

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KARDİYOMİYOJENİK FARKLILAŞMA FAKTÖRLERİ, VEGF VE
DESELÜLARİZE KALP MATRİKSİNİN MEZENKİMAL KÖK
HÜCRELERİN FARKLILAŞMASINA NOTCH/HEDGEHOG SİNYAL
YOLAKLARI ÜZERİNDEN OLAN ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Kamil Can KILIÇ

Kocaeli Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin
Kök Hücre ve Doku Yenilenmesi Programı için Öngördüğü
BİLİM UZMANLIĞI TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır.

KOCAELİ
2018

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KARDİYOMİYOJENİK FARKLILAŞMA FAKTÖRLERİ, VEGF VE
DESELÜLARİZE KALP MATRİKSİNİN MEZENKİMAL KÖK
HÜCRELERİN FARKLILAŞMASINA NOTCH/HEDGEHOG SİNYAL
YOLAKLARI ÜZERİNDEN OLAN ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Kamil Can KILIÇ

Kocaeli Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin
Kök Hücre ve Doku Yenilenmesi Programı için Öngördüğü
BİLİM UZMANLIĞI TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır.

Danışman: Doç. Dr. Yusufhan YAZIR

KOCAELİ
2018

T.C.
KOCAELI ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
(Tez Onay Sayfası)


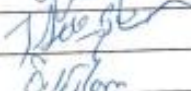
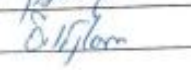
Tez adı: Kolesterolün genetik farklılaşma faktörleri, vücut ve dış ortamlara bağlı matrisin Nöbet/Herpes virüsü yatakları ile ilişkili olarak matrisin kök hücrelerin farklılaşmasında denetiminin incelenmesi

Tez yazarı: Kerem Can KILG

Tez savunma tarihi: 09/06/2018

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Yusufhan YAZIR

İş bu çalışma Jürimiz tarafından K.K. KILG Anabilim
Dalı: Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Sınavı jüri üyeleri		İmzası
Unvanı Adı Soyadı		
Üye Doç. Dr.	Yusufhan YAZIR	
Üye Dr. Öğr. Üyesi	Z. Sedat HALBOTOĞULLARI	
Üye Dr. Öğr. Üyesi	Özlem SAĞLAM DÖĞER	

ONAY

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylıyorum.

09/06/2018

Prof. Dr. Sema Aşkın KEÇELİ
Enstitü Müdürü

ÖZET

Kardiyomiyojenik Farklılaşma Faktörleri, VEGF ve Deselülarize Kalp Matriksinin Mezenkimal Kök Hücrelerin Farklılaşmasına Notch/Hedgehog Sinyal Yolakları Üzerinden Olan Etkilerinin İncelenmesi

AMAÇ: Sunulan tez çalışmasında sıçan kalbinden deselülarizasyon tekniğiyle elde edilen kalp ekstraselüler matriksinin, kardiyomiyojenik uyarımın ve VEGF molekülünün sıçan kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücrelerin farklılaşmasına olan etkilerinin Notch ve Hedgehog sinyal yolaklarındaki değişimler ile incelenmesi amaçlanmıştır.

YÖNTEM: Deterjan uygulaması neticesinde kalp dokusundan hücreler uzaklaştırılarak deselülarize doku ve organları oluşturacak olan mezenkimal kök hücrelerin tutunacağı ve farklılaşma sürecine gireceği kalp ekstraselüler matriksi elde edilmiştir. Deselülarize edilen kalbin ekstraselüler matriksinden hücre ve hücre kalıntıların tamamen arındırıldığı histokimyasal, immünfloresan ve moleküler olarak kanıtlanmıştır. Sıçan kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücreler deselülarize ekstraselüler matriks üzerine ekilmiştir ve matriks üzerinde çoğalmaları sağlanmıştır. Deselülarize ekstraselüler kalp matriksi üzerine ekilen hücreler standart besiyerinde kültüre edilerek, matriks kaynaklı fiziksel uyarım ve bu fiziksel uyarıma ek olarak kardiyomiyojenik farklılaşma eklentilerinin olduğu farklılaşma besiyerinden kaynaklı kimyasal uyarımın kardiyomiyojenik farklılaşma mekanizması üzerindeki etkileri incelenmiştir. Deselülarize yapı iskelesindeki hücrelerin kardiyomiyojenik farklılaşma durumları kardiyomiyosit hücrelerine, Notch ve Hedgehog sinyal yolaklarına özgü belirteçler kullanılarak gen ifadesi düzeyinde Real Time-PCR ile ve protein seviyesinde ise histokimyasal ve immünfloresan boyamalarla tespit edilmiştir. Üç boyutlu deselülarize ekstraselüler matriksten elde edilen veriler, standart ve kardiyomiyojenik farklılaşma besiyerinde iki boyutlu olarak kültüre edilen hücrelerle kıyaslanmıştır. Böylece deselülarize kalp matriksi üzerinde yapılan farklılaşma yönteminin verimliliği incelenmiştir.

BULGULAR: Elde edilen bulgular kalp deselülarizasyonunun etkili ve başarılı bir şekilde gerçekleştirilebildiğini göstermiştir. Kalp ekstraselüler matriksine ekilen hücrelerin canlılıklarını koruyabildiği ve çoğalmaya devam ettikleri gözlemlenmiştir. Üç boyutlu ekstraselüler matriks üzerinde kardiyomiyojenik farklılaşmaya alınan hücrelerin, iki

boyutlu olarak kültüre edilen hücelere kıyasla daha yüksek seviyede gen ifadesini tetiklediği tespit edilmiştir.

SONUÇ: Kalp ekstraselüler matriksinin hcelerinden tamamen arındırıldığı ortaya koyulmuştur. Deselülarize kalp ekstraselüler matriksinin sıçan kemik iliği kökenli mezenkimal kök hcelerle resellarize edilmesi sonrasında, hücelerin matrikse tutunarak canlıklarını korudukları ve çoğalmaya devam ettikleri gösterilmiştir. Ayrıca deselülarize kalp ekstraselüler matriksinden kaynaklanan fiziksel uyarım ve kardiyomiyojenik farklılaşma eklentilerinden kaynaklanan kimyasal uyarım ile miyokard tabakasına benzer bir yapı elde edildiği gözlemlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Deselülarizasyon, Kalp, Ekstraselüler Matriks, Reselülarizasyon, Doku Mühendisliği

ABSTRACT

Investigation of Effects of Cardiomyogenic Differentiation Factors, VEGF and Decellularized Heart Matrix on the Differentiation of Mesenchymal Stem Cells via Notch/Hedgehog Signaling Pathways

OBJECTIVE: In the present thesis study, it was aimed to investigate the effects of heart extracellular matrix obtained by decellularization technique from rat, cardiomyogenic stimulation and VEGF molecule on the differentiation of rat bone marrow derived mesenchymal stem cells with changes in Notch and Hedgehog signaling pathways.

METHOD: At the end of the detergent application, the cells were removed from the heart tissue and a decellularized cardiac extracellular matrix was obtained. In this view, three dimensional scaffold was achieved for the mesenchymal stem cells, which will form the tissues and organs, and which will enter the differentiation process. It was proven that the cells and the cell debris were completely removed from the cardiac extracellular matrix as histochemical, immunofluorescent and molecular experiment. Rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells were seeded and provided to proliferate onto decellularized extracellular matrix. Cells reseeded on a decellularized extracellular heart matrix were cultured in a standard medium to investigate the effects of matrix-induced physical stimulation and cultured with cardiomyogenic differentiation supplements containing medium to observe the effect of chemical stimulation for cardiomyogenic differentiation mechanism. Cardiomyogenic differentiation of cells in the decellularized scaffold was determined by cardiomyocyte cells, Notch and Hedgehog signaling pathways specific markers. This finding was gained by real time PCR at the gene expression level and by histochemical and immunofluorescent staining at the protein level. The data obtained from 3-dimensional decellularized extracellular matrix was compared with the cells cultured in 2-dimensional in standard and cardiomyogenic differentiation medium. Thus, the efficiency of the differentiation method on the decellularized heart matrix has been examined.

RESULTS: Results obtained from investigations have shown that heart decellularization can be performed effectively and successfully. It has been observed that the cells reseeded onto the heart extracellular matrix can maintain their viability and continue to proliferation of their. Cells undergoing cardiomyogenic differentiation onto a 3-dimensional

extracellular matrix were found to induce gene expression at a higher level than cells cultured in 2-dimensional.

CONCLUSIONS: It has been shown that cells of the heart were completely removed from the extracellular matrix. It has been shown that after recellularization of the decellularized cardiac extracellular matrix with rat bone marrow derived mesenchymal stem cells, the cells retained their viability and continued to proliferate. It has also been observed that a similar structure to that of the myocardial layer is obtained by chemical stimulation from cardiomyogenic differentiation supplements and physical stimulation from decellularized cardiac extracellular matrix.

Keywords: Decellularization, Heart, Extracellular Matrix, Resellularization, Tissue Engineering

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince anlayışını hiçbir zaman esirgemeyen, bilgi ve tecrübeleriyle gelişimimde büyük pay sahibi olan bölüm başkanım, danışman hocam sayın **Doç. Dr. Yusufhan YAZIR**'a, anaç tavrı ve güler yüzü ile desteğini ve yardımını sürekli hissettiğim sayın **Dr. Öğr. Üyesi Gülçin GACAR**'a, ilgili ve özverili tavrıyla çalışmama verdiği desteğinden ötürü sayın **Dr. Öğr. Üyesi Gökhan DURUKSU**'ya, bilimsel anlamda gelişimime gösterdiği önem ve yaptığı katkılarından dolayı sayın **Dr. Öğr. Üyesi Zehra Seda HALBUTOĞULLARI**'na teşekkürlerimi sunmaktan mutluluk duyarım.

Tez çalışmam boyunca, birlikte fikir üretip birlikte uyguladığımız ve sonuçlarımızı akademik aleme yine birlikte sunduğumuz kardeşim **Arş. Gör. Ahmet ÖZTÜRK**'e, desteğini ve ilgisini sürekli hissettiğim, kardeşim olarak sevdiğim **Ayşenur KAYA**'ya çok teşekkür ederim.

Laboratuvar hayatımda her zaman birlikte olduğumuz arkadaşlarım **Arş. Gör. Ayşegül BAĞLAR**'a, **Arş. Gör. Büşra ÖNCEL DUMAN**'a, **Uzm. Bio. Gizem TURAC KARAKURT**'a, **Uzm. Gen. Müh. Sema YUSUFOĞLU**'na, **Öğr. Gör. Gülay ERMAN**'a, **Bulut YURTSEVER**'e, **Leyla KAYIŞ**'e, **Selen POLAT**'a, **Gizem USLU**'ya, **Talhmina Hayrunnisa TATAR**'a ve **Alparslan OKCU**'ya katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Lisans eğitimimde hayatıma katıldığı günden beri gece ve gündüz desteğiyle hep yanımda olan, birlikte gülüp birlikte ağladığım, birlikte öğrenip birlikte sorguladığım ve birlikte bir gelecek planladığım sevgili **Arş. Gör. Arzu AYSAN**'a tüm kalbim, sevgim ve içtenliğimle çok teşekkür ederim.

Tüm eğitim hayatımda olduğu gibi, zorlu yüksek lisans eğitimim süresinde de aradaki kilometreleri sifıra indirircesine ihtiyacım olan her an benimle olan, karşılaştığım sıkıntıların üstesinden gelmemde maddi ve manevi olarak bana hep destek çıkan ve verdikleri ahlak, gösterdikleri anlayış, taşıdıkları sevgi ve sağladıkları mutlu bir yaşam ile benim ben olmamda en büyük paya sahip olan **anneme**, **babama** ve **abime** sevgi, saygı ve minnet dolu teşekkürlerimi bir borç bilirim.

TEZİN AŞIRMA OLMADIĞI BİLDİRİSİ

Tezimde başka kaynaklardan yararlanılarak kullanılan, yazı, bilgi, çizim, çizelge ve diğer malzemeler kaynakları gösterilerek verilmiştir. Tezimin herhangi bir yayından kısmen ya da tamamen aşırma olmadığını ve bir intihal programı kullanılarak test edildiğini beyan ederim.



28.05.2018



İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR	viii
TEZİN AŞIRMA OLMADIĞI BİLDİRİSİ.....	ix
İÇİNDEKİLER.....	x
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	xii
ÇİZİMLER DİZİNİ	xiii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xv
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Genel Bilgiler.....	1
1.2. Kök Hücreler.....	2
1.3. Kök Hücrelerin Sınıflandırılması.....	7
1.3.1. Farklılaşma Potansiyellerine Göre Kök Hücre Sınıflandırması.....	8
1.3.2. Elde Edildikleri Yere Göre Kök Hücre Sınıflandırması	13
1.4. Kalp Histolojisi	19
1.4.1. Kalp Dokusunun Ekstrasellüler Matriksi	25
1.5. Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF).....	27
1.5.1. Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF) Tipleri	28
1.5.2. Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü Reseptörü (VEGFR) Tipleri	30
1.6. Doku Mühendisliği	32
1.7. Deselülarizasyon	34
1.8. Notch ve Hedgehog Sinyal Yolakları	39
2. AMAÇ	41
3. YÖNTEM.....	42
3.1. Hücreler ve Kültür Koşulları	42
3.2. Deney Gruplarının Oluşturulması.....	42
3.3. Kalplerin Çıkarılması Ve Deselülarizasyonu.....	43
3.4. Kalp Deselülarizasyonun Etkinliğinin İncelenmesi.....	44
3.4.1. PCR ile DNA İçeriğinin Ölçülmesi.....	44
3.4.2. Histokimyasal ve İmmün Floresan Boyama	45
3.4.3. Kollajen İçeriğinin Biyokimyasal Olarak Belirlenmesi	46
3.5. Reselülarizasyon	47

3.5.1. Kalp Ekstraselüler Matriksinde sKİ-MKH'lerin Canlılığının Değerlendirilmesi	47
3.6. Kalp Ekstraselüler Matriksinde sKİ-MKH'lerin Kardiyomiyositlere Farklılaştırılması	48
3.7. İki boyutlu <i>in vitro</i> Kültür Ortamında sKİ-MKH'lerin Kardiyomiyositlere Farklılaştırılması	48
3.8. Kantitatif Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Gen İfadelerinin Analizi.	49
3.9. Kalp Ekstraselüler Matriksinde sKİ-MKH'lerin Kardiyomiyositlere Farklılaştırılması Sonrasında İmmün Floresan Boyama.....	50
4. BULGULAR	53
4.1. sKİ-MKH'lerin Kültürü ve Çoğaltılması.....	53
4.2. Sıçan Kalbinin Çıkarılması	54
4.3. Desellülarize Edilmiş Kalp Ekstraselüler Matriksinin Karakterizasyonu	54
4.3.1. PCR ile DNA İçeriğinin Ölçülmesi.....	55
4.3.2. Histokimyasal ve İmmün Floresan Boyamalar	56
4.3.3. Kalp Ekstraselüler Matriksindeki Kollajen İçeriğinin Biyokimyasal Olarak Belirlenmesi	57
4.4. Deselülarize Kalp Ekstraselüler Matriksinin Reselülarizasyonu	58
4.5. İki boyutlu <i>in vitro</i> Kültür Ortamında ve Kalp Ekstraselüler Matriksinde sKİ-MKH'lerin Kardiyomiyositlere Farklılaştırılması	59
5. TARTIŞMA.....	65
5.1. Sınırlılıklar	70
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	71
KAYNAKLAR.....	72
ÖZGEÇMİŞ.....	91
EKLER	94

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

2-B: İki Boyutlu

3-B: Üç Boyutlu

CD: Cluster of Differentiation

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol

FBS: Fetal Sığır Serumu

FGF: Fibroblast Büyüme Faktörü

GAG: Glikozaminoglikan

kDa: Kilo Dalton

LIF: Lösemi baskılayıcı faktör

mg: Miligram

MKH: Mezenkimal Kök Hücre

mL: Mililitre

ng: Nanogram

PAA: Perasetik Asit

PBS: Fosfat Salin Tamponu

PCR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu

SDS: Sodyum Dodesil Sülfat

uPKH: Uyarılmış Pluripotent Kök Hücre

VEGF: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü

VEGFR: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü Reseptörü

ÇİZİMLER DİZİNİ

Çizim 1.1. Dokuların embriyonik gelişimi.....	3
Çizim 1.2. Asimetrik ve simetrik kök hücre bölünmesi.....	4
Çizim 1.3. Hücre replikasyon mekanizması.....	5
Çizim 1.4. Telomeraz enziminin çalışma prensibi.....	6
Çizim 1.5. Kök hücrelerin sınıflandırılması.....	7
Çizim 1.6. Embriyogenezin ilk 10 günü.....	9
Çizim 1.7. Kalbin morfolojik yapısı.....	20
Çizim 1.8. Kalbin fibröz iskeleti.....	22
Çizim 1.9. Kalbin impuls iletim sistemi.....	23
Çizim 1.10. Kalbin histolojik katmanları.....	24
Çizim 1.11. VEGF ve VEGFR tipleri.....	27
Çizim 4.1. Rat kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücre kültürü.....	52
Çizim 4.2. Sıçan kalbinin çıkarılması.....	53
Çizim 4.3. Sıçan kalbinin desellülarizasyonu.....	54
Çizim 4.4. Desellülarizasyon süreci neticesinde kalp ekstraselüler matriksinde DNA kalıntısı kalıp kalmadığının jel elektroforezi ile tespit edilmesi.....	55
Çizim 4.5. Normal kalp dokusundan ve desellülarize ekstraselüler kalp matriksinden elde edilen kesitlerde fibronektin boyaması.....	56
Çizim 4.6. Normal kalp ve desellülarize kalp ekstraselüler matriksinden elde edilen kesitlerde pikrosiriyus red boyaması.....	56
Çizim 4.7. Normal kalp matriksi ve desellülarize ekstraselüler kalp matriksi örneklerindeki total kollajen miktarının matriks ağırlığına oranla yüzde olarak tespit edilmesi.....	57
Çizim 4.8. Desellülarize kalp ekstraselüler matriksindeki metabolik olarak aktif olan hücrelerin sayısını belirlemek için yapılan WST-1 çoğalma analizi.....	58
Çizim 4.9. 21. gün sonunda standart ve kardiyomiyojenik farklılaşma besiyerinde kültüre edilen iki boyutlu kültür ortamındaki hücrelerin Con43 boyaması.....	59

Çizim 4.10. 21. gün sonunda standart ve kardiyomiyojenik farklılaşma besiyerinde kültüre edilen iki boyutlu kültür ortamındaki hücrelerin cTN-I boyaması.....	59
Çizim 4.11. 21. gün sonunda standart ve kardiyomiyojenik farklılaşma besiyerinde kültüre edilen kalp ekstraselüler matriksindeki hücrelerin Con43 boyaması.....	60
Çizim 4.12. 21. gün sonunda standart ve kardiyomiyojenik farklılaşma besiyerinde kültüre edilen kalp ekstraselüler matriksindeki hücrelerin cTN-I boyaması.....	60
Çizim 4.13. Notch sinyal yolağına özgü Jagged ve Notch1 belirteçlerinin ifade etme seviyelerinin incelenmesi.....	61
Çizim 4.14. Hedgehog sinyal yolağına özgü SHH, IHH ve Gli2 belirteçlerinin ifade etme seviyelerinin incelenmesi.....	62
Çizim 4.15. Kardiyomiyositlere özgü GATA4 ve Nkx2.5 belirteçlerinin ifade etme seviyelerinin incelenmesi.....	63

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. İnsandan ve fareden izole edilen embriyonik kök hücrelerin özellikleri.....	11
Çizelge 3.1. Deney gruplarının oluşturulması.....	42
Çizelge 3.2. Konvansiyonel PCR bileşenleri ve konsantrasyonları.....	44
Çizelge 3.3. Kantitatif eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılan genler.....	49
Çizelge 3.4. Primer antikor, sekonder antikor ve blok serum listesi.....	51



1. GİRİŞ

1.1. Genel Bilgiler

Sağlık, tarih boyunca insanoğlunun ve diğer canlıların en büyük gereksinimi olmuştur. İnsanoğlu fiziki ve mental güçlerinin büyük bir kısmını hastalık durumunda sağlıklarına kavuşmanın yollarını aramakta kullanmışlardır. Söz konusu arayışlar tıp biliminin giderek gelişmesine ve zaman içinde çeşitli tedavi seçeneklerinin ortaya çıkmasına yol açmıştır. Son zamanlarda tıp biliminin tedavi arayışlarıyla ilgili geldiği konunun odağında ‘kök hücre’ kavramı yer almaktadır.

Kök hücre kavramı tarihte ilk defa bitkilerin büyüme kapasitesine sahip uç kısımlarına verilen isim olarak eski yazıtlarda yer almıştır. Diğer canlı gruplarında da benzer işleve sahip hücreler için de ‘kök hücre’ terimi kullanmak tercih sebebi haline gelmiştir. Yaşam olgusunun temelinde yer alan hücreler, Alman patolog Rudolph Virchow’un 1858 yılında ‘*omnis cellula e cellula*’ yani her hücre başka bir hücreden meydana gelir kuramını öne sürmesinden beri anlam kazanmıştır. Virchow tarafından öne sürülen bu hücre kuramı dahilinde, kök hücreler son yıllarda kazandığı önemle birlikte tıp bilimi açısından gittikçe artan oranda bir çekim merkezi haline gelmiştir.

Kök hücrelerin tıp alanındaki araştırmacılar, doktorlar ve hastalar için bu kadar önemli olmasının sebebi sahip oldukları neredeyse organizmanın hayatı boyunca bölünebilme, kendini yenileyebilme ve fizyolojik homeostaz için hasarlı dokularda meydana gelen hücre ya da doku açığına kapatmak amacıyla farklılaşma gibi özelliklerinden ileri gelmektedir. Kök hücreler barındırdıkları bu yenileyici (rejeneratif) ve onarıcı (reperatif) özellikleri sayesinde diğer hücre tiplerinden ayrılan ve canlılığın anahtarı olarak düşünülen hücrelerdir.

Dünya genelinde akut ve kronik kardiyovasküler hastalıklar oldukça yaygın olarak görülmektedir. Öyle ki kardiyovasküler hastalıklara bağlı ölümler ilk sırada yer almaktadır. Söz konusu bu hastalıklar için farmakolojik, elektrofizyolojik ve cerrahi girişimler başlıca tedavi seçenekleridir. Son evre kalp yetmezliği olan hastalarda ise en iyi tedavi seçeneği allojenik (farklı bireyler arası) kalp nakli olarak görülmektedir. Ancak kalp nakillerinde donör kısıtlılığı, immün baskılama gerekliliği ve yüksek tedavi masrafları nakil için en büyük sınırlayıcı faktörlerdendir. T.C. Sağlık Bakanlığı’nın paylaştığı verilerde kalp nakli için yaklaşık 980 hastanın nakil listesinde yer aldığı ve 2016-2018 yılları arasında nakil yapılabilen hasta sayısının ise yalnızca 165 olduğu bildirilmiştir. Kalp nakli bekleyen

hastalara çare olabilmek amacıyla donör yetersizliğini aşmak ve nakil yetersizliği ve/veya immün sistem aracılı başarısız nakiller nedeniyle gerçekleşen ölümlerin önüne geçmek ülkemizde oldukça önem arz eden konulardandır.

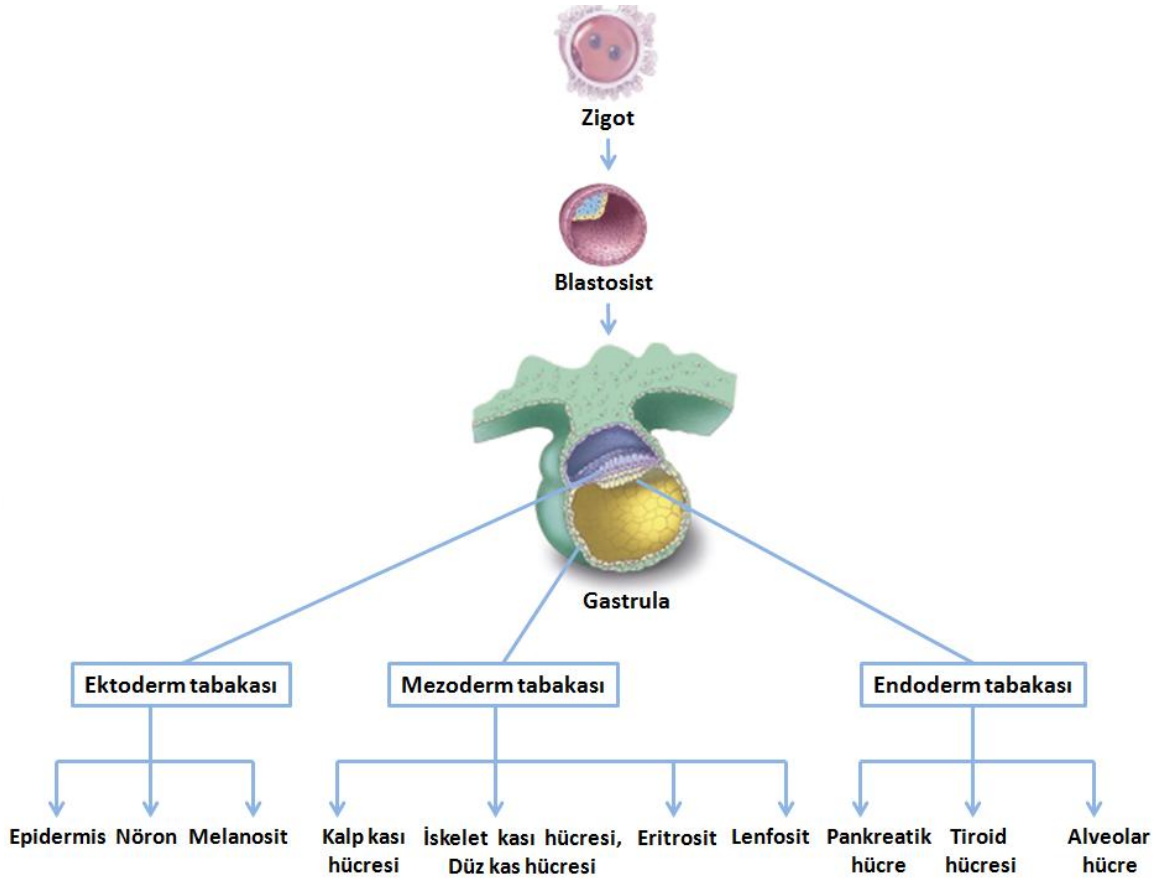
Donör kısıtlılığı ve yüksek tedavi masrafları nedeniyle hücre ve doku mühendisliği tabanlı tedaviler cerrahi girişimlere alternatif olarak araştırılmaktadır. Doku mühendisliği disiplininde araştırılan bu yeni nesil tedavi seçeneğinin başlıca aktörlerden biri ise rejeneratif kapasitesi bulunan kök hücrelerdir. Öyle ki kök hücreler algıladıkları uyarılara bağlı olarak çoğalma, yenilenmenin sağlanması için birçok farklı hücre türüne farklılaşabilme ve kendilerini yenileme kapasitesinde olan özel hücrelerdir (Sangkum 2016). Hücre tabanlı tedavilerde yenileyici ve onarıcı özellikleri nedeniyle bu kök hücreler sıklıkla tercih edilmekte ve işlevini kaybeden doku ve/veya organların yeniden oluşturulmasında deneysel anlamda önemli bir konumda yer almaktadır. Araştırma halindeki bu tedavi seçeneğinin sunduğu en önemli avantajlardan biri de canlılığa zarar vermeksizin hasta bireyin kendi vücudundan elde edilebilen ve immünolojik açıdan kişiye tam uyum gösteren otolog (bireye ait) kök hücrelerin kullanılabilmesidir.

Kök hücrelere bağlı olarak vücudun kendini yenileme özelliğini harekete geçirmek amacıyla doku mühendisliği uygulamalarının da içinde bulunduğu yenileyici ve onarıcı yaklaşımların ve varılması hedeflenen hücresel tedavi seçeneklerinin potansiyeli yapılan çalışmalarla birlikte gittikçe artmaktadır. Söz konusu potansiyelin aktörü olan kök hücreler ve kullanılan doku mühendisliği teknolojisi kardiyovasküler sistemdeki hasarlı dokularda ve/veya organlarda meydana gelen fizyolojik açığı kapatmak noktasında umut vaat etmektedir.

1.2. Kök Hücreler

Kök hücre, spermin yumurtayı döllemesiyle meydana gelen zigot hücresinde ve embriyonik dönemden başlayarak dokuların oluşumuna kadar uzanan canlılık boyunca var olan bir olgudur (Çizim 1.1). Söz konusu kök hücre olgusu, gereken durumlarda canlılığın devamlılığı için zarar görmüş ve/veya işlevini kaybetmiş doku ya da organların yenilenmesiyle ve tamir edilmesiyle görevlidir. Kök hücrelerin tanımlanmasında sahip oldukları başlıca özellikler dikkate alınmaktadır. Bu özellikler ise genel anlamda dokuda az bulunmaları, yaşam boyu belli oranda ve hızda ancak hasar durumunda yoğun şekilde bölünmeleri, büyüme uyarılarına karşı duyarlı olmaları, fizyolojik streslere karşı dirençli

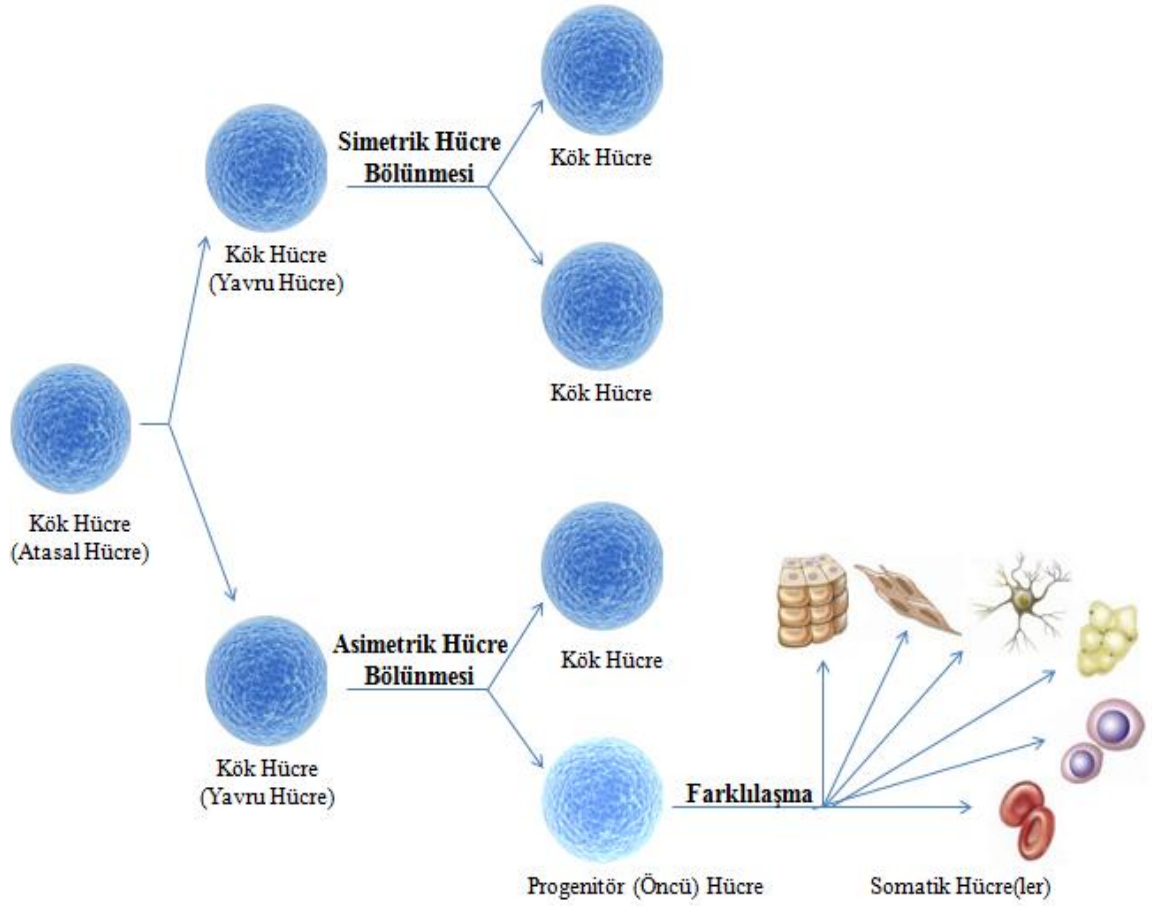
olmaları ve diğer hücre tiplerine nazaran özgül genetik ve epigenetik yapıya sahip olmaları şeklinde sıralanabilir.



Çizim 1.1. Dokuların embriyonik gelişimi.

Kök hücrelerde 2 çeşit bölünme görülebilmektedir. Bunlar kendini yenileme mekanizmasında meydana gelen simetrik bölünme ve farklılaşma sürecinde meydana gelen asimetric bölünmedir (Çizim 1.2.). Simetrik hücre bölünmesi kök hücre havuzunun devamlılığı için gözlenen en önemli mekanizmadır. Simetrik hücre bölünmesi sonrasında oluşan iki yavru hücrenin sitoplazma içeriği ve genetik materyal miktarı yaklaşık olarak aynı kalmaktadır.

Asimetrik kök hücre bölünmesinde ise çevre asimetrisi ve bölünme asimetrisi olmak üzere iki farklı durum gözlenebilmektedir. Çevre asimetrisinde kök hücrenin bölünmesiyle oluşan iki hücre çevreden gelen uyarıların yoğunluğu ve türüne göre farklılaşmaktadır ve/veya kök hücre havuzuna katılmaktadır. Bölünme asimetrisinde ise kök hücrenin bölünmesi esnasında yavru hücrelere sitoplazma içeriği eşit oranda dağılmadığı için oluşan yavru hücrelerden biri farklılaşma sürecine girerek somatik bir hücreyi meydana getirmekte, diğer yavru hücre ise kök hücre havuzuna dahil olmaktadır.

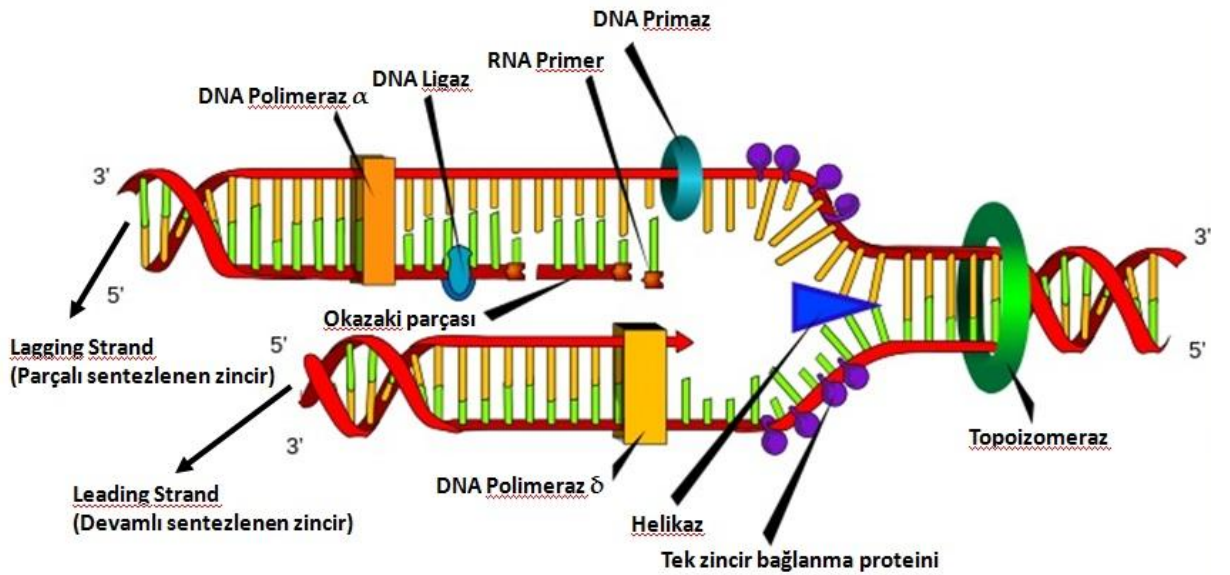


Çizim 1.2. Asimetrik ve simetrik kök hücre bölünmesi.

Kök hücrelerin farklılaşma süreci boyunca mRNA ve DNA sentez profillerinde genetik değişiklikler ve histon asetilasyonu, ökromatik/heterokromatik yapıların oranı, DNA metilasyonu gibi epigenetik değişiklikler meydana gelmektedir. Genetik ve epigenetik değişikliklerin seviyesi farklılaşma sürecindeki kök hücrelerin ya da farklılaşmış somatik kök hücrelerin genotipini belirleyen en önemli faktörlerdir (Can 2013, s.45). Genotipin hücre morfolojisine yansısıyla fenotipte de değişiklikler gözlenmektedir. Bahsedilen bu farklılaşma mekanizması kök hücreler ve somatik hücreler arasında çift yönlü meydana gelebilmektedir. Normal fizyolojik düzende kök hücreler diferansiyasyon olarak isimlendirilen ileri yönde farklılaşarak somatik hücreleri oluşturmaktadır. Ancak belirli uyarılar ve genlerin etkisi sonucunda somatik hücreler de dediferansiyasyon olarak bilinen mekanizma ile geri yönde farklılaşarak kök hücreleri oluşturabilmektedir. Geriye farklılaşmanın görüldüğü en önemli örnek laboratuvar ortamında pluripotensi genlerinin aktive edilmesiyle oluşturulan uyarılmış pluripotent kök hücrelerdir (uPKH).

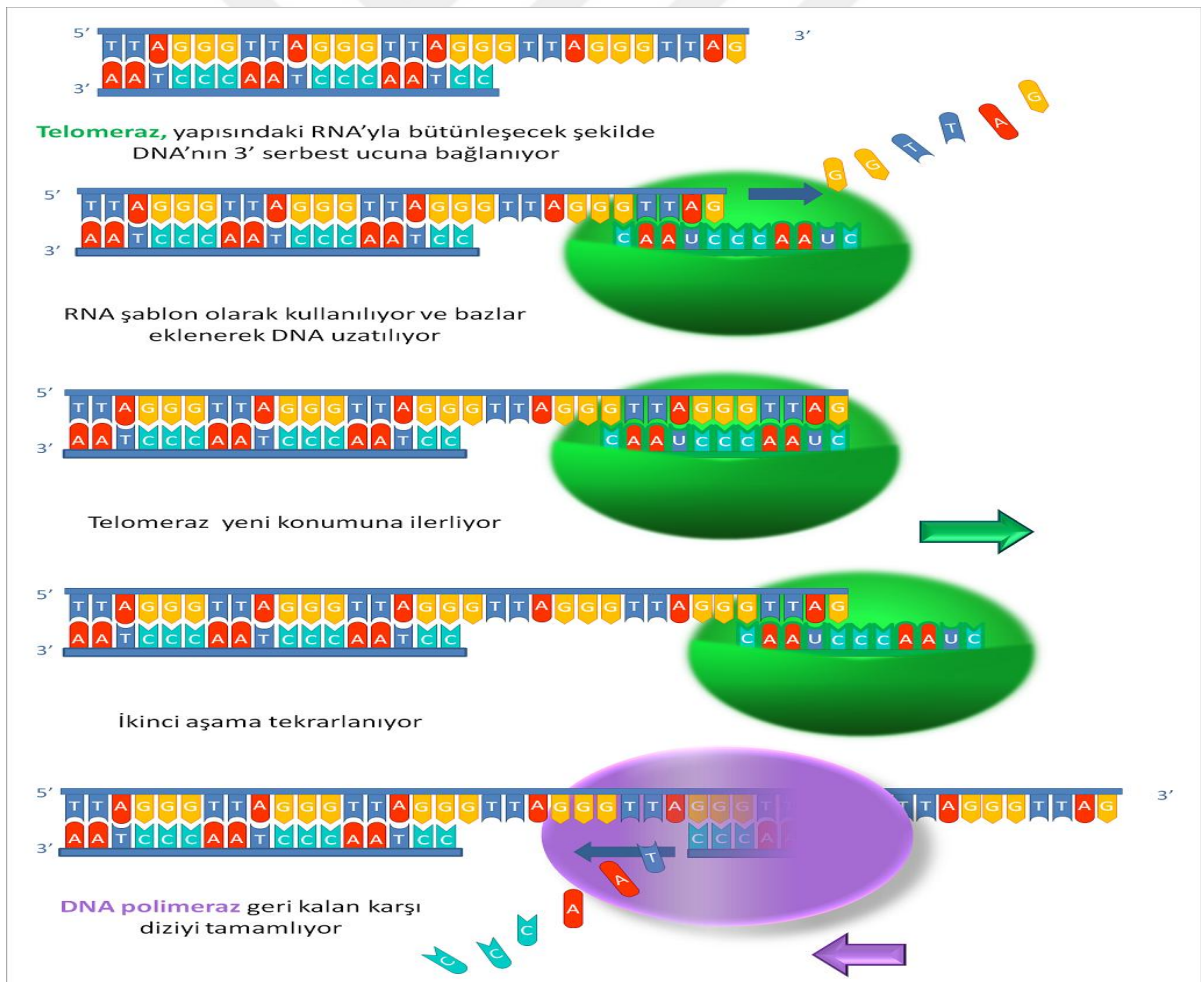
Kök hücrelerin sahip oldukları farklılaşma özelliklerinin yanı sıra öne çıkan en önemli özelliklerinden biri de yüksek seviyede ve genellikle genetik materyallerinin

devamlılığını sağlayacak şekilde bölünebilmeleridir. Hücrelerin genetik materyali olan kromozomların uç kısımlarında bulunan transkripsiyon açısından işlevsel olmayan ancak düzenleyici rol anlamında önem arz eden ve ‘‘Telomer’’ olarak adlandırılan tekrar dizileri yer almaktadır. Canlılar arasında boyutu değişkenlik gösteren bu tekrar dizisi omurgalılar için 3’-TTAGGG-5’ gen dizisinden meydana gelmektedir. Telomer yapılarının uzunluğu somatik hücrelerde olduğu gibi kök hücrelerde de bölünme hızı ve kapasitesini doğru orantıda kontrol eden en önemli durumlardan biridir. Ancak hücrenin bölünmesinin temeli olan DNA sentezi (replikasyon) (Çizim 1.3) mekanizmasının doğası gereği DNA zincirine bağlanan ve DNA polimeraz enzimine rehber görevi gören primer yapıları nedeniyle DNA zincirinin 3’ ucunda DNA sentezi gerçekleştirilemez. Hücre tarafından telomer hasarı olarak algılandığı için bu dizi DNA tamir mekanizmasından korunmalıdır. Bu nedenle telomer bölgeleri replikasyon sonrasında telomeraz olarak isimlendirilen RNA bağımlı DNA polimeraz enzimiyle tamamlanır (Aix ve diğ. 2018). Telomeraz enzimi 3’ ucunda meydana gelen bu sentezi ise enzim kompleksinde yer alan, kalıp olarak kullanılan hTR isimli RNA molekülü ve ters transkriptaz özelliğinde olan hTERT isimli katalitik alt birimi aracılığıyla gerçekleştirmektedir (Çizim 1.4). Böylece replikasyon tamamlanır ve DNA dizisinin tamamı eşlenmiş olur. Buna ek olarak hücre içinde telomeraz enziminin mRNA üretiminde bir azalma olmamasına rağmen, telomeraz mRNA’sının protein diline çevrilmesinde (translasyon) gittikçe azalma olmasından dolayı DNA dizisi her hücre bölünmesinde yaklaşık 50-150 baz çifti kadar azalmaktadır (Reddel 2003).



