

T.C.  
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**İNSAN YAĞ DOKUSU KAYNAKLI MEZENKİMAL KÖK  
HÜCRELERİ İLE YÜKLENMİŞ HYALURONİK ASİT/  
JELATİN PLAZMA JELLERİN YUMUŞAK DOKU  
MÜHENDİSLİĞİ UYGULAMALARINDA KULLANIMI**

Hazırlayan: Esra KORURER

Kocaeli Üniversitesi  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin  
Kök Hücre ve Doku  
Yenilenmesi Programı için Öngördüğü  
BİLİM UZMANLIĞI (YÜKSEK LİSANS) TEZİ  
Olarak Hazırlanmıştır

KOCAELİ  
2012

T.C.  
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**İNSAN YAĞ DOKUSU KAYNAKLI MEZENKİMAL KÖK  
HÜCRELERİ İLE YÜKLENMİŞ HYALURONİK ASİT/  
JELATİN PLAZMA JELLERİN YUMUŞAK DOKU  
MÜHENDİSLİĞİ UYGULAMALARINDA KULLANIMI**

Hazırlayan: Esra KORURER

Kocaeli Üniversitesi  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin  
Kök Hücre ve Doku  
Yenilenmesi Programı için Öngördüğü  
BİLİM UZMANLIĞI (YÜKSEK LİSANS) TEZİ  
Olarak Hazırlanmıştır

Danışman: Prof. Dr. Erdal KARAÖZ

KOCAELİ  
2012

T.C.  
KOCAELI ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ




Tez adı: İnsan Yağ Dokusu Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücreleri ile Yüklennmiş Hyaluronik Asit/ Jelatin Plazma Jellerin Yumuşak Doku Mühendisliği Uygulamalarında Kullanımı

Tez yazarı: Esra Korurer

Tez savunma tarihi: 28.12.2012

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Erdal Karaöz


*İş bu çalışma Jürimiz tarafından Kök Hücre Anabilim Dalı yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.*

Tez Savunma Sınavı jüri üyeleri		İmzası
Ünvanı	Adı Soyadı	
Başkan (Danışman)	Prof. Dr. Erdal Karaöz	
Üye	Doç. Dr. Güralp Özkoç	
Üye	Yard. Doç. Dr. Ayla Eker Sarıboyacı	

ONAY

*Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.*

..24..1...21.../2013

  
Prof. Dr. Tuncay Çolak  
Enstitü Müdürü

## ÖZET

Plastik ve rekonsruktif cerrahide ve kalp yetmezliği ile ilgili hastalıkların tedavisinde sayısız yumuşak doku mühendisliği temelli uygulamalar bulunmaktadır. Sadece hücre enjeksiyonu ile yapılan hücre transplantasyonlarında hücre-hücre dışı matriks (HDM) etkileşiminin yetersiz olmasından kaynaklanan fonksiyonel bozukluklar ve transplantasyonda yeterli sayıda canlı hücre olmamasından kaynaklanan sorunlar meydana gelmektedir. Laboratuvar ortamında büyüme faktörlerinin yanı sıra kök hücrelere çeşitli mikroçevre özelliklerinin sağlanması ile hedef hücre farklılaşması daha verimli bir şekilde gerçekleştirilebilmektedir. Bu çalışmanın amacı insan kanı plazmasından yoğunlaştırılmış fibrinojen, jelatin ve göbek bağı türevli hyaluronik asit (HA) ile üç boyutlu iskeletonun *in vitro* testler ile yumuşak doku mühendisliği uygulamalarındaki uygunluğunun test edilmesi ve jel üzerine ekilen adipoz doku kaynaklı mezankimal kök hücrelerin (AD-MKH) yağ ve kalp kası hücrelerine farklılaşma potansiyelinin incelenmesidir. Öncelikle, jelatin, HA ve insan kanı plazmasından fibrinojenin çöktürülmesi ile hyaluronik asit/ jelatin plazma jeller (HA/J plazma jel) üretildi. Gluteraldehit ile çapraz bağlanmış jellerin sıkıştırma testi ile mekanik özellikleri incelendi ve kriyokesitleri alınan jeller komasi mavisi ile boyanarak jellerin gözenekliliği ve gözenek çapı belirlendi. HA/J plazma jellerin elastik modüllerinin yumuşak dokuların elastik modüllerine yakın,  $3.53 \pm 0.23$  kPa, olduğu belirlendi. HA/J plazma jellerin sade plazma jellere göre daha yüksek gözenekliliğe sahip olduğu belirlendi (%  $72.5 \pm 5.85$ , %  $63.86 \pm 4.27$ ).

İnsan lipoaspirat materyalinden AD-MKH'ler izole edildi ve üçüncü pasajda akım sitometri ile ve osteojenik ve adipojenik farklılaşma yapılarak karakterize edildi. Jel ve cam slayt üzerine ekilen hücrelere WST-1 testi yapıldı. HA/J plazma jel üzerindeki AD-MKH'lerin cam slayt üzerindeki hücrelere göre zamanla daha fazla çoğaldığı ve jelin toksik etkisinin olmadığı belirlendi. Sonrasında, jel üzerindeki AD-MKH'lerin adipojenik ve kardiyomiyojenik farklılaşma potansiyeli incelendi. Jel üzerindeki AD-MKH'lerin yağ hücrelerine farklılaştığı görüldü. Kardiyomiyojenik farklılaşmaya alınan hücrelerin 2 ve 3 hafta sonra gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonları (PZR, Real-Time PCR) testi ile özel kalp kası genleri olan GATA4, TBX5 ve cTn I genleri HA/J plazma jellerin ve aktivin-a, BMP-4, insulin, valproik asit ve 5-azasitidin gibi çeşitli kimyasal maddelerin etkileri karşılaştırmalı olarak incelendi. Gerçek zamanlı PZR sonuçlarına göre jel ve cam slayt üzerindeki hücrelerin farklı kimyasal maddeler ile her bir gen için ekspresyon oranları farklı bulundu.

Sonuç olarak, HA/J plazma jellerin yumuşak doku mühendisliği uygulamaları için uygun gözenek büyüklüğüne, mekanik özelliklere sahip olduğu ve hücre büyümesini desteklediği belirlenmiştir. Ayrıca bu çalışmada, aktivin-a, BMP-4 ve insulin, valproik asitin 5-azasitidine göre jel üzerindeki AD-MKH'leri daha fazla kardiyomyojenik farklılaşmaya yönlendirdiği belirlenmiştir.

**Anahtar kelimeler:** Yumuşak doku mühendisliği, Hyaluronik asit/Jelatin plazma jel, insan adipoz dokusu kaynaklı mezenkimal kök hücreler



## ABSTRACT

Soft tissue engineering-based approaches have numerous potential applications in plastic and reconstructive surgery and treatments of diseases related to heart failure. Cell transplantation through direct cell injection are not optimal for cell survival and function due to the lack of cell-ECM interactions. More efficient differentiation to target cells is achieved in the laboratory with the provision of various microenvironmental features besides the growth factors to stem cells. The purpose of this study was to evaluate cardiomyogenic and adipogenic differentiation potential of Adipose derived stem cells (AD-MSCs) on gels and the suitability of 3D scaffolds, composed concentrated fibrinogen from human plasma, gelatin and human umbilical cord derived hyaluronic acid, for soft tissue engineering applications through in vitro tests. Fibrinogen was precipitated from human plasma and its composite gels with gelatin and hyaluronic acid (HA/G plasma gels) were produced afterwards. Mechanical properties of the glutaraldehyde crosslinked gels were determined with compression tests and their porosity and pore size determined from their cryosections stained with comassie brilliant blue. The Young Modulus of the HA/G plasma gels was determined as  $3.53\pm 0.23$  kPa, close to that of soft tissues. The HA/G plasma gels had higher porosity than plain plasma gels ( $72.5\%\pm 5.85$  vs  $63.86\%\pm 4.27$ ). AD-MSCs were isolated from human lipoaspirates and characterised with flow cytometry at the third passage, and also were differentiated into osteogenic and adipogenic lineages. AD-MSCs were seeded on the gels and coverslips for comparative cell proliferation tests. The cell proliferation assay (WST-1) of AD-MSCs on the HA/G plasma gels revealed the nontoxic nature of the gels and that the number of cells on the gels increase more rapidly than on the coverslips in time. After, adipogenic and cardiomyogenic differentiation capability of AD-MSCs on the gels is being investigated. Adipogenic differentiation of ASCs on gels were better than AD-MSCs of cover slips. After two and three weeks of incubation for cardiomyogenic differentiation, the specific cardiac genes expressions of GATA4, TBX5 and cTn I were examined by real-time quantitative polymerase chain reaction (real-time PCR) analysis to investigate the effects of HA/Gelatin blood plasma gels and the chemical modifiers like activin-a, BMP-4, insulin, valproic acid and 5-azacytidine on cardiomyogenic differentiation of AD-MSCs. Real time RT-PCR results showed that different ratios cardiac markers' expression of cells seeded on gels and coverslips (GAT 4, TBX5 and cTn I) caused every chemical modifiers. The results showed that a composite HA/Gelatin plasma gel with suitable pore size, mechanical properties and

excellent cell growth supporting property can serve as a useful scaffold for soft tissue engineering applications . Also cardiac gene expressions of the activin-a, BMP-4 and insulin, valproic acid induced cells compared with 5- azacytidine induced cells on HA/G plasma gels were the most pronounced in promoting cardiomyogenic differentiations in this investigation.

**Key words:** Soft tissue engineering, Hyaluronic acid/Gelatin plasma gel, human adipose derived mesenchymal stem cells.



## TEŞEKKÜR

Bilimsel anlamdaki bilgi ve tecrübeleriyle, çalışmalarımın yönlendirilmesi ve yürütülmesi için gerekli desteği hiçbir zaman esirgemeyen çok değerli hocam Prof. Dr. Erdal KARAÖZ'e çalışmalarım boyunca sağladığı olanaklar için sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez konumu belirleyen ve bütün çalışmalarım boyunca her zaman yanımda olarak bilgi ve deneyimlerini paylaşan değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Halime KENAR'a,

Çalışmalarımı tamamlamam için gerekli izinleri almama yardımcı olan saygıdeğer hocam Prof. Dr. H. Soner ALTUNDOĞAN'a,

Real- Time PCR çalışmalarında yardımcı olan Uzm. Biyolog Zehra Seda ÜNAL ve Uzm. Biyolog Özlem SAĞLAM'a, immunfloresan ve immunhistokimyasal boyalı örneklerin görüntülenmesinde yardımcı olan Biyolog Cansu SUBAŞI'ya, Akım Sitometrisi çalışmalarında yardımcı olan Biyolog Gülay ERMAN'a, tez çalışmalarım boyunca örneklerimin kesit alma aşamasında desteklerini esirgemeyen Kocaeli Üniversitesi Patoloji laboratuvarları şefi Biyolog Hakan TOPAL'a,

Tez çalışmalarımın yürütülmesinde emeği olan, yardımlarını esirgemeyen değerli dostlarım Araş. Gör. Biyomüh. Birol AY'a ve Biyolog Büşra ÖNCEL'e

Tez yazımı aşamasında her sorduğum soruya sabırla cevap veren, bilimsel anlamda bana büyük katkısı olan değerli iş arkadaşım Araş. Gör. Biyomüh. Serhat ELÇİÇEK'e

Her zaman bana destek olan ve hayatım boyunca attığım her adımda yanımda olan aileme ve sevgisiyle hayatıma kattığı değerler için Rıdvan Fatih GÖV'e

TEŞEKKÜR EDERİM.



## İÇİNDEKİLER

ÖZET .....	v
ABSTRACT .....	vii
TEŞEKKÜR .....	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	xv
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xvii
1.GİRİŞ VE AMAÇ .....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. DOKU MÜHENDİSLİĞİ.....	4
2.2. DOKU MÜHENDİSLİĞİNDE KULLANILAN HÜCRE KAYNAKLARI .....	5
2.2.1.Kök Hücreler .....	6
2.3.DOKU MÜHENDİSLİĞİNDE KULLANILAN BİYOMALZEMELER .....	9
2.3.1 Hyaluronik Asit .....	11
2.3.2 Fibrin .....	14
2.3.3 Jelatin .....	17
2.4.YAPI İSKELELERİ .....	18
2.4.1. Hidrojeller .....	19
2.5. KALP KASI DOKU MÜHENDİSLİĞİ .....	21
2.5.1 Kalp Hastalıkları ve Hücresel tedavi.....	21
2.5.2 Kalp Rejenerasyonunda Kullanılan Hücre Çeşitleri .....	22
2.5.3 Kalbin Embriyolojik Gelişimi .....	24
2.5.4 Kalp Kası Doku Mühendisliği için iskele tasarımı .....	25
2.5.5. Kalp Kası Onarımı İçin Yenileyici Tedavide Hidrojel Kullanımı .....	27
2. 6. ADİPOZ DOKU MÜHENDİSLİĞİ .....	28
2.6.1. Adipoz Dokusu ve Adipoz Kök hücreleri .....	28
2.6.2. Adipojenezis.....	29
2.6.4. Adipoz Dokusu Tamiri İçin Kullanılan Stratejiler.....	29
2.6.3. Adipoz Doku Mühendisliğinde Kullanılan Yapı iskeleleri.....	30
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	32
3.1. İnsan Lipoaspirat Materyalinden AD-MKH İzolasyonu .....	32
3.2. Adipoz Kaynaklı MKH'lerin Karakterizasyonu.....	33
3.3. Göbek Bağından Hyaluronik Asit İzolasyonu .....	34
3.4 İnsan Göbek Bağından İzole Edilen Hyaluronik Asitin Karakterizasyonu .....	35

3.5. İnsan Kan Plazmasından Fibrinojen İzolasyonu.....	36
3.6. Hyaluronik Asit/Jelatin Plazma Jellerin Üretimi .....	36
3.7. Plazma Jellerin Üretimi .....	37
3.8. Hyaluronik Asit/Jelatin Plazma Jellerin Stabilite Testi Çalışmaları.....	38
3.9. Hyaluronik Asit/Jelatin Plazma Jel ve Plazma Jellerin Karakterizasyonu .....	39
3.9.1. Basma Testi.....	39
3.9.2. Gözeneklilik ve Gözenek Büyüklüğü .....	40
3.9.3. Elektron Mikroskobu Görüntüleri.....	40
3.10. H.A/J Plazma Jel Üzerindeki MKH'lerin Canlılık ve Çoğalma Testleri.....	41
3.11. . HA/J Plazma Jel Üzerine Ekilmiş İnsan AD-MKH'lerin Kardiyomiyojenik Farklılaşma Potansiyelinin Değerlendirilmesi.....	41
3.11.1. Cam Slayt Üzerine Ekilmiş MKH'lerin Kardiyomiyojenik Farklılaşma Potansiyelinin Değerlendirilmesi .....	41
3.11.2. H.A/J Plazma Jel Üzerine Ekilmiş AD - MKH'lerin Kardiyomiyojenik Farklılaşma Potansiyeli .....	43
3.11.3. İmmunhistokimyasal Boyamalar.....	44
3.11.4. Gerçek zamanlı PZR (Real-time PCR ) Çalışmaları.....	45
3.12. HA/J Plazma Jel üzerine Ekilmiş İnsan AD-MKH'lerin Adipojenik Farklılaşma Potansiyelinin Değerlendirilmesi.....	48
4. BULGULAR .....	49
4.1. AD-MKH İzolasyonu ve Karakterizasyonu .....	49
4.2. İnsan Göbek Bağından İzole Edilen Hyaluronik Asitin Karakterizasyonu .....	52
4.3. İnsan Kan Plazmasından Fibrinojen İzolasyonu.....	56
4.4. Plazma ve HA/J Plazma Jellerin Üretimi ile İlgili Yapılan Çalışmalar.....	57
4.5. HA/J Plazma Jellerin Dayanıklılık Testi Çalışmaları .....	58
4.6. HA/J Plazma Jel ve Plazma Jellerin Karakterizasyonu .....	59
4.6.1. Mekanik Test.....	59
4.6.2. Jellerin Gözenekliliği ve Gözenek Çapı.....	61
4.6.3. Elektron Mikroskobu Görüntüleri.....	62
4.7. HA/J Plazma Jel Üzerine ekilen MKH 'lerin Canlılığının ve Çoğalma Miktarının Belirlenmesi .....	66
4.8. HA/J Plazma Jel Üzerine Ekilmiş İnsan AD-MKH'lerin Kardiyomiyojenik Farklılaşmasının İncelenmesi .....	68
4.8.1. Cam Slayt Üzerine Ekilmiş AD- MKH'lerin Kardiyomiyojenik Farklılaşmasının İncelenmesi.....	68

4.8.2. H.A/J Plazma Jel üzerine ekilmiş AD - MKH' lerin kardiyomiyojenik farklılaşmasının incelenmesi .....	70
4.9.HA/J Plazma Jel Üzerine Ekilmiş İnsan AD-MKH'lerin Adipojenik Farklılaşmasının İncelenmesi .....	77
5. TARTIŞMA.....	78
6.SONUÇLAR VE ÖNERİLER .....	84
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	85
EKLER .....	91
ÖZGEÇMİŞ.....	96



## **SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ**

ANP: atriyal natriüretik peptid

bFGF: Human basic fibroblast büyüme faktörü

BSA: Sığır serum albumin

cm: Santimetre

Da: dalton

dk: dakika

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMEM/F12 : Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12

DNA: Deoksiribonükleik asit

EDC : (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide)

EKH: Embriyonik Kök Hücreler

FBS: Fetal Sığır Serumu

g: gün

GA: Gluteraldehit

Gtn-DTPH: Tiol ile modifiye edilmiş jelatin

HBSS: Hank's Buffered Salt Solution

hEGF: Human Endotelial büyüme faktörü

IBMX: 3-isobutyl-1-methylxanthine

IGF 1: İnsülin büyüme faktörü

iPKH : İndüklenmiş pluripotent kök hücreler

MHC: Miyozin ağır zincir

MI: Miyokardiyal infarktüs

MKH: Mezenkimal Kök Hücre

ml: mililitre

mm: Milimetre

N: Newton

NHS : (N-Hydroxysuccinimide)

PBS: Phosphate-buffered saline

PDMS: Polidimetiloksian

PE: Polietilen

PEG: polietilenglikol

Pen/Strep : Penisilin/Streptomisin

PFA : Paraformaldehit

PGA: Poli(glikolik asit)

PLA: Poli(laktik asit)

PLGA: Poli(laktik ko- glikolik asit)

PP: Polipropilen

PTFE: Politetrafluriyeten

RNA: Ribonükleik asit

sa: Saat

VEGF: Vasküler endotelyal büyüme faktörü

$\mu$ l: Mikrolitre

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Doku mühendisliği uygulamalarının aşamaları.....	4
Şekil 2.2. Tıbbi uygulamalarda kullanılan erişkin ve embriyonik kök hücreler.....	6
Şekil 2.3. Embriyonik kök hücreler ve pluripotent özellikleri.....	7
Şekil 2.4. Hyaluronik asit molekülü.....	12
Şekil 2.5. Sıçanda femoral hasar modeli.....	13
Şekil 2.6. Fibrin polimerizasyonunu ve fibrinolizisin şematik gösterimi.....	15
Şekil 2.7. Farklı trombin konsantrasyonlarının fibrin pıhtı yapısına etkisi.....	16
Şekil 2.8. Doku mühendisliğinde kullanılan iskele üretimi yaklaşımları.....	19
Şekil 2.9. Hidrojellerdeki kovalent bağ, bağlantı noktaları ve dolaşıklıkları gösteren ağ yapısı.....	20
Şekil 2.10. Kalp kası doku mühendisliğinde günümüzde kullanılan ana stratejiler	21
Şekil 2.11. Kök hücreden adiposit farklılaşmasının aşamaları.....	29
Şekil 3.1. Hyaluronik asit/J plazma jelin üretim sonrası resimleri.....	37
Şekil 3.2. HA/J plazma ve plazma Jellerin üretim aşamalarının şematik gösterimi....	38
Şekil 3.3. AD-MKH'lerin kardiyomiyojenik farklılaşma çalışmaları deney düzeneği.....	44
Şekil 3.4. AD-MKH'lerin adipojenik farklılaşma çalışmaları deney düzeneği.....	49
Şekil 4.1. AD-MKH'lerin morfolojik görünüşleri.....	49
Şekil 4.2. İnsan lipoaspirat materyalinden izole edilmiş MKH'lerin (P3) akım sitometri cihazında saptanan immunofenotipik özellikleri.....	50
Şekil 4.3. İnsan lipoaspirat materyalinden izole edilmiş MKH'lerin (P3) kemik farklılaşmaları.....	51
Şekil 4.4. İnsan lipoaspirat materyalinden izole edilmiş MKH'lerin (P3) yağ farklılaşmalarının flouresan mikroskobu görüntüleri.....	52
Şekil 4.5. BSA proteini için BCA testi kullanılarak elde edilen kalibrasyon eğrisi.....	54
Şekil 4.6. İzole edilen göbek bağı ve horoz ibiği kaynaklı hyaluronik asit (satın alınan) ile karşılaştırmalı UV bölgesi spektrumu.....	55
Şekil 4.7. Alsiyan mavisi ile boyanmış HA'in ışık mikroskobu görüntüleri.....	56
Şekil 4.8. HA/J plazma jel iskelelerin makro ve ışık mikroskobu görüntüleri.....	58
Şekil 4.9. Plazma jellerinin gerinim-gerilme grafiği.....	60

<b>Şekil 4.10.</b> HA/J plazma jellerinin gerinim-gerilme grafiği.....	60
<b>Şekil 4.11.</b> Komasi mavisi ile boyanan plazma ve HA/J plazma jellerin mikroskopik görüntüleri.....	62
<b>Şekil 4.12.</b> Plazma ve HA/J plazma jellerin SEM mikrofotografaları.....	64
<b>Şekil 4.13.</b> Plazma ve HA/J plazma jellerin SEM mikrofotografaları.....	65
<b>Şekil 4.14.</b> Hücre yüklenmiş ve hücretsiz HA/J plazma jellerin SEM mikrofotografaları (21.gün).....	66
<b>Şekil 4.15.</b> AD-MKH'lerin WST-1 testi ile oluşturulan kalibrasyon eğrisi.....	67
<b>Şekil 4.16.</b> HA/J plazma jel ve cam slayt (C.S) üzerine ekilen AD-MKH'lerin farklı günlerdeki hücre sayıları.....	67
<b>Şekil 4.17.</b> Kardiyomiyojenik farklılaşma uygulanan AD-MKH'lerin $\alpha$ aktinin için immün boyaması.....	69
<b>Şekil 4.18.</b> Kardiyomiyojenik farklılaşma uygulanan H.A/J plazma jel üzerinde bulunan AD-MKH'lerin $\alpha$ aktinin için immün boyaması.....	71
<b>Şekil 4.19.</b> Kardiyomiyojenik farklılaşma uygulanan H.A/J plazma jel üzerinde bulunan AD-MKH'lerin troponin t antikor boyaması.....	73
<b>Şekil 4.20.</b> Gerçek zamanlı PZR sonuçlarına göre; GATA4 geninin deney gruplarındaki ekspresyonlarının karşılaştırılması.....	74
<b>Şekil 4.21.</b> Gerçek zamanlı PZR sonuçlarına göre; TBX5 geninin deney gruplarındaki ekspresyonlarının karşılaştırılması.....	75
<b>Şekil 4.22.</b> Gerçek zamanlı PZR sonuçlarına göre; cTn I geninin deney gruplarındaki ekspresyonlarının karşılaştırılması.....	75
<b>Şekil 4.23.</b> Adipojenik farklılaşma uygulanan H.A/J plazma jel üzerinde bulunan AD-MKH'lerin Oil Red O boyaması.....	77

## ÇİZELGELER DİZİNİ

<b>Çizelge 2.1.</b> Yumuşak doku mühendisliğinde sıklıkla kullanılan biyomalzemeler.....	11
<b>Çizelge 2.2.</b> Tek eksenli uzatma deneyi ile hesaplanan fibrin jel Young's modül değerleri.....	17
<b>Çizelge 2.3.</b> Kalp doku mühendisliğinde yaygın olarak kullanılan hidrojeller.....	26
<b>Çizelge 2.4.</b> Adipoz doku mühendisliğinde son zamanlarda kullanılan biyomalzemeler.....	31
<b>Çizelge 3.1.</b> H.A/J plazma jellerine uygulanan çapraz bağlayıcı maddeler ve uygulanma süreleri.....	39
<b>Çizelge 3.2.</b> Gerçek zamanlı PZR çalışmalarında kullanılan primerlerin özellikleri...	45
<b>Çizelge 3.3.</b> Gerçek zamanlı PZR çalışmalarında kullanılan grupların isimlendirilmesi.....	47
<b>Çizelge 4.1.</b> Göbek bağından ve horoz ibiğinden izole edilen hyaluronik asitlerin BCA testi sonuçları.....	53
<b>Çizelge 4.2.</b> BCA testine göre göbek bağından ve horoz ibiğinden izole edilen HA'in içerdikleri protein miktarları.....	54
<b>Çizelge 4.3.</b> Kan plazması ile plazma ve H.A/J plazma jellerin üretimi için jel içeriğindeki maddelerin farklı oranlarda deneme çalışmaları.....	57
<b>Çizelge 4.4.</b> H.A/J plazma jellerinin dayanıklılığının artırılması çalışmaları sonucunda jelde meydana gelen değişiklikler.....	59
<b>Çizelge 7.1.</b> Gerçek zamanlı PZR sonucunda deney gruplarındaki GATA4 geninin CT değerleri.....	91
<b>Çizelge 7.2.</b> Gerçek zamanlı PZR sonucunda TBX5 geninin CT değerleri.....	92
<b>Çizelge 7.3.</b> Gerçek zamanlı PZR sonucunda cTn I geninin CT değerleri.....	93
<b>Çizelge 7.4.</b> Deney gruplarının ANOVA testi ile çoklu karşılaştırılması.....	94
<b>Çizelge 7.5.</b> 14. ve 21. günlerdeki aynı deney gruplarının Paired Sample Test ile karşılaştırılması.....	95





## 1.GİRİŞ VE AMAÇ

Doku mühendisliği, mühendislik ilkelerinin biyoloji ve tıp bilimleri ile birleştirilerek, biyoyapay organların laboratuvar ortamında oluşturulmasına ek olarak, zarar görmüş dokuların onarımını (rejenerasyonunu) hedefleyen bir araştırma alanıdır. Doku mühendisliği bileşenleri hücre, iskele ve düzenleyicilerdir. İskele gözenekli, biyobozunur ve hücre fonksiyonlarını düzenleyici etkilere sahip olmalıdır. Doku mühendisliği bileşenlerinden olan diğer bir unsur hücrelerdir. Bir dokuyu oluşturmak için çok miktarda hücreye ihtiyaç duyulması, hücre kaynağı olarak dikkatleri laboratuvar ortamında rahatlıkla çoğaltılabilen ve birçok hücre tipine farklılaşabilen kök hücrelerin üzerine çekmiştir. Tıbbi anlamda şu an için kullanımı en güvenli ve mümkün olan kök hücreler mezenkimal kök hücre (MKH)'lerdir. MKH'ler salgıladıkları çeşitli büyüme faktörleri ve sitokinler sayesinde hasarlı dokuda hücre ölümünü azaltıp damarlanmayı hızlandırabilirler, hedef doku hücrelerine farklılaşabilirler ve allojenik kullanıldıklarında bile immün tepkiyi baskılayabilirler.

Bir kök hücrenin farklılaşma veya kendini yenileme yollarına yönelmesinde 'niş'in (yatak-yuva-çevre) etkisi fazladır. Niş temelde hücrenin mikroçevresi olarak tanımlanır ve yapısal, biyolojik ve mekanik özellikleri ile hücre davranışına yön verir. Laboratuvar ortamında büyüme faktörlerinin yanı sıra kök hücrelere çeşitli mikroçevre özelliklerinin sağlanması ile hedef hücre farklılaşmasının daha verimli bir şekilde gerçekleştirilmesi hedeflenmektedir.

Plastik ve rekonstruktif cerrahide meme ameliyatları ve diğer tümör rezeksiyonu gibi müdahalelerde dokunun yeniden yapılanmasında, yanma gibi post-travmatik hasarların tamirinde, göğüs, yanak ve çene gibi organların konjenital anormallikleri veya kırışıklıklar nedeniyle yaşlanan yüzü gençleştirme gibi işlemler için adipoz doku materyali sıklıkla kullanılmaktadır (Patrick, 2001). Yumuşak dokuların tamirinde hücrelerin doğrudan verilmesi, sadece iskelenin verilmesi ya da hücreli yapı iskelelerinin uygulanması konusunda birçok çalışma gerçekleştirilmiştir. Hastaya uygulanan yapının hızlı bir şekilde tükenmesi (resorbe olması) ve uygulanan bölgenin eski haline dönmesi sorunlara neden olabilmektedir. Bu nedenle, genellikle yapılan doku mühendisliği çalışmalarında kolayca vücut içerisinde bozunmayacak, transplante edilen bölgeyle kaynaşarak immunolojik yanıt oluşturmayacak doku benzeri yapılar üretilmesi amaçlanmaktadır.

Miyokardiyal infarktüs (MI) veya miyokardiyal iskemi gibi hastalıklar hücre kaybı temelli olup, bu nedenle, kalp kası doku mühendisliği dokunun onarımında ve doku bütünlüğünün sağlanmasında büyük öneme sahiptir. MKH'lerden kardiyomiyojenik yönde farklılaşmış hücreler elde etmek amacıyla, kullanılan yöntemlerden en sık kullanılanı ortak kültür (ko- kültür) çalışmalarıdır (Choi et al. 2010, Peran et al. 2010). Ancak, klinik uygulamalarda kullanım için insan kalbi ekstraktları ile çalışılması pratik açıdan uygun olmayacağından dolayı ko-kültür gerektirmeyen *in vitro* kardiyomiyojenik farklılaşma çalışmalarına yönelmek gerekmektedir.

Bu tez çalışmasında, göbek bağından izole edilen hyaluronik asit ve kan plazmasından elde edilen fibrinojen kullanılarak hyaluronik asit/jelatin (HA/J) plazma jeller üretilmiştir. İskele amaçlı üretilen bu jellere insan lipoaspirat materyalinden izole edilen adipoz dokusu kaynaklı mezenkimal kök hücreler (AD-MKH)'ler yüklenerek yumuşak doku mühendisliği alanlarına giren adipoz ve kalp kası doku mühendisliği üzerine çalışmalar yapıldı. Gerçekleştirilen deneysel çalışmalar sonucunda, bu jellerin biyouyumlu ve hücrelere toksik etkisinin olmaması nedeniyle doku hasarının olduğu bölgeye yama amaçlı veya dokunun tamiri için vücuda verilebileceği öngörüldü. Bu jeller uzun süre *in vitro* koşullarda çözünmeden kalabildiği ve bu jellerin elastik modülleri yağ dokusuna çok yakın olduğu için adipoz doku mühendisliğine uygun bir materyal oldukları belirlendi. Bunun yanında, AD-MKH'ler bu jellere ekildiğinde herhangi bir indükleyici besiyeri olmadığı durumda da adipojenik yönde farklılaşmanın saptanması bu jellerin hücreli veya hücresiz olarak adipoz dokusu mühendisliğinde kullanılabileceğini gösterdi.

Kalp kası doku mühendisliği ile ilgili gerçekleştirdiğimiz çalışmalarda ise, elde ettiğimiz jelin kök hücrelerin kardiyomiyojenik yönde farklılaşması üzerine olası etkileri araştırıldı. Ürettiğimiz jellere yüklenen AD-MKH'lere içeriği farklı üç farklılaşma besiyeri uygulanarak kardiyomiyojenik yönde farklılaşma kapasiteleri gen düzeyinde Eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonları (gerçek zamanlı PZR) çalışmaları ile incelendi. Sonuçta, MKH'lerin kalp kası hücrelerine farklılaşmasında farklı besiyeri ortamlarının ve jelin etkisi incelendi. Jel içeriğindeki biyolojik yapıların ve jelin mekanik etkilerinin farklılaşmaya olası etkileri saptandı. Bu çalışmanın mevcut sonuçları, kök hücre temelli *in vitro* kardiyomiyojenik farklılaşmanın başlıca başarılı yöntemi olan ko-kültür uygulamaları için taze insan kalp ekstraktları ve kardiyomiyositlerine gereksinimi ortadan kaldırarak farklı bir yaklaşımın kullanılabileceğine ilişkin ilk bilgileri sunmaktadır. Bu yaklaşımın *in*

*vitro* fonksiyonel, üç boyutlu kalp kası doku grefti geliştirilmesi için de önemli bir yöntem olacağını öngörmekteyiz.

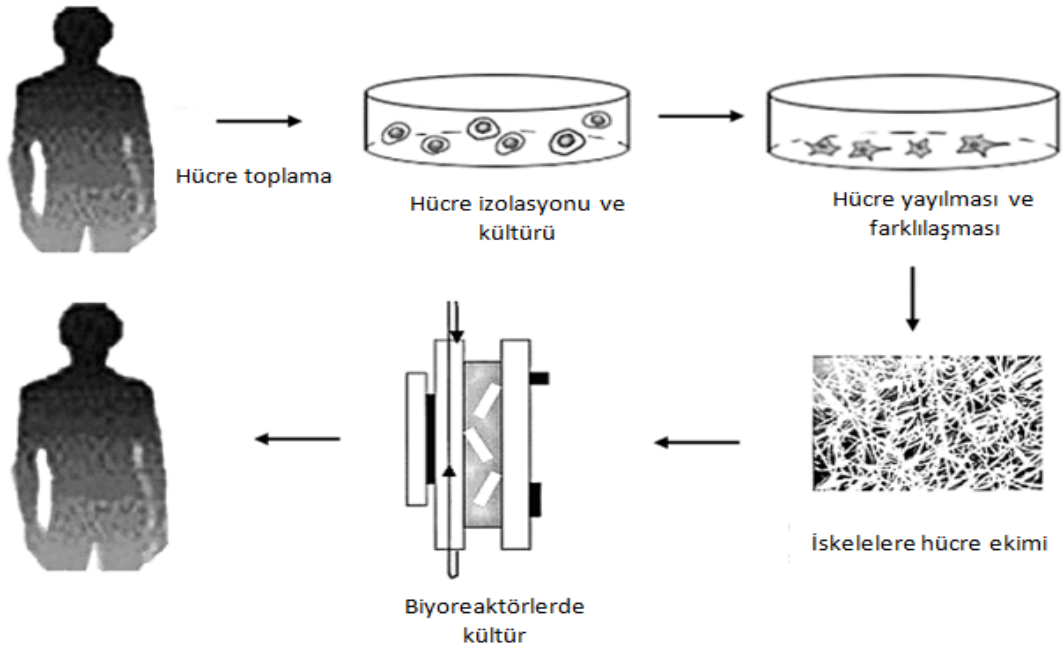


## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. DOKU MÜHENDİSLİĞİ

Dünyada önde gelen ölüm nedenlerinden biri olan organ fonksiyon bozukluğu hastalıklarında umut verici bir çözüm olarak görünen organ nakilleri uygun donör bulma, yüksek maliyet, ömür boyu immun baskılayıcı ilaç alma gibi birçok dezavantajı da bulunmaktadır (Ansell, 2005). Organ naklinin özellikle uygun verici bulma ve uzun süreli bağışık baskılayıcı tedavilerinin dezavantajlarını çözmek amacıyla bilim insanlarını hücreler ile laboratuvar koşullarında doku/organ benzeri yapıları üretip hastalarda kullanarak hasta yaşamını korumak ve kalitesini arttırmak amacıyla alternatif yöntemler bulmaya yönelmiştir. Böylelikle, çok disiplinli bir araştırma alanı olan doku mühendisliği ortaya çıkmıştır.

