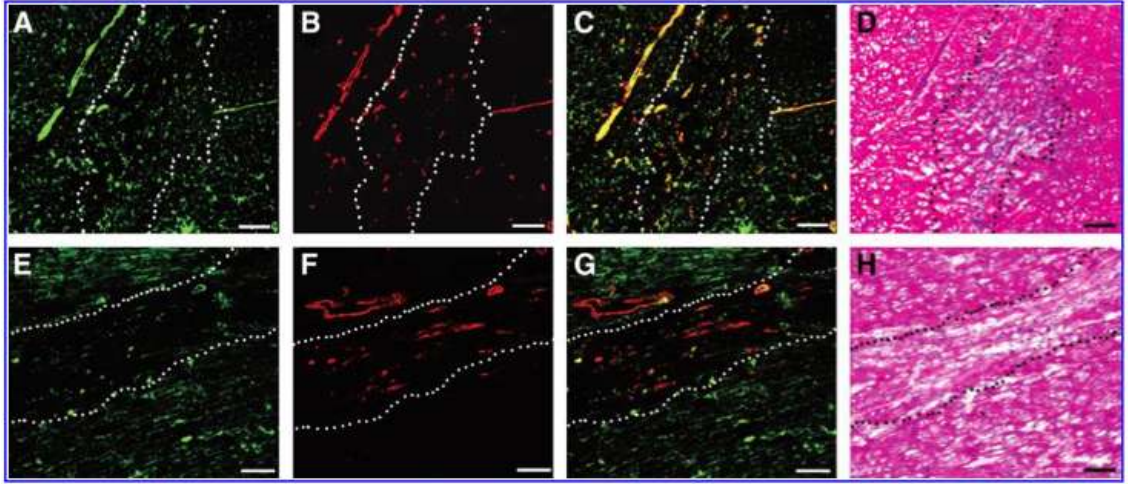
Şekil 3.3.a.Deselülerize perikardiyum, b. deselülerizasyondan sonra liyofilize edilmiş perikardiyum, c. toz haline getirilmiş perikardiyum ve d. enzimatik parçalanma sonucu elde edilen çözülebilir matriks yapı

Protein bileşimini görmek için yapılan SDS-PAGE sonucunda iki perikardiyumda da kollajene karşılık gelen bantlar görülmüştür (Şekil 3.4). Her iki perikardiyumda da GAG içerikleri birbirine yakın bulunmuştur.



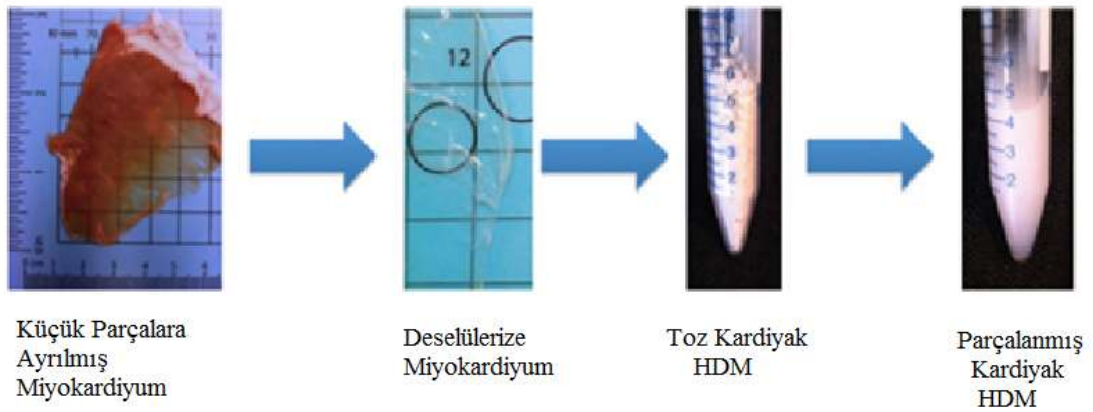
Şekil 3.4 Naraghi ve arkadaşlarının 2010 yılındaki çalışmalarına ait SDS-PAGE görüntüleri

In vivo çalışmalarda çözülebilir formdaki HDM'nin, sıçan kalplerine miyokardiyal enjeksiyonu yapılarak belirli zaman noktalarında örnekler alınmıştır. Enjeksiyon bölgesinde kan damarı oluşumunu gözlemlemek için immünhistokimya çalışmaları yapılmış ve sonucunda çözülebilir formdaki HDM'nin yeni damar oluşumunu desteklediği görülmüştür (Şekil 3.5).



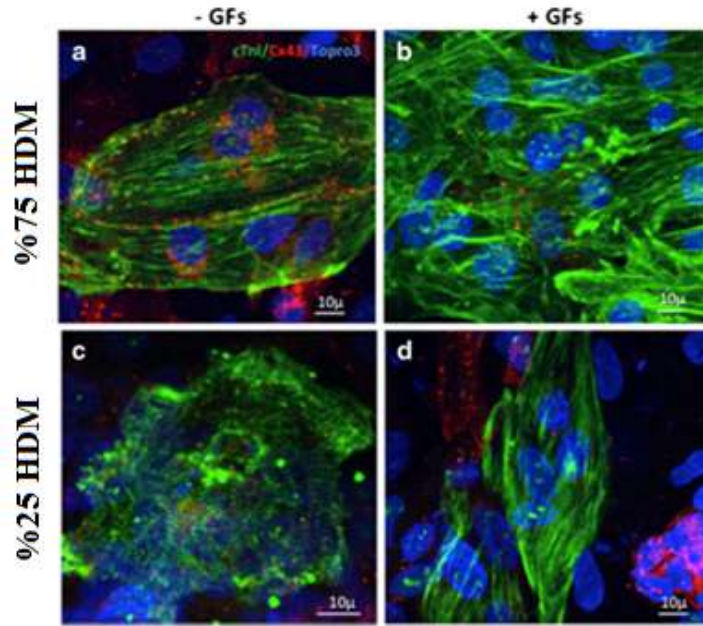
Şekil 3.5.a-c Enjekte edilen insan vee-g domuz matriks jellerindeki damar oluşumu için yapılan floresan boyaması

Duan vd. 2011 yılında yaptıkları bir çalışmada domuz kalbinin sağ ve sol ventrikülünü küçük parçalara ayırarak deselülerize etmişlerdir. Deselülerizasyonda parçalar sırasıyla, %0,02 tripsin, %3 Triton X, %4 deoksikolat ve %0,1 PAA uygulamasından sonra saf ile yıkanmıştır. Sıvı azotta dondurulan örnekler havanda dövülerek liyofilize edilmiştir. Liyofilize toz pepsin ile enzimatik olarak parçalanmış ve elde edilen karışım -80°C 'de saklanmıştır (Şekil 3.6).



Şekil 3.6 Kardiyak HDM hidrojel görüntüleri

Kollajen HDM'nin farklı oranlarda (kollajen, %25 HDM - %75 kollajen, %75 HDM - %25 kollajen) karışımlarının kinetik özellikleri spektrofotometrik olarak tayin edilmiş ve sadece HDM yerine, kollajen ile karışımları kullanılmıştır. %75 HDM'den oluşan hidrojel, daha yüksek oranda HDM proteinleri içerdiğinden dolayı kardiyak farklılaşmada daha etkili bir rolü vardır. *In vitro* çalışmalarda insan embriyonik kök hücreleri, elde edilen hidrojellerde enkapsüle edilerek kullanılmış ve bu hücrelerin kardiyak farklılaşması büyüme faktörlerinin varlığında ve yokluğunda gözlenmiştir. Farklılaşmayı gözlemlemek için cardiac troponin I (cTnI) ve connexin 43 ifadesine bakılmıştır. Sadece HDM'nin kardiyak farklılaşmayı desteklediği, %75 ve %25 HDM içeren hidrojellerin ise büyüme faktörleri varlığında farklılaşmayı desteklediği bulunmuştur.



Şekil 3.7 Kardiyak belirteçlerinin, farklı hidrojellerde, büyüme faktörü varlığında ve yokluğundaki konfokal mikroskop görüntüleri

cTnI yeşil, connexin 43 kırmızı

4. MATERİYAL ve YÖNTEM

4.1 Materyal

Deneyde kullanılan sığır kalpleri Ankara Et ve Balık Kurumu Genel Müdürlüğü bünyesindeki hayvan kesim tesisinden, veteriner kontrolü altında kesimi yapılan sağlıklı sığırlardan elde edildi.

Deselülerizasyon işlemlerinde kullanılan SDS, Triton X-100, tripsin, EDTA, NH₄OH, PAA ve EtOH Sigma-Aldrich (St. Louis, MN, ABD) firmasından temin edildi. Liyofilizasyon işlemi Christ Alfa marka liyofilizatörde gerçekleştirildi. Dondurma ve saklama işlemleri için -80 Heto marka ultra dondurucu kullanıldı.

DNA içeriğinin belirlenmesinde kullanılan TRIS, EDTA, NaCl, SDS, etanol ve proteinaz K Sigma-Aldrich (St. Louis, MN, ABD) firmasından temin edildi. Santrifüj işlemleri Hettich Universal 32R marka cihaz ile gerçekleştirildi. DNA ölçümleri 96 kuyucuklu UV mikro plaka içerisinde, SpectraMax M5 model (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, ABD) spektrofotometrede alındı.

Hücre kültürü çalışmalarında, hücrelerin ekilip çoğaltıldığı steril doku kültür kapları (Corning, NY, ABD), besiyeri olarak α – MEM (Minimum Essential Medium Alpha) (Sigma), besiyeri katkısı olarak L-glutamin, penisilin-streptomisin (P/S) ve fetal sığır serumu (FBS) (Sigma, St. Louis, MO, ABD), hücrelerin pasajlanması işleminde ise tripsin/EDTA çözeltisi (Sigma) kullanıldı. Çalışmaların tamamı laminar akışlı steril kabinde (Nuair) yapıldı ve hücre kültürleri 37°C, %5 CO₂, %95 nem ortamını sağlayan bir karbondioksitli inkübatörde (Heracell 240®, Waltham, MA, ABD) gerçekleştirildi.

Hücrelerin mitokondriyel dehidrogenaz aktivitesinin belirlenmesinde kullanılan MTT [3-(4,5-dimetildiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür] kiti Sigma firmasından temin edildi ve ölçümler UV mikro plaka okuyucu (Biotrak II, Amersham Biosciences, ABD) cihazında alındı.

Deselülerize k-HDM yapısının enzimatik parçalanmasında kullanılan pepsin enzimi Sigma firmasından temin edildi.

Protein içeriğinin belirlenmesinde, standart ve örnek ölçümleri Spectramax M5 model spektrofotometrede alındı. Protein standardı hazırlanmasında kullanılan BSA (Sığır Serum Albümini) Sigma firmasından temin edildi.

SDS-PAGE’de ve agaroz jel elektroforezinde Biorad marka jel tankı ve güç kaynağı kullanıldı.

Kesit alma işleminden sonra örnekler, hematoksin ve eosin (H&E) (Sigma), ile boyandı. Boyama görüntüleri LeicaDM 4000B araştırma mikroskobunda (Wetzlar, Almanya) incelendi.

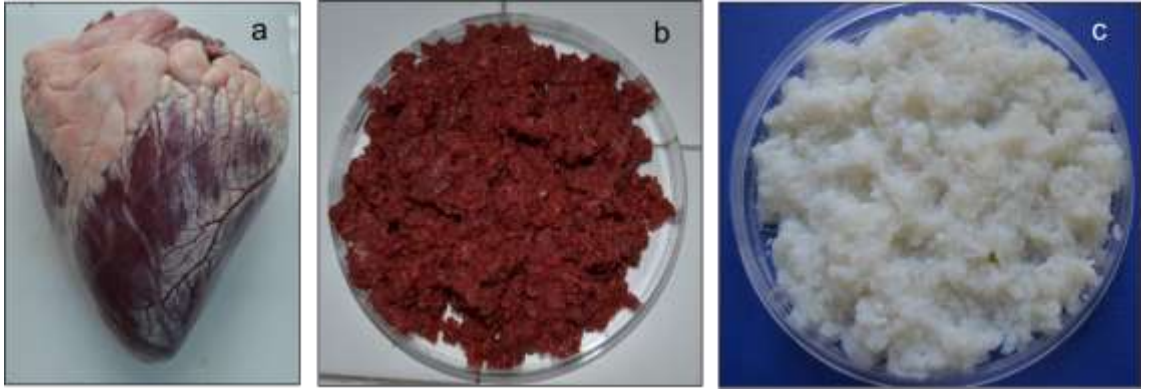
4.2 Yöntem

4.2.1 Deselülerizasyon

Ankara Et ve Balık Kurumu Genel Müdürlüğü bünyesindeki hayvan kesim tesisinden, veteriner kontrolü altında kesimi yapılan sağlıklı sığırlardan elde edilen kalpler, kesimi takibe 1-2saat içerisinde, PBS tamponu ve antibiyotik içeren çözelti içerisinde laboratuvara getirildi. Yıkılarak kan kalıntıları uzaklaştırıldıktan sonra -80°C’de muhafaza etmek ve hücre parçalanmasını kolaylaştırmak için 1-10 gün süre arasında donduruldu. Çalışmaya başlamadan önce oda sıcaklığına getirilen kalplerden yağ ve bağ doku uzaklaştırıldıktan sonra sol ventrikül kısmı alındı ve deselülerizasyonun etkinliğini arttırmak ve süresini kısaltmak amacı ile küçük parçalara ayrıldı. Parçalar öncelikle hipotonik/hipertonik tuz çözeltileri ve ardından PBS ile birer gün yıkılarak fazla kan ve kalıntılar uzaklaştırıldı. Ardından aşağıda belirtilendört farklı deselülerizasyon protokolü uygulandı.