Çizim 1.3. Hücre replikasyon mekanizması.

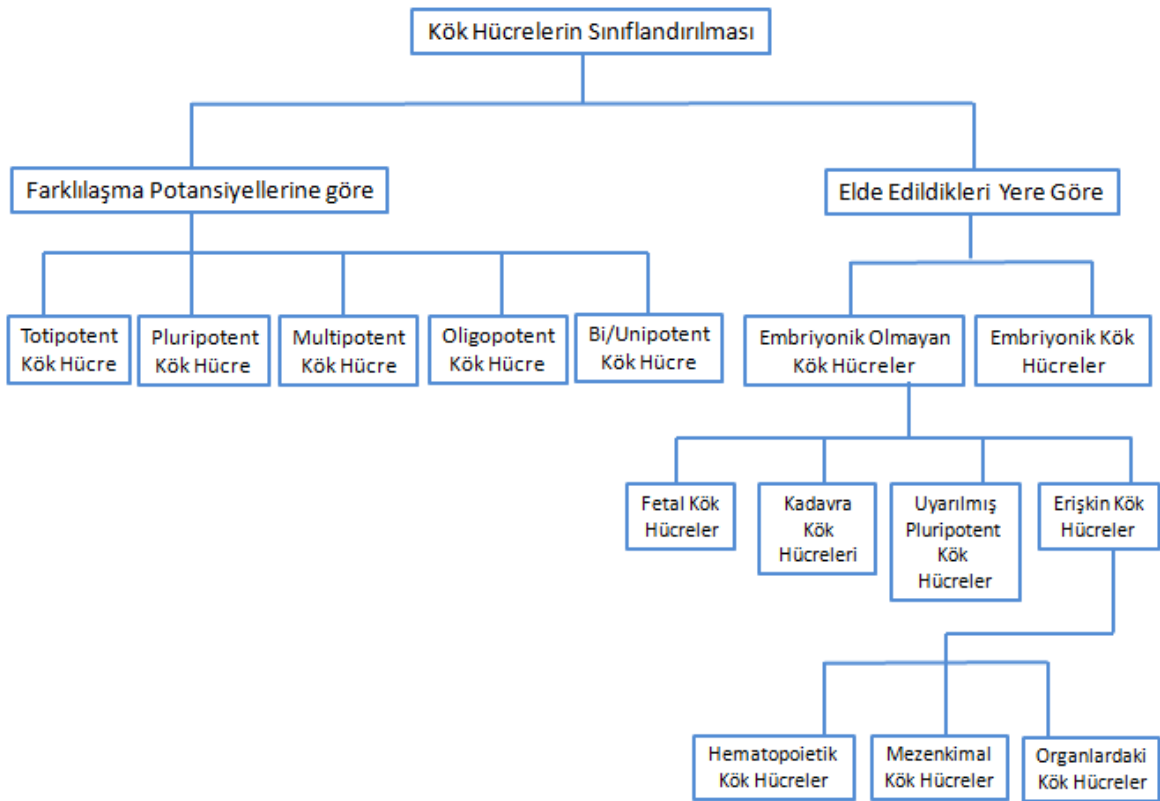
Kök hücrelerin potansisi ve telomer uzunluğu arasında paralellik olduğu bilinmektedir. Bu nedenle telomer yapıları telomeraz enziminin çalışmasına da bağlı olarak embriyonik kök hücrelerden erişkin kök hücrelerine doğru potansi azalmasıyla birlikte kısalmaktadır. Öyle ki somatik hücrelerin telomeraz aktivitesinin hücre bölünmesini düzenleyecek kadar yeterli seviyede olmamasından dolayı somatik hücreler bölünemezler. Ancak somatik hücrelerin bölünememe durumuna istisna olarak, kısalmış telomer bölgelerine sahip olmalarına rağmen kanser kök hücrelerinde ve/veya kanser hücrelerinde telomeraz enzimin yüksek etkinlikle çalıştığı da bilinmektedir (Kong ve diğ. 2015). Telomer dizisinin boyunun düzenleyici etkilerinden biri de hücre canlılığıyla ilişkilidir. Öyle ki, telomeraz enzimin etkinliğinin düşmesine bağlı olarak bölünen hücrelerde her bölünmede meydana gelen telomer kısalması kritik noktaya ulaştığında hücre programlı hücre ölümüne (apoptoz) gidebilmektedir. Böylece hücre bölünmesi açısından yeterli ve etkin genetik materyali olmayan hücreler vücut içinde temizlenmektedir.



Çizim 1.4. Telomeraz enziminin çalışma prensibi.

1.2.Kök Hücrelerin Sınıflandırılması

Kök hücreler vücutta kendini yenileme ve farklılaşma kapasitesine sahip özel hücre gruplarıdır. Bu hücreler gerekli uyarıyı aldıklarında kardiyomyosit, kondrosit, eritrosit, osteosit gibi somatik hücrelere farklılaşarak canlı fizyolojisinin ve histolojisinin devamlılığını sağlamaya yardımcı olmaktadır. Kök hücrelerin sınıflandırılmasında temel olarak iki kriter dikkate alınmaktadır. Bu kriterlerden biri kök hücrelerin sahip oldukları potansi yani farklılaşma kapasiteleri (Batista 2014), diğeri ise kök hücrelerin vücutta bulunma yeri diğere değışle *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar için elde edildikleri yerdir (Çizim 1.5). Kök hücreler farklılaşma potansiyellerine göre totipotent, pluripotent, multipotent, oligopotent ve bi/unipotent kök hücreler olarak giderek azalan potansiye göre sınıflandırılmaktadır. Elde edildikleri yerlere göre ise embriyonik dönem sınır kabul edilerek embriyonik ve embriyonik olmayan kök hücreler olarak sınıflandırılmaktadır. Embriyonik olmayan kök hücreler de fetal kök hücreler, erişkin kök hücreler, kadavra kök hücreleri ve uyarılmış pluripotent kök hücreler olmak üzere alt sınıflara ayrılmaktadır.



Çizim 1.5. Kök hücrelerin sınıflandırılması.

1.3.1. Farklılaşma Potansiyellerine Göre Kök Hücre Sınıflandırması

1.3.1.1. Totipotent Kök Hücreler

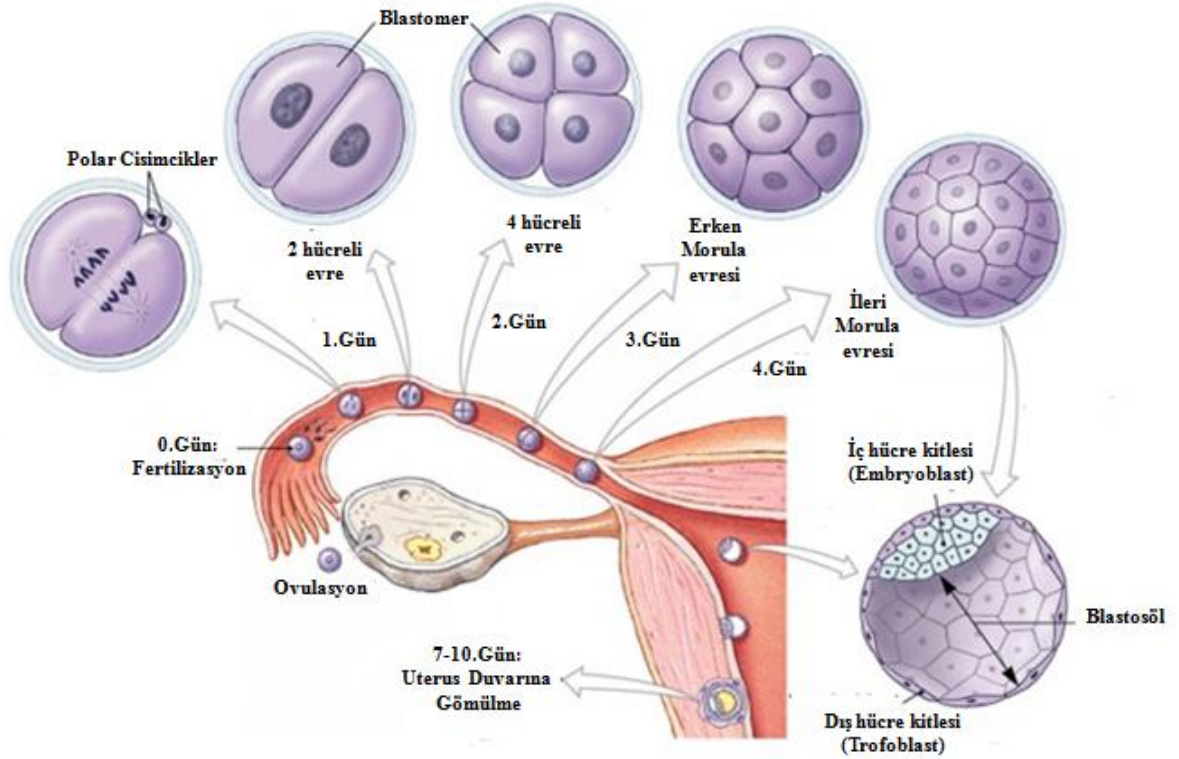
Kök hücre sınıflandırmasında en güçlü potansiye sahip olan hücre grubu totipotent kök hücrelerdir. Totipotent kök hücreler embriyonik dönemdeki segmentasyon sürecinin 2 hücreli evresi ile morula evresi (insanlar için yaklaşık 4.günün sonuna kadarki evre) arasındaki hücreler için kullanılan bir terimdir (Çizim 1.6) . Totipotent kelimesi filolojik olarak Latince tüm anlamına gelen “*tōtus*” ve güç anlamına gelen “*potentia*” kelimelerinin birleşiminden oluşmaktadır. Totipotent kök hücreler sahip oldukları kapasitesi ile bütün bir canlıyı oluşturabilecek embriyonik ve embriyonik-olmayan hücrelere farklılaşabilmektedir. Böylece bu hücreler hem embriyonun zarını (plasenta) hem de embriyonun tamamını meydana getirebilmektedirler.

1.3.1.2. Pluripotent Kök Hücreler

Fertilizasyon sonrasındaki yaklaşık 4.günde meydana gelen morula evresini takip eden 12-15 saatlik süreç sonrasında 32 blastomerli embriyo ve hemen sonrasında da blastokist oluşumu gözlenir. Böylece embriyonik gelişimin 4-5.gününde *Zona Pellucida* üzerinden blastokist içine sızan uterus sıvısıyla blastosöl adı verilen sıvı kesesi de meydana gelir. Blastokist dış kısmında trofoektoderm ya da trofoblast hücrelerinin oluşturduğu dış hücre kitlesi (*outer cell mass*) ve iç kısımda ise blastosöl boşluğuna bakan embriyoblast hücrelerinin oluşturduğu iç hücre kitlesi (*inner cell mass*) şeklinde iki farklı dokunun görüldüğü ilk yapıdır (Çizim 1.6). Blastokist yapısında bulunan iç hücre kitlesindeki ve dış hücre kitlesindeki hücrelerin toplam sayısının yaklaşık olarak 120 olduğu bilinmektedir.

Kök hücrelerin farklılaşma kapasitelerine göre sınıflandırılmasında ikinci sıradaki hücre grubu pluripotent kök hücrelerdir. Pluripotent kelimesi filolojik olarak incelendiğinde, Latince pek çok anlamına gelen “*plūris*” ve güç anlamına gelen “*potentia*” kelimelerinin birleşiminden oluştuğu görülmektedir. Pluripotent kök hücreler 3 embriyonik germ yaprağından-endoderm (iç tabaka), mezoderm (orta tabaka), ektoderm (dış tabaka)-köken alan yaklaşık 200 farklı tipteki hücreye farklılaşabilen kök hücrelerdir (Martin 1981). Ancak pluripotent kök hücrelerin totipotent kök hücrelerden farklı olarak plasenta gibi embriyonik olmayan dokuların hücrelerine farklılaşma kapasiteleri yoktur.

Embriyonik gelişimin yaklaşık 16.gününe kadar pluripotent karakterde kök hücreleri gözlemlemek mümkündür.



Çizim 1.6. Embriyogenezin ilk 10 günü.

Blastokist aşamasındaki hücreler uterus duvarına gömülmesinden önce ve sonra kültür ortamına alındığında farklı pluripotent kök hücre dizilerini meydana getirmektedir. Blastokist yapısında bulunan dış hücre kitlesindeki trofoektoderm (trofoblast) hücreleri ve iç hücre kitlesindeki embriyoblast hücreleri embriyonik kök hücreler olarak pluripotent kök hücrelere en iyi örneklerdendir. Uterus duvarına gömülmesi sonrasında iç hücre kütlesindeki embriyoblast hücrelerinin meydana getirdiği epiblast ve hipoblast hücreleri, embriyo karsinoma hücreleri (Kahan ve Ephrussi 1970) ve ilkel cinsiyet hücreleri (Kanatsu-Shinohara ve diğ. 2004, Guan ve diğ. 2006) pluripotent karakterdeki kök hücrelerdir. Bunlara ek olarak, uyarılmış pluripotent kök hücreler ve embriyo kök hücresi benzeri çok küçük hücreler (VSEL) de pluripotent karakterdeki hücrelerdir (Zuba-Surma ve diğ. 2008).

Pluripotent kök hücreler kromatin yapı açısından oldukça değişkendir ve sürekli olarak histon metilasyonu ve asetilasyonu ile epigenetik olarak kontrol altındadır. Diğer kök hücrelere ve somatik hücrelere nazaran ökromatik yapı kazanmaları daha kolaydır ve böylece gen ifadesi açısından oldukça esneklerdir. Farklılaşmayla ilişkili genler ise bu

hücrelerde histon metillenmesiyle pluripotensinin devamlılığı açısından sessiz durumdadır. Ancak pluripotent kök hücreler farklılaşma sürecine girdiğinde pluripotensi genleri (Çizelge 1.1) epigenetik olarak heterokromatik yapı kazanır (Meshorer ve diğ. 2006). Farklılaşma süresince epigenetik düzenlemeyle çok sayıda genin transkripsiyon seviyesinde sessiz konuma geçirilmesi, sürecin devamlılığını sağlayacak genlerin ise etkinliğini artırmaktadır (Bibikova ve diğ. 2008).

Embriyonik kök hücreler ilk olarak 1970’li yıllarda fare teratokarsinomundan embriyo karsinoma hücrelerinin elde edilmesiyle araştırılmaya başlanmıştır (Kahan ve Ephrussi 1970). Ancak tümör kaynaklı bu hücrelerin genetik materyal ve sitoplazma açısından bozuk içerikte olmasından dolayı embriyo karsinoma hücreleriyle olan çalışmalar akıllarda soru işaretlerinin belirmesine yol açmıştır. 1981 yılında embriyonik kök hücreler blastokist evresindeki fare embriyosunun iç hücre kitlesinden alınan hücrelerle laboratuvar ortamında incelenmeye başlamıştır. Embriyonik kök hücrelerin embriyo karsinom hücrelerinin salgılarıyla zenginleştirilmiş ve lösemi baskılayıcı faktör (LIF) bulunan kültür ortamında pluripotent karakterlerini korudukları gözlenmiştir (Evans ve Kaufmann 1981). Embriyonik kök hücrelerin kültür ortamında pluripotent karakterlerini sürdürmeleri ise tekrar blastokiste aktarıldığında iç hücre kitlesine dahil olarak 3 germ yaprağına ait hücelere farklılaşabilmeleriyle açıklanmaktadır (Bradley ve diğ. 1984).

Pluripotent kök hücreler sahip oldukları farklılaşma kapasitesilerini normal embriyonik gelişim sürecinde zamanla kaybetmektedir ve bu kayıp tek yönlüdür yani geri döndürülemez. Ancak 2006 yılında Takahashi ve Yamanaka’nın yayınladığı çalışma bu tek yönlü sistemin tersine çevrilebileceğini ortaya koymuştur. Bu keşif kök hücre biyolojisinde ve bilim dünyasında yankı uyandırmıştır. Takahashi ve Yamanaka embriyonik kök hücrelerde ifade edilen Oct4, Sox2, c-Myc ve Klf4 transkripsiyon faktörüne ait genleri laboratuvar ortamında farklılaşmış (somatik) fare deri fibroblastlarına aktarmışlardır. Bu genlerin fibroblast hücrelerinde yüksek seviyede ifade edilmesinin sağlanmasıyla fibroblast hücrelerinin mRNA ve protein üretim profilinde değişim gözlenmiştir. Böylece fibroblast hücrelerine pluripotent karakter kazandırılmıştır (Takahashi ve Yamanaka 2006). Yamanaka bu çalışması ile 2010 yılında Nobel Fizyoloji ve Tıp ödülüne layık görülmüştür. Somatik hücelere gen aktarımıyla elde edilen bu kök hücelere ise uyarılmış pluripotent kök hücreler adı verilmiştir. 2007 yılında ise aynı çalışma insan deri fibroblastları ile yapılmış ve insan uyarılmış pluripotent kök hücreleri elde edilmiştir (Takahashi ve diğ. 2007). Klf4 ve c-Myc genlerinin karsinogenez (kanser oluşumu) mekanizmasıyla ilişkili genler olmaları nedeniyle (Munro ve diğ. 2018, Le Magnen ve diğ. 2013), 2007 yılındaki

başka bir çalışmada da somatik hücelere Oct4, Sox2, Lin28 ve Nanog transkripsiyon faktörlerine ait genler aktarılarak pluripotent karakter elde edilmiştir (Yu ve diğ. 2007).

Çizelge 1.1. İnsandan ve fareden izole edilen embriyonik kök hücrelerin özellikleri (Can 2013, s.225)

Belirteç	Fare Embriyonik Kök Hücresi	İnsan Embriyonik Kök Hücresi
SSEA-1	+	-
SSEA-3 ve SSEA-4	-	+
TRA-1-60 ve TRA-1-81	-	+
TRA-2-54	-	+
GCTM-2	-	+
CD133	+	+
CD9	+	+
Oct4	+	+
Nanog	+	+
Sox2	+	+
X kromozom durumu	Her iki X kromozomu da etkin	X kromozomlarından birisi etkin
Telomeraz etkinliği	+	+
Alkalın fosfataz etkinliği	+	+
<i>in vivo</i> teratom oluşturma	+	Denenmedi
<i>in vitro</i> germ hücresi oluşturma	+	Henüz bildirilmedi

1.3.1.3. Multipotent Kök Hücreler

Multipotent kök hücreler farklılaşma potansiyeline göre en yüksekten en düşüğe doğru yapılan skalada üçüncü sırada yer almaktadır. Multipotent kelimesi Latin filolojisinde çok anlamına gelen “*multi*” ve güç anlamına gelen “*potentia*” kelimelerinin birleşmesiyle meydana gelmektedir. Embriyonik gelişim sürecinde pluripotent kök

hücrelerin farklılaşma potansiyellerinde azalma meydana gelmekte ve bu azalmayla beraber oluşan hücreler multipotent kök hücreler olarak adlandırılmaktadır. Diğer bir deyişle multipotent kök hücreler pluripotent kök hücrelerin özelleşmiş bir formudur (Murphy ve diğ. 2013, Mundra ve diğ. 2012, Bibber ve diğ. 2013). Bu hücreler embriyonik gelişimin yaklaşık 16.gününden itibaren gözlenmeye başlar ve yetişkin vücudundaki doku ve organlarda bulunmaya devam eder. Multipotent kök hücreler trilineer germ diski oluştuktan sonra meydana geldiği için, genel anlamda bir hücre serisine ait ve özel işlevleri olan hücrelere farklılaşabilme kapasitesindeki hücrelerdir.

Multipotent kök hücrelere en güzel örneklerden birisi hematopoetik kök hücrelerdir (Wang ve Wagers 2011). Hematopoetik kök hücreler yalnızca B lenfosit, T lenfosit ve doğal öldürücü hücrelerden oluşan lenfoid seriye ait ve bazofil, dendritik hücre, eritrosit, makrofaj, nötrofil, eozinofil, megakaryosit hücrelerinden oluşan miyeloid seriye ait birkaç hücre tipine farklılaşabilmektedir. Ayrıca multipotent kök hücrelerin nöral kista (Calloni ve diğ., 2009), adipoz doku (Zuk ve diğ. 2001), göbek kordonu (Wang ve diğ. 2004), endometriyum (Gargett ve diğ. 2007), kalp (Tomita ve diğ. 2005), diş pulpası (Gronthos ve diğ. 2002) kemik iliği (Phinney ve diğ. 2007), dermis tabakası (Toma ve diğ. 2001) gibi pek çok yetişkin dokuda ve organda varlığı kanıtlanmıştır.

1.3.1.4. Oligopotent Kök Hücreler

Oligopotent kök hücrelerin farklılaşma kapasitesi 2 ve daha fazla hücre tipi oluşturabilecek kadar sınırlıdır. Oligopotent kelimesi Latin filolojisinde değerlendirildiğinde birkaç anlamına gelen "*oligo*" ve güç anlamına gelen "*potentia*" kelimelerinin birleşmesiyle meydana gelmektedir. Oligopotent kök hücreler multipotent hücrelere benzer hücreler olmalarına rağmen, daha sınırlı bölünebilme ve sadece yakın ilişkili olduğu birkaç hücre tipine farklılaşma kapasitesine sahip hücrelerdir. Bu özellikleri bakımından oligopotent kök hücreler, progenitör (öncü) hücreler olarak adlandırılmaktadır. Akciğerdeki bronşiyolar epitele ve alveolar epitele farklılaşabilen bronkoalveolar kanal hücreleri (Kim ve diğ. 2005) ve konjunktival ve kornea hücrelerine farklılaşabilen oküler yüzey hücreleri (Majo ve diğ. 2008) oligopotent kök hücrelere örnek olarak verilebilir.

1.3.1.5. Bi/Unipotent Kök Hücreler

Bipotent kök hücreler iki farklı hücre tipine farklılaşabilen kök hücrelerdir. Bipotent kök hücrelere hepatosit ve kolanjiosit hücrelerine farklılaşabilen hepatoblastlar (Chikada ve diğ. 2015), dış myoepitelial ve iç luminal hücrelere farklılaşabilen meme kök hücreleri (Rios ve diğ. 2014) örnek olarak verilebilir.

Unipotent kök hücreler ise yalnızca bir hücre tipine farklılaşabilen kök hücrelerdir. Akciğerdeki alveollerde bulunan ve tip 1 pnömositleri oluşturan tip 2 pnömositler unipotent kök hücreler örnektir (Kolios ve Moodley 2013).

1.3.2. Elde Edildikleri Yere Göre Kök Hücre Sınıflandırması

1.3.2.1. Embriyonik Kök Hücreler

Embriyonik kök hücreler barındırdıkları pluripotent karakter sayesinde trilaminar germ diskinde ait hücrelerin tamamını oluşturabilen kök hücrelerdir (Bradley ve diğ. 1984). Embriyonik kök hücreler kardiyomyosit, adiposit, düz kas hücresi, nöron, oligodendrisit ve eritrosit gibi yaklaşık 200 farklı hücre tipine farklılaşabilmektedir (Klimanskaya ve diğ. 2007, Lu ve diğ. 2009, Jiang ve diğ. 2012, Mandel ve diğ. 2012, Kriks ve diğ. 2011, Erceg ve diğ. 2010). Pluripotent karakterine ek olarak teorikte sınırsız bölünme özelliklerine sahip olması da yetişkin kök hücrelerden ayrıldığı en önemli noktadır. Embriyonik kök hücreler karakteristik olarak Oct4, Nanog, Rex-1 gibi pluripotensi ile ilişkili transkripsiyon faktörlerini ve SSEA-1, SSEA-3, SSEA-4, TRA-160, TRA-1-81 gibi hücre yüzey antijenlerini ifade etmektedir. Ayrıca bu hücreler yüksek seviyede alkalın fosfataz ve telomeraz aktivitesine sahiptir (Carpenter ve diğ. 2004, Amit 2002). Embriyonik kök hücreler pluripotent karakterleri nedeniyle teratom oluşturma riski, ayrıca allojenik kullanım ve etik tartışmalar gibi sorunları da içermektedir.

Embriyonik olmayan kök hücrelere kıyasla embriyonik kök hücrelerin hücre döngüsü mekanizmasında S fazı uzun, G1 ve G2 fazları ise daha kısadır (Neganova ve diğ. 2009, Becker ve diğ. 2006). Bu şekilde G1 ve G2 fazlarının kısa olması embriyonik kök hücrelere daha fazla hücre bölünmesi yapabilme olanağı sunmaktadır (Orford ve Scadden 2008). Embriyonik kök hücrelerin farklılaşması hücre döngüsünü düzenleyen/kontrol eden moleküller aracılığıyla döngünün G1/S fazından duraklatılması sonucunda gerçekleşmektedir (Ruiz ve diğ. 2011).

Embriyonik kök hücreler, 5-7 günlük blastokist evresindeki iç hücre kitlesinde bulunan pluripotent karakterli hücrelerdir ve bu pluripotent hücreler trofoblast hücrelerinden bir immünocerrahi yöntemi kullanılarak ayrıştırılması yolu ile saf olarak elde edilir (Evans ve Kaufman 1981, Thomson ve diğ. 1998). Elde edilen embriyonik kök hücreler LIF varlığında ve mitotik aktivitesi durdurulmuş fare embriyonik fibroblast veya insan fibroblast hücrelerinden oluşan besleyici bir tabaka üzerinde (Richards ve diğ. 2002, Ilic ve diğ. 2009) ya da besleyici tabaka olmaksızın (Klimanskaya ve diğ. 2005) kültüre edilebilmektedir.

İç hücre kitlesinden embriyonik kök hücre eldesi çok zor ve etik olarak tartışmalı bir durum olduğu için zaman için alternatif yöntem ve kaynaklar türetilmiştir. Bu yöntemler genel anlamda somatik hücrelere geri programlama yoluyla yeniden pluripotent karakter kazandırma mantığına dayanır. Alternatif yöntemlerde ilki somatik hücrelerden alınan çekirdeğin, çekirdeği çıkarılmış oosit hücrelerine nükleer transfüzyonu ile yeniden pluripotensi elde edilmesidir (Gurdon ve diğ. 1975, Wilmut ve diğ. 1997, Wakai ve diğ. 2008). Alternatif yöntemlerden ikincisi ise somatik hücrelerin embriyonik kök hücre, embriyonik germ hücresi ve embriyonik karsinoma hücresi gibi pluripotent karakterde bir hücre ile füzyon edilmesidir (Tada ve diğ. 2001). Füzyon ile üretilen hibrid hücreler tetraploid oldukları için klinik kullanıma uygun değildir. Ancak bu hücreler pluripotensiyle ilişkili genleri ifade etmektedir ve DNA metilasyonu ve/veya histon modifikasyonu açısından embriyonik kök hücrelere benzer epigenetik mekanizmaya sahiptir (Kimura ve diğ. 2004). Alternatif yöntemlerden bir diğeri ise pluripotensi ile ilişkili genlerin somatik hücrelere aktarılmasını içermektedir. Bu yöntemle aktarılan genler ektopik olarak somatik hücrelerde ifade edildiğinde çeşitli epigenetik mekanizmaları aktifleştirerek yeniden programlamayı sağlar (Takahashi ve Yamanaka 2006, Takahashi ve diğ. 2007, Yu ve diğ. 2007).

1.3.2.2. Embriyonik Olmayan Kök Hücreler

Embriyonik olmayan kök hücreler yaklaşık olarak gebeliğin üçüncü trimester dönemindeki fetüsten başlayarak erişkin döneme kadar uzanan süreçteki doku ve organlarda bulunan multipotent veya özel girişimlerle üretilmiş pluripotent kök hücrelerdir. Bu hücreler genel olarak fetal kök hücreler, kadavra kök hücreleri, uyarılmış pluripotent kök hücreler ve erişkin kök hücreler olmak üzere 4 alt başlıkta incelenebilir.

1.3.2.2.1. Fetal Kök Hücreler

Fetal kök hücreler fenotipik ve gen ifadesi bakımından heterojen bir hücre popülasyonundan meydana gelmektedir. Bu hücreler farklılaşma kapasitesi bakımından embriyonik kök hücreler ile erişkin kök hücreler arasında köprü konumundaki hücrelerdir (Spinelli ve diğ. 2013). Multipotent olmalarının yanı sıra bu hücreler, erişkin doku ve organdaki kök hücrelere göre daha küçük boyuttadır ve daha fazla telomeraz aktivitesine, çoğalma, farklılaşma ve tamir etme potansiyeline sahiptir (De Coppi 2007). Ayrıca sahip oldukları bu özelliklerden dolayı erişkin dokularla kıyaslandığında yeniden programlamaya daha yatkın hücrelerdir (Jones ve diğ. 2012).

Fetal kök hücreler kan, karaciğer, kemik iliği gibi fetal dokular ve plasenta, kordon kanı, göbek kordonu, amniyotik sıvı gibi koruyucu embriyonik dokulardan elde edilebilmektedir (Marcus 2008, Cananzi 2009). Elde edildikleri yerlere göre alt sınıflandırma yapmak gerekirse; fetal hematopoetik kök hücreler kan, karaciğer ve kemik iliğinden, fetal mezenkimal kök hücreler kan, karaciğeri kemik iliği, akciğer, böbrek ve pankreastan, fetal endotelial kök hücreler kemik iliği ve plasentadan, fetal epitelial kök hücreler karaciğer ve pankreastan ve fetal nöral kök hücreler ise beyinden ve omurilikten elde edilmektedir (O'Donoghue ve Fisk 2004).

1.3.2.2.2. Kadavra Kök Hücreleri

Kadavra kök hücreleri asistolik, post-mortem donörlerden güvenli ve yüksek miktarda elde edilebilen multipotent kök hücrelerdir. Kadavra çoklu organ ve/veya doku donörlerinden mezenkimal, hematopoetik ve nöral kök hücreler gibi farklı tiplerde kök hücre edebilmek mümkündür (Palmer ve diğ. 2001). Kadavra içindeki somatik hücreler ölüm gerçekleşikten kısa süre sonra ölürlür. Ancak ölüm sonrasında bile kök hücreler hipoksik duruma direnç göstererek canlılıklarını korurlar (Suda ve diğ. 2005). Bu şekilde post-mortem dönemde kemik iliğinden (Michelova ve diğ. 2011), beyin dokusundan (Schwartz ve diğ. 2003) ve karaciğer dokusundan (Erker ve diğ. 2010) kök hücre elde edilebilir. Kadavradan elde edilen kök hücreler özgül kök hücre genlerini ifade edebilmektedir (Valente ve diğ. 2014). Ayrıca yapılan çalışmalarda bu kök hücrelerin, uygun *in vitro* koşullar altında somatik hücrelere farklılaşabildiği (Peran ve diğ. 2013) ve *in vivo* olarak kardiyak yenilenmeyi uyardığı gösterilmiştir (Sun ve diğ. 2016).

1.3.2.2.3. Uyarılmış Pluripotent Kök Hücreler

Somatik hücrelerin epigenetik olarak yeniden pluripotent düzeye programlanmasıyla (dediferensiyasyon) üretilen hücelere uyarılmış pluripotent kök hücreler denilmektedir. Epigenetik programlamanın gen aktarımıyla gerçekleştirilebileceği ilk defa deri fibroblast hücrelerine bir dizi pluripotent karakterle ilgili transkripsiyon faktörlerinin (Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc) aktarılmasıyla gösterilmiştir (Takahashi ve Yamanaka 2006). Bu faktörlerden Oct4'ün ve Sox2'nin pluripotensiye geri dönüş için mutlaka olması gerekmektedir. Bunlarla birlikte aktarılacak diğer faktörler ise değişkenlik gösterebilir. Buna ek olarak Klf4 ve c-Myc yerine Lin28 ve Nanog kullanımıyla da pluripotensi uyarılması sağlanmaktadır (Yu ve diğ. 2007). Pluripotent karakter kazandırmak için aktarılan bu faktörler epigenetik olarak DNA demetilasyonlarını ve histon asetilasyonlarını harekete geçirmektedir.

Uyarılmış pluripotent kök hücreler pluripotent kritere göre embriyonik kök hücelere alternatifler, hastalık modellemelerinde yaygın olarak kullanılırlar ve bireye özgü üretilebilmeleri nedeniyle etik sorunlara çözüm niteliğindedirler (Somoza ve Rubio 2012, Robinton ve Daley 2012). Ayrıca geri programlama yoluyla üretilen bu kök hücreler Takahashi ve Yamanaka'nın yayınladığı çalışmadan sonra insan (Lowry ve diğ. 2008, Park ve diğ. 2008) ve fare (Maheralli ve diğ. 2007, Wernig ve diğ. 2007) üzerinde başka genetik faktörlerin aktarılmasıyla da başarılmıştır. Bu nedenle somatik hücrelerin pluripotent seviyeye uyarılması basit ve tekrar edilebilir bir yöntem olarak görülmektedir.

Uyarılmış pluripotent kök hücreler embriyonik kök hücrelerin alternatifi olmasına rağmen, bu iki farklı hücre tipinin farklılaşma verimleri (Hu ve diğ. 2010), gen ifade seviyeleri (Chin ve diğ. 2009) ve epigenetik yapıları (Kim ve diğ. 2010, Polo ve diğ. 2010) farklıdır. Buna ek olarak bu kök hücreler pluripotent bir güçle çalışmak için yedek anahtar gibi görülmekte bazı sınırlılıklar ve sıkıntılar barındırmaktadır. Bunların başında uyarımla ilgili sorunlar gelmektedir. Öyle ki pluripotensiye yeniden programlama yapılırken elde edilen verim %1'den daha düşüktür (Yamanaka 2009) ve gen aktarımı için genellikle tercih edilen retroviral ajanlar genomu yerleşerek immünojenik özellikte uyarılmış pluripotent kök hücre oluşmasına yol açmaktadır (Zhao ve diğ. 2011). Genomla ilişkili olmayan plazmid (Okita ve diğ. 2011), Sendai virüs (Fusaki ve diğ. 2009), adenovirüs (Stadtelt ve diğ. 2008) gibi taşıyıcılarının ya da doğrudan ilgili genlerin mRNA'sının

(Warren ve diğ. 2010) ve proteinlerinin (Kim ve diğ. 2009) kullanılması bu sorunun üstesinden gelinmesine yardımcı olmuştur.

Uyarılmış pluripotent kök hücreler Alzheimer (Yagi ve diğ. 2011) ve şizofreni (Brennan ve diğ. 2011) gibi poligenik hastalıkların ve omurilik yaralanmaları (Tsuji ve diğ. 2010), maküler dejenerasyon (Jin ve diğ. 2009) gibi akut hastalıkların *in vitro* modellenmesinde kullanılmaktadır. Ayrıca bu hücreler ilaç toksisite testlerinde de model hücre olarak yer almaktadır.

1.3.2.2.4. Erişkin Kök Hücreler

Erişkin kök hücreler embriyonik gelişim sonrasında oluşan kemik iliği, kas, sinir, deri, kıl kökü, kornea, beyin, kalp, karaciğer gibi pek çok doku ve organda bulunan kök hücrelerdir. Multipotent ya da oligopotent karakterleri nedeniyle sınırlı farklılaşma potansiyeline, asimetrik bölünebilme özelliğine ve plastisiteye sahiptirler. Erişkin kök hücreler mezenkimal kök hücreler, hematopoetik kök hücreler ve yetişkin doku/organlarında bulunan kök hücreler olarak alt sınıflara ayrılabilir (Çizim 1.5).

Hematopoetik kök hücreler

Hematopoetik kök hücreler lenfoid ve miyeloid seriye ait somatik hücre tiplerine farklılaşma kapasitesine sahip multipotent kök hücrelerdir ve ilk olarak kemik iliği örneklerindeki Sca-1⁺, Lin⁻, c-Kit⁺ genotipindeki hücreler olarak tanımlanmışlardır. (Spangrude ve diğ. 1988). Hematopoez, hematopoetik kök hücrelerin farklılaşarak kan hücreleri ve immün sistem hücrelerini meydana getirme sürecidir (Till ve McCulloch 1961, Becker ve diğ. 1963). Bu kök hücreler gerçekleştirdikleri farklılaşma ile hem hematopoetik hem de immün sistem homeostazını sağlamakla görevlidir. Hematopoetik kök hücreler farklılaşma ve kendilerini yenileme kapasiteleri bakımından uzun ömürlü ve kısa ömürlü olmak üzere heterojen bir hücre popülasyonundan meydana gelmektedir (Pietras ve diğ. 2015).

Hematopoez embriyonik dönemde aorto-gonad-mezonefroz bölgesindeki hematopoetik kök hücreler tarafından başlatılır (Ivanovs ve diğ. 2011, Ivanovs ve diğ. 2014). Embriyonik gelişimin ilerleyen evrelerinde ise hematopoez görevi fetal karaciğere ve oradan da kemik iliği dokusuna aktarılmaktadır (Dzierzak ve diğ. 2008, Medvinsky ve diğ. 2011). Öyle ki genellikle yetişkin bireylerde görülen hematopoez periferik kan ve

kordon kanının yanı sıra kemik iliği nişinde de gerçekleşmektedir. Kemik iliğindeki hematopoetik kök hücreler endosteal osteoblastik ve perivasküler endotelial niş olmak üzere iki farklı bölgede bulunmaktadır. Hematopoetik kök hücreleri, diğer kök hücrelerin ve somatik kan hücrelerinden ayırmada bazı belirteçler kullanılabilir. Buna göre hematopoetik kök hücreler farelerde CD2, CD3, CD4, CD5, CD8, NK1.1, B220, TER-119, Gr-1 belirteçlerini; insanda ise T lenfosit belirteci olan CD3 (T lenfosit), CD13 ve CD33 (myeloid hücre), CD14 (monosit hücresi), CD16 (NK hücresi ve granülosit), CD19 (B lenfosit), CD56 (NK hücresi), CD61 (megakaryosit) gibi belirteçleri taşımazlar (Can 2013, s.341). Bu belirteçlerin yanı sıra CD34, CD90, CD105 (endoglin), CD117 (c-kit), CD184 (CXCR4) gibi belirteçleri ise ifade etmektedirler. Hematopoetik kök hücreler başlıca kan hücrelerinin yapımından sorumlu oldukları için gerektiği durumlarda kemik iliği nişinden ayrılarak kan dolaşımına geçebilen ve işlev göstereceği dokuya yerleşebilen kök hücrelerdir. Bu hücrelerin sahip olduğu bu dinamizm, çeşitli kemokinler ve büyüme faktörleri gibi çözünebilir moleküller, membranlarında yer alan bağlantı molekülleri ve sitoplazmalarında bir denge dahilinde faaliyet gösteren sinyal yollarıyla sıkı bir şekilde kontrol altında tutulmaktadır.