Doku mühendisliği malzeme bilimi, mühendislik, kimya, fizik ve yaşam bilimlerinin prensiplerini birleştirerek, doğal hücre dışı matrikse (HDM) benzer biyolojik yapılar üreterek insan vücudunda zarar görmüş veya fonksiyon bozukluğu bulunan organların tamiri ve değişiminin yapılmasıdır. Özetle, üç boyutlu gözenekli yapı iskelesi üretilerek, hücre ekimi yapılır ve büyüme faktörleri veya proteinler eklenerek hasarlı doku veya organın fonksiyonlarını tamir etmek amacıyla iskelenin transplantasyonu yapılır (Şekil 2.1) (Vacanti, 2006).



Şekil 2.1. Doku mühendisliği uygulamalarının aşamaları (Howard et al. 2008)

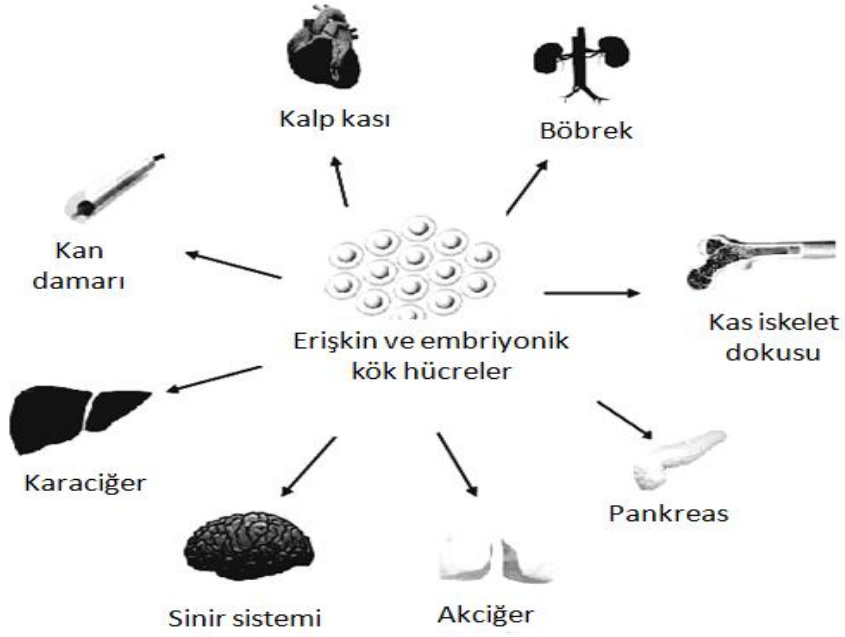
Herhangi iyi bir doku mühendisliği ürünü üretmek için gerekli stratejiler aşağıda verilmiştir (Chiu et al. 2011, Vacanti, 2006):

1. Mekanik özellikleri doğal doku ile benzer, biyoyumlu polimer, metal ve seramik gibi malzemeler seçilmelidir,
2. Gözenek yoğunluğu ve gözenek büyüklüğü uygun mikroyapılı üç boyutlu yapı iskelesi üretilmelidir,
3. Hedef dokunun yeterli miktardaki hücreleri veya kök hücreleri izole edilip, karakterize edilmelidir,
4. Hücreler yapı iskelesine ekilip, *in vitro* koşullarda hücre yayılması denemeleri yapılmalıdır,
5. Hücre ekilmiş yapı iskeleleri hasarlı bölgeye implante edilmelidir,
6. Hücre ekilmiş yapı iskeleleri kendi HDM'lerini üretmeli ve damarlanma görülmelidir,
7. Zamanla yapı iskelesi çözünmeli ve hasarlı bölgenin rejenerasyonu tamamlanmış olmalıdır.

Daha öncede belirtildiği gibi biyomalzeme seçimi, iskele üretimi, hücre kaynağı seçimi doku mühendisliği uygulamalarının önemli unsurlarıdır.

## **2.2. DOKU MÜHENDİSLİĞİNDE KULLANILAN HÜCRE KAYNAKLARI**

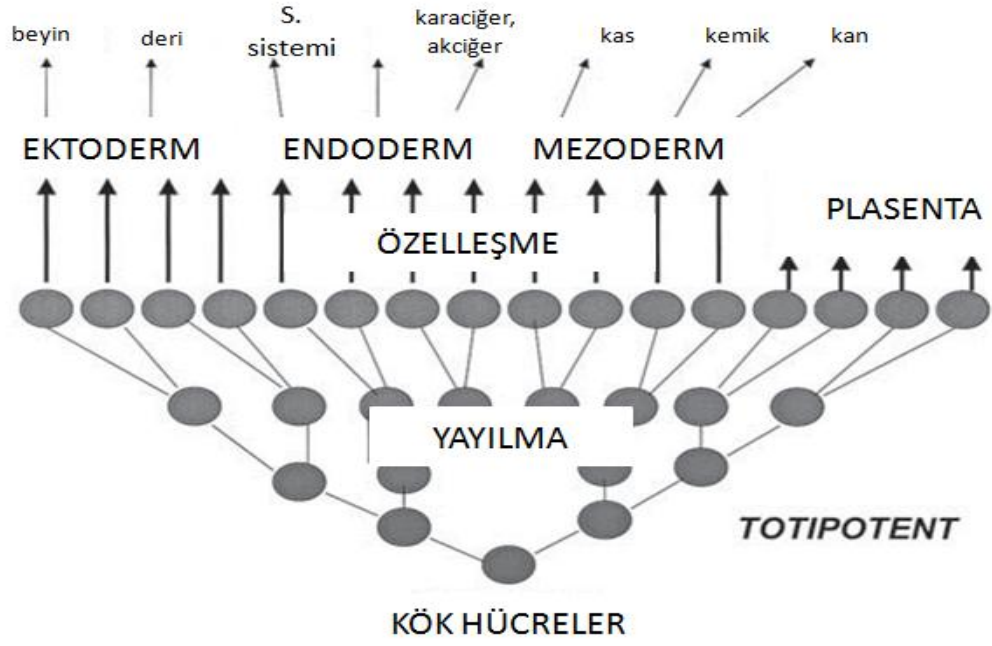
Doku mühendisliği uygulamalarında kullanılan hücreler *in vitro* koşullarda kolayca elde edilebilen ve çoğalabilen hücrelerdir. Bu amaçla, immun yanıtı azaltan ve hastalardan alınan otolog hücreler primer hücre kaynağı olarak sıklıkla kullanılmaktadır. Hasarlı doku veya organdan hücre izole edildiği zaman hücre kalitesinin ideal olamaması nedeniyle son 20 yılda kök hücreler doku mühendisliği uygulamalarında umut verici yeni bir hücre kaynağı olarak dikkatleri üzerine çekmiştir (Vunjak-Novakovic and Freshney, 2007). Embriyonik kök hücreler (EKH) ve erişkin kök hücreler olmak üzere iki çeşit kök hücre doku mühendisliğinde kullanılmaktadır (Şekil 2.2).



**Şekil 2.2.** Tıbbi uygulamalarda kullanılan erişkin ve embriyonik kök hücreler (Wu et al. 2006).

### 2.2.1.Kök Hücreler

Yumurtanın döllenmesiyle oluşan zigot beş veya altı defa bölünerek blastokist adı verilen yapıyı oluşturmaktadır. Bu yapının iç hücre kitlesini oluşturan hücreler ki embriyonik kök hücreler olarak da isimlendirilmektedir, farklı organ ve dokuları oluşturmak üzere yönlenebilir (commitment) (Şekil 2.3) (Sell, 2004). Erişkin veya embriyonik dokuların özelleşmiş hücrelerine farklılaşabilen bu kök hücreler aynı zamanda yaşamın kökenini de oluşturmaktadır.



Şekil 2. 3. Embriyonik kök hücreler ve pluripotent özellikleri (Sell, 2004)

Vücuttaki diğer hücrelerden farklı özelliklere sahip olan kök hücreleri tanımlamak için beş ölçüt kullanılmaktadır (Karaöz ve Ovalı, 2004):

- 1) Kök hücreler, uzun zaman dilimleri boyunca bölünebilme ve kendilerini yenileyebilme yeteneğine sahiptirler,
- 2) Kök hücreler özelleşmemişlerdir,
- 3) Kök hücreden elde edilen bir yavru hücre, özelleşmiş hücrelere farklılaşabilir,
- 4) Kök hücreler, hasar gören alıcıya nakil sonrasında kaynak dokuyu işlevsel olarak tekrardan onarabilmelidir,

5) Daha az anlaşılmış diğer bir ölçüt ise, kök hücrelerinin *in vivo* ortamda doku hasarının olmadığı durumlarda bile farklılaşmış kuşaklara katkı sağlamasıdır.

Temelde kök hücreleri embriyonik ve erişkin (doku ya da organa özgün) kök hücreleri olmak üzere 2 ana kısma ayırabiliriz. EKH'ler erişkin vücutundaki herhangi bir hücre tipine farklılaşabilirler. Erişkin kök hücreler ise, sınırlı sayıda hücre tipine farklılaşma özellikleri vardır (Goldstein and Schneider, 2010).

Erişkin kök hücreleri;

- 1- Hematopoietik kök hücreleri,
  - a) Kemik iliği kök hücreleri,



- b) Periferik kan kök hücreleri,
- c) Göbek kanı kök hücreleri,
- 2- Stromal kök hücreler (MKHleri),
- 3- Organlarda yerleşik diğer erişkin kök hücreleri şeklinde sınıflayabiliriz  
( Karaöz ve Ovalı, 2004).

### 2.2.1.1. Mezenkimal kök hücreler

Kemik iliğindeki kemik iliği stromal hücreleri keşfedildikten (Friedenstein et al. 1970) sonra mezodermal kökenli hücrelere farklılaşabildiği için bu hücrelere MKH'ler adı verildi. Başlangıçta, bu hücrelerin mezodermal kökenli osteositlere, kondrositlere, adipositlere ve miyoblastlara farklılaşabildiği belirlendi (Pittenger et al.1999). Sonraları bu hücrelerin nöral (Sanchez-Ramos et al. 2000, Karaoz et al. 2009), kardiyak (Toma et al. 2002), hepatik (Weng et al. 2003), endotelial (Oswald et al. 2004), pankreatik (Moriscot et al. 2005, Karaoz et al. 2011) ve böbrek (Chhabra and Brayman, 2009) hücrelerine farklılaşabildiği saptandı. MKH'lerin mezodermal kökenli hücrelerin dışındaki hücre tiplerine farklılaşmasına kök hücre plastisitesi denilmektedir.

İlk defa kemik iliğinden izole edilen MKH'lerin diğer kaynaklarına ise periferik kan (Zvaifler et al. 2000), adipoz dokusu (Zuk et al.2001), deri (Chunmeng and Tianmin, 2004), timus, dalak (Krampera et al.2007), diş pulpası (Karaoz et al. 2010), pankreatik adacık (Karaoz et al. 2010), trabeküler kemik (Sottile et al. 2002), göbek bağı kanı (Ericas et al. 2000) örnek verilebilir. Fibroblast benzeri morfoloji, koloni oluşturma ve multipotentlik özellikleriyle karakterize edilen MKH'ler uygun kültür şartlarında doku kültürü kaplarına yapışabilen ve kolayca yayılabilen hücrelerdir. Bu hücreler CD105, CD73 ve CD90 yüzey antijenlerini eksprese ederken, CD45, CD34, CD14 veya CD11b, CD79 alfa veya CD19 ve HLA-DR yüzey antijenlerini eksprese etmemelidir. Ayrıca MKH'ler *in vitro* koşullarda osteoblast, adiposit ve kondroblastlara farklılaşabilmelidir (Dominici et al. 2006). Bu hücreler yüksek çoğalma kapasitesine sahip olması ve kolayca izole edilebilmesi nedeniyle hücresel tedavisi ve doku mühendisliği uygulamalarında sıklıkla kullanılmaktadır.

## **Adipoz doku kaynaklı MKH'ler**

Çeşitli adipoz doku bölgelerinde oldukça fazla bulunan farklılaşmamış progenitör hücreler adipoz dokusundan kolayca elde edilebilmekte ve *in vitro* koşullarda kontrollü şartlar altında mezodermal ve ektodermal kökenli hücrelere farklılaşabilmektedir. Bu hücreler AD-MKH, adipoz doku kaynaklı stromal hücreler (AD-SKH) veya adipoz doku kaynaklı kök hücreler (AD-KH) olarak adlandırılmakta, hücre yüzey antijen profilleri ve farklılaşma karakteristikleri diğer erişkin kök hücreler (kemik iliği kaynaklı MKH) ile benzerlik göstermektedir. Bu hücre tiplerinin en önemli avantajı normal insan yağ dokusunda sık bulunması ve standart lipoaspirat prosedürü ile kolayca elde edilebilmesidir (Guilak, Awad et al. 2004).

Hayvan ve insan adipoz doku kaynaklı stromal kök hücrelerin karakterizasyonu *in vitro* koşullarda akım sitometri cihazı ve immunhistokimyasal yöntemlerle yapılmaktadır. Hücre yüzey antijenleri bakımından MKH'ler ile büyük benzerlik gösteren AD-MKH'ler CD29, CD44, CD71, CD90, and CD105 yüzey antijenlerini eksprese etmektedir (Zuk et al. 2002). Hematopoitik yüzey belirteçleri CD31, CD34 ve CD45 her iki hücre çeşidinde eksprese edilmezken, AD-MKH'lerinde nötür edopeptidaz (CD10 veya sık görülen akut lenfositik lösemi antijeni CALLA), aminopeptidaz (CD13) ve ektonükleotidaz (CD73) ifadeleri görülmektedir. Ayrıca, AD-MKH hücreleri tip I ve tip III kollagen, osteopontin, osteonektin, Thy-1 (CD90), ve MUC-18 (CD146) üretmektedir (Gimble and Guilak, 2003).

## **2.3.DOKU MÜHENDİSLİĞİNDE KULLANILAN BİYOMALZEMELER**

Prostetik malzemeler, diş malzemeleri, implantlar ve ilaç salınımı gibi tıp ve doku mühendisliği uygulamalarında polimerik malzemeler uzun zamandır yaygın olarak kullanılmaktadır. Polimerik malzemelerin metal ve seramik malzemelere göre kolay işlenebilmesi, fiziksel özelliklerinin uygun olması, daha ucuz maliyetle üretilmesi gibi birçok avantajı bulunmaktadır (Park and Lakes, 2007).

Polietilen (PE), polipropilen(PP), politetraflürietilen (PTFE), poli(dimetil tiloksan) (PDMS) ve poli(etilen glikol) (PEG) gibi çözünmeyen polimerler ortopedik implant, kateter, oküler lens, kalp kapakçığı, kemik çimentolarında ve greftlerde uzun zamandır

kullanılmaktadır. Polilaktik asit (PLA), poliglikolik asit (PGA) ve kopolimeri polilaktik ko-glikolik asit (PLGA), poli(dioksan), poli(trimetil karbonat), poli(karbonat) gibi çözünebilir polimerler biyoyumlu olmaları, çözünme ürünlerinin toksik olmaması ve kolayca işlenebilmeleri nedeniyle üç boyutlu doku iskelesi üretiminde, ilaç salınım sistemlerinde ve ameliyat ipliklerinde kullanılmaktadır (Shastri, 2003).

Jelatin, kollagen, ipek, fibrin, dekstran, matrijel, hyaluronik asit, aljinat, kitosan ve agaroz gibi doğal polimerler uzun zamandır biyomalzeme olarak kullanılmaktadır (Freyman et al. 2011). Bu malzemeler HDM'in bir parçası olup, biyoyumlu ve doku mühendisliği ile üretilen dokuların yapısına uygundur. Ancak, bu malzemelerin kullanımında mekanik özelliklerin ve çözünme hızlarının kolayca kontrol altına alınamaması sorun teşkil edebilmektedir. Ayrıca bitki, hayvan veya bakteri gibi canlılardan ekstrakte edildiklerinden ksenojenik protein, virüs veya bakteri içerebilirler ve bu durum bağışıklık yanıtının oluşmasına neden olabilir. Bu olumsuzluklar biyolojik malzemelerin doku mühendisliği uygulamalarında kullanılmasını sınırlamaktadır (Park and Lakes, 2007).

Yumuşak doku mühendisliğinde jelatin, fibrin gibi doğal biyomalzemeler ile poliester, polilaktik asit gibi yapay biyomalzemeler sıklıkla kullanılmaktadır (Çizelge 2.1).

**Çizelge 2.1.** Yumuşak doku mühendisliğinde sıklıkla kullanılan biyomalzemeler (Papenburg, 2009)

<b>Kökeni</b>	<b>Polimer adı</b>
<b>Doğal</b>	Kollagen Fibrin Jelatin Polihidroksibütirat Polisakkaritler (sık kullanılanlar: hyaluronik asit, kitosan, nişasta ve aljinat)
<b>Yapay</b>	Poliesterler (sık kullanılan: poli ( $\alpha$ -hidroksiasitler)) Poli(laktik asit) (PLA) and poliglukonik asit (PGA) Polikaprolakton Poli(propilen furamat) Polianhidritler Poli(ortoesterler)

### 2.3.1 Hyaluronik Asit

İlk defa 1934'de Meyer ve Palmer tarafından sığır vitröz humorlerinden asidik koşullarda izole edilen mukoz benzeri bu maddeye hyaluronik asit (HA) ismi verilmiştir. Hyaluronik asit, sulfat içermeyen amino şekerleri ve üronik asit içeren asidik bir polisakkarittir (Ducheyne et al. 2011).

Memeli dermisinde bulunan, D-glukuronik asit ve N-asetil-glukozaminin oluşturduğu lineer polisakkarit yapısında olan hyaluronik asit (HA), beta-1,4 ve beta-1,3 glukozidik bağlarla birbirine bağlanarak enerji düzeyleri ve uzaysal yapı bakımından oldukça stabil olan primer bir yapıdır (Şekil 2.4) ( Laurent et al. 1995).

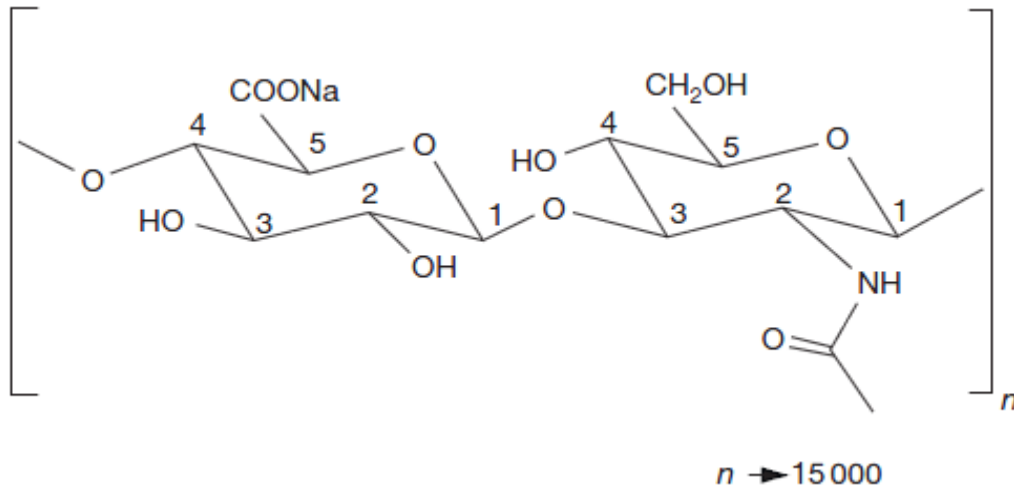
Hyaluronan sentetaz enzimleri; tekrarlanan disakkarit yapısındaki hyaluronan moleküllerinin büyük, lineer yapıdaki polimerlerini sentezler. Sentezlenen zincir, aktive olmuş nükleotit şekerlerine glukuronik asit ve N-asetilglukozaminin eklenmesiyle büyür. Moleküler ağırlığı da ~4 milyon dalton (her disakkarit yaklaşık ~400 dalton) olan bu

madde de tekrarlanan hyaluronan disakkaritlerinin sayısı 10,000 ya da daha fazla moleküle ulaşabilir ( Laurent et al. 1995).

Bağ doku ara maddesinin temel yapı taşı olan HA elastovisköz ortam sağlamaktadır. HA'in su tutucu özelliği nedeniyle, derinin turgorunun sağlanmasında önemli görevleri vardır. Fetal deride oldukça fazla bulunan bu madde, yaşla beraber azalır (Öztaş ve Çalikoğlu, 2003).

Bakteri ve yüksek yapılı organizmalarda bulunan HA yüksek yapılı canlıların dokularında ve HDM'de dolgu materyali olarak yer alır. Gözün vitröz sıvısında, hiyalin kıkırdakta, eklem sıvısında, dermis ve epidermiste yer almaktadır (Fraser et al. 1997, Ascher et al. 2004). Ayrıca, horoz ibiği ve sığırların vitröz humorlerinden de ekstrakte edilebilmektedir.

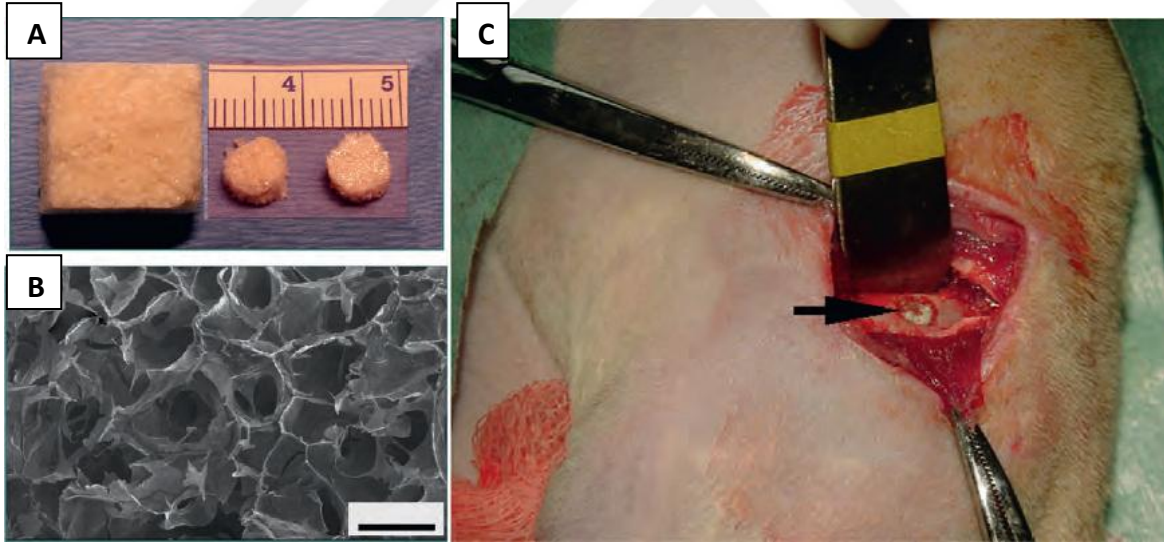
Hyaluronan- lipozom, hyaluronan-protein kompleksleri, hyaluronan-polykarboksilik asit polimerleri, hyaluronan ile birleştirilmiş ko-polimer, hyaluronan-DNA, hyaluronan-kitosan ve hyaluronan karışımları genel olarak; dermatolojide nemlendirici olarak, yara iyileşmesini hızlandırmak amacıyla, dolgu maddesi olarak, kontrollü ilaç salımında, hedeflenmiş gen aktarımında, biyopolimerik taşıyıcı olarak, biyoabsorbe edilebilir membran olarak, oftalmolojik uygulamalarda ve tüp bebek uygulamalarında kullanılmaktadır (Maes and Marenus,1994).



**Şekil 2.4.** Hyaluronik asit molekülü (Ducheyne et al. 2011)

### 2.3.1.2 Hyaluronik asitin doku mühendisliğinde kullanımı

Yapay HDM olarak da adlandırılan üç boyutlu yapı iskeleleri yenileyici tıp ve ilaç salınımı uygulamalarında sıklıkla kullanılmaktadır. HA temelli hidrojeller hücrelerin iskeleyle tutunma, çoğalma ve yayılmasını desteklemektedir. HA ile ilgili yapılan çalışmalarda, disülfid çapraz bağlanma ile makro gözenekli liyofilize sünger benzeri iskeleler üretilmiştir. Çalışmalarda, PEGDA çapraz bağlayıcı maddesi kullanılarak tiol ile modifiye edilmiş jelatin (Gtn-DTPH) ve HA-DTPH adlı enjekte edilebilir iskeleler üretilerek, bu iskelelerin hücrelerin tutunmasına ve yayılmasına uygun olduğu saptanmıştır (Şekil 2.5). Bu malzemelere endotelial hücreler biyoprinting yöntemiyle ekildiğinde hücre büyümesinin ve yeni damar oluşum hızının arttığı saptanmıştır. Ayrıca, tiol ile modifiye heparin (HP-DTPH) çaprazbağlı HA temelli yapı iskelelerde *in vitro* bFGF salınımı yarı ömrünün de arttığı saptanmıştır (Ducheyne et al. 2011).



**Şekil 2.5.** Sıçanda femoral hasar modeli. **A-** HA-DTPH ve jelatin-DTPH'nın PEGDA ile çapraz bağlanmış liyofilize sünger benzeri yapı iskeleleri **B-** İskelelerin SEM görüntüsü **C-** İskelenin hasarlı bölgeye transplantasyonu (Ducheyne et al. 2011)

Kök hücrelerin farklılaşmasının kontrolünde HA hidrojelleri kullanılmaktadır. Tiol ile çaprazbağlı HA jel veya benzer şekilde foto çapraz bağlama ile üretilen HA jel ile kök hücreler kapsüllenerek kök hücrelerin farklılaşma potansiyelleri incelenmiştir.

Fotopolimerize HA jeller ile MKH'lerin kondrositlere farklılaşmasının incelendiği bir çalışmada HA'in kıkırdak dokusunun doğal bir bileşeni olup, hücrelerin yüzey reseptörleri ile HA'leri algılaması ile farklılaşmanın olduğu düşünülmektedir.

Diğer bir araştırmada, HA jel üzerindeki MKH'lerin PEG hidrojelindeki MKH'lere göre kıkırdak hücrelerine özgü yüzey antijenlerini daha fazla ekprese ettiği görülmüştür. Bu çalışmayla sadece hidrojel kimyasının MKH farklılaşmasında rol aldığı ve HA'in kondrojenik yönde farklılaşmada önemli etkisinin olduğu anlaşılmıştır (Burdick and Prestwich, 2011).

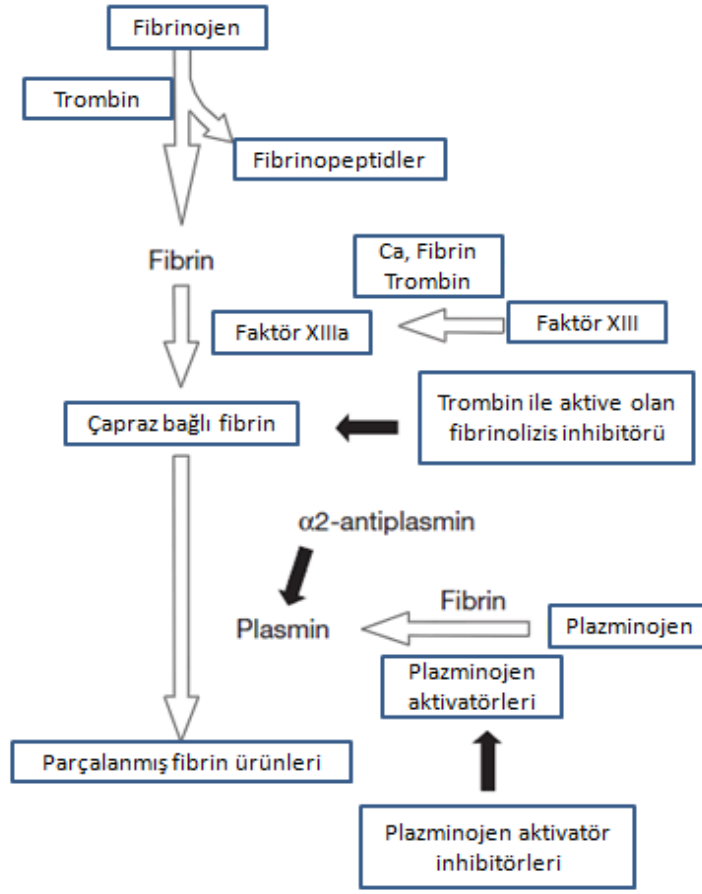
### 2.3.2 Fibrin

Biyoçözünebilen ve kan pıhtılaşmasının önemli bir bileşeni olan fibrin, trombin tarafından katalize edilen fibrinojen monomerlerin polimerizasyonu ile oluşturulur (Brouwers, 2002). 340 000 Da olan ve yaklaşık 45 nm uzunluğundaki fibrinojenin fibrine dönüşümü protrombinin aktivasyonu ile oluşan kan pıhtılaşması kaskatında yer alan serin proteaz olan trombin tarafından sağlanır (Şekil 2.6) (Ducheyne et al. 2011).

Fibrin jel yapımında önemli role sahip olan trombinin konsantrasyonu arttıkça jel daha saydam olmakta ve jelleşme süresi kısalmaktadır. Doğrusal olmayan yoğunlaşma polimerizasyonu ile meydana gelen polimerizasyon esnasında jelleşme noktası belirli bir zamanda meydana gelmektedir ve çözünen polimerler aniden elastik bir jel formuna dönüşürler (Blomb and Bark, 2004).

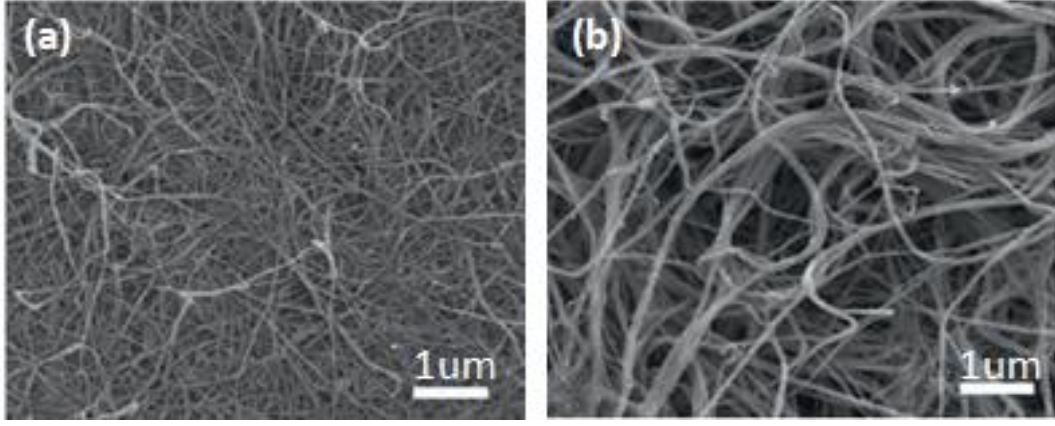
Polimerleşme, fiber oluşum hızı ve yapısını fibrinojen, trombin konsantrasyonu, iyonik kuvvetler, diğer plazma proteinlerinin varlığı (albumin gibi), pH ve sıcaklık gibi birçok faktör etkilemektedir. Örneğin farklı trombin konsantrasyonlarında hazırlanan fibrin pıhtıların yapıları kıyaslandığında, yüksek trombin içeren yapının daha ince fibril yapıları, daha az gözenekli ve daha fazla birleşim noktaları olduğu görülürken, az trombin konsantrasyonu içeren yapıda daha kalın fibrillerin olduğu görülmüştür (Şekil 2.6). Benzer olarak, tuz konsantrasyonunun artmasıyla daha az gözenekli, daha ince fibrilli ve daha fazla birleşim noktaları olan 'ince jel' olarak tanımlanan jeller oluşmaktadır. Tuz konsantrasyonu daha az olduğunda ise 'kaba jel' olarak tanımlanan daha gözenekli, büyük yarıçapa sahip fibrilleri bulunan jeller meydana gelmektedir. Faktör XIII'ün aktive olmasıyla fibrin monomerlerinin çapraz bağlandığı ve fibrin zincirleri arasında kovalent bağ oluşumunda katalizör görevi gördüğü saptanmış ancak gözeneklilik ve fibril kalınlığı üzerinde etkisi olmadığı belirtilmiştir. Ayrıca, fibronektinin gözeneklilik üzerinde etkisinin

olmadığı ama pıhtı içerisindeki fibril yarıçapını arttırdığı anlaşılmıştır (Ducheyne et al. 2011).



**Şekil 2.6.** Fibrin polimerizasyonu ve fibrinolizisin şematik gösterimi (Ducheyne et al. 2011).





**Şekil 2.7.** Farklı trombin konsantrasyonlarının fibrin pıhtı yapısına etkisi **A-25 IU/ml** trombin; **B-0.25 IU/ml** trombin. Fibrinojen konsantrasyonu: 5 mg/ml (Ducheyne et al. 2011).

Klinikte ameliyatlarda yapıştırıcı olarak uzun süredir kullanılan fibrin yapıştırıcı (fibrin glue) son zamanlarda hücre salınım sistemlerinde ve enjekte edilebilen yapı iskelesi uygulamalarında kullanılmaktadır. Fibrin yapıştırıcıdaki trombin konsantrasyonu (>100 U/ml ) artırılarak kısa sürede yapışabilen fibrin yapıştırıcılar üretilmektedir. Bu tip fibrin yapıştırıcılar doku mühendisliği uygulamaları ve hücre salınım sistemlerinde kullanılamamaktadır (Zhao et al. 2008).

Damar greftleri, kardiyovasküler, tendon, ligament, deri, karaciğer, kıkırdak, kemik ve sinir doku mühendisliği uygulamalarında fibrin jel yaygın olarak kullanılmaktadır. Biyouyumlu olması ve istenilen özelliklere sahip iskelenin üretim kolaylığı nedeniyle fibrin yapı iskeleleri başka polimerlerle kompozit oluşturacak şekilde yaygın olarak kullanılmaktadır. Yapılan bir çalışmada, sol ventrikül tamiri için, infarktüs oluşturulmuş domuz modeli kullanılarak, insan EKH kaynaklı vasküler hücreler (endotelial ve iskelet kası hücreleri) ile oluşturulan fibrin yamaları hayvanlara transplante edildiğinde, yeni damar oluşumunda artma, sol ventrikül kasılmasında gelişme, infarktüslü bölgenin boyutunda azalma olduğu saptanmıştır (Ducheyne et al. 2011).