Gruplar	Örneğe uygulanan işlemler
1. Grup	Sırasıyla %1 SDS ve %1 Triton X-100 ile yıkandı(Ott vd. 2007).
2. Grup	Tripsin-EDTA uygulamasının ardından, %3 Triton X-100, %4 deoksikolik asit ve %0,1 PAA/%4 EtOH ile yıkandı (Wainwright vd. 2010).
3. Grup	Tripsin-EDTA uygulandıktan sonra %1 Triton X-100 ve 20mM NH ₄ OH ile hazırlanmış deterjan solüsyonu ile yıkandı (Castro Bras vd. 2013).
4. Grup	Örnekler %1 SDS ile yıkandıktan sonra %0,1 PAA/%4 EtOH ile muamele edildi (Laboratuvarımızda geliştirdiğimiz yöntem).

Tüm gruplar deterjan yıkamalarının ardından, deterjan kalıntılarını uzaklaştırmak amacı ile saf su ile yıkandı. Daha sonraki analizlerde ve deney basamaklarında kullanılmak üzere, elde edilen kardiyak hücre dışı matriks (k-HDM) yapısı önce -80°C’de donduruldu ardından liyofilize edilerek muhafaza edildi (Şekil 4.1).



Şekil 4.1.a. Sığır kalbi, b. küçük parçalara ayrılmış sol ventrikül, c. deselülerizasyon sonrası kalp dokusu

4.2.1.1 DNA içeriğinin belirlenmesi

Deselülerizasyon işleminin etkinliğini değerlendirmek için her bir grubun DNA içeriği doğal doku ile ve kendi aralarında karşılaştırıldı. Yaklaşık 10 mg doğal liyofilize edilmiş doku ve farklı protokollerle deselülerize edilmiş dokuların (k-HDM), T:N:E:S

(Tris: NaCl: EDTA: SDS) tamponunda proteinaz K ile 55°C’de 3 gün bekletilerek parçalanması sağlandı. Parçalanma tamamlandıktan sonra örnekler 150 µL 6M NaCl ilave edildi ve 30 saniye vortekslendi. 4°C’de 3000 devir/dakika’da 5 dk süre ile santrifüj edildi. Aynı bir tüpe alınan süpernatant üzerine 500 µL soğuk etanol eklendi ve yaklaşık 20 dakika -20°C’de bekletildi. Tekrar 4°C’de 3000 devir/dakika’da 5 dk süre ile santrifüj edilerek DNA pellet halinde elde edildi, süpernatant uzaklaştırıldı. 500 µL %70 soğuk etanol ilave edilen tüpler son kez 4°C’de 3000 devir/dakika 5 dk süre ile santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı ve kalan etanolü uzaklaştırmak için tüpler oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Tüplere 100 µL steril su eklenerek DNA içeriği spektrofotometrik olarak tayin edildi. Köre karşı 260 nm ve 280 nm dalga boyunda ölçüm alınarak doğal ve deselülerize örneklerdeki DNA miktarı karşılaştırıldı (Aljanabi ve Martinez 1997). Her grup için üçer örnek ile çalışıldı. Ortalama DNA konsantrasyonu ve saflığı eşitlik 4.1’e göre hesaplandı.

$$\text{DNA Konsantrasyonu} = \text{OD}_{260} \times \text{Seyreltme faktörü} \times 50 \text{ ng/}\mu\text{L} \quad (\text{Eşitlik 4.1})$$

$$\text{DNA Saflık} = \text{OD}_{260/280} = \sim 1,8 \quad \text{ideal saflık}$$

$$<< 1,8 \text{ kontaminasyon}$$

$$>> 1,8 \text{ kontaminasyon}$$

4.2.1.2 Agaroz Jel Elektroforezi

Elektroforez, bir elektriksel alan içerisinde yüklü moleküllerin ayrıştırılması esasına dayanır. Moleküllerin yük, büyüklük ve konformasyonlarına göre ayrılmasını sağlayan bir yöntemdir. Özellikle nükleik asit ve proteinlerin saflaştırılması ve ayrılmasında sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. Deselülerizasyonun etkinliğini değerlendirmek için, örneklerdeki DNA kalıntıları etidyum bromür ile %1,5 agaroz (70V-1 saat) agaroz jel elektroforezinde yürütüldü ve jel görüntüsü çekildi. DNA belirteci ve kontrol grubundaki DNA bantları ile deselülerize örneklerdeki DNA bantları karşılaştırıldı.

4.2.1.3 Histokimya çalışması

Örneklerin deselülerizasyon işlemi sonrası hücresizleşme düzeyinin değerlendirilmesi, çekirdek ve sitoplazmik içeriği boyayan, H&E boyaması yapılmış örnekler üzerinde gerçekleştirildi.

Ağaç kabuğundan elde edilen ve nükleer boya olarak en fazla kullanılan hematoksilin, kendi başına bir boya değildir. Oksidasyon ürünü olan hematein zayıf anyonik boyadır. Hemateinin dokuya afinitesi azdır, fakat metalik mordantlar eklendiğinde özellikle hücre çekirdeğine afinitesi artar ve kuvvetli boyar. Eosin, kesitlerin rutin boyanmasında en fazla kullanılan karşıt boyadır.

Eosin ile en iyi boyanma yaklaşık pH 4-6'da meydana gelir. Genel doku boyası olarak; çekirdek ve sitoplazma ayırımında kullanılan, histolojik boyalar içinde en geniş kullanımı olan ve dokunun farklı bölgelerini farklı olarak boyayan Hematoksilin ve Eosin boyasıdır.

Hematoksilin genellikle; çekirdeği mavi-siyah renkte boyayarak çekirdek içini iyi bir biçimde gösterir. Eosin ise, hücre sitoplazmasını ve bağ dokusu elemanlarını çeşitli varyasyonlarda pembe, turuncu ve kırmızı renkte boyar (<http://www.ihcworld.com>).

H&E boyaması için, deneylerde kullanılan örnekler belirli zaman noktalarında eksplante edilen örnekler kriyo tampon çözeltisinde (potasyum fosfat tamponu; K_2HPO_4/KH_2PO_4 pH 7.4, 0,1M) hazırlanmış %2,5 Gluteraldehit içerisinde 10 dakika tespit edildikten sonra sırasıyla 30'ar dakika dondurma tamponunda (%15 süktroz içeren 0,1M potasyum fosfat tamponu) ve dondurma çözeltisinde (Tissue-Tek, Sakura Finetek Hollanda) bekletildikten sonra $-80^{\circ}C$ 'de dondurulup, kriyo kesitleri alınmış ve lam üzerindeki örneklerle aşağıdaki işlemler sırası ile uygulanmıştır;

1. 2-3 dakika saf su ile nemlendirildi.
2. 8 dakika Hematoksilin ile boyandı.
3. Hematoksilini uzaklaştırmak için 10 dakika saf su ile yıkandı.
4. %95'lik etil alkol ile muamele edildi.
5. 1 dakika Eozin ile boyandı.
6. % 95'lik etil alkolden geçirilerek fazla boya uzaklaştırıldı.
7. Hazırlanan örnekler ışık mikroskobu ile incelendi.

Bu protokole göre k-HDM örnekleri boyandı ve deselülerizasyon sonrası hücresizleşme düzeyi H&E boyaması ile değerlendirildi.

4.2.2 Kalıntı deterjan içeriğinin belirlenmesi

Bu çalışmada sıçan kemik iliği mezenkimal kök hücreleri (Kİ-MKH) kullanılmıştır. Kİ-MKH'leri standart protokollere göre 8-12 haftalık 200-250g ağırlığındaki Wistar soyu sıçanların femur ve tibialarından izole edildi. Bu amaçla, avertin ile anestezi (10 mL/kg) sonrası sıçanın her iki bacağındaki femurlar ve tibialar çıkarıldı. %70'lik etanol ile etraflarındaki yağ ve kas kalıntıları iyice temizlenerek alt ve üst kısımlarından kesildi. İçerisinde 5 mL α -MEM besiyeri bulunan 25 G'lik enjektör yardımıyla kemik iliği hücreleri santrifüj tüpüne aktararak 1100 devir/dakika, 7-11 dakika süre ile santrifüj edildi. Santrifüj sonrası çözeltinin üst kısmı atıldı ve 5'er dakika 1100 devir/dakikada 3 kere santrifüjleme işlemi yapılarak hücreler besiyeri ile yıkandı. Yıkama işlemlerinin ardından elde edilen Kİ-MKH'leri, %10 fetal sıgır serumu (fetal bovine serum; FBS), 2 mM L-glutamin, 100 μ L/mL penisilin-streptomisin içeren α -MEM içerisinde, 37°C'de, %5 CO₂, %95 hava, %90 nem içeren hücre kültürü koşullarında inkübe edildi. Kültürün üçüncü gününde kültür kabına yapışmayan hücreler, besiyeri değiştirilerek uzaklaştırıldı. Besiyeri haftada üç kez değiştirilerek, yapışan hücrelerin kültürüne devam edildi. Hücreler %80-90 bolluk noktasına geldiğinde, %0,25 tripsin ve 1 mM EDTA içeren çözelti yardımıyla kap yüzeyinden kaldırılarak pasajlama işlemi yapıldı.

3. pasajdaki hücreler kullanıldı.

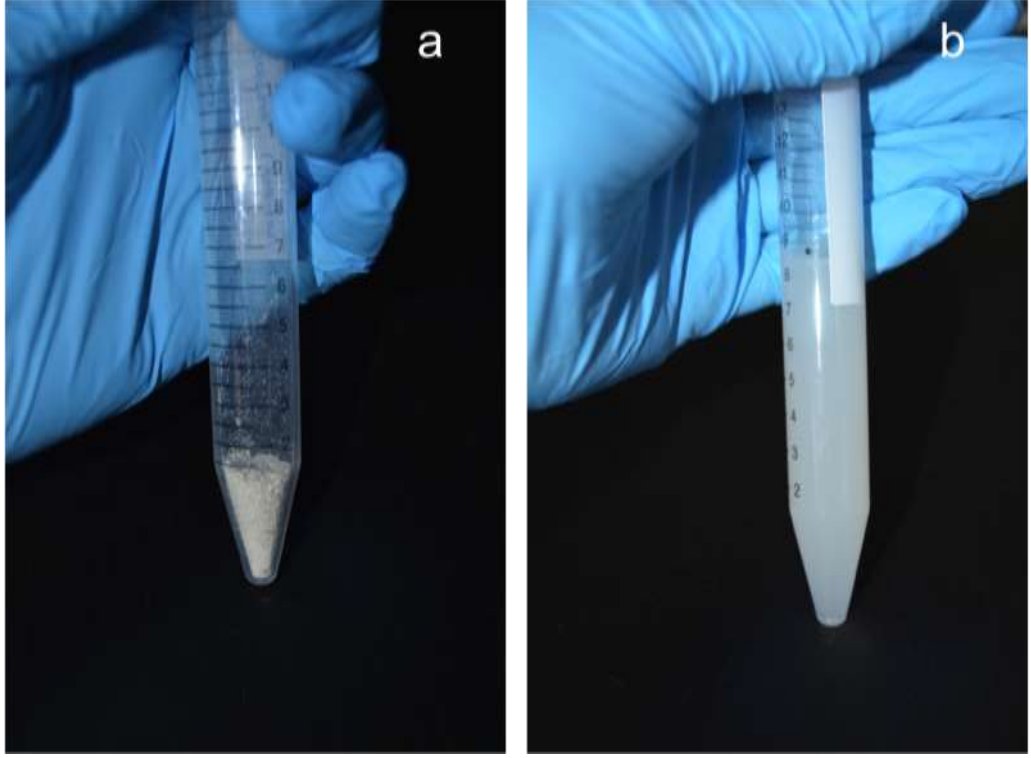
k-HDM'de deselülerizasyon sonrası deterjan kalıntısı olup olmadığının kontrolü hücre canlılığına bakılarak tespit edildi. Bunun için ~3 g k-HDM, ~7 g ml standart kültür vasatında (α -MEM, %10 FBS, 2 mM L-glutamin, 100 μ L/mL penisilin-streptomisin) 3 gün süre ile 37°C'de, %5 CO₂, %95 hava, %90 nem içeren hücre kültürü koşullarında inkübe edildi. Bu işlem sonunda eğer k- HDM'de yüksek oranda deterjan kalıntısı mevcut ise inkübasyon sırasında vasat ortamına geçeceği, ve bunun sonucunda bu vasatın kullanılacağı hücrelerin canlılığını etkileyerek azaltacağı düşünülmektedir.

İnkübe edilen vasat, kültürü devam eden Kİ-MKH'ler için besiyeri olarak kullanıldı ve standart vasat kullanılan hücrelerin canlılığı ile inkübe edilen vasatın kullanıldığı hücrelerin canlılığı MTT kiti (CGD1 Sigma) kullanılarak karşılaştırıldı.