Kordon kanından elde edilen hematopoetik kök hücreler sahip oldukları potansiyel açısından oldukça verimlidir. Kaliteli bir hematopoetik kök hücre kaynağı olan kordon kanı hem çocuklarda hem de yetişkinlerde çeşitli hematolojik, metabolik ve gelişimsel hastalıkların tedavisinde klinik olarak incelenmektedir.

Mezenkimal Kök Hücreler

1966 yılında *Friendenstein* ve ark. fare kemik iliği stromasında osteosit, adiposit, kondrosit ve retikulosit gibi hücrelere dönüşebilme özelliğine sahip multipotent kök hücrelerin varlığını tespit etmiştir (Friendenstein ve diğ. 1966). Bu hücreler genel anlamda plastik yüzeylere yapışma, in vitro olarak çoğaltılabilme ve hem in vitro hemde in vivo olarak osteosit, adiposit, kondrosit gibi üç farklı somatik hücre tipine farklılaşabilme özelliğine sahip multipotent mezenkimal kök hücrelerdir (Prockop 1997). Mezenkimal kök hücre heterojen bir hücre popülasyonunu kapsayan genel bir terimdir. Bu nedenle hücresel işlev bakımından benzer hücrelerden oluşsalar da farklı kaynaklardan elde edilen mezenkimal kök hücrelerin karakterizasyonu açısından belirsizlikler vardır. Ancak yine de bütün mezenkimal kök hücreler Uluslararası Hücresel Tedavi Derneği'nin (International Society for Cellular Therapy) önerdiği üzere CD73, CD90 ve CD105 ortak belirteçlerini

ifade ederken, CD31, CD34 ve CD45 gibi belirteçleri taşımamaktadır (Dominici ve diğ. 2006).

Mezenkimal kök hücreler kemik iliği, adipoz doku, kordon kanı, göbek kordonu, amniyotik sıvı gibi pek çok dokudan elde edilebilmektedir. Ancak farklı kaynaklardan elde edilen mezenkimal kök hücreler buldukları nişlerin farklılığına bağlı olarak farklı genetik ve epigenetik mekanizmalara (Wagner ve diğ. 2005) sahiptir. Buna ek olarak büyüme, çoğalma, farklılaşma kapasitesi ve sitokin ve kemokin salgılayabilme gibi durumlar için de farklılıklar gösterebilmektedir (Friedman ve ark 2007). Mezenkimal kök hücreler buldukları dokulara göre immün düzenleme, apoptoz baskılama, fibrozis oluşumunu engelleme, anjiyogenezi uyarmak gibi bir takım işlevlere sahiptir. Öyle ki, kemik iliğinde bulunan mezenkimal kök hücreler ilişki içerisinde buldukları hematopoetik kök hücrelerin ve immün sistem hücrelerinin fizyolojik görevlerini kontrol etmektedir. (Kyurchiev ve diğ. 2014).

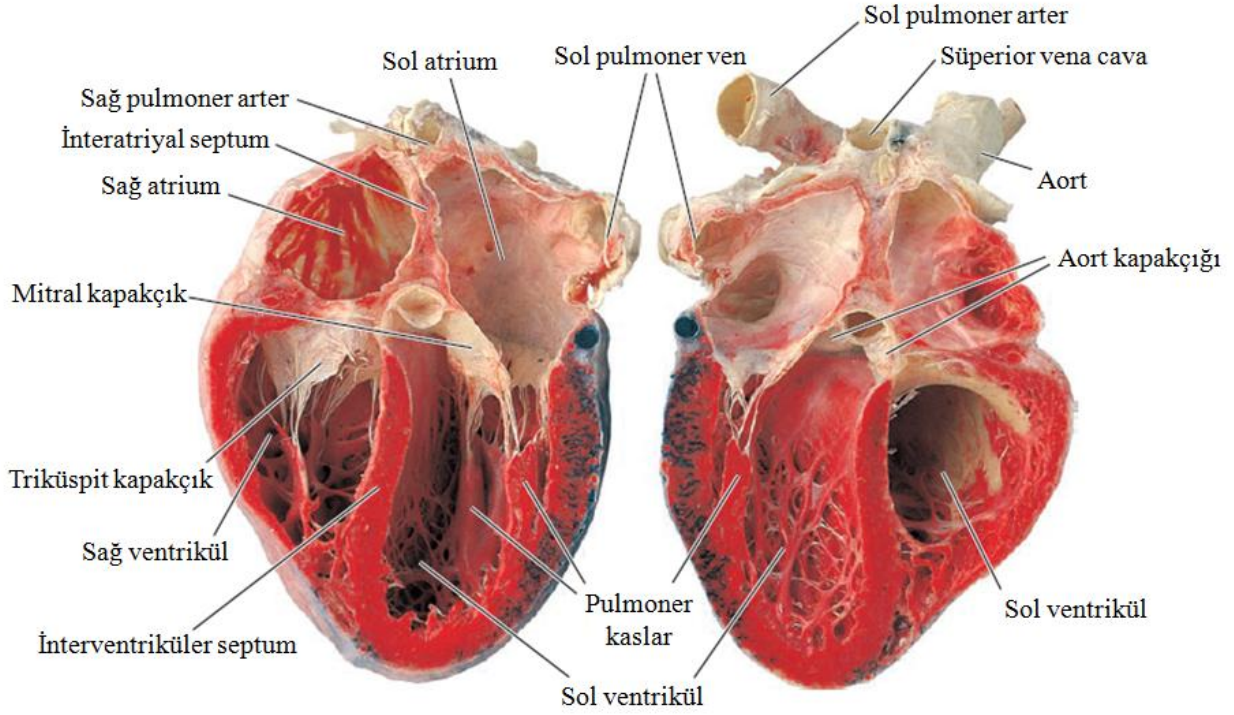
Mezenkimal kök hücrelerin immün sistemle bağlantılı özelliklerinden bir tanesi de MHC Sınıf II moleküllerini taşımaması ve bu sayede allojenik ve ksenojenik nakiller için elverişli olmasıdır. Mezenkimal kök hücrelerin immün düzenleyici etkilerinden yararlanarak, bu hücreler organ ve doku nakillerinde Graft versus Host hastalığının (GVHD) baskılanmasında oldukça etkili olup ve sık bir şekilde kullanılmaktadır. Mezenkimal kök hücrelerin multipotent kapasiteleri, in vitro olarak kültür ortamında çoğalma ve farklılaşma dinamikleri ve farklılaşma sonucu oluşturdukları somatik hücrelerin tanımlanmasına yönelik hala zıt görüşler mevcuttur. Ancak bu tartışmalar içerisinde mezenkimal kök hücrelerin embriyonik dönemde mezoderm germ yaprağından köken almasına rağmen, endotel hücresi (Oswald ve diğ. 2004), kardiyomyosit (Makino ve diğ. 1999), hepatosit (Snykers ve diğ. 2009), sinir hücresi ve astrosit gibi (Arthur ve diğ. 2008) mezoderm kökenli olmayan hücrelere de farklılaşma göstermesi başı çekmektedir.

1.4. Kalp Histolojisi

Kardiyovasküler sistem vücut içerisinde kalp ve dokular arasında besin, hormon, antikor, oksijen-karbondioksit ve hücre atık gibi maddeleri içeren kan ve lenf sıvılarını taşımada görevli mezodermal kökenli bir sistemdir. Bu taşıyıcı sistem kalp, kan damarları (atardamar, toplardamar, kılcal damar) ve lenf damarları olmak üzere başlıca 3 ana bileşenden meydana gelmektedir. Kardiyovasküler sistemin başlıca bileşenlerinden olan

kalp, nefes alış-verişine bağlı olarak göğüs kafesinde oluşan negatif basınç ve toplar damarların (ven) yakınında bulunan iskelet kaslarının kasılması yardımıyla toplanan kanın vücuda belirli bir basınç dahilinde geri pompalanmasını sağlamakla görevli olan organdır. Kardiyovasküler sistem kanın kalpten pompalandıktan sonra gideceği hedef dokuya göre pulmoner ve sistemik dolaşım olmak üzere iki farklı dolaşıma aracılık etmektedir. Kalpteki kanın hedef doku olarak akciğerlere pompalandığı ve tekrar kalbe geri getirildiği dolaşım şekli pulmoner dolaşımdır. Kalpteki kanın hedef olarak vücuttaki diğer tüm organlara pompalandığı ve damar sistemi aracılığıyla geri kalbe toplandığı dolaşıma ise sistemik dolaşım adı verilmektedir. Her iki dolaşımda da kan damarlarının anatomisine bakıldığında, arterlerin kapiller ile, kapillerin ise venler ile devamlılık içinde olduğu görülmektedir. Pulmoner ve sistemik dolaşımda kalpten pompalanarak çıkan ve atar damarlar (arter) ile taşınan kan, arterlerin devamlılık gösterdiği ince duvar yapısına sahip kılcal damarlardan (kapiller) geçerken Starling hipotezine uygun olarak basınç gradiyentine göre iki yönlü madde giriş-çıkışına olanak sağlamaktadır. Bu giriş-çıkış esnasında kapillerler içerisine giremeyen ekstraselüler sıvı lenf sistemi aracılığıyla toplanır ve lenf damarlarının bağlantılı olduğu arterlere iletilerek kan dolaşımına dahil edilir.

Kardiyovasküler sistemdeki kuvvet elemanı olan kalp gelişimsel olarak toraks boşluğunun sol kısmına daha yakın şekilde ve sternum, vertebral kolon, diyafram ve akciğerler arasında konuşlanmış oblik biçimli bir organdır (Ross ve Pawlina, 2014). Kalbin içinde bulunduğu boşlukta sabit kalmasını sağlayan ve komşu yapılarla sıkı şekilde tutunmasına olanak veren yapı ise kalbi çevreleyen perikard isimli fibröz bir kesedir. Kalp anatomik olarak sağ ve sol atriyumlar (kulakçık) ve sağ ve sol ventriküller (karıncık) olmak üzere 4 boşluk içeren müsküler bir yapıdır (Çizim 1.7). Kalbe gelen kan bu boşluklar içinde atriyum-ventrikül doğrultusunda tek yönlü olacak biçimde pompalanmaktadır. Kalbin sağ ve sol yarıları özel yapılar tarafından ikiye ayrılmış durumdadır. Bu yapılardan birincisi atriyumlar arasında bulunan, kalp kasından oluşan ve endokard ile döşenmiş interatriyal septumdur. İkinci ayırıcı yapı ise ventriküller arasında bulunan, fibröz dokudan ve bazı alanlar dışında yine aynı şekilde kalp kasından oluşan ve endokard ile döşenmiş interventriküler septumdur. Atriyum ve ventriküller arasındaki ayırım ise kanın ters yönlü akımını engelleyecek biküspit (mitral) ve triküspit kapakçıklar ile sağlanmaktadır.



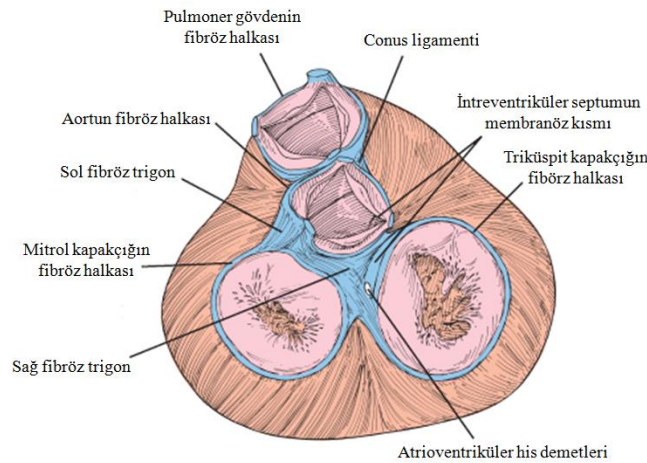
Çizim 1.7. Kalbin morfolojik yapısı.

Kalbin sağ yarısı pulmoner sisteme kan pompalamakla görevli olan kısımdır. Vücuttaki dokulardan toplanarak gelen ve karbondioksit, artık maddeler yönünden zengin kan *inferior* ve *superior vena cava* ile sağ atriyuma aktarılır. Kan sağ atriyumun kasılmasıyla sağ ventriküle iletilir. Sağ ventriküle dolan kan ise pulmoner kasların kasılmasıyla pulmoner dolaşıma katılarak oksijence zenginleştirilmek üzere akciğere gönderilir. Akciğerde “*Starling Hipotezi*”ne göre kapillerler seviyesinde karbondioksit bakımından temizlenerek oksijence zenginleşen kan pulmoner venler ile sol atriyuma geri döner (Hu ve Weinbaum 1999). Sol atriyumun kasılmasıyla sol ventriküle iletilen kan ventiküler kasılmayla aort aracılığıyla sistemik dolaşım kapsamında tüm vücuda pompalanır.

Genel anlamda bir yetişkin kalbi sistemik veya pulmoner dolaşıma dahil olması gereken kanı pompalamayı sağlayacak atriyal ve ventiküler kaslar, kalbin şeklinin korunmasına yardımcı olan fibröz iskelet, kalp dokusunun beslenmesi için gerekli arteriyal kan desteğinin sağlandığı koroner damar sistemi ve ve kalp kasının kasılması için gerekli impuls oluşumunu ve yayılmasını sağlayan iletim sistemi olmak üzere 4 yapıdan meydana gelmektedir.

Kalp kası, iskelet kası ile benzer histolojiye sahip kasılğan filamentlerden meydana gelmektedir. Bu benzerlik nedeniyle kalp kası dokusu histolojik incelemelerde hücrelerin ve filamentlerin oluşturduğu çizgiler meydana getirmektedir. Ayrıca bitişik kalp kası dokusu kalp kası hücrelerinin (kardiyomiyosit) arasındaki özelleşmiş hücre-hücre bağlantılarının oluşturduğu merdiven görünümüne interkalar disk olarak adlandırılan bantları da içermektedir. Kardiyomiyositler arasındaki tutunma bölgesini simgeleyen interkalar disk tipik ve özelleşmiş hücre-hücre bağlantıları fasiya adherens, makula adherens (desmozom) ve oluklu bağlantılar (gap junction) olmak üzere 3 tiptir. Fasiya adherens interkalar disk yapısının enine segmentini oluşturmaktadır ve sarkomerin ince filament bileşeninin plazma membranına bağlanmasıyla görevlidir. Makula adherens interkalar diskin hem enine hemde dikine olan segmentinde bulunarak kardiyomiyosit hücrelerinin kasılmasından doğan gerginlikle komşu hücrelerin birbirinden ayrılmasını engellemektedir. Oluklu bağlantılar interkalar disk yapısının lateral segmentinde yer almaktadır. Oluklu bağlantılar kalp kası hücreleri arasında iyon ve madde bütünlüğü oluşturacak tarzda bir geçişe izin vererek dokusal devamlılık meydana getirir ve böylece kalp kasının top yekün kasılmasına olanak sağlamaktadır.

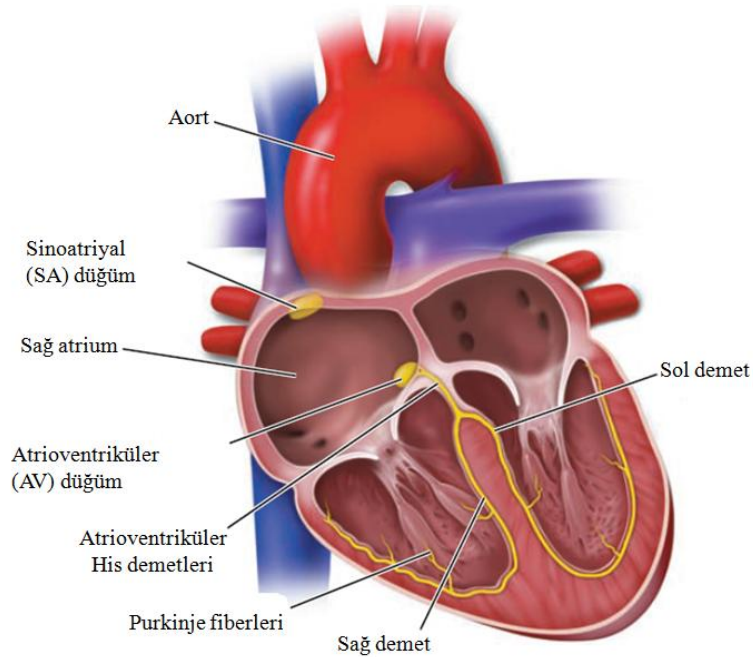
Kalbin fibröz iskeleti, kalp kapakçıklarının deliklerini çevreleyen fibröz halkalardan, halkaları birbirine bağlayan sol ve sağ fibröz trigonlardan ve kalp kasının yer almadığı interatriyal ve interventriküler septumların membranöz kısımlarından meydana gelmektedir (Çizim 1.8). Fibröz halkalar histolojik olarak sıkı bağ dokudan oluşmaktadır ve ilişkili olduğu dokuları tutunma alanları oluşturmakla görevlidirler. Ayrıca atriyum ve ventrikül arasında serbest impuls iletimini engelleyen bir yapı olarak da faaliyet göstermektedirler.



Çizim 1.8. Kalbin fibröz iskeleti.

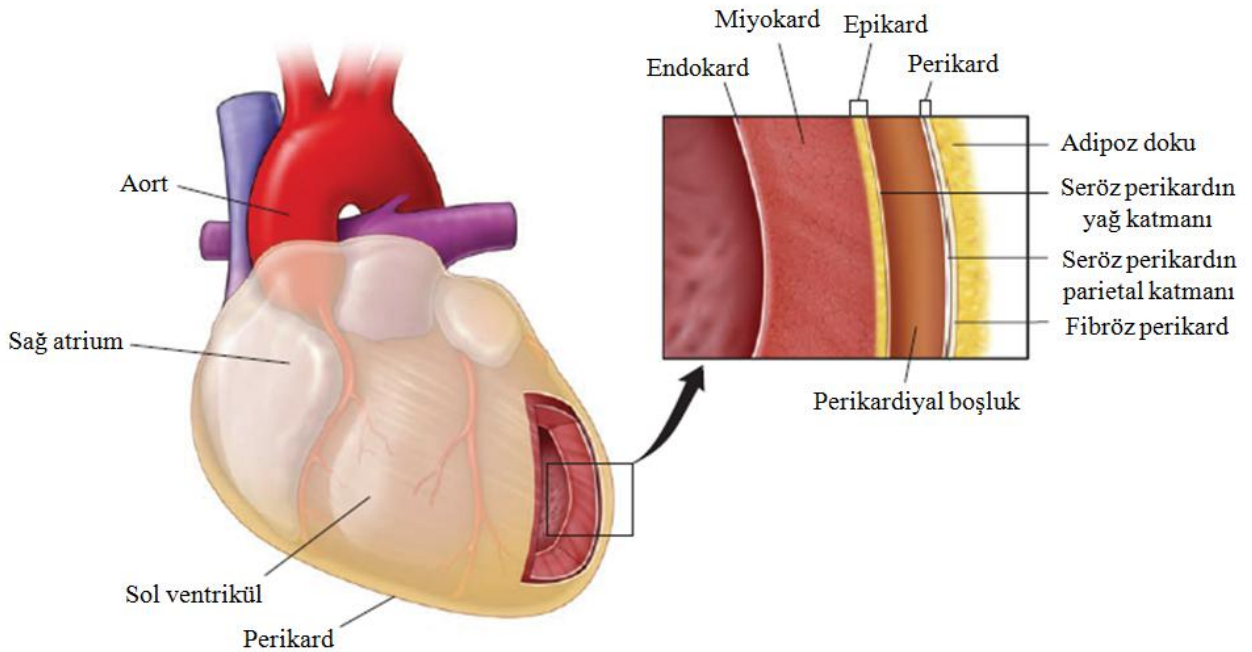
Kalbin koroner sistemi, kalp dokusunun fizyolojik olarak devamlılığını sağlayabilmesi için gerekli besin ve gaz alış-verişine imkan sağlayan iki adet koroner arter (sağ ve sol koroner arter) ve kardiyak venlerden meydana gelmektedir. Koroner arterler aortun çıkan kısmından dallanma yaparak başlarlar ve kalbin apeks bölgesine devam ederek kalbin ihtiyaç duyduğu kanı temin etmekle görevlidirler. Kardiyak venler ise karbondioksit ve atık maddeden zengin kirli kanın sağ atriyuma geri drene olmasını sağlayan koroner sinüslerle bağlantılıdır.

Kalbin iletim sistemi, kalbin ritmik şekilde kasılmasını sağlayan özelleşmiş yapılardan meydana gelmektedir. Bu iletim sistemi kalbin kasılması için gerekli elektriksel depolarizasyonu atriyum başlangıcında sinoatriyal düğüm ile, ventrikül girişinde ise atrioventriküler düğüm ile sağlamaktadır (Çizim 1.9). Özelleşmiş kalp hücreleri tarafından başlatılan elektriksel impuls sinoatriyal düğüm aracılığıyla atriyumu geçerek atrioventriküler düğümüne iletilir. Atrioventriküler düğümde toplanan impuls his demetleri ile fibröz iskelet üzerinden ventriküle aktarılmaktadır. His demetleri impulsu tüm ventriküle iletmek üzere önce sağ ve sol demet dallarına, sonra da kardiyak iletim hücrelerinden meydana gelen daha küçük boyutlardaki Purkinje fiberlerine ayrılmaktadır. Purkinje fiberlerinin yapısındaki hücreler arasında bulunan interkalar diskler sayesinde çok hızlı şekilde iletim sağlamaktadır.



Çizim 1.9. Kalbin impuls iletim sistemi.

Kalp duvarı, atriyumlarda ve ventriküllerde aynı düzenlenime sahip olmak üzere dıştan içe doğru epikard, miyokard ve endokard olarak isimlendirilen 3 tabakadan meydana gelmektedir (Çizim 1.10). Epikard tabakası kalbin en dış katmanı olup, mezotel hücrelerinden ve bunların alt kısmında yer alan yağ hücreleri ve bağ dokudan oluşmaktadır. Epikard tabakası içerdiği yağ hücreleri nedeniyle seröz perikardın visseral tabakası olarak da bilinmektedir. Koroner arter ve kalbe gelen sinirler epikard tabakasında yer almaktadır. Miyokardiyum kalp kası hücrelerinin (kardiyomiyosit) oluşturduğu ve kalbin ana işlevi olan pompalama için gerekli kuvvetin üretildiği tabakadır. Atriyumlardaki miyokard tabakası ventriküllerdekine nazaran daha incedir. Bunun sebebi ise atriyumlardaki kanın ventriküllere pompalanması için daha az bir kuvvet gerekirken, ventriküllerdeki kanın sistemik ya da pulmoner sisteme iletilebilmesi için daha yüksek seviyede bir kuvvetin gerekli olmasıdır. Endokard tabakası kalbin iletim sistemiyle ilişkili olan tabakasıdır ve kendi içerisinde 3 alt tabakaya ayrılmaktadır. Bunlar endotelial ve subendotelial bağ dokusunun oluşturduğu iç tabaka, bağ dokusu ve düz kas hücrelerinden oluşan orta tabaka ve subendokondriyal tabakadan oluşan ve miyokard ile devamlılık gösteren dış tabakadır.



Çizim 1.10. Kalbin histolojik katmanları.

Kalp kapakçıkları, bağ dokusu ve endokard tabakasından meydana gelmektedir. Kalp kapakçıkları ve bağlı olduğu bağ dokusu fibröz halkaları meydana getirmektedir. Her bir kalp kapakçığı fibroza, spongiyoza ve ventrikularis olmak üzere 3 tabakadan meydana

gelmektedir. Fibroza tabakası kapağın merkezi konumundadır ve düzensiz sıkı bağ dokusundan oluşur. Spongiyoza tabakası proteoglikan, kollajen ve elastik fiberlern meydana gelen ve kapakçıkların atriyumlara veya kan damarlarına bakan yüzeyindeki gevşek bağ dokusundan oluşur. Ventrikülaris elastik fiberler içeren ve endotel hücreleriyle döşenmiş sıkı bağ dokusundan meydana gelmektedir. Ventrikülaris tabakası kapakçıkların ventrikül veya atriyumlara bakan yüzeyinde bulunmaktadır.

1.4.1. Kalp Dokusunun Ekstrasellüler Matriksi

Kalp dokusu, kardiyomiyositler, fibroblastlar, endoteliyal hücreler, düz kas hücreleri, sinir hücreleri ve ekstrasellüler matriks proteinlerinden meydana gelmektedir (Bowers ve Baudino 2012). Fibriler bir ağ yapısında olan kalp ekstrasellüler matriksi, içinde bulunan hücrelerin işlev gösterebilmeleri için uygun mimari yapıyı, mekanik ve kimyasal sinyalleri, yumuşaklığı ve/veya sertliği ve direnci sağlamaktadır. Kalp dokusundaki hücreler için canlılık, çoğalma ve morfoloji bakımından anahtar role sahip olan ekstrasellüler matriks kalp hücrelerinin düzgün şekilde atım yapabilmesi için gerekli kan akış sistemine ve kalp hücrelerinin belli bir organizasyonda dizilim göstermesine de taban teşkil etmektedir (Curtis ve Russel 2011). Ekstrasellüler matriks proteinlerinin başlıca üretim kaynağı olan fibroblast hücreleri ve kalp dokusunun fonksiyonel elemanları olan kardiyomiyosit hücreleri toplam hücre miktarının yaklaşık %75'ini ihtiva etmektedir (Manabe ve diğ. 2002). Kalp ekstrasellüler matriksinde yer alan bir diğer önemli hücre grubu ise sinir hücreleridir. Kalbin ana işlevi olan kasılma olayının uyarıcısı olarak faaliyet gösteren otonom (vagal) ve sempatik sinir hücrelerinin uzantıları miyokard tabakasına kadar uzanmaktadır. Kalbin atrial ve ventriküler kasılabilmesi için gerekli olan uyarı vagus ve sempatik sinirlerin sinoatriyal ve atriyoventriküler düğümleri innerve etmesiyle sağlanmaktadır.

Miyokardiyal ekstrasellüler matriksi başlıca kollajen tip I, III, IV, V, VI'den, fibronektin, laminin ve elastin gibi glikoproteinlerden, kondroitin sülfat, heparin sülfat gibi proteoglikanlardan, hyaluronan gibi glikozaminoglikanlardan, ekstrasellüler proteazlardan ve ekstrasellüler matriks reseptörlerinden meydana gelmektedir. Ekstrasellüler matriksin glikoprotein, proteoglikan ve kollajen bileşenleri, integrin transmembran proteinleri aracılığıyla kardiyomiyosit hücrelerinin iskelet elemanlarıyla bağlantı kurarak dokunun geometrisini oluşturmaktadır. Öyle ki kardiyomiyositler $\alpha\beta1$ integrin reseptörü ile kollajen tip I proteinine, $\alpha3\beta1$ ve $\alpha5\beta1$ integrin reseptörü ile fibronektin proteinine ve

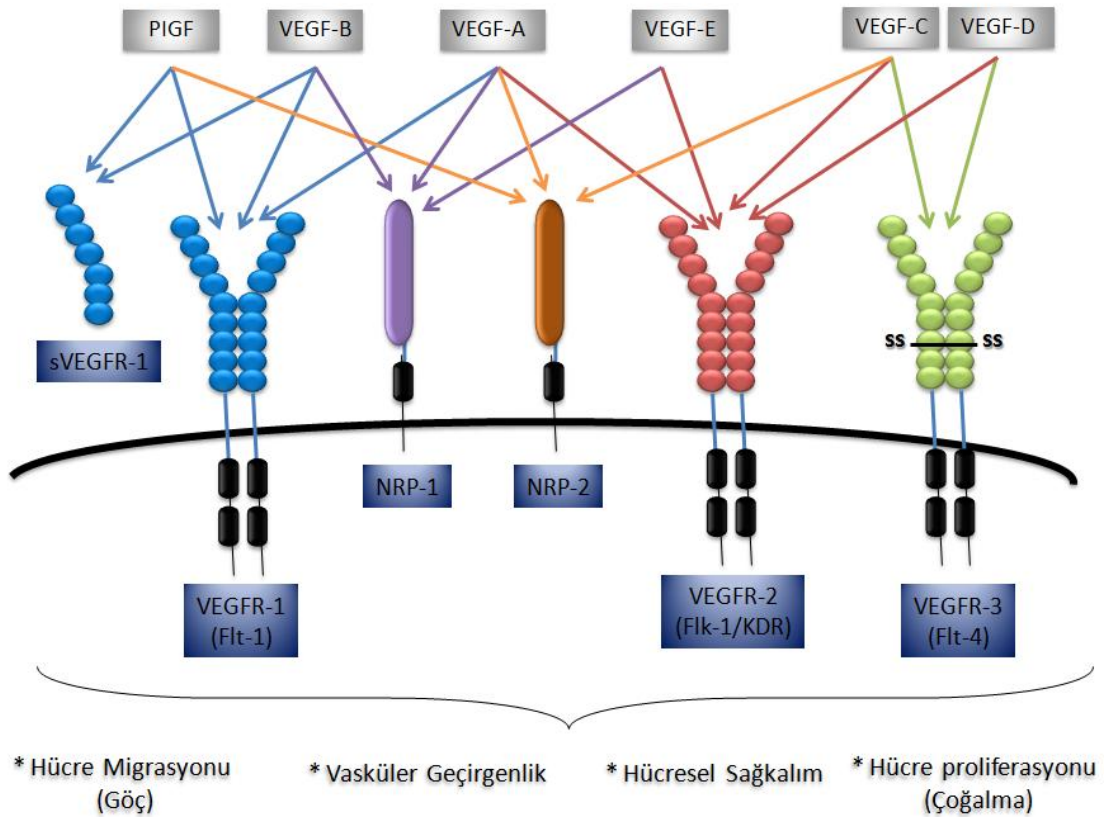
$\alpha1\beta1$, $\alpha3\beta1$ ve $\alpha7\beta1$ integrin reseptörü ile laminin proteinine bağlanmaktadır (Ross ve Borg 2001, Goldsmith ve Borg 2002). Bu bağlanma sonucunda integrin proteininin bağlantılı olduğu hücre içi ikincil moleküller yardımıyla aktifleşen ya da baskılanan sinyaller ile transkripsiyon seviyesinde değişimler meydana gelmektedir. Bu değişimler ile hücrelerin membran organizasyonu, canlılığını, sağkalımını ve döngüsünü kontrol edilmektedir.

Fibronektin, ekstraselüler matriksin temel bileşenlerinden birisidir. Proteoglikan yapısındaki yüksek moleküler ağırlığa sahip olan fibronektin integrinlere ($\alpha3\beta1$ ve $\alpha5\beta1$), kollajenlere ve fibrin moleküllerine bağlanarak kardiyomiyosit hücrelerinin fonksiyonuna ve sağkalımına aracılık etmektedir (Pankov ve Yamada 2002). Laminin, 400 kDa'luk boyutu ile ekstraselüler matriksin en yüksek moleküler ağırlığına sahip glikoproteinlerinden biridir. Bazal membranın bazal lamina tabakasında yoğunlukla bulunan laminin, ekstraselüler matriksteki hücrelerin dokuya tutunmasını ve dokunun üç boyutlu mimarisini kazanmasında oldukça önemli role sahiptir.

Kollajen, ekstraselüler matrikste en çok bulunan yapısal bileşendir ve kalp dokusundaki hücreler tarafından üretilmektedir. Kollajen tip I ve tip III fibroblast ve düz kas hücrelerinden sentezlenirken, kollajen tip IV ise kardiyomiyositler ve endotel hücrelerinden sentezlenmektedir (Corda ve diğ. 2000). Kollajen memelilerde en çok bulunan protein olması nedeniyle, vücut ağırlığının ortalama %25-30'unu oluşturmaktadır. Kalp ekstraselüler matriksinde fizyolojik olarak en önemli kollajen tiplerinden olan kollajen tip I (total kollajenin %85'ini oluşturur) gerilme kuvvetine karşı direnci sağlamakla görevliken, kollajen tip III (total kollajenin %11'ini oluşturur) ise dokunun üç boyutlu mimarisinin devamlılığında işlev göstermektedir (Jugdutt 2003). Kollajen proteinlerinin dokuda aşırı miktarda birikmesi kalpte fibrozis gelişmesine neden olmaktadır. Bu nedenle kardiyak fizyolojinin devamlılığı için ekstraselüler matriks bileşenlerinin miktarı kontrol altında tutulmaktadır. Söz konusu bu kontrol mekanizması, kollajen, fibronektin, proteoglikan, laminin ve jelatin gibi bileşenlerin parçalanmasında görevli olan matriks metalloproteazlar ve bu enzimlerin inhibitörleri tarafından düzenlenmektedir. Bu enzim-inhibitör ikilisinin arasındaki denge ile kalp ekstraselüler matriksinin homeostazını sağlamaktadır ve kalp dokusu patolojik süreçlerden korunmaktadır (Ahmed ve diğ. 2006, Moore ve diğ. 2012).

1.5. Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF)

Vasküler endotelial büyüme faktörü (vascular endothelial growth factor; VEGF) çok işlevli bir büyüme faktörüdür. VEGF proteini endotel hücrelerinde, makrofajlarda, aktif T-hücrelerinde ve diğer hücre tiplerinde üretilmektedir (Melter ve diğ. 2000). VEGF ailesi VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E ve plasenta büyüme faktörü (placenta growth factor; PlGF) olmak üzere 6 farklı ligand proteininden meydana gelmektedir. VEGF reseptörleri (VEGFR) ise VEGF-1, VEGF-2, VEGF-3 ve NRP-1 (neuropilin-1) ve NRP-2 (neuropilin-2) yardımcı reseptörleri (coreceptor) olmak üzere toplam 5 farklı reseptörden oluşmaktadır (Çizim 1.11). VEGF proteinleri ve onların reseptörleri (VEGFR) embriyonik süreç, tümör oluşumu, kardiyak iske mi ve yara iyileşmesi vb. gibi fizyolojik durumlarda anjiyogenez, vaskülojenez ve vasküler geçirgenlik mekanizmalarından sorumlu moleküllerdir. VEGF geninin ifadesi ise hipoksi, büyüme faktörleri, tümör oluşumu ve östrojen, TSH ve nitrik oksit (NO) üretimi gibi çeşitli uyaranlar tarafından transkripsiyon ve translasyon seviyelerinde kontrol edilmektedir (Xie ve diğ. 2004).



Çizim 1.11. VEGF ve VEGFR tipleri.

1.5.1. Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF) Tipleri

VEGF-A

İnsan VEGF-A geni 8 ekzon ve 7 intron içerecek bir mRNA'yı kodlayacak diziye sahiptir ve genomda 6p21.3 bölgesinde lokalize halde bulunmaktadır (Houck ve diğ. 1991, Vincenti ve diğ. 1996). 1, 2, 3, 4, 5 ve 8.ekzondan kodlanan protein kısmı öncü protein olarak sentezlenir ve 7.ekzondan kodlanan katyonik protein kısmı ile birleşerek bütün VEGF-A proteinini meydana getirir. VEGF-A genininden üretilen mRNA'nın alternatif kesim mekanizmasının sonucu olarak VEGF₁₂₁, VEGF₁₄₅, VEGF₁₄₈, VEGF₁₆₂, VEGF₁₆₅, VEGF_{165b}, VEGF₁₈₃, VEGF₁₈₉ ve VEGF₂₀₆ olmak üzere 9 farklı alt tipi bulunmaktadır (Bates ve Harper 2003). Bu alt tiplerinden hepsi sahip oldukları sinyal dizileri sayesinde bağlandıkları reseptör molekülünde bir sinyal başlatırlar. VEGF izoformlarının vücut içindeki seviyelerinin düzenlenmesine dair kesin bilgiler bulunmamakla birlikte, VEGF üreten hücrelerin daha çok VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅ ve VEGF₁₈₉ izoformlarını sentezlediği bilinmektedir. VEGF₁₆₅ yaklaşık 46 kDa ağırlığında bir izoformdur. Homodimer olarak sentezlenen bu molekül ekzon 7 tarafından kodlanan 15 amino asitlik bir bağlanma bölgesiyle heparine bağlanma özelliği gösterir (Leung ve diğ. 1989). VEGF₁₂₁ ekzon 6 ve ekzon 7 eksik olan bir mRNA tarafından kodlandığı için heparine bağlanma özelliği içermemektedir ve hücreden serbest olarak salınmaktadır. VEGF₁₈₉ ekzon 6 ve ekzon 7 tarafından kodlanan bir bağlanma bölgesi ise heparine ve heparan sülfat proteoglikanlara çok güçlü şekilde bağlanarak ekstraselüler matrikste kalmasını sağlamaktadır. VEGF-A VEGFR-1, VEGFR-2 reseptörlerine ve bunların yardımcı reseptörleri NRP-1 ve NRP-2'ye seçimli olarak bağlanabilmektedir. Örneğin, VEGF₁₆₅ NRP-1 ve NRP-2'ye bağlanırken, VEGF₁₄₅ yalnızca NRP-2'ye bağlanmaktadır (Gluzman-Poltorak ve diğ. 2000).

VEGF-B

VEGF-B çok çeşitli dokularda bulunmasının yanı sıra, özellikle kalp ve iskelet kası dokularında sıklıkla üretilmektedir. VEGF-B molekülü 6.ekzonda geçirdiği alternatif kesim sonrasında VEGF-B₁₈₆ ve VEGF-B₁₆₇ olmak üzere iki farklı izoform olarak sentezlenmektedir (Makinen ve diğ. 1999). Bu VEGF-B₁₈₆ ve VEGF-B₁₆₇ izoformları VEGFR-1 ve NRP-1 reseptörlerine bağlanarak monosit aktivasyonu, inflamatuvar artrit

vasküler düzenleme ve iskemi yaralanmalarından korunma gibi fizyolojik olaylarda rol oynamaktadır (Mould ve diğ. 2003, Sun ve diğ. 2004).

VEGF-C ve VEGF-D

VEGF-C proteini VEGF₁₆₅ ile yaklaşık %30'luk amino asit benzerliği içeren 388 amino asitlik bir polipeptid zincirinden meydana gelmektedir. Ancak VEGF-C diğer VEGF tiplerinin aksine N-terminal ve C-terminal uçlarının yapısı itibariyle en çok VEGF-D proteinine benzerlik göstermektedir. Preproprotein (öncü) formda üretilen VEGF-C ve VEGF-D molekülleri üretildikten sonra proteolitik olgunlaşma süreci geçirmektedir. Öyle ki uzun N-terminal ve C-terminal propeptidleri içeren bu preproprotein formu art arda iki proteolitik kesim geçirmektedir. Proteolitik kesimler neticesinde VEGFR2 ve VEGFR-3 reseptörlerine yüksek bağlanma ilgisine sahip VEGF-C ve VEGF-D proteinleri meydana gelmektedir. VEGF-C proteini VEGF-2 ve VEGF-3 reseptörlerine ve NRP-2 yardımcı reseptörüne bağlanırken, VEGF-D proteini yalnızca VEGFR-3 reseptörüne bağlanır. Söz konusu bağlanmalar sonucunda VEGF-C proteini damar ve lenf endotelial hücrelerinde parakrin etkiyle mitojenik aktivasyon sağlanmaktadır (Veikkola ve diğ. 2003, Karkkainen ve diğ. 2004). VEGF-D proteini ise reseptör etkileşimiyle tümör dokusunda lenfanjiyogenezi ve metaztazi uyarmaktadır (Stacker ve diğ. 2001).

VEGF-E

VEGF-E proteini ilk olarak parapoxvirus tipi Orf virus genomunda tanımlanmıştır (Lyttle ve diğ. 1994). VEGF-E amino asit dizilimi açısından VEGF₁₆₅ ile %25'lik benzerlik içermesine rağmen, VEGF₁₆₅'in aksine yalnızca VEGFR-2 bağlanabilir. Esas olarak VEGF-E molekülü VEGF-E_{NZ-2}, VEGF-E_{NZ-7}, VEGF-E_{NZ-10}, VEGF-E_{D1701} ve VEGF-E_{VR634} proteinlerinden oluşan bir protein grubu için kullanılan genel bir terimdir. Ancak heparine bağlanma özelliği içermemesine rağmen endotelial hücreler üzerindeki mitojenik etki ve anjiyogenezi artırmak açısından VEGF₁₆₅ ile benzer potansiyele sahiptir (Takahashi ve Shibuya 2005).

PIGF

PIGF proteini tüm gebelik süreci boyunca plasentada yüksek seviyede ifade edilen ve VEGF ailesinin ilk tanımlanan proteindir (Maglione ve diğ. 1991). PIGF plasentadan başka kalp, akciğer, tiroid bezi ve iskelet kaslarında da ifade edilmektedir (Persico ve diğ. 1999). PIGF genindeki alternatif kesim mekanizması nedeniyle PIGF-1 (PIGF₁₃₁), PIGF-2 (PIGF₁₅₂), PIGF-3 (PIGF₂₀₃) ve PIGF-4 (PIGF₂₂₄) olmak üzere 4 izoform bulunmaktadır. PIGF-1 en kısa izoformdur ve tıpkı PIGF-3 izoformu gibi heparine bağlanma özelliğine sahip değildir (Cao ve diğ. 1997). PIGF-4 heparine ve PIGF-2 ise hem heparine hemde NRP-1 ve NRP-2 yardımcı reseptörlerine bağlanabilmektedir (Yang ve diğ. 2003). Bu 4 izoformun hepsi VEGFR-1 reseptörüne bağlanmaktadır (Sawano ve diğ. 1996). PIGF ve VEGFR-1 etkileşimi sonucunda anjiyogenez, iskemi, inflamasyon, yara iyileşmesi ve kanser gibi durumlarda kolateral büyüme görülmektedir (Carmeliet ve diğ. 2001).