Doku mühendisliğinde kullanılan diğer iskelelerle fibrin jeller kıyaslandığında, fibrin jellerin çözünme hızının kontrol edilebilmesi, doku gelişimine katkıda bulunması ve hastanın kanından üretildiği için bağışık red olasılığını ortadan kaldırması gibi avantajları vardır. Hücrelerin yapı iskelesi içerisinde homojen dağılımı doku mühendisliği uygulamalarında genellikle sorun olmaktadır. Bunun tersine fibrin jel içerisindeki hücreler için hücreler polimerizasyondan önce iyice karıştırılıp sonrasında birkaç dakika içerisinde jelleşme olacağı için hücrelerin homojen dağılımında sorun olmamaktadır. Üç mm'den az

kalınlıkta fibrin jeller üretildiği zaman difüzyon zorluğu nedeniyle oluşan yerel hücre ölümleri meydana gelmemektedir (Brouwers, 2002). Fibrin jellerin en önemli dezavantajı ise, mekanik özelliklerinin düşük olmasıdır (Çizelge 2.2)

**Çizelge 2.2.** Tek eksenli uzatma deneyi ile hesaplanan fibrin jel Young's modül değerleri (Brouwers, 2002).

<b>Fibrinojen konsantrasyonu (mg/ml)</b>	<b>Young's Modül (Pa)</b>
4	4722
8	5898
14	9584
18	9809
30	9995

### 2.3.3 Jelatin

'Dondurulmuş' veya 'kalınlaşmış' anlamına gelen Latince kelime 'gelatus'tan türetilen jelatin çeşitli aminoasitlerden oluşan suda çözünebilir, moleküler ağırlığı 15 000 ve 250 000 Da arasında değişen doğrusal bir polimerdir. Kollagenin hidrolizisiyle elde edilen jelatin üretim şekline göre iki farklı yolla üretilmektedir.

**Tip A jelatin:** (pH 3.8-6; izo-elektrik noktası 6-8) kollagenin hidrolizisi asidik koşullarda meydana gelir,

**Tip B jelatin:** (pH 5-7.4; izo-elektrik noktası 4.7-5.3) kollagene alkali koşullarda müdahale edilir (Lee et al. 2003).

Camsı, gevrek, katı, rengi sarı beyaz gibi kokusuz ve tatsız olan jelatin %84-90 protein, %1-2 mineral tuzları, %8-15 su içermektedir. Jelatin uzun zamandır gıda endüstrisinde saflaştırma ajanı, stabilizatör, tatlı, şeker, dondurma, fırın ürünlerinde ve günlük yiyeceklerde kullanılmaktadır. Ayrıca kozmetik, fotoğraf ve daha birçok endüstriyel uygulamalarda jelatin yaygın olarak kullanılmaktadır (Boudet et al. 2005).

Memelilerde bağ dokusunun önemli bileşenlerinden olan kollagen karakteristik olarak jelatinden daha fazla miktarda glisin, prolin ve hidroksiprolin aminoasitlerini

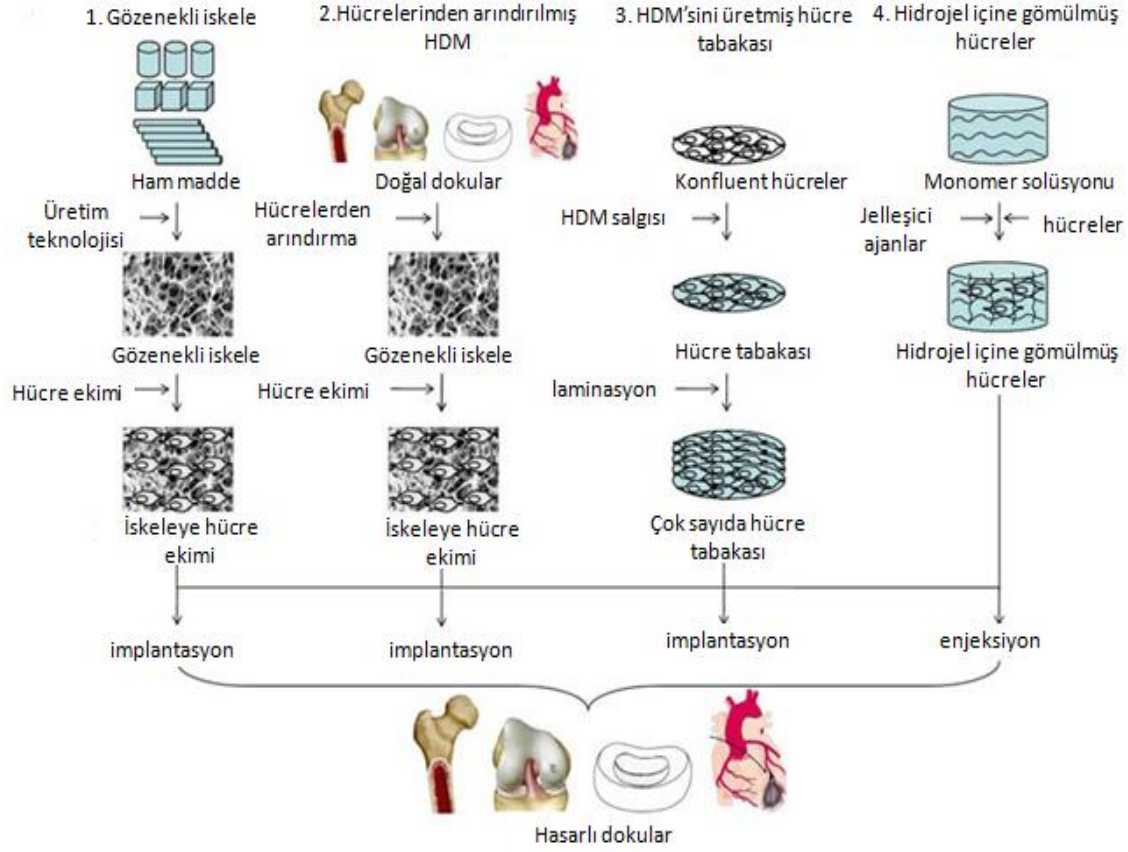
içermektedir. Yapısal olarak jelatin molekülü glisin-X-Y üçlü dizinin tekrarıyla oluşmaktadır ve genellikle X ve Y prolin ve hidroksiprolindir. Bu diziler jelatinin üçlü helikal yapısının oluşumundan sorumludur ve jelatinin protein zincirleri suyu hareketsizleştirerek bu helikal yapılardan jel oluşumu meydana gelmektedir. Ayrıca, kollagen transplantasyonu ile fizyolojik koşullarda bağışık red oluşabilirken, jelatin transplantasyonu ile bağışık red reaksiyonu minimum seviyede meydana gelmektedir. Bunun yanında doğal kollajenden yoğunlaştırılmış kollagen eldesi oldukça zor ve jelatin kollajenden daha ucuz olduğu için jelatinin kullanımı daha yaygındır (Rosellini et al. 2009).

## 2.4.YAPI İSKELELERİ

Yapı iskelesi tasarımı ve üretimi biyomalzeme araştırmalarının önemli araştırma alanlarından olup doku mühendisliği ve yenileyici tıp araştırmalarında önemli bir konuma sahiptir. Doku yenilenmesi ve tamirinde eşsiz bir rol oynayan iskeleler aşağıda sıralanan fonksiyonları yerine getirmek üzere üç boyutlu, gözenekli katı biyomalzemeler olarak tanımlanmaktadır (Yoshida et al. 2011):

- Kullanılan biyomalzeme hücre tutunmasına ve HDM üretimine teşvik etmelidir,
- Hücre canlılığı, çoğalması ve farklılaşmasına izin verecek şekilde gazların, besiyerinin ve düzenleyici faktörlerin taşınımı sağlanmalıdır,
- İlgili kültür koşullarında doku yenilenme hızı biyoçözünme ile kontrol altına alınabilmelidir,
- *In vivo* koşullarda toksisite ve iltihap seviyesi minimum olmalıdır.

Çeşitli iskele yapım teknikleri bulunmaktadır ve bu iskeleler doku mühendisliğinde birçok farklı strateji ile uygulanmaktadır (Şekil 2.8).



**Şekil 2.8.** Doku mühendisliğinde kullanılan iskele üretimi yaklaşımları (Chan and Leong, 2008)

### 2.4.1. Hidrojeller

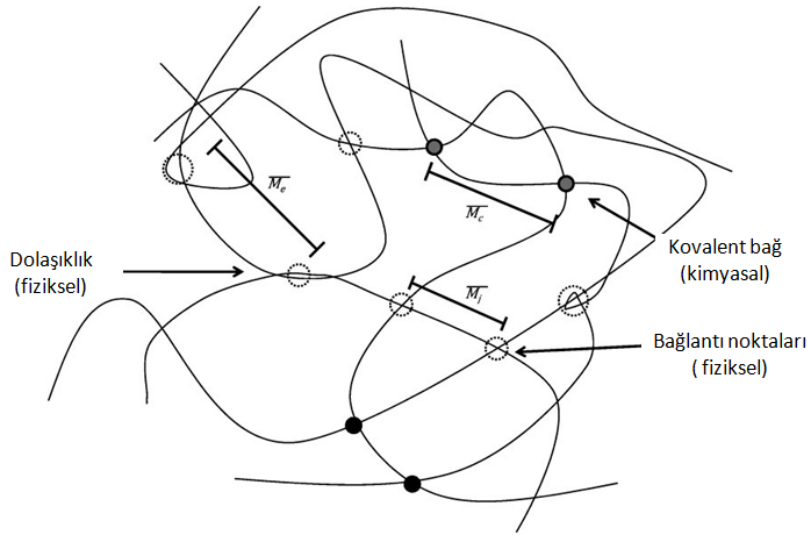
Suda çözünebilen polimerlerin çapraz bağlanmasıyla oluşan ve karboksil, amino ve hidroksil gibi hidrofilik gruplara sahip olan hidrojeller, gözenekli yapısı içerisinde su tutma kapasitesine sahiptir. Hidrojeller yaygın bir şekilde klinikte, hüresel immobilizasyon çalışmalarında, biyomolekülleri veya hücreleri ayırma işlemlerinde ve biyolojik yapışmayı düzenlemede bariyer malzemesi olarak birçok deneysel araştırmalarda kullanılmaktadır (Peppas et al. 2000).

İlaç salınımı çalışmalarında fiziksel özelliklerinden dolayı yaygın olarak kullanılan bu yapılar istenilen boyutta gözenekli yapıda üretilebilmekte ve sulu ortamdaki şişme özelliği jel içerisindeki çapraz bağlayıcı ajanların yoğunluğu ile kontrol edilebilmektedir. Hidrojeller oldukça biyoyumlu, yüksek su içeriğine sahip, fizikokimyasal özellikleri doğal HDM'e benzer yapılardır (Peppas et al. 2000) (Şekil 2.9). Ancak, hidrojellerin düşük gerilme mukavemeti, yüksek su içeriği ve büyük gözenek boyutu gibi özellikleri bu yapılar

ile yapılan çalışmaları sınırlamaktadır. Yüksek emme gücüne sahip yapay polimerlerden üretilen hidrojellerle ilgili birkaç sorun olmasına rağmen, birçok uygulamada destek materyali olarak kullanılarak sorunlar önemsiz hal almaktadır. Hidrojeller doğal olarak sümük, göz kırırdağının vitröz dokusu, tendon ve kan pıhtısında yer almaktadır (Peppas et al. 2000).

Hidrojellerin yüksek su içeriği, yumuşaklığı, esnek yapı ve su veya biyolojik sıvılar ile düşük arayüzey gerilimi oluşturması gibi özellikleri canlı dokularıyla büyük oranda benzerlik göstermektedir. Hidrojellerden salınım hızı ve salınım mekanizmasının kontrolünü polimer yapı bileşimi, çapraz bağlanma yoğunluğu, kristalinite ve su içeriği etkilemektedir (Satish et al. 2006).

Üç boyutlu kimyasal veya fiziksel olarak çapraz bağlanmış hidrofilik zincirlerin ağ yapısından oluşan jelin şişme veya emme işlemi için gerekli itici güç genellikle ozmotik güç, elektrostatik kuvvet ve entropi (su içerisinde polimerin çözünmesinin gözetilmesine bağlı olarak) ile sağlanmaktadır. Çapraz bağ sayısı fazla olan hidrojeller daha az sayıda çapraz bağ içeren jellere göre daha hızlı şişmektedir (Klattenhoff et al. 2006). Çapraz bağlanma yoğunluğu, iyonik ve hidrofilik içerik hidrojellerdeki şişme sürecini etkileyen önemli faktörlerdir.

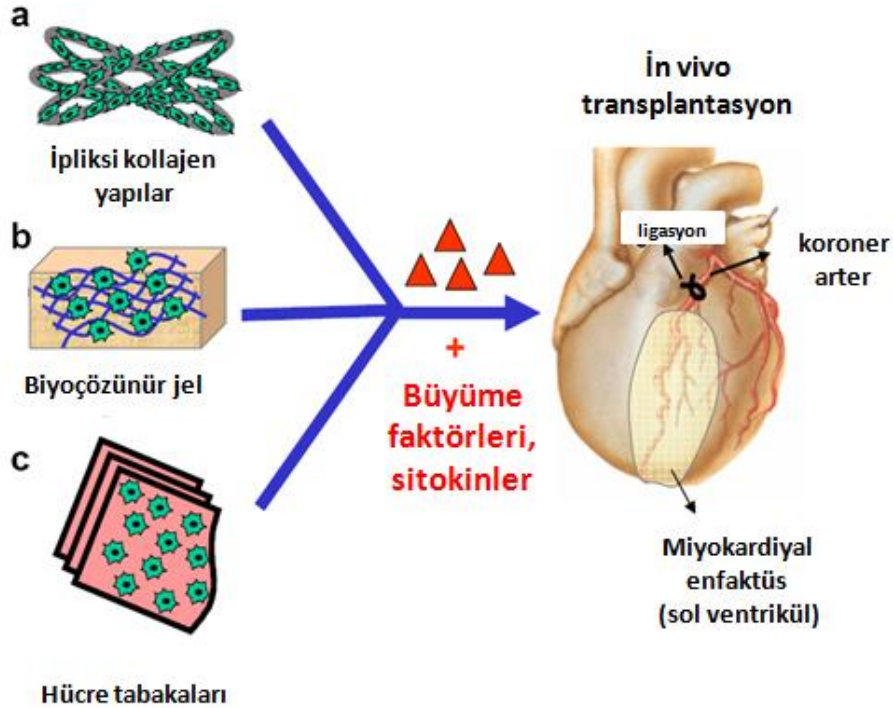


**Şekil 2.9.** Hidrojellerdeki kovalent bağ, bağlantı noktaları ve dolaşıklıkları gösteren ağ yapısı. Tüm bağlantı noktaları gösterilmemiştir (Slaughter et al. 2009)

## 2.5. KALP KASI DOKU MÜHENDİSLİĞİ

Kalp kası doku mühendisliği uygulamaları için *in vitro* koşullarda biyomalzemeler üzerine kardiyomiyositlerin ekilmesiyle oluşturulan ‘yama’ların alıcıya naklini içeren süreçler denenmektedir. Bunun dışında, ‘yapı iskelesi’ üretimi ile ilgili çalışmalar da yaygın olarak bulunmaktadır (Codina et al. 2010). Hasarlı miyokardiyumun tamiri için, doku mühendisliği uygulamaları ile hücre enjeksiyon yöntemleri kıyaslandığında; doku mühendisliği uygulamalarında hücre kaybında azalma ve fonksiyonel kas yamalarında kardiyomiyositlerin organize olabilmeleri avantaj olarak saptanmıştır (Chachques et al. 2008).

Doku mühendisliği ürünü biyomalzemeler memeli kalbine uygulandıklarında bazı başarılı sonuçlar elde edilmiştir (Şekil 2.10). Ancak bu başarılı sonuçların yanında, kalp kası doku mühendisliği çalışmalarında yapı iskelesi tasarımının zorluğu, damarlaşma, yama ile kalbin işlevsel birleşmemesi gibi sorunlar da bulunmaktadır.



Şekil 2.10. Kalp kası doku mühendisliğinde günümüzde kullanılan ana stratejiler (Zammaretti and Jaconi, 2004).

### **2.5.1 Kalp Hastalıkları ve Hücresel Tedavi**

MI, kardiyomiyositlerin kaybıyla meydana gelen ölümlerin en önemli nedenlerinden biridir. Miyokardiyal hasar sonrasında skar doku oluşumu gözlenir ve ardından kalp yetmezliğine neden olabilen doku hipertrofisi izlenir. Şiddetli kalp yetmezliği olan hastalar için kalp nakli tek seçenek olabilmektedir. Kardiyomiyosit kaybı ile ilgili hastalık ve ölüm oranları incelendiğinde, transplantasyon için verici kalplerin yetersizliği hücresel tedavi seçeneklerinin gelişmesine olanak sağlamaktadır. Hücre replasman tedavisinin hasarlı bölgede hipertrofiyi önleyerek tekrar kas yapısını meydana getireceği ve kalp kası fonksiyonlarını arttıracığı düşünülmektedir (Mummery et al. 2010).

### **2.5.2 Kalp Rejenerasyonunda Kullanılan Hücre Çeşitleri**

Hasarlı kalp kasının rejenerasyonu için model olabilecek birçok farklı hücre tipi araştırılmaktadır. Bunlara iskelet kası miyoblast hücresi, kemik iliği kaynaklı multipotent öncül hücresi, embriyonik ve neonatal kardiyomiyosit, erişkin kalp öncül hücresi, indüklenmiş pluripotent kök hücre (iPKH), tekrar programlanmış somatik hücre ve EKH'ler örnek verilebilir (Vunjak-Novakovic et al. 2010).

#### **2.5.2.1. İskelet kası kök hücreleri (çizgili kas öncül hücreleri)**

İskelet kası kök hücreleri doğum sonrasında iskelet kaslarının büyüme, tamir ve onarımında görev almaktadır (Chen and Goldhamer, 2003). Hasta transplantasyonlarında ilk uygulanan hücre çeşidi olan iskelet kası kök hücreleri aritmiye sebep olduğu için diğer kök hücreler üzerinde çalışmalar başlamıştır (Zhaoyang et al. 2011).

#### **2.5.2.2. Erişkin kemik iliği kaynaklı kök hücreler ve AD-MKH'ler**

Heterojen yapıda olan kemik iliği kaynaklı hücreler %99'dan fazla farklılaşmış hücre barındırırlar. Az miktarda ise progenitor hücre, hemotopoitik kök hücre (HKH), MKH ve endotelial öncül hücre (EÖH) içerirler (Zhaoyang et al. 2011). EÖH'ler kan damarlarının iç yüzeyini oluşturan endotelial hücrelere ve birkaç sınırlı yayında belirtildiği gibi kardiyomiyositlere farklılaşabilmektedir (Badorff et al. 2003, Condorelli et al. 2001).

Bazı yayınlara göre HKH'ler kalp kası yenilenmesinde rol almaktadır (Orlic et al. 2001) ancak *in vivo* ve *in vitro* testlerde HKH'lerin kardiyomyosit fenotipine dönüşmesinin sınırlı olduğu belirtilmektedir (Murry et al. 2004).

Otolog transplantasyonlarda kullanılabilmeleri, kolay izole edilebilmeleri ve kültürde kolayca yayılabilmeleri MKH'lerin en önemli avantajlarıdır. Adipoz dokusu ise adipositlerden oluşur ancak endotelyal, çizgili kas hücreleri ve kök hücrelerden oluşan stromal vasküler bir hücre topluluğu da içermektedir (Zuk et al. 2001). Adipoz dokudan izole edilen MKH benzeri hücrelerin kardiyomyositlere farklılaşabildikleri ve adipoz kaynaklı kardiyomyositlerin infarktüsle fare kalbine transplantasyonu yapıldığında kalp kası tamirine katkıda buldukları bildirilmiştir. Hücre transplantasyonunda AD-MKH kullanımının en önemli avantajı ise, adipoz alımı operasyonu (liposuction) ile hastanın kendi adipoz dokusunun kullanılabilmesidir (Palpant and Metzger, 2010).

Kemik iliği kaynaklı MKH'ler Akt, eNOS, Sfrp2 gibi faktörleri salgılayarak kardiyomyositleri apoptozise karşı korumaktadır. Lin-c-kit hücreleri ile Akt faktörünün MI'lı modellerde kalp kası fonksiyonel gelişimine katkı sağladığı anlaşılmıştır (Zhaoyang et al. 2011).

### **2.5.2.3. Fetal kardiyomyositler**

Kültüre edilen fetal kardiyomyositler *in vitro* yayılma ve çoğalma potansiyellerinin düşük olması nedeniyle ve insan kalbi için yeterli sayıda hücre sağlayamadıklarından dolayı uygun bir kaynak değildir. Ancak, *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar için uygun pozitif kontrol hücre kaynağıdır (Porrello et al. 2011).

### **2.5.2.4. Kalp kök hücreleri**

Sca-1, c-kit ve Isl-1 yüzey antijenlerini eksprese eden kalp kök hücreleri miyokardiyal rejenerasyon yapabilmekte, kalp kası fonksiyonlarını arttırmakta ve büyük kan damarları oluşturabilmektedir (Zhaoyang et al. 2011). GATA4 pozitif hücre popülasyonlarının kalp tamirinde rol aldığı ve bu hücrelerin erişkin kalp epikardiyumunda varlığı saptanmıştır. Kalp kök hücrelerinin dezavantajı ise verici kalpten yeterli miktarda hücre elde edilememesidir (Vieira and Riley, 2010).



### **2.5.2.5. Embriyonik kök hücreler ve indüklenmiş pluripotent kök hücreler (iPKH)**

EKH kaynaklı kardiyomyositlerin yapısal ve fonksiyonel özellikleri embriyonik kardiyomyositlere benzerdir (Kehat et al. 2001).

Doku tamiri ve üretimi ile ilgili çalışmalarda fazla sayıda hücreye ihtiyaç duyulması nedeniyle EKH'lerin yüksek çoğalma kapasitesine sahip olması bu hücrelerin avantajlarından biridir. Hayvan modellerinde EKH kaynaklı kardiyomyositlerin konak kalbini ile kaynaştığı ve yenilenmeyi indüklediği saptanmıştır. EKH'den embriyoid cisimcik oluşturulduktan sonra spontan olarak hücrelerin bir kısmında farklılaşma olduğu görülmektedir (Kehat et al. 2001).

iPKH'ler EKH benzeri Oct4, Sox2, c-Myc, Klf4 gibi yüzey antijenlerini ekspres eden miyokardiyal rejenerasyonda umut vaat edici hücrelerdir. EKH'ler gibi etik sorunları olmaması ve kişiye özel üretilebilmesi avantajları arasındadır (Zhaoyang et al. 2011). İnsan iPKH kaynaklı kardiyomyositler EKH-kaynaklı kardiyomyositler ile benzer fenotipik özellikler göstermektedirler. Ancak, iPKH'ler kalp kası tedavilerinde sadece otolog transplantasyonlar ile kullanılabilir (Yokoo et al. 2009). EKH'ler gibi teratoma oluşumu riski bulunmaktadır (Kooreman and Wu, 2010).

### **2.5.3 Kalbin Embriyolojik Gelişimi**

Embriyoda ilk biçim bulan organ kalptir. Blastosit evresindeki iç hücre kitlesindeki hücreler pluripotentir ve bütün hücre tiplerine farklılaşma potansiyeline sahiptirler. Gastrulasyon başlangıcı ile, ilkel bir çizgi halinde mezoderm oluşur ve hücreler hızla farklı hücre biçimlerine dönüşürler. Hücrelerin ilkel çizginin posterior bölgesinden mezodermde hilal şeklindeki kardiyojenik bölgeye göçü ile kalbin embriyolojik gelişimi başlar (Tam et al. 1997).

Moleküler düzeyde Nanog ve Sox2 gibi pluripotensiyle ilgili genler, iç hücre kitlesindeki hücrelerde eksprese edilmektedir. Miyogenezis ektoderm, endoderm ve nöral tüpten gönderilen Activin/Nodal/TGF- $\beta$ , Wnt, ve BMP sinyal yollarındaki hücre dışı sinyallerle düzenlenmektedir. Nkx2.5 ve T-box protein Tbx5 kalp kası farklılaşmasında en erken ortaya çıkan antijenler olup, myocyte enhancer factor 2 (MEF2) ailesine ait

transkripsiyon faktörleri kalp kası farklılaşmasını sağlayan genlerin açılmasında anahtar rol oynamaktadırlar. Kalple ilgili Nkx 2.5 ve GATA4 gibi birkaç transkripsiyon faktörü aktive olmaktadır. Kalbe özgü olan MEF2C, kardiyak *a*-aktin, atriyal natriüretik peptid (ANP) ve miyozin ağır zincir (MHC) antijeninin izoformları kardiyomiyosit gelişiminde ve kardiyomiyosit yapısının oluşumunda önemli transkripsiyonel düzenleyicilerdir (Bongso and Lee, 2005).

#### **2.5.4 Kalp Kası Doku Mühendisliği İçin İskele Tasarımı**

İdeal kalp kası yaması kalp kasılmasıyla meydana gelebilecek zarara direnecek kadar güçlü olmalı, ayrıca gözenekli yapısı kan damarlarının içine girmesine, besiyerinin ve büyüme faktörlerinin difüzyonuna, hücrelerin birleşmesine izin vermelidir (Vunjak Novakovic et al. 2010). Mekanik mukavemeti kalbin kasılmasına izin verecek yeterli elastikiyette olan iskele tamir işlemi bitinceye kadar çözünmemeli ve biyouyumlu olmalıdır. Doğal veya yapay malzemelerden yapılabilen iskeleler hücre büyümesi ve gelişmesini kontrol edebilecek özel biyokimyasal bölgeler içermelidir. Yapay malzemelerin kullanıldığı yapay iskeleler dayanıklılık, elastiklik ve biyoçözünme gibi özellikleri kontrol altına alınabildiği için avantajlıdır. Ancak, yapay iskelelerin hücrelerle fonksiyonel etkileşime girmeleri zordur ve endojen koşulları taklit etmek için müdahalelere gereksinim duyarlar (Marsano et al. 2010). Doğal polimerler ve HDM proteinleri kullanılarak üretilen biyolojik temelli iskeleler kardiyomiyositlerin doğal çevresini taklit etmek amacıyla kullanılır. Bu iskelelerin yapay iskelelere göre kimyasal ve mekanik özelliklerinin kontrolü zor ve bu iskeleler işlevsel özelliklerini daha kolay kaybedebilmektedir. Bunun yanında, ksenoprotein kullanıldığında patojen geçişi olasılığı bulunmaktadır (Çizelge 2.3) (Schussler et al. 2010).

*In vitro* kalp kası doku mühendisliğinde en önemli konu kök hücrelerin etkili ve kontrollü şekilde kalp kası hücrelerine farklılaşabilmeleridir. Üç boyutlu hidrojel sistemleri kök hücrelerin kalp kası hücrelerine farklılaşmasında ve *in vitro* hücre yayılımında (büyümesinde) avantajlı kültür sistemleridir. Yapılan bir çalışmada, iskelet kası kaynaklı kök hücreler kollagen jel içine enkapsüle edilerek hücre-hücre etkileşimi sağlanıp, kardiyomiyosit gen ekspresyonlarından konneksin 43 ve kardiyak troponin T'nin arttığı görülmüştür. Aynı jel sistemine kasılmayı sağlayıcı güç verilerek, hücre içi kalsiyum iyonu geçişi ile çalışma yine yapılmış ve kök hücrelerin kardiyomiyositlere optimum şekilde

farklılaşmasını hidrojinin hem kimyasal hem de fiziksel özelliklerinin etkilediği saptanmıştır (Zhaoyang et al. 2011).

**Çizelge 2.3.** Kalp doku mühendisliğinde yaygın olarak kullanılan hidrojel (Li and Guan, 2011)

<b>Kategorisi</b>	<b>İsmi</b>	<b>Avantajları</b>	<b>Dezavantajları</b>
<b>Doğal malzemeler</b>	Kollagen ve deselüler HDM	Biyouyumlu, biyoçözünür	Zayıf mekanik özellik, bağışık red, yavaş jelleşme
	Fibrin jel	Biyouyumlu, biyoçözünür, kullanıma uygun	<i>İn vivo</i> koşullarda yavaş jelleşme ve hızlı çözünme
	Matrijel	Doğal HDM yapısına benzerlik	Kanserojen olma riski
<b>Yapay malzemeler</b>	Polietilen glikol (PEG)	Biyoinert, biyouyumlu, FDA onaylı	Hücre tutunma oranı düşük, enjekte edilemez, çapraz bağlayıcı ajanlardan dolayı toksik olma riski, çözünememe
	Polihidroksietil metakrilat (PHEMA)	Biyouyumlu ve işlevsellik için müsait	Mekanik özellik uygunsuzluğu, çözünememe
	Poliamidler	Hızlı jelleşme, enjekte edilebilme, kimyasal modifikasyonlara uygunluk	Saf poliamidler çözünemezler ve elastik değildirler.

## 2.5.5. Kalp Kası Onarımı İçin Yenileyici Tedavide Hidrojel Kullanımı

### **Hücresiz hidrojel materyalinin direk verilmesi:**

Hücresiz hidrojeller hasarlı kalbe transplante edildiğinde, kalbe mekanik destek sağlamaktadır. Hidrojel yapımında kullanılan ticari bir ürün olan fibrin glue hasarlı sıçan kalbine enjekte edildiğinde ise kalp duvar kalınlığının, kardiyak fonksiyonlarının korunduğu ve mikrodamar oluşumunu indüklediği görülmüştür. Kalsiyum iyonu ile çapraz bağlanan aljinat polisakkariti kullanılarak, arjinin-glisin-aspartik asit (RGD) sekansına sahip aljinat hidrojeller kronik iskemili rodentlerde sol ventrikül (LV) fonksiyonunu arttırıp, anjiyogenezi indüklemiştir. Sadece HA hidrojelci sıçan MI modeline verilip 4 hafta sonra sıçan kalbi incelendiğinde, kalp kası yapısının yenilendiği, fibröz doku oluşumu olduğu ve önemli derecede kalp kası fonksiyonlarında iyileşme olduğu saptanmıştır (Zhaoyang et al. 2011).

### **Hidrojellerle kontrollü ilaç salınımı:**

Büyüme faktörleri ve sitokinler sadece hasarlı kalpteki iskemik mikroçevreyi düzenlemiyor, ayrıca hücrenin bölgede kalmasını, canlılığı, büyümesi ve farklılaşmasını da indüklüyor. Hidrojel sistemleri ise bu biyofaktörlerin kontrollü şekilde salınmasını sağlamaktadır (Zhaoyang et al. 2011).

Jelatin hidrojel mikrosferleri içerisine anjiyogenezi önemli rol oynayan bFGF koyularak hasarlı sıçan ve domuz kalbine verildiğinde, bu mikrosferlerin anjiyogenezi indüklediği, LV sistolik ve diastolik kan basıncında artışa neden olduğu saptanmıştır (Zhaoyang et al. 2011).

Hidrojeller ile eritropoetinin salınımı yapılan sıçan MI modelinde, hücre apoptozisinin durduğu, yeni damar oluşumunun arttığı, hasarlı bölgenin azaldığı ve kalp kası fonksiyonlarının geliştiği görülmüştür (Zhaoyang et al. 2011).

## **Hidrojellerle hücre salınımı:**

Kalp kası yenileyici tedavi stratejilerinde hidrojeller hücre salınım uygulamalarında sıkça kullanılmakta ve niş benzeri mikroçevre oluşturularak kök hücreler hidrojel içerisinde tutuklanmaktadır.

Kalp kası doku mühendisliğinde PEG ve fibrinojen veya fibrinojen ve trombin ile birçok farklı malzemeleri içeren hidrojel sistemleri oluşturulmaktadır. Yapılan bir çalışma da HGF kovalent olarak PEG fibrin hidrojeline tutturularak içerisinde fare kemik iliği kaynaklı MKH bulunan jeller üretilmiştir. Bu sistemin hasarlı kalpte hücre apoptozunu inhibe ettiği, doku fibrozisinin oluştuğu ve kalp kasında fonksiyonel gelişme olduğu görülmüştür (Zhaoyang et al. 2011).

## **2. 6. ADİPOZ DOKU MÜHENDİSLİĞİ**

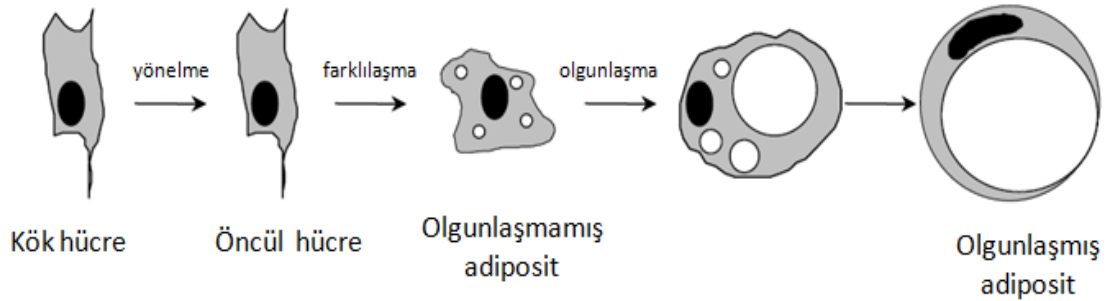
### **2.6.1. Adipoz Dokusu ve Adipoz Kök hücreleri**

Adipoz dokusu büyümesi (obezitenin normal gelişimi sırasında görülen) enerji depolamaktan ve leptin salgılamaktan sorumlu olan adipositlerin hem hipertrofi (boyutta büyüme) hemde hiperplazi (sayıca artış) meydana gelmesinden kaynaklanmaktadır. Hipertrofi oluşumunda adipositler büyümezler ve lipit olarak birikim yaparlar, hiperplazi da ise kök hücre veya prekürsör (öncül) hücrelerden yeni adipositlerin oluşumu görülmektedir ( Novakofski, 2004).

Adipoz dokusu kolay elde edilebilir ve *in vitro* kontrollü şartlar altında mezodermal ve ektodermal kökenli hücrelere farklılaşabilmektedir. Bu hücreler AKH veya adipoz kaynaklı erişkin stromal hücreler olarak adlandırılmakta ve hücre yüzey antijen profilleri ve farklılaşma karakteristikleri diğer erişkin kök hücreler (kemik iliği kaynaklı MKH) ile benzerlik göstermektedir. Bu hücre tiplerinin avantajı normal insan yağ dokusunda sık bulunması ve standart lipoaspirat prosedürü ile kolayca elde edilebilmesidir (Guilak and Awad, 2004).

## 2.6.2. Adipojenezis

Adipositlerin mezenkimal öncül hücrelerin farklılaşmasıyla oluştuğu düşünülmektedir (Şekil 2.11). Bu multipotent öncül hücreler kondrojenik, osteojenik ve adipojenik farklılaşabilir ve sonrasında adipojenik farklılaşmaya yönlendirdiğimiz preadipositler meydana gelir. Ardından bu hücreler çevresel etkiler ile olgun adipositlere dönüşür. Preadiposit hücre hatları ile çalışılarak adipojenezisin moleküler mekanizması anlaşılmaya çalışılmakta ve adiposit farklılaşması esnasında yapısal ve fonksiyonel yapı oluşumunda 300'den fazla protein yer aldığı saptanmıştır (Smas and Sul, 1995).