Her iki vasatın kullanıldığı hücrelerin morfolojileri, bu hücrelere ait belirli zamanlarda çekilen mikroskop görüntüleri incelenmesiyle karşılaştırıldı.

4.2.3 Deselülerize k-HDM' in enzimatik parçalanması ve enjekte edilebilir miyokardiyal matriksin elde edilmesi

Enjekte edilebilir miyokardiyal matriks elde etmek için deselülerize kalp dokusu çözülebilir hale getirildi (Singelyn vd. 2009, Seif-Naraghi vd. 2010-2012, Duan vd. 2011). Deselülerize k-HDM örnekler enzimatik olarak parçalandı. 0,1M HCl içerisinde pepsin (mg/mL) çözeltisi küçük parçalara ayrılmış k-HDM örneklerine eklendi (10:1) ve oda sıcaklığında ~80saat boyunca sürekli karıştırıldı. Bu süre sonunda viskoz bir sıvı elde edildi. Pepsin aktivitesini durdurmak için elde edilen viskoz çözeltinin pH'sı NaOH ile pH 6 üzerine ayarlandı. Elde edilen viskoz matriks yapısı -80°C'de muhafaza edildi. Bu yapının 30 dakika 37°C'de inkübasyonu ile miyokardiyal matriks yapı elde edildi (Şekil 4.2).



Şekil 4.2.a. Toz haline getirilmiş deselülerize k-HDM, b. enzimatik parçalanma sonucu elde edilen miyokardiyal matriks yapı

4.2.4 Miyokardiyal matriksin karakterizasyon çalışmaları

4.2.4.1 Türbidimetrik analiz

Türbidimetri, bulanıklık ölçümü esasına dayanan bir yöntemdir. İletilen ışığın, bulanıklık sebebiyle, şiddet kaybının kolorimetrik olarak ölçülmesi işlemidir.

Enzimatik parçalanma sonucu elde edilen çözülebilir matriksin jel oluşumu türbidimetrik yöntem ile tayin edildi (Freytes vd. 2008, Seif-Naraghi vd. 2010, Wolf vd. 2012, Medberry vd. 2013). Jel oluşumu sonucunda bulanıklığın artması ile değişen absorbans değerleri eşitlik 4.2 kullanılarak, jel oluşum süresi belirlendi. 37°C'ye ayarlanan spektrofotometrede (SpectraMax M5) 1 saat boyunca 2 dakikada bir absorbans ölçümü alındı.

$$\text{Normalize Absorbans} = \frac{A - A_0}{A_{\max} - A_0}$$

(Eşitlik 4.2)

4.2.4.2 Miyokardiyal matriksin protein içeriğinin belirlenmesi

4.2.4.2.1 Miyokardiyal matriksin protein içeriğinin Lowry yöntemi ile tayini

Enzimatik parçalanmanın ardından yapıdaki protein içeriği kolorimetrik olarak Lowry yöntemi ile tayin edildi. Yöntemin esası; peptit bağları ile Cu^{2+} 'ın biüret reaksiyonu vermesine dayanır. Bu yöntemde peptit bağları alkali ortamda bakır ile renkli kompleks oluşturur. Üçer örnek olarak hazırlanan standart çözeltilere ve numuneye reaktifler eklendikten sonra oda sıcaklığında yarım saat bekletildi ve bu süre sonunda oluşan renk yoğunluğu 750 nm dalga boyunda ölçüldü ve ortalaması alındı. 0,1-1,4 μg BSA/ml derişim aralığında hazırlanan standartların absorbans ölçümü yapılarak kalibrasyon eğrisi çizildi ve doğal doku ve numunenin absorbansından yola çıkılarak protein içerikleri hesaplandı.

4.2.4.2.2 Miyokardiyal matriksin protein içeriğinin SDS-PAGE ile belirlenmesi

SDS-PAGE proteinleri boyutlarına göre ayırmak için kullanılan bir yöntemdir. SDS negatif yüklü bir moleküldür ve proteini kaplayarak onun yükünü perdeler. Böylelikle karışımındaki tüm proteinler eşit yüklü duruma gelir. SDS varlığında ısıtılan proteinler denatüre olur ve negatif yüklenerek, elektriksel alanda anoda doğru hareket ederler. Böylece proteinler SDS-PAGE ile yüklerine göre değil büyüklüklerine göre ayrılır. Ayrıca bu yöntem ile protein saflık kontrolü, molekül kütlesi ve konsantrasyon çeşitliliği de tayin edilebilir (Laemmli 1970).

SDS-PAGE ile, enzim ile parçalanmış matriks yapının protein içeriği, protein standardı ve sıçan kuyruk tendonundan izole edilen kollajen ile karşılaştırıldı (Singelyn vd. 2009, Seif-Naraghi vd. 2010).

Çizelge 4.1 SDS-PAGE ‘de kullanılan jel içerikleri

Çözeltiler	%12’lik Ayırma Jeli	%4’lük Toplayıcı Jel
dH ₂ O	3,2 mL	2,975 mL
Akrilamit (%30)/Bis- akrilamit (%0,8)	4 mL	0,67 mL
1M Tris-HCl (pH 6,8)	2,6 mL	1,25 mL
%10 SDS	0,1 mL	0,05 mL
%10 Amonyum persülfat	0,1 mL	0,05 mL
TEMED	10 µL	5 µL

Çizelge 4.1’de belirtilen oranlara göre hazırlanan ayırma jeli elektroforez tankına döküldü, üzerine izopropil alkol eklenerek jelin düzgün biçimde donması sağlandı. İzopropil alkol uzaklaştırıldıktan sonra toplayıcı jel donmuş olan ayırıcı jel üzerine döküldü.

Örnekler, lizis tamponu (0,035 M SDS, 1 M Tris-HCl (pH 6,8), 2 mg bromofenol, %0,56 gliserol, %0,06 2-merkaptoetanol) (1:1) içerisinde 95°C’deki su banyosunda 5 dakika bekletildi. Su banyosundan çıkarılan örnekler örnek tamponu (0,5M Tris-HCl (pH 6,8), %10 gliserol, 3,5 mM SDS, 2 mg bromofenol , %0,25 2-merkaptoetanol) (2:1) eklendi. Her bir kuyucuğa 20µl örnek eklendi ve jelde 200 V’da ve 40 dakika süre ile yürütme tamponunda (0,19 M glisin, 0,025 M Tris, 3,5 mM SDS) yürütüldü. Ardından jel, boyama çözeltisi (1,2 g Comassie brilliant blue, 454 mL %50 metanol, 46 mL glasiyel asetik asit. Hazırlanan boya çözeltisi kullanılmadan önce Whatman no 1 kağıdından süzüldü) içerisinde 1 gün süre ile bekletildi. Boyama çözeltisinden sonra jel, boya uzaklaştırma çözeltisi(%5 metanol, %7,5 glasiyel asetik asit) içerisinde 3 gün bekletilerek boyadan arındırıldı ve jelin görüntüsü çekildi.

4.2.4.3 Miyokardiyal matriksin GAG içeriğinin belirlenmesi

GAG'lar, uzun anyonik polisakkarit birimlerinden oluşmuş ve hücrel çevreyi oluşturan en büyük makromoleküllerdendir. GAG'ların, çeşitli süreçlerde, enzim düzenlenmesi, hücrel tutunma, büyüme, göç ve farklılaşma gibi farklı işlevleri vardır (Yung ve Chan 2006). Doku yaralanması sonrası GAG içeriğinin bilinmesi, olgun fenotipin yeniden oluşturulması ile ilgili sürecin anlaşılmasında önem taşımaktadır (Barbosa vd. 2003).

Miyokardiyal matriks yapıdaki GAG içeriğinin belirlenmesinde, 1,9-dimetil metilen mavisi boyasının GAG ile bağlanması sonucu, absorpsiyon spektrumunda meydana gelen değişimlerin spektrofotometrik olarak takibinde yararlanıldı (Barbosa vd. 2003, Huynh vd. 2012).

Dondurulmuş doğal doku liyofilize edildi. Doğal doku ve miyokardiyal matriks, 25mg/mL ekstraksiyon tamponunda (50 mM Tris-HCl, 10 mM NaCl, 3 mM MgCl₂, ve 1% Triton X-100, pH 7.9) 4°C'de süspanse edildi. Ardından örnekler proteinaz K (50 µg/mL son örnek konsantrasyonu) ile 56°C'de gece boyu inkübe edildi. Proteinaz K inaktivasyonundan sonra (90 °C, 30 dk) örnekler santrifüj edilerek (10000 devir/dakika, 20 dk) ve süpernatant ayrıldı, GAG'ları içermeyen pellet atıldı. 10 veya 100 µL filtrelenmiş, proteinaz K ile parçalanmış örneklerin son hacmi su ile 100 µL ye tamamlandı. Her bir örneğe 1 mL GAG-DMMB kompleksleşme çözeltisi (%0,2 sodyum format ve %0,2 formik asit içeren 0,2 M guanidin hidroklorür çözeltisi ile, filtreden geçirilmiş etanolik 1,85 mM DMMB çözeltisi) eklendikten sonra 30 dk boyunca çalkalandı. Örnekler santrifüj edildi (10000 devir/dakika, 10 dk) ve süpernatant atıldı. Pellet GAG-DMMB kompleksini içerir. GAG-DMMB pelleti 250 µL kompleksleşme bozucu çözeltisinde (%10 propan-1-ol ve 50mM sodyum asetat içeren 4 M GuHCl) kuvvetli şekilde çalkalanarak çözüldü ve 656 nm dalga boyunda absorbans ölçümü yapıldı. Kalibrasyon grafiği, bilinen CS-A konsantrasyonlarına göre çizildi (55, 45, 40 ve 35 µg CS-A/mL). Kalibrasyon grafiğinden yola çıkılarak örneğin içerdiği GAG miktarı belirlendi.

4.2.7 *In vitro* hücre kültürü çalışmaları

4.2.7.1 Adipoz Mezenkimal Kök Hücre kültürü

Daha önce etik kurul kararı çerçevesinde izole edilip, karakterizasyonu yapılmış olan, -80°C’de dondurulmuş durumda saklananiAMKH’leri bu çalışmada kullanılmıştır.

Öncelikle iAMKH’lerin uygun bir kaynaktan izolasyonu gerçekleştirilerek, bu hücreler farklılaştırma deneylerinde kullanılmak üzere, DMEM F-12, %10 FBS, 2 mM L-glutamin, 100 µL/mL penisilin-streptomisin içeren besiyerinde, 37°C’de, %5 CO₂, %95 hava, %90 nem içeren hücre kültürü koşullarında pasaj 5’e kadar çoğaltılmıştır. Hücreler doku kültür kabında %80 bolluğa ulaştığında tripsinize edilerek hücre tohumlama çalışmalarında kullanılmıştır.

4.2.7.2 Hücrelerin tohumlanması

Kültürü devam eden insan adipoz mezenkimal kök hücreleri, %80 bolluğa ulaştığında tripsinize edildi. Bu işlemde, kültür kaplarındaki vasat uzaklaştırıldıktan sonra, tripsinin serum tarafından inhibisyonunu engellemek için kültür kabı 5 mL steril PBS ile yıkandı. Kültür kaplarına 5 mL %0,05 Tripsin-0,53 mM EDTA eklenerek 2-3 dakika inkübe edildi. Hücrelerin kültür kabının yüzeyinden kalkması sağlandı. Tripsinin inhibe edilmesi için, hücre süspansiyonu kültür kabından alınarak içerisinde 2 mL serum bulunan tüpe aktarıldı. Hücre süspansiyonu 1500 devir/dakika hızda 5 dakika süre ile santrifüj edildi. Santrifüj sonunda süpernatant uzaklaştırıldı. Pellet üzerine tam vasat eklenerek pipetleme yapıldı ve hücre süspansiyonu elde edildi. 24 kuyucuklu kültür kaplarında yarım saat boyunca UV ile (254 nm) sterilize edilen miyokardiyal matriks yapısı üzerine, hücreler ~ 100.000 hücre/cm² olacak şekilde tohumlandı.

4.2.7.3 Hücrelerin çoğalma kapasitesinin belirlenmesi

Elde edilen miyokardiyal matriks üzerine tohumlanan hücrelerin canlılıkları ve çoğalma kapasitesi, belirlenen zaman noktalarında (3., 7., 14. ve 21. gün) MTT kiti (Sigma) ile tespit edildi. Tüm zaman noktalarında üçer örnek ile çalışıldı.

24 kuyucuklu kültür kabındaki örnekler yeni bir kültür kabına alındı. Örnekler steril PBS ile yıkandı. Her kuyucuğa 270 µL serumsuz vasat ve 30 µL MTT çözeltisi eklendi. Örnekler 37°C’de, %5 CO₂, %95 hava, %90 nem içeren hücre kültürü ortamında 4 saat inkübe edildi. Bu sürenin sonunda vasat uzaklaştırıldı. Her kuyucuğa 300 µL MTT çözücüsü eklenerek oluşan formazan kristallerinin çözülmesi sağlandı. Kolorimetrik ölçüm 570 nm dalga boyunda, UV çoklu plaka okuyucu (Biotrak II, Amersham Biosciences, ABD) cihazında alındı. Kontrol olarak hücre kültür kaplarına aynı miktarda tohumlanan iAMKH’in, aynı zaman noktalarında MTT testi ile canlılık oranları belirlendi.