1.5.2. Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü Reseptörü (VEGFR) Tipleri

VEGFR-1

VEGFR-1, 180 kDa ağırlığında bir membran proteindir. VEGFR-1 reseptörü yapısındaki ikinci Ig domaini ile VEGF-A, VEGF-B ve PIGF ligandlarına yüksek etkinlikte bağlanabilen bir reseptördür. VEGFR-1 başlıca vasküler endotelial hücrelerde olmak üzere, makrofaj, monosit ve hematopoetik kök hücre gibi non-endotelial hücrelerde de ifade edilmektedir. VEGFR-1 reseptörü aracılığıyla başlatılan hücrel sinyal sonucunda hematopoetik kök hücrelerin farklılaşmasını ve makrofaj/monositlerin migrasyonunu uyarmaktadır. (Sawano ve diğ. 2001, Hattori ve diğ. 2002). Ayrıca VEGF-1 molekülü erken embriyonik gelişim sürecinde anjiyogenezi baskılayıcı bir etkiye sahip olmasına rağmen, patolojik durumlar söz konusu olduğunda anjiyogenezi tetiklemektedir. Çözülebilir formdaki VEGFR-1 (sVEGFR-1), VEGF-A proteinine bağlanarak bu molekülün diğer reseptörlerle olan etkileşimini ve VEGFR-2'e bağlanıp heterodimer oluşturarak VEGFR-2 aracılı hücrel sinyallerin başlatılmasını engellemektedir (Kendall ve diğ. 1996).

VEGFR-2

VEGFR-2, 200-230 kDa ağırlığında bir membran proteindir. VEGFR-2 reseptörü VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D ve VEGF-E ligandlarına yüksek etkinlikte bağlanabilen bir reseptördür. VEGFR-2 başlıca vasküler ve lenfatik endotelial hücrelerde olmak üzere, megakaryosit ve hematopoetik kök hücreler gibi diğer hücrelerde de üretilmektedir (Kato ve diğ. 1995). VEGFR-2 ifade edildiği hücrelerde özellikle VEGF-A ligandı ile etkileşimi sonucu mitojenik, anjiyogenik ve geçirgenlik artırıcı etkileri ortaya koymaktadır (NagY ve diğ. 2002, Hong ve diğ. 2004). Son zamanlarda insan ve fare plazma içerisinde tanımlanan çözülebilir VEGFR-2 (sVEGFR-2)'nin de VEGF aracılı anjiyogenez mekanizmasında düzenleyici rolleri olduğu düşünülmektedir (Ebos ve diğ. 2004).

VEGFR-3

VEGFR-3, 195 kDa ağırlığında bir membran proteindir. VEGFR-3 reseptörü VEGF-C ve VEGF-D ligandlarına yüksek etkinlikte bağlanabilen bir reseptördür. VEGFR-1 ve VEGFR-2 reseptörlerinin aksine, VEGFR-3 reseptörü üretildikten sonra üç boyutlu protein yapısında bulunan 5. ekstraselüler Ig halkasından proteolitik kesime uğrar. Bu proteoliziz sonucunda 120 kDa ve 75 kDa ağırlıklarında oluşan iki parça membrana taşınmadan önce disülfid bağları ile bağlanarak dimer oluşturur (Lohela ve diğ. 2003). VEGFR-3 reseptörünün ligandları ile uyarılması lenfanjiyogenezin uyarılması için gerekli ve yeterlidir. Bu uyarılma endotel hücrelerini serum yetersizliği ile başlatılan apoptozdan korumaktadır (Makinen ve diğ. 2001).

VEGFR-3 reseptörü kazanılmış bağışıklık yanıtında da rol oynamaktadır. Öyle ki, yapılan bir çalışma VEGFR-3 sinyalinin baskılanmasının korneada bulunan dendritik hücrelerin lenf nodlarına geçişini engellediğini ve kornea nakli sonrasında hipersensivite ile birlikte immün red yanıtın gelişmesine yol açtığını ortaya koymuştur (Chen ve diğ. 2004).

NRP-1 ve NRP-2

NRP-1, 130-140 kDa ağırlığında bir membran glikoproteindir. NRP-1 reseptörü ilk olarak aksonal yönlenme (rehberlik) mekanizmasında görevli bir semaforin reseptörü olarak tanımlanmıştır ve daha sonra VEGF-A molekülü içinde özgül bir reseptör olduğu

gösterilmiştir (Neufeld ve diğ. 2002). NRP-2 reseptörü ise NRP-1 reseptörü ile amino asit seviyesinde %44'lük bir homoloji göstermektedir. NRP-1 reseptörü VEGF₁₆₅, VEGF-B, PIGF-2 ve bazı VEGF-E proteinlerine bağlanırken, NRP-2 reseptörü VEGF₁₄₅, VEGF₁₆₅, PIGF-2 ve VEGF-C ligandlarına bağlanır.

NRP reseptörlerinin intraselüler domainleri kısadır ve bu nedenle hücre içinde biyolojik bir sinyal iletimi başlatmak için yeterli değildir. Ancak diğer VEGF reseptörlerine yardımcı reseptör olarak yardım eder ve çeşitli sinyal yollarını aktifleştirir. Örneğin, VEGF₁₆₅ ile hücrelerel göç ve çoğalmasını tetiklenen hücrelerde VEGFR-2 reseptörünün ifade edilme düzeyinin NRP-1 varlığı ile arttığı gösterilmiştir (Schuch ve diğ. 2002). Transgenik fareler ile yapılan bir in vivo çalışma, NRP-1 reseptörü baskılanmış hayvanlarda yalnızca nöronal gelişimde değil, kardiyovasküler yapıların oluşumunda da ciddi sorunlar meydana geldiğini göstermiştir (Kawasaki ve diğ. 1999). NRP-2 geni baskılanmış fareler üzerinde yapılan bir diğer çalışmada ise lenfatik damarların ve kapillerlerin ya hiç gelişmediği ya da ciddi problemler ile geliştiği belirtilmiştir (Yuan ve diğ. 2002).

1.6. Doku Mühendisliği

Canlı vücudunda meydana gelen travmalar sonucunda ilgili doku ve/veya organda çeşitli yaralanma ve işlev bozuklukları meydana gelmektedir. Kök hücreler ve ilişkili oldukları somatik hücreler ve ekstraselüler matriks elemanları gibi canlılık bileşenleri oluşan bu travmatik hasarları ortadan kaldırmak noktasında oldukça yüksek bir potansiyele sahiptir. Ancak vücutta meydana gelebilecek travmatik hasarlar canlılığı tehdit edecek kadar üst boyutlara ulaştığında, travmatik hasarların giderilmesinde bu potansiyel yetersiz kalmaktadır. Kök hücre ve doku mühendisliği çalışmaları ciddi yaralanma ve hasar durumlarının giderilmesi için gerekli potansiyeli sağlamak adına rejeneratif (yenileyici) ve reperatif (onarıcı) tedavi yaklaşımları üretmektedir. Doku mühendisliği tekniklerini ve kök hücre tabanlı tedavileri bir araya getiren bu yaklaşımlar ile vücudun sahip olduğu rejeneratif gücün tetiklenmesi ya da artırılması, normal fizyolojinin devamlılığının sağlanması ve hasarlı dokuların ya da organların tamir edilmesi hedeflenmektedir.

Doku mühendisliği, tıp, matematik, fizik, malzeme bilimi gibi pek çok bilim dalını kapsayan ve hücreleri, biyolojik olarak aktif sinyal moleküllerini ve yapı iskelelerini işlevsel bir doku oluşturmak üzere bir araya getiren disiplinlerarası bir bilim dalıdır. Daima

gelişim içerisinde olan doku mühendisliği bilimi rejeneratif ve reperatif tıp uygulamaları için vücudun ihtiyaç duyduğu biyolojik yapıları taklit etmek ve hatta doğala en yakın yapıyı diğer bir deyişle aynılarını üretmeyi amaçlamaktadır.

Kök hücreler, vücudun kendini yenileme ve onarma mekanizmasının merkezinde yer alan aktörlerden biridir. Bu hücrelerin sahip oldukları rejeneratif ve reperatif potansiyele ilişkin bilgilerin çoğu klasik kültür koşullarında yapılan çalışmalardan elde edilmiştir. Ancak klasik kültür koşulları, diğer bir deyişle iki boyutlu (2-B) kültür koşulları, kök hücrelerin vücut içindeki işlevlerini taklit etmek konusunda yetersiz kalmaktadır. Öyle ki, plastik kültür kaplarına yapışarak düz bir katman ya da katmanlar halinde büyüüp çoğalan hücreler organların üç boyutlu (3-B) mimarisini morfolojik, fizyolojik ve histolojik açıdan tam anlamıyla taklit edememektedir. 2-B kültür çalışmalarının içerdiği bu sınırlılıklara çözüm olarak geliştirilen doku mühendisliği ve kök hücre tabanlı 3-B kültür çalışmaları ile hücrelerin çoğalması, farklılaşması, morfolojisi, fizyolojisi, uyarılara verdiği tepkiler, gen ve protein ifade profilleri, migrasyon kapasiteleri ve ilaç metabolizmaları gibi pek çok fonksiyonu daha iyi taklit edilebilmektedir. Doku mühendisliği biliminin sunduğu bu mimetik özellik daha potansiyel doku ya da organ tasarımına olanak sağlamaktadır.

Doku mühendisliğinin temelindeki 3 ana bileşen olan hücre, yapı iskelesi ve biyolojik olarak aktif moleküller birbirleriyle etkileşim halindedirler. Laboratuvar ortamında teknolojinin sunduğu cihazlar ve tekniklerle polilaktik asit (PLA), polilaktik koglolik asit (PLGA), polietilen glikol (PEG), polikaprolakton (PCL) vs. içerikli yapay doku iskeleleri ve deselülarize edilmiş doğal yapı iskeleleri doku mühendisliği çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır. Bu yapı iskeleleri üzerinde çoğaltılan ya da farklılaştırılan uygun tipteki mezenkimal kök hücre, embriyonik kök hücre ya da uyarılmış pluripotent kök hücre gibi hücreler biyolojik olarak aktif moleküllerden aldıkları sinyaller neticesinde doğru morfolojiye ve işleve sahip hücrelere dönüşebilmektedir. Biyolojik olarak aktif moleküllerden gelen sinyaller yalnızca üretilmek istenen doku ve organın başlıca işlevsel hücre tiplerini oluşturulmasıyla sonuçlanmaktadır. Vasküler endotelial büyüme faktörü (vascular endothelial growth factor, VEGF), fibroblast büyüme faktörü (fibroblast growth factor, FGF), angiopoetin gibi moleküller yapı iskelesindeki damar ağının oluşumunu uyarmaktadır. (Chiu ve Radisic 2010, Freeman ve Cohen 2009).

Zaman içerisinde gerçekleşen teknolojik ilerlemeler doku mühendisliği bilimi için pek çok biyolojik yapının üretilmesine aracılık etmiştir. Laboratuvar ortamında üretilen bu işlevsel doku ve organların hasarlı doku ve/veya organların tamiri için kullanılmasının yolu açılmıştır. Ancak yapay yapı iskeleleriyle alakalı biyouyumluluk ve biyobozunur olmak ve gerekli damar ağını içermemek gibi durumlar doku mühendisliği çalışmalarında oldukça önemli problemlerdir. Yapay yapı iskelelerinin beraberinde getirdiği bu problemlere çözüm olarak, tamamen biyouyumluluk gösteren ve mükemmel en yakın ekstraselüler matriks bileşenlerine ve damar ağına sahip olan hücrelerinden arındırılmış deselülarize doğal yapı iskeleleri kullanılmaktadır. Doğal yapı iskeleleri, yapay olarak üretilmiş yapı iskelelerinin aksine hücrelerin yerleşebilmesi, iskele içinde hareket edebilmesi, diğer hücrelerle ya da bileşenlerle etkileşim halinde olabilmesi ve madde alış-verişi yapabilmesi için uygun boyutlarda ve sayıda porlu bir mimari de sağlamaktadır. Bunlara ek olarak, henüz tam anlamıyla işlevsel ve yeterli kompleksliğe sahip doku ve organların üretilmesinden oldukça uzak olunması nedeniyle, doku mühendisliği çalışmaları için hücrelerin, yapı iskelelerinin ve diğer biyolojik olarak aktif moleküllerin özellikleri ve görevleri hakkında halen daha çok bilgiye ihtiyaç duyulmaktadır.

1.7. Deselülarizasyon

Doku ve organlar ana olarak iki temel yapıdan meydana gelmektedir. Bunlar doku ve organların fizyolojik işlevini göstereceği hücreler ve hücrelerin işlevleri üzerinde düzenleyici ve destekleyici etkiye sahip olan ekstraselüler matriks bileşenleridir. Deselülarizasyon, doku mühendisliği çalışmaları için doğal yapı iskelesi elde etmek adına kullanılan bir tekniktir. Deselülarizasyon tekniğinde mantık çeşitli fiziksel ve/veya kimyasal ajanlar kullanılarak hücreleri etkileşimde oldukları ekstraselüler matriks bileşenlerinden uzaklaştırarak, orijinal mimarisi korunmuş bir yapı iskelesi elde etmektir. Deselülarizasyon tekniği yalnızca dokuları, uygulanan ajan ile hücrelerinden ve nükleer materyallerden arındırmayı kapsamamaktadır. Bunun yanı sıra kullanılan ajanın üç boyutlu doku mimarisine vereceği zararın en az olması da bu tekniğin en önemli kriterlerinden birisidir. Dokuların veya organların deselülarizasyonu için genellikle kimyasal ve fiziksel uygulamaların birlikte kullanımı, matriks bütünlüğünün korunması ve işlevselliğinin korunması açısından daha başarılı sonuçlar vermektedir. Ancak deselülarizasyon etkinliğini belirleyen etmenlerin başında dokunun biyokimyasal içeriği gelmektedir.

Ksenojenik ve allojenik nakillerde en sık karşılaşılan sorunlardan birisi de hücrel antijenlerin alıcının immün sistemi tarafından yabancı olarak algılanıp vücutta bir immün yanıt başlatılmasıdır. Ekstraselüler matriks bileşenleri türler arasında korunduğu ve ksenojenik nakillerde bile kullanılabilirdiği için rejeneratif ve reperatif tıp çalışmalarında gittikçe artan oranda bir ilgi odağı haline gelmektedir (Exposito ve diğ. 1992, Mazza ve diğ. 2015). Öyle ki, kalp kapakçığı (Schenke-Layland ve diğ. 2003), kan damarları (Dahl ve diğ. 2003), deri (Chen ve diğ. 2004), iskelet kası (Borschel ve diğ. 2004), idrar kesesi (Freytes ve diğ. 2004) ve karaciğer (Lin ve diğ. 2004) gibi çeşitli organ ve dokulardan elde edilen ekstraselüler matriksler doku mühendisliği ve rejeneratif tıp alanları için çalışma konusu olmuştur.

Deselülarizasyon ve doku mühendisliği alanındaki gelişmelerle birlikte tam organ deselülarizasyonu başarıyla gerçekleştirilebilir hale gelmiştir (Shupe ve diğ. 2010, Guyette ve diğ. 2008). Donör kısıtlılığı, nakil sonrası doku uyumsuzluğu riski, ömür boyu immün baskılayıcı ilaç kullanma zorunluluğu ve graft versus host hastalıkları organ yetmezliklerini daha da ciddi hale getiren problemlerdir. Deselülarizasyon ile elde edilen doğal yapı iskeleleri ve bu iskelelerin bireyin kendi hücreleriyle tekrardan donatılması (reselülarizasyon) söz konusu problemlere çözüm niteliğindedir.

Deselülarizasyon sonucunda iskele üzerinde kalan biyolojik kalıntılar deselülarizasyonun etkinliğini belirlemektedir. Kaliteli deselülarizasyonun başarılı bir reselülarizasyon için altın kural olması nedeniyle, deselülarizasyon tekniğinin klinik kullanımda yer almasından önce optimize edilmesi zorunludur (Brown ve diğ. 2009).

Organ ve dokuların hücrelerinden arındırılması için fiziksel ajanlar, enzimatik ajanlar ve asit, baz, hipotonik ve hipertonic çözelti, deterjan, alkol gibi kimyasal ajanlar kullanılmaktadır. Bahsi geçen hücrel arındırma için kullanılan ajanlar, dokunun perfüzyonu, basınç gradiyentine maruz bırakılması ve sıvı içerisinde bekletilmesi ya da çalkalanması gibi yöntemlerle birlikte kullanılmaktadır. Perfüzyon yöntemiyle yapılacak deselülarizasyon doku veya organın damar ağına bağlanan peristaltik sistem aracılığıyla sağlanmaktadır. Perfüzyon sistemi ve uygun kimyasal ve/veya enzimatik ajan kullanılarak kalp (Guyette ve diğ. 2014), karaciğer (Öztürk 2015), akciğer (Gilpin ve diğ. 2014) ve böbrek (Liu ve diğ. 2015) gibi başlıca organların deselülarizasyonu etkili bir şekilde yapılabilmektedir. Basınç gradiyenti yöntemi, enzimatik ajanlarla yapılan deselülarizasyonun başarısını yükselten yardımcı yöntemlerdendir. Sıvıda bekletme ya da sıvıda çalkalama yöntemiyle yapılan deselülarizasyonda ana mantık kullanılan ajanın doku

içine difüzyon yoluyla yayılması ve etkisini göstermesidir. Etkili difüzyona olanak sağlayacak kornea (Wilson ve diğ. 2016), testis (Baert ve diğ. 2015), mesane (Yang ve diğ. 2010), kıkırdak ve damar (Duisit ve diğ. 2018), tendon (Deeken ve diğ. 2011) gibi dokular veya organlar bu yöntemle hücrelerinden arındırılabilir. Deselülarizasyon için kullanılacak ajanın ve yöntemin seçiminde dokunun protein, lipit ve karbonhidrat kompozisyonu, katmanlı olup olmaması, hacmi ve dokudaki hücrelerin yoğunluğu gibi etmenler önem arz etmektedir. Ayrıca dokunun sahip olduğu histolojik özellikler deselülarizasyon sürecinin uzunluğunu da belirlemektedir.

Fiziksel ajanlar etkili bir deselülarizasyon gerçekleştirmekten ziyade, diğer ajanlarla birlikte kullanıldığında deselülarizasyonu kolaylaştıracak etkiler ortaya koymaktadır. Dondur-çöz, basınç uygulama, sonikasyon ve çalkalama gibi uygulamalar deselülarizasyon için kullanılan fiziksel ajanlardır. Dondur-çöz tekniğiyle yapılan deselülarizasyonda hücre içi buz kristallerinin oluşumu membran yapılarının parçalanmasına ve hücrelerin lizize uğramasına neden olmaktadır. Dondur-çöz tekniğinde sıcaklık değişimleri kontrollü şekilde gerçekleştirilmelidir. Çünkü söz konusu sıcaklık değişimleri sonucunda oluşan buz kristalleri aynı zamanda ekstraselüler matriksin mikro mimarisi açısından da risk teşkil etmektedir. Ayrıca bu teknikle yapılan deselülarizasyonda hücre kalıntılarının ortamdan uzaklaştırılması gibi işlemlere de gereksinim duyulmaktadır. Dondur-çöz tekniği tendon, ligament (Jackson ve diğ. 1990, Roberts ve diğ. 1991) ve sinir dokusu (Gulati 1988) gibi yapıların deselülarizasyonu için kullanılmaktadır. Basınç uygulama yöntemi de hücrelerin parçalanması için kullanılacak yardımcı tekniklerden biridir. Ancak bu tekniğin ekstraselüler matrikse verdiği zararın fazla olması ve sıkı bağ dokusundan zengin organ veya dokular için elverişli olmaması nedeniyle deselülarizasyon uygulamalarında pek kullanılmamaktadır. Mekanik çalkalama ve sonikasyon gibi fiziksel ajanlar ise hücrelerin dokulardan uzaklaştırılması için kimyasal ajanlarla birlikte kullanılmaktadır (Gilbert ve diğ. 2006).

Enzimatik olarak gerçekleştirilen deselülarizasyon da hücre ve nükleer bileşenleri matriksten uzaklaştırmak noktasında oldukça başarılıdır. Lipaz, endonükleaz, ekzonükleaz, tripsin gibi enzimler dokuları hücrelerden arındırmak için kullanılan enzimatik ajanlardır (Kasimir ve diğ. 2003). Enzimatik olarak gerçekleştirilen deselülarizasyonların tek başlarına yeterli etki göstermemeleri nedeniyle, diğer ajanlarla kombine bir biçimde kullanılmaları başarılı sonuçların elde edilmesi için tercih sebebidir. Enzimatik ajanların kullanımı hücre ve nükleer yapıların yanı sıra, ekstraselüler

matriksteki protein, lipit ve karbonhidrat türevli bileşenlere de etki edebilmektedir. Bu nedenle dokunun enzimle muamele süresi deselülarizasyon başarısını doğrudan etkileyebilen bir diğer etmenddir. Öyle ki, gereğinden daha az süreli enzim muamelesi yeterli hücrel ve nükleer arınma sağlayamazken, gereğinden daha uzun süreli muameleler ise laminin, fibronektin, elastin ve glikozaminoglikan (GAG) gibi ekstraselüler matriks bileşenlerinde istenmeyen parçalanmalara da sebep olabilmektedir. Enzimatik ajanlarla yapılacak deselülarizasyon sürecinde başarıyı etkileyen bir diğer etmen ise enzimlerin çalışması için gerekli optimum sıcaklığın sağlanmasıdır. Bunlara ek olarak, parçalanmış hücrelerden ortama yayılan proteazlara karşı fenilmetilsülfonilflorid (PMSF), aprotinin ve löpeptin gibi proteaz inhibitörlerinin enzimatik ajanlarla birlikte kullanımı ekstraselüler matriksin protein bileşenlerinin korunması açısından da oldukça kritiktir.

Asitler ve bazlar, deterjanlar, hipotonik ve hipertonic çözeltiler ve alkoller deselülarizasyon tekniğinde kullanılan kimyasal ajanlardır. Asitler ve bazlar hücrelerin sitoplazmik bileşenlerinin yanı sıra, DNA ve RNA gibi nükleer materyallerinde de hidrolitik parçalanmayı tetikleyen ajanlardır. Asetik asit, hidroklorik asit, sülfirik asit ve sodyum hidroksit, amonyum hidroksit gibi kimyasal ajanlar hücre membranının ve organellerinin parçalanması için oldukça etkilidir (Falke ve diğ. 2003). Perasetik asit yapı olarak kalın ve yoğun olmayan dokuların deselülarizasyonu için etkili olmasının yanı sıra %0,10-0,15 gibi düşük konsantrasyonlarda dahi deselülarize edilmiş matriksin sterilizasyonunu için sıklıkla kullanılan bir ajandır (Hodde ve Hiles 2002). Bazların deselülarizasyon için kullanımı dermis gibi dokular için etkili sonuçlar vermekle beraber, dokunun üç boyutlu mimarisine verdiği zararlar nedeniyle de oldukça sınırlıdır. Öyle ki, hücrelerin beraberinde matriksteki büyüme faktörlerinin de uzaklaştırılmasına neden olması, kollajen fibrillerine ve GAG moleküllerine verdikleri zarar nedeniyle sodyum hidroksit ve amonyum hidroksit gibi bazlar deselülarizasyon için pek tercih edilmemektedir (Reing ve diğ. 2010). Triton X-100, sodyum dodesil sülfat (SDS), sodyum deoksikolat gibi iyonik deterjanlar ve Triton X-100 gibi aniyonik deterjanlar deselülarizasyon için yaygın olarak kullanılmadadır. Deterjanlar hücrel ve nükleer yapıların birbirlerinden ve ekstraselüler matriksten ayrılmasında ve proteinlerin denatüre olmasında oldukça etkili ajanlardır. Deterjan ile deselülarizasyon ekstraselüler matriksteki GAG ve kollajen bileşenlerinin kaybı açısından risk taşımaktadır. Bu nedenle kullanılacak deterjanın türü, miktarı, uygulanma süresi, dokunun hacmi ve moleküler içeriği deselülarizasyon başarısını ve ekstraselüler matriks bütünlüğünü etkileyen en önemli

etmenlerdir (Rieder ve diğ. 2004, Hudson ve diğ. 2004, Cebotari ve diğ. 2010). Triton X-100 ile kıyaslandığında, SDS böbrek, karaciğer ve kalp gibi dokuların deselülarizasyonda ve hücre kalıntılarının matriksten uzaklaştırılmasında daha etkili bir kimyasal ajandır (Uygun ve diğ. 2010, Cebotari ve diğ. 2010). Etkili bir deselülarizasyon sağlamasına rağmen, SDS'in deselülarizasyon sürecinde dokunun doğal yapısına zarar verdiği ve GAG konsantrasyonunda düşüşe ve kollajen bütünlüğünde kayba yol açtığı da bilinmektedir. Bu nedenle düşük yoğunluklarda SDS kullanılarak yapılan deselülarizasyon ile bu negatif etkilerin en aza indirgenmesi hedeflenmektedir (Gilbert ve diğ. 2006).

Hipertonik ve hipotonik çözeltiler, DNA-protein etkileşimini bozmaları ve hücrelerde ozmotik şoka yol açmaları nedeniyle doku veya organların hücrelerinden arındırılması sürecinde kullanılmaktadır. Lizize uğratılan hücrelerin ekstraselüler matriksten arındırılmasında yardımcı ajan olarak kullanılabilen hipertonik ve hipotonik çözeltiler sıralı ve diğer diğer deselülarizasyon ajanlarıyla birlikte kullanıldığında etkili bir sonuç gösterebilmektedir. Alkoller dokudaki suyun uzaklaştırılmasında ve lipit temelli hücresel elemanların parçalanmasında yardımcı ajanlardandır (Prasertung ve diğ. 2008, Flynn ve diğ. 2010). Ancak diğer kimyasal ajanlar gibi, hipotonik ve hipertonik çözeltiler ve alkoller de ekstraselüler matrikse belli oranda zarar verdikleri için, etkili bir deselülarizasyon için bu ajanların kullanım miktarları ve süreleri konusunda optimizasyona ihtiyaç duyulmaktadır.

Deselülarizasyon tekniğinde hücreleri dokudan uzaklaştırmak için kullanılan her yöntem ve ajan ekstraselüler matriksin üç boyutlu mimarisinde bir takım değişikliğe neden olmaktadır. Etkili ve başarılı bir deselülarizasyon fiziksel, enzimatik ve kimyasal ajanların birlikte kullanıldığı yaklaşımlarla sağlanabilmektedir. Genel anlamda deselülarizasyon protokollerine bakıldığında, süreç iyonik çözeltiler veya fiziksel muameleler için hücrelerin lizize uğratılması ve ardından hücresel ve nükleer bileşenlerin enzimatik ajanlar ve deterjanlar ile dokudan uzaklaştırılması şeklinde devam etmektedir. Organları hücrelerinden arındırma sürecinde kullanılan kimyasal ve biyolojik ajanlar ve süreç sonrasında matriksteki hücresel kalıntılar immünolojik yanıtların gelişmesine ve biyo-uyumluluğun azalmasına neden olmaktadır. Bu nedenle deselülarizasyon sonrasında elde edilen ekstraselüler matriksin biyolojik açıdan güvenilir olduğundan emin olmak gerekmektedir. Bu amaçla, matriksteki DNA, protein ve fosfolipit gibi hücresel elemanlar incelenerek deselülarizasyon başarısı hakkında bilgi elde edilebilmektedir. Bunun yanı sıra günümüzde deselülarizasyon için kullanılan teknikler söz konusu bu hücresel elemanların

ekstraselüler matriksten uzaklaştırmak noktasında tam anlamıyla etkin değildir. Ancak yinede deselülarizasyon etkinliğinin yeterli olduğunu işaret eden bazı kriterler de mevcuttur. Bu kriterlere göre, deselülarizasyon sonrasında 1 mg ekstraselüler matrikstekki çift zincirli DNA en fazla 50 ng kadar olmalıdır, DNA parçalarının uzunluğu 200 baz çiftinden az olmalıdır ve 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI) yapılan immünfloresan boyamalarda nükleer yapılar gözlenmemelidir. Deselülarize edilmiş ekstraselüler matriks içindeki DNA kalıntılarının miktarı ve uzunluğu polimeraz zincir reaksiyonu (polymerase chain reaction, PCR) sonrasında yapılan jel elektroforezinin propidyum iyodür ya da etidyum bromür gibi ajanlarla görüntülenmesiyle kolaylıkla tespit edilmektedir. Ayrıca deselülarizasyon etkinliği belirlemek amacıyla yapılan 3 yöntemin de birbirini doğrular nitelikte olması gerekmektedir (Crapo ve diğ. 2011).

Deselülarizasyon sonrasında elde edilen ekstraselüler matriksler *in vitro* kültür ortamında veya *in vivo* transplantasyon çalışmalarında kullanılmadan önce sterilizasyon açısından mutlaka değerlendirilmelidir. Deselülarizasyon için kullanılan kimyasal ve biyolojik ajanlar dokuda endotoksin veya patojen yapıları uzaklaştırmak için yetersiz kaldığında kullanılacak sterilizasyon ajanı konusunda dikkatli olunmalıdır. Ekstraselüler matriksin sterilizasyonunda kullanılacak asitler, etilen oksit gibi bir takım çözücüler ve gama ışınlamaları matriksin mimarisine mikro ve nano boyutlarda zarar verebilmektedir (Hodde ve Hiles 2002). Son yıllarda doku mühendisliği çalışmalarında doğal yapı iskelelerinin sterilizasyonunda perasetik asit kullanılmaya başlanmıştır. Perasetik asit düşük konsantrasyonda bile küf ve bakteri oluşumunu engellemek açısından oldukça etkili ve hızlı bir sterilizasyon sağlamaktadır. Perasetik asit kullanımının sterilizasyon sürecinde ekstraselüler matriksin mimarisine verdiği zararın minimal olması da bu maddenin kullanımı için ayrıca bir tercih sebebidir (Yoganarasimha ve diğ. 2014, Kajbafzadeh ve diğ. 2013).

1.8. Notch ve Hedgehog Sinyal Yolakları

Notch sinyal yolağı canlılar arasında filogenetik olarak korunmuş bir sinyal yolağıdır ve glikozilasyon, hücre içi moleküller karşılıklı etkileşimi ve yolakta görevli bileşenlerin ubiquitin bağımlı yıkılmasıyla kontrol edilmektedir. Memelilerde, Notch sinyal yolağı 300 kDa ağırlığında Notch 1, Notch 2, Notch 3, ve Notch 4 olmak üzere 4 adet homolog transmembran proteininden ve Jagged 1, Jagged2, Delta-like 1 (Dll 1), Delta-like 2 (Dll 2), Delta-like 3 (Dll 3), Delta-like 4 (Dll 4) olmak üzere 5 adet ligandan meydana

gelmektedir (Borggrede ve Oswald 2009). Notch reseptörlerine ilgili ligandın bağlanmasıyla, reseptör intraselüler kısımdan proteolitik bir kesime uğramaktadır. Proteolitik kesim sonucunda meydana gelen bu intraselüler kısım nükleusa taşınarak transkripsiyon faktörü olarak rol oynamaktadır. Bütün organizmalarda, Notch sinyali hücrel gelişim, farklılaşma, çoğalma, apoptoz ve adhezyon gibi olayları kontrol etmek için komşu hücreler arasında etkili bir iletişimin gerçekleşmesini sağlamaktadır (Schwanbeck ve diğ. 2011).

Notch sinyal yolağı embriyonik dönemdeki kardiyogenezde atriyumların, ventriküllerin, kalp kapakçıklarının ve koroner damarların oluşumuyla ilişkili iken, erişkin dönemde ise iskemi sonrası miyokardiyal yenilenme, anjiyogenezin uyarılması, kardiyak fibroblastların miyofibroblastlara dönüşümünü engelleme ve atrioventriküler düğümde elektrik impulsunun iletilmesi gibi işlevlere sahiptir (Del Monte ve diğ. 2011, Penton ve diğ. 2012). Notch sinyal yolağında meydana gelen mutasyonlar perikardiyal ödem, kalp kapakçıklarının, atriyal ve ventriküler septumların oluşumunda bozukluklarla sonuçlanmaktadır (Timmerman ve diğ. 2004). Fareler üzerinde yapılan bir miyokardiyal enfarktüs modellemesinde de Notch sinyal yolağı aktifleştirilmiş mezenkimal kök hücrelerin naklini takiben enfarktüs alanında gerileme ve kardiyak işlevde artış gözlenmiştir (Li ve diğ. 2011).

Hedgehog sinyal yolağı protein-protein etkileşimleri, pozitif ve negatif geri bildirim mekanizmaları ve fosforilasyon, lipidasyon ve proteolitik kesim gibi post-translasyonel modifikasyonlardan oluşan pek çok hücrel ve moleküler mekanizmayla ilişkilidir. Bu nedenle Hedgehog sinyal yolağı hücre farklılaşması ve yenilenmesi mekanizmalarında anahtar rol oynamaktadır. Memelilerde, Sonic Hedgehog (SHH), Indian Hedgehog (IHH) ve Desert Hedgehog olmak üzere 3 adet Hedgehog ligandı bulunmaktadır. Bu ligandlar translasyon sonrasında proteolitik kesime uğrar ve N-terminal uçlarına lipid moleküllerinin eklenmesiyle aktif formuna kavuşmaktadır (Chen ve diğ. 2011). Smoothened (Smo) ve onun negatif düzenleyicisi olan Patched (Pit1) transmembran proteinleri ve Gli1, Gli2, Gli3 transkripsiyon faktörleri Hedgehog sinyal yolağı ile ilişkili proteinlerdir. Hedgehog sinyal yolağı yalnızca embriyonik dönemdeki koroner damar ağının oluşması için değil, erişkin kalp dokusundaki yeni koroner damarların oluşması için de önem arz etmektedir (Thoma ve diğ. 2008). Hedgehog sinyal yolağı kardiyomiyosit farklılaşması ve çoğalması, anjiyogenez, kardiyak onarım ve yenilenme gibi pek çok mekanizmada da rol oynamaktadır (Washington Smoak ve diğ. 2005, Dyer ve Kirby ve diğ. 2009).

2. AMAÇ

Bu çalışmada, doku mühendisliği tekniklerinden olan deselülarizasyon ile elde edilen organa özgü kalp yapı iskelesi ve sıçan kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücreler kullanarak miyokard benzeri bir doku oluşturulması hedeflenmiştir. Kimyasal kardiyomiyojenik farklılaştırma uyarıları ve üç boyutlu yapı iskelesinin sağladığı fiziksel uyarım ile gerçekleştirilen farklılaştırma sürecinde Notch/Hedgehog sinyal yollarındaki değişimlerin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Bu çalışmada ayrıca deselülarize edilmiş kalp matriksi üzerine ekilen mezenkimal kök hücrelerin, uygun kimyasal uyarımla Notch ve Hedgehog sinyal yollarındaki moleküler değişimler aracılığıyla kardiyomiyosit hücrelerine farklılaşabileceği hipotez edilmiştir. Söz konusu üç boyutlu ortamdaki kardiyomiyojenik farklılaştırma, aynı kimyasal uyarımlar kullanılarak gerçekleştirilen iki boyutlu klasik kültür ortamındaki farklılaştırma ile kıyaslamalı olarak incelenmiştir.

Oldukça ileri teknolojileri ve disiplinlerarası yaklaşımları barındıran doku mühendisliği ile daha önce moleküler düzeyde incelemelerin yer almadığı literatüre katkı yapmak ve araştırmacıların yeni fikirler üretmesine olanak sağlamak çalışmanın başlıca hedeflerindedir. Bu sayede, doku ve organ yetersizliği nedeniyle gelişen hastalıkların tedavisi ve ilgili vücut parçasının onarılmasıyla ilgili çalışmalarında kapsamı arttırılmış olacaktır. Bunun yanı sıra, fizyolojik devamlılığın sağlanabilmesi için dokuya ait hücre ve ekstraselüler matriks bileşenlerinin belirtilen amaç dahilinde bir araya getirilmesiyle işlevsel doku tasarımları yapılıp yapılamayacağına cevabı da ortaya koyulacaktır. Bu çalışma paralelinde ortaya çıkacak çalışmalar ise doku mühendisliğinin sunduğu doku tasarımı kavramını git gide daha anlamlı ve işlevsel çalışmaları tasvir eder hale getirecektir.

3. YÖNTEM

3.1. Hücreler ve Kültür Koşulları

Bu tez çalışmasında, KÖGEM'in hücre koleksiyonunda yer alan ve daha önce yapılan araştırmalarda izole edilen kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücreler kullanıldı. İzolasyon sonrasında bu hücrelerin mezenkimal kök hücrelere ait genotipik ve fenotipik özelliklere sahip olduğu ve herhangi bir kimyasal uyarana maruz kalmadığı sürece farklılaşmadıkları yapılan karakterizasyon çalışmaları ile ortaya koyuldu.

Çalışmada kullanılan hücreler, penisilin-streptomisin (%1) ve FBS eklentili DMEM-Ham's F12 besiyeri kullanılarak kültüre edildi. Kültür kabına ekimi gerçekleştirilen hücreler %5 CO₂ içeren, 37 °C'lik inkübatörde kontrollü olarak takip edildi. Yeterli büyüme gösterene kadar 3 günde bir hücrelerin besiyeri tazelandı ve %70-80 hücre yoğunluğuna ulaşan hücreler pasajlandı.

3.2. Deney Gruplarının Oluşturulması

Çalışmanın ana hedeflerinden biri deselülarize edilmiş kalp matriksi üzerinde üç boyutlu olarak ve kültür kaplarında iki boyutlu olarak kültüre edilen sıçan kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücreler kullanarak (sKİ-MKH) kalp ve/veya kalp benzeri hücrelere farklılaştırmaktır (Lo ve diğ. 2018). Çalışmanın diğer hedefi ise deselülarize kalp matriksinin sunduğu fiziksel uyarımı ve farklılaşma besiyerinin sağladığı kimyasal uyarımı iki boyutlu ve üç boyutlu kültür ortamlarında karşılaştırmalı olarak incelemektir. Bu amaca uygun olarak, deselülarize matriks üzerine 3-B olarak ve kültür kabına 2-B olarak ekim yapılan sKİ-MKH'ler FBS (%10), penisilin-streptomisin (%1) ve 5-azasitidin, hidrokortizon, retinoik asit ve FGF-2 eklentili DMEM-Ham's F12 besiyeri (Çizelge 3.1, Grup 2 ve 6), FBS (%10), penisilin-streptomisin (%1) ve VEGF eklentili DMEM-Ham's F12 besiyeri (Çizelge 3.1, Grup 3 ve 7) ve FBS (%10), penisilin-streptomisin (%1) ve 5-azasitidin, hidrokortizon, retinoik asit, FGF-2 ve VEGF besiyeri (Çizelge 3.1, Grup 4 ve 8) kullanılarak kültüre edildi. Çalışmada oluşturulan deney gruplarıyla deselülarize matriksten kaynaklanan fiziksel uyarımın ve besiyerine eklenen kimyasal uyarıların kardiyomiyojenik farklılaşma üzerine etkisi ayrı ayrı ve birlikte olacak biçimde incelendi.

Çizelge 3.1. Deney gruplarının oluşturulması

Deney Grupları	Ekim Yapılan Ortam	Kullanılan Besiyeri	Farklılaşma Uyaranı	Kültür Ortamı
Grup 1	Standart 2-B Kültür	DMEM-Ham's F12 Besiyeri	Uyaran yok	2-B
Grup 2	Standart 2-B Kültür	Kardiyomiyojenik Farklılaştırma Besiyeri	Kimyasal	2-B
Grup 3	Standart 2-B Kültür	DMEM-Ham's F12 Besiyeri	VEGF molekülü	2-B
Grup 4	Standart 2-B Kültür	Kardiyomiyojenik Farklılaştırma Besiyeri	Kimyasal ve VEGF Molekülü	2-B
Grup 5	Deselülarize matriks üzerinde 3-B Kültür	DMEM-Ham's F12 Besiyeri	Fiziksel	3-B
Grup 6	Deselülarize matriks üzerinde 3-B Kültür	Kardiyomiyojenik Farklılaştırma Besiyeri	Fiziksel ve Kimyasal	3-B
Grup 7	Deselülarize matriks üzerinde 3-B Kültür	DMEM-Ham's F12 Besiyeri	Fiziksel ve VEGF Molekülü	3-B
Grup 8	Deselülarize matriks üzerinde 3-B Kültür	Kardiyomiyojenik Farklılaştırma Besiyeri	Fiziksel, Kimyasal ve VEGF Molekülü	3-B

3.3. Kalplerin Çıkarılması Ve Deselülarizasyonu

Çalışmada kalp eldesi için kullanılacak 200-280 gramlık Wistar cinsi albino sıçanlar Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Araştırma Biriminden (DETAB) temin edildi ve söz konusu işlem tam anestezi altında gerçekleştirildi. Anestezi altında açılan hayvanların kalpleri, organ bütünlüğünün bozulmamasına dikkat edilerek çıkarıldı. Kalp örnekleri

penisilin-streptomisin antibiyotikleri bulunan DMEM-Ham'S F12 besiyeri içerisine alınarak laboratuvar ortamına transfer edildi.