Şekil 2.11. Kök hücreden adiposit farklılaşmasının aşamaları (Gregoire et al. 1988)

## 2.6.4. Adipoz Dokusu Tamiri İçin Kullanılan Stratejiler

Rekonstruktif ve plastik cerrahide, her bireyin kendi adipoz dokusundan elde edilen greftler yumuşak doku kusurlarının onarılması için dolgu materyali olarak kullanılmaktadır. Yumuşak doku tamirlerinde kullanılan otolog adipoz greftlerinin transplantasyonu ile yetersiz sayıda yeni damar oluşumu meydana geldiği için verilen dokuların etkinliği azalmaktadır. Adipoz greftinin tekrar büzülmesi ile yine cerrahi müdahale gerek olabilirken bazı durumlarda otogreftler verildiği bölgede skar doku oluşarak, verici nedenli hastalıklara neden olabilmektedir.

Diğer bir yaklaşım ise çeşitli aspirasyon teknikleri ile olgun adiposit süspansiyonlarının enjeksiyon ile verilmesidir. Bu yöntem uygun değildir, çünkü

adipositlerin yaklaşık %90'ı lipoaspirasyon işlemi esnasında mekanik kuvvetlerin etkisiyle kırılğan oldukları için zarar görmektedirler.

Yumuşak dokulara dolgu materyalinin verilmesi konusundaki diğér bir yaklaşım ise alloplastik ve alojenik ürünler olan teflon, silikon implantlar ve sığır kollajeni gibi yapıların kullanılmasıdır. Deri allogrefti olarak otolog enjekte edilebilir kollajen son zamanlarda sıklıkla kullanılmaktadır.

Her bir yöntemin yabancı vücut reaksiyonları, alerjik reaksiyonlar ve enfeksiyon gibi sakınca ve engelleri bulunmaktadır. Tüm bu nedenlerden dolayı doku mühendisliği, adipoz dokusu yenilenmesi ve dolgu materyali olarak kullanılacak malzemelerin uygulanması için alternatif tekniklerden biridir (Ducheyne et al. 2011).

### **2.6.3. Adipoz Dokusu Mühendisliğinde Kullanılan Yapı iskeleleri**

Üç boyutlu doku benzeri yapılar üretebilmek için dokuya özgü iskeleler ve sinyal sistemleri kullanılarak kök hücreler adipoz hücrelerine farklılaştırılmakta veya adipoz dokusu ile ilgili kusurların tedavisi için üç boyutlu iskeleler üzerine adipoz dokusundan izole edilen erişkin kök hücreler ekilerek implante edilebilir yapıların üretilmesi istenmektedir. Rekonstruktif ve plastik cerrahi de doku mühendisliği ürünü adipoz doku tabakası derialtına verilerek dokunun hacmi arttırılabilmektedir. Ayrıca yeni üretilen doku benzeri yapıda hücreler HDM üretebilmeli ve uzun süre dokunun tamirinde rol almalıdır. Yapay HDM yani iskele hücre tutunmasına, göçüne, çoğalmasına elverişli olmalı ve transplante edilen dokunun yenilenmesine katkıda bulunmalıdır (Vats et al. 2003). Adipoz doku mühendisliğinde birçok biyomalzeme kullanılmaktadır (Çizelge 2.4).

**Çizelge 2.4.** Adipoz doku mühendisliğinde son zamanlarda kullanılan biyomalzemeler (Vats et al. 2003)

<b>Biyomalzeme çeşitleri</b>	<b>Özellikleri</b>
Kollagen mikro boncuklar	Enjekte edilebilecek kadar küçük partiküller üzerinde kök hücrelerin çoğalması ve farklılaşması sağlanmıştır.
Tip I kollagen iskele	Mükemmel hücre sel uyumluluk ve <i>in vivo</i> hasarlı doku tamiri yapılabilmektedir.
Hyaluronik asit temelli sünger benzeri iskele	Kararlı hücre taşıyıcısı ve doku hacminin korunmasında etkindir.
Hücrelerinden arındırılmış yapı (PDM) ve çapraz bağlı hyaluronan (XLHA) iskeleler	Hücre çoğalmasını ve canlılığını arttırmaktadır. Yapışmayan XLHA ile enkapsüle edilen hücrelerde farklılaşma artmıştır.
Enjekte edilebilir poly (laktik ko-glikolik asit) (PLGA) küreler	Yayılmayan yumuşak doku dolguları üretilerek, <i>in vivo</i> koşullarda 8 hafta sonra adipoz dokusu oluşumu gözlenmiştir.
İpek fibroin-kitosan iskeleler	Yara iyileşmesini hızlandırmış ve tamir edilecek dokuda fibrovasküler, endotel ve epitel farklılaşma görülmüştür.



### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. İnsan Lipoaspirat Materyalinden AD-MKH İzolasyonu

Kocaeli Üniversitesi İnsan Araştırmaları Etik Kurulu'ndan alınan izinle, bilgilendirme ve onam formlarının vericiye imzalatılması sonrası adipoz aldırma ameliyatı olan hastaların lipoaspirat materyali KÖGEM'e getirildi. Getirilene kadar steril koşullarda muafaza edilmeye çalışılan lipoaspirattan adipoz parçacıklarının bulunduğu üst kısım pipet ile toplandı. Aşağı kısımda kanlı yıkama sıvısı bulunmaktadır ve AD-MKH'ler yüksek oranda adipoz parçacıkları bulunan üst kısımdan izole edilmektedir. %0.1'lik kollegenaz tip I (Gibco) HBSS içerisinde hazırlandı. Adipoz parçacıkları hücrelerin dokudan enzimatik yolla ayrılması için 37 °C deki su banyosunda %0.1'lik kollegenaz solüsyonunda 60 dk bekletildi. Su banyosundan alınan hücreli solüsyon 1500 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatantı atılıp, pellet resuspanse edilerek 2 defa PBS ile 1800 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek yıkama yapıldı. Süpernatant atılıp, üzerine 1 ml besiyeri koyularak hücrelerle besiyeri karıştırılıp, sonrasında besiyeri ile hücreli solüsyon 5 ml'ye tamamlandı. Hücre ve küçük doku parçacıkları içeren besiyeri 100 µm'lik süzgeçten geçirilmiş ve T25 hücre kültür flasklarına aktarıldı. Besiyeri olarak DMEM/F12, %10 Fetal Sığır Serumu (FBS) (Gibco), %1 L-glutamin, 1ng/ml bFGF kullanıldı.

Deneme amaçlı alt kısımdaki kanlı örnekten de izolasyon yapıldı. Bu kan örneği 1500 rpm de 10 dk santrifüj edilerek, pellet 1 ml besiyeri ile resuspanse edilip, T75 hücre kültür flasklarına ekimi yapıldı.

Günlük gözlemleri yapılan bu hücrelerin besiyeri değişimiyle eritrosit ve diğer hücrelerden arındığı görülürken, MKH'lerin flaska tutunduğu gözlemlendi. Flask yüzeyinin yaklaşık %70'i hücrelerle kaplandığı zaman, pasajlama işlemi yapıldı. Monolayer karakterde olan kök hücreler yüzeye tutunduğu için besiyeri atıldıktan sonra hücreler PBS'le yıkandı. Sonrasında hücreleri yüzeyden kaldırmak amacıyla, hücrelerin üzerine %0.25 tripsin-EDTA (Gibco) solüsyonu uygulandı ve 5 dakika %5 CO<sub>2</sub>'li 37°C inkübatörde inkübe edildi. Yüzeyden kaldırılan hücreler 1:3 pasaj oranında pasajlandı. Her bir pasajlama esnasında hücrelerden en az 2 kriyovial dondurularak, çalışmalarda kullanılmak üzere stok yapıldı.

### 3.2. Adipoz Kaynaklı MKH'lerin Karakterizasyonu

Hücreler üçüncü pasaja geldiklerinde akım sitometri cihazı (BD Biosciences FACSCalibur) ile CellQuest yazılımı (BD Pharmingen) kullanılarak yüzey antijenleri (CD13, CD29, CD44, CD90, CD146, CD166, HLA ABC, CD3, CD8, CD11b, CD14, CD15, CD19, CD33, CD34, CD45, CD117 ve HLA-DR) bakımından karakterize edildi.

Eş zamanlı olarak MKH'ler  $6 \times 10^4$  hücre/kuyucuk olacak şekilde 6 kuyucuklu plakalara ekildi. Ekilen hücreler adipojenik ve osteojenik farklılaşmaya alındı. Adipoz hücrelerine farklılaştırmak için %10 FBS, 200  $\mu$ M indometacin, 10 $\mu$ g/mL insülin, 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX),  $10^{-6}$ M deksametazon ve %0.1 primosin (Invivogen) içeren Minimum Essential Medium (MEM) (Gibco) besiyortamı ile fibronektin kaplı cam slaytlara ekilen hücreler 2 hafta boyunca kültüre edildi. Kontrol olarak, fibronektin kaplı cam slaytlara hücreler ekilerek %10 FBS, %0.1 primosinli MEM besiyortamı ile kültüre edildi.

Kemik hücrelerine farklılaştırmak için ise, %10 FBS, 100 nM deksametazon, 10 mM gliserol-2-fosfat, 50  $\mu$ g/ml askorbat-2-fosfat ve %0.1 primosinli MEM besiyortamı ile kollagen kaplı cam slaytlara ekilen hücreler 14 gün boyunca inkübe edildi. Kontrol olarak, kollagen kaplı cam slaytlara hücreler ekilerek % 10 FBS, %0.1 primosinli MEM besiyortamı ile kültüre edildi.

Mikroskopta günlük gözlemleri yapılan bu hücrelerin 14. günde cam slaytın çoğu yerinde adipoz birikintileri biriktirdiği gözlemlendiği zaman, hücreler fosfat tamponu (PBS) içerisinde hazırlanan %4 paraformaldehit (PFA) (Merck) solüsyonu içerisinde 15 dk oda sıcaklığında bekletilerek sabitlendi. Ardından sırasıyla PBS ve distile su ile yıkanan cam slayt üzerindeki hücreler son olarak %60'lık 2-propanol (Sigma-Aldrich) ile 5 dk oda sıcaklığında bekletildi. Sabitlemeden sonra, Oil Red O ile histokimyasal boyama yapıldı. 0.3 gr Oil Red O (Sigma-Aldrich) %60'lık 100 ml 2-propanol içerisinde çözünmesi için 50°C deki çalkalayıcıya koyularak stok solüsyon hazırlandı. Ardından stok solüsyon ile distile su 3:2 oranında karıştırılarak, karışım hücrelerle 50 dk boyunca oda sıcaklığında çalkalayıcı da inkübe edildi. Böylece, Oil Red O boyası ile yağ damlacıkları boyanarak MKH'lerin adipojenik olarak farklılaştığı gösterildi.

Kemik yönünde farklılaştırmaya alınan hücrelerin 14. günde cam slaytın çoğu yerinde kalsiyum nodülleri oluşturdukları gözlemlendi ve %70'lik alkol ile 5 dk oda sıcaklığında bekletilerek sabitlendi. Sabitlenmenin ardından, %2'lik Alizarin Red (Fluka)

çözeltisi distile su içerisinde hazırlandı. Boyanın pH'sı 4.1-4.3 arasında bir değere ayarlandı. Cam slaytlar yaklaşık 20 defa distile su ile yıkandıktan sonra, hücrelerin üzerine Alizarin Red çözeltisi eklenerek 45 saniye oda sıcaklığında bekletildi. Böylece, kalsiyum nodülleri boyanarak MKH'lerin osteojenik olarak farklılaştığı gösterildi.

Tüm bu analizlerden sonra MKH karakteri taşıdığı belirlenen lipoaspiratla elde edilmiş adipoz doku kaynaklı hücreler pasaj dörde getirilerek jeller üzerine ekilmeye hazır hale getirildi.

### **3.3. Göbek Bağından Hyaluronik Asit İzolasyonu**

Kocaeli Üniversitesi İnsan Araştırmaları Etik Kurulu'ndan alınan izinle, bilgilendirme ve onam formlarının vericiye imzalatılması sonrası Kocaeli Üniversitesi Kadın Doğum Bölümünden toplanan göbek bağları KÖGEM'e getirildi. Gelen göbek bağları aynı gün içerisinde PBS'le yıkanıp, damarları çıkarılıp, -80°C'ye kaldırıldı (20 göbek bağı kullanıldı).

Göbek bağından hyaluronik asit izolasyon protokolü (Lago et al. 2005) değiştirilerek uygulandı. Göbek bağları -80°C'den çıkarılıp küçük parçalara (4 cmx4cm) ayrıldı ve üzerine PBS eklenerek çalkalama yapılarak,+4°C'ye kaldırıldı. Ertesi gün, % 0.2'lik NaCl solüsyonu hazırlandı. Yaklaşık 1 kg göbek bağı 4 litre NaCl solüsyonu içerisinde +4°C'ye kaldırıldı. 3 gün sonunda oda sıcaklığında yaklaşık 16 saat süreyle magnetik karıştırıcıda işleme alındı. Göbek bağından çıkan HA'yi toplayabilmek için süpernatanta 300–600 ml %1 setil trimetil amonyum bromür (cetyltrimethylamonium bromide; CTAB, AppliChem) solüsyonu eklendi. Eklendikçe agregasyon olduğundan dolayı CTAB-HA falkonda toplandı. Sonrasında HA'in çözünmesi için 0.9 M kalsiyum klorit çözeltisi eklenerek 37°C de çözünene kadar çalkalayıcıya koyuldu. HA çözeltisindeki nükleik asitleri elemine etmek için 30 ml %25 v/v etil alkol 10 ml' lik HA çözeltisine eklenerek santrifüj edildi (1000 g, 10 dk). Süpernatantın %10'u kadar kloroform (Merck) eklenerek iyice çalkalanıp bırakıldı. Çözeltide iki faz oluşumu gözlemlendi. Alt kısım proteinli kısım olduğu için üst kısım toplandı ve tekrar çözeltinin %10'u kadar kloroform eklendi ve iyice çalkalanarak bırakıldı. Bu işlem 4 gün boyunca 4 defa tekrarlandı. Sonrasında %75 v/v etil alkol (Rieder de Haen) solüsyona eklenerek

HA'lerin çökmesi beklendi, çökme olmuyorsa aseton (Sigma- Aldrich) eklenerek santrifüj edilip kurumaya bırakıldı.

### **3.4. İnsan Göbek Bağından İzole Edilen Hyaluronik Asitin Karakterizasyonu**

Karakterizasyon çalışmalarında referans olarak horoz ibiğinden üretilen HA (Sigma) kullanılmıştır. Göbek bağından ve horoz ibiğinden üretilen HA'lerden su içerisinde %1'lik çözeltiler hazırlandı. Çözünmesi için 50°C de çalkalayıcıda bir gece bırakıldı. Öncelikle HA'lerin içerisindeki protein miktarlarını belirlemek için BCA testi yapıldı. BCA testi üretici firmanın protokolüne göre 50:1 oranında ajan A (bikinkoninik asit solüsyonu):ajan B (%4'lük bakır (II) sülfat pentahidrat) (Sigma- Aldrich) solüsyonu yeşil oluncaya kadar karıştırılır ve bu solüsyona BCA solüsyonu adı verilir. Standart eğri için 0, 200, 400, 600, 800 ve 1000 µg/ml olacak şekilde sığır serum albumin (bovine serum albumin; BSA) proteini hazırlandı. 96 kuyucuklu plakaya BSA'lü örnekler, göbek bağından izole edilen, referans olarak kullanmak için horoz ibiğinden üretilen HA örneklerinden (%1'lik HA solüsyonları 5 kat dilüe edilerek) 25 µl koyuldu ve üzerlerine 200 µl BCA solüsyonu eklendi ve kör olarak 225 µl BCA solüsyonu kullanıldı. Örnekler iyice karıştırılarak 37°C de 30 dk bekletildi. Eliza Plaka Okuyucu (Versamax) kullanılarak 540- 590 nm dalga boyunda absorbans değerleri okundu.

Hassas spektrofotometre (picodrop) ile %1'lik göbek bağından izole edilen ve horoz ibiğinden izole edilen HA'lerin çift zincirli DNA içeriği ve direk protein miktarı belirlendi. Ayrıca, bu örneklerin UV absorbans spektrumları grafikleri belirlendi. Bu çalışmalar için programdan ilgili sekme seçilerek, picodrop ile µl seviyesinde örneklerden alınarak okumalar yapıldı ve kör olarak distile su kullanıldı.

Son karakterizasyon çalışması olarak göbek bağı, horoz ibiği ve Wharton jeli kaynaklı hücrelerin kültüründen elde edilen HA'in alsiyan mavisi ile histokimyasal boyaması gerçekleştirildi. Yukarıda sayılan örneklerden ve negatif kontrol olarak %6'lık jelatin solüsyonu 50 µl cam slaytlara koyuldu ve bir gece kurumaya bırakıldı. Alsiyan mavisi boyama işlemi için öncelikle cam slaytlar distile su ile yıkandı. %3'lük asetik asit (Riedel-de Haen) içerisinde %1'lik alsiyan mavisi (Sigma- Aldrich) hazırlandı. Bu solüsyon cam slaytların üzerini kaplayacak şekilde koyuldu ve 30 dk oda sıcaklığında

beklendi. Sonrasında distile su ile yıkanarak kurumaya bırakıldı ve ışık mikroskopunda görüntüler alındı.

### **3.5. İnsan Kan Plazmasından Fibrinojen İzolasyonu**

Kocaeli Üniversitesi İnsan Araştırmaları Etik Kurulu'ndan alınan izinle, Kocaeli Üniversitesi Kan Bankası'ndan kullanım süresi geçmiş insan kanı plazmaları elde edildi. Etanol çöktürme ve dondurma prensiplerinin birleştirilmesiyle oluşturulan (Park et. al. 1999) protokole göre fibrinojen çöktürmesi yapıldı. Öncelikle plazmadan 10'ar ml tüplere konuldu ve üzerlerine 2 ml %99'luk etanol eklenerek hemen karıştırıldı. Plazma etanol karışımı -20°C'de 20 dakika bekletildi. Sonrasında, örnekler 3200 rpm de 8 dk +4°C'de santrifüj edildi. Süpernatant dökülerek, pellet 200 µl %0.9'luk NaCl (salin) ile resuspanse edildi ve etanolün uçması için tüplerin kapakları yarım açık olacak şekilde laminar flow kabinde bekletildi. Çöken fibrinojenin çözünmesi için 15 dk 37°C'de inkübatörde bekletildi. Bu yoğunlaştırılmış stok fibrinojen çözeltisi 1 ml'lik alikotlara bölünerek HA/J plazma jellerin yapımında kullanılmak üzere -20°C'ye kaldırıldı.

### **3.6. Hyaluronik Asit/Jelatin Plazma Jellerin Üretimi**

Sığır plazmasından elde edilmiş trombin (Sigma) HBBS (Gibco) içerisinde 40 IU olacak şekilde alikotlara bölünerek -80°C'ye kaldırıldı. Öncelikle jelatin (Merck, sığırdan elde edilmiş) ve göbek bağından izole edilen HA'in çapraz bağlanması gerçekleştirildi. 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide/N-hydroxysuccinimide (EDC/NHS) çapraz bağlayıcı ajanları ile çapraz bağlama yapıldı. 3 ml'lik solüsyondaki hyaluronik asit ve jelatinin çapraz bağlanması için 500 µl %1'lik HA çözeltisine 500 µl daha MES tampon çözeltisi eklendi. Sonrasında %1 EDC (Thermo Scientific) olacak şekilde 10 mg EDC ve 0.2M NHS (Thermo Scientific) olacak şekilde 23 mg NHS tartıldı. Bütün maddeler HA solüsyonuna koyularak 30 dk oda sıcaklığında bekletildi. EDC'nin HA'e bağlanmasını durdurmak için 1,4 µl 2-merkaptoetanol (Merck) eklendi. 150 mM NaCl ve PBS içinde hazırlanan %6'lık jelatinden solüsyona 2.04 ml eklendi ve bir gece boyunca bekletildi. Sonrasından bir çok farklı oranlarda insan kan plazmasından çöktürülen yoğunlaştırılmış

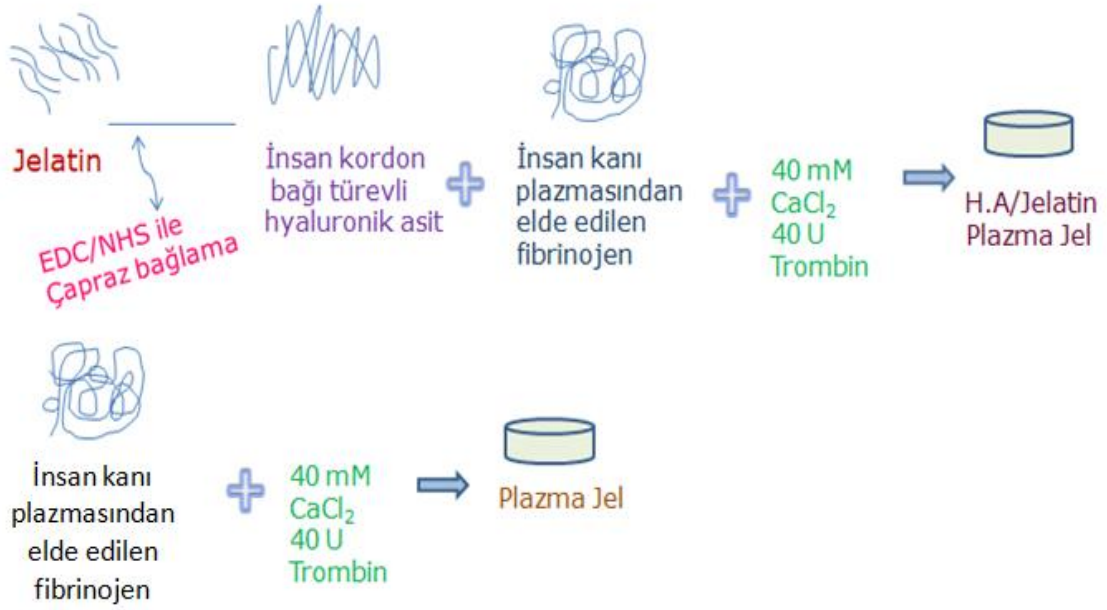
fibrinojen, trombin, çapraz bağlanmış HA/J solüsyonları ve  $\text{CaCl}_2$  ile HA/J plazma jel üretimi çalışmaları yapıldı. Uygun kalınlıkta ve kolayca deforme olmayan jellerin üretimi için bir çok farklı oranlarda denemeler yapıldı (Çizelge 4.4). Çalışmalarda kullanılan jellerin yapılışı için, 1 ml yoğunlaştırılmış kan plazması fibrinojeni üzerine önce 250  $\mu\text{l}$  HA/J solüsyonu ve ardından 250  $\mu\text{l}$  40 mM  $\text{CaCl}_2$  koyularak iyice karıştırıldı. Sonrasında bu solüsyondan 180  $\mu\text{l}$  48 kuyucuklu plakanın bir gözüne aktarılarak, üzerine 50  $\mu\text{l}$  40U olan trombin konularak hafifçe pipet ucu ile karıştırıldı (Şekil 3.2). Jellerin yapısının dağılmaması ve homojen görünümde olması için bu karıştırma işleminin çok nazik şekilde olması gerekmektedir. Bu yöntemle 80 tane HA/J plazma jel yapıldı (Şekil 3.1) ve jellerin ne zaman çözüneceğini test etmek amacıyla PBS içerisinde  $37^\circ\text{C}$ 'ye kaldırıldı.



Şekil 3. 1. Hyaluronik asit/jelatin plazma jelin üretim sonrası resimleri

### 3.7. Plazma Jellerin Üretimi

Yoğunlaştırılmış kan plazması fibrinojeni (500  $\mu\text{l}$ ) üzerine 125  $\mu\text{l}$  40 mM  $\text{CaCl}_2$  eklenerek iyice karıştırıldı. Sonrasında, bu solüsyondan 180  $\mu\text{l}$  48 kuyucuklu plakanın bir kuyucuğuna konularak üzerine 50  $\mu\text{l}$  40IU olan trombin eklenerek hafifçe pipet ucu ile karıştırıldı. Jellerin yapısının dağılmaması ve homojen görünümde olması için yine nazik bir şekilde karıştırma işlemleri yapıldı (Şekil 3.2). Çalışmalarda kullanılmak üzere bu yöntemle 30 tane plazma jel üretildi.



Şekil 3.2. HA/J plazma ve plazma jellerin üretim aşamalarının şematik gösterimi.

### 3.8. Hyaluronik Asit/Jelatin Plazma Jellerin Stabilite Testi Çalışmaları

HA/J plazma jellerin PBS içerisinde 37°C'de 2 gün içerisinde çözündükleri gözlemlenmiştir. Bu nedenle jellerin stabilitesi arttırmak amacıyla jellere çeşitli çapraz bağlayıcı maddeler eklendi ve stabilize edilen jellerin PBS içerisinde ne kadar sürede çözüldüğü tespit edildi (Çizelge 3.1). Üç farklı çapraz bağlayıcı madde hazırlandı. %1'lik EDC ve 0.2M NHS distile su içerisinde hazırlanarak 0,22 µl'lik filtreden geçirilerek steril edildi. Aynı şekilde, distile su içerisinde % 1'lik gluteraldehit çözeltisi (GA) hazırlanarak filtre ile steril edildi. Ayrıca, %70'lik etanol ile %1'lik EDC çözeltisi hazırlanarak filtre ile steril edildi. Çizelge 3.1'de görüldüğü gibi jeller hazırlanan çapraz bağ sayısını arttırıcı maddeler ile farklı sürelerde 37°C'de bekletildi. Ardından jeller 1M glisin (Fluka) çözeltisi içerisinde 2 saat bekletildi ve HBSS ile yıkamalar yapılarak PBS içerisinde 37°C'de bekletildi. Çözünüp çözünmediklerini anlamak amacıyla iskele günlük olarak incelendi.

**Çizelge 3.1.** HA/J plazma jellerine uygulanan çapraz bağlayıcı maddeler ve uygulanma süreleri

Çapraz bağlayıcı ajan adı	PBS (*)	EDS/NHS	EDC/NHS	EDC/EtOH	EDC/EtOH	GA	GA	GA
Jellerin çapraz bağlayıcı ajanda kalma süreleri	-	2 sa	16 sa	2 sa	16 sa	5 dk.	15 dk.	30 dk.
Glisin uygulama süresi	-	2 sa	2 sa	2 sa	2 sa	2 sa	2 sa	2 sa

(\*) :çapraz bağlayıcı ajan ile müdahale edilmeden PBS içerisine koyulmuştur.

EDC/NHS: 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide/N-Hydroxysuccinimide

EtOH: % 70'lik etanol, GA: Gluteraldehit

### 3.9. Hyaluronik Asit/Jelatin Plazma Jel ve Plazma Jellerin Karakterizasyonu

HA/J plazma ve plazma jellerin karakterizasyonu için sıkıştırma testi yapılarak mekanik özellikleri belirlendi, Scion Image programı kullanılarak gözenek çapı ve gözeneklilik belirlendi ve jellerin SEM görüntüleri alındı.

#### 3.9.1. Basma Testi

2N'a kadar kuvvet uygulayabilen Lloyd instruments LR 30 K cihazı ile sıkıştırma aralığı %10 olacak şekilde 1 mm/dk hızda 9.2 mm çapa sahip olan jellerin sıkıştırma testi



yapıldı. Jeller parçalanıncaya kadar yük uygulandı ve her iki jel türü için 3'er örnek çalışıldı.

### **3.9.2. Gözeneklilik ve Gözenek Çapı**

HA/J plazma ve plazma jeller üretildikten hemen sonra Kocaeli Üniversitesi, Patoloji bölümünde kriyomikrotom (Shandon) yardımıyla 10 µm kalınlığında kriyokesitler alındı. Bu kriyokesitler PBS içerisinde hazırlanan %4'lük PFA çözeltisinde oda sıcaklığında 15 dk bekletildi ve ardından PBS ile kriyokesitler yıkandı. Jellerin gözenekliliğini hesaplamak ve gözenek çapını belirlemek amacıyla komasi mavisini boyama yapıldı. Bu boya proteinleri boyadığı için jelin poroz yapısını görülebilir hale getirdi. 100 ml'lik komasi mavisi (Commassie Brilliant Blue R250, Merck) boyasını hazırlamak için, 1: 1 hacimde 90 ml metanol (Merck) ve distile su karışımı hazırlandı. 10 ml saf asetik asit (Riedel-de Haen) eklenerek bu solüsyona 0.25 g boya eklendi. İyice çözüldükten sonra boyanın temiz olması için boya solüsyonu 0.45'lik filtreden geçirildi. Kriyokesitleri içeren lamellerin üzerine boya damlatıldı ve 30 dk oda sıcaklığında bekletildi. Kriyokesitler yıkama amacıyla boya içermeyen su, metanol ve asetik asit çözeltisinde 30 dk bekletildi. Kuruyan lamellerin ışık mikroskopunda görüntüleri alındı ve "Scion Image" programı kullanılarak gözenek çapı ve yoğunluğu hesaplandı.

### **3.9.3. Elektron Mikroskobu Görüntüleri**

HA/J plazma jel, plazma jel, ve AD-MKH'lerin ekildiği HA/J plazma jelin SEM görüntüsü alındı. HA/J plazma jel üzerine ekilen hücreler 21. günde %4'lük PFA ile 15 dk. oda sıcaklığında fikse edildi. Hazırlık amacıyla tüm bu örnekler -80°C'de donduruldu ve Cool safe 110-4 marka liyofilizatörde kurutuldu. Ardından her iki jel türüne ve hücreli HA/J plazma jellere altın kaplama cihazında 10 nm kalınlığında Au-Pd kaplama yapıldı. ODTÜ Merkezi Laboratuvarında jellerin yapısını belirlemek amacıyla örnekler SEM (QUANTA 400F Field Emission) cihazında düşük vakum altında incelendi.

### **3.10. HA/J Plazma Jel Üzerindeki MKH'lerin Canlılık ve Çoğalma Testleri**

HA/J plazma jellerin hücrelere sitotoksik etkilerini ve hücrelerin bu yapı iskelelerine tutunma ve çoğalma potansiyellerini tayin etmek amacıyla WST-1 (Roche) hücre çoğalmı/canlılık testi yapıldı. Bu test için, jellere ve cam slaytlara  $7.5 \times 10^3$  hücre/cm<sup>2</sup> olacak şekilde AD-MKH hücreleri ekildi. 1., 5., 7., 14. ve 21. günlerde WST-1 testi yapılarak cam slayt ve jellerdeki hücrelerin çoğalma hızları incelendi. Jelli örneklerin körleri olarak, üzerine hücre ekimi yapılmamış besiyeri içerisinde hücreli jellerin kültür süresi kadar bekletilen jeller kullanıldı. Jellere ve cam slaytlara ekilen hücrelerin 1.gündeki hücre canlılığını belirlemek amacıyla, öncelikle karanlıkta %10 FBS ve %0.1 primosin içeren L-DMEM besiyeri ile %10'luk WST-1 solüsyonu hazırlandı. 48 kuyucuklu plakalara hazırlanan çözeltiden 300 µl konularak ardından hızlıca jel ve cam slaytların solüsyon içerisine transferi yapıldı. Her bir örnekten 3'er tane çalışıldı. Işık almaması için aliminyum folyo ile kapatılan plaka 37<sup>0</sup>C'de, %5 CO<sub>2</sub>'li inkübatörde 2 saat bekletildi. 96 kuyucuklu bir plakaya, her bir kuyucuk için örneklerin besi ortamından 200'er µL alınarak 3'er kuyucuk dolduruldu. Ardından mikroplate okuyucu (VersaMax) kullanılarak 480 nm dalga boyunda absorbans değerleri okundu. 5., 7., 14. ve 21. günlerde de aynı şekilde çalışmalar yapılarak absorbans değerleri kaydedildi.

Ayrıca, WST-1 testinin kalibrasyon eğrisinin oluşturulması amacıyla 48 kuyucuklu plakaların herbirine 3'er örnek olacak şekilde 5000, 7500,15000, 25000, 50000 ve 75000 hücre ekildi. Hücrelerin tutunması amacıyla 48 kuyucuklu plaka 3 sa 37<sup>0</sup>C'de, %5 CO<sub>2</sub>'li inkübatörde bekletildi. Sayısını bildiğimiz hücrelerin 480 nm'de hangi absorbans değerlerini verdiği belirlenerek kalibrasyon eğrisi oluşturuldu.

### **3.11. HA/J Plazma Jel Üzerine Ekilmiş İnsan AD-MKH'lerin Kardiyomiyojenik Farklılaşma Potansiyelinin Değerlendirilmesi**

#### **3.11.1. Cam Slayt Üzerine Ekilmiş MKH'lerin Kardiyomiyojenik Farklılaşma Potansiyelinin Değerlendirilmesi**

Literatürde embriyonik kök hücrelerin kardiyomiyositlere farklılaşması için uygulanan protokol (Stevens et al. 2009), çalışmamızda değiştirilerek AD-MKH'lerine uygulandı. değiştirilerek uygulandı. Farklılaşmayı indükleyeceği düşünülen üç grup ve

kontrol grubu olmak üzere 4 farklı grup için çalışma yapıldı. AD-MKH'lerin  $2.5 \times 10^3$  hücre/cm<sup>2</sup> olacak şekilde 6 kuyucuklu plakaya konulan fibronektin kaplı cam slaytlara ekimi yapıldı ve her bir grup için 3 eş çalışma yapıldı. %70 konflusensiyeye ulaşan hücelere kardiyomiyojenik farklılaşma prosedürleri uygulandı. Kontrol grubu besiyeri olarak RPMI, %10 FBS ve %1'lik kanamisin kullanıldı. Kontrol grubu hariç diğer gruplara 100 ng/ml aktivin-A verilerek şartlama yapıldı. Ardından her bir grubun farklılaşma ajanları 3 günde bir değiştirilerek 21 gün boyunca kültürdeki hücelere verildi. Kardiyomiyojenik farklılaşma besiyeri içerikleri aşağıda verilmiştir.

1. Grup farklılaşma besiyeri; 10 ng/ml BMP-4, %10 FBS, %1 kanamisin, RPMI besiyeri,
2. Grup farklılaşma besiyeri; 2 mM valproik asit, %10 FBS, %1 kanamisin, RPMI besiyeri,
3. Grup farklılaşma besiyeri; 10 ng/ml BMP-4, 2 mM Valproik asit, %10 FBS, %1 kanamisin, RPMI besiyeri,
4. Kontrol grubu besiyeri; %10 FBS, %1 kanamisin, RPMI besiyeri.

Kardiyomiyojenik farklılaşmayı değerlendirmek amacıyla 21. günde hücreler sabitlendi. Sabitleme işlemi için dikkatle alınan cam slaytlar öncelikle PBS'le yıkandı. Cam slaytların üzerini kaplayacak şekilde metanol eklenerek -20°C'de 10 dk bekletildi. Kurumaya bırakılan cam slaytların anti- $\alpha$  aktinin (Sigma-Aldrich A7811) ile immunflouresan boyamaları gerçekleştirildi. Blok serum hazırlarken 200:3 oranında PBS ve goat serum kullanıldı. Blok serum cam slaytların üzerinde 30 dk bekledikten sonra yıkama yapmadan, anti- $\alpha$  aktinin 400:1 oranında kendisine ait solüsyonda hazırlandı ve cam slaytların üzerine eklendi (1 saat). PBS ile yıkamalar yapıldıktan sonra sekonder antikör olarak Goat anti Mouse IgG-FITC (1: 100) (Santa Cruz Biotechnology Sc-2010) kullanıldı. DAPI içeren kapatma solüsyonu (Santa Cruz Biotechnology) ile cam slaytlar lamellerin üzerine kapatıldı ve flouresan mikroskopta incelendi.