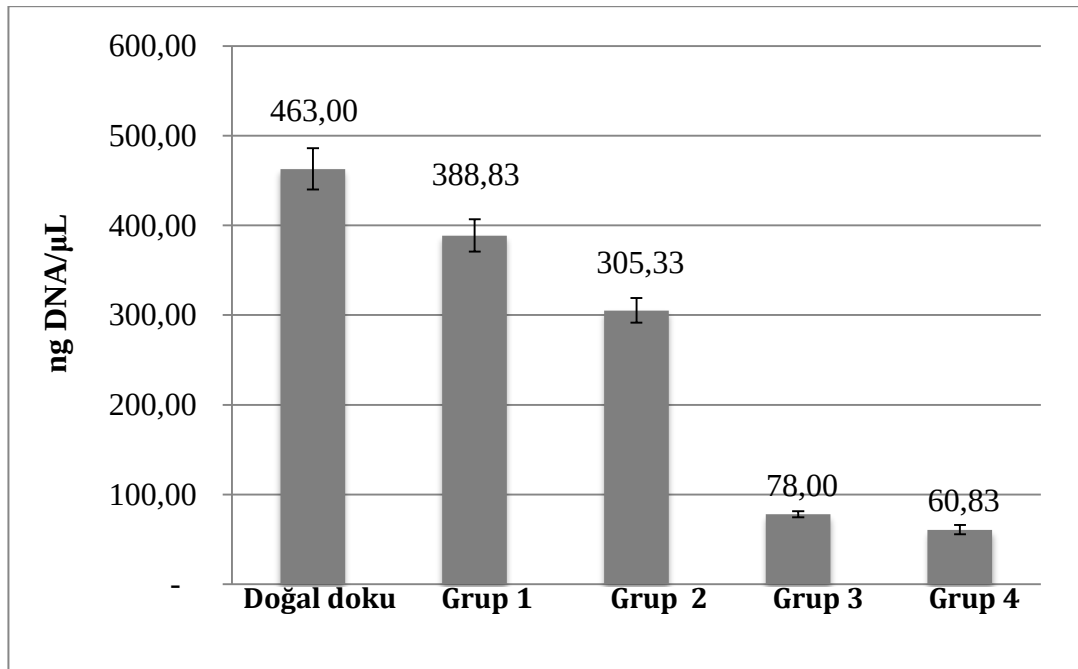
4.2.7.4 Histokimya çalışmaları

Önceden belirlenen zaman noktalarında (3., 7., 14. ve 21. gün) alınan örnekler %2,5’luk gluteraldehit içerisinde sabitlendi. Örnekler önce sabitleyiciyi uzaklaştırmak için 3 kez 10 dk saf su ile yıkandı. Ardından 0,2 M’lık fosfat tamponu (pH 7,4) ile 20 dk yıkanan örnekler, dondurma tamponundan geçirildikten sonra kesit alma işlemi için doku dondurucu çözeltisi (tissue freezing medium) içerisine alındı ve kesit alma işlemi gerçekleştirildi. Kesitler, hücre canlılığı ve çoğalmasını gözlemlemek için H&E ile boyandı.

5. BULGULAR

5.1 DNA İçeriği

Doğal doku ve farklı deselülerizasyon protokolleri ile deselülerize edilen dokuların DNA içerikleri karşılaştırıldı. Eşitlik 4.1'e göre hesaplanan DNA içerikleri şu şekildedir; doğal doku; 463 ± 22 ng DNA/ μ L örnek, deselülerize dokular; 1.grup; $388,83 \pm 18$ ng DNA/ μ L örnek, 2. grup; $317,83 \pm 13$ ng DNA/ μ L örnek, 3. grup; $78,00 \pm 3,5$ ng DNA/ μ L örnek ve 4. grup; $60,83 \pm 5$ ng DNA/ μ L örnek olarak bulunmuştur. Bu değerlere göre DNA içeriğinde %85'e varan bir azalma olduğunu gösteren en etkin deselülerizasyon protokolü 4. grup için uygulanan protokol olarak belirlenmiştir.



Şekil 5.1 Doğal doku ve çeşitli yöntemlerle hücresizleştirilmiş dokuların DNA içerikleri

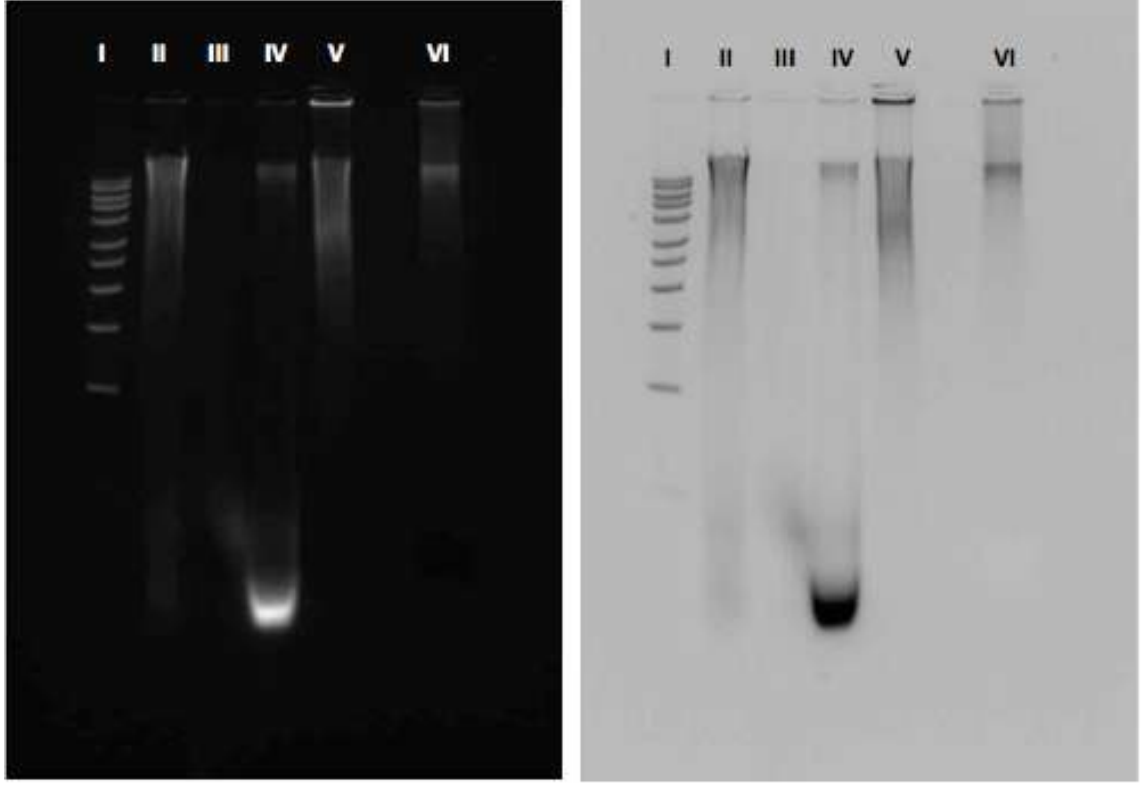
Her bir grubun DNA saflık oranları, 260 nm ve 280 nm dalga boyunda yapılan ölçümlerin oranı hesaplanarak ($OD_{260/280}$) bulunmuştur. Elde edilen sonuçlar, DNA ekstraksiyonu sırasında büyük ölçüde bir kontaminasyon olmadığını göstermektedir.

Çizelge 5.1 Kontrol ve deselülerize örneklerin DNA saflık oranları

Gruplar	$OD_{260/280}$
Kontrol	1,784
1. Grup	1,452
2. Grup	1,673
3. Grup	1,952
4. Grup	1,854

5.2 Agaroz Jel Elektroforezi

Farklı deselülerizasyon protokollerine göre hücresizleştirilmiş örneklerdeki DNA kalıntılarını belirlemek için agaroz jel elektroforezi yapılmıştır. Karşılaştırma yapabilmek için DNA standardı, kontrol olarak doğal kalp dokusu ve 4 farklı yöntemle göre deselülerize edilmiş örnekler kullanılmıştır. Agaroz jel elektroforez görüntülerine göre 1., 2. ve 3. grubun örneklerinin yüklendiği kuyucuklarda (IV, V ve VI) DNA bantları gözlenirken, 4. grubun yüklendiği kuyucukta ise (III. kuyucuk) DNA bandı görülmemiştir. Bundan sonraki aşamalarda bu protokole göre deselülerize edilen k-HDM örnekleri kullanılmıştır.

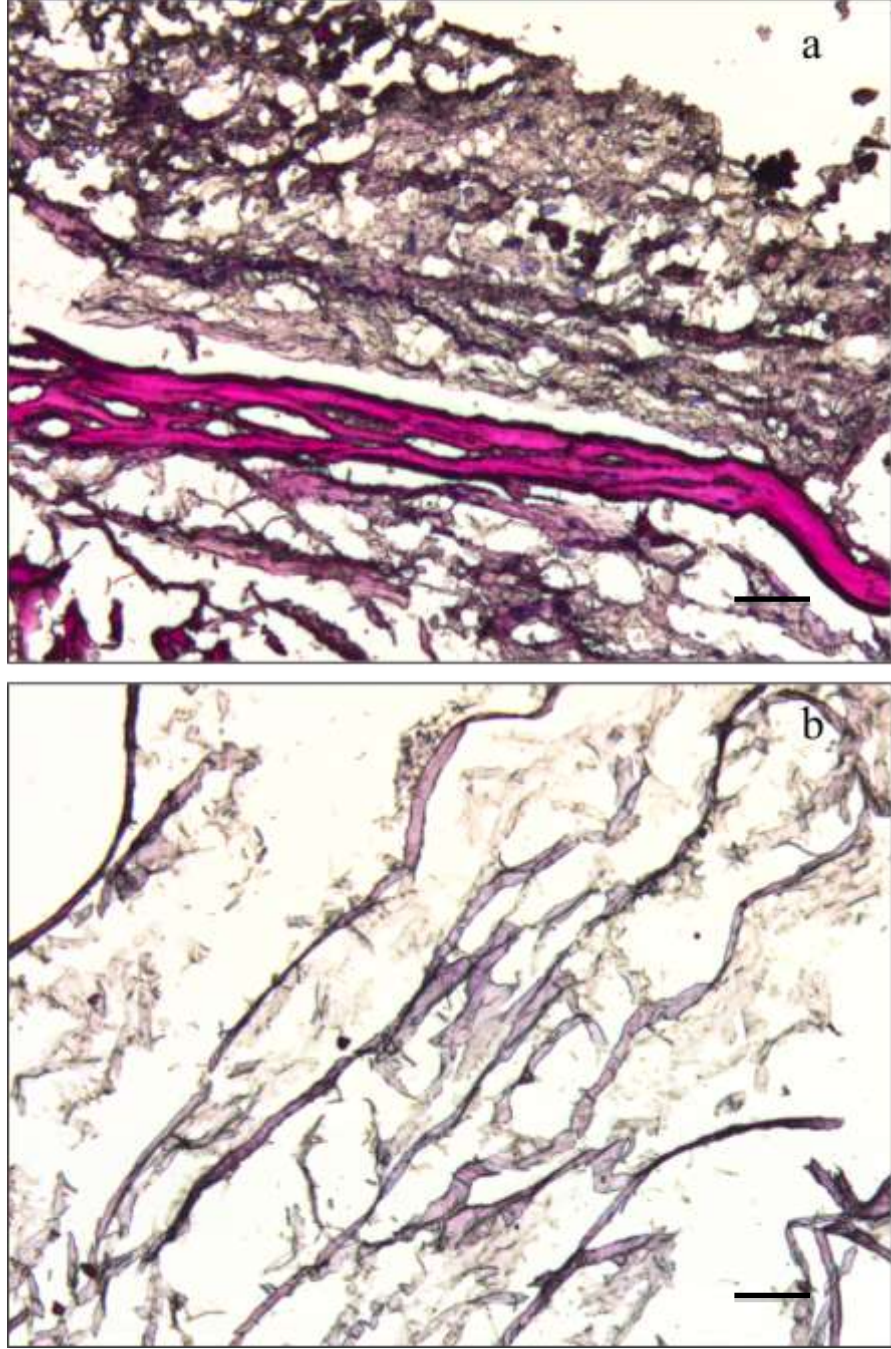


Şekil 5.2 DNA belirteci, doğal kalp dokusu ve 4 yönteme göre deselülerize edilmiş kalp dokularındaki DNA kalıntılarının agaroz jel elektroforez görüntüsü

DNA belirteci (I), doğal doku (II), grup 4 (III), grup 1 (IV), grup 2 (V), grup 3 (VI)

5.3 Histokimya  alışması

Deselülerizasyon işleminin etkinliğini değerlendirmek için kullanılan bir diğer yöntem H&E boyamasıdır.Doğal dokunun ve 4.gruptan alınan k-HDM  rneğinin H&E boyamaları karşılaştırılmıştır. Doğal dokuda gözlenen ve yoğun bir biçimde mavi ile boyanan çekirdek varlığı geliştirdiğimiz yönteme göre deselülerize edilen k-HDM yapısında gözlenmemiştir.