Laboratuvara getirilen kalp örneklerine deselülarizasyon işlemi için sırayla şu basamaklar uygulandı; antibiyotikli DMEM-Ham'S F12 besiyerindeki kalp örnekleri 100 ml PBS içerisinde ve 180 rpm hızdaki çalkalayıcıda 1 saat boyunca yıkandı. PBS ile yıkanan doku örnekleri 80 ml %1 Triton X-100 çözeltisine alınarak, 180 rpm hızdaki çalkalayıcıda deselülarizasyon amacıyla 24 saat boyunca çalkalandı. Deselülarizasyona devam etmek amacıyla dokular 80 ml %0,5'lik SDS çözeltisine alınarak, 180 rpm hızdaki çalkalayıcıda 48 saat boyunca çalkalandı. Ardından dokular %1'lik SDS çözeltisine alındı ve SDS çözeltisi 1 hafta boyunca her gün tazelenerek, 80 ml %1'lik SDS çözeltisinde ve 180 rpm hızdaki çalkalayıcıda inkübasyona devam edildi. Sterilizasyonu sağlamak amacıyla deselülarize matriks örnekleri 80 ml %0,1'lik perasetik asit (PAA) içerisinde ve 180 rpm hızdaki çalkalayıcıda 24 saat boyunca çalkalandı. Matrikslerin sterilizasyonunu tamamlamak için, sırasıyla %5'lik penisilin-streptomisin içeren 80 ml dH₂O içerisinde ve %5'lik anti-anti içeren 80 ml dH₂O içerisinde ve 180 rpm hızdaki çalkalayıcıda 24'er saat boyunca çalkalandı. Son olarak deselülarize matriks örnekleri 2 gün boyunca 80 ml dH₂O içerisinde ve 180 rpm hızdaki çalkalayıcıda yıkandı ve deselülarizasyon işlemi sonlandırıldı.

3.4. Kalp Deselülarizasyonun Etkinliğinin İncelenmesi

Deselülarizasyon etkinliğinin incelenmesi amacıyla, deselülarize edilmiş kalp matriksi ve pozitif kontrol olarak normal kalp dokusundan izole edilen genomik DNA örnekleri ile konvansiyonel PCR yapıldı. Ekstraselüler matrikse özgü proteinlerin histolojik olarak görüntülenmesi için immünfloresan boyama yapıldı matriksin hücrelerden arındırıldığı gösterildi. Deselülarize matriksteki kollajen miktarını normal kalp dokusundaki kollajen miktarıyla kıyaslamak amacıyla da pikrosiriyus red boyaması yapıldı.

3.4.1. PCR ile DNA İçeriğinin Ölçülmesi

Deselülarizasyon sonrasında kalp matriksindeki DNA içeriğinin belirlenmesi amacıyla DNA saflaştırma kiti (GeneJET Genomic DNA Purification Kit, Fermentas) kullanılarak DNA izolasyonu yapıldı. Pozitif kontrol olarak normal kalp dokusundan izole

edilen DNA örnekleri kullanıldı. İzolasyon sonrasında β -aktin genine özgü primerler ve hata okuma-düzeltilme özelliği olan DNA polimeraz I ile konvansiyonel PCR yapıldı. Konvansiyonel PCR deneyinin negatif kontrolü olarak DNA örneğinin olmadığı grup kullanıldı. Deneyde kullanılan bileşenler çizelge 3.2’de listelenmiştir. PCR reaksiyonunun her döngüsü 95 °C’de 30 saniye boyunca gerçekleşen denatürasyon, 55 °C’de 45 saniye boyunca gerçekleşen bağlanma ve 72 °C’de 1 dakika boyunca gerçekleşen uzama aşamaları olacak şekilde ayarlandı ve söz konusu reaksiyon 40 döngü olarak yapıldı. PCR sonrasında çoğaltılan DNA örnekleri Tris-Asetik asit-EDTA (TAE) tampon çözeltisinde hazırlanan %1’lik agaroz jelde yatay elektroforez ile yürütüldü. 100 V’da 60 dakika boyunca yapılan elektroforez sonrasında elde edilecek DNA bantlarının cihazda (DNR Bio-Imaging Systems) görüntülenebilmesi için örnekler ile birlikte Sybr Green boyası da jele yüklendi.

Çizelge 3.2. Konvansiyonel PCR bileşenleri ve konsantrasyonları

Bileşenler	Konsantrasyon
Tampon çözelti	1X
Magnezyum klorür (MgCl ₂)	2 mM
Deoksiniükleotid trifosfat (dNTP)	0,2 mM
Taq DNA polimeraz enzimi	1 U
DNA örneği	40 ng/ μ l
Primer	1 pM

3.4.2. Histokimyasal ve İmmün Floresan Boyama

Deselülarize edilmiş kalp matriksleri histokimyasal ve immünfloresan analizler için doku takip kasetlerine alınarak fiksasyon amacıyla 3 gün boyunca %10’luk formalin içinde inkübe edildi. Fikse olan matriks örneklerinin suyunu giderme (dehidratasyon) amacıyla, örnekler sırasıyla 70’lik etanol, %80’lik etanol, %90’lık etanol, %100’lük etanol serilerinde 30’ar dakika bekletildi ve ardından %100’lük etanolde 30 dakika daha bekletildi. Ardından matriks içerisine giren alkolü uzaklaştırmak için, matriks örnekleri 1 saat ksilen içinde inkübe edildi. Bu sürenin sonunda, parafinin matriks içerisine girebilmesi-yayılabilmesi için matriks örnekleri 60 °C’de sıvı parafin içine alınarak 1 saat etüv içinde bekletildi. Parafinle muamele sonrasında, örnekler metal bloklara alınarak,

bloklar sıvı parafin ile kapatıldı. Parafine gömülen matriks örneklerinden mikrotom yardımıyla 5 µm'lik kesit alındı ve kesitler poli-L-lisin kaplı lam üzerine aktarıldı. Histokimyasal ve immünfloresan boyama için, lamlar 70 °C'deki etüv içinde 1 saat bekletilerek kesitlerdeki parafinin erimesi sağlandı. Lam üzerindeki kesitlerden parafinin uzaklaştırılması (deparafinizasyon) amacıyla lamlar ksilen dolu 3 ayrı kap içinde sırasıyla 5'er dakika bekletildi. Kesitlerdeki ksilenin uzaklaştırılması amacıyla, lamlar sırasıyla %100'lük etanol, %90'lık etanol, %80'lik etanol ve %70'lik etanol serilerinde 5'er dakika bekletildi. Ardından kesitlerdeki alkolden kurtulmak ve rehidratasyon amacıyla lamlar distile su içinde bekletildi. Distile su ile yıkanmış kesitlerin histokimyasal ve immünfloresan analizlerine hazırlık olması ve kesitlerdeki antijenlerin açığa çıkarılması (antigen retrieval, recovery) amacıyla, lam üzerindeki kesitler 50 mM, pH 6.0 kaynamış trisodyumsitrat içinde 20 dakika bekletildi.

Histokimyasal analizler için pikrosiriyus red ile boyanan lamlar Crystal Mounting Medium ile kapatılarak Leica DMI 4000 ışık mikroskobu altında incelendi. İmmünfloresan boyama öncesinde, lam üzerindeki kesitler non-spesifik bağlanmaları engellemek için uygun blok serumla 30 dakika inkübe edildi. Blok serum uygulamasından sonra kesitlerin immünfloresan olarak boyanması amacıyla fibronektine özgü primer antikör (anti-fibronektin antikoru, Santa Cruz Biotechnology) ile +4 °C'de gece boyu olarak inkübe edildi. Primer antikör uygulaması sonrasında PBS ile yıkanan kesitler, primer antikora özgü uygun sekonder antikör ile oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. Sekonder antikör uygulaması sonrasında, bağlanamayan antikörlerin lam üzerinden uzaklaştırılması için lamlar PBS ile yıkandı ve DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol, UltraCruz Mounting Medium for fluorescence with DAPI) kapatma medyumunu ile kapatıldı. İmmünfloresan boyama yapılan lamlar Leica DMI 4000 ışık mikroskobu altında incelendi.

3.4.3. Kollajen İçeriğinin Biyokimyasal Olarak Belirlenmesi

Deselülarizasyon işlemi sonrasında, kalp matriksindeki kollajen içeriğini deselülarize edilmemiş kalp dokusuyla kıyaslayarak belirlemek amacıyla deselülarize kalp matriksi ve normal kalp matriksi pikrosiriyus red ile boyanarak spektrofotometrik analiz yapıldı (Taşkiran ve diğ 1999). Bu boyama için, deselülarize kalp matriksine ve kontrol grubu olan normal kalp matriksine tripsin eklenerek 3 gün süresince oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında tripsinle parçalanmamış dokulardan kurtulmak amacıyla 20.000 g'de 20 dakikalık bir santrifüj yapıldı. Kullanılacak boya çözeltisi 0,5 M asetik asit ve 0,5 µM pikrosiriyus red karıştırılarak hazırlandı. Deneyin standardı olarak kuyruk

kollajeni kullanıldı. Deselülarize kalp matriksi ve normal kalp matriksi ve kuyruk kollajeni hazırlanan pikrosiriyus red boyası ile oda sıcaklığında 20 dakika boyunca inkübe edildi. Yapılan inkübasyon sonrasında, deselülarize ve normal matriks örnekleri ve kuyruk kollajeni örneği 2.500 g'de 10 dakika santrifüj edildi. Elde edilen süpernatantların 540 nm'de spektrofotometrik ölçümleri alındı. Elde edilen ölçüm değerleri hazırlanan standardın ölçüm değerinden çıkarılarak normalizasyon yapıldı.

3.5. Reselülarizasyon

Reselülarizasyon öncesinde deselülarize kalp matriksleri %3 penisilin-streptomisin ve %10 FBS içeren 50 ml DMEM-Ham'S F12 besiyerinde 1 gün boyunca inkübe edildi. Çoğaltılan sKİ-MKH'ler her matrikse $1,5 \times 10^6$ hücre/cm² olacak biçimde insülin enjektörü yardımıyla ekilerek reselülarizasyon işlemi gerçekleştirildi (Kitahara ve diğ. 2016).

3.5.1. Kalp Ekstraselüler Matriksinde sKİ-MKH'lerin Canlılığının Değerlendirilmesi

WST-1 (Water soluble tetrazolium-1) analiziyle deselülarize matriksin sKİ-MKH'lerin bölünmesine olan etkisi incelendi. WST-1 açık kırmızı renkli kararlı bir tetrazolyum tuzudur. Kararlı WST-1 molekülünün koyu kırmızı renkli formazan bileşenlerine indirgenmesine süksinat-tetrazolyum enzimi aracılık eder. Bu enzimin işlevi canlı hücrelerin membranında gerçekleşen kompleks bir hücrenel mekanizma ile ilişkilidir. Söz konusu formazan oluşumu canlı ve metabolik aktivitesi yüksek hücrelerde gerçekleşen glikolitik NAD(P)H üretiminin de göstergesidir. Kültür ortamındaki aktif metabolizması olan ve çoğalan hücrelerin göreceli miktarı ve formazan oluşumuna bağlı elde edilen spektrofotometrik ölçüm arasındaki direkt ilişki WST-1 analizi ile belirlenir.

Deselülarize matriks üzerinde sKİ-MKH'lerin çoğalmasının WST-1 analizi ile incelenebilmesi için kültür ortamındaki besiyeri tamamen çekildi ve matriks üzerine %10 WST-1 reaktifinin bulunduğu DMEM-Ham's/F12 besiyeri koyuldu. Deselülarize matriks WST-1 içeren besiyerinde 3 saat boyunca karanlıkta ve standart kültür koşullarında bekletildi. Kör okuma yapılabilmesi için hücre içermeyen yalnızca WST-1 reaktifinin olduğu besiyeri kullanıldı.

3.6. Kalp Ekstraselüler Matriksinde sKİ-MKH'lerin Kardiyomiyositlere Farklılaştırılması

Deselülarize kalp matriksinin rBM-MKH'lerin kardiyomiyojenik yöndeki farklılaşmasına olası etkisini incelemek amacıyla matriks örneklerine sKİ-MKH ekildi. Hücre ekimi matriks üzerinde 1×10^6 hücre/cm² olacak biçimde enjektör yardımıyla DMEM-Ham's F12 besiyerinde yapıldı (Çizelge 3.1). Kontrol grubu olarak matriks üzerine sKİ-MKH'ler yalnızca FBS (Fetal Bovine Serum) (%10), penisilin-streptomisin (%1) eklentili DMEM-Ham's F12 besiyerinde ekildi. sKİ-MKH'lerin kalp ekstraselüler matriksi üzerinde (3-B kültür ortamında) kardiyomiyojenik yönde farklılaşmasını uyarmak amacıyla kimyasal uyarılar (5-azasitidin, hidrokortizon, retinoik asit ve FGF-2) ve VEGF molekülü kullanıldı (Tomita ve diğ. 2007, Paiva ve diğ. 2005, Detillieux ve diğ. 2003, Giraud ve diğ. 2006, Bekhite ve diğ. 2011). Matriksin farklılaşma üzerindeki fiziksel uyarımına ek olarak kardiyomiyojenik farklılaşma için sKİ-MKH'ler, FBS (Fetal Bovine Serum) (%10), Penisilin-streptomisin (%1) ve 5-azasitidin, hidrokortizon, retinoik asit ve FGF-2 ile eklentili DMEM-Ham's F12 besiyerinde ve FBS (Fetal Bovine Serum) (%10), penisilin-streptomisin (%1) ve VEGF molekülü ile eklentili DMEM-Ham's F12 besiyerinde ekildi (Çizelge 3.1). Hem kontrol grubundaki matriksler hem de farklılaşma ortamındaki matriksler %5 CO₂ içeren 37 °C'lik inkübatörde kontrollü olarak 4 hafta boyunca takip edildi. Her 3 günde bir kültür ortamındaki hücrelerin besiyeri tazelendi. Kalp ekstraselüler matriksi üzerinde gerçekleştirilen kardiyomiyojenik farklılaşmayı gen ifadesi düzeyinde incelemek için Real Time-PCR ve protein seviyesinde gözlemlemek için immünfloresan boyamalar yapıldı.

3.7. İki boyutlu *in vitro* Kültür Ortamında sKİ-MKH'lerin Kardiyomiyositlere Farklılaştırılması

Deselülarize kalp matriksinin rBM-MKH'lerin kardiyomiyojenik yöndeki farklılaşmasına olası etkilerini kıyaslayabilmek amacıyla *in vitro* koşullarda 6-kuyucuklu kültür kaplarında iki boyutlu farklılaştırma yapıldı. İki boyutlu *in vitro* farklılaştırma sonrasında immünfloresan analiz yapılabilmesi amacıyla 6-kuyucuklu kültür kaplarına cam slaytlar yerleştirildi ve her kuyuyuya 150.000'er hücre ekildi. Hem kontrol grubundaki, hem de farklılaşma ortamındaki hücreler %5 CO₂ içeren 37 °C'lik inkübatörde kontrollü olarak 4 hafta boyunca takip edildi. Kontrol grubu olarak sKİ-MKH'ler yalnızca FBS (Fetal Bovine

Serum) (%10), penisilin-streptomisin (%1) eklentili DMEM-Ham's F12 besiyerinde kültüre edildi (Çizelge 3.1). İki boyutlu kültür ortamında kardiyomiyojenik yönde farklılaşmayı uyarmak amacıyla 5-azasitidin, hidrokortizon, retinoik asit ve FGF-2 ve VEGF molekülü kullanılmıştır (Tomita ve diğ. 2007, Paiva ve diğ. 2005, Detillieux ve diğ. 2003, Giraud ve diğ. 2006, Bekhite ve diğ. 2011). sK1-MKH'ler, FBS (Fetal Bovine Serum) (%10), penisilin-streptomisin (%1) ve 5-azasitidin, hidrokortizon, retinoik asit ve FGF-2 eklentili DMEM-Ham's F12 besiyerinde ve FBS (Fetal Bovine Serum) (%10), penisilin-streptomisin (%1) ve VEGF molekülü ile eklentili DMEM-Ham's F12 besiyerinde kültüre edildi (Çizelge 3.1). Her 3 günde bir kültür ortamındaki hücrelerin besiyeri tazelenildi. *In vitro* koşullarda 6-kuyucuklu kültür kaplarında gerçekleştirilen kardiyomiyojenik farklılaşmayı gen ifadesi düzeyinde incelemek için Real Time-PCR ve protein seviyesinde gözlemlemek için histokimyasal ve immünfloresan boyamalar yapıldı.

3.8. Kantitatif Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Gen İfadelerinin Analizi

İki boyutlu ve üç boyutlu kültür süresince toplanan örneklerden kit (Jena Bioscience RNA Isolation Kit, Lot Number:112.707) kullanılarak RNA izolasyonu yapıldı. İzole edilen total RNA örneklerinden komplementer DNA (cDNA) kiti (Revertaid First Strand cDNA Synthesis #K1622) kullanılarak Ters Transkriptaz PCR (RT-PCR) ile cDNA sentezlendi. İki boyutlu ve üç boyutlu olarak kültüre edilen hücrelerin kardiyak hücrelere farklılaşma durumlarını ve deselülarize kalp matriksinin kardiyomiyojenik farklılaşmasına Notch ve Hedgehog sinyal yolları üzerinden olan etkisini gen ifadesi düzeyinde belirlemek için, sentezlenen cDNA örneklerinden Real-Time PCR analizi gerçekleştirildi. Kardiyak hücrelere özgü GATA4 ve Nkx2.5 genlerinin primerleri, Hedgehog sinyal yolağına özgü SHH, IHH ve Gli2 genlerinin primerleri, Notch sinyal yolağına özgü Jagged ve Notch1 genlerinin primerleri ve kontrol olarak GAPDH genine ait primer (Çizelge 3.3) ile Real-Time PCR deneyi yapıldı (Li ve diğ. 2015, Yu ve diğ. 2016, Wong ve diğ. 2012) Real-Time PCR cihazı (Lightcycler 480, Roche) kullanılarak ilgili genlerin amplifikasyonu ölçüldü. Real-Time PCR ile elde edilen ölçüm değerleri referans gene göre normalize edilerek ilgili genlerin ifade seviyeleri belirlendi.

Çizelge 3.3. Kantitatif eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılan genler

Genlerin Açık İsimleri	İleri ve Geri Primerler	Baz Dizilimi (5'-3')
Jagged	Jag-F	CACTGCCAGGGCTCATTACA
	Jag-R	AGCTATTTGCCGACAAGGCT
Notch1	Notch1-F	CTCACAGGCACACTCGTAGC
	Notch1-R	AACGCCTACCTCTGCTTCTG
Sonic Hedgehog	Shh-F	TTTCACAGAGCAGCAGTGGATGC
	Shh-R	TTAAATGCCTTGGCCATCTC
Indian Hedgehog	Ihh-F	TGACAGAGATGGCCAGTGAG
	Ihh-R	AAACTCGCGCCTCTTGCCCTA
Gli Ailesi Çinko Parmak 2	Gli-F	GACTCCTGGTGAAGGCAGAG
	Gli-R	TCAGCCATCTCAGGACACAG
GATA-bağlayıcı faktör 4	GATA4-F	TGCCCGTAGTGAGATGACAG
	GATA4-R	GGAAGCCCAAGCCAATGAAT
Nk2 Homeobox 5	Nkx2.5-F	GCCAACAACAACCTTCGTGAAC
	Nkx2.5-R	CTACCAGGCTCGGATACCAT
Gliseraldehit-3-Fosfat- Dehidrogenaz	Gapdh-F	GAGTCATACTGCCGGTCCG
	Gapdh-R	GAGCTAGCAGAGATGAGCCG

3.9. Kalp Ekstraselüler Matriksinde sKİ-MKH'lerin Kardiyomiyositlere Farklılaştırılması Sonrasında İmmün Floresan Boyama

Kalp matriksi üzerinde farklılaştırma amacıyla 4 hafta boyunca kültüre edilen deney gruplarından alınan matriks örnekleri, 4 hafta sonrasında histokimyasal ve immünfloresan analizler için doku takip kasetlerine alınarak fiksasyon amacıyla 3 gün boyunca %10'luk formalin içinde inkübe edildi. Fikse olan matriks örnekleri akar suda yıkandı ve örneklerdeki suyu giderme (dehidratasyon) amacıyla, örnekler sırasıyla 70'lik etanol, %80'lik etanol, %90'lık etanol, %100'lük etanol serilerinde 30'ar dakika bekletildi ve

%100'lük etanolde 30 dakika daha bekletildi. Ardından matriks içerisine giren alkolü uzaklaştırmak için 1 saat ksilen içinde inkübe edildi. Bu sürenin sonunda, parafinin matriks içerisine girebilmesi-yayılabilmesi için örnekler 60 °C'de sıvı parafin içine alınarak 1 saat etüv içinde bekletildi. Parafinle muamele sonrasında, matriks örnekleri metal bloklara alınarak, bloklar sıvı parafin ile kapatıldı. Parafine gömülen matriks örneklerinden mikrotom yardımıyla 5 µm'lik kesit alınarak, kesitler poli-L-lisin kaplı lam üzerine aktarıldı.

İmmünofloresan boyama için, lamalar 70 °C'deki etüv içinde 1 saat bekletilerek kesitlerdeki parafinin erimesi sağlandı. Lam üzerindeki kesitlerden parafinin uzaklaştırılması (deparafinizasyon) amacıyla lamalar ksilen dolu 3 ayrı kap içinde 5'er dakika bekletildi. Kesitlerdeki ksilenin uzaklaştırılması amacıyla, lamalar sırasıyla %100'lük etanol, %90'lık etanol, %80'lik etanol ve %70'lik etanol serilerinde 5'er dakika bekletildi. Ardından kesitlerdeki alkolden kurtulmak ve rehidratasyon amacıyla lamalar distile su içinde bekletildi. Distile su ile yıkanmış kesitlerin histokimyasal ve immünofloresan analizlerine hazırlık olması ve kesitlerdeki antijenlerin açığa çıkarılması (antigen retrieval, recovery) amacıyla, lam üzerindeki kesitler 50 mM, pH 6.0 kaynamış trisodyumsitrat içinde 20 dakika bekletildi.

İmmün floresan boyama öncesinde, lam üzerindeki kesitler non-spesifik bağlanmaları engellemek için uygun blok serumla 30 dakika inkübe edildi. Blok serum uygulamasından sonra kesitlerin immünofloresan olarak boyanması amacıyla Çizelge 3.4'te listelenen konneksin43 ve kardiyak troponin I'ya özgü primer antikolar ile +4 °C'de gece boyu olarak inkübe edildi (Haghani ve diğ 2012, Ramkisoensing ve diğ. 2012).

Primer antikor uygulamasının sonrasında PBS ile yıkanan kesitler, primer antikora özgü sekonder antikor ile oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. Sekonder antikor uygulaması sonrasında, bağlanamayan antikorların lam üzerinden uzaklaştırılması için lamalar PBS ile yıkandı ve lamalar DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol, UltraCruz Mounting Medium for fluorescence with DAPI) kapatma medyumunu ile kapatıldı. İmmünofloresan boyaması yapılan örnekler Leica DMI 4000 ışık mikroskobu altında incelendi.

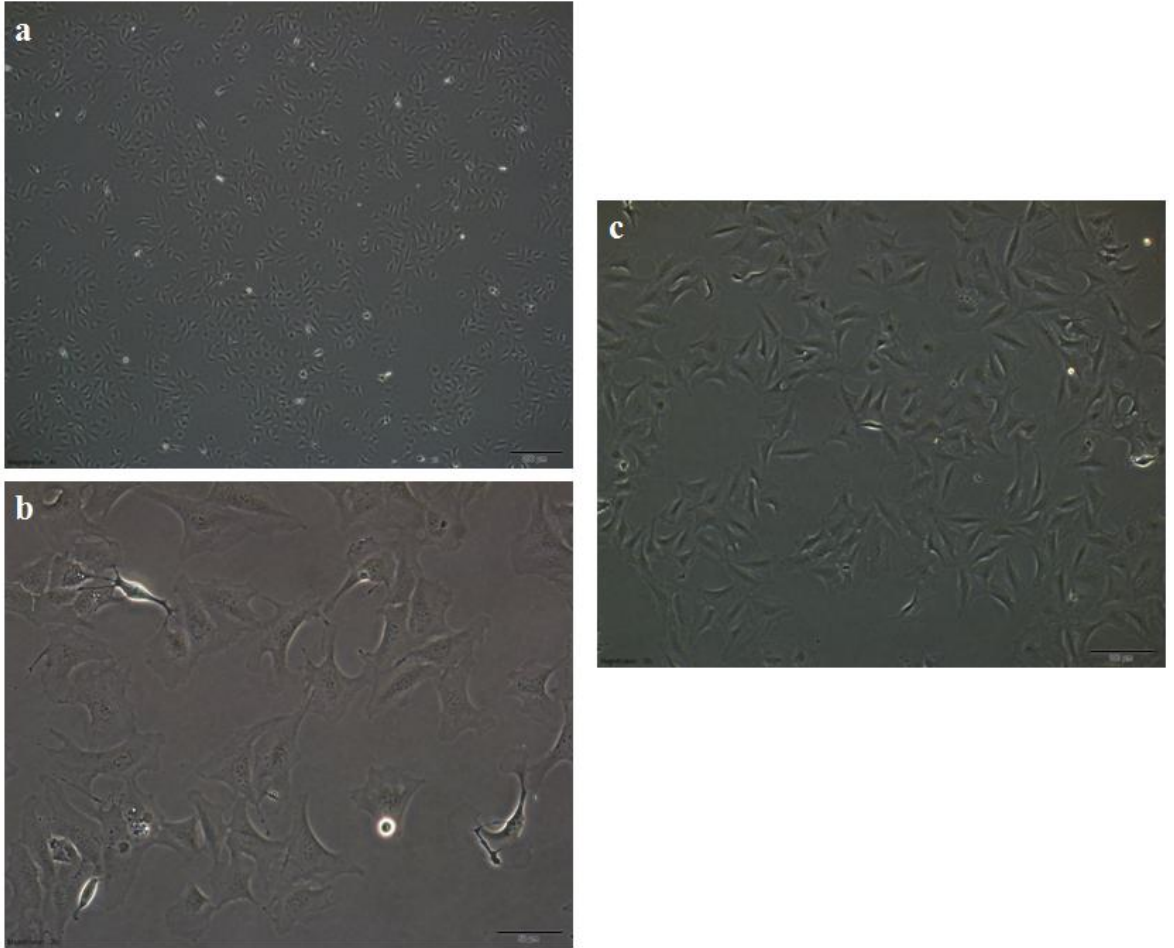
Çizelge 3.4. Primer antikor, sekonder antikor ve blok serum listesi

Antikor Adı	Katalog Numarası	Firma
Anti-Connexin43	05-763	Millipore
Anti-Cardiac Troponin T	Sc-8121	Santa Cruz
Anti-Collajen1 α 1	sc-25974	Santa Cruz
Anti-Fibronectin	sc-8422	Santa Cruz
Donkey Anti-goat IgG-FITC	sc-2024	Santa Cruz
Goat Anti-mause IgG-FITC	sc-2010	Santa Cruz

4. BULGULAR

4.1. sKI-MKH'lerin Kùltürü ve Çoğaltılması

Tez çalışması nda -150 °C'de saklanan sKI-MKH'ler %10 fetal sığır serumu (FBS),%1 Penisilin/Streptomisin içeren DMEM Ham's F12 besiyerinde, %5 CO₂ içeren ve 37 °C'deki kontrollü kùltür ortamında çoğaltıldı. Her 3 günde bir kùltür ortamındaki hücrelerin besiyeri tazelenildi. Kùltür kabında %70-80 oranında yoğunluğa ulaşan hücrelere tripsin ile pasajlama yapıldı. Faz kontrast mikroskobu ile hücrelerin morfolojileri takip edildi ve sKI-MKH'lerin karakteristik olarak iğsi ve fibroblast benzeri bir morfoloji sergilediği gözlemlendi (Çizim 4.1).



Çizim 4.1. Sıçan kemik iliğı kökenli mezenkimal kök hücre kùltürü. Ölçek çubuğı: (a) 200 μm, (b) 100 μm, (c) 50 μm.

4.2. Sıçan Kalbinin Çıkarılması

Kalp çıkarılması işlemi tam anestezi altında yapıldı. Anestezi sağlandıktan sonra sıçanların abdomeninden başlanarak orta hat boyunca kesi yapıldı. Sternum kemik makası ile kesildi. Sternum açıldıktan sonra göğüs kafesinin altındaki kalp, damar bağlantılarının zarar görmemesine dikkat edilerek çıkarıldı ve %10 penisilin/streptomisin içeren PBS (Phosphate Buffered Saline, Fosfat Tamponlu Salin) içine koyularak laboratuvara taşındı (Çizim 4.2).

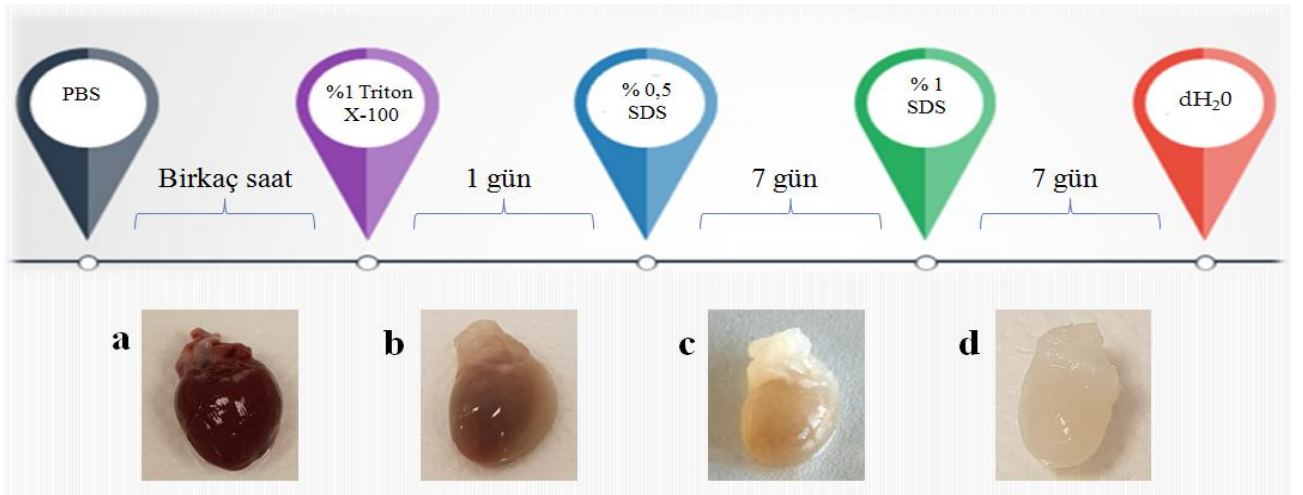


Çizim 4.2. Sıçan kalbinin çıkarılması.

4.3. Desellülarize Edilmiş Kalp Ekstraselüler Matriksinin Karakterizasyonu

Sıçanlardan elde edilen kalplerin desellülarizasyonu sıvıda çalkalama metoduyla gerçekleştirildi. Kalp örneklerinin sırasıyla PBS, %0,5 SDS, %1 SDS, %0,1 PAA içerisinde çalkalamalı olarak yapılan desellülarizasyonu sürecinde dokunun renginin açıldığı gözlemlendi. Desellülarizasyon sürecinin 15.gününde kalp örneklerinin üç boyutlu

mimarisinin korunduğu yarı şeffaf ve hücrelerinden arındırılmış bir kalp ekstraselüler matriksi elde edildi (Çizim 4.3). Hücrelerin dokulardan uzaklaştırılması amacıyla kullanılan Triton X-100 deterjanının deselülarizasyonun başlangıç aşaması için uygun olduğu, ancak tüm dokuyu deselülarize edecek sertlikte bir ajan olmadığı görüldü. Bunun yanı sıra %0,5 ve %1 oranlarında kullanılan SDS deterjanının ise etkili bir deselülarizasyon sağladığı gözlemlendi. Yüksek konsantrasyonlarda SDS kullanımının hücreleri dokudan arındırmasına ek olarak matrikse de zarar vermesi nedeniyle en uygun doz olarak %1 oranında SDS kullanımına karar verildi. Deselülarizasyon sürecinde gittikçe yarı şeffaf bir görünüm kazanan kalp örneklerindeki koroner damarlar da çıplak gözle gözlemlenebilir hale geldi.

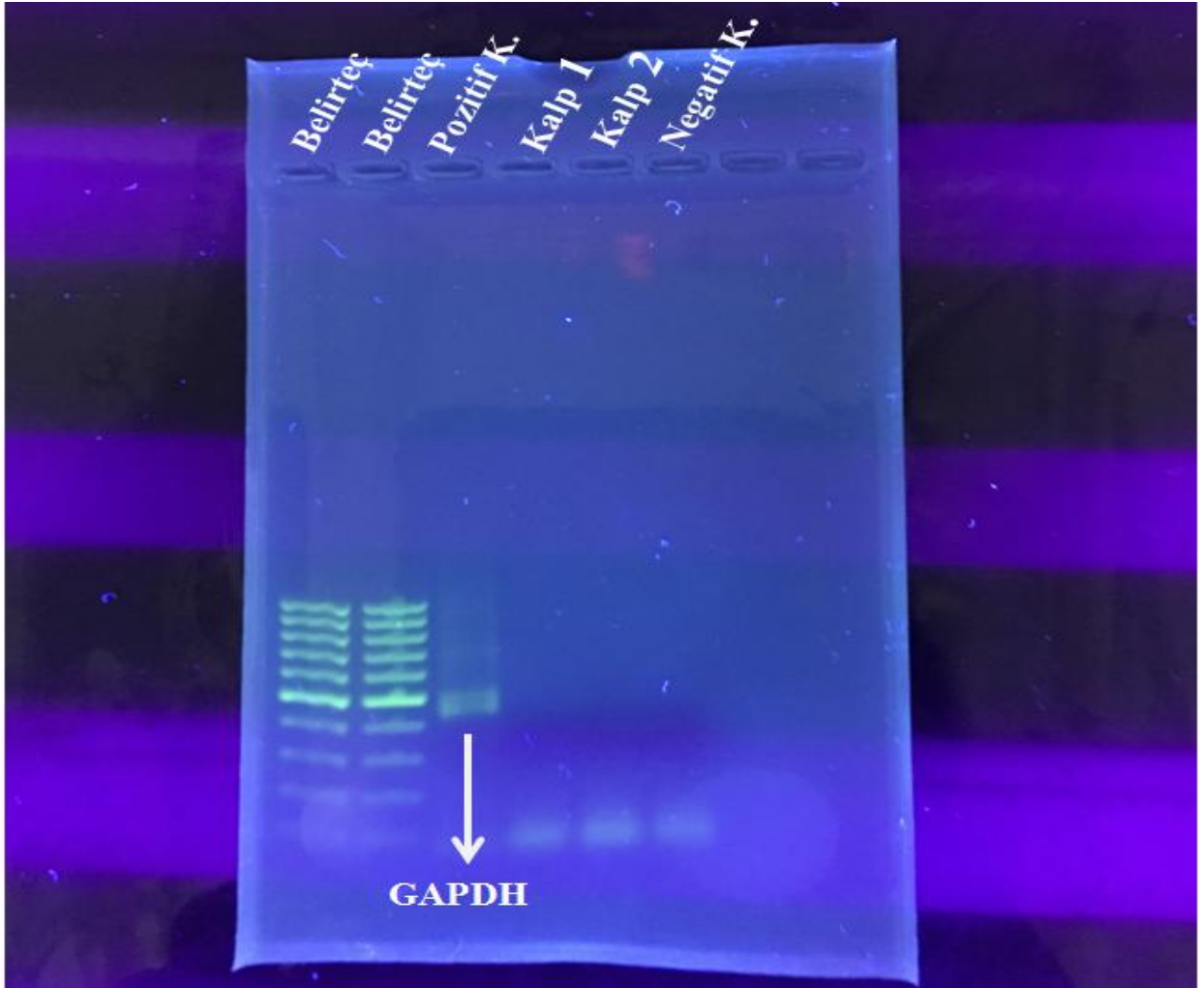


Çizim 4.3. Sıçan kalbinin deselülarizasyonu. Kalp deselülarizasyonunun (a) 0. gün, (b) 1. gün, (c) 7. gün, (d) 14. gün ve sterilizasyonu yapılarak reselülarizasyona (hücre ekimine) hazır kalp ekstraselüler matriksi.

4.3.1. PCR ile DNA İçeriğinin Ölçülmesi

Kalp örneklerinin deselülarizasyonu tamamlandıktan sonra ekstraselüler matriksteki DNA içeriğinin belirlemek için DNA saflaştırma kiti ile (GeneJET Genomic DNA Purification Kit, Fermentas) DNA izolasyonu yapıldı. Pozitif kontrolden (sKİ-MKH) izole edilen genomik DNA örneğinden GAPDH geninin konvansiyonel PCR ile çoğaltılması neticesinde jel görüntüleme cihazıyla (DNR Bio-Imaging System) yapılan incelemede agaroz jelde pozitif bir bant gözlemlendi. Ancak deselülarize kalp ekstraselüler matriksinden ve herhangi bir DNA bileşeni içermeyen negatif kontrolden izole edilen genomik DNA

örnekleriyle yapılan konvansiyonel PCR ürünlerinin agaroz jelde GAPDH geni için bant vermemesi, kalp ekstraselüler matriksinin başarıyla hücrelerinden arındırıldığını gösterdi.



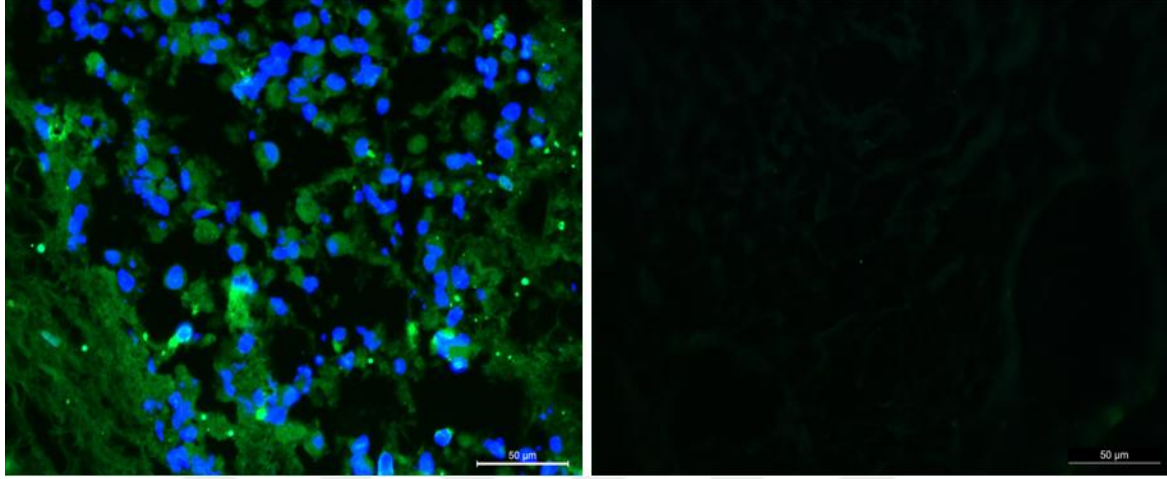
Çizim 4.4. Deselülarizasyon süreci neticesinde kalp ekstraselüler matriksinde DNA kalıntısı kalıp kalmadığının jel elektroforezi ile tespit edilmesi.

4.3.2. Histokimyasal ve İmmün Floresan Boyamalar

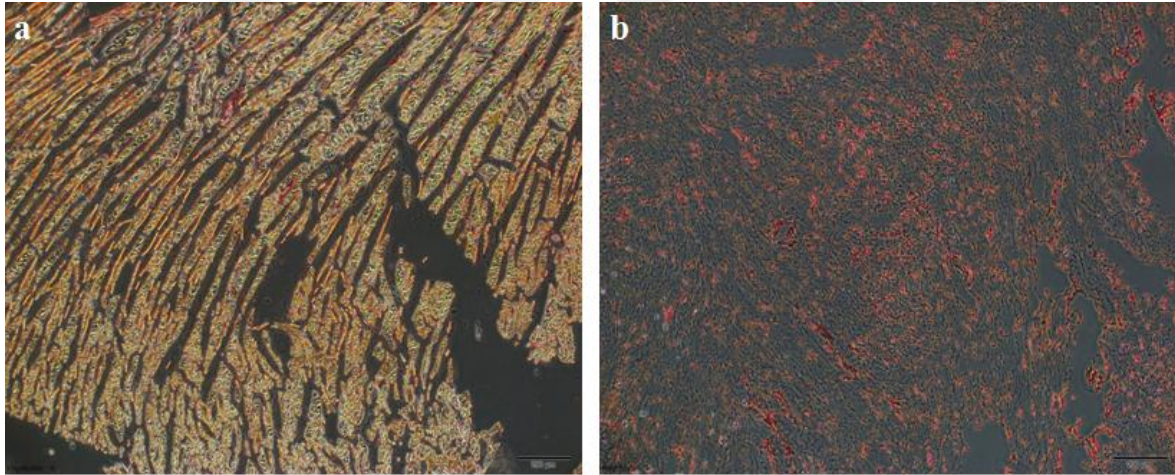
Ekstraselüler matriks bileşenlerinden olan fibronektin proteinine özgü antikor ile yapılan immün floresan boyama sonrasında normal kalp dokusu ile desellülarize ekstraselüler kalp matriksi kıyasladığında deselülarizasyon işleminin başarılı şekilde gerçekleştirildiği ve hücrelerin matriksten uzaklaştırıldığı görüldü. (Çizim 4.5).