### 3.11.2. HA/J Plazma Jel Üzerine Ekilmiş AD-MKH'lerin Kardiyomiyojenik Farklılaşma Potansiyeli

HA/J plazma jel ve cam slaytlar kullanılarak AD-MKH'lerin kardiyomiyositlere farklılaşma potansiyeli incelenmiştir. Bu amaçla 3 grup farklılaşma besiyeri ve kontrol besiyeri kullanıldı. 3 adet 48 kuyucuklu plaka kullanılarak her grup farklılaştırma besiyeri için; immunhistokimyasal boyamalar için 3 adet, gerçek zamanlı PZR çalışmalarında 14.hafta için 6, 21.hafta için 6 adet üzerine hücre ekilmiş jelle gereksinim oldu. Bu amaçla toplam 60 adet HA/J plazma jel üzerine  $7.5 \times 10^3$  MKH/jel olacak şekilde hücre ekimi yapıldı. Bunun yanında jel üzerindeki hücrelerin farklılaşma potansiyellerini kıyaslayabilmek amacıyla 60 adet cam slayta  $7.5 \times 10^3$  MKH/cam slayt olacak şekilde hücre ekimi yapıldı. Hücre ekiminden 1 gün sonra hücrelere 3 grup farklılaşma besiyeri ve kontrol besiyeri uygulandı. (Şekil 3.3). 3.11.1'deki farklılaşma çalışmaları sonucu 3.grup farklılaşma besiyerinin kardiyomiyojenik farklılaşmada kullanılmasına karar verilmiştir. Jellere ve cam slaytlara uygulanan farklılaşma ve kontrol besiyeri bileşimleri aşağıdadır:

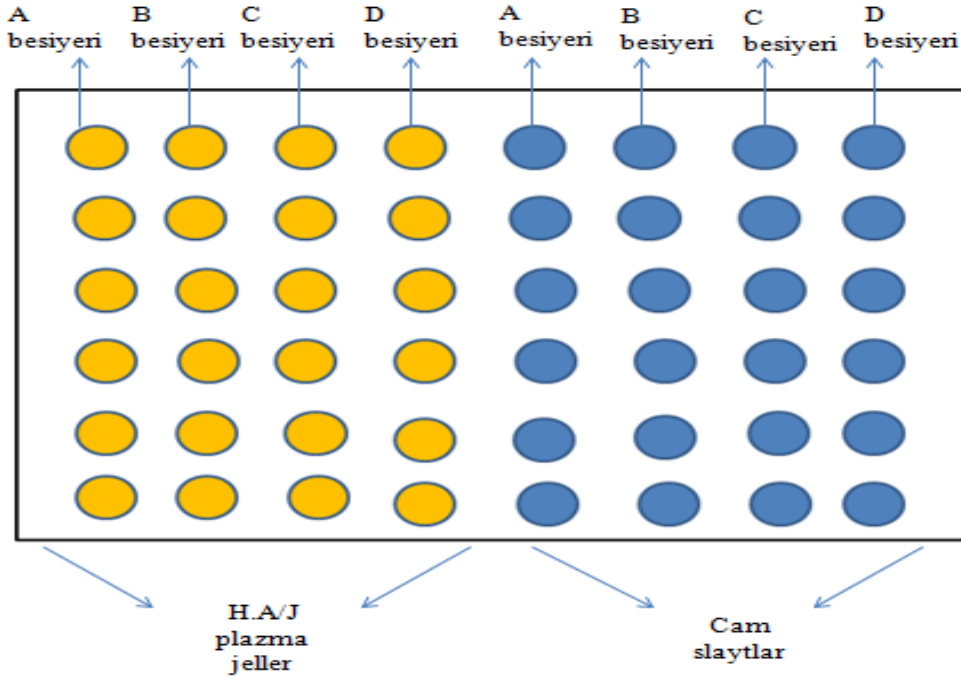
**A besiyeri:** 100 µg/ml insülin (Sigma), 2 mM valproik asit, %10 FBS, %0.1 primosin, L- DMEM,

**B besiyeri:** 10 µg/ml 5-azasitidin (Sigma), %10 FBS, %0.1 primosin, L- DMEM,

**C besiyeri:** 10 ng/ml BMP-4, 2 mM valproik asit, %10 FBS, %0.1 primosin, L- DMEM,

**D besiyeri:** %10 FBS, %0.1 primosin, L- DMEM.

Her 3 günde bir besiyeri değişimi yapılan kültürün 21. gününde immunhistokimyasal boyamalar için her gruptan üç tane jelden 10 µm kalınlığında kriyokesitler alındı. Kriyokesit ve cam slaytlar %4'lük PFA ile oda sıcaklığında sabitlendi. Kültürün 14. ve 21. gününde ise her bir gruptan 6'şar örnek alınarak, gerçek zamanlı PZR çalışmaları için lizis tampon çözeltisi (Roche RNA izolasyon kiti) ile hücreler patlatılarak, -80°C'ye kaldırıldı.



Şekil 3.3. AD-MKH'lerin kardiyomiyojenik farklılaşma çalışma deney düzeneği

### 3.11.2.1. İmmunhistokimyasal Boyamalar

Kardiyomiyojenik farklılaşmaya alınan kültürün 21. gününde immunhistokimyasal boyamalar için her gruptan 3'er örnek alınarak jellerden 10 µm kalınlığında kriyokesitler alındı. Hücreler jelin üzerine ekildiği için hücrelerin bulunduğu yüzeyden kesitler alındı. Kriyokesitler ve cam slaytlar %4'lük PFA ile oda sıcaklığında sabitlendi. Gluteraldehit oto flouresan bir madde olduğu için jellere immunhistokimyasal boyama yapıldı. Anti- $\alpha$  aktinin ve anti- kardiyak troponin T (Thermo) antikorları ile boyamalar yapıldı. Kriyokesitler ve cam slaytlar öncelikle PBS ile yıkandı. Numunelerin üzerine blok serum (Large Volume Ultra V Block, Thermo) koyularak, 30 dk bekletildi. Ardından blok serum ile primer antikor olan anti- $\alpha$  aktinin 1:400 oranında hazırlandı. Isıtıcı önünde 1 sa bekletildi ve sonrasında PBS ile numuneler yıkandı. Sekonder antikor olarak hazır halde bulunan biyotinlenmiş goat anti-polivalent (Thermo) sıvısı örneklerin üzerini kaplayacak şekilde koyuldu ve 20 dk bekletildi. PBS ile yıkamalardan sonra enzim olarak streptavidin peroksidaz enzimi (Thermo) koyularak 20 dk bekletildi. Enzimin ardından substrat olarak AEC (invitrogen) koyularak 10 dk çalkalayıcı üzerinde bekletildi. Distile su ile yıkamalar yapılarak örnekler kurumaya bırakıldı. DAPI ile lameller ve cam slaytlar kapatılarak ışık mikroskobunda görüntüler alındı.

### 3.11.2.2. Gerçek Zamanlı PZR (Real -time PCR) Çalışmaları

Kültürün 14. ve 21. günlerinde lizis çözeltisiyle patlatılarak -80°C'ye kaldırılan hücrelerin, RNA izolasyon kiti (High Pure RNA isolation kit, Roche) ile üretici firmanın tavsiye ettiği protokol uygulanarak, RNA'ları izole edildi.

RNA izolasyonunun ardından tek iplikçikli cDNA sentezi cDNA sentez kiti (Fermentas) kullanılarak yine üretici firmanın tavsiye ettiği protokol uygulanarak gerçekleştirildi.

16 farklı çalışma grubunun cDNA'ları kullanılarak 3 defa gerçek zamanlı PZR çalışıldı ve 3 ayrı genin gerçek zamanlı PZR ile karşılaştırmalı olarak analizi yapıldı (Çizelge 3.3). İnsan kardiyak troponin I tip 3 (cTn I), GATA4ve T-box5 (TBX5) genleri ile çalışıldı. Bu genlerin primerleri Roche probe finder programı ile bulunmuştur (Çizelge 3.2).

**Çizelge 3.2.** Gerçek zamanlı PZR çalışmalarında kullanılan primerlerin özellikleri

Primer		Uzunluğu	Pozisyonu	Tm	% GC	Dizisi
cTn I (NM_000363.4)	sol	21	672 - 692	59	52	aagaaggagga caccgagaag
	sağ	20	718 - 737	60	50	cagtgcacgat gttcttgc
GATA 4 (NM_002052.3)	sol	20	1513 - 1532	60	50	ggaagcccaag aacctgaat
	sağ	19	1592 - 1610	59	53	gttgctggagttg ctggaa
TBX5 (NM_000192.3)	sol	22	609 - 630	59	50	gaagaggtggg atagttggaga
	sağ	18	718 - 735	60	56	ggcaggtctttg cgtca

cTn I geninin referans geni olarak 10 GUSB, GATA4 için 17 GUSB ve Tbx5 için 81 GUSB genleri kullanıldı. Primerler 20 mM olacak şekilde saf su ile sulandırıldı. 96 kuyucuklu plakanın bir kuyucuğuna sırasıyla eklenen maddeler: 0.4 µl hedef primer, 0.4 µl

referans primer, 0.4 µl hedef prob, 0.4 µl referans prob, 3 µl saf su, 10 µl master karışım, 5 µl cDNA'dır.

GATA4 geninin grup 13'teki ekspresyonu Standart 0 (std0) olarak kullanıldı. Std1 std0'ın 4 kat dilüe edilmesiyle hazırlandı ve std3 de std2'nin 4 kat dilüe edilmesiyle hazırlandı. Negatif konrollerde su bulunmaktadır.

Roche Light Cycler 450II cihazı ile Dual Color Hydrolysis Probe kullanılarak gerçek zamanlı PZR çalışmaları yapıldı. Örneklerin isimleri cihaza girildi ve relatif hesaplama kısmı seçilerek çalışma başlatıldı. Sonrasında cihazdan grupların Ct değerleri alınarak birbiriyle kıyaslama yapıldı. Bütün gerçek zamanlı PZR çalışmaları 3 defa tekrarlandı.



**Çizelge 3.3.** Gerçek zamanlı PZR çalışmalarında kullanılan grupların isimlendirilmesi

<b>14.GÜN</b>	<b>Grup Adı</b>	<b>21.GÜN</b>	<b>Grup Adı</b>
A besiyeri uygulanmış HA/J Plazma jel üzerine ekilmiş AD-MKH	1	A besiyeri uygulanmış HA/J Plazma jel üzerine ekilmiş AD-MKH	9
A besiyeri uygulanmış cam slayt üzerine ekilmiş AD-MKH	2	A besiyeri uygulanmış cam slayt üzerine ekilmiş AD-MKH	10
C besiyeri uygulanmış HA/J Plazma jel üzerine ekilmiş AD-MKH	3	C besiyeri uygulanmış HA/J Plazma jel üzerine ekilmiş AD-MKH	11
C besiyeri uygulanmış cam slayt üzerine ekilmiş AD-MKH	4	C besiyeri uygulanmış cam slayt üzerine ekilmiş AD-MKH	12
B besiyeri uygulanmış HA/J Plazma jel üzerine ekilmiş AD-MKH	5	B besiyeri uygulanmış HA/J Plazma jel üzerine ekilmiş AD-MKH	13
B besiyeri uygulanmış cam slayt üzerine ekilmiş AD-MKH	6	B besiyeri uygulanmış cam slayt üzerine ekilmiş AD-MKH	14
D besiyeri uygulanmış HA/J Plazma jel üzerine ekilmiş AD-MKH	7	D besiyeri uygulanmış HA/J Plazma jel üzerine ekilmiş AD-MKH	15
D besiyeri uygulanmış cam slayt üzerine ekilmiş AD-MKH	8	D besiyeri uygulanmış cam slayt üzerine ekilmiş AD-MKH	16



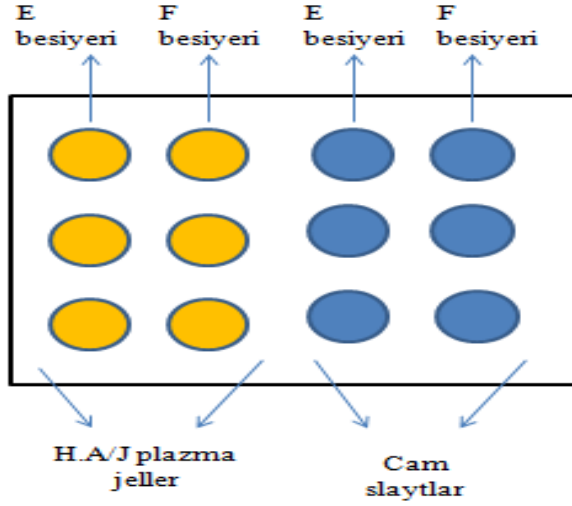
### 3.12. HA/J Plazma Jel üzerine Ekilmiş İnsan AD-MKH'lerin Adipojenik Farklılaşma Potansiyelinin Değerlendirilmesi

HA/J plazma jel üzerindeki AD-MKH'lerin adipoz hücrelerine farklılaşma potansiyelini araştırmak amacıyla her bir grup için 3'er tane jel ve cam slaytlar kullanıldı (Şekil 3.4). 48 kuyucuklu plakadaki her bir kuyucuğa  $2.5 \times 10^4$  AD-MKH' leri ekildi ve mikroskopta cam slaytlara bakılarak hücreler %70 konfluensiye geldiğinde hücrelere farklılaşma ve kontrol besiyerleri verildi. Jellere ve cam slaytlara uygulanan farklılaşma ve kontrol besiyeri bileşimleri aşağıdadır:

**Farklılaşma besiyeri:** 200 $\mu$ M indometasin, 10 $\mu$ g/mL insülin, 0,5mM 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX),  $10^{-6}$  M deksametazon , %10 FBS, %0.1 primosin, MEM besiyeri,

**Kontrol besiyeri:** %10 FBS, % 0.1 primosin, MEM besiyeri.

Üç günde bir besiyeri değişimi yapılarak, kültürün 21. gününde cam slaytın çoğu yerinde yağ damlacıkları gözlemlendiği zaman, jel ve cam slayt üzerindeki hücreler PBS içerisinde hazırlanan %4 PFA solüsyonu içerisinde 15 dk oda sıcaklığında bekletilerek sabitlendi. Oil Red O histokimyasal boyaması için jellerden 10  $\mu$ m kalınlıkta kriyokesitler alındı. 3 gr Oil Red O boyasının %60'luk 100 ml 2-propanol içerisinde çözünmesi için 50°C deki çalkalayıcıya koyuldu ve stok solüsyonu hazırlandı. Ardından stok solüsyon ile distile su 3:2 oranında karıştırılarak, karışım hücrelerle 50 dk. boyunca oda sıcaklığında çalkalayıcıda inkübe edildi. Böylece, Oil Red O boyası ile adipoz vezikülleri boyanarak HA/J plazma jel ve cam slayt üzerindeki MKH'ler ışık mikroskobunda incelendi ve resimler çekildi.

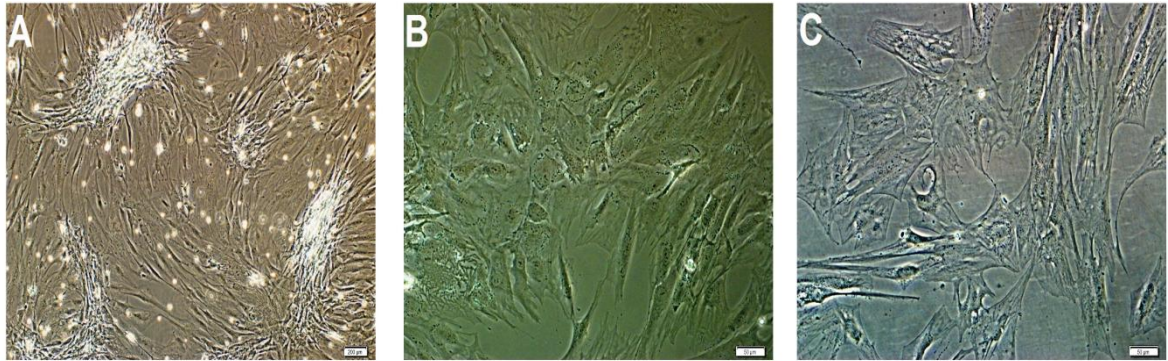


**Şekil 3.4.** AD-MKH'lerin adipojenik farklılaşma çalışmaları deney düzeneği. E Besiyeri: Farklılaşma besiyeri, F Besiyeri: Kontrol besiyeri

## 4. BULGULAR

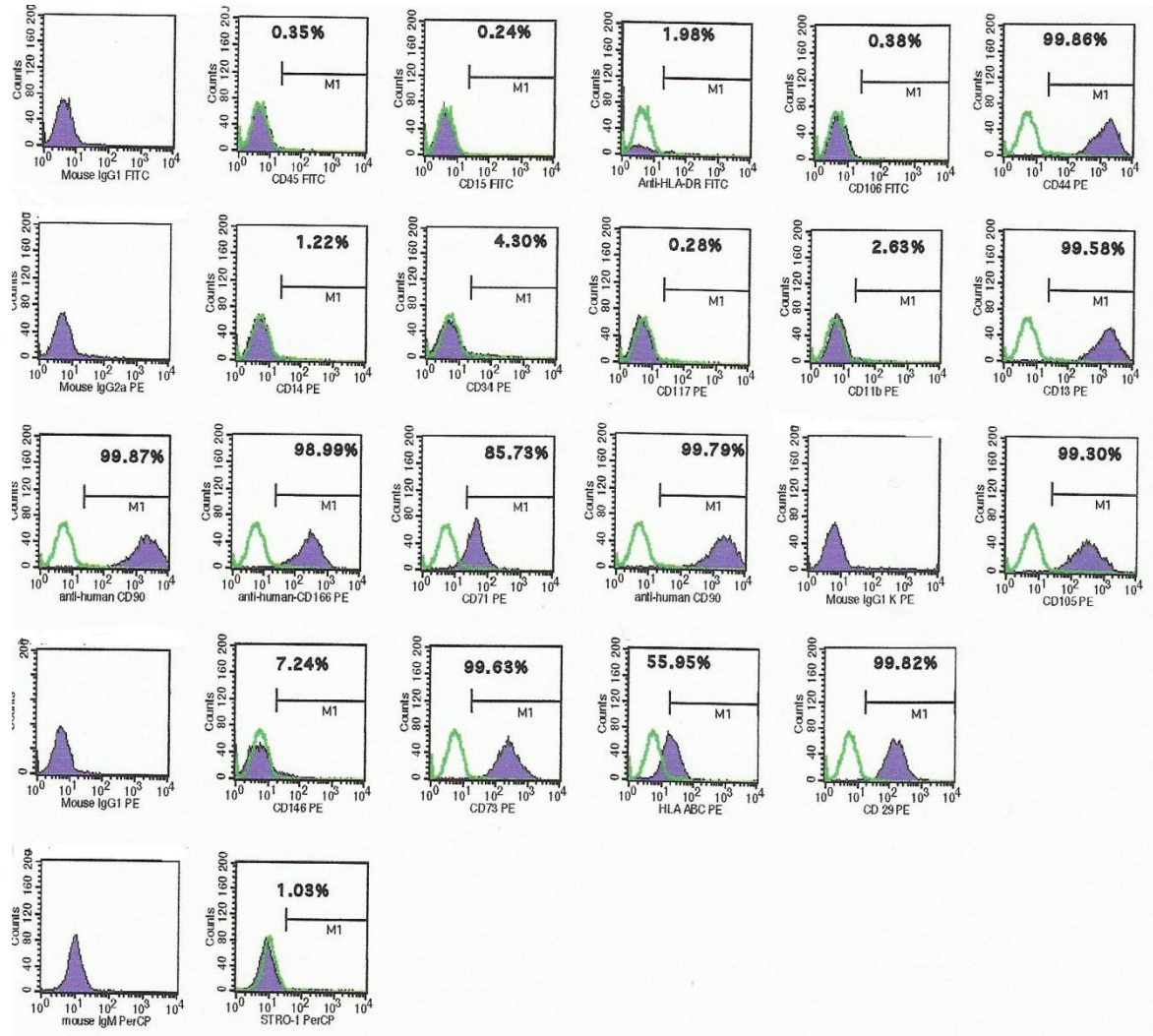
### 4.1. AD-MKH İzolasyonu ve Karakterizasyonu

İnsan lipoaspirat materyalinden elde edilen AD-MKH'lerin MKH olup olmadığını anlamak amacıyla, pasaj 0'dan itibaren invert mikroskop ile günlük gözlemler yapıldı. 3. Pasaja (P3) gelen hücreler P0'daki hücelere göre daha fazla MKH içereceği için, P3'teki hücrelerin akım sitometrik analizi yapılarak, bu hücreler kemik ve adipoz hücrelerine farklılaştırıldı.



**Şekil 4.1.** AD-MKH'lerin morfolojik görünüşleri. **A**-P0-1. gün, **B**-P1-4. gün ve **C**- P4-6.güne ait invert mikroskop görüntüleri (Orijinal Büyütme: A-X40, B-X200 ve C-X200)

P0'daki hücreler şekilde görüldüğü gibi toplanmış bir şekilde sanki hasar görmüş gibi görünmektedirler. Ancak ilerleyen pasajlarda diğer hücrelerin elemine olmasıyla MKH sayısı artmıştır. Böylelikle P3 ve P4'deki hücrelerde MKH morfolojisine benzer uzun, ince hücreler görülmektedir.

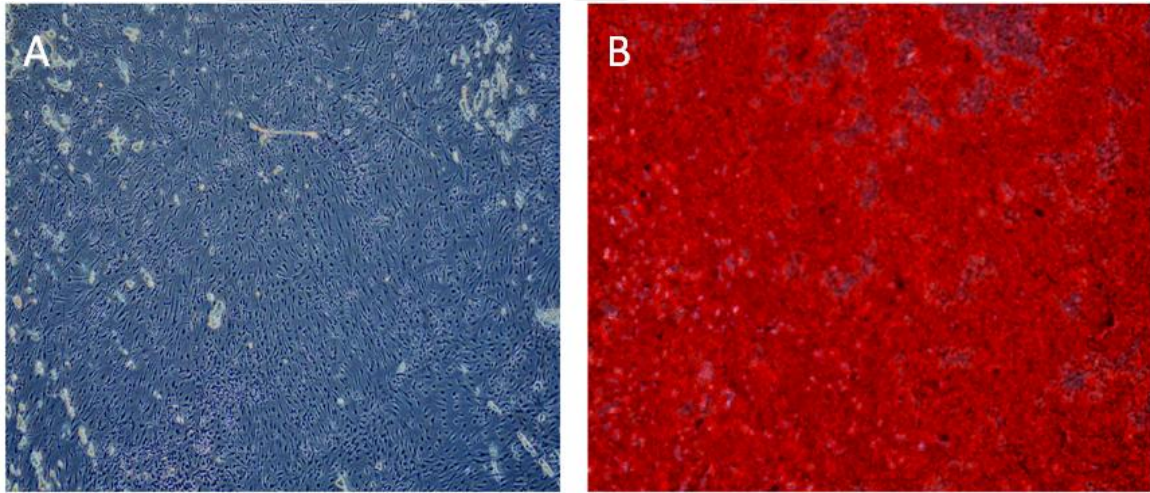


**Şekil 4. 2.** İnsan lipoaspirat materyalinden izole edilmiş MKH'lerin (P3) akım sitometri cihazında saptanan immunofenotipik özellikleri

Yapılan akım sitometri analizi sonucunda, AD-MKH'lerin yüzey belirteci olarak CD13, CD29, CD44, CD90, CD146, CD166, CD73, CD 71, CD105 ve HLA ABC yönünden pozitif; CD106, CD146, CD11b, CD14, CD15,CD34, CD45, CD117, HLA-DR ve STRO-1 açısından negatif oldukları gösterildi.

Daha çok immün sistem hücrelerinin yüzey antijenleri olan belirteçler negatif çıkmıştır. MKH yüzey belirteçlerinin pozitif çıkmasıyla bu hücrelerin MKH oldukları söylenebilir. Ancak bir başka çalışma ile de hücrelerin MKH olup olmadığı test edilmelidir. Bu hücreler en az iki farklı hücre çeşidine farklılaşıyorsa hücrelerin mezenkimal kaynaklı olduğu söylenebilir. Bunun için lipoaspirattan elde edilen hücrelere osteojenik ve adipojenik farklılaşma protokolleri uygulandı.

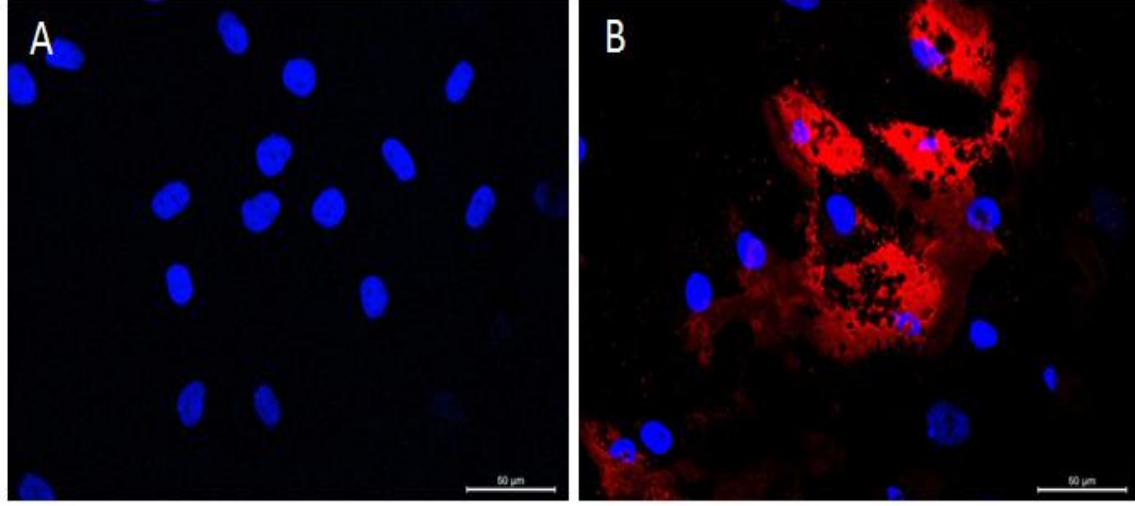
AD-MKH'lerin kemik hücrelerine farklılaşması sonucunda kalsiyum fosfat nodülleri biriktirdiği görülmektedir. Alizarin Red boyası kalsiyum fosfat nodüllerini kırmızıya boyamaktadır. Bu nedenle, 14 günlük kültürün sonunda hücreler sabitlenerek Alizarin Red ile boyandığında kalsiyum fosfat nodüllerinin boyanarak kırmızı renk aldığı görüldü (Şekil 4.3.B). Herhangi bir farklılaşma besiyeri uygulanmayan AD-MKH'lerin ise kalsiyum fosfat nodülleri biriktirmediği ve dolayısıyla da Alizarin Red boyası ile renk vermediği görüldü (Şekil 4.3.A).



**Şekil 4.3.** İnsan lipoaspirat materyalinden izole edilmiş MKH'lerin (P3) kemik farklılaşmaları **A-** Kontrol **B-** Osteojenik farklılaşma besiyeri ile inkübe edilmiş AD-MKH'ler (Alizarin Red Boyaması) (Orijinal Büyütme: X40).

Adipojenik farklılaşmaya alınan AD-MKH'lerin 14 günlük kültürün sonunda sabitlenerek Oil Red O ile boyandığında, deney grubunda oluşan adipoz veziküllerinin Oil Red O boyası ile kırmızı renk vermesi beklenmektedir. Adipojenik farklılaşmaya uğratılan hücrelerde adipoz vezikülleri oluşumu ve bu veziküllerin kırmızıya boyandığı görüldü (Şekil 4.4.B), herhangi bir farklılaşma besiyeri uygulanmayan AD-MKH'lerin

ise adipojenik farklılaşma ile ilgili herhangi bir indükleyici maddeye maruz kalmadığı için Oil Red O boyası ile renk vermediği görüldü (Şekil 4.4.A).



**Şekil 4.4.** İnsan lipoaspirat materyalinden izole edilmiş MKH'lerin (P3) adipoz farklılaşmalarının flouresan mikroskobu görüntüleri **A-** Kontrol **B-** Adipojenik farklılaşma besiyeri ile inkübe edilmiş AD-MKH'ler (Oil Red O Boyama).

#### 4.2. İnsan Göbek Bağından İzole Edilen Hyaluronik Asitin Karakterizasyonu

İzole edilen HA'in kuruma sonrasında toplamda 640 mg olduğu görüldü. Hyaluronik asit nem almayacak şekilde muhafaza edilerek -20°C'ye kaldırıldı.

Karakterizasyon amaçlı %1 HA çözeltisi hazırlandı ve 260 ve 280 nm'de picodrop cihazında absorbansı alınarak sırasıyla nükleik asit ve protein kontaminasyon yüzdesi belirlendi. Kontrol olarak >%98 saflıktaki (protein ihtivası %2'den az) horozibiği hyaluronik asidi (Sigma) kullanıldı.

Horozibiği HA'ı çift sarmal DNA: 16.7 ng/µL

Direkt protein: 0.2 mg/mL

A260/A280: 1.699

İzole edilen göbek bağı HA'ı çift sarmal DNA: 39.4 ng/µL

Direkt protein: 0.6 mg/mL

A260/A280: 1.349

Direkt protein miktarı dikkate alındığında izole edilen HA'nin protein ihtivası %6 ve saflık yüzdesi de yaklaşık olarak %94 olarak belirlendi. Referans olarak alınan horoz ibiği HA'nin protein içeriği ise; %2 olarak bulunmuştur. İzole edilen hyaluronik asitin ticari olarak satılan hyaluronik asitin saflığına yakın olduğu görülmektedir.

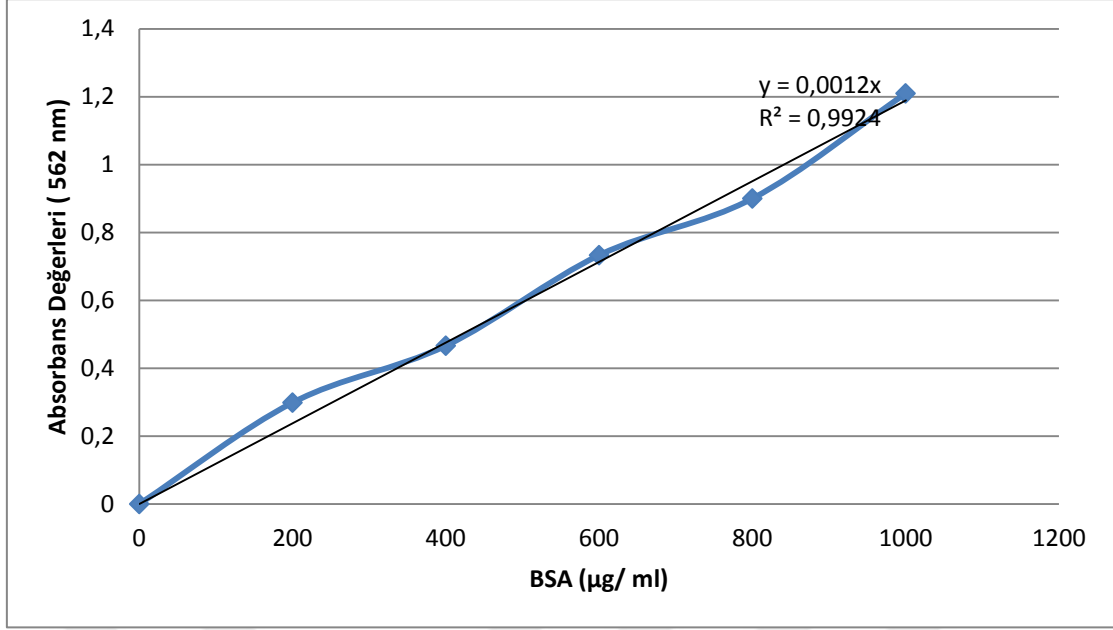
Buna ek olarak izole edilen HA'nin DNA ihtivası da horoz ibiği hyaluronik asidinin 2.4 katı olarak belirlendi.

HA içerisindeki protein yüzdesi BCA testi ile de belirlendi. İki sonuç değerlendirilerek daha sağlıklı bir değer elde edildi.

**Çizelge 4.1.** Göbek bağından ve horoz ibiğinden izole edilen HA'lerin BCA testi sonuçları

<b>Satın alınan horoz ibiği HA'i</b>		<b>Göbek bağından izole edilen HA</b>	
<b>Miktarı</b>	<b>Net absorbans değeri (562 nm)</b>	<b>Miktarı</b>	<b>Net absorbans değeri (562 nm)</b>
%1'lik çözelti	0,004	%1'lik çözelti	0,617
DF:2	0,004	DF:2	0,431
DF:5	0,003	DF:5	0,087

DF: Dilüsyon faktörü (Seyreltme faktörü)



Şekil 4.5. BSA proteini için BCA testi kullanılarak elde edilen kalibrasyon eğrisi

$y = 0,012x$  denklemine göre; her iki örnekteki % protein miktarları hesaplandı.

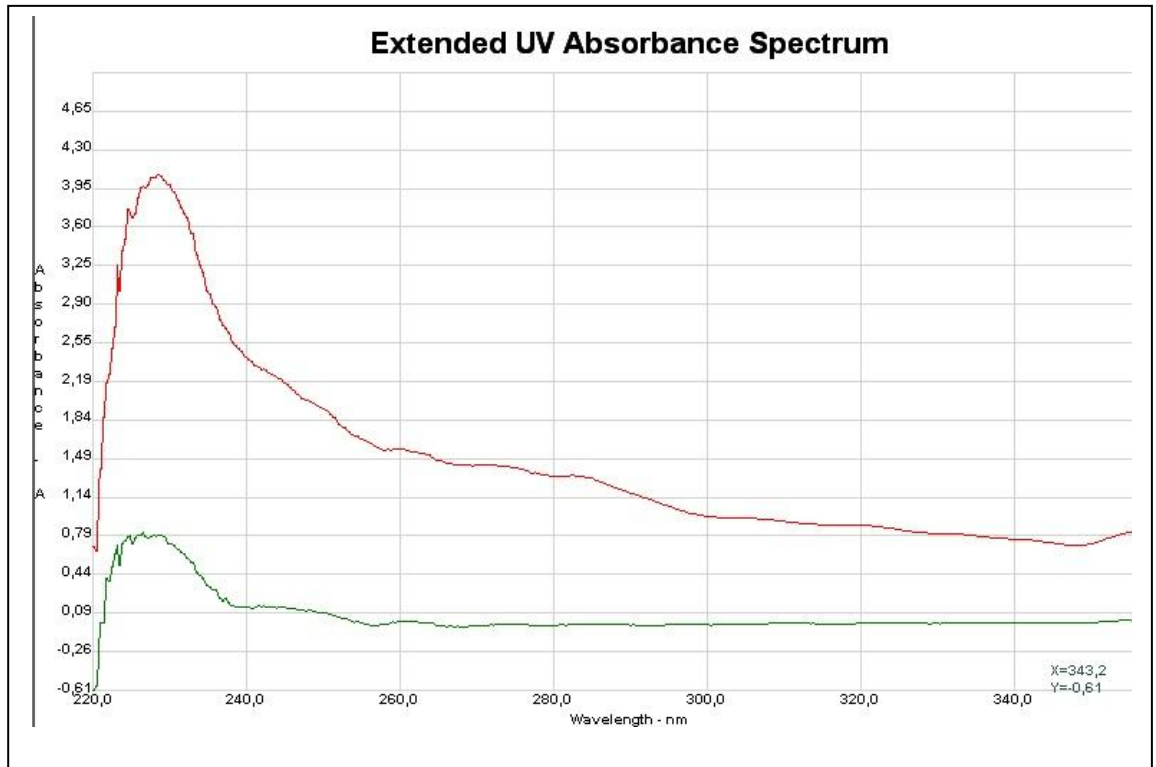
BCA testi sonuçlarına göre; göbek bağından ve horoz ibiğinden izole edilen HA içerisindeki protein miktarı Çizelge 4.2’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.2. BCA testine göre göbek bağından ve horoz ibiğinden izole edilen HA’lerin içerdikleri protein miktarları

Satın alınan horoz ibiği hyaluronik asiti		Göbek bağından izole edilen hyaluronik asit	
Miktarı	Protein miktarları (µg/ml)	Miktarı	Protein miktarları (µg/ml)
% 1’lik çözelti	6	% 1’lik çözelti	514
X2 kat seyreltik	3	X2 kat seyreltik	357
X5 kat seyreltik	4	X5 kat seyreltik	68

BCA testine göre BSA kalibrasyon eğrisi dikkate alındığında göbek bağından izole edilen %1'lik HA içerisindeki protein miktarı  $0,522 \pm 0,187$  mg/ml olarak bulundu, bu değer %5 proteine tekabül etmektedir. Yukarıda da görüldüğü gibi horoz ibiğinden elde edilen ticari olarak satılan HA'nın protein yüzdesi 0 denilebilecek şekilde oldukça düşük çıkmıştır.