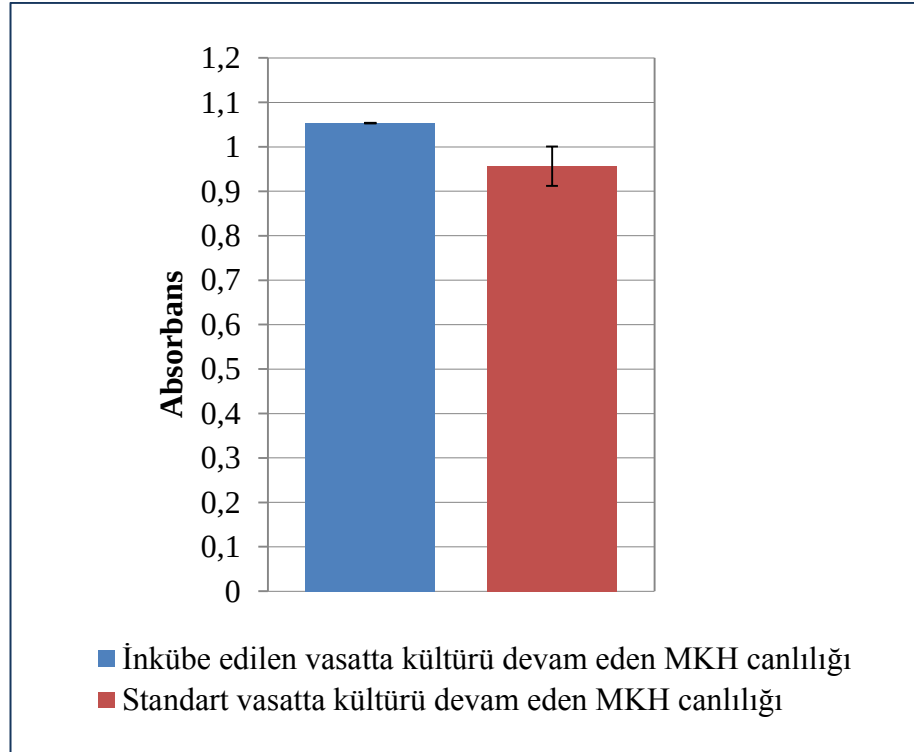


Şekil 5.3.a. Doğal kalp dokusu, b. deselülerize kalp dokusunun H&E boyaması mikroskopik görüntüleri

Boyut çubuğu: 100 μ m

5.4 Kalıntı Deterjan İçeriğinin Belirlenmesi

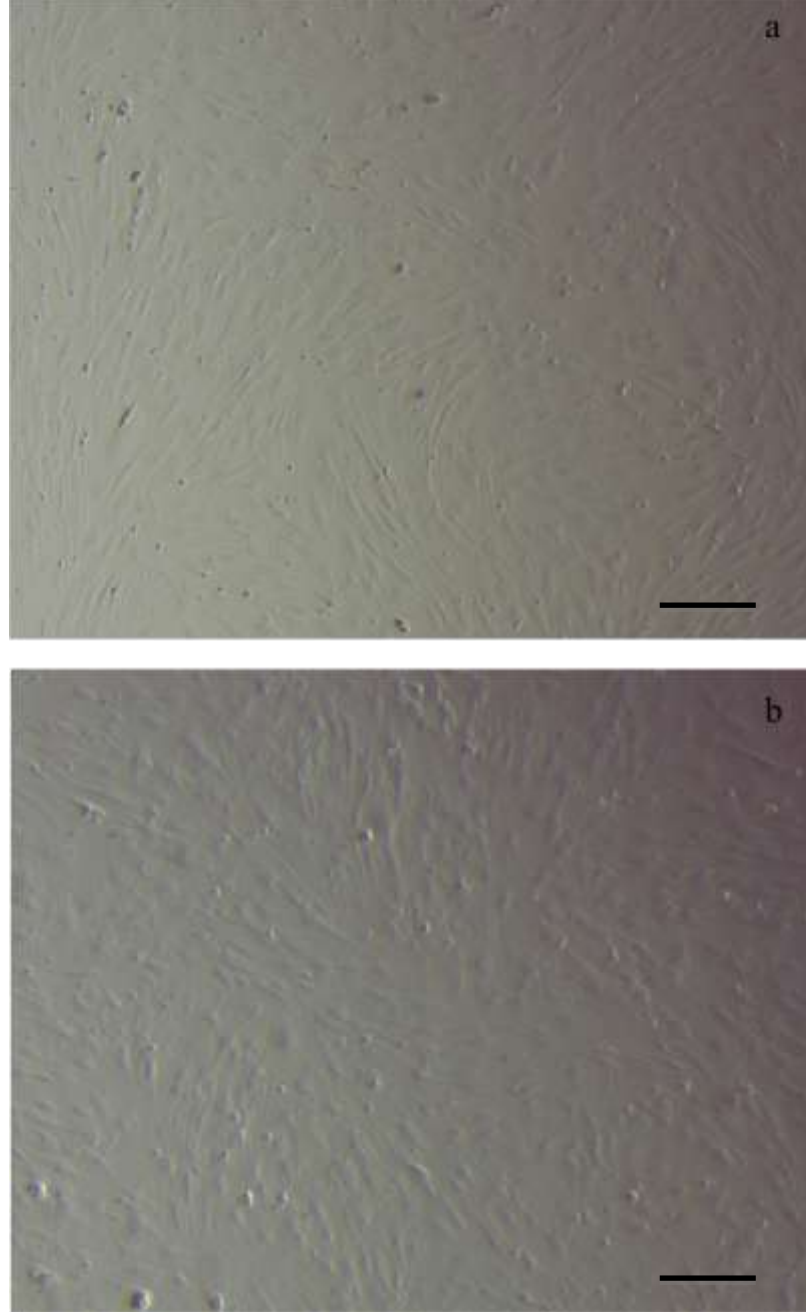
Deselülerize k-HDM parçaları hücre kültüründe kullanılan vasat içerisinde (α -MEM, %10FBS, P-S, L-Glutamin) 3 gün inkübe edildi. İnkübe edilen bu vasat kültürü devam etmekte olan sıçan Kİ-MKH hücreleri için besiyeri olarak kullanıldı.3 gün sonra, kontrol olarak normal besiyeri kullanılan hücrelerin canlılığı ile inkübe edilmiş besi yerinin kullanıldığı hücrelerin canlılıkları MTT testi karşılaştırıldığında bir fark gözlenmedi. Bu veriler, deselülerizasyon sonrası k-HDM içerisinde hücre canlılığını olumsuz yönde etkileyecek düzeyde deterjan kalıntısı olmadığını göstermektedir.



Şekil 5.4 İnkübasyon sonunda elde edilen vasatın ve normal vasatın kullanıldığı hücrelerinMTT testi ile belirlenen canlılık oranları

Her iki vasat içersinde kültüre edilen hücrelerin morfolojik değişimleri invert mikroskobu ile incelenmiştir.Mikroskobik görüntülere bakıldığında, her iki

vasatın kullanıldığı hücrelerin morfolojileri arasında herhangi bir farklılık gözlenmemiştir (Şekil 5.5).

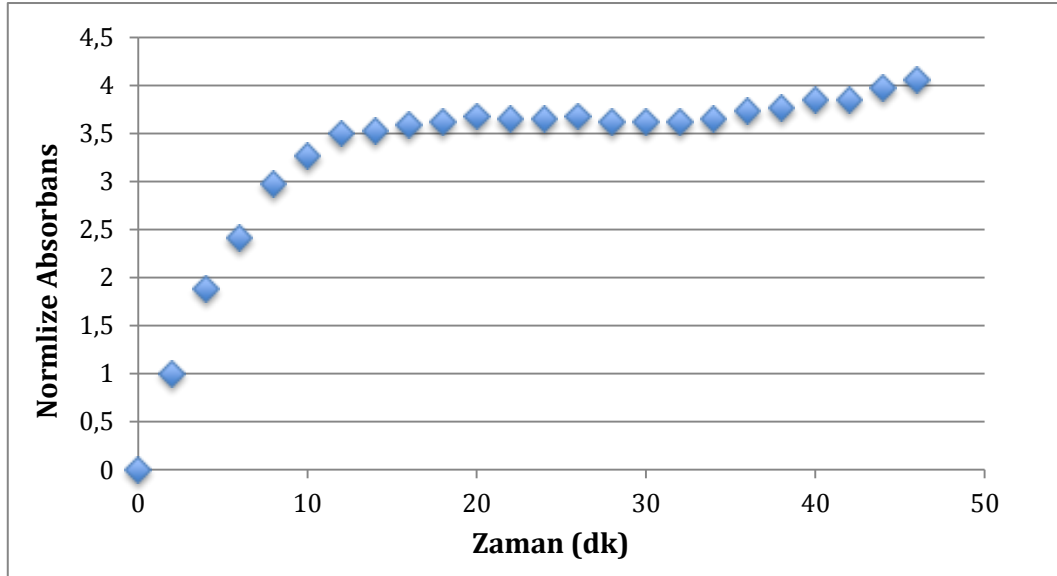


Şekil 5.5.a. İnkübasyon sonunda elde edilen vasatın kullanıldığı ve b. normal vasatın kullanıldığı MKH'lerin invert mikroskop görüntüsü

Boyut çubukları 100 μm

5.5 Türbidimetrik Analiz

Jel oluşum süresince artan bulanıklık miktarından yola çıkılarak türdimetrik ölçüm yapıldı. Partikül yoğunluğuna göre zamanla değişen absorbens değerleri eşitlik 4.2 kullanılarak normalize edilmiş absorbens değerleri elde edildi ve zamana karşı grafiğe geçirildi. Normalize absorbensin, jel oluşum süresince arttığı, ardından belirli bir süre sonra sabit kaldığı gözlenmiştir. Bu sonuçtan yola çıkarak jelleşmenin ilk 10 dk içerisinde gerçekleştiği tespit edilmiştir (Şekil 5.6).



Şekil 5.6 Miyokardiyal matriksin jel oluşum hızını gösteren türbidimetrik kinetik ölçüm grafiği

5.6 Miyokardiyal Matriksin Protein İçeriğinin Belirlenmesi

5.6.1 Miyokardiyal matriksin protein içeriğinin Lowry yöntemi ile tayini

Derişim aralığında 0,1-1,4 μg BSA/mL olarak hazırlanan standartların absorbensları 750 nm dalga boyunda ölçüm yapılarak tayin edildi ve grafiğe geçirildi (Şekil 5.8). Örneğin

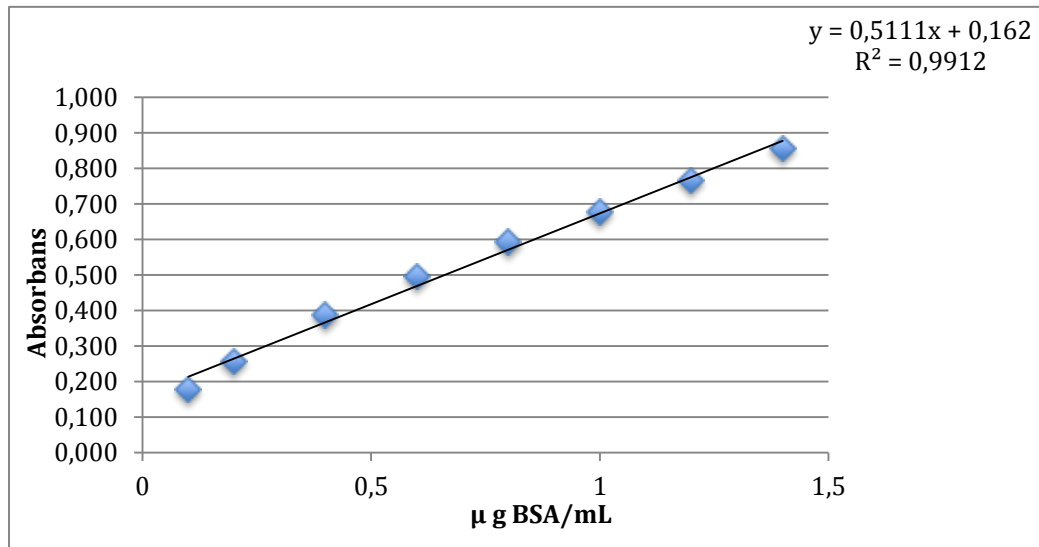
absorbansından yola çıkılarak protein içeriği 0,999 µg BSA/mL olarak hesaplandı. Aynı şekilde doğal dokunun absorbansından yola çıkılarak protein içeriği 1,880 µg BSA/mL olarak bulunmuştur. Miyokardiyal matriksin protein içeriğini %50 oranında koruduğu belirlenmiştir.