Çekirdek ve sitoplazmayı sarı ve kollajen liflerini kırmızı renkte boyayan pikrosiriyus red ile yapılan histokimyasal analizler sonrasında deselülarize kalp

matriksinde yalnızca kollajen liflerinin boyanması ve sarı renkte bir çekirdek ve ya sitoplazma boyamasının görülmemesi de matriks içinde bir çekirdek ve sitoplazma kalıntısının olmadığı gösterdi (Çizim 4.6).



Çizim 4.5 . Normal kalp dokusundan (a) ve desellülarize ekstraselüler kalp matriksinden (b) elde edilen kesitlerde fibronektin (yeşil) boyaması. Kesitlerin zıt boyamaları ise DAPI (mavi) kullanılarak yapılmıştır. Ölçüm çubuğu: 50 µm (a-b).

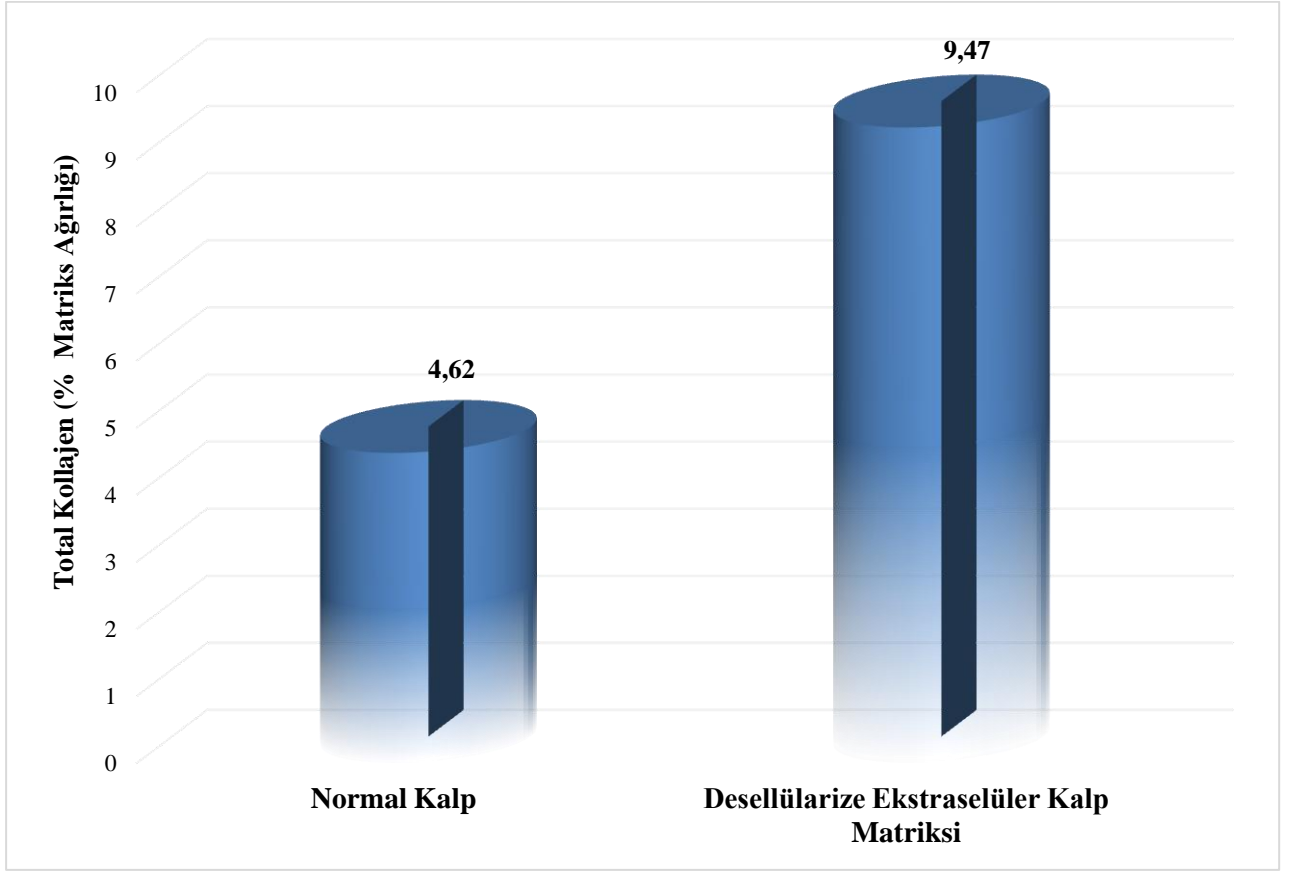


Çizim 4.6. Normal kalp (a) ve desellülarize kalp ekstraselüler matriksinden (b) elde edilen kesitlerde pikrosiriyus red boyaması. Ölçüm çubuğu: 200 µm.

4.3.3. Kalp Ekstraselüler Matriksindeki Kollajen İçeriğinin Biyokimyasal Olarak Belirlenmesi

Deselülarizasyon sonrasında, kalp ekstraselüler matriksindeki kollajen içeriği deselülarize edilmemiş kalp dokusuyla kıyaslanarak pikrosiriyus red ile biyokimyasal olarak incelendi. İnceleme neticesinde elde edilen değerler kollajen miktarının matriksin toplam ağırlığına oranlanarak yüzde olarak belirlendi. Biyokimyasal analiz sonucunda

deselülarize edilmemiş kalp dokusunun % 4,62 kollajen içerdiği, buna karşılık deselülarize kalp ekstraselüler matriksinin ise % 9,47 kollajen içerdiği bulundu (Çizim 4.7).

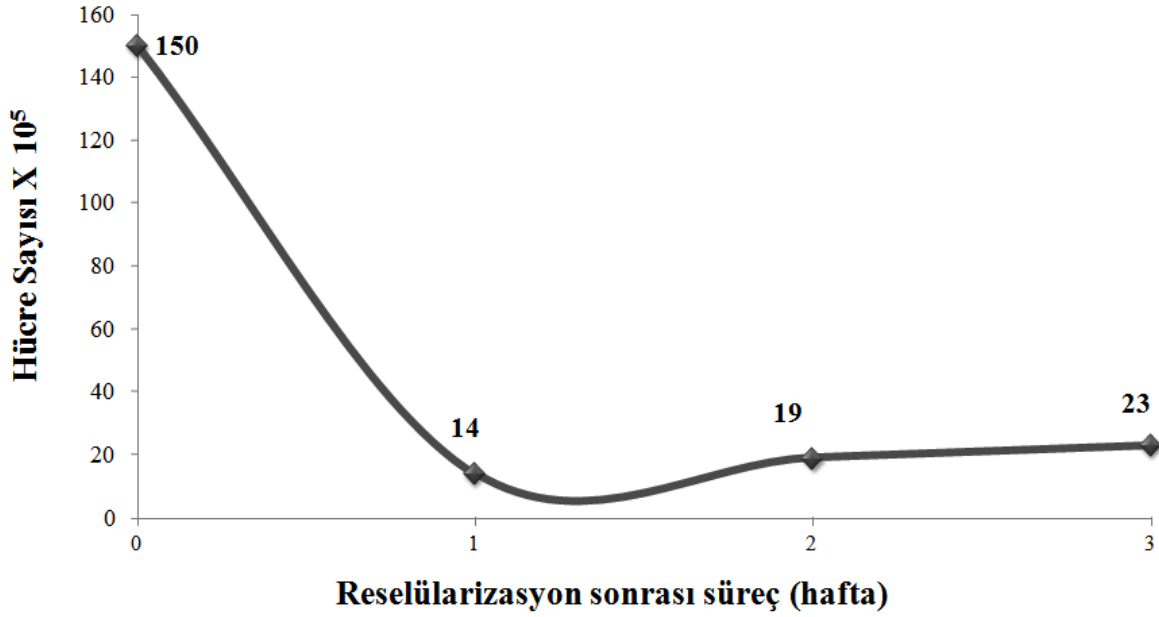


Çizim 4.7. Normal kalp matriksi ve deselülarize ekstraselüler kalp matriksi örneklerindeki total kollajen miktarının matriks ağırlığına oranla yüzde olarak tespit edilmesi.

4.4. Deselülarize Kalp Ekstraselüler Matriksinin Reselülarizasyonu

Reselülarizasyon öncesinde ekilecek hücrelerin yerleşip çoğalabilmeleri açısından deselülarize kalp ekstraselüler matrikslerinin uygun hale getirilmesi amacıyla matriks örnekleri hücre içermeyen besiyerinde 1 gün boyunca inkübe edildi. 0. günde ekstraselüler matriks $1,5 \times 10^6$ hücre ekilerek reselülarize edildi ve deselülarize kalp ekstraselüler matriksine ekilen sKİ-MKH'lerin canlılıkları WST-1 analizi ile incelendi. Kalp ekstraselüler matriksine $1,5 \times 10^6$ hücre ekilerek yapılan reselülarizasyon sonrasında, üç hafta süresince matriks üzerindeki canlı hücrelerin sayısı saptandı. Kalp matriksi üzerindeki canlı hücre sayısı ilk hafta için yaklaşık 14×10^4 olarak ölçüldü. Ancak sürecin ilerleyen haftalarında matriks üzerinde proliferasyonuna devam eden hücrelerin sayısı ikinci hafta için yaklaşık 19×10^4 ve üçüncü hafta için ise 23×10^4 seviyelerine kadar

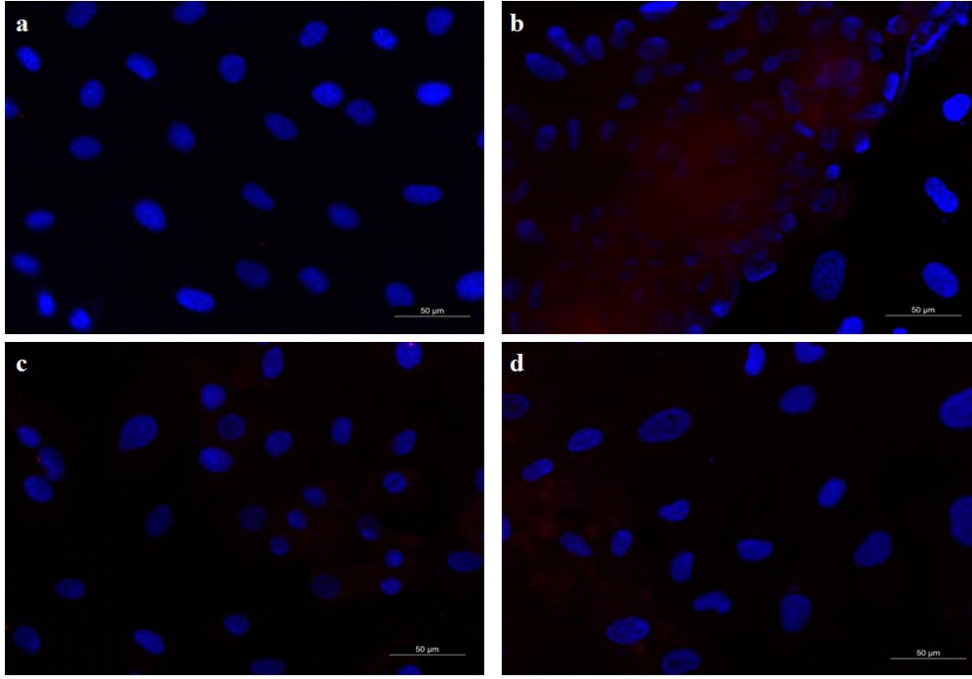
yükseldi. Reselülarizasyon sonrasında yapılan incelemeler sKİ-MKH'lerin ekstraselüler matriks üzerinde canlılıklarını koruduğunu ve bölünebildiklerini gösterdi (Çizim 4.8).



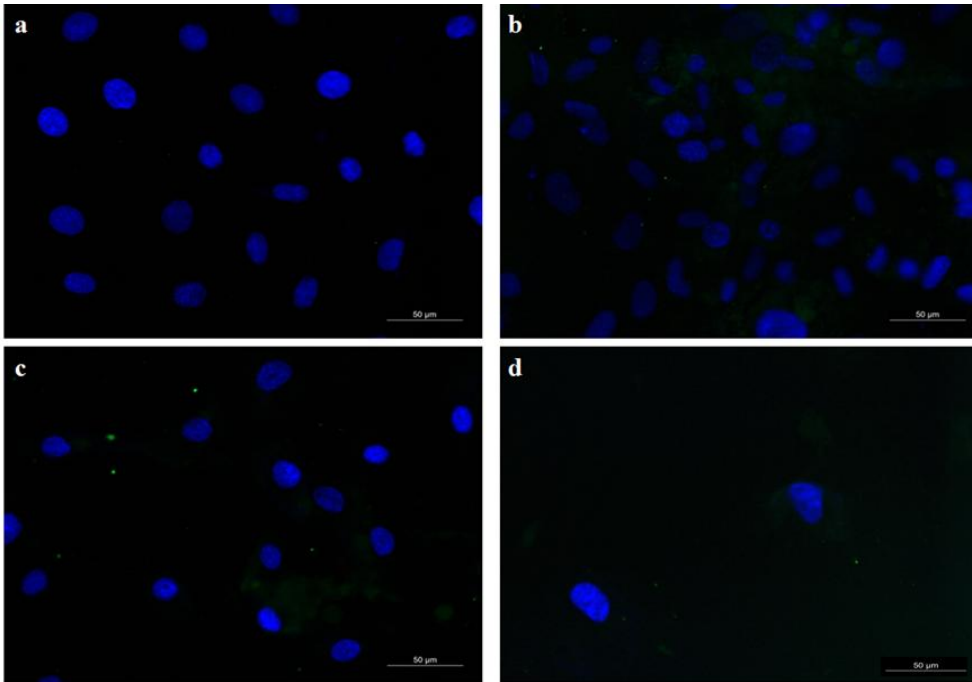
Çizim 4.8. Deselülarize kalp ekstraselüler matriksindeki metabolik olarak aktif olan hücrelerin sayısını belirlemek için yapılan WST-1 çoğalma analizi.

4.5. İki boyutlu *in vitro* Kültür Ortamında ve Kalp Ekstraselüler Matriksinde sKİ-MKH'lerin Kardiyomiyositlere Farklılaştırılması

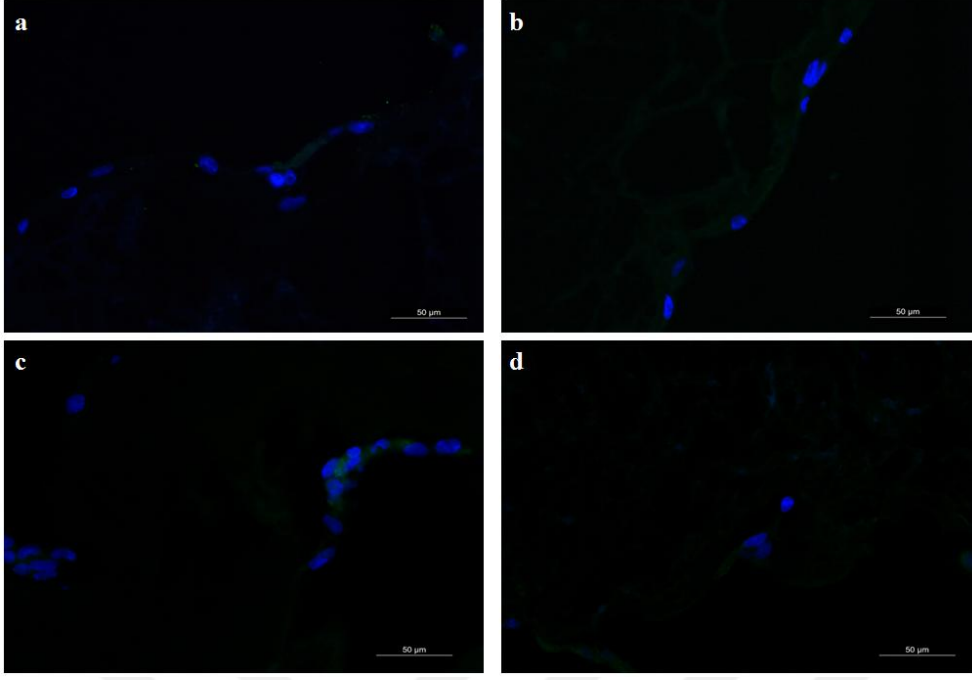
Kalp ekstraselüler matriksi üzerine sKİ-MKH ekilerek gerçekleştirilen reselülarizasyon sonrasında kontrol ve deney gruplarına ait matriks örnekleri 21 gün boyunca kültüre edildi. 21 günlük kültür sonrasında deney gruplarına ait kalp ekstraselüler matrikslerinden doku kesitleri alındı. Alınan kesitlerde kardiyomiyositlere özgü connexin 43 (Con43) ve kardiyak troponin I (cTN-I) proteinlerine karşı antikorlar ile immünfloresan boyama yapıldı ve boyanma yoğunluğuna göre değerlendirme yapıldı. Con43'ün hücre membranında ve cTN-I'nın ise hücre sitoplazmasında yer alması beklenmektedir. Elde edilen görüntülerde con43 ve cTN-I pozitif hücreler görüldü. Ancak hücrelerin tamamının pozitif olmadığı da gözlemlendi. Hem iki boyutlu kültür ortamında hem de ekstraselüler matriks üzerinde kardiyomiyositlere özgü belirteçlerle yapılan boyama sonucunda standart kültür grubunda daha az ve bölgesel olarak bir boyama gözlemlendi. Bunun yanı sıra özellikle 5-azasitidin, hidrokortizon, retinoik asit ve FGF-2 eklentili kardiyomiyojenik farklılaştırma besiyerinde kültüre edilen hücrelerde ise daha yoğun ve geniş alana yayılmış bir boyama gözlemlendi (Çizim 4.9-4.12).



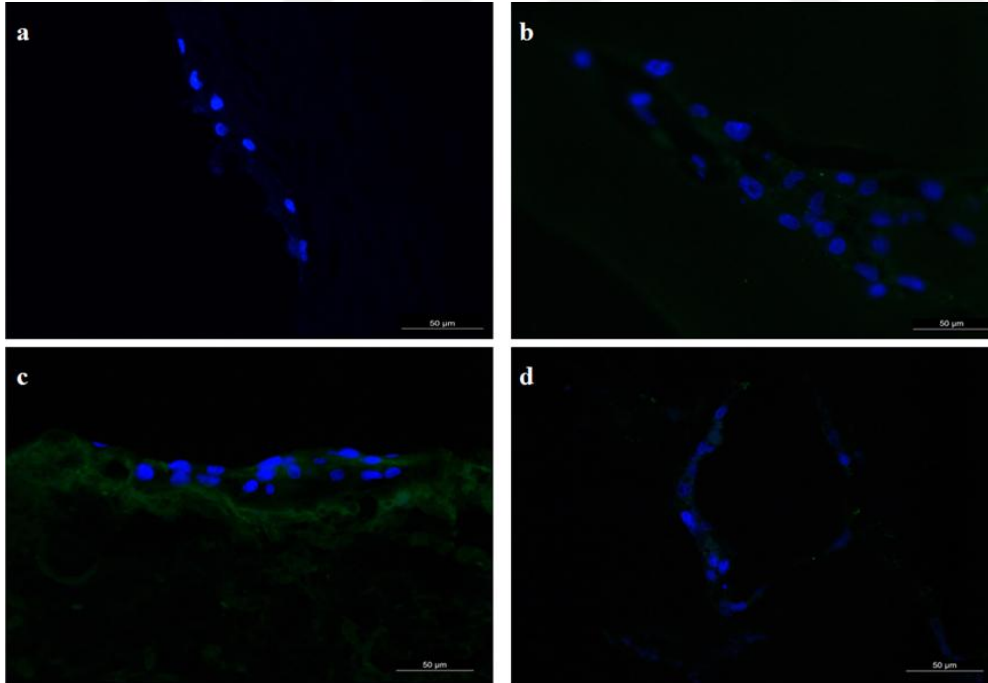
Çizim 4.9. 21. gün sonunda standart ve kardiyomiyojenik farklılaşma besiyerinde kültüre edilen iki boyutlu kültür ortamındaki hücrelerin Con43 boyaması. **(a)** standart besiyeri içinde yapılan kültürde, **(b)** 5-azasitidin, hidrokortizon, retinoik asit ve FGF-2 eklentili kardiyomiyojenik farklılaştırma besiyerinde, **(c)** VEGF eklentili kardiyomiyojenik farklılaştırma besiyerinde ve **(d)** 5-azasitidin, hidrokortizon, retinoik asit, FGF-2 ve VEGF eklentili kardiyomiyojenik farklılaştırma besiyerinde Con43 (kırmızı) boyanmıştır. Kesitlerin zıt boyamaları ise DAPİ (mavi) kullanılarak yapılmıştır. **(a-d)** Ölçüm çubuğu: 50 µm.



Çizim 4.10. 21. gün sonunda standart ve kardiyomiyojenik farklılaşma besiyerinde kültüre edilen İki boyutlu kültür ortamındaki hücrelerin cTN-I boyaması. **(a)** standart besiyeri içinde yapılan kültürde, **(b)** 5-azasitidin, hidrokortizon, retinoik asit ve FGF-2 eklentili kardiyomiyojenik farklılaştırma besiyerinde, **(c)** VEGF eklentili kardiyomiyojenik farklılaştırma besiyerinde ve **(d)** 5-azasitidin, hidrokortizon, retinoik asit, FGF-2 ve VEGF eklentili kardiyomiyojenik farklılaştırma besiyerinde cTN-I (yeşil) boyanmıştır. Kesitlerin zıt boyamaları ise DAPİ (mavi) kullanılarak yapılmıştır. **(a-d)** Ölçüm çubuğu: 50 µm.



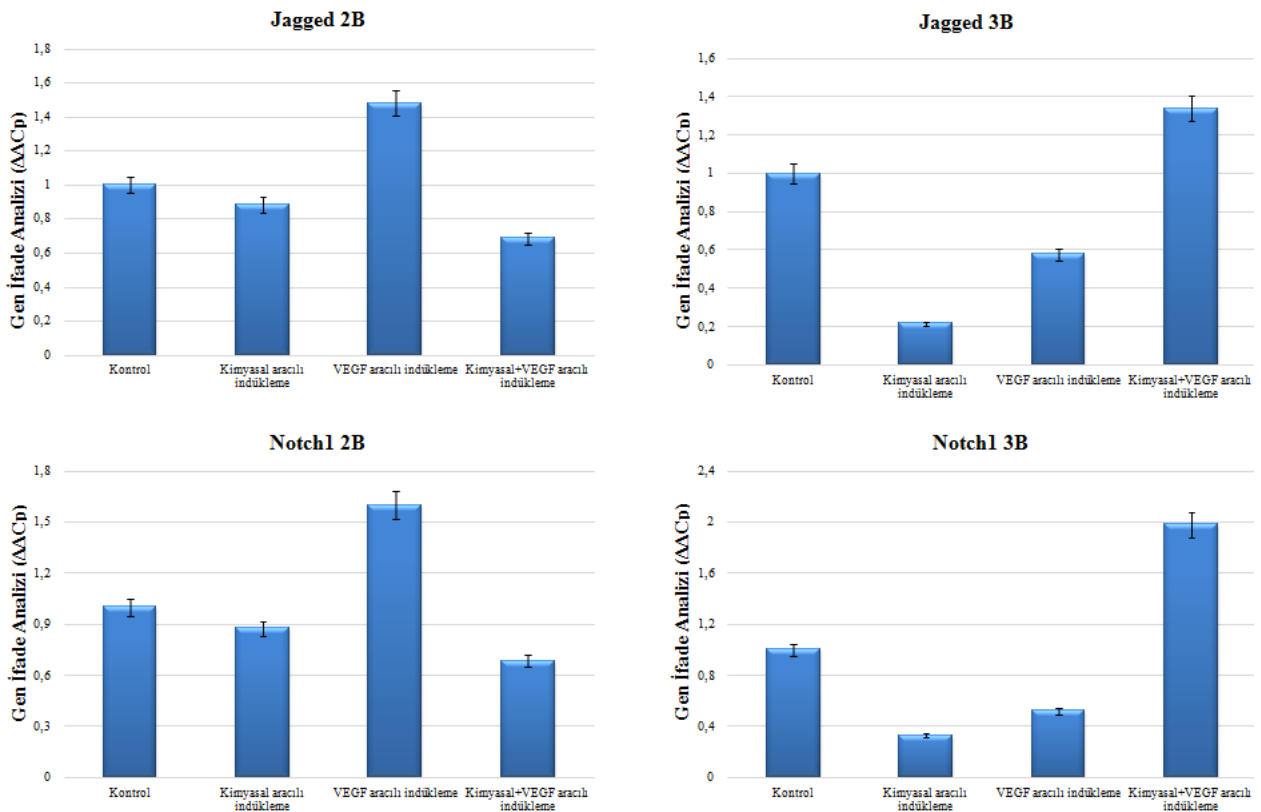
Çizim 4.11. 21. gün sonunda standart ve kardiyomiyojenik farklılaşma besiyerinde kültüre edilen kalp ekstraselüler matriksindeki hücrelerin con43 boyaması. **(a)** standart besiyeri içinde yapılan kültürde, **(b)** 5-azasitidin, hidrokortizon, retinoik asit ve FGF-2 eklentili kardiyomiyojenik farklılaştırma besiyerinde, **(c)** VEGF eklentili kardiyomiyojenik farklılaştırma besiyerinde ve **(d)** 5-azasitidin, hidrokortizon, retinoik asit, FGF-2 ve VEGF eklentili kardiyomiyojenik farklılaştırma besiyerinde con43 (yeşil) boyanmıştır. Kesitlerin zıt boyamaları ise DAPİ (mavi) kullanılarak yapılmıştır. **(a-d)** Ölçüm çubuğu: 50 µm.



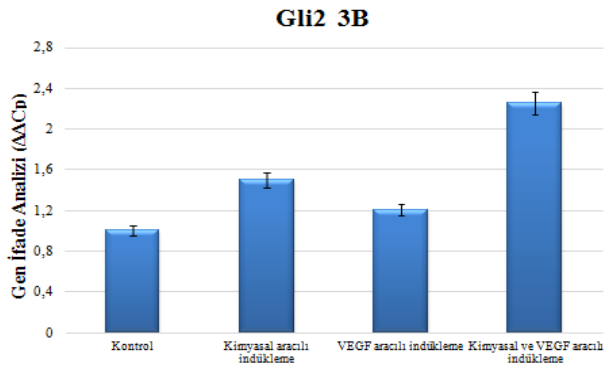
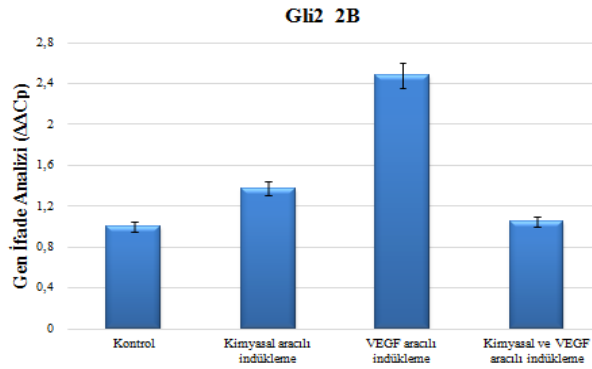
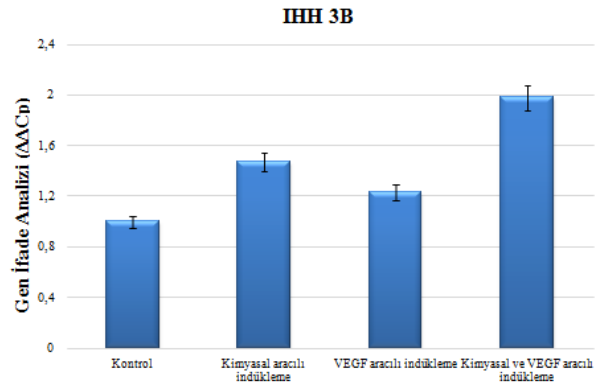
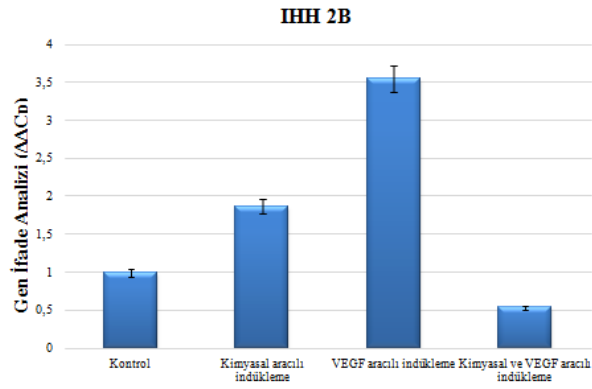
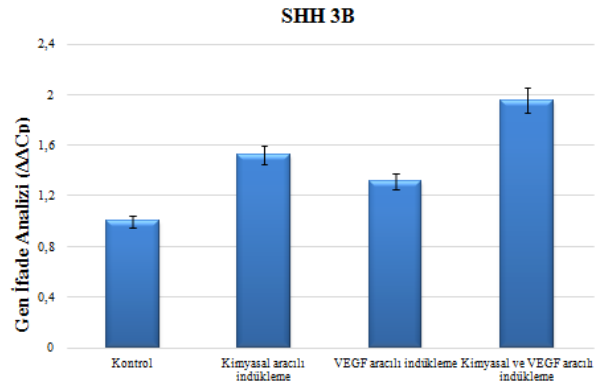
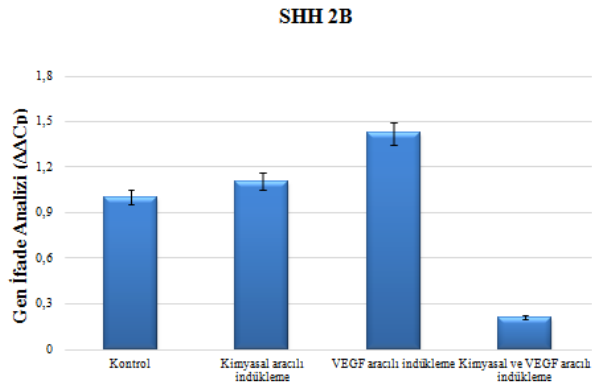
Çizim 4.12. 21. gün sonunda standart ve kardiyomiyojenik farklılaşma besiyerinde kültüre edilen kalp ekstraselüler matriksindeki hücrelerin cTN-I boyaması. **(a)** standart besiyeri içinde yapılan kültürde, **(b)** 5-azasitidin, hidrokortizon, retinoik asit ve FGF-2 eklentili kardiyomiyojenik farklılaştırma besiyerinde, **(c)** VEGF eklentili kardiyomiyojenik farklılaştırma besiyerinde ve **(d)** 5-azasitidin, hidrokortizon, retinoik asit, FGF-2 ve VEGF eklentili kardiyomiyojenik farklılaştırma besiyerinde cTN-I (yeşil) boyanmıştır. Kesitlerin zıt boyamaları ise DAPİ (mavi) kullanılarak yapılmıştır. **(a-d)** Ölçüm çubuğu: 50 µm.

Kalp ekstraselüler matriksindeki farklılaşma neticesinde elde edilen immünfloresan analizlerin verilerini doğrulamak ve matriks içinde standart besiyeri ve kardiyomiyojenik farklılaşma besiyeri ile kültüre edilen mezenkimal kök hücrelerin farklılaşmalarını Notch ve Hedgehog sinyal yollarıyla bağlantılı olarak incelemek amacıyla Notch sinyal yolağına özgü Jagged, Noggin, Notch1 ve Hedgehog sinyal yolağına özgü SHH, IHH, Gli2, kardiyomiyositlere özgü GATA-4, Nkx2.5 ve kontrol olarak GAPDH genlerinin ifade düzeyleri incelendi (Çizim 4.13-4.15).

Elde edilen sonuçlar iki boyutlu kültür ortamında Notch1 ve Jagged için yaklaşık 1,5 katlık fark ve IHH,SHH ve Gli2 için sırasıyla 1,4, 3,6 ve 2,5 katlık fark ile en etkin farklılaşmanın VEGF eklentili kardiyomiyojenik farklılaşma grupta olduğu görüldü. Üç boyutlu ekstraselüler kalp matriksinde ise Notch1 ve Jagged için sırasıyla 1,9 ve 1,3 katlık fark ve IHH,SHH ve Gli2 için sırasıyla 1,9, 2 ve 2,2 katlık fark ile en etkin farklılaşmanın 5-azasitidin, hidrokortizon, retinoik asit, FGF-2 ve VEGF eklentili kardiyomiyojenik farklılaşma grubunda olduğunu belirlendi (Çizim 4.13-4.14).

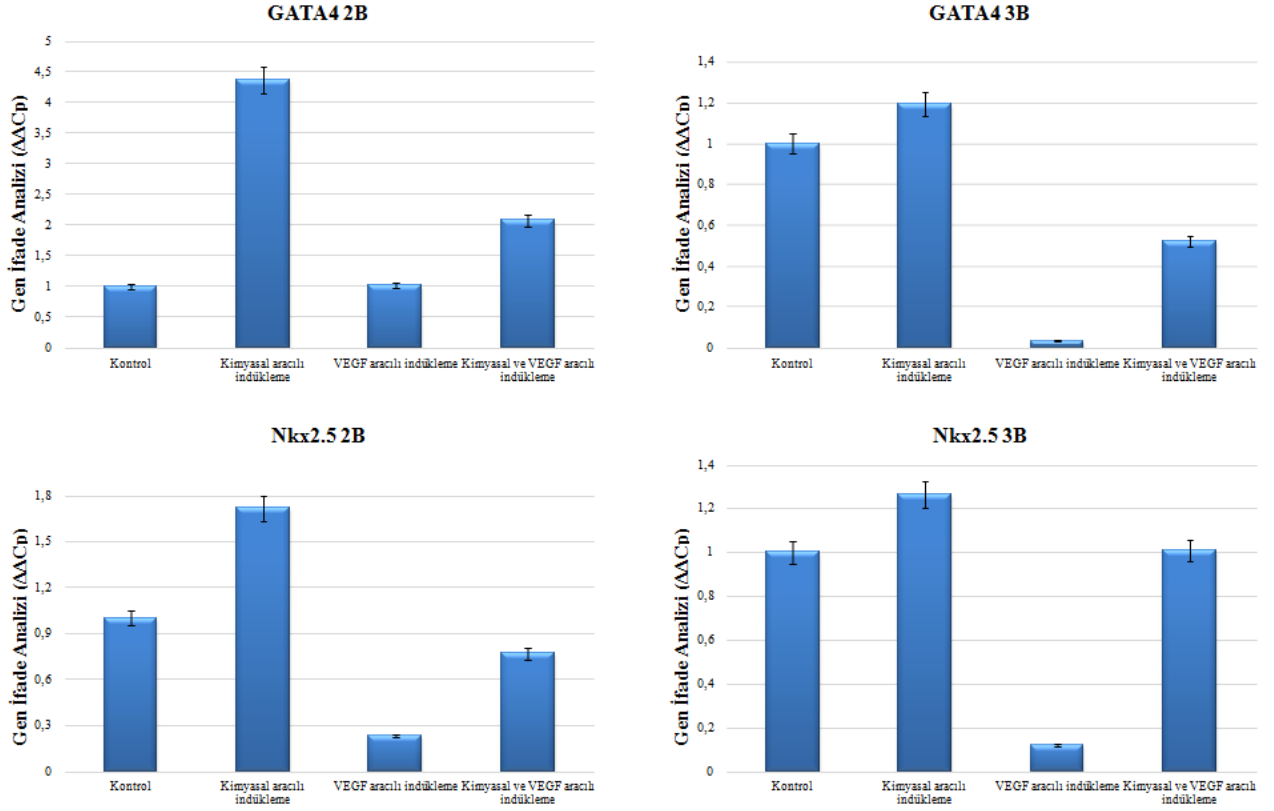


Çizim 4.13. 21. gün sonunda standart ve kardiyomiyojenik farklılaşma besiyerinde kültüre edilen iki boyutlu kültür ortamındaki ve üç boyutlu kalp ekstraselüler matriksindeki hücrelerin Jagged ve Notch1 belirteçlerini ifade etme seviyelerinin incelenmesi. Referans gen olarak GAPDH kullanılmıştır ($p < 0,05$).



Çizim 4.14. 21. gün sonunda standart ve kardiyomiyojenik farklılaşma besiyerinde kültüre edilen iki boyutlu kültür ortamındaki ve üç boyutlu kalp ekstraselüler matrisindeki hücrelerin SHH, IHH ve Gli2 belirteçlerini ifade etme seviyelerinin incelenmesi. Referans gen olarak GAPDH kullanılmıştır ($p < 0,05$).

Buna ek olarak, kardiyomiyositlere özgü GATA4 ve Nkx2.5 açısından iki boyutlu kültür ortamının için sırasıyla 4,2 ve 1,7 katlık fark ve üç boyutlu ekstraselüler kalp matriksinde de sırasıyla 1,2 ve 1,3 katlık fark ile en etkin farklılaşmanın 5-azasitidin, hidrokortizon, retinoik asit ve FGF-2 eklentili kardiyomiyojenik farklılaşma grubunda elde edildiği gözlemlendi (Çizim 4.13-4.15).



Çizim 4.15. gün sonunda standart ve kardiyomiyojenik farklılaşma besiyerinde kültüre edilen iki boyutlu kültür ortamındaki ve üç boyutlu kalp ekstraselüler matriksindeki hücrelerin kardiyomiyositlere özgü GATA4 ve Nkx2.5 belirteçlerini ifade etme seviyelerinin incelenmesi. Referans gen olarak GAPDH kullanılmıştır ($p < 0,05$).

5. TARTIŞMA

Akut ve kronik kardiyovasküler hastalıklar insan sağlığını tehdit eden en ciddi hastalıklardır. Kardiyovasküler hastalıkların tedavisini gerçekleştirebilmek amacıyla kalp bağışının yetersiz olması da en az hastalıkların kendisi kadar önemli bir durumdur. Bu sebeple araştırmacılar alternatif ve işlevsel nitelikte bir tedavi arayışı içindedirler. Günümüzde temel bilimler ve tıp bilimi başta olmak üzere birçok bilim dalı için gittikçe önem arz eden doku mühendisliği çalışmalarıyla bahsi geçen alternatif tedavileri üretmek adına ciddi mesafeler kat etmiştir. Öyle ki, doku mühendisliği teknikleri kullanılarak elde edilen hücrelerinden arındırılmış doğal yapı iskeleleri ile işlevsel doku ve/veya doku parçaları başarıyla üretilebilmiştir (Crapo ve diğ. 2011). Ulaşılan bu başarılı sonuçların temelinde doğal yapı iskelelerinin immünolojik redde neden olmaması ve hastalardan alınan hücrelerle özgül olarak doku inşasının yapılması yer almaktadır. Ancak üç boyutlu mimarisinin kompleks olması ve cerrahi müdahalelerin hasta yaşamı için oldukça risk içermesi kalp rahatsızlığı olan bireyler açısından doku mühendisliği tekniklerini içeren yaklaşımların sonuçlarını kısıtlamaktadır.

Bu tez çalışmasında kalp ekstraselüler matriksinin mezodermal germ yaprağından köken alan mezenkimal kök hücrelerin kardiyomiyojenik farklılaşmasına olan etkisi incelendi. Ayrıca mezenkimal kök hücrelerin kardiyomiyositlere farklılaşma sürecinde sinyal yolları açısından meydana gelen değişiklikler hakkında birtakım bilgilere ulaşılması amaçlandı. Böylelikle daha etkin ve işlevsel somatik kalp hücrelerinin oluşmasıyla sonuçlanacak farklılaşma mekanizmasının ortaya konması ana hedefler arasında yer almaktadır. Çalışmamızda kalp ekstraselüler matriksi kullanılarak etkin bir kardiyomiyojenik farklılaşmanın hedeflenmesinde, kalbin fizyolojisi nedeniyle yaşamla doğrudan ilişkili bir organ olması en önemli etmenlerden biridir. Söz konusu çalışma kalp doku mühendisliği ile ilgili moleküler seviyede bilgilere ışık tutması nedeniyle değerli bir görevi de yerine getirmektedir. Bunlara ek olarak, potensisi yüksek erişkin kök hücrelerden olan mezenkimal kök hücrelerin mezoderm kökenli olması ve oluşturulması hedeflenen kardiyomiyositlerin de mezodermal kökenli olması çalışmada bu iki unsurun başlangıç ve sonuç olarak yer almasının nedenleri arasındadır (Leri ve diğ. 2015, Komada ve diğ. 2012).