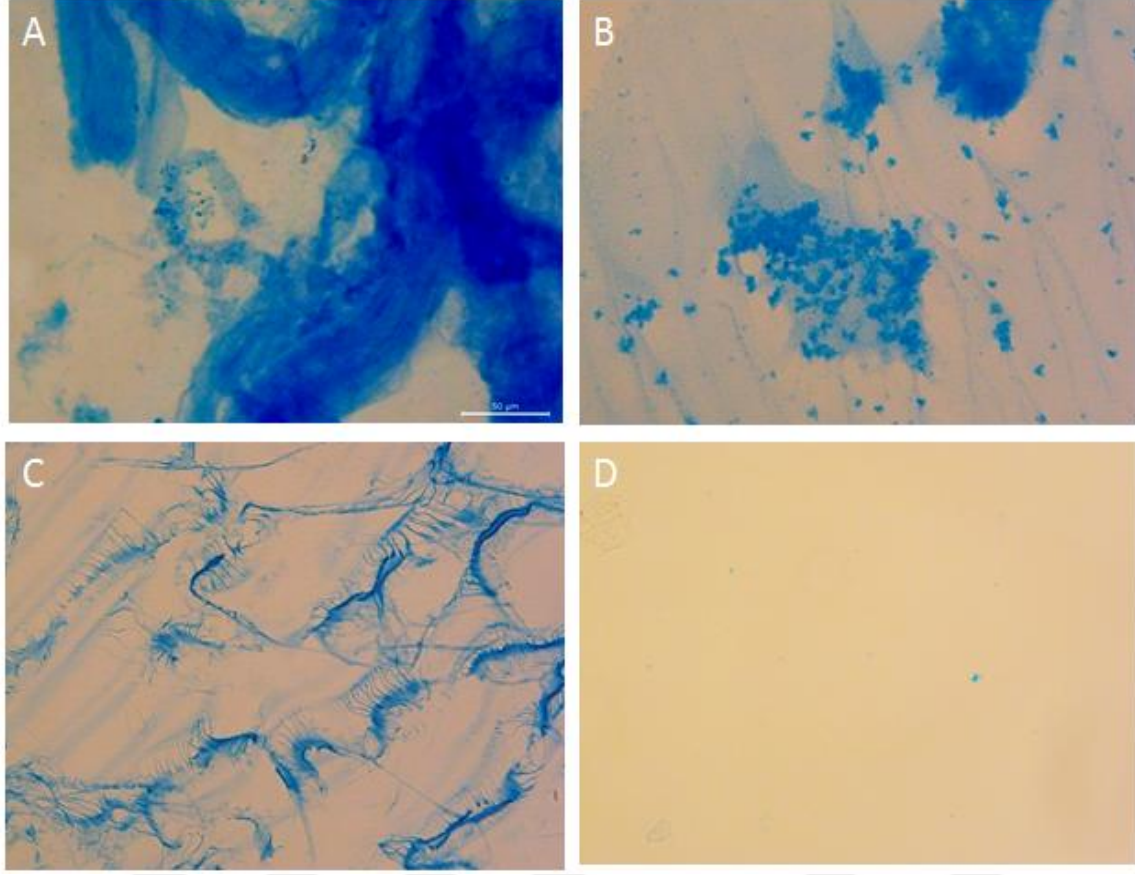
Yine picodrop cihazında aynı çözeltilerin UV bölgesinde karşılaştırmalı spektrumu alındı (Şekil 4.6). İki çözeltinin de benzer spektruma sahip olduğu saptandı.



**Şekil 4.6.** İzole edilen göbek bağı (kırmızı eğri) horoz ibiği (yeşil eğri) kaynaklı HA (satın alınan, %98 saflıkta) ile karşılaştırmalı UV bölgesi spektrumu

Aynı çözeltilerden cam slayt üzerine damlatılıp kurutmaya alındı ve bunun yanında göbek bağı dokusundan  $37^{\circ}\text{C}$ 'deki hücre kültür ortamına çıkan HA ve %6'lık jelatin solüsyonu örnekleri de kurutmaya alınarak, alsiyan mavisi ile boyandı. Sonrasında ışık mikroskopunda görüntülendi (Şekil 4.7). İzole edilen göbek bağı kaynaklı malzemenin maviye boyanması glikozaminoglikanların (GAG) varlığına bir kanıt olmuştur. Göbek bağında GAG içerisinde en çok HA bulunduğu için insan göbek bağından izole edilen hyaluronik asitlerin varlığı gösterilmiştir.





**Şekil 4.7.** Alsiyan mavisi ile boyanmış HA'nın ışık mikroskobu görüntüleri: **A-** Göbek bağı dokusundan 37 °C'deki hücre kültür ortamına çıkan, **B-** İzole edilen göbek bağı kaynaklı, **C-** Horoz ibiği kaynaklı HA (satın alınan, %98 saflıkta), **D-** Jelatin solüsyonu, negatif kontrol (Orijinal büyütme: X400)

### 4.3. İnsan Kan Plazmasından Fibrinojen İzolasyonu

Yaklaşık 600ml kan plazmasından 55 ml yoğunlaştırılmış fibrinojen elde edilmiştir. Her pellete 200 µl %0.9'luk NaCl eklendiği için 55 ml'lik fibrinojen solüsyonu içerisinde yaklaşık 10 ml salin çözeltisi bulunmaktadır. Yoğunlaştırılmış fibrinojen solüsyonu 100 kat seyreltilerek picodrop ile direkt protein miktarı ölçüldü ve yoğunlaştırılmış fibrinojen solüsyonu içerisindeki toplam protein miktarı 480 mg/ml olarak bulundu.

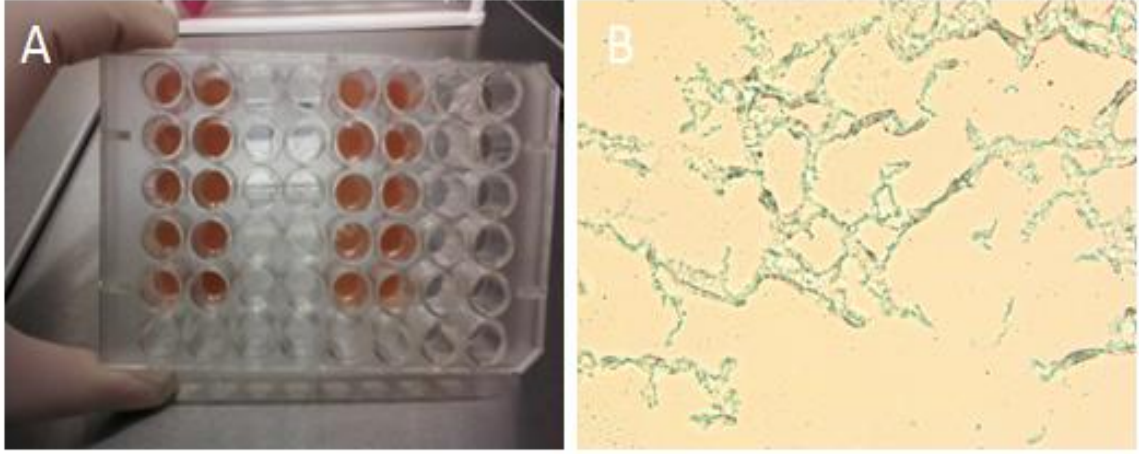
#### 4.4. Plazma ve HA/J Plazma Jellerin Üretimi ile İlgili Yapılan Çalışmalar

Öncelikle kan plazması ile jel üretme çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, +4°C'den alınan plazmalar 37 °C'de çözüldükten sonra farklı miktarlarda çapraz bağlanmış HA/J, CaCl<sub>2</sub>, trombin denenerek jel üretmeye çalışılmıştır (Çizelge 4.3).

**Çizelge 4.3.** Kan plazması ile plazma ve HA/J plazma jellerin üretimi için jel içeriğindeki maddelerin farklı oranlarda deneme çalışmaları

Kan plazması (µl)	HA/J (µl)	CaCl <sub>2</sub> (µl)	Trombin (µl)	Jel oluşumu
100	-	100	50 (40IU)	Jelleşme olmadı
200	-	100	50 (40IU)	Jelleşme olmadı
400	100	100	100 (20IU)	Saniyeler sonra küçük pıhtılaşmalar görüldü
400	100	100	50 (40IU)	Saniyeler sonra küçük pıhtılaşmalar görüldü
400	100	100	100 (40IU)	Saniyeler sonra küçük pıhtılaşmalar görüldü

Sonuçta kan plazmasından jel üretimi için fibrinojen miktarının az geldiğine karar verilerek soğuk uygulama ve etanol presipitasyonu yoluyla kan plazmasından yoğunlaştırılmış fibrinojen eldesi gerçekleştirilmiştir. Uygun kalınlıkta ve kolayca deforme olmayan HA/J plazma jellerin üretimi için yoğunlaştırılmış kan plazması fibrinojeni ile jel içeriğindeki maddelerden farklı oranlarda denemeler yapılmıştır. Jelleşmeyi sağlayan ajanlar en son koyulup işlemler hızlıca yapılarak homojen, parçalanmayan jeller üretildi.



**Şekil 4. 8.** HA/J plazma jel iskelelerin **A**-makro ve **B**-ışık mikroskobu görüntüleri (Orijinal Büyütme: X200).

#### **4.5. HA/J Plazma Jellerin Dayanıklılık Testi Çalışmaları**

HA/J plazma jellerin PBS içerisinde birkaç günde çözüldükleri görülmüştür. Estetik cerrahide hastaya transplante edilecek yapının hemen çözünmemesi gerekmektedir. Bu nedenle jellerin uzun süre çözünmemesi için jeldeki çapraz bağ sayısı artırılmalıdır. Bu çalışmada jellerin daha dayanıklı olması için ekstra bazı çapraz bağlayıcı ajanlar uygulanmıştır. Çizelge 3.1’de yapılan denemelerin sonucunda %1’lik GA solüsyonu ile jeller 30 dk bekletildiğinde çözünmenin uzun süre gerçekleşmediği görülmüştür. 45 gün PBS içerisinde bekletilen GA ile çapraz bağlı jellerin çözünmediği saptanmıştır. Diğer çapraz bağlayıcı ajanların etkisiyle ise jellerin kısa sürede çözüldüğü görülmüştür (Çizelge 4.4). GA müdahalesinin ardından açık kalan uçların kapatılması için jeller bir aminoasit olan glisin çözeltisinde bekletimiştir. Sonrasında HBSS tampon çözeltisi ile jeller birkaç gün yıkandı ve HBSS’de fenol kırmızısı indikatörü bulunduğu için yıkama için özellikle bu çözelti kullanıldı. GA fiksatif bir madde olduğu için jel içerisinde bulunduğu taktirde hücrelere toksik etki yapar. Bu amaçla yıkama sıvısının rengi sarıdan pembeye dönünceye kadar birkaç gün jeller HBSS ile yıkandı. GA asidik olduğu için fenol indikatörünün pembeye dönmesi asidik maddenin elemine olduğunu gösterecektir.

**Çizelge 4.4.** HA/J plazma jellerin dayanıklılığının artırılması çalışmaları sonucunda jelde meydana gelen değişiklikler

Çapraz bağlayıcı ajan adı	Jellerin çapraz bağlayıcı ajanda kalma süreleri	Stabilizasyon sonrası jelde meydana gelen değişiklikler
PBS (*)	-	1 gün içerisinde jel tamamen çözünmektedir.
EDS/NHS	2 sa	Çözünme olmadı ancak, jelde küçülme meydana geldi.
EDS/NHS	16 sa	Birkaç gün içerisinde jel çözüldü.
EDC/EtOH	2 sa	Birkaç gün içerisinde jel çözüldü.
EDC/EtOH	16 sa	Birkaç gün içerisinde jel çözüldü.
GA	5 dk	Hafif çözünmeler görüldü, jelin bazı bölgeleri daha ince ve saydam oldu.
GA	15 dk	Birkaç gün içerisinde çözünme olmadı ancak 30 dk bekleme süresi ile yapısı daha dayanıklı jeller meydana geldiği için bu süre seçilmemiştir.
GA	30 dk	Jelin rengi diğer çapraz bağlayıcı ajanların müdahalesine göre daha koyu oldu ve çözünme olmadı.

(\*) :çapraz bağlayıcı ajan ile müdahale edilmeden PBS içerisine koyulmuştur.

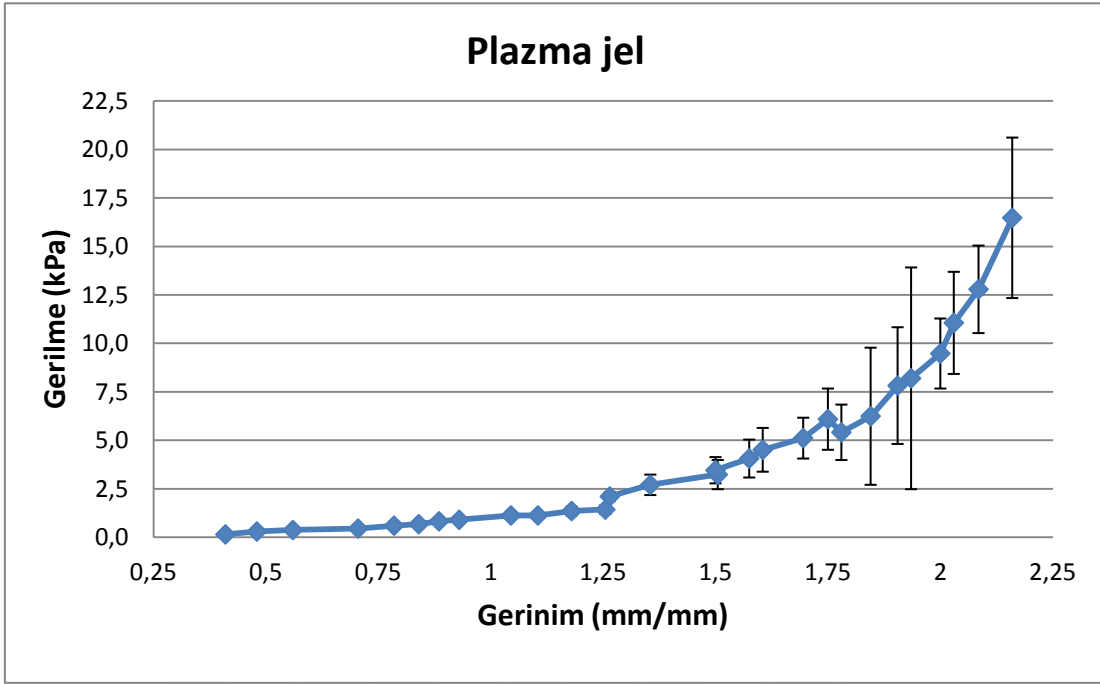
EDC/NHS: 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide/N-Hydroxysuccinimide

EtOH: % 70'lik etanol, GA: Gluteraldehit

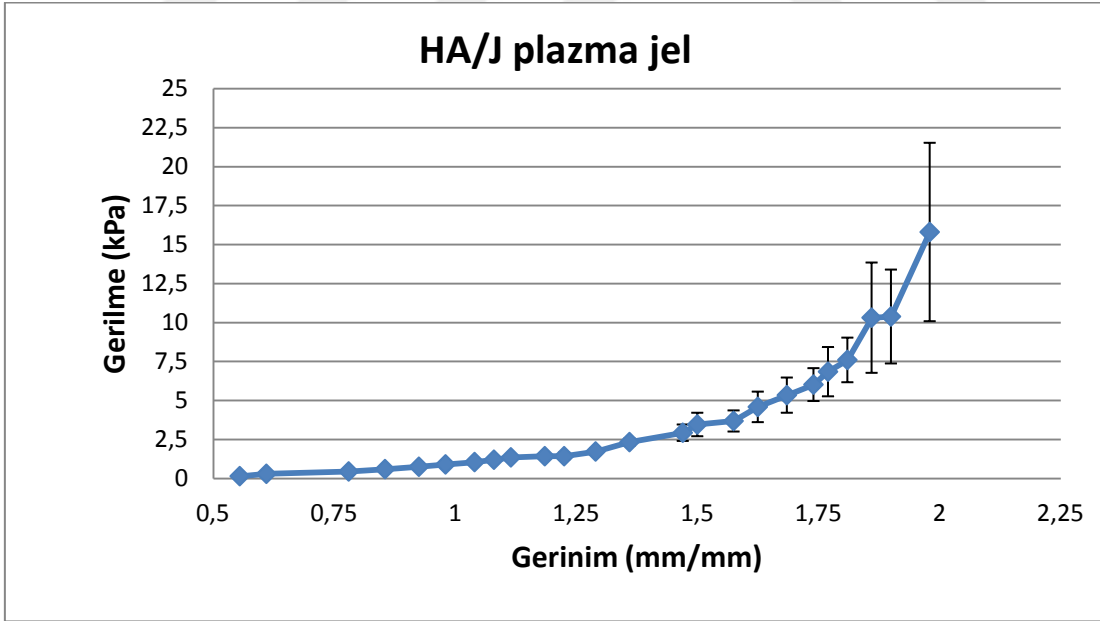
## 4.6. HA/J Plazma ve Plazma Jellerin Karakterizasyonu

### 4.6.1. Mekanik Test

Plazma ve HA/J plazma jellerin elastik modülünü hesaplamak amacıyla sıkıştırma testi yapıldı. Elastik modül gerilme ve gerinim grafiğinin doğrusal kısmının eğiminden hesaplanmaktadır ( Şekil 4. 9 ve 4. 10).



Şekil 4. 9. Plazma jellerinin gerinim-gerilme grafiği



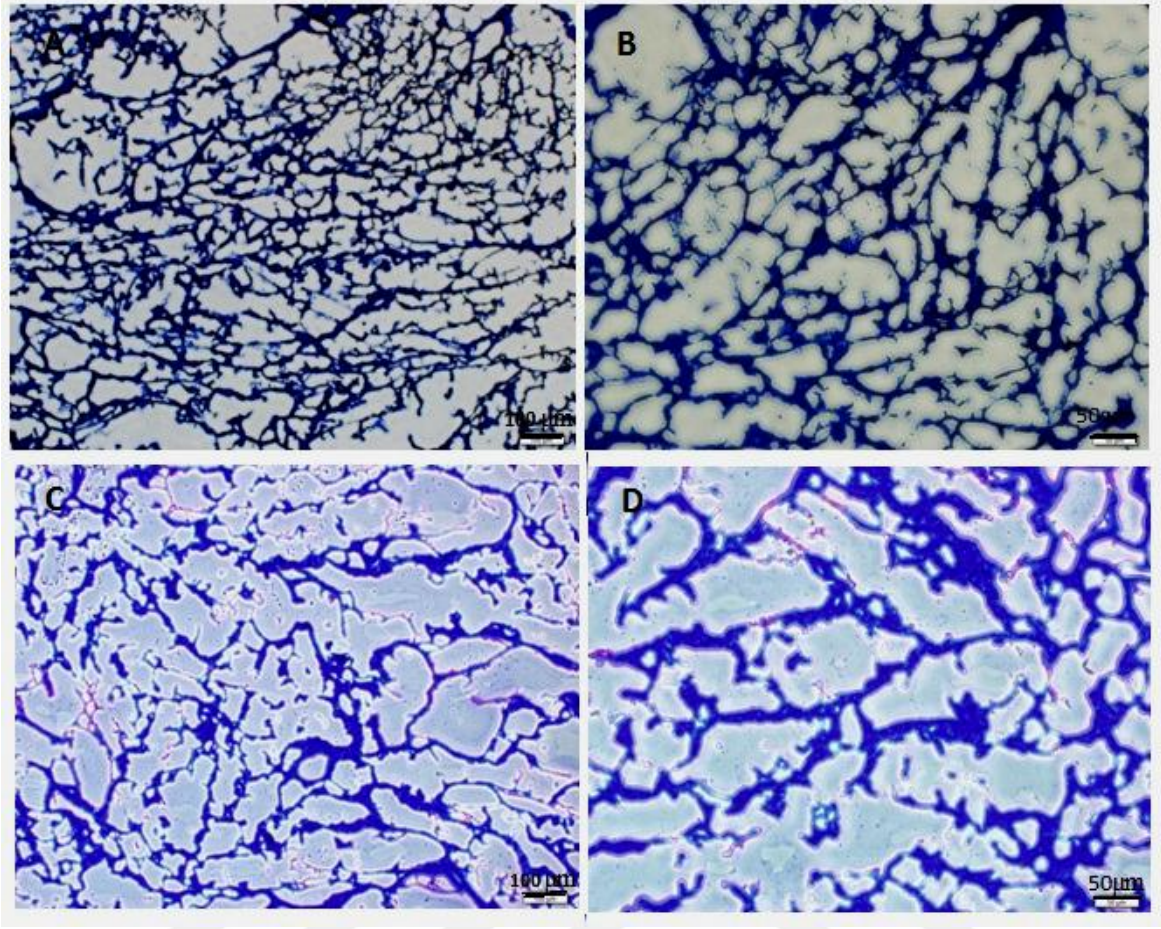
Şekil 4. 10. HA /J plazma jellerinin gerinim-gerilme grafiği

Şekil 4. 9 kullanılarak plazma jellerin elastik modülleri  $2.14 \pm 0.045$  kPa ve Şekil 4.10 kullanılarak HA/J plazma jellerin elastik modülleri ise  $3.53 \pm 0.23$  kPa olarak bulundu.

HA ve jelatinin jele eklenmesi jelin elastik modülünün artmasına neden olmuştur. HA/J jellerin elastik modülünün yumuşak doku mühendisliğine uygun olduğu belirlenmiştir.

#### 4.6.2. Jellerin Gözenekliliği ve Gözenek Çapı

10µm kalınlığında alınan kriyokesitler komasi mavisi ile boyanarak jellerin gözenekliliği ve gözenek çapı hesaplandı. Scion Image programı ile HA/J plazma jellerin gözenekliliği %72.05±5.85, plazma jellerin ise gözenekliliği %63.86±4.27 olarak hesaplandı. Buradan HA/J plazma jellerin daha gözenekli bir yapıya sahip olduğu söylenebilir. HA ve jelatin ilavesi gözenekliliği arttırmıştır. Plazma ve HA/J plazma jellerin gözenekleri Şekil 4.11 de görüldüğü gibi küre gibi değildir. Gözenek boyutu ile ilgili bir fikir edinmek amacıyla gözeneklerin enine uzunlukları alındı ve HA/J plazma jellerin ortalama gözeneklerinin çapı 133±20 µm iken, plazma jellerin gözenek çapları 58±9 µm olarak hesaplandı. Buradan HA/J plazma jellerin gözeneklerinin daha büyük olduğu saptandı. İskelede gözenek büyüklüğünün hücreler arası iletişim, besiyeri ulaşımı, hücrelerin iskelenin diğer bölgelerine yayılabilmesi gibi birçok etkisi vardır. HA ve jelatin ilavesi ile gözenek çapı daha büyük iskelelerin elde edilmesi, HA/J plazma jellerin doku mühendisliği uygulamalarında plazma jele göre daha uygun olduğunu göstermektedir. Ayrıca, plazma jellerde gözenek çeperi daha ince olduğu için bu jellerin *in vivo* ortamda çok daha fazla çökeceği ve deforme olacağı tahmin edilmektedir.



**Şekil 4.11.** Komasi mavisi ile boyanan plazma ve HA/J plazma jellerin mikroskopik görüntüleri **A-**Plazma jel, **B-** Plazma jel, **C-** HA/J plazma jel, **D-** HA/J plazma jel (Orjinal büyütme: **A-**X100, **B-**X200, **C-**X100 ve **D-**X200)

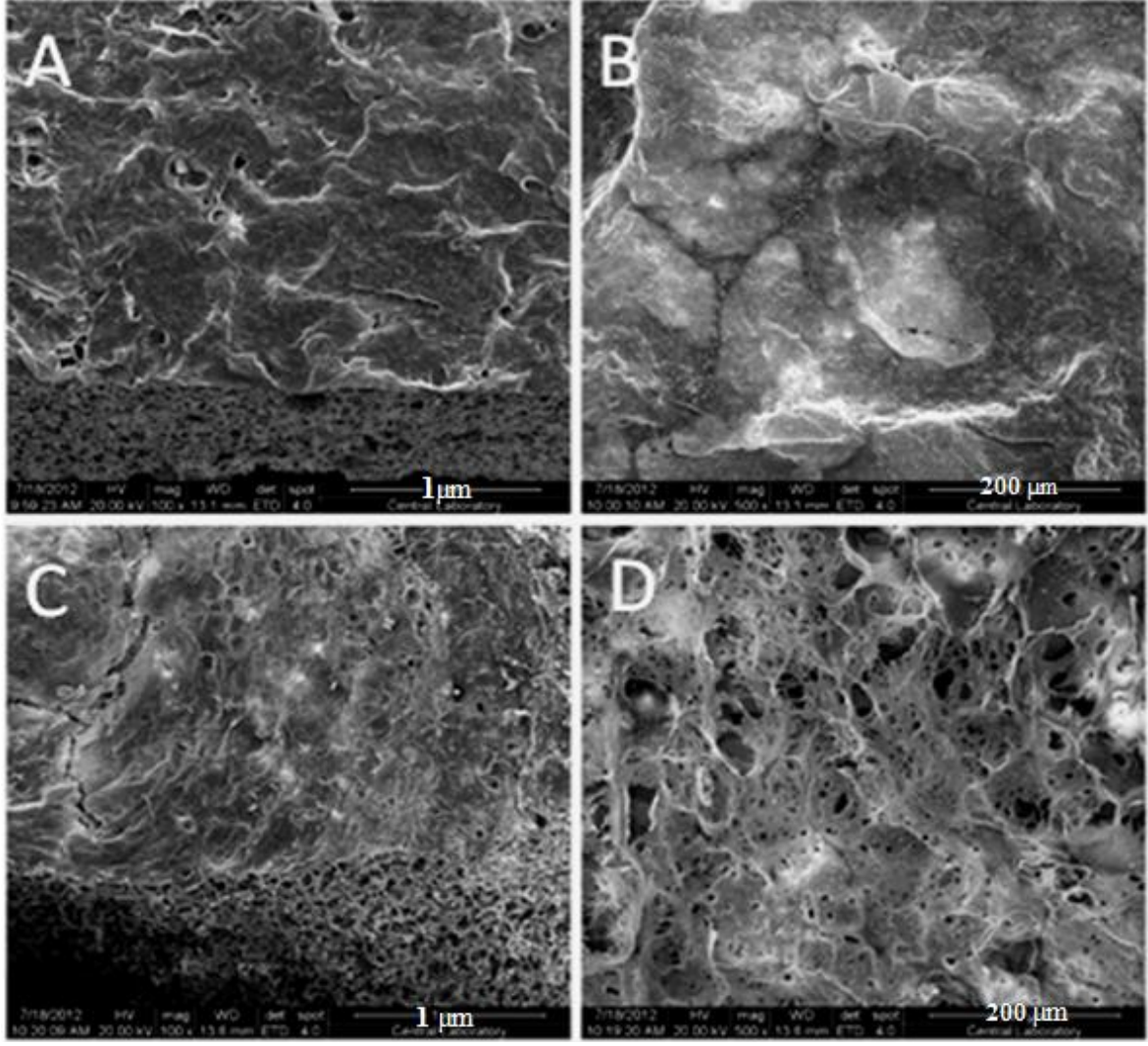
#### 4.6.3. Elektron Mikroskobu Görüntüleri

Plazma ve HA/J plazma jeller üretilip GA ile stabilize edildikten sonra birkaç gün yıkandı ve jeller SEM için hazırlandı. Jellerin üst ve yan kesitten iç kısmı SEM ile incelenerek fotoğrafları çekildi (Şekil 4.12). Şekilde de görüldüğü gibi her iki jelde de iç kısımda fibriller yapı ve gözenekli yapı izlenmektedir. HA/J plazma jelin üst yapısının diğer jele göre daha gözenekli bir yapı gösterdiği görülmektedir. Fibrin fibriller bir yapı olduğu için HA/J bu fibriller yapının açılarak gözenekli bir yapı olmasını sağlamıştır. Doku mühendisliği uygulamalarında iskelenin gözenekliliği ve gözenek çapının fazla olması istenmektedir. Bu durumda HA/J plazma jellerinin yumuşak doku mühendisliğine daha uygun olduğu söylenebilir.

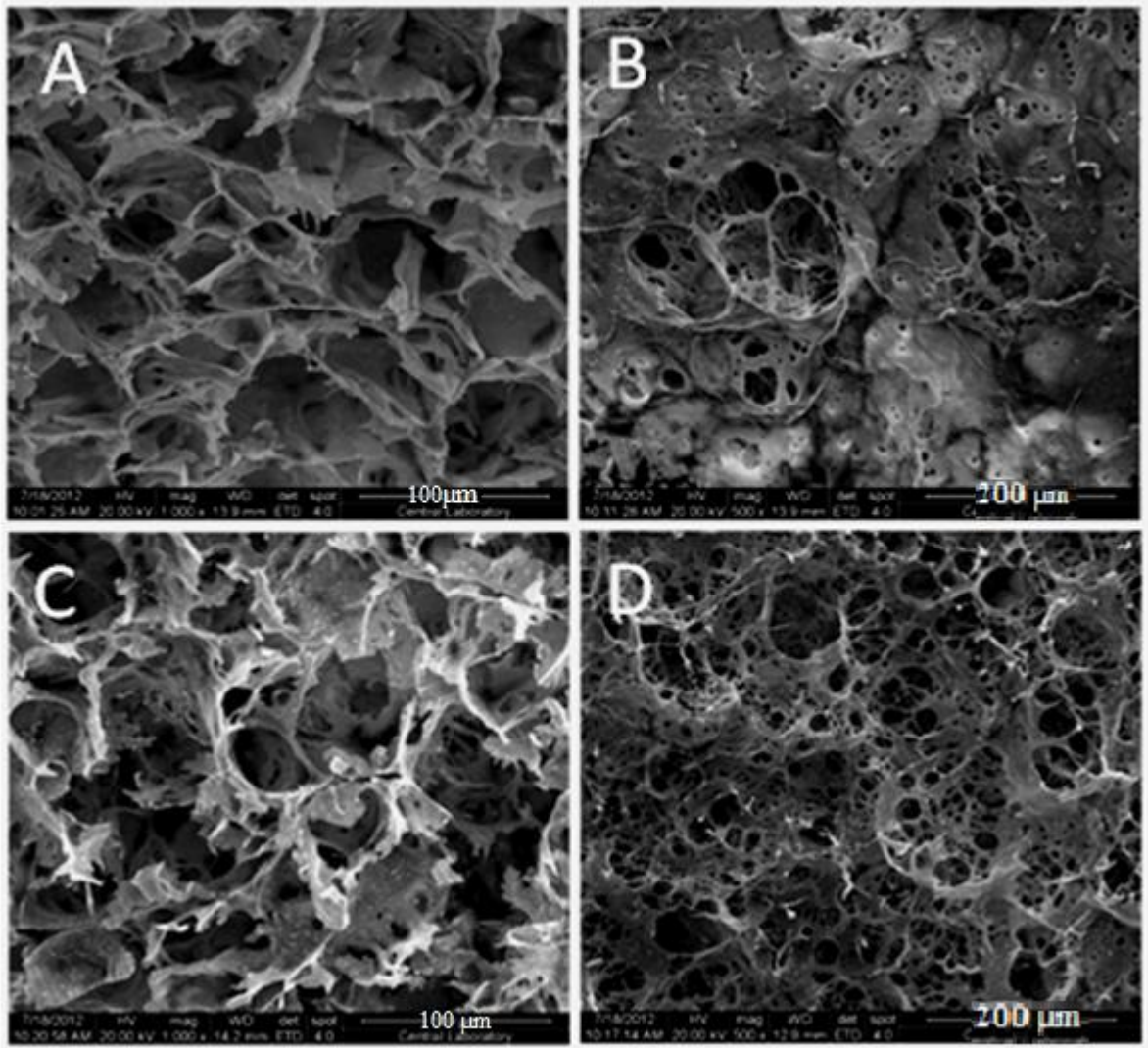
HA/J plazma jellerinin alt ve iç kısmından alınan kesitler incelendiğinde plazma jele göre yine daha gözenekli bir yapıda olduğu görülmektedir (Şekil 4.13). Şekil 4.13-B'de plazma jelin alt kısmının bazı yerlerinde gözenek boyutu büyükken bazı yerlerde gözenek boyutu çok küçüktür, bazı yerlerde ise hiç gözenek görünmemektedir. Başka bir deyişle, plazma jelin alt yüzeyi homojen bir görünüm sergilemezken HA/J plazma jellerin yapısındaki gözenekli yapı daha homojen bir görünümde dir.