Şekil 5.7 Lowry yöntemi için hazırlanan standart çözeltiler

Tüp numarası ile artan BSA konsantrasyonları sırasıyla; 0,1, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1,0, 1,2 ve 1,4 µg BSA/mL

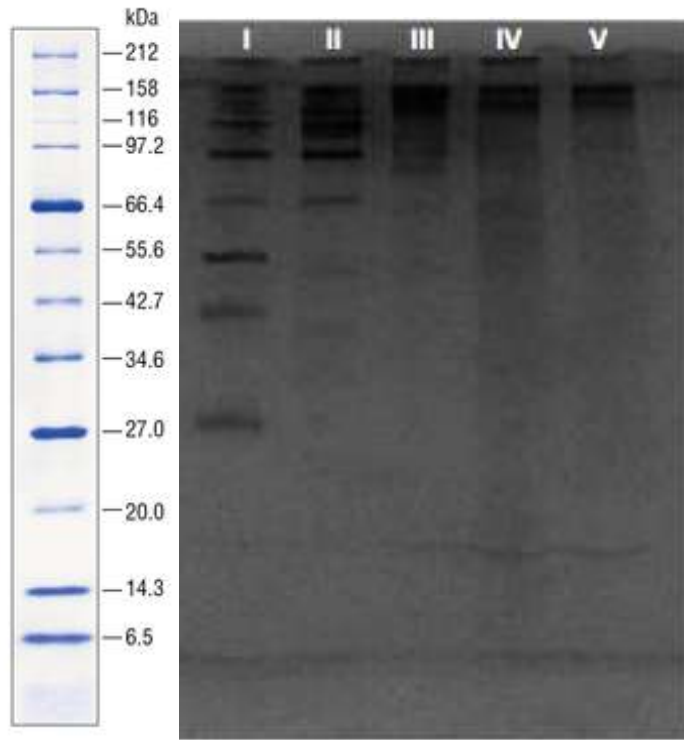
Tüp 1x: miyokardiyal matriks



Şekil 5.8 Lowry yöntemi standart grafiği

5.6.2 Miyokardiyal matriksin protein içeriğinin SDS-PAGE ile belirlenmesi

Enzimatik parçalanmanın ardından elde edilen miyokardiyal matriks yapısının protein içeriğini değerlendirmek için SDS-PAGE yapıldı. Protein standartları, sıçan kuyruk tendonundan izole edilen kollajenve örnek jelde yürütülerek görüntüsü alındı (Şekil 5.9). Örneğin yüklendiği kuyucuklarda, sıçan kuyruk tendonundan izole edilen kollajenin yüklendiği kuyucuktaki bantlara denk gelen bantlar gözlenmiştir. Bu da miyokardiyal matriks yapıdaki kollajen varlığını göstermektedir.

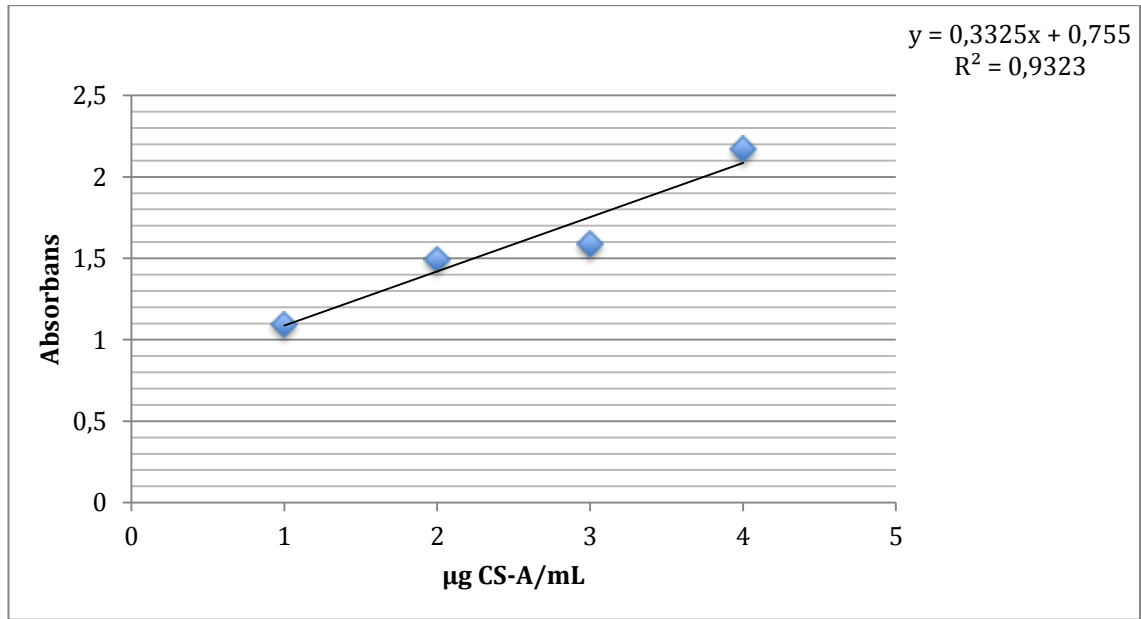


Şekil 5.9 Miyokardiyal matriksin SDS-PAGE görüntüsü

Küçük ölçekte protein belirteci (I), büyük ölçekte protein belirteci (II), sıçan kuyruk tendonundan izole edilen kollajen (III), miyokardiyal matriks (IV-V). Protein belirteci molekül ağırlıkları

5.7 Miyokardiyal Matriksin GAG İçeriğinin Belirlenmesi

Miyokardiyal matriks yapısının GAG içeriği, 1,9 dimetil metilen mavisi deneyi ile tayin edildi. Bilinen CS-A konsantrasyonlarına göre çizilen kalibrasyon grafine göre doğal dokunun GAG içeriği 2,417 µg/mL, miyokardiyal matriksin GAG içeriği 1,983 µg/mL olarak bulunmuştur (Şekil 5.10). Bu sonuçlardan yola çıkarak, miyokardiyal matriksin GAG içeriğini büyük ölçüde koruduğu tespit edilmiştir.



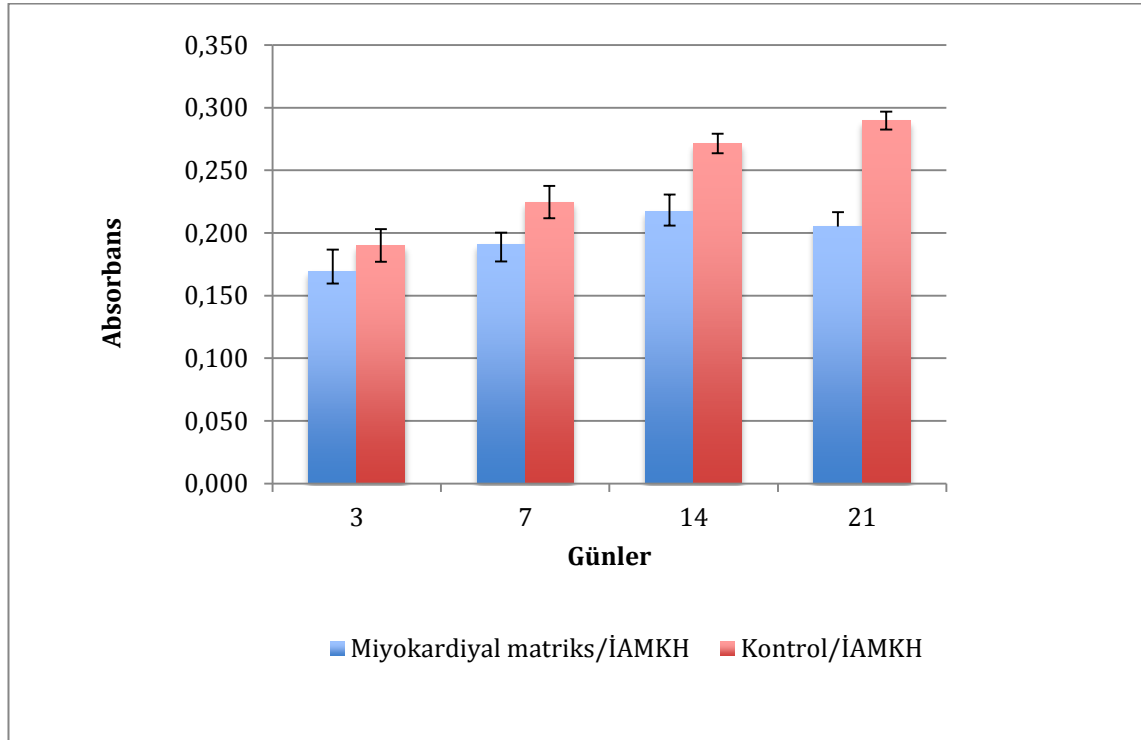
Şekil 5.10 CS-A standartlarına göre hazırlanan kalibrasyon grafiği

5.8 *In Vitro* Çalışmalar

5.8.1 MTT Bulguları

Belirli zaman noktalarında miyokardiyal matriks yapıya tohumlanmış iAMKH'lerin canlılıkları MTT testi ile değerlendirildi. Her zaman noktasında üçer örnek ile çalışılmıştır. MTT reaktifi ile 4 saat inkübe edilen örneklerdeki hücrelerin mitokondriyel aktiviteleri spektrofotometrik ölçümler ile belirlenmiştir.

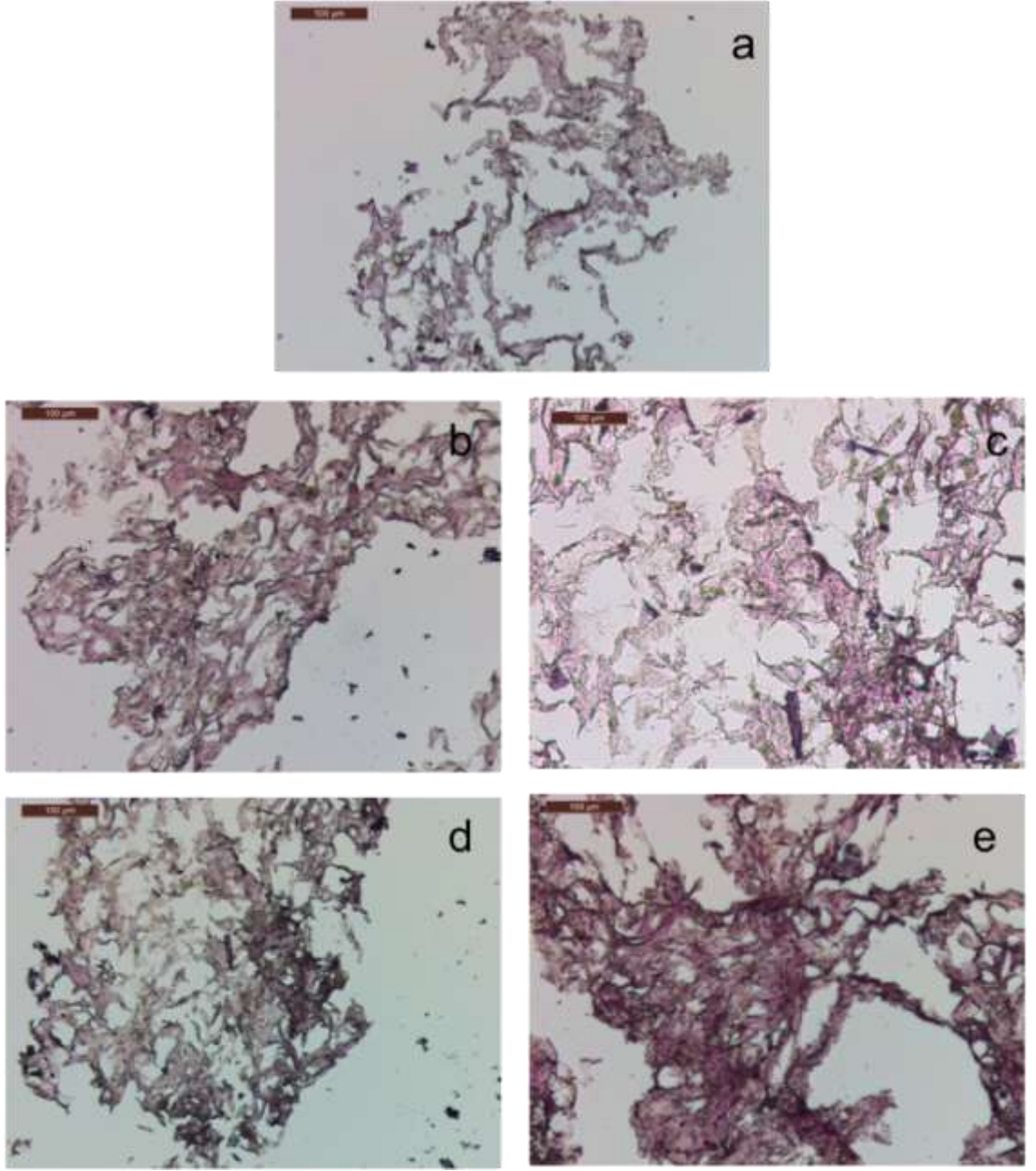
Belirlenen zaman noktalarında, miyokardiyal matriks üzerine tohumlanan iAMKH'lerin MTT testi ile bulunan canlılık oranları ile, kontrol olarak tohumlanan hücrelerin canlılık oranlarının, paralel biçimde olduğu görülmüştür. Elde edilen bu sonuçlar, miyokardiyal matriks yapı üzerine tohumlanan hücrelerindeney süresince çoğaldıklarını ve canlılıklarını devam ettirdiklerini göstermektedir (Şekil 5.11).



Şekil 5.11 Miyokardiyal matriks üzerine tohumlanan iAMKH'lerin belirli zaman noktalarında MTT testi ile belirlenen canlılık oranları

5.8.2 Histokimya çalışmaları

Belirlenen zaman noktalarında gerçekleştirilen H&E boyamaları ile hücre canlılıkları değerlendirilmiştir. Boyamalarda, kontrol olarak seçilen hücre tohumlanmamış miyokardiyal matriks yapının boyanmadığı görülmüştür. iAMKH tohumlanan miyokardiyal matriks yapıda deney süresince hücre yoğunluğunun arttığı görülmüştür (Şekil 5.12). Ayrıca son zaman noktalarındaki artan boyama yoğunluğu hücrelerin kendi HDM'lerini sentezlediklerini göstermektedir.