Çalışmanın amacı doğrultusunda yapılan yeniden hücrelendirme aşamasında kullanılacak hücrelerin hangisi olacağına ise literatürdeki bilgilerin de işaret ettiği yüksek çoğalma ve farklılaşabilme özellikleri nedeniyle mezenkimal kök hücreler olarak karar verildi (Dominici ve diğ 2006). Mezenkimal kök hücrelerin vücuttaki pek çok dokudan

elde edilebilmesi ve kalp hasarlarının onarımında etkili hücrelerden olması da bu hücreler için ayrıca tercih sebebi olmuştur (Bartunek ve diğ. 2008). Kalp ekstraselüler matriksi, kardiyomiyojenik uyaranlar ve mezenkimal kök hücreler kullanılarak yapılacak farklılaştırma sürecinde tüm kök hücrelerin farklılaşma yoluna girmemesi olası bir neticedir. Bu kalp doku mühendisliği çalışmasında mezenkimal kök hücrelerin kullanılması belli avantajları da beraberinde getirmektedir. Öyle ki, mezenkimal kök hücrelerin vasküler damar ağının oluşumunda görev alması (Zimmet ve Hare 2005, Wang ve diğ. 2014) ekstraselüler matriks bileşenlerinin onarımına ve üretimine destek olması, nakil sonrasında meydana gelebilecek hipoksik koşullara karşı anti-apoptotik özelliği ile ve immunojenik ataklara karşı da immün düzenleyici rolü ile kalkan görevi görmesi bu avantajların başında gelmektedir (Casaraghi ve diğ. 2010).

Günümüze kadar, organların hücrelerinden arındırılarak yalnızca ekstraselüler matriks elde etmek ve sonrasında bu matrikslerin yeniden hücrelendirilmesi amacıyla birçok deselülarizasyon yöntemi ortaya çıkarılmıştır (Keane ve diğ. 2015). Deselülarizasyon tekniğinde kullanılan mekanik yöntemlerle organların hücrelerinden arındırılması organın büyüklüğüne ve histolojik yapısına göre değişkenlik göstermektedir (Sheridan ve diğ. 2013) . Ancak bu tez çalışmasında hem çalkalamalı olarak mekanik etki hem de deterjan uygulamasıyla kimyasal etki bir araya getirilerek etkili bir şekilde kalp deselülarizasyonu gerçekleştirildi. Kalp deselülarizasyonunda kimyasal ajan olarak kullanılan deterjanların difüzyon etkinliği çalkalamadan gelen mekanik hareket ile arttırıldı. Bu nedenle hem fiziksel hem de kimyasal ajanların bir arada kullanıldığı bu deselülarizasyon tekniği, organları etkili bir şekilde hücrelerinden arındırmaya imkan sağladı. Deselülarizasyon boyunca, kalp hücrelerinden arındıkça matriks yarı saydam bir görünüm kazandı (Çizim 4.3). Ancak literatürde yer alan bilgiler, deselülarizasyon etkinliğinin belirlenebilmesi için bu makro gözlemin yeterli olmadığına, organın tamamen ya da tamamına yakın bir oranda hücrelerinden arındırılmış olmasına ve deselülarizasyon tekniğinde kullanılan deterjanların ekstraselüler matriks içeriğine bir zarar vermemesi gerektiğine göstermektedir (Badylak ve diğ. 2011). Bu çalışmada gerçekleştirilen kalp deselülarizasyonu sonrasında, matriks yapısının histokimyasal ve immünfloresan olarak incelenmesi neticesinde ekstraselüler matriks içinde herhangi bir hücrenin ve/veya hücre kalıntının yer almadığı gözlemlendi (Çizim 4.5-4.6). Kalp ekstraselüler matriksinde herhangi bir hücresel bileşenin kalıp kalmadığını moleküler olarak doğrulamak amacıyla, matriksten genomik DNA izolasyonu yapıldı ve GAPDH genine özgü primer ile yapılan konvansiyonel PCR ürünleri agaroz jele yüklenerek, yürütüldü. Pozitif kontrolün yer aldığı

kuyucukta bant elde edilmesi ve negatif kontrolün yer aldığı kuyucukta bant elde edilememesi PCR deneyinin başarılı bir şekilde yapıldığını gösterdi. Deselülarize ekstraselüler kalp matriksinden elde edilen genomik DNA'lar ile yapılan PCR'ın ürünlerinin ise elektroforez sonrasında negatif sonuç vermesi, yapılan kalp deselülarizasyonunun başarısını ve ekstraselüler matriksin hücrel materyal içermediğini doğruladı (Çizim 4.4). Deselülarizasyon başarısını belirleyen etmenlerden bir diğeri ise matriks bütünlüğünün korunmasıdır. Deselülarizasyon sonrasında matriks bütünlüğünün incelenmesine dair yapılan histokimyasal analizler, deterjan uygulamasının matriks bileşenlerine fazla zarar vermediğini ve normal kalp dokusu ile kıyaslandığında deselülarize kalp matriksinin bütünlüğünün kısmen korunduğunu gözlemlendi (Çizim 4.5-4.6). Bunlara ek olarak, bu tez çalışması dahilinde yapılan biyokimyasal değerlendirmeler neticesinde normal kalp matriksindeki kollajen içeriğinin total ağırlığa oranla % 4,62 olduğu, deselülarize ekstraselüler kalp matriksindeki kollajen içeriğinin ise % 9,47 olduğu gösterildi (Çizim 4.8). Sonuç olarak elde edilen veriler deselülarizasyon işleminin başarısı açısından gerekli kriterlerin sağlandığını ortaya koydu.

Doğal bir yapı iskelesi olan deselülarize kalp ekstraselüler matriksi her ne kadar biyouyumlu olsa da, deselülarizasyon sırasında kullanılan deterjanların ekstraselüler proteinlerde meydana getirdiği hasar hücrelerin matrikse tutunmasını ve orada çoğalarak devamlılığını sürdürmesini etkileyebilmektedir (Wilhelmi ve diğ. 2012). Bu nedenle, özellikle tam organ deselülarizasyonlarında dikkat edilmesi gerek önemli hususlardan birisi de kimyasal ve/veya fiziksel ajanların ekstraselüler matriks bileşenlerin oluşturacağı tahribatı olabildiğince minimum seviyede tutmaktır. Bu bilginin varlığında, çalışmada oldukça etkili bir kimyasal ajan olan SDS deterjanını yüksek konsantrasyonlarda kullanmaktan kaçınıldı ve %0,5 ve %1 olacak şekilde düşük konsantrasyonlarda SDS ile muamele yapıldı. Buna ek olarak düşük konsantrasyonlarda da olsa SDS'in verebileceği zararı indirmek, dokunun SDS ile temas sürecini azaltmak ve hücre membranlarındaki lipit ve lipoprotein yapılarını parçalamak amacıyla SDS öncesinde Triton X-100 deterjanı kullanıldı. Ardından söz konusu düşük konsantrasyonlarda kullanılan SDS ile hücreler tamamen lizise uğratarak, matriksteki tüm hücrel yapılar matriksten uzaklaştırıldı. Reselülarizasyon sonrasında kalp ekstraselüler matriksi üzerinde 3 hafta boyunca hücrelerin canlılığını sürdürebildiği ve hücrelerin proliferasyonu için matriksin biyoaktif yapısını koruyabildiği de gösterildi (Çizim 4.11).

Mezenkimal kök hücrelerin farklılaştırılarak oluşturduğu kardiyomiyositlerin eldesi ve böylece kalp rejenerasyonunun (yenilenmesinin) ve reperasyonunun (onarımının)

sağlanması günümüzde kalp hastalıklarının tedavisi için hedeflenen ana noktalardandır. Ancak *in vivo* olarak yapılan bir çalışmada, miyokard enfarktüs hasarı olan bölgeye aktarılan mezenkimal kök hücrelerin hasarlı mikroçevrede onarımın aksine skar oluşumuna neden olduğu bildirilmiştir (Wang ve diğ. 2001). Bu bulgu mezenkimal kök hücrelerin kardiyomiyositlere sağlıklı bir şekilde farklılaşması için sitokin, kemokin, serum içermeyen kültür koşulları, deselülarize ekstraselüler matriks gibi çeşitli fiziksel ve kimyasal tetikleyicilerin gerekliliğine dikkat çekmektedir.

5-azasitidin (5-aza) hem *in vivo* hemde *in vitro* olarak çeşitli sinyal yollarını aktifleştirerek bazı genlerin ifade seviyelerinin seviyelerinin değişmesine aracılık eden bir çeşit modifiye sitozin molekülüdür (Chiu ve Blau 1985). 5-aza molekülünün kültür ortamındaki hücrelere uygulandığında, kardiyomiyojenik yöndeki uyarımı yaklaşık olarak %25-30 seviyelerinde tetiklediği ve kardiyomiyositlere özgü genlerin ifadesinde artışa yol açtığı gösterilmiştir (Tomita ve diğ. 2007). 5-aza molekülünün yüksek konsantrasyonlarda uygulanması hücrelerde sitotoksik etkiye yol açacağından dolayı, optimum dozajın hücrelerin canlılığı ve farklılaşması üzerinde oldukça önemli bir yeri olduğu da bilinmektedir. Yapılan bir çalışmada 10 μ M'lık 5-aza'nın 24 saatlik uygulamasının hücrelerin kardiyomiyojenik farklılaşması için en uygun doz olduğu ortaya koyulmuştur (Tomita ve diğ. 2007). Bu nedenle söz konusu tez çalışmasında da kardiyomiyojenik farklılaşma için kullanılan mezenkimal kök hücreler 10 μ M konsantrasyondaki 5-azasitidin molekülü ile 24 saat boyunca muamele edildi.

Retinoik asit (RA) vitamin A'nın aktif formudur. RA kardiyomiyojenik farklılaşma önemli rolü olan moleküllerden bir diğeridir. Öyle ki yapılan bir çalışma da miyokardiyal enfarktüs ve hipertansiyon sonrasında oluşan doku hasarının giderilmesinde RA'ye bağlı yenilenmenin meydana geldiği ve kardiyomiyositlere özgü genlerin ifadesinde artış olduğu gösterilmiştir (Paiva ve diğ. 2005). FGF-2 hücre membranında bulunan tirozin kinaz reseptörlerine bağlanarak, hücresel çoğalma, farklılaşma ve sağkalım gibi mekanizmalarında görev alan büyüme faktörüdür. Fareler üzerinde gerçekleştirilen bir araştırmada, iskemik kalp hasarı sonrasında yenilenmenin olduğu bölgede FGF-2 ifadesinde artış meydana geldiği gözlenmiştir (Detillieux ve diğ. 2003). Hidrokortizon adrenal bezlerden salgılanan bir tür stres hormonudur ve özellikle kardiyomiyositlerin çoğalması üzerinde etkili olduğu bilinmektedir (Giraud ve diğ. 2006).

VEGF, platelet kökenli büyüme faktörü ailesine ait büyüme faktörlerinden biridir. VEGF molekülünün yalnızca vaskülogenezle ilişkili bir sitokin olmadığı, VEGFR2 reseptörü aracılığıyla kardiyomiyogenez mekanizması üzerinde de etkili olduğu *in vivo* ve

in vitro çalışmalarda ortaya koyulmuştur (Bekhte ve diğ 2011). VEGF molekülüyle diğ er yapılan çalışmalarda da, vasküler ve kardiyak hasar sonrasında VEGF'nin anjiyogenezi uyardığı, endotelial onarımı arttırdığı ve progenitör/kök hücrelerin farklılaşmaya yönlendirdiği gösterilmiştir (Hutter ve diğ. 2004, Asahara ve diğ. 1999, Chen ve diğ. 2006). Bu tez çalışmasında da sKİ-MKH'lerin kardiyomiyojenik farklılaştırma süreci boyunca (21 gün) 1 µM konsantrasyonda RA, 10 nM konsantrasyonda FGF-2, 50µM konsantrasyonda hidrokortizon ve 1,25 ng/mL konsantrasyonda konsantrasyonda VEGF kullanıldı. Belirtilen konsantrasyon ve sürede 5-aza, RA, FGF-2, hidrokortizon ve VEGF uygulanması neticesinde sKİ-MKH'lerin kardiyomiyosit hücrelerine farklılaştığı ve bu hücrelere özgü genleri ifade ettiği gösterildi.

Notch sinyal yolağı evrimsel olarak korunmuş bir yolaktır ve farklılaşma, çoğalma ve apoptoz gibi hücrel mekanizmaların kontrolünde önemli rol oynamaktadır (Brenner ve diğ. 2000). Notch proteinlerinin memeli hücrelerinin ve dokularının çoğunda ifade edildiği ve özellikle kalp rejenerasyonu, gelişimi ve oluşumda görev aldığı ortaya koyulmuştur (Perdigoto ve Bardin 2013). Hedgehog sinyal yolağı da başta embriyonik dönemde olmak üzere, erişkin canlılarda da farklılaşma ve çoğalma mekanizmalarında sinyal yoğunluğuna bağlı olarak aktivatör ya da inhibitör olarak işlev göstermektedir (Verma ve diğ. 2013). Zebra balıkları üzerinde yapılan bir çalışma da Hedgehog sinyalinin aktifleştirilmesi sonucunda çoğalan kardiyomiyosit hücrelerinin %60 oranında arttığı gösterilmiştir (Choi ve diğ. 2013). Hedgehog sinyal yolağıyla ilgili yayınlanan bir diğ er çalışmada da, bu sinyal yolağının kardiyomiyogenezi tetiklediği ve kardiyomiyosit hücrelerinin apoptozunu baskıladığı belirtilmiştir (Gianakopoulos ve Skerjanc 2005). GATA-4 ve Nkx2.5 genleri de kalp gelişimiyle ilişkili en önemli genlerdendir (Arminan ve diğ. 2009). Bu çalışmada, farklılaşma süreci sonunda Notch sinyal yolağına ait Notch1 ve Jagged genlerinin ve Hedgehog sinyal yolağına ait SHH, IHH ve Gli2 genlerinin ifade düzeylerinde değişimler gözlemlendi. Öyle ki, Notch ve Hedgehog sinyal yolağlarına bakıldığında, ilgili genlerin ifadesinin 2-B ortam açısından VEGF eklentili farklılaşma ortamında en yüksek olduğu görülürken, 3-B ekstraselüler kalp matriksindeki farklılaşma açısından ise 5-azasitidin, hidrokortizon, retinoik asit, FGF-2 ve VEGF eklentili ortamda en yüksek olduğu görüldü (Çizim 4.13-4.14). Kardiyomiyosit hücrelerine özgü genler olan GATA-4 ve Nkx2.5 genlerinin ifade düzeylerinin ise 5-azasitidin, hidrokortizon, retinoik asit, FGF-2 eklentili kardiyomiyojenik farklılaşma ortamında en yüksek olduğu görüldü (Çizim 4.15). Buna ek olarak VEGF eklentili farklılaştırma ortamında kardiyomiyositlere özgü GATA4 ve Nkx2.5 belirteçlerinin ifadesinin az olmasının sebebinin ise VEGF

molekülünün kök hücrelerin çoğalma/farklılaşma dengesini daha çok çoğalma açısından yönlendirmesi olduğu düşünüldü (Zisa ve diğ. 2011).

Deselülarize ekstraselüler matrikslerin yeniden hücrelendirilmesi noktasında genellikle sürekli çoğalma özellikleri nedeniyle kolay bir reselülarizasyon sağlayabilen tümör hücre hatları kullanılmaktadır (Crabbé ve diğ. 2015, Mazza ve diğ. 2015). Bunun yanı sıra tümör hücre hatlarıyla yapılan reselülarizasyon yalnızca ekstraselüler matriksin hücrelerin çoğalması için sağladığı mikroçevrenin incelenmesi açısından yarar sağlarken, klinik kullanımdan tamamen uzaktır. Gerçekleştirilen bu tez çalışması ise tümör hücrelerinin aksine sağlıklılık durumunun devamı için birçok olumlu özelliği bulunan mezenkimal kök hücrelerle yapılan reselülarizasyonu kapsamaktadır. Kök hücrelerin reselülarizasyon sonrasında ekstraselüler matrikse tutunması ve çoğalması tümör hücrelerine kıyasla daha güç olmasına rağmen, bireylerin kendi kök hücrelerinin kullanılmasıyla immünolojik açıdan tam uyumlu ve klinik kullanıma elverişli olması da kök hücrelerin sahip olduğu önemli avantajlardandır. Bununla bağlantılı olarak kardiyomyositlere özgü genlerin ifadesi bakımından qRT-PCR ile elde edilen veriler söz konusu tez çalışmasının başarı değerlerinden biridir (Çizim 4.13-4.15). Yapılan immünfloresan boyamalarla da bu genlerin protein diline çevrildiği ve işlevsel proteinler olarak hücrelerde yer aldığı ortaya koyuldu (Çizim 4.9-4.12). Tüm bu sonuçlar birbiriyle tutarlı olarak üç boyutlu kalp ekstraselüler matriksinde daha yüksek seviyede bir kardiyomyojenik farklılaşmanın desteklendiğini gösterdi.

5.1. Sınırlılıklar

Üç boyutlu ekstraselüler matriksler ile yapılan bu çalışmada, SEM (scanning electron microscope) kullanılarak deselülarizasyon sürecinde matrikste meydana gelen değişimler hakkında bilgi sahibi olunabilir.

Çalışmada yer alan deneylerde normal kalp ve deselülarize ekstraselüler matriksin biyokimyasal içeriğine dair ileri bilgilere ulaşabilmek için liyafilizatör ile tam kurutulmuş dokular kullanılması, daha etkili ve kesin sonuçların elde edilmesini sağlayabilir. Bu bağlamda SEM ve liyafilizatör cihazlarının laboratuvar cihazları arasında bulunması matriksteki değişimlerin gözlemi ve ayrıntılı biyokimyasal analizlerin yapılabilmesine olanak sağlayacaktır.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Yürütülen bu tez çalışmasında kemik iliğinden izole edilen mezenkimal kök kullanılarak yeniden hücrelendirilen deselülarize kalp ekstraselüler matriksinin, bu kök hücrelerin kardiyomiyojenik farklılaşmasına olan etkilerinin incelenmesi amaçlandı. Söz konusu deselülarize ekstraselüler matriks kaynaklı etkilerin, kardiyomiyojenik farklılaşmada oldukça önemli sinyal yollarından olan Notch ve Hedgehog sinyal yolları bazında moleküler olarak da incelenmesi çalışmanın amaçları dahilindedir. Elde edilen sonuçlara göre matriks kaynaklı fiziksel uyarım ve kardiyomiyojenik farklılaşma besiyerinden kaynaklı kimyasal uyarım, ekstraselüler kalp matriksi üzerinde daha yüksek bir farklılaşma olduğu ortaya koyuldu. Bu sonuçlar, farklılaşma sonrasında kardiyomiyositlere özgü belirteçlerin protein düzeyinde immünfloresan analizlerle ve gen düzeyinde ise qRT-PCR analizleriyle ifade edildiğini doğruladı.

Bunun yanı sıra, kalp dokusunun deselülarizasyon ile hücrelerinden arındırılması süresinde, deselülarize yapı iskelesinin doğal yapısını büyük oranda-kısmen koruduğu histokimyasal ve immünfloresan analizlerle tespit edildi. Ayrıca kalp ekstraselüler matriksinin kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücrelerin çoğalma ve farklılaşma mekanizmaları için uygun bir niş (mikroçevre) sağladığı da gözlemlendi. Bu çalışma ile kalp ekstraselüler matriksinin doku ve/veya organ yenilenmesi ve onarılması için sahip olduğu potansiyeli ortaya koymaktadır ve doku mühendisliğinde ileri çalışmalar için çıkış noktası niteliği taşımaktadır. Çalışmada incelenen Notch ve Hedgehog sinyal yollarındaki değişimlere dair daha derinlemesine çalışmalar ihtiyaç sebebidir.

Elde edilen kalp benzeri dokuların elektriksel uyarana cevap olarak kasılabilen bir doku yapısı olup olmadığıyla ilişkili incelemeler de yapılmalıdır. Buna ek olarak iskemik miyokard modeli oluşturulan hayvanlara bu kasılgan dokular nakledildiğinde *in vivo* ortamda da bu dokuların kasılabildiği ve bunun neticesinde doku mühendisliği teknikleriyle üretilen bu doku parçalarının işlevsel olduğu gösterilmelidir.

KAYNAKLAR

Ahmed SH, Clark LL, Pennington WR ve diğ. Matrix metalloproteinases/tissue inhibitors of metalloproteinases: relationship between changes in proteolytic determinants of matrix composition and structural, functional, and clinical manifestations of hypertensive heart disease. *Circulation*. 2006 May 2;113(17):2089-96.

Aix E, Gallinat A, Flores I. Telomeres and telomerase in heart regeneration. *Differentiation*. 2018 Mar; 100 (1):26-30.

Amit M, Itskovitz-Eldor J. Derivation and spontaneous differentiation of human embryonic stem cells. *J Anat*. 2002 Mar;200(Pt 3):225-32.

Armiñán A, Gandía C, Bartual M ve diğ. Cardiac differentiation is driven by NKX2.5 and GATA4 nuclear translocation in tissue-specific mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev*. 2009 Jul-Aug;18(6):907-18.

Arthur A, Rychkov G, Shi S ve diğ. Adult human dental pulp stem cells differentiate toward functionally active neurons under appropriate environmental cues. *Stem Cells*. 2008 Jul;26(7):1787-95.

Asahara T, Takahashi T, Masuda H ve diğ. VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *EMBO J*. 1999 Jul 15;18(14):3964-72.

Badylak SF, Taylor D, Uygun K. Whole-organ tissue engineering: decellularization and recellularization of three-dimensional matrix scaffolds. *Annu Rev Biomed Eng*. 2011 Aug 15;13:27-53.

Baert Y, Stukenborg JB, Landreh M ve diğ. Derivation and characterization of a cytocompatible scaffold from human testis. *Hum Reprod*. 2015 Feb;30(2):256-67.

Bartunek J, Behfar A, Vanderheyden M ve diğ. Mesenchymal stem cells and cardiac repair: principles and practice. *J Cardiovasc Transl Res*. 2008 Jun;1(2):115-9.

Bates DO, Harper SJ. Regulation of vascular permeability by vascular endothelial growth factors. *Vascul Pharmacol*. 2002 Nov;39(4-5):225-37.

Batista LF. Telomere Biology In Stem Cells And Reprogramming. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2014;125:67-88.

Becker AJ, McCulloch EA, Till JE. Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature*. 1963 Feb 2;197:452-4.

Becker KA, Ghule PN, Therrien JA ve diğ. Self-renewal of human embryonic stem cells is supported by a shortened G1 cell cycle phase. *J Cell Physiol.* 2006 Dec;209(3):883-93.

Bekhite MM, Finkensieper A, Binas S ve diğ. VEGF-mediated PI3K class IA and PKC signaling in cardiomyogenesis and vasculogenesis of mouse embryonic stem cells. *J Cell Sci.* 2011 Jun 1;124(11):1819-30.

Bibber B, Sinha G, Lobba AR ve diğ. A Review of Stem Cell Translation and Potential Confounds by Cancer Stem Cells. A review of stem cell translation and potential confounds by cancer stem cells. *Stem Cells Int.* 2013;2013: 241-48.

Bibikova M, Laurent LC, Ren B, ve diğ. Unraveling epigenetic regulation in embryonic stem cells. *Cell Stem Cell.* 2008 Feb 7;2(2):123-34.

Borggreffe T, Oswald F. The Notch signaling pathway: transcriptional regulation at Notch target genes. *Cell Mol Life Sci.* 2009 May;66(10):1631-46.

Borschel GH, Dennis RG, Kuzon WM Jr. Contractile skeletal muscle tissue-engineered on an acellular scaffold. *Plast Reconstr Surg.* 2004 Feb;113(2):595-602; discussion 603-4.

Bowers SL, Baudino TA. Cardiac myocyte-fibroblast interactions and the coronary vasculature. *J Cardiovasc Transl Res.* 2012 Dec;5(6):783-93.

Bradley A, Evans M, Kaufman MH ve diğ. Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. *Nature.* 1984 May 17-23;309(5965):255-6.

Brennan KJ, Simone A, Jou J ve diğ. Modelling schizophrenia using human induced pluripotent stem cells. *Nature.* 2011 May 12;473(7346):221-5.

Brenner M. To be or notch to be. *Nat Med.* 2000 Nov;6(11):1210-1.

Brown BN, Barnes CA, Kasick RT ve diğ. Surface characterization of extracellular matrix scaffolds. *Biomaterials.* 2010 Jan;31(3):428-37.

Calloni GW, Le Douarin NM, Dupin E. High frequency of cephalic neural crest cells shows coexistence of neurogenic, melanogenic, and osteogenic differentiation capacities. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009 Jun 2;106(22):8947-52.

Can A. Kök Hücre Türleri, Biyolojisi ve Tedavide Kullanımları. Akademisyen Tıp Kitapevi, Ankara, 2014.

Cananzi M, Atala A, De Coppi P. Stem cells derived from amniotic fluid: new potentials in regenerative medicine. *Reprod Biomed Online*. 2009;18 Suppl 1:17-27.

Cao Y, Ji WR, Qi P ve diğ. Placenta growth factor: identification and characterization of a novel isoform generated by RNA alternative splicing. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997 Jun 27;235(3):493-8.

Carmeliet P, Moons L, Luttun A ve diğ. Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. *Nat Med*. 2001 May;7(5):575-83.

Carpenter MK, Rosler ES, Fisk GJ ve diğ. Properties of four human embryonic stem cell lines maintained in a feeder-free culture system. *Dev Dyn*. 2004 Feb;229(2):243-58.

Casiraghi F, Noris M, Remuzzi G. Immunomodulatory effects of mesenchymal stromal cells in solid organ transplantation. *Curr Opin Organ Transplant*. 2010 Dec;15(6):731-7.

Cebotari S, Tudorache I, Jaekel T ve diğ. Detergent decellularization of heart valves for tissue engineering: toxicological effects of residual detergents on human endothelial cells. *Artif Organs*. 2010 Mar;34(3):206-10.

Chen L, Hamrah P, Cursiefen C ve diğ. Vascular endothelial growth factor receptor-3 mediates induction of corneal alloimmunity. *Ocul Immunol Inflamm*. 2007 May-Jun;15(3):275-8.

Chen RN, Ho HO, Tsai YT ve diğ. Process development of an acellular dermal matrix (ADM) for biomedical applications. *Biomaterials*. 2004 Jun;25(13):2679-86.

Chen X, Tukachinsky H, Huang CH ve diğ. Processing and turnover of the Hedgehog protein in the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol*. 2011 Mar 7;192(5):825-38.

Chen Y, Amende I, Hampton TG ve diğ. Vascular endothelial growth factor promotes cardiomyocyte differentiation of embryonic stem cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006 Oct;291(4):H1653-8.

Chikada H, Ito K, Yanagida A ve diğ. The Basic Helix-Loop-Helix Transcription Factor, Mist1, Induces Maturation Of Mouse Fetal Hepatoblasts. *Sci Rep*. 2015 Oct 12;5:14989.

Chin MH, Mason MJ, Xie W ve diğ. Induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells are distinguished by gene expression signatures. *Cell Stem Cell*. 2009 Jul 2;5(1):111-23.

Chiu CP, Blau HM. 5-Azacytidine permits gene activation in a previously noninducible cell type. *Cell*. 1985 Feb; 40(2):417-24.

Chiu LL, Radisic M. Scaffolds with covalently immobilized VEGF and Angiopoietin-1 for vascularization of engineered tissues. *Biomaterials*. 2010 Jan;31(2):226-41.

Choi WY, Gemberling M, Wang J ve diğ. In vivo monitoring of cardiomyocyte proliferation to identify chemical modifiers of heart regeneration. *Development*. 2013 Feb 1;140(3):660-6.

Corda S, Samuel JL, Rappaport L. Extracellular matrix and growth factors during heart growth. *Heart Fail Rev*. 2000 Jun;5(2):119-30.

Crabbé A, Liu Y, Sarker SF ve diğ. Recellularization of decellularized lung scaffolds is enhanced by dynamic suspension culture. *PLoS One*. 2015 May 11;10(5):e0126846.

Crapo PM, Gilbert TW, Badylak SF. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials*. 2011 Apr;32(12):3233-43.

Curtis MW, Russell B. Micromechanical regulation in cardiac myocytes and fibroblasts: implications for tissue remodeling. *Pflugers Arch*. 2011 Jul;462(1):105-17.

Dahl SL, Koh J, Prabhakar V ve diğ. Decellularized native and engineered arterial scaffolds for transplantation. *Cell Transplant*. 2003;12(6):659-66.

De Coppi P, Callegari A, Chiavegato A ve diğ. Amniotic fluid and bone marrow derived mesenchymal stem cells can be converted to smooth muscle cells in the cryo-injured rat bladder and prevent compensatory hypertrophy of surviving smooth muscle cells. *J Urol*. 2007 Jan;177(1):369-76.

Deeken CR, White AK, Bachman SL ve diğ. Method of preparing a decellularized porcine tendon using tributyl phosphate. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2011 Feb;96(2):199-206.

Del Monte G, Casanova JC, Guadix JA ve diğ. Differential Notch signaling in the epicardium is required for cardiac inflow development and coronary vessel morphogenesis. *Circ Res*. 2011 Apr 1;108(7):824-36.

Detillieux KA, Sheikh F, Kardami E ve diğ. Biological activities of fibroblast growth factor-2 in the adult myocardium. *Cardiovasc Res*. 2003 Jan;57(1):8-19.

Dominici M, Le Blanc K, Mueller I ve diğ. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-7.

Duisit J, Orlando G, Debluts D ve diğ. Decellularization of the Porcine Ear Generates a Biocompatible, Nonimmunogenic Extracellular Matrix Platform for Face Subunit Bioengineering. *Ann Surg.* 2018 Jun;267(6):1191-1201.

Dyer LA, Kirby ML. Sonic hedgehog maintains proliferation in secondary heart field progenitors and is required for normal arterial pole formation. *Dev Biol.* 2009 Jun 15;330(2):305-17.

Dzierzak E, Medvinsky A. The discovery of a source of adult hematopoietic cells in the embryo. *Development.* 2008 Aug;135(14):2343-6.

Ebos JM, Bocci G, Man S ve diğ. A naturally occurring soluble form of vascular endothelial growth factor receptor 2 detected in mouse and human plasma. *Mol Cancer Res.* 2004 Jun;2(6):315-26.

Erceg S, Ronaghi M, Oria M ve diğ. Transplanted oligodendrocytes and motoneuron progenitors generated from human embryonic stem cells promote locomotor recovery after spinal cord transection. *Stem Cells.* 2010 Sep;28(9):1541-9.

Erker L, Azuma H, Lee AY ve diğ. Therapeutic liver reconstitution with murine cells isolated long after death. *Gastroenterology.* 2010 Sep;139(3):1019-29.

Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in Culture Of Pluripotential Cells From Mouse Embryos. *Nature.* 1981 Jul 9;292(5819):154-6.

Exposito JY, D'Alessio M, Solursh M ve diğ. Sea urchin collagen evolutionarily homologous to vertebrate pro-alpha 2(I) collagen. *J Biol Chem.* 1992 Aug 5;267(22):15559-62.

Falke G, Yoo JJ, Kwon TG ve diğ. Formation of corporal tissue architecture in vivo using human cavernosal muscle and endothelial cells seeded on collagen matrices. *Tissue Eng.* 2003 Oct;9(5):871-9.

Flynn LE. The use of decellularized adipose tissue to provide an inductive microenvironment for the adipogenic differentiation of human adipose-derived stem cells. *Biomaterials.* 2010 Jun;31(17):4715-24.

Freeman I, Cohen S. The influence of the sequential delivery of angiogenic factors from affinity-binding alginate scaffolds on vascularization. *Biomaterials.* 2009 Apr;30(11):2122-31.

Freytes DO, Badylak SF, Webster TJ ve diğ. Biaxial strength of multilaminated extracellular matrix scaffolds. *Biomaterials.* 2004 May;25(12):2353-61. Friedenstein AJ, Piatetzky-Shapiro II, Petrakova KV. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol.* 1966 Dec;16(3):381-90.

Friedman R, Betancur M, Boissel L ve diğ. Umbilical cord mesenchymal stem cells: adjuvants for human cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2007 Dec;13(12):1477-86.

Fusaki N, Ban H, Nishiyama A ve diğ. Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*. 2009;85(8):348-62.

Gargett CE, Chan RW, Schwab KE. Endometrial stem cells. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2007 Aug; 19(4): 377-83.

Gianakopoulos PJ, Skerjanc IS. Hedgehog signaling induces cardiomyogenesis in P19 cells. *J Biol Chem*. 2005 Jun 3;280(22):21022-8. Epub 2005 Mar 26.

Gilbert TW, Sellaro TL, Badylak SF ve diğ. Decellularization of tissues and organs. *Biomaterials*. 2006 Jul; 27(19):3675-83.

Gilpin SE, Guyette JP, Gonzalez G ve diğ. Perfusion decellularization of human and porcine lungs: bringing the matrix to clinical scale. *J Heart Lung Transplant*. 2014 Mar;33(3):298-308.

Giraud GD, Louey S, Jonker S ve diğ. Cortisol stimulates cell cycle activity in the cardiomyocyte of the sheep fetus. *Endocrinology*. 2006 Aug;147(8):3643-9.

Gluzman-Poltorak Z, Cohen T, Herzog Y ve diğ. Neuropilin-2 is a receptor for the vascular endothelial growth factor (VEGF) forms VEGF-145 and VEGF-165. *J Biol Chem*. 2000 Jun 16;275(24):18040-5.

Goldsmith EC, Borg TK. The dynamic interaction of the extracellular matrix in cardiac remodeling. *J Card Fail*. 2002 Dec;8(6 Suppl):S314-8.

Gronthos S, Brahim J, Li W ve diğ. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Res*. 2002 Aug;81(8):531-5.

Guan K, Nayernia K, Maier LS ve diğ. Pluripotency of spermatogonial stem cells from adult mouse testis. *Nature*. 2006 Apr 27;440(7088):1199-203.

Gurdon JB. Attempts to analyse the biochemical basis of regional differences in animal eggs. *Ciba Found Symp*. 1975;0(29):223-39.

Guyette JP, Gilpin SE, Charest JM ve diğ. Perfusion decellularization of whole organs. *Nat Protoc*. 2014; 9(6):1451-68.

Haghani K, Bakhtiyari S, Nouri AM. In vitro study of the differentiation of bone marrow stromal cells into cardiomyocyte-like cells. *Mol Cell Biochem.* 2012 Feb;361(1-2):315-20.

Hattori K, Heissig B, Wu Y ve diğ. Placental growth factor reconstitutes hematopoiesis by recruiting VEGFR1(+) stem cells from bone-marrow microenvironment. *Nat Med.* 2002 Aug;8(8):841-9.

Hodde J, Hiles M. Virus safety of a porcine-derived medical device: evaluation of a viral inactivation method. *Biotechnol Bioeng.* 2002 Jul 20;79(2):211-6.

Hong YK, Lange-Asschenfeldt B, Velasco P ve diğ. VEGF-A promotes tissue repair-associated lymphatic vessel formation via VEGFR-2 and the alpha1beta1 and alpha2beta1 integrins. *FASEB J.* 2004 Jul; 18(10):1111-3.

Houck KA, Ferrara N, Winer J ve diğ. The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. *Mol Endocrinol.* 1991 Dec;5(12):1806-14.

Hu BY, Weick JP, Yu J ve diğ. Neural differentiation of human induced pluripotent stem cells follows developmental principles but with variable potency. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2010 Mar 2;107(9):4335-40.

Hu X, Weinbaum S. A new view of Starling's hypothesis at the microstructural level. *Microvasc Res.* 1999 Nov; 58(3):281-304.

Hudson TW, Liu SY, Schmidt CE. Engineering an improved acellular nerve graft via optimized chemical processing. *Tissue Eng.* 2004 Sep-Oct;10(9-10):1346-58.

Hutter R, Carrick FE, Valdiviezo C ve diğ. Vascular endothelial growth factor regulates reendothelialization and neointima formation in a mouse model of arterial injury. *Circulation.* 2004 Oct 19;110(16):2430-5.

Ilic D, Giritharan G, Zdravkovic T ve diğ. Derivation of human embryonic stem cell lines from biopsied blastomeres on human feeders with minimal exposure to xenomaterials. *Stem Cells Dev.* 2009 Nov; 18(9):1343-50.

Ivanovs A, Rybtsov S, Anderson RA ve diğ. Identification of the niche and phenotype of the first human hematopoietic stem cells. *Stem Cell Reports.* 2014 Mar 27;2(4):449-56.

Ivanovs A, Rybtsov S, Welch L ve diğ. Highly potent human hematopoietic stem cells first emerge in the intraembryonic aorta-gonad-mesonephros region. *J Exp Med.* 2011 Nov 21;208(12):2417-27.

Jackson DW, Windler GE, Simon TM ve diğ. Intraarticular reaction associated with the use of freeze-dried, ethylene oxide-sterilized bone-patella tendon-bone allografts in the reconstruction of the anterior cruciate ligament. *Am J Sports Med.* 1990 Jan-Feb;18(1):1-10; discussion 10-1.

Jiang J, Han P, Zhang Q ve diğ. Cardiac differentiation of human pluripotent stem cells. *J Cell Mol Med.* 2012 Aug;16(8):1663-8.

Jin ZB, Okamoto S, Mandai M ve diğ. Induced pluripotent stem cells for retinal degenerative diseases: a new perspective on the challenges. *J Genet.* 2009 Dec;88(4):417-24.

Jones GN, Moschidou D, Puga-Iglesias TI ve diğ. Ontological differences in first compared to third trimester human fetal placental chorionic stemcells. *PLoS One.* 2012;7(9):e43395.

Jugdutt BI. Remodeling of the myocardium and potential targets in the collagen degradation and synthesis pathways. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord.* 2003 Mar;3(1):1-30.

Kahan BW, Ephrussi B. Developmental potentialities of clonal in vitro cultures of mouse testicular teratoma. *J Natl Cancer Inst* 1970 May;44(5):1015-36.

Kajbafzadeh AM, Javan-Farazmand N, Monajemzadeh M ve diğ. Determining the optimal decellularization and sterilization protocol for preparing a tissue scaffold of a human-sized liver tissue. *Tissue Eng Part C Methods.* 2013 Aug;19(8):642-51.

Kanatsu-Shinohara M, Inoue K, Lee J ve diğ. Generation of pluripotent stem cells from neonatal mouse testis. *Cell.* 2004 Dec 29;119(7):1001-12.

Karkkainen MJ, Haiko P, Sainio K ve diğ. Vascular endothelial growth factor C is required for sprouting of the first lymphatic vessels from embryonic veins. *Nat Immunol.* 2004 Jan;5(1):74-80.

Kasimir MT, Rieder E, Seebacher G ve diğ. Comparison of different decellularization procedures of porcine heart valves. *Int J Artif Organs.* 2003 May;26(5):421-7.

Katoh O, Tauchi H, Kawaishi K ve diğ. Expression of the vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor gene, KDR, in hematopoietic cells and inhibitory effect of VEGF on apoptotic cell death caused by ionizing radiation. *Cancer Res.* 1995 Dec 1;55(23):5687-92.

Kawasaki T, Kitsukawa T, Bekku Y ve diğ. A requirement for neuropilin-1 in embryonic vessel formation. *Development.* 1999 Nov;126(21):4895-902.

Keane TJ, Swinehart IT, Badylak SF. Methods of tissue decellularization used for preparation of biologic scaffolds and in vivo relevance. *Methods.* 2015 Aug;84:25-34.

Kendall RL, Wang G, Thomas KA. Identification of a natural soluble form of the vascular endothelial growth factor receptor, FLT-1, and its heterodimerization with KDR. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996 Sep 13;226(2):324-8.

Kim CF, Jackson EL, Woolfenden AE ve diğ. Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer. *Cell*. 2005 Jun 17;121(6):823-35.

Kim K, Doi A, Wen B ve diğ. Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells. *Nature*. 2010 Sep 16; 467(7313):285-90.

Kim D, Kim CH, Moon JI ve diğ. Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins. *Cell Stem Cell*. 2009 Jun 5;4(6):472-6.

Kimura H, Tada M, Nakatsuji N ve diğ. Histone code modifications on pluripotential nuclei of reprogrammed somatic cells. *Mol Cell Biol*. 2004 Jul;24(13):5710-20.

Kitahara H, Yagi H, Tajima K ve diğ. Heterotopic transplantation of a decellularized and recellularized whole porcine heart. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*. 2016 May;22(5):571-9.

Klimanskaya I, Chung Y, Becker S ve diğ. Derivation of human embryonic stem cells from single blastomeres. *Nat Protoc*. 2007;2(8):1963-72.

Klimanskaya I, Chung Y, Meisner L ve diğ. Human embryonic stem cells derived without feeder cells. *Lancet*. 2005 May 7-13;365(9471):1636-41.

Kolios G, Moodley Y. Introduction to stem cells and regenerative medicine. *Respiration*. 2013;85(1):3-10.

Komada Y, Yamane T, Kadota D ve diğ. Origins and properties of dental, thymic, and bone marrow mesenchymal cells and their stem cells. *PLoS One*. 2012;7(11):e46436.