HA/J plazma jellerin üst kısmına AD-MKH'ler ekilerek 21 gün boyunca kültüre edildi ve SEM için hazırlandı. 21 gün boyunca hücre siz besiyerine bırakılan jellerin 1 gün besiyerine bırakılan jellerden daha büyük gözenek çapına sahip olmasına rağmen, hücreli jellerde bu gözenek çapı artışının daha fazla olduğu görülmektedir (Şekil 4.14). Üzerinde hücre bulunan jellerin kültürün ilerleyen günlerinde gözenek çapının büyümesinin nedeni, hücrelerin enzim salgılarıyla jeli bir miktar parçalamasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

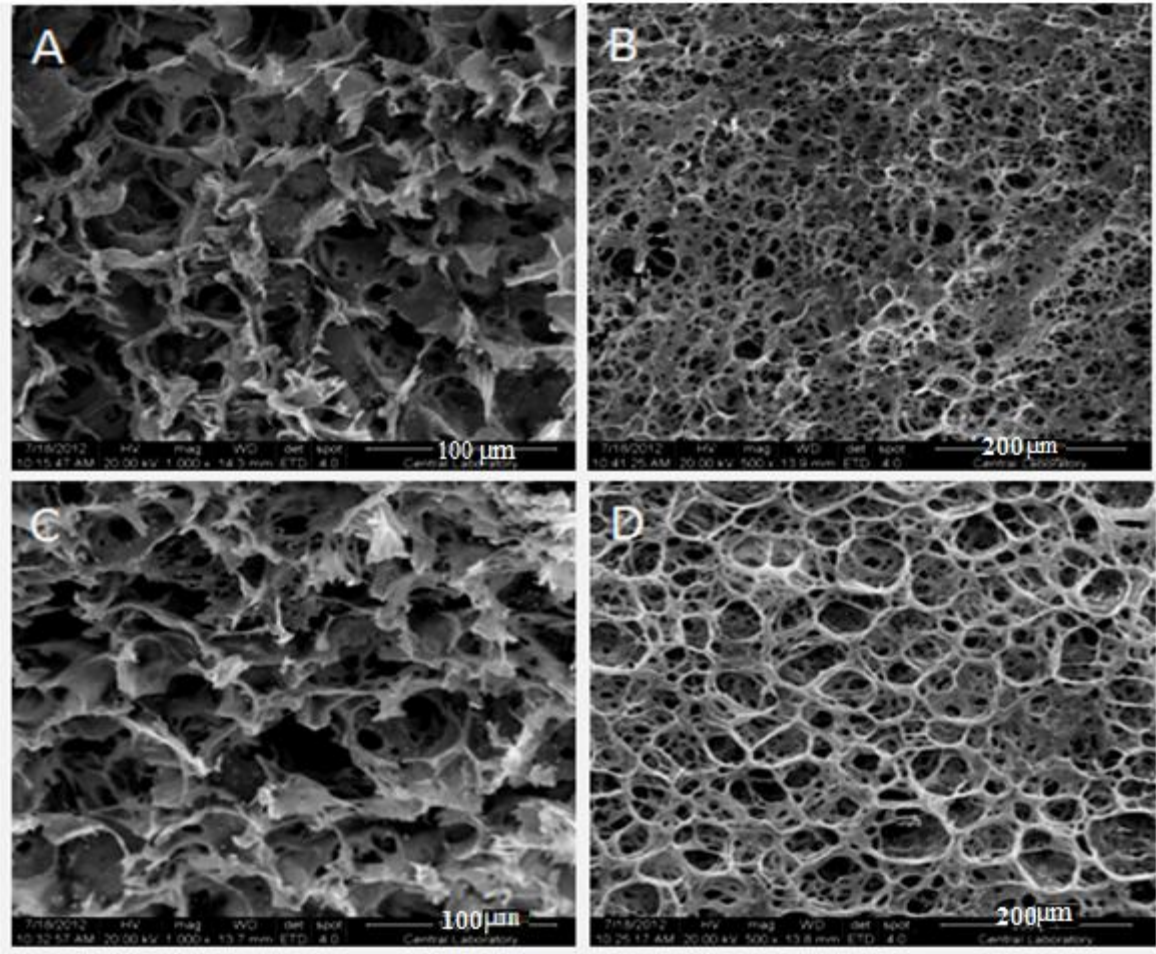




**Şekil 4.12.** Plazma ve HA/J plazma jellerin SEM mikrofotografaları **A**-Plazma jelin üstten iç kısmı, **B**-Plazma jelin üst kısmı, **C**-HA/J plazma jelin üstten iç kısmı, **D**-HA/J plazma jelin üst kısmı



**Şekil. 4.13.** Plazma ve HA/J plazma jellerin SEM mikrofotografaları **A**-Plazma jelin iç kısmından bir kesit, **B**-Plazma jelin alt kısmı, **C**-HA/J plazma jelin iç kısmından bir kesit, **D**-HA/J plazma jelin alt kısmı

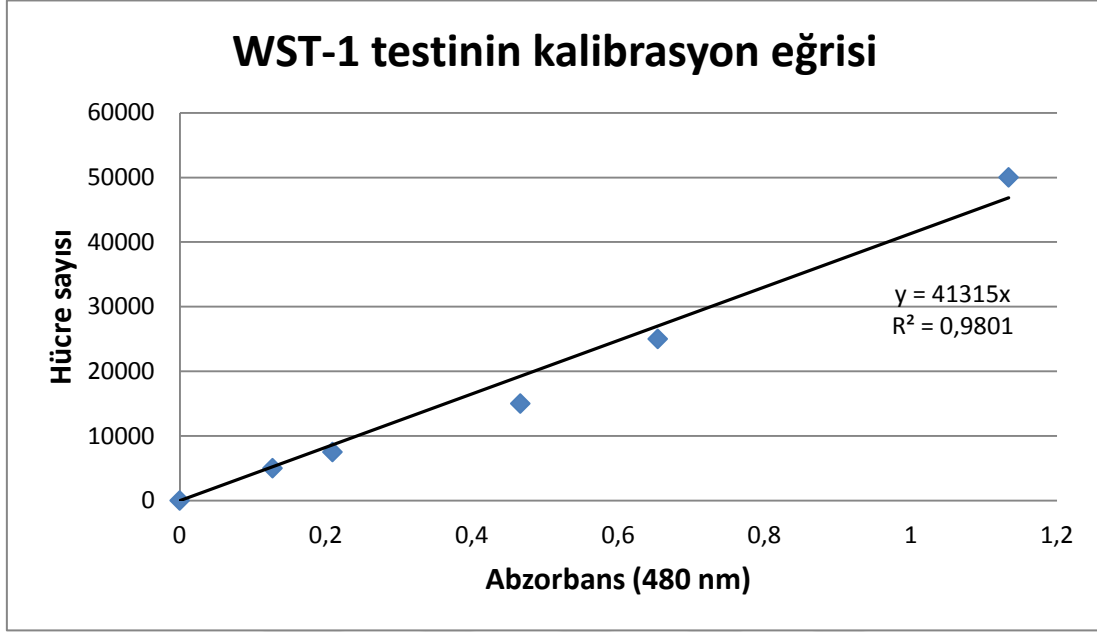


**Şekil 4.14.** Hücre yüklenmiş ve hücresiz HA/J plazma jellerin SEM mikrofotoğrafları ( 21.gün) **A-** Hücresiz HA/J plazma jelin üst kısmı, **B-** Hücresiz HA/J plazma jelin iç kesiti, **C-**AD-MKH yüklenmiş HA/J plazma jelin üst kısmı, **D-**AD-MKH yüklenmiş HA/J plazma jelin iç kesiti

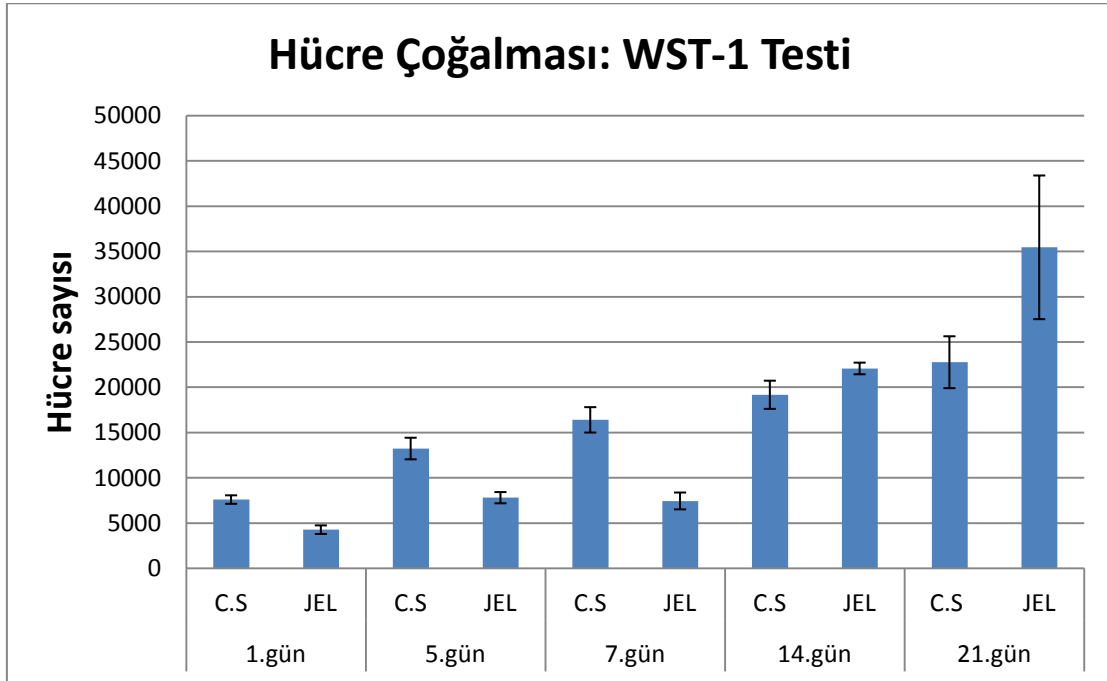
#### **4.6. HA/J Plazma Jel Üzerine Ekilen MKH'lerin Canlılığının ve Çoğalma Miktarının Belirlenmesi**

HA/J plazma jellerin üretiminde stabilizasyon amacıyla GA kullanıldığı için bu uygulamanın hücreler üzerinde toksik bir etkisinin olup olmadığını anlamak amacıyla WST-1 testi yapıldı. Cam slayt ve jel üzerine ekilen hücrelerin kültürdeki 1., 5., 7., 14. ve 21. gündeki hücre sayıları belirlendi. Bütün jel ve cam slaytlara  $7.5 \times 10^3$  hücre ekildi (jel ve cam slaytların çapları yaklaşık olarak aynıdır). Ayrıca, absorbans-hücre sayısı arasındaki bağıntıyı verecek olan kalibrasyon eğrisinin oluşturulması amacıyla 48

kuyucuklu plakalara belirli sayılarda hücre ekimi yapılarak, bu hücelere WST-1 testi uygulandı (Şekil 4.15). Bu eğrinin eğimi kullanılarak kültürün değişik günlerinde alınan jel ve cam slayt üzerindeki hücre miktarları hesaplandı (Şekil 4.16).



Şekil 4. 15. AD-MKH'lerin WST-1 testi ile oluşturulan kalibrasyon eğrisi



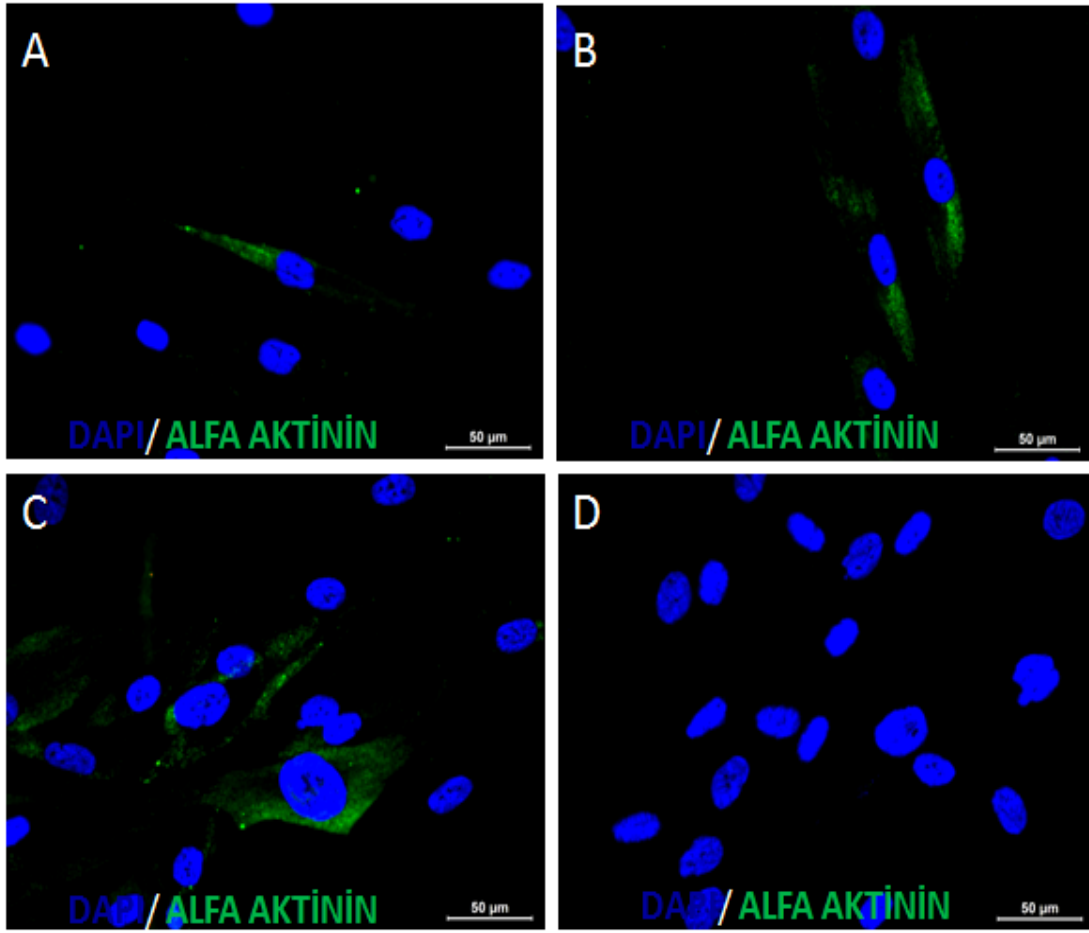
Şekil 4.16. HA/J plazma jel ve cam slayt (C.S) üzerine ekilen AD-MKH'lerin farklı günlerdeki hücre sayıları

Kültürün birinci gününde WST-1 testi yapılan jel ve cam slayt üzerindeki hücrelerin miktarının cam slayt üzerinde daha fazla olduğu görüldü. Ancak Şekil 4.16 'da görüldüğü gibi kültürün ilerleyen zamanlarında jel üzerinde bulunan hücre sayısı artmıştır. Jel ve cam slayt üzerinde bulunan hücre sayıları SPSS programı ile student t testi yapıldığında istatistiksel olarak 1., 5., 7.,14. ve 21. günlerdeki jel ve cam slayt üzerindeki hücre sayılarının birbirinden farklı olduğu bulundu ( $p<0.05$ ).

#### **4.8. HA/J Plazma Jel Üzerine Ekilmiş İnsan AD-MKH'lerin Kardiyomiyojenik Farklılaşmasının İncelenmesi**

##### **4.8.1. Cam Slayt Üzerine Ekilmiş AD-MKH'lerin Kardiyomiyojenik Farklılaşmasının İncelenmesi**

Cam slayt üzerine ekilen AD-MKH'lere kardiyomiyojenik farklılaşmaya neden olabileceği düşünülen üç farklı besiyeri 21gün boyunca uygulandı. Kontrol besiyeri olarak farklılaşma faktörlerini içermeyen besiyeri kullanıldı. 21.gün sonunda hücreler sabitlenerek immunflouresan olarak anti  $\alpha$ -aktinin ile boyandı (Şekil 4.17). Böylelikle kas hücrelerine spesifik antikor olan anti  $\alpha$ -aktinin ile hücrelerin kas yönüne doğru farklılaşmaya yönelip yönelmediği anlaşılmaya çalışıldı.



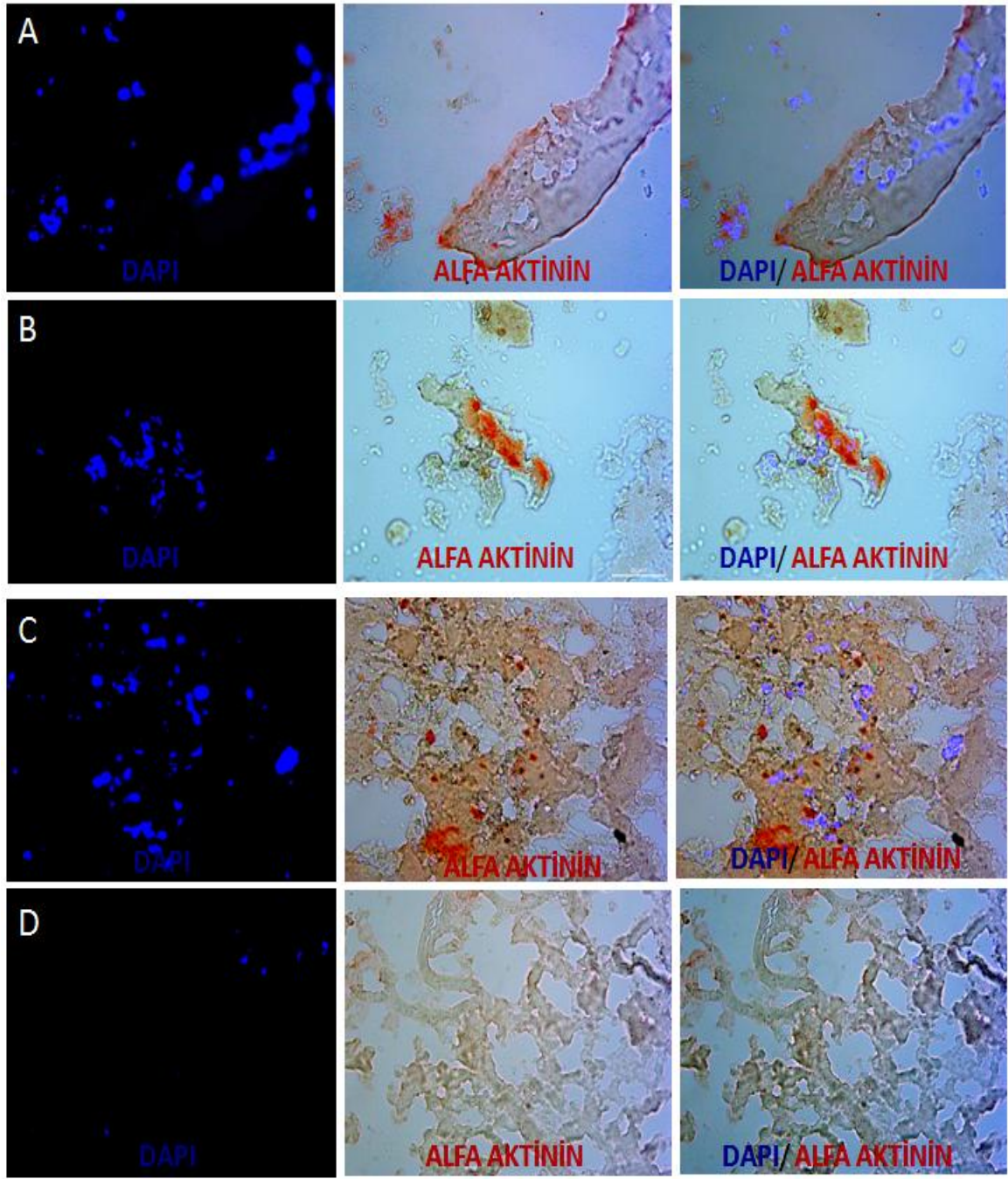
**Şekil 4.17.** Kardiyomiyojenik farklılaşma uygulanan AD-MKH'lerin  $\alpha$  aktinin için immün boyaması. **A**-BMP-4 içeren besiyeri, **B**-Valproik asit içeren besiyeri, **C**- BMP-4/valproik asit içeren besiyeri, **D**-Kontrol besiyeri ile kültüre alınan AD-MKH'ler

Anti- $\alpha$  aktinin antikoruna ile pozitif boyanmada çizgisel yapılar olması gerekmektedir. Ancak, Şekil 4.17'de de görüldüğü gibi çok az bir boyanma görülmektedir. Bu üç farklılaşma besiyerinden birini seçmek için yapılan bu çalışmada diğer iki besiyerinin karışımı olan BMP-4/valproik asit farklılaşma besiyeri seçildi. Literatürde BMP-4 ile yapılan farklılaştırma çalışmalarına valproik asitte eklenerek farklı bir kardiyomiyojenik farklılaşma besiyeri uygulandı.

## **4.8.2. HA/J Plazma Jel Üzerine Ekilmiş AD-MKH'lerin Kardiyomiyojenik Farklılaşmasının İncelenmesi**

### **4.8.2.1. İmmunohistokimyasal boyamalar**

HA/J plazma jel ve cam slayt üzerine ekilen AD-MKH'ler 3 farklı kardiyomiyojenik farklılaşma besiyeri ve kontrol besiyeri ile inkübe edildi. 21. günde hücreler sabitlenerek jellerden kriyokesitler alındı. Cam slayt ve kriyokesitleri anti  $\alpha$ -aktinin ve troponin T ile immunohistokimyasal boyamaları yapıldı (Şekil 4.18). Cam slayt üzerindeki hücrelerin boyama sonucunda bu proteinleri içermedikleri görüldü (veriler verilmemiştir).

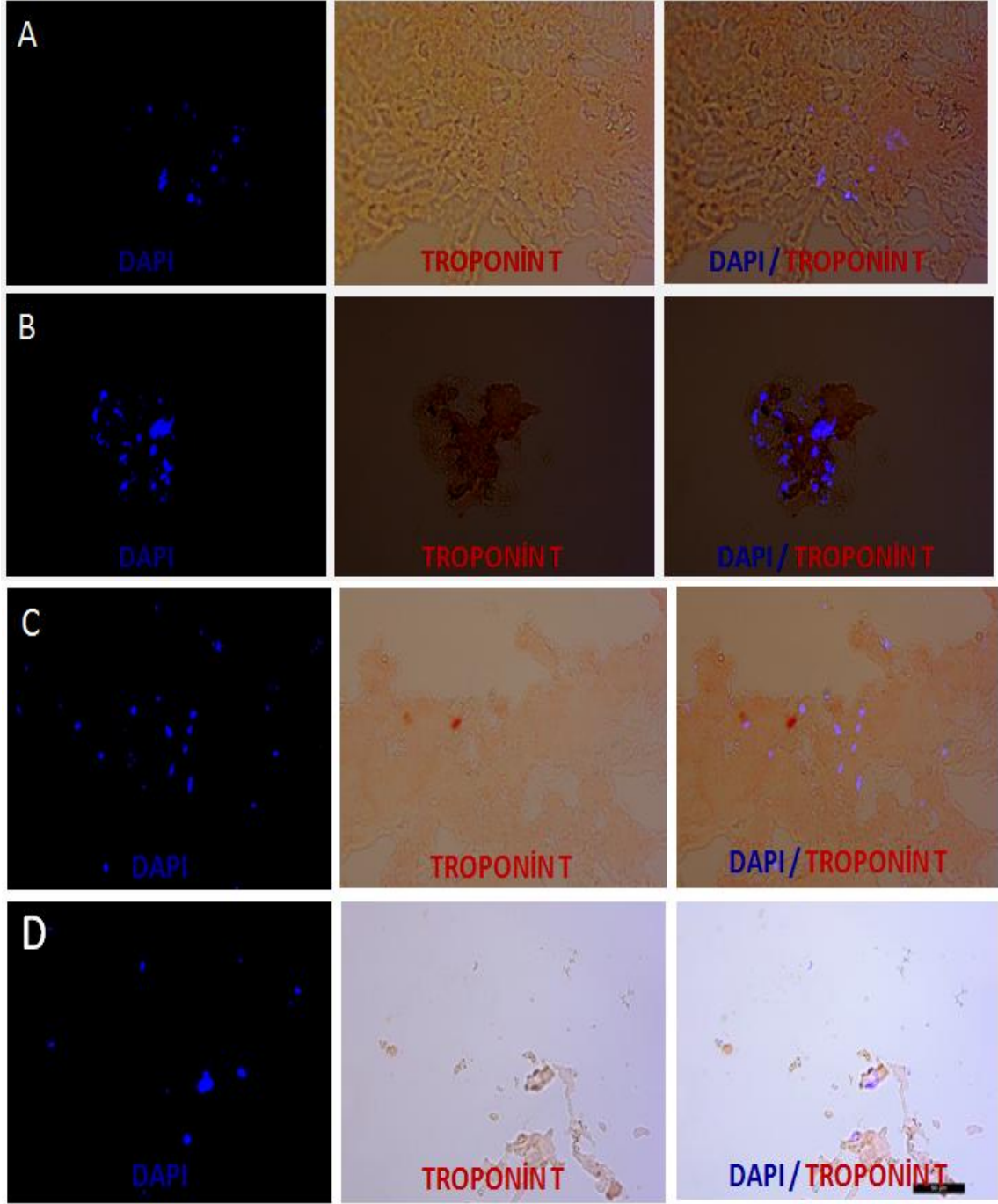


**Şekil 4.18.** Kardiyomyojenik farklılaşma uygulanan HA/J plazma jel üzerinde bulunan AD-MKH'lerin  $\alpha$  aktinin için immün boyaması **A-** İnsülin/valproik asit içeren besiyeri, **B-** 5-azasitidin içeren besiyeri, **C-** BMP-4/valproik asit içeren besiyeri, **D-** Kontrol besiyeri ile kültüre alınan AD-MKH'ler (Orijinal büyütme: X200)



Jel üzerindeki MKH'lerin kardiyomyojenik farklılaşma sonucunda protein seviyesinde ekspresyonlarını değerlendirmek amacıyla kaslara özgün olan anti- $\alpha$  aktinin ve troponin T (Şekil 4.19) antikoları ile boyandığında net görüntüler elde edilemedi. Çok az kırmızıya boyanmalar görüldü. Şekil 4.18 ve 4.19 incelendiğinde alfa aktinin immün boyanmanın troponin T antikoruyla göre daha iyi bir sonuç verdiği söylenebilir ki bunun nedeni alfa aktininin bütün kas çeşitlerinde bulunan bir antijen olması olabilir. Hücrelerdeki farklılaşma oranlarını net bir şekilde saptamak için gerçek zamanlı PZR yapıldı.

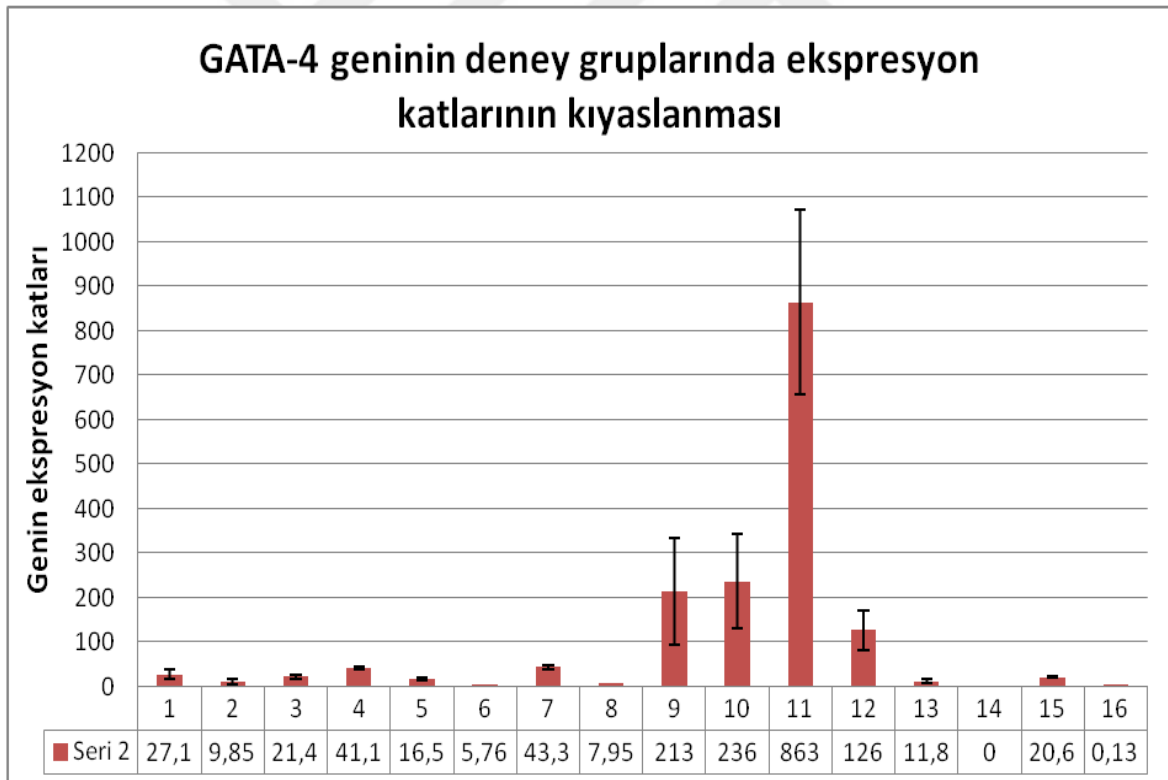




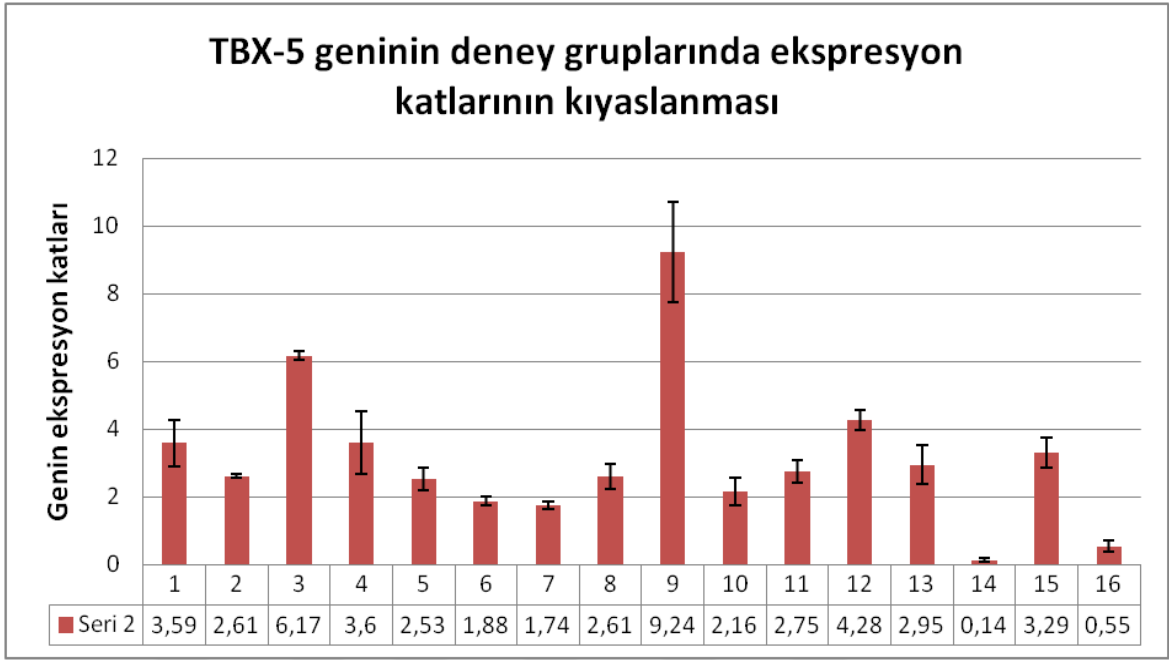
**Şekil 4.19.** Kardiyomiyojenik farklılaşma uygulanan HA/J plazma jel üzerinde bulunan AD-MKH'lerin troponin t antikor boyaması **A-** İnsülin/valproik asit içeren besiyeri, **B-** 5-azasitidin içeren besiyeri, **C-** BMP-4/valproik asit içeren besiyeri, **D-** Kontrol besiyeri ile kültüre alınan AD-MKH'ler (Orijinal büyütme: X200)

#### 4.8.2.1. Gerçek zamanlı PZR ( Real -time PCR ) çalışmaları

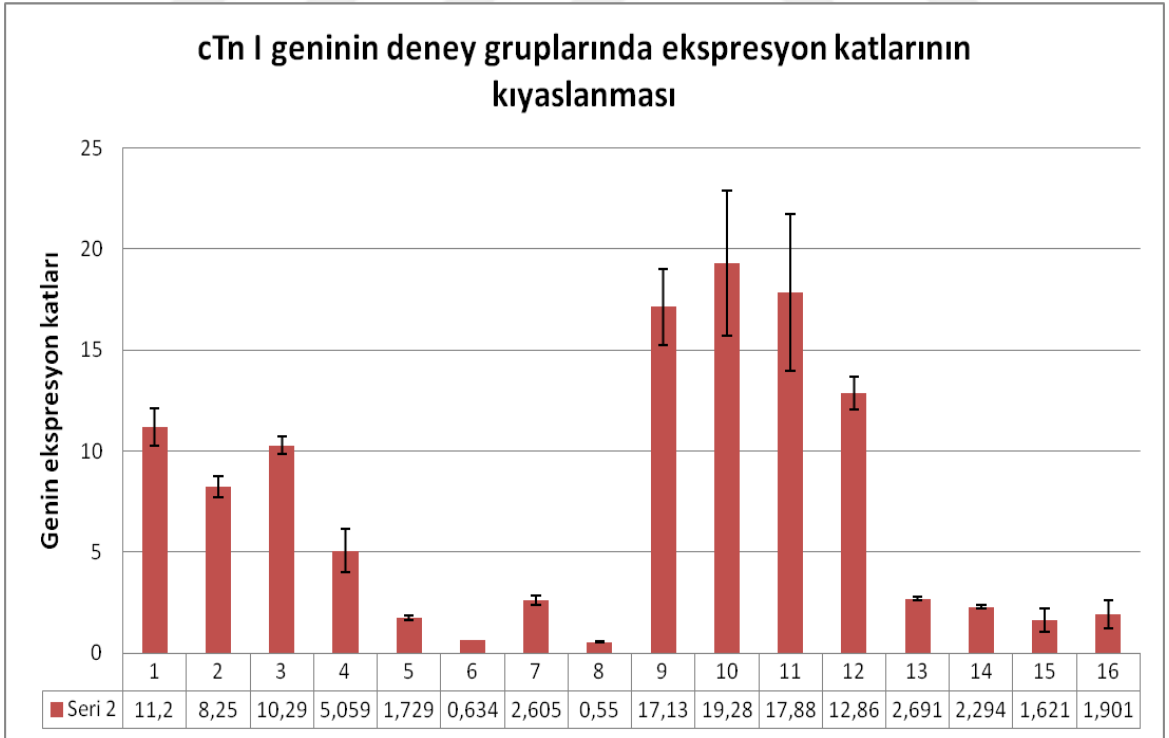
Deney grubunun RNA izolasyonları (n=16) tane yapıldıktan sonra picodrop ile RNA miktarları saptandı. Bütün gruplardaki RNA miktarları yaklaşık olarak 10 - 100 ng/μl olarak saptanmıştır. Ardından gradient PCR ile cDNA'ya çevrilen RNA'lara real- time PCR yapıldı. 16 deney grubunda (Çizelge 3.3) kardiyomiyositlere özgü üç genin birbirleriyle karşılaştırmalı olarak ekspresyon katlarına bakıldı. İnsan kardiyak GATA4, T-box5 (TBX5) ve Troponin I tip 3 (cTn I) genleri için çalışıldı. Gerçek zamanlı PZR çalışmasının sonucunda her bir örnek için referans ve hedef genin CT değerleri temel alınarak hesaplamalar yapıldı (Çizelge 7.1, 7.2, 7.3) ve GATA4, cTn I ve TBX5 genlerinin ifadelerinin kıyaslanmasında  $2^{-\Delta\Delta CT}$  tekniği kullanıldı (Livak et al., 2001) (Şekil 4.20, 4.21 ve 4.22). Kontrol CT değeri olarak 14. ve 21. günlerdeki cam slayt üzerindeki AD-MKH'lerine kontrol besiyeri uygulanan gruplar (8. ve 16. gruplar) kullanılmıştır.