Şekil 5.12 iAMKH'lerinin tohumlandığı miyokardiyal matriks yapısının kültürün belirlenen zaman noktalarındaki H&E boyama görüntüleri

a. Hüresiz matriks, b. 3. gün, c. 7. gün, d. 14. gün, e. 21. gün

6. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada yeni geliştirilen bir deselülerizasyon yöntemi ile sığır kalp dokusu hücrelerinden arındırılarak, enjekte edilebilir bir biyomalzeme elde edilmiş ve malzemenin karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen malzemenin *in vitro* koşullarda kök hücreler ile etkileşimleri incelenmiştir.

Çalışmada öncelikle sığır kalp dokusu, geliştirmiş olduğumuz yöntem ile hücrelerinden arındırılmıştır. İlk olarak domuz kalp dokusu deselülerizasyonunda yaygın olarak kullanılan çeşitli yöntemler denenmiştir (Ott vd. 2007, Wainwright vd. 2010, Castro Brás vd. 2013). Bu yöntemler kullanılarak elde edilen deselülerize dokuların DNA içeriklerine bakıldığında, hücrelerin uzaklaştırılmasında bu yöntemlerin yetersiz kaldığı görülmüştür. Bu nedenle kullanılan yöntemlere alternatif olarak bu çalışmada geliştirdiğimiz, SDS ve PAA/EtOH çözeltilerinin kullanıldığı deselülerizasyon yöntemi denenmiştir. Yöntemin etkinliğini değerlendirmek amacı ile öncelikle DNA içeriğine bakılmıştır. Bu tez çalışmasında geliştirdiğimiz yöntemin kullanıldığı kalp dokusunun DNA içeriğinde %85'e varan bir azalma gözlenmiştir. 260 nm ve 280 nm dalga boyunda yapılan spektrofotometrik ölçüm oranlarının ~1,8 civarında bulunması, DNA ekstraksiyonu aşamasının başarılı bir şekilde gerçekleştiği ve büyük ölçüde bir kontaminasyon olmadığını göstermektedir.

Deselülerizasyon işleminin başarısını değerlendirmek için ayrıca agaroz jel elektroforezi uygulanmıştır. Standart, doğal doku ve 4 farklı yöntemle hücrelerinden arındırılan deselülerize örneklerin yüklendiği kuyucuklardaki DNA bantları karşılaştırıldığında (Şekil 5.2) geliştirdiğimiz yöntemle göre hücresizleştirilen örnekte, belirgin bir DNA bandına rastlanmamıştır. Bu sonuçlardan yola çıkarak, hücresizleştirmenin 4. yöntem ile başarılı bir şekilde gerçekleştirildiğini söyleyebiliriz.

Hücresizliğin kontrolü hematoksilin-eozin boyaması ile de doğrulanmıştır. Doğal kalp dokusu ve geliştirdiğimiz yöntemle hücresizleştirilmiş kalp dokusu H&E boyamasının ardından karşılaştırılmıştır. İşlem görmemiş kalp dokusunda hücre çekirdeğinin mavi-

siyah renkte boyandığı görülmüştür (Şekil 5.3). Deselülerizasyon sonrası boyamalarda ise mavi-siyah renkte karakterize edilen hücre çekirdeğine rastlanmamıştır.

DNA içeriği, agaroz jel elektroforez ve hematoksilin-eozin boyama sonuçları, geliştirdiğimiz deselülerizasyon yöntemi ile kalp dokusunun büyük ölçüde hücrelerinden arındırıldığını göstermektedir.

Deselülerizasyon sonrasında elde edilen matriks yapıda deterjan kalıntılarının hücre üzerindeki olası toksik etkisini değerlendirmek için hücre canlılığına bakılmıştır. Elde edilen deselülerize matriks yapı tam vasat içerisinde, 37°C'de, %5 CO₂, %95 hava, %90 nem içeren hücre kültürü koşullarında inkübe edilmiştir. Bu sürede varsa kalan deterjan kalıntılarının besiyeri yerine geçeceği düşünülmüştür. Kültürü devam eden Kİ-MKH'in, inkübe edilen vasat ve normal vasat kullanıldığında canlılıkları, MTT testinde elde edilen absorbans değerleri karşılaştırılmıştır. Her iki vasatın kullanıldığı hücrelerin canlılığında bir değişim gözlenmemiştir (Şekil 5.4). Ayrıca her iki vasatın uygulandığı hücrelerin morfolojilerinde bir değişim olup olmadığı mikroskop yardımıyla incelenmiş ve invert mikroskop görüntülerine bakıldığında hücre morfolojileri arasında bir fark olmadığı görülmüştür (Şekil 5.5). Bu sonuçlardan yola çıkarak deselülerizasyon sonrasında elde edilen matriks yapıdan deterjanın büyük ölçüde uzaklaştırıldığı görülmüştür.

In vitro çalışmalarda kullanmak için deselülerize matriks yapının enjekte edilebilir formu elde edilmiştir (Singelyn vd. 2009, Naraghi vd. 2010, Duan vd. 2011, Seif-Naraghi vd. 2012). Öncelikle deselülerize matriks yapı pepsin enzimi yardımı ile asidik ortamda ve oda sıcaklığında parçalanarak viskoz bir sıvı elde edilmiş, ardından bu viskoz sıvının 37°C'de inkübasyonu ile enjekte edilebilir miyokardiyal matriks yapı oluşturulmuştur.

Miyokardiyal matriks yapının jel oluşum hızını tayin etmek için türbidimetrik analiz yapılmış ve eşitlik 4.2 kullanılarak normalize absorbans değerleri hesaplanmıştır. Elde edilen kinetik grafiğine bakıldığında bulanıklığın ilk 10 dk içerisinde arttığı, yani jel oluşumunun ilk 10 dakikada gerçekleştiği görülmüştür (Şekil 5.6). Yapılan çalışmalarla

kıyaslandığında (Singelyn vd. 2009, Naraghi vd. 2010, Duan vd. 2011, Seif-Naraghi vd. 2012), elde edilen miyokardiyal matriksin çok daha kısa süre içinde jel oluşturduğu görülmüştür. Jel oluşumunun kısa süre içinde gerçekleşmesinin, *in vivo* deneyler için avantaj sağlayacağı düşünülmektedir.

Hücre tutunması ve çoğalması için HDM proteinlerinin rolü büyüktür. Enzimatik parçalanma sonunda elde edilen miyokardiyal matriks yapının protein içeriğini koruyup korumadığını değerlendirmek için Lowry metodu yardımıyla protein içeriği tayin edilmiştir. İşlenmemiş doku ve miyokardiyal matriksin protein içerikleri karşılaştırıldığında, HDM'nin enzimatik parçalanma ardından protein içeriğini büyük oranda koruduğu görülmektedir (Şekil 5.8).

Protein içeriğini değerlendirmek için ayrıca SDS-PAGE deneyleri yapılmıştır. Protein belirteci, sıçan kuyruk tendonunda izole edilen kollejen ve miyokardiyal matriksin yüklendiği jel görüntüleri çekilmiştir. Alınan jel görüntülerinde örneğin yüklendiği kuyucuklarda, sıçan kuyruk tendonundan izole edilen kollajene denk bantlar gözlenmiştir (Şekil 5.9). Bu sonuçlardan yola çıkarak, enzimatik parçalanmanın ardından miyokardiyal matriks yapıda kollajen varlığı belirlenmiştir.

Hücrenin tutunması, çoğalması ve canlılığını devam ettirebilmesi için önemli HDM bileşenlerinden birisi de glikozaminoglikanlardır. Miyokardiyal matriks yapısındaki ve doğal kalp dokusundaki GAG içeriği, 1,9-dimetil metilen mavisi testi ile belirlenmiştir. Sonuçlara göre HDM'nin enzimatik parçalanmasının ardından elde edilen enjekte edilebilir miyokardiyal matriks yapının GAG içeriğini %60 oranında koruduğu belirlenmiştir (Şekil 5.10). Busonuçlar da, yapının hücre tutunması, canlılığı ve çoğalması için uygun bir mikroçevre sağladığını göstermektedir.

In vitro çalışmalarda, elde edilen miyokardiyal matriks yapı üzerine tohumlanan hücrelerin, belirlenen zaman noktalarında canlılıkları değerlendirilmiştir. Miyokardiyal matriks yapısı ile insan adipoz mezenkimal hücreleri etkileştirilmiş ve belirli zaman noktalarında hücre canlılığı, dehidrogenaz aktivitesi ile takip edilmiştir. MTT

sonuçlarında, miyokardiyal matriks yapıya tohumlanan hücrelerin, kontrol grubu ile paralel olarak çoğaldıkları ve canlılıklarını sürdürdükleri görülmektedir (Şekil 5.11).

Miyokardiyal matriks üzerine tohumlanan iAMKH'lerin canlılığı, histokimya çalışması ile değerlendirilmiştir. Belirlenen zaman noktalarında gerçekleştirilen H&E boyamasında, hücre tohumlanmayan miyokardiyal matrikste hücre çekirdeği boyaması görülmezken, iAMKH'lerin tohumlandığı miyokardiyal matriks yapısının, zaman noktaları ile doğru orantılı olarak çekirdek ve sitoplazma boyama yoğunluğunun arttığı görülmüştür. Ayrıca son zaman noktalarında görülen yoğun sitoplazma boyaması, hücrelerin kendi HDM'lerini sentezlediklerini göstermektedir (Şekil 5.12). Çekirdek boyamasının artması iAMKH'lerin miyokardiyal matriks yapısı üzerinde tutunup çoğaldıklarını göstermektedir.

Elde edilen bu verilere göre;

- 1- Zengin matriks yapısı ve doğal kaynaklardan kolayca izole edilebilmesi nedeniyle, biyomalzeme üretiminde, sığır kalp dokusu kaynak olarak belirlenmiştir.
- 2- Deselülerizasyonu için literatürde de kullanılan çeşitli protokoller uygulanmıştır. Etkin hücresizleştirmenin geliştirdiğimiz protokol ile sağlandığı görülmüştür.
- 3- Enzimatik parçalanma ile elde edilen miyokardiyal matriks yapının protein içeriği ve HDM bileşenlerini koruduğu ve hücrelerin canlılıklarını sürdürebilecekleri bir ortam sağladığı belirlenmiştir.

KAYNAKLAR

- Abdin, G.C. 2014. Cardiac tissue engineering: designing innovative approaches combining bioreactor-based technologies and biological strategies. Doctoral Thesis. Politecnico di Torino, Porto Institutional Repository, 151, Italy.
- Aljanabi, S.M. and Martinez, I. 1997. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research*, 25(22) 4692–4693.
- Anonim. 2013. <http://www.tuik.gov.tr/PreHaberBultenleri.do?id=15847>, Erişim Tarihi:10.03.2014.
- Anonymous. 2011. http://www.ihcworld.com/protocols/special_stains/h&e_ellis.htm, Erişim Tarihi: 05.01.2014.
- Anonymous. 2014. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>, Erişim Tarihi: 10.03.2014.
- Arnal-Pastor, M., Chachques' J.C., Monleón Pradas, M. and Vallés-Lluch, A. 2013. Biomaterials for Cardiac Tissue Engineering (Chapter 12). *Regenerative Medicine and Tissue Engineering*, 866, ISBN 978-953-51-1108-5.
- Badylak, S.F., Freytes, D.O. and Gilbert, T.W. 2009. Extracellular matrix as a biological scaffold material: Structure and function. *Acta Biomaterialia* 5, 1–13.
- Barbosa, I., Garcia, S., Barbier-Chassefière, V., Caruelle, J.P., Martelly, I. and Papy-García, D. 2003. Improved and simple micro assay for sulfated glycosaminoglycans quantification in biological extracts and its use in skin and muscle tissue studies. *Glycobiology*, 13(9), 647-53.
- Bell, E. 1991. Tissue Engineering: A Perspective. *Journal of Cellular Biochemistry*, 45, 239-241.
- Castro Brás, L.E., Ramirez, T.A., DeLeon-Pennell, K.Y., Chiao, Y.A., Ma, Y., Dai, Q., Halade, G.V., Hakala, K., Weintraub, S.T. and Lindsey, M.L. 2013. Texas 3-Step decellularization protocol: Looking at the cardiac extracellular matrix. *Journal of Proteomics*, 86, 43-52.
- Chan, B.P. and Leong, K.W. 2008. Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations. *European Spine Journal*, 17(4), 467–479.
- Chen, Z., Harding, S.E., Ali, N.N., Lyon, A.R. and Boccaccini, A.R. 2008. Biomaterials in cardiac tissue engineering: Ten years of research survey. *Materials Science and Engineering*, 59, 1-37.