Kong W, Lv N, Wysham WZ ve diğ. Knockdown of hTERT and Treatment with BIBR1532 Inhibit Cell Proliferation and Invasion in Endometrial Cancer Cells. *J Cancer*. 2015 Nov 1;6(12):1337-45.

Kriks S, Shim JW, Piao J ve diğ. Dopamine neurons derived from human ES cells efficiently engraft in animal models of Parkinson's disease. *Nature*. 2011 Nov 6;480(7378):547-51.

Kyurkchiev D, Bochev I, Ivanova-Todorova E ve diğ. Secretion of immunoregulatory cytokines by mesenchymal stem cells. *World J Stem Cells*. 2014 Nov 26;6(5):552-70.

Le Magnen C, Bubendorf L, Ruiz C ve diğ. Klf4 transcription factor is expressed in the cytoplasm of prostate cancer cells. *Eur J Cancer*. 2013 Mar;49(4):955-63.

Leri A, Rota M, Pasqualini FS ve diğ. Origin of cardiomyocytes in the adult heart. *Circ Res*. 2015 Jan 2; 116(1):150-66.

Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ ve diğ. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science*. 1989 Dec 8;246(4935):1306-9.

Li P, Zhang L. Exogenous Nkx2.5- or GATA-4-transfected rabbit bone marrow mesenchymal stem cells and myocardial cell co-culture on the treatment of myocardial infarction in rabbits. *Mol Med Rep*. 2015 Aug; 12(2):2607-21.

Li Y, Hiroi Y, Ngoy S ve diğ. Notch1 in bone marrow-derived cells mediates cardiac repair after myocardial infarction. *Circulation*. 2011 Mar 1;123(8):866-76.

Lin P, Chan WC, Badylak SF ve diğ. Assessing porcine liver-derived biomatrix for hepatic tissue engineering. *Tissue Eng*. 2004 Jul-Aug;10(7-8):1046-53.

Liu RF, Gao JS, Yang YF ve diğ. Preparation of Rat Whole-kidney Acellular Matrix via Peristaltic Pump. *Urol J*. 2015 Dec 23;12(6):2457-61.

Lo HY, Huang AL, Lee PC ve diğ. Morphological transformation of hBMSC from 2D monolayer to 3D microtissue on low-crystallinity SF-PCL patch with promotion of cardiomyogenesis. *J Tissue Eng Regen Med*. 2018 Apr; 12(4):e1852-e1864.

Lohela M, Saaristo A, Veikkola T ve diğ. Lymphangiogenic growth factors, receptors and therapies. *Thromb Haemost*. 2003 Aug;90(2):167-84.

Lowry WE, Richter L, Yachechko R ve diğ. Generation of human induced pluripotent stem cells from dermal fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008 Feb 26;105(8):2883-8.

Lu SJ, Ivanova Y, Feng Q ve diğ. Hemangioblasts from human embryonic stem cells generate multilayered blood vessels with functional smooth muscle cells. *Regen Med*. 2009 Jan;4(1):37-47.

Lyttle DJ, Fraser KM, Fleming SB ve diğ. Homologs of vascular endothelial growth factor are encoded by the poxvirus orf virus. *J Virol*. 1994 Jan;68(1):84-92.

Maglione D, Guerriero V, Viglietto G ve diğ. Isolation of a human placenta cDNA coding for a protein related to the vascular permeability factor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991 Oct 15;88(20):9267-71.

Maherali N, Sridharan R, Xie W ve diğ. Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution. *Cell Stem Cell*. 2007 Jun 7;1(1):55-70.

Majo F, Rochat A, Nicolas M ve diğ. Oligopotent stem cells are distributed throughout the mammalian ocular surface. *Nature*. 2008 Nov 13;456(7219):250-4.

Makinen T, Olofsson B, Karpanen T ve diğ. Differential binding of vascular endothelial growth factor B splice and proteolytic isoforms to neuropilin-1. *J Biol Chem*. 1999 Jul 23;274(30):21217-22.

Mäkinen T, Veikkola T, Mustjoki S ve diğ. Isolated lymphatic endothelial cells transduce growth, survival and migratory signals via the VEGF-C/D receptor VEGFR-3. *EMBO J*. 2001 Sep 3;20(17):4762-73.

Makino S, Fukuda K, Miyoshi S ve diğ. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest*. 1999 Mar;103(5):697-705.

Manabe I, Shindo T, Nagai R. Gene expression in fibroblasts and fibrosis: involvement in cardiac hypertrophy. *Circ Res*. 2002 Dec 13;91(12):1103-13.

Mandel Y, Weissman A, Schick R ve diğ. Human embryonic and induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes exhibit beat rate variability and power-law behavior. *Circulation*. 2012 Feb 21;125(7):883-93.

Marcus AJ, Coyne TM, Black IB ve diğ. Fate of amnion-derived stem cells transplanted to the fetal rat brain: migration, survival and differentiation. *J Cell Mol Med*. 2008 Aug;12(4):1256-64.

Martin GR 1981. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1981 Dec;78(12):7634-8.

Mazza G, Rombouts K, Rennie Hall A ve diğ. Decellularized human liver as a natural 3D-scaffold for liver bioengineering and transplantation. *Sci Rep*. 2015 Aug 7;5:13079.

Medvinsky A, Rybtsov S, Taoudi S. Embryonic origin of the adult hematopoietic system: advances and questions. *Development*. 2011 Mar;138(6):1017-31.

Melter M, Reinders ME, Sho M ve diğ. Ligation of CD40 induces the expression of vascular endothelial growth factor by endothelial cells and monocytes and promotes angiogenesis in vivo. *Blood*. 2000 Dec 1; 96(12):3801-8.

Meshorer E, Misteli T. Chromatin in pluripotent embryonic stem cells and differentiation. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006 Jul;7(7):540-6.

Michalova J, Savvulidi F, Sefc L ve diğ. Cadaveric bone marrow as potential source of hematopoietic stem cells for transplantation. *Chimerism*. 2011 Jul;2(3):86-7.

Moore L, Fan D, Basu R ve diğ. Tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMPs) in heart failure. *Heart Fail Rev*. 2012 Sep;17(4-5):693-706.

Mould AW, Tonks ID, Cahill MM ve diğ. Vegfb gene knockout mice display reduced pathology and synovial angiogenesis in both antigen-induced and collagen-induced models of arthritis. *Arthritis Rheum*. 2003 Sep;48(9):2660-9.

Mundra V, Gerling IC, Mahato RI. Mesenchymal stem cell-based therapy. *Mol Pharm*. 2013 Jan 7;10(1):77-89.

Munro MJ, Wickremesekera SK, Peng L ve diğ. Cancer stem cells in colorectal cancer: a review. *J Clin Pathol*. 2018 Feb;71(2):110-116.

Murphy MB, Moncivais K, Caplan AI. Mesenchymal stem cells: environmentally responsive therapeutics for regenerative medicine. *Exp Mol Med*. 2013 Nov 15;45:e54.

Nagy JA, Vasile E, Feng D ve diğ. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor induces lymphangiogenesis as well as angiogenesis. *J Exp Med*. 2002 Dec 2;196(11):1497-506.

Neganova I, Zhang X, Atkinson S ve diğ. Expression and functional analysis of G1 to S regulatory components reveals an important role for CDK2 in cell cycle regulation in human embryonic stem cells. *Oncogene*. 2009 Jan 8;28(1):20-30.

Neufeld G, Kessler O, Herzog Y. The interaction of Neuropilin-1 and Neuropilin-2 with tyrosine-kinase receptors for VEGF. *Adv Exp Med Biol*. 2002;515:81-90.

Okita K, Matsumura Y, Sato Y ve diğ. A more efficient method to generate integration-free human iPS cells. *Nat Methods*. 2011 May;8(5):409-12.

Orford KW, Scadden DT. Deconstructing stem cell self-renewal: genetic insights into cell-cycle regulation. *Nat Rev Genet*. 2008 Feb;9(2):115-28.

Oswald J, Boxberger S, Jørgensen B ve diğ. Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro. *Stem Cells*. 2004;22(3):377-84.

Öztürk A. Pankreas Adacık Kaynaklı MafA+/Pax4+ Kök Hücrelerin Kullanılmasıyla Desellülerize Karaciğer Doku İskelesinin İnsülin Salgılayan Doku Parçasına Dönüştürülmesi Yüksek lisans tezi. Kocaeli Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2016.

Paiva SA, Matsubara LS, Matsubara BB ve diğ. Retinoic acid supplementation attenuates ventricular remodeling after myocardial infarction in rats. *J Nutr.* 2005 Oct;135(10):2326-8.

Palmer TD, Schwartz PH, Taupin P ve diğ. Cell culture. Progenitor cells from human brain after death. *Nature.* 2001 May 3;411(6833):42-3.

Pankov R, Yamada KM. Fibronectin at a glance. *J Cell Sci.* 2002 Oct 15;115(Pt 20):3861-3.

Park IH, Zhao R, West JA ve diğ. Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature.* 2008 Jan 10;451(7175):141-6.

Penton AL, Leonard LD, Spinner NB. Notch signaling in human development and disease. *Semin Cell Dev Biol.* 2012 Jun;23(4):450-7.

Perán M, López-Ruiz E, González-Herrera L ve diğ. Cellular extracts from post-mortem human cardiac tissue direct cardiomyogenic differentiation of human adipose tissue-derived stem cells. *Cytotherapy.* 2013 Dec;15(12):1541-8.

Perdigoto CN, Bardin AJ. Sending the right signal: Notch and stem cells. *Biochim Biophys Acta.* 2013 Feb;1830(2):2307-22.

Persico MG, Vincenti V, DiPalma T. Structure, expression and receptor-binding properties of placenta growth factor (PlGF). *Curr Top Microbiol Immunol.* 1999;237:31-40.

Phinney DG, Prockop DJ. Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair—current views. *Stem Cells.* 2007 Nov;25(11):2896-902.

Pietras EM, Reynaud D, Kang YA ve diğ. Functionally Distinct Subsets of Lineage-Biased Multipotent Progenitors Control Blood Production in Normal and Regenerative Conditions. *Cell Stem Cell.* 2015 Jul 2;17(1):35-46.

Polo JM, Liu S, Figueroa ME ve diğ. Cell type of origin influences the molecular and functional properties of mouse induced pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol.* 2010 Aug;28(8):848-55.

Prasertsung I, Kanokpanont S, Bunaprasert T ve diğ. Development of acellular dermis from porcine skin using periodic pressurized technique. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2008 Apr;85(1):210-9.

Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science*. 1997 Apr 4; 276(5309):71-4.

Ramkisoensing AA, Pijnappels DA, Swildens J ve diğ. Gap junctional coupling with cardiomyocytes is necessary but not sufficient for cardiomyogenic differentiation of cocultured human mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 2012 Jun;30(6):1236-45.

Reddel RR. Alternative lengthening of telomeres, telomerase, and cancer. *Cancer Lett*. 2003 May 15; 194(2):155-62.

Reing JE, Brown BN, Daly KA ve diğ. The effects of processing methods upon mechanical and biologic properties of porcine dermal extracellular matrix scaffolds. *Biomaterials*. 2010 Nov;31(33):8626-33.

Richards M, Fong CY, Chan WK ve diğ. Human feeders support prolonged undifferentiated growth of human inner cell masses and embryonic stem cells. *Nat Biotechnol*. 2002 Sep;20(9):933-6.

Rieder E, Kasimir MT, Silberhumer G ve diğ. Decellularization protocols of porcine heart valves differ importantly in efficiency of cell removal and susceptibility of the matrix to recellularization with human vascular cells. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2004 Feb;127(2):399-405.

Rios AC, Fu NY, Lindeman GJ ve diğ. In situ identification of bipotent stem cells in the mammary gland. *Nature*. 2014 Feb 20;506(7488):322-7.

Roberts TS, Drez D Jr, McCarthy W ve diğ. Anterior cruciate ligament reconstruction using freeze-dried, ethylene oxide-sterilized, bone-patellar tendon-bone allografts. Two year results in thirty-six patients. *Am J Sports Med*. 1991 Jan-Feb;19(1):35-41.

Robinton DA, Daley GQ. The promise of induced pluripotent stem cells in research and therapy. *Nature*. 2012 Jan 18;481(7381):295-305.

Ross MH, Pawlina W. Histoloji konu anlatımı ve atlas. Lippincott Williams & Wilkins. Çev. Barış Baykal, Palme Yayıncılık, Ankara, 2014.

Ross RS, Borg TK. Integrins and the myocardium. *Circ Res*. 2001 Jun 8;88(11):1112-9.

Ruiz S, Panopoulos AD, Herrerías A ve diğ. A high proliferation rate is required for cell reprogramming and maintenance of human embryonic stem cell identity. *Curr Biol*. 2011 Jan 11;21(1):45-52.

Sangkum P. Research highlights on stem cell therapy for the treatment of Peyronie's disease. *Transl Androl Urol*. 2016 Jun;5(3):363-5.

Sawano A, Iwai S, Sakurai Y ve diğ. Flt-1, vascular endothelial growth factor receptor 1, is a novel cell surface marker for the lineage of monocyte-macrophages in humans. *Blood*. 2001 Feb 1;97(3):785-91.

Sawano A, Takahashi T, Yamaguchi S ve diğ. Flt-1 but not KDR/Flk-1 tyrosine kinase is a receptor for placenta growth factor, which is related to vascular endothelial growth factor. *Cell Growth Differ*. 1996 Feb;7(2):213-21.

Schenke-Layland K, Vasilevski O, Opitz F ve diğ. Impact of decellularization of xenogeneic tissue on extracellular matrix integrity for tissue engineering of heart valves. *J Struct Biol*. 2003 Sep;143(3):201-8.

Schuch G, Machluf M, Bartsch G Jr ve diğ. In vivo administration of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its antagonist, soluble neuropilin-1, predicts a role of VEGF in the progression of acute myeloid leukemia in vivo. *Blood*. 2002 Dec 15;100(13):4622-8.

Schwanbeck R, Martini S, Bernoth K ve diğ. The Notch signaling pathway: molecular basis of cell context dependency. *Eur J Cell Biol*. 2011 Jun-Jul;90(6-7):572-81.

Schwartz PH, Bryant PJ, Fuja TJ ve diğ. Isolation and characterization of neural progenitor cells from post-mortem human cortex. *J Neurosci Res*. 2003 Dec 15;74(6):838-51.

Sheridan WS, Duffy GP, Murphy BP. Optimum parameters for freeze-drying decellularized arterial scaffolds. *Tissue Eng Part C Methods*. 2013 Dec;19(12):981-90.

Shupe T, Williams M, Brown A ve diğ. Method for the decellularization of intact rat liver. *Organogenesis*. 2010 Apr-Jun;6(2):134-6.

Snykers S, De Kock J, Rogiers V ve diğ. In vitro differentiation of embryonic and adult stem cells into hepatocytes: state of the art. *Stem Cells*. 2009 Mar;27(3):577-605.

Somoza RA, Rubio FJ. Cell therapy using induced pluripotent stem cells or somatic stem cells: this is the question. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2012 May;7(3):191-6.

Spangrude GJ, Heimfeld S, Weissman IL. Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science*. 1988 Jul 1;241(4861):58-62.

Spinelli V, Guillot PV, De Coppi P. Induced pluripotent stem (iPS) cells from human fetal stem cells (hFSCs). *Organogenesis*. 2013 Apr-Jun;9(2):101-10.

Stacker SA, Caesar C, Baldwin ME ve diğ. VEGF-D promotes the metastatic spread of tumor cells via the lymphatics. *Nat Med*. 2001 Feb;7(2):186-91.

Stadtfeld M, Nagaya M, Utikal J ve diğ. Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. *Science*. 2008 Nov 7;322(5903):945-9.

Suda T, Arai F, Shimmura S. Regulation of stem cells in the niche. *Cornea*. 2005 Nov;24(8 Suppl):S12-S17.

Sun Y, Chi D, Tan M ve diğ. Cadaveric cardiosphere-derived cells can maintain regenerative capacity and improve the heart function of cardiomyopathy. *Cell Cycle*. 2016 May 2;15(9):1248-56.

Sun Y, Jin K, Childs JT ve diğ. Increased severity of cerebral ischemic injury in vascular endothelial growth factor-B-deficient mice. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2004 Oct;24(10):1146-52.

Tada M, Takahama Y, Abe K ve diğ. Nuclear reprogramming of somatic cells by in vitro hybridization with ES cells. *Curr Biol*. 2001 Oct 2;11(19):1553-8.

Takahashi H, Shibuya M. The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. *Clin Sci (Lond)*. 2005 Sep;109(3):227-41.

Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M ve diğ. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 2007 Nov 30;131(5):861-72.

Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from Mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006 Aug 25;126(4):663-76.

Taskiran D, Taskiran E, Yercan H ve diğ. Quantification of total collagen in rabbit tendon by the sirius red method. *Tr. J. of Med. Sci*. 1999 May 29(2):7-9.

Thomas NA, Koudijs M, van Eeden FJ ve diğ. Hedgehog signaling plays a cell-autonomous role in maximizing cardiac developmental potential. *Development*. 2008 Nov;135(22):3789-99.

Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS ve diğ Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. 1998 Nov 6;282(5391):1145-7.

Till JE, McCulloch EA. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res*. 1961 Feb;14:213-22.

Timmerman LA, Grego-Bessa J, Raya A ve diğ. Notch promotes epithelial-mesenchymal transition during cardiac development and oncogenic transformation. *Genes Dev*. 2004 Jan 1;18(1):99-115.

Toma JG, Akhavan M, Fernandes KJ ve diğ. Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. *Nat Cell Biol.* 2001 Sep;3(9):778-84.

Tomita Y, Makino S, Hakuno D ve diğ. Application of mesenchymal stem cell-derived cardiomyocytes as bio-pacemakers: current status and problems to be solved. *Med Biol Eng Comput.* 2007 Feb;45(2):209-20.

Tomita Y, Matsumura K, Wakamatsu Y. Cardiac neural crest cells contribute to the dormant multipotent stem cell in the mammalian heart. *J Cell Biol.* 2005 Sep 26;170(7):1135-46.

Tsuji O, Miura K, Okada Y ve diğ. Therapeutic potential of appropriately evaluated safe-induced pluripotent stem cells for spinal cord injury. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2010 Jul 13;107(28):12704-9.

Uygun BE, Soto-Gutierrez A, Yagi H ve diğ. Organ reengineering through development of a transplantable recellularized liver graft using decellularized liver matrix. *Nat Med.* 2010 Jul;16(7):814-20.

Valente S, Alviano F, Ciavarella C ve diğ. Human cadaver multipotent stromal/stem cells isolated from arteries stored in liquid nitrogen for 5 years. *Stem Cell Res Ther.* 2014 Jan 15;5(1):8.

Veikkola T, Lohela M, Ikenberg K ve diğ. Intrinsic versus microenvironmental regulation of lymphatic endothelial cell phenotype and function. *FASEB J.* 2003 Nov;17(14):2006-13.

Verma V, Purnamawati K, Manasi ve diğ. Steering signal transduction pathway towards cardiac lineage from human pluripotent stem cells: a review. *Cell Signal.* 2013 May;25(5):1096-107.

Vincenti V, Cassano C, Rocchi M ve diğ. Assignment of the vascular endothelial growth factor gene to human chromosome 6p21.3. *Circulation.* 1996 Apr 15;93(8):1493-5.

Wagner W, Wein F, Seckinger A ve diğ. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Exp Hematol.* 2005 Nov;33(11):1402-16.

Wakai T, Sugimura S, Yamanaka K ve diğ. Production of viable cloned miniature pig embryos using oocytes derived from domestic pig ovaries. *Cloning Stem Cells.* 2008 Jun;10(2):249-62.

Wang DG, Zhang FX, Chen ML ve diğ. Cx43 in mesenchymal stem cells promotes angiogenesis of the infarcted heart independent of gap junctions. *Mol Med Rep.* 2014 Apr;9(4):1095-102.

Wang JS, Shum-Tim D, Chedrawy E ve diğ. The coronary delivery of marrow stromal cells for myocardial regeneration: pathophysiologic and therapeutic implications. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2001 Oct; 122(4): 699-705.

Wang HS, Hung SC, Peng ST. Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. *Stem Cells*. 2004;22(7):1330-7.

Warren L, Manos PD, Ahfeldt T ve diğ. Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. *Cell Stem Cell*. 2010 Nov 5;7(5):618-30.

Washington Smoak I, Byrd NA, Abu-Issa R ve diğ. Sonic hedgehog is required for cardiac outflow tract and neural crest cell development. *Dev Biol*. 2005 Jul 15;283(2):357-72.

Wernig M, Meissner A, Foreman R ve diğ. In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature*. 2007 Jul 19;448(7151):318-24.

Wilhelmi M, Giere B, Harder M. Interaction of cells with decellularized biological materials. *Adv Biochem Eng Biotechnol*. 2012;126:105-16.

Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J ve diğ. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*. 1997 Feb 27;385(6619):810-3.

Wilson SL, Sidney LE, Dunphy SE ve diğ. Corneal Decellularization: A Method of Recycling Unsuitable Donor Tissue for Clinical Translation? *Curr Eye Res*. 2016 Jun;41(6):769-82.

Wong KS, Rehn K, Palencia-Desai S ve diğ. Hedgehog signaling is required for differentiation of endocardial progenitors in zebrafish. *Dev Biol*. 2012 Jan 15;361(2):377-91.

Xie K, Wei D, Shi Q ve diğ. Constitutive and inducible expression and regulation of vascular endothelial growth factor. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2004 Oct;15(5):297-324.

Yagi T, Ito D, Okada Y ve diğ. Modeling familial Alzheimer's disease with induced pluripotent stem cells. *Hum Mol Genet*. 2011 Dec 1;20(23):4530-9.

Yamanaka S. A fresh look at iPS cells. *Cell*. 2009 Apr 3;137(1):13-7.

Yang B, Zhang Y, Zhou L ve diğ. Development of a porcine bladder acellular matrix with well-preserved extracellular bioactive factors for tissue engineering. *Tissue Eng Part C Methods*. 2010 Oct;16(5):1201-11.

Yang W, Ahn H, Hinrichs M ve diğ. Evidence of a novel isoform of placenta growth factor (PlGF-4) expressed in human trophoblast and endothelial cells. *J Reprod Immunol*. 2003 Oct;60(1):53-60.

Yoganarasimha S, Trahan WR, Best AM ve diğ. Peracetic acid: a practical agent for sterilizing heat-labile polymeric tissue-engineering scaffolds. *Tissue Eng Part C Methods*. 2014 Sep;20(9):714-23.

Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K ve diğ. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*. 2007 Dec 21;318(5858):1917-20.

Yu Z, Zou Y, Fan J ve diğ. Notch1 is associated with the differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells to cardiomyocytes. *Mol Med Rep*. 2016 Dec;14(6):5065-5071.

Yuan L, Moyon D, Pardanaud L ve diğ. Abnormal lymphatic vessel development in neuropilin 2 mutant mice. *Development*. 2002 Oct;129(20):4797-806.

Zhao T, Zhang ZN, Rong Z ve diğ. Immunogenicity of induced pluripotent stem cells. *Nature*. 2011 May 13; 474(7350):212-5.

Zimmet JM, Hare JM. Emerging role for bone marrow derived mesenchymal stem cells in myocardial regenerative therapy. *Basic Res Cardiol*. 2005 Nov;100(6):471-81.

Zisa D, Shabbir A, Mastri M ve diğ. Intramuscular VEGF activates an SDF1-dependent progenitor cell cascade and an SDF1-independent muscle paracrine cascade for cardiac repair. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011 Dec;301(6):H2422-32.

Zuba-Surma EK, Kucia M, Wu W ve diğ. Very small embryonic-like stem cells are present in adult murine organs: Image Stream-based morphological analysis and distribution studies. *Cytometry A*. 2008 Dec; 73A (12):1116-27.

Zuk PA, Zhu M, Mizuno H. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*. 2001 Apr;7(2):211-28.

ÖZGEÇMİŞ

Bireysel Bilgiler

Adı Soyadı: Kamil Can KILIÇ

Doğum yeri ve tarihi: Emirdağ/AFYON - 07/10/1992

Uyruğu: T.C.

Medeni durumu: Bekar

Askerlik durumu: Tecilli (24/08/2018'e kadar)

Çalıştığı kurum: Kocaeli Üniversitesi

İletişim adresi: Malta Mah. Doğa Cad. Dünya Bankası Kalıcı Konutları 4.Ada E6 Blok

Daire:10 İzmit/KOCAELİ

Telefon: 0 506 491 93 43

E-posta adresi: k.kilic03@gmail.com

Eğitimi (tarih sırasına göre):

09/2015-Devam ediyor

Yüksek Lisans

Kocaeli Üniversitesi,
Kök Hücre Anabilim Dalı,
Kök Hücre ve Doku Yenilenmesi Programı,
Kocaeli/TÜRKİYE

10/2010-06/2015

Lisans

Gebze Teknik Üniversitesi,
Temel Bilimler Fakültesi,
Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü,
Gebze/Kocaeli/TÜRKİYE

09/2006-06/2010

Lise

Afyon Anadolu Öğretmen Lisesi,
Afyon/TÜRKİYE

Mesleki Deneyimi

04/2017- Devam ediyor

Araştırma Görevlisi

Kocaeli Üniversitesi, Kök Hücre Anabilim Dalı, Kök Hücre ve Doku Yenilenmesi Programı-
Kocaeli/TÜRKİYE

Yabancı Dili: İngilizce

Bilimsel Etkinlikler

- 1- XIX. Kök Hücre ve Doku Mühendisliği Kursu: Temel Kök Hücre Teknikleri ve Moleküler Biyoloji Uygulamaları (16-20 Kasım 2015, Kurs Düzenleme Kurulu Üyesi)
- 2- XX. Kök Hücre ve Doku Mühendisliği Kursu: Temel Kök Hücre Teknikleri ve Moleküler Biyoloji Uygulamaları (7-11 Aralık 2015, Kurs Düzenleme Kurulu Üyesi)
- 3- XXI. Kök Hücre ve Doku Mühendisliği Kursu: Temel Kök Hücre Teknikleri ve Moleküler Biyoloji Uygulamaları (17-21 Ekim 2016, Kurs Düzenleme Kurulu Üyesi)
- 4- XXII. Kök Hücre ve Doku Mühendisliği Kursu: Temel Kök Hücre Teknikleri ve Moleküler Biyoloji Uygulamaları (3-7 Temmuz 2017, Kurs Düzenleme Kurulu Üyesi)
- 5- XXIII. Kök Hücre ve Doku Mühendisliği Kursu: Temel Kök Hücre Teknikleri ve Moleküler Biyoloji Uygulamaları (2-6 Ekim 2017, Kurs Düzenleme Kurulu Üyesi)
- 6- XXIV. Kök Hücre ve Doku Mühendisliği Kursu: Temel Kök Hücre Teknikleri ve Moleküler Biyoloji Uygulamaları (19-23 Şubat 2017, Kurs Düzenleme Kurulu Üyesi)
- 7- XXV. Kök Hücre ve Doku Mühendisliği Kursu: Temel Kök Hücre Teknikleri ve Moleküler Biyoloji Uygulamaları (2-6 Nisan 2018, Kurs Düzenleme Kurulu Üyesi)

Yayımlar

Uluslararası Bilimsel Etkinliklerde Sunulan Sözlü Sunumlar

- 1- Gacar G, Utkan T, Halbutogullari ZS, **Kilic KC**, Kaya A, Yazir Y. Investigation Of Resveratrol's Protective And Anti-Inflammatory Effects On Thoracic Aorta And Blood Plasma Of Rats Under Unpredictable Chronic Mild Stress (Ucms) Model (6th International Molecular Biology and Biotechnology Congress), 22-25 Dec 2017, Afyon/TURKEY
- 2- **Ozturk A**, **Kilic KC**, Duruksu G, Yazir Y. Useful Cryoprotective Method For Decellularized Tissues: Frozen Kidney, Heart And Liver Extracellular Matrix. (6th International Molecular Biology and Biotechnology Congress), 22-25 Dec 2017, Afyon/TURKEY

- 3- A. Öztürk, **K.C.Kılıç**, G. Duruksu, Z.S. Halbutoğulları, Y. Yazır. Cryopreservation of Acellular Heart and Lung Scaffolds With Different Cryogenic Methods. IV. International Congress for Applied Biological Sciences. 3-5 May 2018, Eskişehir, Turkey.
- 4- **K.C.Kılıç**, Y. Yazır, A. Öztürk, G. Duruksu, G. Gacar. Investigation of Decellularized Heart Matrix's Impacts on Differentiation Capacity Of Mesenchymal Stem Cell Into Cardiomyocytes. IV. International Congress for Applied Biological Sciences. 3-5 May 2018, Eskişehir, Turkey.

Uluslararası Bilimsel Etkinliklerde Sunulan Poster Sunumları

- 1- Ozturk A, **Kilic KC**, Duruksu G, Halbutogullari ZS, Yazir Y. Determination of Suitable Cryopreservative Conditions for Decellularized Kidney (International Congress for Applied Biological Sciences), 3-5 May 2018, Eskişehir/TURKEY
- 2- Gacar G, Halbutogullari ZS, **Kilic KC**, Kaya A, Utkan T, Yazir Y. Examination of Resveratrol's Neuroprotective Effects On Brain Cortex and Hippocampal Tissue Of Rats Exposed Unpredictable Chronic Mild Stress (UCMS) Model (International Congress for Applied Biological Sciences), 3-5 May 2018, Eskişehir/TURKEY

Ulusal Bilimsel Etkinliklerde Poster Bildirileri

- 1- Ahmet Öztürk, **Kamil Can Kılıç**, Gökhan Duruksu, Z. Seda Halbutoğulları, Yusufhan Yazır, Desellülarize Kalp ve Akciğer Doku İskelelerinin Farklı Yöntemlerle Dondurulması (14. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi), 10-13 Mayıs 2018, Antalya/TÜRKİYE
- 2- Ahmet Öztürk, **Kamil Can Kılıç**, Gökhan Duruksu, Yusufhan Yazır, Hücrelerinden Arındırılmış Böbrek Dokusunun Saklanması İçin Uygun Yöntem Belirlenmesi (14. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi), 10-13 Mayıs 2018, Antalya/TÜRKİYE
- 3- **Kamil Can Kılıç**, Yusufhan Yazır, Ahmet Öztürk, Gökhan Duruksu, Gülçin Gacar, Desellülarize Kalp Matriksinin Mezenkimal Kök Hücrelerin Kardiyomiyojenik Farklılaşma Potansiyeli Üzerindeki Etkilerinin İncelenmesi (14. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi), 10-13 Mayıs 2018, Antalya/TÜRKİYE

EKLER

EK 1. Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Onay Formu



T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU



PROJE NO: 2016/38	ARAŞTIRMANIN ADI	Kardiyomiyojenik farklılaşma faktörleri VEGF ve deselülarize kalp matriksinin Notch/Hedgehog sinyal yolları üzerinden mezenkimal kök hücrelerin farklılaşmasına olan etkilerinin incelenmesi
	SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ADI KURUMU	Doç.Dr. Yusufhan YAZIR KOU Tıp Fak.
	YARDIMCI ARAŞTIRMACILAR	Yüksek Lisan Öğr. Kamil Can KILIÇ, Yrd. Doç. Dr. Gökhan DURUKSU, Yrd. Doç. Dr. Zehra Seda HALBUTOĞULLARI, Yrd. Doç. Dr. Gülçin GACAR

DEĞERLENDİRİLEN BELGE	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ ve EKLERİ	x
------------------------------	--------------------------------------	---

KARAR BİLGİLERİ	Yukarıda başvuru bilgileri bulunan araştırma projesi Kocaeli Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesine dayanarak gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemler açısından incelenmiş olup, araştırmanın yürütülmesinin etik açıdan uygun olduğu kararına varılmıştır.	
	KARAR NO: KOU HADYEK 8/4-2016	KARAR TARİHİ: 29.12.2016

ETİK KURUL ÜYELERİ			
UNVANI/ADI SOYADI ETİK KURUL GÖREVİ	BİRİMİ	TOPLANTIYA KATILMA	KARARA KATILMA İMZA
Prof. Dr. Hüsnü EFENDİ Başkan	Kocaeli Üniversitesi (KOU) Tıp Fakültesi Nöroloji AD	<input checked="" type="checkbox"/> Katıldı <input type="checkbox"/> Katılmadı	
Doç. Dr. Mine ŞEHİRALTI Başkan Vekili	KOU Tıp Fakültesi Tıp Tarihi ve Deontoloji AD	<input checked="" type="checkbox"/> Katıldı <input type="checkbox"/> Katılmadı	
Veteriner Hekim Cüneyt Özer Raportör	KOU Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Birimi	<input checked="" type="checkbox"/> Katıldı <input type="checkbox"/> Katılmadı	
Prof. Dr. Tijen UTKAN Üye	KOU Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Birimi Tıp Fakültesi Farmakoloji AD	<input checked="" type="checkbox"/> Katıldı <input type="checkbox"/> Katılmadı	
Yrd. Doç. Dr. Sabri CORA Üye	KOU Dış Hekimliği Fakültesi Endodonti AD	<input type="checkbox"/> Katıldı <input type="checkbox"/> Katılmadı	
Yard. Doç. Dr. Fevzi UÇKAN Üye	KOU Fen-Edebiyat Fakültesi Genel Biyoloji AD	<input type="checkbox"/> Katıldı <input type="checkbox"/> Katılmadı	
Prof. Dr. Zafer CANTÜRK Üye	KOU Tıp Fakültesi Genel Cerrahi AD	<input type="checkbox"/> Katıldı <input type="checkbox"/> Katılmadı	
Prof. Dr. Melda YARDIMOĞLU YILMAZ Üye	KOU Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji AD	<input checked="" type="checkbox"/> Katıldı <input type="checkbox"/> Katılmadı	
Doç. Dr. Canan BAYDEMİR Üye	KOU Tıp Fakültesi Biyostatistik ve Tıbbi Bilişim AD	<input checked="" type="checkbox"/> Katıldı <input type="checkbox"/> Katılmadı	
Yard. Doç. Dr. Gürler AKPINAR Üye	KOU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji AD	<input checked="" type="checkbox"/> Katıldı <input type="checkbox"/> Katılmadı	
Veteriner Hekim Akın Ziya ÜNAL Üye	Hayvan Hakları Derneği Veterinerler Odası	<input type="checkbox"/> Katıldı <input type="checkbox"/> Katılmadı	
Asiye ASLAN Üye	Emekli Öğretmen	<input checked="" type="checkbox"/> Katıldı <input type="checkbox"/> Katılmadı	

EK 2. Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurul Onay Formu



T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ

GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR
ETİK KURULU



Etik Kurul Bilgileri	Adı	Kocaeli Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
	Adres	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Ara Kat 41380 Umuttepe Yerleşkesi /KOCAELİ
	Telefon	0262 303 74 50
	Faks	0262 303 74 63
	E-Posta	gokaetik kurul@kocaeli.edu.tr

Başvuru Bilgileri	Araştırmacının Adı	Kardiyomiyojenik farklılaşma faktörleri, VEGF ve deselülarize kalp matriksinin mezenkimal kök hücrelerin farklılaşmasına Notch/Hedgehig sinyal yolları üzerinden olan etkilerinin incelenmesi			
	Araştırma Proje Numarası	KÜ GOKAEK 2016/323			
	Sorumlu Araştırmacı Unvanı/Adı/Soyadı	Doç. Dr. Yusufhan Yazır			
	Sorumlu Araştırmacının Uzmanlık Alanı	Histoloji ve Embriyoloji			
	Araştırma Merkezi	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi KÖGEM			
	Destekleyici	TÜBİTAK			
	Araştırmacının Türü	Yüksek Lisans Tezi			
	Araştırmaya Katılan Merkezler	Tek Merkezli <input checked="" type="checkbox"/>	Çok Merkezli <input type="checkbox"/>	Ulusal <input checked="" type="checkbox"/>	Uluslararası <input type="checkbox"/>

Değerlendirilen Belgeler	Belge Adı	Var	Yok	Açıklama
	Başvuru Dilekçesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	Başvuru Formu	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	Araştırmacının Türü	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Hücre ve Doku Kültürü-Koleksiyon Materyalle Yapılacak araştırma
	Araştırma Protokolü	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	Kullanılacak Form Örnekleri	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	Aydınlatılmış Onam Formu	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	Araştırma Bütçesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	Literatür Örneği	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	Taahhütname	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	Biyolojik Materyal Transfer Anlaşması	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	İzin Belgeleri	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	Başhekimlik Onayı	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	Özgeçmişler	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	Değişiklik Bilgi Formu	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	Proje Sonuç Formu	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Diğer	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		

KÜ Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Onay Formu

Belge kodu	Rev. Tarihi / No.su:	Sayfa
Onay formu	21.03.2016/KOGOEK01.1	1/2

Karar Bilgileri	Karar No: KÜ GOKAEK 2016/22.13	Proje No: 2016/323	Tarih: 28/12/2016
	Doç. Dr. Yusufhan Yazır sorumluluğunda yapılan ve yukarıda bilgileri verilen araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler, araştırmanın gerekçesi, amacı, yaklaşım ve yöntemleri, gönüllüler için beklenen yarar ve riskler dikkate alınarak değerlendirilmiş ve araştırmanın ilgili protokol doğrultusunda belirtilen merkezlerde yürütülmesi etik açıdan, <input checked="" type="checkbox"/> Uygun bulunmuştur. <input type="checkbox"/> Eksikliklerin tamamlanması koşulu ile uygun bulunmuştur.* <input type="checkbox"/> Uygun bulunmamıştır.*		

Dayanakları	Hasta Hakları Yönetmeliği (01.08.1998/23420); Biyoloji ve Tıbbın Uygulanması Bakımından İnsan Hakları ve İnsan Haysiyetinin Korunması Sözleşmesi: İnsan Hakları ve Biyotıp Sözleşmesinin Uygun Bulunduğuna Dair Kanun (09.12.2003/25311); Biyotıp Araştırmalarına İlişkin İnsan Hakları ve Biyotıp Sözleşmesine Ek Protokolün Onaylanmasının Uygun Bulunduğuna Dair Kanun (29.03.2011/27899); İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik (13.04.2013/28617); Tıbbi Cihaz Klinik Araştırmaları Yönetmeliği (06.09.2014/29111); Dünya Tıp Birliği Helsinki Bildirgesi; İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu; Türk Tabipleri Birliği Hekimlik Meslek Etiği Kuralları; Türk Tabipleri Birliği Araştırma Etiği Bildirgesi
-------------	--

Etik Kurul Üyeleri

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile İlişki		Toplantıda Bulunma		İmza
			E	K	E	H	E	H	
Prof. Dr. Kadir Babaoğlu Başkan	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	KATILMADI
Prof. Dr. İ. Erdem Okay Üye	Genel Cerrahi	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	KATILMADI
Prof. Dr. Haluk Emre Özel Üye	Restoratif Diş Tedavisi	Kocaeli Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Canan Baydemir Üye	Biyostatistik	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Selcen Göçmez Üye	Farmakoloji	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Özlem Yıldız Gündoğdu Üye	Çocuk ve Ergen Ruh Sağlığı ve Hastalıkları	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Yusufhan Yazır Üye	Histoloji ve Embriyoloji	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	İLİŞKİLİ*
Yrd. Doç. Dr. Aslıhan Akpınar Raportör	Tıp Tarihi ve Etik	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. Ceyla Eraldemir Üye	Biyokimya	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	

* Gerekçe ve öneriler:

⇒ ilişkili etik kurul üyesi bu profesörün taahhüsüne katılmadıkça
Aslıhan

KÜ Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Onay Formu

Beige kodu	Rev. Tarihi / No.su:	Sayfa
Onay formu	21.09.2016/KOGOEK01.1	2/2

EK 3. Tez Denetleme Listesi

Tez, aşağıdaki denetimler yapılarak tamamlanmıştır.

- Kapak ve iç kapak sayfalarında BİLİM UZMANLIĞI ya da DOKTORA şeklinde elde edilen unvanlar yazıldı (Kapak sayfasına danışman adı yazılmamalıdır).
- Kapak sayfasına mezun olunan PROGRAMIN (Anabilim dalının değil) adı yazıldı.
- Tez kapağı sırt kısmına kılavuzda belirtilen çizimde (yazının yönüne dikkat!) ad, program, yıl yazıldı.
- Onay sayfası uygun çizimde hazırlandı (kazanan unvanlar BİLİM UZMANLIĞI ya da DOKTORA olmalıdır) imzalatıldı (Enstitü Müdürü'nün imzası da gereklidir, imzaların aynı renk kalemle atılmasına dikkat edilmelidir).
- Dizinler kılavuzda belirtildiği gibi sıralandı.
- Ön sayfalara i, ii, iii şeklinde Roma rakamları konuldu.
- Sayfa numaraları kılavuzda belirtildiği şekilde konuldu.
- Sayfa düzeni kılavuzda belirtildiği şekilde yapıldı.
- Ana metin yazı boyutu 12 olacak biçimde basıldı.
- Dipnot yazı boyutu 10 olacak şekilde basıldı.
- Ana metin satır aralığı 1.5 olacak şekilde yazıldı.
- Kaynaklar abecesel sıralamaya göre yazıldı.
- Kaynak gösterme ilkelerine ve yazım kurallarına uyuldu.
- Ekler kılavuzda belirtildiği gibi verildi.

29/06/2018

Doç. Dr. Yusufhan YAZIR