- Christman, K.L., Vardanian, A.J., Fang, Q., Sievers, R.E., Fok, H.H. and Lee, R.J. 2004. Injectable fibrin scaffold improves cell transplant survival, reduces infarct expansion, and induces neovasculature formation in ischemic myocardium. *Journal of the American College of Cardiology*, 44(3), 654–60.
- Christman, K.L., Fok, H.H., Sievers, R.E., Fang, Q. and Lee, R.J. 2004. Fibrin glue alone and skeletal myoblasts in a fibrin scaffold preserve cardiac function after myocardial infarction. *Tissue Engineering*, 10(3-4), 403–9.
- Choi, Y.S., Dusting, G.J., Stubbs, S., Arunothayaraj, S., Han, X.L., Collas, P., Morrison, W.A. and Dilley, R.J. 2010. Differentiation of human adipose-derived stem cells into beating cardiomyocytes. *J Cell Mol Med.*, 14(4), 878-89.
- Crapo, P.M., Gilbert, T.W. and Badylak, S.F. 2011. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials*, 32, 3233-3243.
- Dai, W., Wold, L.E., Dow, J.S., and Kloner, R.A. 2005. Thickening of the infarcted wall by collagen injection improves left ventricular function in rats: a novel approach to preserve cardiac function after myocardial infarction. *Journal of the American College of Cardiology*, 46(4), 714-9.
- Duan, Y., Liu, Z., O'Neill, J., Wan, L.Q., Freytes, D.O., and Vunjak-Novakovic, G. 2011. Hybrid Gel Composed of Native Heart Matrix and Collagen Induces Cardiac Differentiation of Human Embryonic Stem Cells without Supplemental Growth Factors. *J Cardiovasc Transl Res.*, 4(5), 605-15.
- Elcin, Y.M. 2003. *Tissue Engineering, Stem Cells and Gene Therapies, Advances in Experimental Medicine and Biology Series: 534*, NY and London, Kluwer Academic-Plenum Publishers, 350, ISBN 0-306-47788-2.
- Eisenbarth, E. 2007. *Biomaterials for Tissue Engineering. Advanced Engineering Materials*, 9(12), 1051-60.
- Freytes, D.O., Martin, J., Velankar, S.S., Lee, A.S. and Badylak, S.F. 2008. Preparation and rheological characterization of a gel form of the porcine urinary bladder matrix. *Biomaterials*, 29(11), 1630-7.
- Fujimoto, K.L., Ma, Z., Nelson, D.M., Hashizume, R., Guan, J., Tobita, K. and Wagner, W.R. 2009. Synthesis, characterization and therapeutic efficacy of a biodegradable, thermoresponsive hydrogel designed for application in chronic infarcted myocardium. *Biomaterials*, 30(26), 4357–4368.
- Gálvez-Montón, C., Prat-Vidal, C., Roura, S., Soler-Botija, C. and Bayes-Genis, A. 2013. Cardiac Tissue Engineering and the Bioartificial Heart. *Sociedad Espanola de Cardiologia*, 66(5), 391-9.
- Gilbert, T.W., Sellaro, T.L. and Badylak, S.F. 2006. Decellularization of tissues and organs. *Biomaterials*, 27, 3675–3683.

- Glowacki, J. and Mizuno, S. 2008. Collagen scaffolds for tissue engineering. *Biopolymers*, 89(5), 338-44.
- Guo H.D., Wang H.J., Tan Y.Z. and Wu J.H. 2011. Transplantation of marrow derived cardiac stem cells carried in fibrin improves cardiac function after myocardial infarction. *Tissue Engineering Part A*, 17(1-2), 45-58.
- Holmes, W.J., Borg, K.T. and Covell, W.J. 2005. Structure And Mechanics Of Healing Myocardial Infarcts. *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, 7, 223–53.
- Huang, N.F., Yu, J., Sievers, R., Li, S., and Lee, R.J. 2005. Injectable biopolymers enhance angiogenesis after myocardial infarction. *Tissue Engineering*, 11(11–12), 1860–1866.
- Hyunh, M.B., Morin, C., Carpentier, G., Garcia-Filipe, S., Talhas-Perret, S., Barbier-Chassefière, V., Kuppevelt, T.H., Martelly, I., Albanese, P. and Papy-Garcia, D. 2012. Age-related Changes in Rat Myocardium Involve Altered Capacities of Glycosaminoglycans to Potentiate Growth Factor Functions and Heparan Sulfate-altered Sulfation. *J. Biol. Chem.*, 287, 11363-11373. □
- Joggerst, S. J. and Hatzopoulos A.K. 2009. Stem cell therapy for cardiac repair: benefits and barriers. *Expert Rev. Mol. Med.*, 11(e20).
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-5.
- Landa, N., Miller, L., Feinberg, M.S., Holbova, R., Shachar, M., Freeman, I., Cohen, S. and Leor, J. 2008. Effect of injectable alginate implant on cardiac remodeling and function after recent and old infarcts in rat. *Circulation*, 117(11), 1388–1396.
- Langer, R. and Tirrell, D.A. 2004. Designing materials for biology and medicine. *Nature*, 428(6982), 487-92.
- Lanza, R., Langer, R. and Vacanti, J. 2007. *Principles of Tissue Engineering* (Third Edition), Academic Press, 1344.
- Leor, J., Amsalem, Y. and Cohen, S. 2005. Cells, scaffolds, and molecules for myocardial tissue engineering. *Pharmacology & Therapeutics*, 105(2), 151–163.
- Lonn, E. and McKelvie, R. 2000. Drug treatment in heart failure. *BMJ*, 320, 1188-1192.
- Lu, W.N., Lu, S.H., Wang, H.B., Li, D.X., Duan, C.M., Liu, Z.Q., Hao, T., He, W.J., Xu, B., Fu, Q., Song, Y.C., Xie, X.H. and Wang, C.Y. 2009. Functional improvement of infarcted heart by co-injection of embryonic stem cells with temperature-responsive chitosan hydrogel. *Tissue Engineering: Part A*, 15, 1437–1447.

- Matsuura, K., Masuda, S. and Shimizu, T. 2013. Cell Sheet-Based Cardiac Tissue Engineering. *The Anatomical Record*, 297, 65–72.
- McCarthy, P. M., Schmitt, S. K., Vargo, R. L., Gordon, S., Keys, T.F., Hobbs, R.”E. 1996. Implantable LVAD infections: Implications for permanent use of the device. *Annals of Thoracic Surgery* 61, 359-365.
- Medberry, C.J., Crapo, P.M., Siu, B.F., Carruthers, C.A., Wolf, M.T., Nagarkar, S.P., Agrawal, V., Jones, K.E., Kelly, J., Johnson, S.A., Velankar, S.S., Watkins, S.C., Modo, M. and Badylak, S.F. 2013. Hydrogels derived from central nervous system extracellular matrix. *Biomaterials*, 34, 1033-1040.
- Miyahara, Y., Nagaya, N., Kataoka, M., Yanagawa, B., Tanaka, K., Hao, H., Ishino, K., Ishida, H., Shimizu, T., Kangawa, K., Sano, S., Okano, T., Kitamura. S. and Mori, H. 2006. Monolayered mesenchymal stem cells repair scarred myocardium after myocardial infarction. *Nature Medicine*, 12(4), 459-65.
- Müller-Ehmsen, J., Peterson, K.L., Kedes, L., Whittaker, P., Dow, J.S., Long, T.I., Laird, P.W. and Kloner, R.A. 2002a. Rebuilding a damaged heart: long-term survival of transplanted neonatal rat cardiomyocytes after myocardial infarction and effect on cardiac function. *Circulation*, 105(14), 1720-6.
- Müller-Ehmsen, J., Whittaker, P., Kloner, R.A., Dow, J.S., Sakoda, T. and Long, T.I. 2002b. Survival and development of neonatal rat cardiomyocytes transplanted into adult myocardium. *J. Molec. Cell. Cardiol.*, 34, 107-116.
- Vunjak-Novakovic, G., Tandon, N., Godier, A., Maidhof, R., Marsano, A., Martens, P.,T. and Radisic, M. 2010. Challenges in Cardiac Tissue Engineering. *Tissue Engineering: Part B*, 16(2), 169-187.
- Ott, H.C., Matthiesen, T.S., Goh, S.K., Black, L.D., Kren, S.M., Netoff, T.I. and Taylor, D.A. 2007. Perfusion-decellularized matrix: using nature’s platform to engineer a bioartificial heart. *Nature Medicine*, 14(2), 213-21.
- Pfeffer, M.A. and Braunwald, E. 1990. Ventricular Remodeling After Myocardial Infarction. *American Heart Association*, 81, 1161-1172.
- Prabhakaran, M.P., Venugopal, J., Kai, D. and Ramakrishna, S. 2011. Biomimetic material strategies for cardiac tissue engineering. *Materials Science and Engineering: C*, 31(3), 503–513.
- Qian, Q., Qian, H., Zhang, X., Zhu, W., Yan, Y., Ye, S., Peng, X., Li, W., Xu, Z., Sun, L. and Xu, W. 2012. 5-Azacytidine induces cardiac differentiation of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells by activating extracellular regulated kinase. *Stem Cells Dev.*, 21(1), 67-75.
- Radisic, M. and Sefton, M.V. 2011. Cardiac Tissue (Chapter 48). *Principles of Regenerative Medicine (Second Edition)*, Academic Press, 1202, ISBN: 978-0-12-381422-7.

- Reinecke, H., Zhang, M., Bartosek, T. and Murry, C.E. 1999. Survival, integration, and differentiation of cardiomyocyte grafts: a study in normal and injured rat hearts. *Circulation*, 100(2), 193-202.
- Ruvinov, E., Leor, J. and Cohen, S. 2011. The promotion of myocardial repair by the sequential delivery of IGF-1 and HGF from an injectable alginate biomaterial in a model of acute myocardial infarction. *Biomaterials*, 32(2), 565-78.
- Seif-Naraghi, S.B. and Christman, K.L. 2013. *Tissue Engineering and the Role of Biomaterial Scaffolds - The Evolution of Cardiac Tissue Engineering. Resident Stem Cells and Regenerative Therapy*. Academic Press, 251, 43-62, ISBN 978-0-12-416012-5.
- Seif-Naraghi, S.B., Salvatore, M.A., Schup-Magoffin, P.J., Hu, D.P. and Christman, K.L. 2010. Design and characterization of an injectable pericardial matrix gel: potentially autologous scaffold for cardiac tissue engineering. *Tissue Engineering: Part A*, 16(6), 2017–2027.
- Seif-Naraghi, S.B., Horn, D., Schup-Magoffin, P.J. and Christman, K.L. 2012. Injectable extracellular matrix derived hydrogel provides a platform for enhanced retention and delivery of a heparin-binding growth factor. *Acta Biomater.*, 8(10), 3695-703.
- Sekiya, S., Shimizu, T., Yamato, M., Kikuchi, A. and Okano, T. 2006. Bioengineered cardiac cell sheet grafts have intrinsic angiogenic potential. *Biochem Biophys Res Commun*, 341(2), 573-82.
- Singelyn, J.M. and Christman, K.L. 2010. Injectable Materials for the Treatment of Myocardial Infarction and Heart Failure: The Promise of Decellularized Matrices. *J Cardiovasc Transl Res.*, 3(5), 478-86.
- Singelyn, J.M., DeQuach, J.A., Seif-Naraghi, S.B., Littlefield, R.B., Schup-Magoffin, P.J. and Christman, K.L. 2009. Naturally derived myocardial matrix as an injectable scaffold for cardiac tissue engineering. *Biomaterials*, 30(29), 5409–5416.
- Stehlik, J., Edwards, L.B., Kucheryavaya, A.Y., Benden, C., Christie, J.D., Dobbels, F., Kirk, R., Rahmel, A.O. and Hertz, M.I. 2011. The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Twenty-eighth Adult Heart Transplant Report—2011. *The Journal of Heart and Lung Transplantation*, 30(10), 1078-1094.
- Wainwright, J.M., Czajka, C.A., Patel, U.B., Freytes, D.O., Tobita, K., Gilbert, T.W. and Badylak, S.F. 2010. Preparation of Cardiac Extracellular Matrix from an Intact Porcine Heart. *Tissue Eng Part C Methods*, 16(3), 525-32.
- Wang, H. and Guan, J. 2010. Cellular cardiomyoplasty and cardiac tissue engineering for myocardial therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62, 784–797.

- Wang, T., Wu, D.Q., Jiang, X.J., Zhang, X.Z., Li, X.Y., Zhang, J.F., Zheng, Z.B., Zhuo, R., Jiang, H. and Huang, C. 2009. Novel thermosensitive hydrogel injection inhibits post-infarct ventricle remodelling. *European Journal of Heart Failure*, 11(1), 14–19.
- Wolf, M.T., Daly, K.A., Brennan-Pierce, E.P., Johnson, S.A., Carruthers, C.A., D'Amore, A., Nagarkar, S.P., Velankar, S.S. and Badylak, S.F. 2012. A hydrogel derived from decellularized dermal extracellular matrix. *Biomaterials*, 33(29), 7028-38.
- Yang, S., Leong, K., Du, Z. and Chua, C. 2001. The Design of Scaffolds for Use in Tissue Engineering. Part I. Traditional Factors. *Tissue Engineering*, 7(6), 679-89.
- Yung, S. and Chan, T.M. 2007. Glycosaminoglycans and proteoglycans: overlooked entities?. *Perit Dial Int.*, 27, 104-9.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Hatice ERCAN

Doğum Yeri : Ankara

Doğum Tarihi : 03.11.1985

Medeni Hali : Bekar

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Süleyman Demirel Anadolu Lisesi (2003)

Lisans : Gazi Üniversitesi, Kimya Eğitimi (2004-2009)

Yüksek Lisans : Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı (Eylül 2011- Temmuz 2014)