**Şekil 4.20.** Gerçek Zamanlı PZR sonuçlarına göre; GATA4 geninin deney gruplarındaki ekspresyonlarının karşılaştırılması



**Şekil 4.21.** Gerçek zamanlı PZR sonuçlarına göre; TBX5 geninin deney gruplarındaki ekspresyonlarının karşılaştırılması



**Şekil 4.22.** Gerçek zamanlı PZR sonuçlarına göre; cTn I geninin deney gruplarındaki ekspresyonlarının karşılaştırılması

14. ve 21. günlerde kültürü sonlandırılan deney gruplarının her bir gen için ekspresyonlarının farklı olduğu görülmektedir. İstatiksel olarak bu farklılığın anlamlı olup olmadığını anlamak amacıyla SPSS programında One Way ANOVA testi yapıldı. Çalışılan bu üç gen için  $p < 0.05$  bulundu ve gruplar arasında fark olduğu belirlendi (Çizelge 7.4). Ayrıca 14. ve 21. günlerde her bir deney grubunda bir fark olup olmadığını anlamak amacıyla Paired Samples Test yapıldı. Her bir gen için  $p < 0.05$  bulunarak 14. ve 21. günlerdeki her bir deney grubundaki ekspresyonların farklı olduğu istatistiksel olarak belirlendi (Çizelge 7.5).

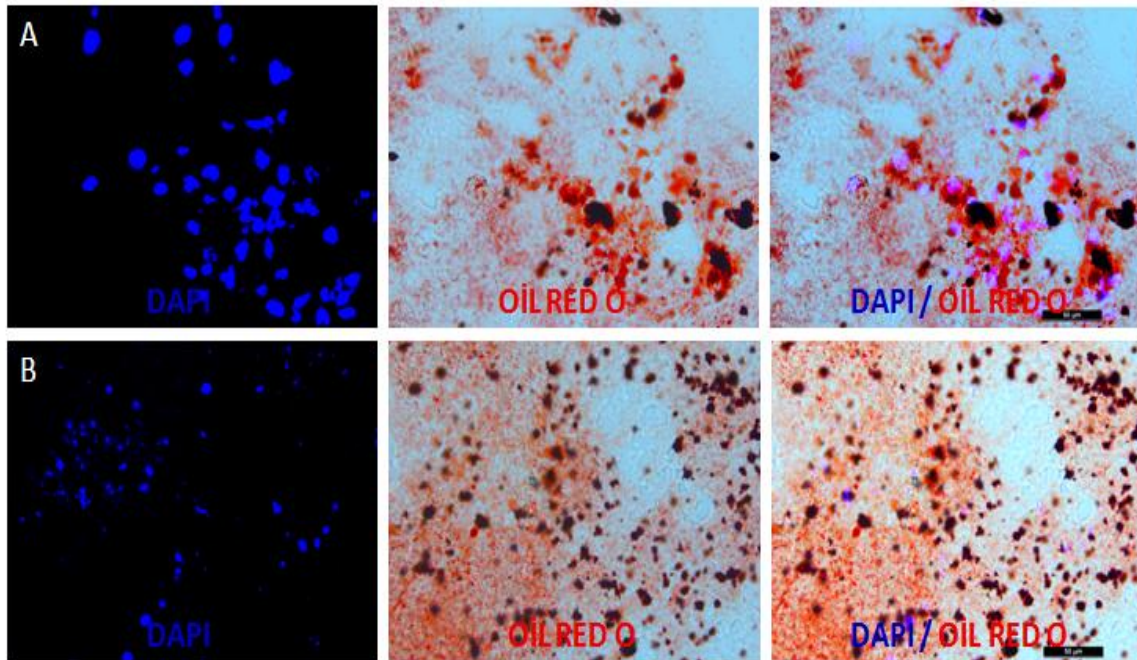
GATA 4 geninin genellikle bütün deney gruplarında 14. günde ekspresyon miktarlarının 21. güne göre düşük olduğu belirlenmiştir. Bir hafta sonrasında bu genin ekspresyonunun bazı deney gruplarında büyük artış gösterdiği görülmektedir. BMP4 içeren besiyeri ile farklılaşmaya alınan jel üzerindeki hücreler (3) 14.g de kontrole göre 21 kat daha fazla GATA4 geni ekspresyonu görülürken 21.günde (11) bu oran 863 kata yükselmiştir. 14. g insülin içeren besiyeri ile farklılaşmaya alınan jel (1) ve cam slayt (2) üzerine ekilen MKH'lerin jel üzerinde olanların GATA4 genini eksprese etme miktarları cam slayta göre 3 kat daha fazladır. Ancak bu besiyerinde farklılaşmaya alınan hücrelerin kontrol hücrelerine göre jel üzerindeki hücrelerin bu geni eksprese etme miktarı 27 kat fazla iken, cam slayt üzerinde bulunan hücrelerin bu geni eksprese etme miktarı kontrole göre 9 kat fazladır. Bu şekilde bütün deney grupları birbiriyle kıyaslandığında genel anlamda jel üzerindeki MKH'lerin GATA4 genini eksprese etme miktarı daha fazladır. En fazla GATA4 ekspresyonu (11) BMP4 içeren besiyeri ile farklılaşmaya alınan jel üzerindeki AD-MKH'lerde görüldü.

TBX5 geni açısından deney grupları incelendiğinde jel üzerinde bulunan MKH'lerin bu geni eksprese etme oranlarının daha yüksek olduğu görülmektedir. Sadece BMP4 içeren besiyeri ile farklılaşmaya alınan 21. g jel üzerindeki kök hücrelerin (11) cam slayt üzerindeki hücrelere göre (12) bu geni eksprese etme miktarının daha düşük olduğu görülmektedir. Ancak istatistiksel olarak  $p > 0.05$  olduğu için bu farkın anlamlı olmadığı saptanmıştır. TBX5 geninin 21.g'de insülin içeren besiyeri ile farklılaşmaya alınan jel üzerindeki kök hücrelerde ekspresyonunun diğer deney gruplarına göre fazla olduğu görülmektedir. Ayrıca 5-azasaytidin içeren besiyeri ile farklılaşmaya alınan jel üzerindeki hücrelerin 14. ve 21. g'deki ekspresyon oranlarının farkı anlamsız çıkmıştır. Jel üzerindeki hücrelerin bu geni eksprese etme oranlarının daha yüksek olduğu söylenebilir.

cTn I geninin insülin ve BMP-4 içeren besiyeri ile farklılaşmaya alınan jel ve cam slayt üzerindeki hücrelerin bu geni eksprese etme oranının diğer deney gruplarına göre daha yüksek olduğu görülmektedir. 21. g'de bu ekspresyon miktarı daha da yükselmiştir. Farklılaşmaya alınan jel üzerindeki kök hücrelerin cTn I genini eksprese etme miktarı daha yüksekken, insülin içeren besiyeri ile farklılaşmaya alınan (9,10) jel ve cam slayt üzerindeki hücrelerde bu genin eksprese olma oranı açısından istatistiksel olarak fark bulunamamıştır. Ayrıca ekspresyon en fazla insülin içeren besiyeri ile farklılaşmaya alınan bu deney grubunda görüldü.

#### 4.9. HA/J Plazma Jel Üzerine Ekilmiş İnsan AD-MKH'lerin Adipojenik Farklılaşmasının İncelenmesi

Cam slayt ve HA/J plazma jel üzerine ekilen AD-MKH'lerin adipoz hücrelerine farklılaşma potansiyeli incelendi. Farklılaşma ve kontrol besiyeri uygulanan jel ve cam slayt üzerindeki hücreler kültürün 21. gününde sabitlenerek Oil Red O histokimyasal boyaması yapıldı (Şekil 4.23).



**Şekil 4.23.** Adipojenik farklılaşma uygulanan HA/J plazma jel üzerinde bulunan AD-MKH'lerin Oil Red O boyaması **A**-Farklılaşma besiyeri, **B**-Kontrol besiyeri ile kültüre alınan AD-MKH'ler (Orijinal büyütme :X200)

## 5.TARTIŞMA

Kalp kası ve adipoz doku mühendisliği çalışmalarında birçok farklı yöntemle iskeleler üretilmekte ve farklı hücre eşitleri kullanılmaktadır (Leor, 2005, Sterodimas, 2010). Hidrojeller yüksek su içeriğine sahip, üç boyutlu iskeleler olup dokuların taklit edilmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Fibrin jeller kalp kası doku mühendisliği çalışmalarında sıklıkla kullanılır ve kardiyomiyosit ekilen bu jellerin *in vivo* koşullarda damarlaşarak hasarlı kalp dokusunu tamir ettiği bildirilmiştir ( Li, 2011).

Kalp hasarı tamirlerinde hücresel tedavi ve doku mühendisliğine yönelik yöntemlere ilgi artmaktadır. AD-MKH'ler ile *in vivo* yapılan çalışmalarda MI'l sıçanlara verilen AD-MKH'lerin damarlaşmaya etkili olduğu ve kalp kası fonksiyonlarını geliştirdiği grlmştir. Ayrıca, *in vitro* koşullarda 5- azasitidin ile kardiyomiyosit benzeri hücreler üretilmiştir (Eliana, 2010).

Yumuşak doku kaybı temelli hasarlarda standart yöntemler olarak otolog doku ilavesi, otolog adipoz doku transplantasyonu ve alloplastik implantlar kullanılmaktadır. Tüm bu yöntemlerin yabancı cisim reaksiyonları, implantın g etmesi, vericiden dolayı meydana gelebilecek hastalıklar gibi olumsuz etkileri bulunmaktadır ve dolayısıyla şimdilerde kök hücre uygulamaları çalışılmaktadır (Sterodimas, 2009). AD-MKH'ler bu uygulamalar için birçok çalışmada kullanılmaktadır.

Bu tez çalışmasında üretilen HA ve jelatin içeren kompozit fibrin jel ile ilgili literatürde herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bu jeller plastik cerrahide kullanıma uygun, biyouyumlu, insan kanından fibrinojen izolasyonu ve göbek bağından HA izole edildiği için immunolojik yanıtı düşük olacağı tahmin edilen yapılardır. Ayrıca, elastik modülü yağ dokusuna çok yakın olduğu için yumuşak doku dolgu materyali olarak hücresiz jelin vücuda transplantasyonu yapılabilir. Ayrıca jel zerindeki AD-MKH'lerin adipojenik farklılaşabilmesi de bu jelin adipoz doku mühendisliğinde kullanıma yatkın olduğunu göstermektedir. Adipoz doku mühendisliği çalışmalarının yanında jel üzerindeki hücrelerin kardiyomiyojenik farklılaşma potansiyeli incelenmiştir. Jel yapısından dolayı boyama işlemleri sonucunda net bir sonuç alınamamış ve bu amaçla gen düzeyinde kardiyomiyojenik farklılaşmayı değerlendirmek için gerçek zamanlı PZR alışmaları yapılmıştır. Bunun sonucunda jel ve cam slayt üzerindeki hücrelerin kalp kası hücrelerine

farklılaşma oranlarının farklı olduğu ve gen ekspresyonlarının değişik indükleyici ajanlar varlığında farklı olduğu saptanmıştır.

Çalışmamızda, akım sitometri sonuçlarına bakıldığında insan lipoaspirat materyalinden izole edilen hücrelerin CD29, CD44, CD90 gibi MKH belirteçlerini yüzeylerinde ifade ederken, CD33, CD34, CD45 gibi kan hücrelerine ait belirteçleri ifade etmemeleri, kültürdeki morfolojik özelliklerinin MKH'lere benzemesi ayrıca da adipoz ve kemik hücrelerine farklılaşmaları bu hücrelerin MKH olduklarını göstermektedir (Karaöz et al. 2009, Karaöz et al. 2010). MKH'lerin kardiyomyojenik yönde farklılaşmasını çeşitli kimyasallar, HDM bileşenlerini taklit etme, fiziksel uyarı ve ko-kültür çalışmaları gibi birçok faktörler etkilemektedir (Dimarakis, 2006). Bu çalışmada doğal HDM yapısı HA/J plazma jeller ile taklit edilmeye çalışılmıştır. Ayrıca, 3 farklı içeriğe sahip kardiyomyojenik farklılaşmayı indükleyici maddeler kullanılmıştır. Birçok MKH çeşidi (kemik iliği kaynaklı, kordon kanı kaynaklı vb.) pre-klinik ve klinik uygulamalarda denenmektedir. Ancak AD-MKH'ler kolayca elde edilebilmeleri, doku içerisinde fazla miktarda bulunmaları gibi avantajlarından dolayı klinik çalışmalarda tercih edilmektedir.

AD-MKH'ler transplante edildiğinde parakrin yollarla kardiyomyositlere ve vasküler hücrelere farklılaşarak kardiyak fonksiyonlarını arttırmaktadır. Bu parakrin faktörler hasarlı dokuda anjiyogenezi geliştirmekte, hücre apoptozunu azaltmakta, nöron oluşumunu indüklemektedir (Bai, 2010). AD-MKH'ler kolay elde edilmesi, adipoz dokusunda bol bulunması, adipoz ve kalp kası doku mühendisliği çalışmalarında yaygın olarak kullanılması nedenlerinden dolayı bu çalışmada kullanılmıştır.

Fibrinojen, hyaluronik asit, hidroksiapatit ve jelatin gibi doğal biyomalzemelerin doku mühendisliğinde kullanımının bir çok avantajı bulunmaktadır. Biyoaktif, biyoyumlu ve dokular ile benzer mekanik özelliklere sahiptirler. Bunun yanında, fizikokimyasal özelliklerini kontrol altına almak ve çözünme hızını ayarlamak zordur. Canlı dokulardan izole edildiği için patojen içerebilir ve sterilizasyonları zordur. Son zamanlarda biyolojik malzemeler ile yapılan çalışmalarla yukarıda sayılan olumsuzluklar elemine edilebilmektedir (Dawson, 2008). Dolayısıyla, bu çalışmada hücrelerin yayılması, çoğalması ve farklılaşmasını indükleyecek içeriğe sahip jeller üretilmiştir.

Kıkırdak doku mühendisliği için HA ve jelatin içeren hidrojel çalışmaları literatürde bulunmaktadır. Bir çalışmada, jele kondroitin sülfat eklenerek doğal kıkırdak dokusu taklit edilmeye çalışılmıştır. Sonrasında *in vitro* çalışmalar ile jelin hücre yapışma, yayılma ve çoğalmasını indüklediği görülmüştür (Hu, 2011). Çalışmamızda, izole edilen



HA satın alınan horoz ibiği kaynaklı HA ile karşılaştırılmıştır. UV ve alsıyan mavisi boyanma spektrumları benzer olan bu iki örneğin protein miktar tayinleri yapıldığında göbek bağından izole edilen HA'nın protein içeriğinin düşük olduğu saptanmıştır. Yoğunlaştırılmış fibrinojen izolasyonu yapılarak jel üretilmesi, yani kişinin kendi kanından bu jelin üretilmesi ile bağışık red reaksiyon oranı azaltılmış olacaktır. Fibrinojen izolasyonunda kimyasal presipitasyon, soğuk müdahale ile izolasyon ve daha farklı yöntemler kullanılmaktadır (Silver, 1995). Bu çalışmada, soğuk müdahale ile izolasyon ve kimyasal presipitasyon yöntemleri birleştirilerek uygulandı. Dolayısıyla plazmadan presipitasyon yapıldığı için, jel içerisinde sadece fibrinojen olmayıp, kan plazmasındaki birçok protein bulunacaktır.

Ye ve arkadaşları insan miyofibroblast hücrelerini kullanarak fibrin jel ile yaptıkları çalışmada jelin hücre büyümesini olumlu etkilediği, doku gelişimini indüklediğini belirtmişlerdir (Ye, 2000). Zhang ve arkadaşları ise, farklı jelatin ve HA konsantrasyonlarında liyofilizasyon yöntemiyle poroz iskeleler üretmişler, jelatin konsantrasyonu fazla olan iskele üzerinde hücrelerin en iyi tutunma ve yayılma gösterdiklerini saptamışlardır. Ayrıca, bir diğer çalışmada aljinat ve jelatinin farklı oranları karıştırılarak üretilen film yapısındaki iskelede aljinat:jelatin 20:80 olduğunda hücre çoğalmasının ve C2C12 miyoblastları ile kardiyomiyojenik farklılaşmanın en iyi olduğu belirlenmiştir (Rosellini, 2008). Kardiyomiyojenik farklılaşmayı indüklemesinin yanında hücre tutunma ve yayılmasına olumlu etkilerinden dolayı bu çalışmada HA/J plazma jel içerisindeki jelatin konsantrasyonu hyaluranik asite göre daha fazla kullanılmıştır. Hyaluronik asit konsantrasyonu fazla olduğunda iskelenin su alma kapasitesi artmaktadır. Ayrıca, bu iskeleler EDC ile çapraz bağlandıklarında gözenek çaplarının değiştiği ve iskelenin elastik modülünün arttığı saptanmıştır (Zhang, 2011). HA/J plazma jellerin üretimi esnasında jel içeriğindeki bileşenlerin miktarları önemlidir. Çünkü, yetersiz miktarda fibrinojen veya trombin olduğunda jelleşme meydana gelmemektedir. Jelleşmeyi hızlandırıcı  $\text{CaCl}_2$  konsantrasyonunun jelleşmenin hızı üzerine etkisi vardır. Konsantrasyon arttıkça jelleşme hızının düştüğü görülmüştür.

Çalışmamızda, üretilen HA/J plazma jellerin birkaç gün içerisinde çözündüğü saptanmıştır. Bunu engellemek için genellikle aprotinin kullanılmaktadır (Lorentz, 2009). Ayrıca aprotininin farklı konsantrasyonlarında jelin çözünme hızının ayarlanabildiği saptanmıştır (Ye, 2000). Çalışmamızda en uzun süre çözünmeden kalabilecek jel üretebilmek için çeşitli stabilize edici ajanlar kullanılarak jelin çözünme hızları belirlendi.

Sonuçta, GA uygulanarak jeldeki çapraz bağ sayısı arttırıldı. Ancak, GA'in hücelere toksik etkisi olabileceği için, bunu önlemek amacıyla glisin ile GA'in jelle bağlanmış olası açık kalan uçları kapatıldı. Jeldeki olası serbest GA kalıntılarının uzaklaştırılması amacıyla içeriğinde fenol kırmızısı indikatörü bulunan HBSS ile jeller 3-4 gün süreyle yıkanmıştır. İndikatörün renk değiştirme dağılımlarına göre GA kalıntılarının tamamen jellerden uzaklaştırıldığına karar verilmiştir. PBS içerisinde bu jelin uzun süre çözünmediği görüldü. HA/J plazma jelin karakterizasyonu plazma jel ile kıyaslanarak yapıldı.

HA kaynaklı jel üzerine ekilen fare MKH'lerinin çoğalma ve yayılma özellikleri incelenen bir çalışmada, çapraz bağ sayısı ve RGD konsantrasyonunun hücrelerin davranışına yön verdiği saptanmış, daha sert hidrojel üzerinde hücrelerin daha az yayıldığı, hareket ettiği ve çoğalma hızının düştüğü tespit edilmiştir. Dolayısıyla, üretilecek dokunun nişine göre iskele üretiminin yapılması gerektiği önerilmiştir (Lei, 2011). Bu nedenle, çalışmamızda elastik modülü adipoz dokusuna benzer jellerin üretilmesi ve HDM benzeri elemanların kullanılması ile yumuşak dokuların nişi taklit edilmiştir.

Fibril temelli iskeleler yapısal iletişimi sağlayarak doku gelişimini sağlamaktadır. Yapılan bir çalışmada, fibrin üzerine hücreler ekilerek, hücrelerin besiyerinde daha az çözünür kollagen bulundurduğu ve daha kısa sürede doğal HDM yapısını oluşturduğu görülmüştür. Fibrini parçalayan inhibitörler kullanıldığında ise, hücreler jelle çoğalırken, HDM yapısı meydana gelmemiştir (Mol, 2005). İskelede fibriller yapıların olması, HDM yapısına benzerliği arttırmaktadır. Ancak, gözenekliliği fazla olan bir iskelede hücrelerin birbiriyle iletişimi, besiyeri ve gaz ulaşımı daha iyi olacağı için poroz yapılu iskeleler tercih edilmektedir. Bu çalışmada fibrinojen yanında HA ve jelatin kullanıldığı için hem fibriller hem de poroz yapıda bir iskele üretilmiştir. Plazma jelle göre HA/J plazma jellerin gözenek çaplarının daha büyük olduğu ve gözenek yoğunluğunun daha fazla olduğu saptandı. Böylelikle fibrin jelle göre yumuşak doku mühendisliğinde kullanıma daha uygun jeller üretilmiştir.

HA/J plazma jellerin SEM fotoğrafları incelendiğinde, plazma jellerin daha fibröz yapıda olduğu saptandı ve 21 gün besiyeri içerisinde bekletilen HA/J plazma jellerin yavaş yavaş çözünerek, gözenek çaplarının büyüdüğü belirlendi. Ayrıca, üzerine hücre ekilen jellerin SEM görüntülerinde, 21 günlük kültür sonucunda hücrelerin jeli metabolize ettiği belirlenmiştir. Zamanla besiyeri içerisinde jelin fibröz dokusu azalırken poroz yapısı ön plana çıkmakta ve hücrelerin jeli metabolize etmesiyle kültürün ilerleyen günlerinde jelin

gözenek çapının büyüdüğü saptanmıştır. Hyaluronik asit, jelatin ve kan plazması proteinleri gibi toksik madde içermeyen, ayrıca kök hücreler üzerinde birçok olumlu etkisi olan bu maddelerin hücrelerce kullanılması önemlidir.

Çalışmamızda, WST-1 testi yapılarak jel üzerindeki hücrelerin çoğalma potansiyeli araştırılmıştır. Cam slayt ve jel üzerine aynı sayıda hücre ekilerek, bu iki materyal üzerinde hücrelerin çoğalma hızları kıyaslandı. Kültürün ilk günlerinde cam slayt üzerindeki hücre sayısı jel üzerindeki hücre sayısına göre fazlayken, 14. günden sonra jel üzerindeki hücre sayısının cam slayt üzerindeki hücrelere göre daha fazla olduğu belirlendi. Bu bize cam slayt üzerinde çoğalmaya yer kalmadığında hücrelerin öldüğünü veya çoğalmalarının azaldığını göstermektedir. Jelde ise poroz bir yapı olduğu için hücreler iç kısımlara giderek kendilerine yer bulmaktadır. Dolayısıyla HA/J plazma jellerin hücre canlılığına herhangi bir olumsuz etkisi bulunmamakla beraber, hücre çoğalmasını desteklediği görüldü.

MKH'ler plupotensiye ilişkin genleri içerdikleri için EKH'lerden kardiyomiyojenik farklılaşmayı sağlayan BMP-4 ve aktivin a indükleyici maddelerini içeren protokol uygulandı (Stevens, 2009). HA/J plazma jel üzerindeki MKH'lerin kardiyomiyojenik farklılaşma sonucunda protein seviyesinde ekspresyonlarını değerlendirmek amacıyla kaslara özgün olan anti- $\alpha$  aktinin antikoru ile boyandığında net görüntüler elde edilemedi. Bunun nedeni jelin yapısı protein yapıda oluşu için jelde sahte boyanmalar meydana geldi. Ayrıca GA otoflouresan bir madde olduğu için immunflouresan boyama yapıldığında ise, jel kendiliğinden flouresan ışıktaki ışımaya yaptığından bu boyama tekniği de kullanılmadı. Troponin t antikoru ile boyama yapıldığında az miktar kırmızıya boyanmalar görülerek yine net görüntüler elde edilemedi. Alfa aktinin antikorusunun troponin t antikorusuna göre daha iyi bir sonuç verdiği söylenebilir. Bunun nedeni alfa aktinin kasa özgü bir antikordur. Deney gruplarında kalp kasının özel bir proteinine farklılaşacak derecede bir özelleşme meydana gelmediğinden troponin t'ye rastlanmamış olunabilir. Ayrıca hücreler jelin yüzeyine ekildiği için kriyokesit alınırken hücre kaybı meydana geldiği için hücrelerin bol bulunduğu numuların sayısı az olmuştur. Bu amaçla gen düzeyindeki hücrelerde meydana gelen değişiklikleri anlamak amacıyla gerçek zamanlı PZR yapılmıştır.

Gerçek zamanlı PZR çalışmalarında incelenen genlerin kalp oluşumunda ve gelişimindeki rollerine bakıldığında; GATA 4 transkripsiyon faktörünün kalbin embriyonik gelişiminde kalbe özgü genlerin ekspresyonu, kardiyomiyosit farklılaşması ve erişkin

kalpte strese yanıt vermede kritik düzenleyici rolü bulunmaktadır (Oka et al.2006). TBX geninin kalp gelişiminde rol aldığı ve kalbin şekillenmesinde TBX5 bulbis kortis dışında ön kısım kalp tüpü boyunca eksprese edilmektedir. TBX5 geni omurgalı embriyosunda kalp gelişiminde ve özelleşmesinde rol almaktadır. TBX5 transkripsiyon faktöründe mutasyon olmasıyla insanlarda kalp septal kusurları oluşarak Holt-Oram sendromu meydana gelmektedir (Horb and Thomsen, 1999). Kardiyak troponin t ve ı kardiyak düzenleyici proteinlerdir ve aktin ve miyozin arasındaki kalsiyum aracılı etkileşimi sağlamaktadırlar. cTn I proteini miyokardiyum dışında başka bir yerde belirlenmemiştir (Sharma et al. 2004).

Gerçek zamanlı PZR sonuçlarına göre; GATA4 geninin genellikle bütün deney gruplarında 14. günde ekspresyon miktarlarının 21. güne göre düşük olduğu görülmektedir. BMP-4 içeren besiyeri ile farklılaşmaya alınan jel üzerindeki hücrelerde bu genin diğer deney gruplarına göre daha fazla eksprese edildiği saptanmıştır. TBX5 geninin 21.günde insülin içeren besiyeri ile farklılaşmaya alınan jel üzerindeki kök hücrelerde ekspresyonunun diğer deney gruplarına göre daha fazla olduğu saptanmıştır. İnsülin ve BMP-4 içeren besiyeri ile farklılaşmaya alınan jel ve cam slayt üzerindeki hücrelerin ise cTn I genini eksprese etme oranının diğer deney gruplarına göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Yukarıda bahsi geçen örneklerin bu üç geni eksprese etme miktarları 21. günde 14. güne göre daha da yükselmiştir. Kalbin embriyonik gelişiminde önemli rol oynayan bu genlerin ekspresyon miktarlarının artması AD-MKH'lerin kardiyomiyosit yönünde farklılaşmaya yöneldiklerini göstermektedir. Genellikle literatürde 5-azasitidin ile yapılan araştırmalarda MKH'lerin kardiyomiyojenik farklılaşabildikleri belirtilmektedir (Burlacu et al. 2008, Martinez and Kofidis, 2011). Bu çalışmada aktivin-a, BMP-4-valproik asit ve insülin-valproik asit içeren besiyerleri ile farklılaşmaya alınan jel üzerindeki hücrelerin 5-azasitidin içeren besiyeri uygulanan jel üzerindeki hücelere göre kalp kasına özgü bu üç genin ekspresyonlarının daha fazla olduğu saptanmıştır.

Adipojenik farklılaşma besiyeri uygulanan jel üzerindeki hücrelerin adipoz hücrelerine farklılaştığı belirlenerek, ayrıca jelin mekanik özelliklerinin adipoz dokusuna çok benzer olması ve/veya polimerik bileşenlerinden dolayı kontrol besiyeri ile de farklılaşma meydana gelmiştir.

## 6.SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu tez HA/J plazma jellerin üretimi, karakterizyonu, adipoz doku mühendisliğinde kullanımı ve kardiyomiyojenik farklılaşmaya etkisinin incelenmesi çalışmalarını kapsamaktadır. Kapsamlı bir şekilde yapılan çalışmalar sonucunda HA/J plazma jellerin hücre çoğalmasını indüklediği, adipojenik ve kardiyomiyojenik farklılaşmaya olumlu yönde etkisinin olduğu belirlenmiştir. Ayrıca plazma jel ile kıyaslandığında HA/J plazma jellerin elastik modülünün, gözenekliliğinin ve gözenek çapının arttığı saptanmıştır. Biyolojik maddeler olan HA ve jelatinin jele eklenmesiyle yumuşak doku mühendisliğine daha uygun materyaller elde edilmiştir. Jelin mekanik özellikleri ve/veya polimerik bileşenleri nedeniyle adipoz hücrelerine indükleyici kimyasal eklenmediğinde dahi hücrelerin adipoz hücrelerine dönüştüğü görülmektedir. HA/J plazma jellerin ve çeşitli kimyasal maddelerin kardiyomiyojenik farklılaşmada etkili olduğu görüldü. Aktivin-a, BMP-4-valproik asit ve insülin-valproik asit içeren besiyerleri ile farklılaşmaya alınan jel üzerindeki hücrelerin 5-azasitidin içeren besiyeri uygulanan jel üzerindeki hücrelere göre kalp kasına özgü genlerin ekspresyonlarının daha fazla olduğu belirlenmiştir.

Sonuç olarak; HA/J plazma jellerin yumuşak doku mühendisliği uygulamaları için uygun gözenek büyüklüğüne, mekanik özelliklere sahip olduğu, hücre büyüme ve yayılmasını desteklediği görülmüştür. Ayrıca bu çalışmada, Aktivin-a, BMP-4 ve insülin, valproik asitin 5-azasitidine göre jel üzerindeki AD-MKH'leri daha fazla kardiyomiyojenik farklılaşmaya yönlendirdiği anlaşılmıştır.

Üretilen HA/J plazma jellerin sıçanlarda *in vivo* çalışmaları yapılmalıdır. Yumuşak doku hasarı bulunan bölgelere hücreli ve hücreli verilerle sıçan dokusunun tamiri incelenmelidir. Bir sonraki çalışmalarda, kardiyomiyojenik farklılaşmanın jelin mekanik özellikleri ile mi ve/veya jelin yapısal bileşenleri olan HA, jelatin veya fibrin sayesinde mi yoksa bu maddelerin hepsinin mi kardiyomiyojenik farklılaşmayı indüklediği çalışılarak belirlenmelidir.

## KAYNAKLAR DİZİNİ

Ansell, C. (2005). Tissue engineering: the challenges ahead. *Plastics, rubber and composites* 34, 165-169.

Ascher, B., Cerceau, M., Baspeyras, M., and Rossi, B. (2004). Soft tissue filling with hyaluronic acid]. Paper presented at: *Annales de chirurgie plastique et esthétique*.

Bai, X., and Alt, E. (2010). Myocardial regeneration potential of adipose tissue-derived stem cells. *Biochemical and biophysical research communications* 401, 321-326.

Blombäck, B., and Bark, N. (2004). Fibrinopeptides and fibrin gel structure. *Biophysical chemistry* 112, 147-151.

Bongso, A., and Lee, E.H. (2005). Stem cells: their definition, classification and sources. *Stem cells: from bench to bedside Singapore: World Scientific Publishing* 1.

Borlongan, C.V., Kaneko, Y., Maki, M., Yu, S.J., Ali, M., Allickson, J.G., Sanberg, C.D., Kuzmin-Nichols, N., and Sanberg, P.R. (2010). Menstrual blood cells display stem cell-like phenotypic markers and exert neuroprotection following transplantation in experimental stroke. *Stem cells and development* 19, 439-452.

Boudet, C., Iliopoulos, I., Poncelet, O., and Cloitre, M. (2005). Control of the chemical cross-linking of gelatin by a thermosensitive polymer: Example of switchable reactivity. *Biomacromolecules* 6, 3073-3078.

Brouwers, J. Influence of fibrinogen concentration on the Young's modulus in fibrin gels (BMTE).

Burdick, J.A., and Prestwich, G.D. (2011). Hyaluronic acid hydrogels for biomedical applications. *Advanced Materials* 23, H41-H56.

Burlacu, A., Rosca, A.M., Maniu, H., Titorencu, I., Dragan, E., Jinga, V., and Simionescu, M. (2008). Promoting effect of 5-azacytidine on the myogenic differentiation of bone marrow stromal cells. *European journal of cell biology* 87, 173-184.

Chan, B., and Leong, K. (2008). Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations. *European spine journal* 17, 467-479.

Chen, J., and Goldhamer, D.J. (2003). Skeletal muscle stem cells. *Reprod Biol Endocrinol* 1, 101.

Chhabra, P., and Brayman, K.L. (2009). The use of stem cells in kidney disease. *Current Opinion in Organ Transplantation* 14, 72-78.

Chiu, L.L.Y., Chu, Z. Radisic, M. (2011) *Tissue Engineering. Comprehensive Nanoscience and Technology*.

Choi, Y.S., Matsuda, K., Disting, G.J., Morrison, W.A., and Dilley, R.J. (2010). Engineering cardiac tissue in vivo from human adipose-derived stem cells. *Biomaterials* 31, 2236-2242.

Christoforou, N., Miller, R.A., Hill, C.M., Jie, C.C., McCallion, A.S., and Gearhart, J.D. (2008). Mouse ES cell-derived cardiac precursor cells are multipotent and facilitate identification of novel cardiac genes. *The Journal of clinical investigation* 118, 894.

Chunmeng, S., and Tianmin, C. (2004). Effects of plastic-adherent dermal multipotent cells on peripheral blood leukocytes and CFU-GM in rats. Paper presented at: *Transplantation proceedings (Elsevier)*.

Codina, M., Elser, J., and Margulies, K.B. (2010). Current status of stem cell therapy in heart failure. *Current cardiology reports* 12, 199-208.

- Dawson, E., Mapili, G., Erickson, K., Taqvi, S., and Roy, K. (2008). Biomaterials for stem cell differentiation. *Advanced drug delivery reviews* 60, 215-228.
- Dhandayuthapani, B., Yoshida, Y., Maekawa, T., and Kumar, D.S. (2011). Polymeric scaffolds in tissue engineering application: a review. *International Journal of Polymer Science* 2011.
- Dimarakis, I., Levicar, N., Nihoyannopoulos, P., Gordon, M.Y., Habiba, N.A. (2006). In vitro stem cell differentiation into cardiomyocytes Part 2: Chemicals, extracellular matrix, physical stimuli and coculture assays. *Journal of Cardiothoracic-Renal Research* 1:115-121
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D., and Horwitz, E. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8, 315-317.
- Ducheyne, P., Healy, K.E., Hutmacher, D., Grainger, D.W., Kirkpatrick, C.J., *Comprehensive biomaterials* (2011). Johannes Gutenberg University Medical Elsevier, Netherlands
- Erices, A., Conget, P., and Minguell, J.J. (2008). Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *British journal of haematology* 109, 235-242.
- Fraser, J., Laurent, T., and Laurent, U. (2003). Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. *Journal of internal medicine* 242, 27-33.
- Freshney, R.I., and Vunjak-Novakovic, G. (2006). *Culture of cells for tissue engineering* (Wiley Online Library).
- Freyman, T., Yannas, I., Yokoo, R., and Gibson, L. (2001). Fibroblast contraction of a collagen-GAG matrix. *Biomaterials* 22, 2883-2891.
- Friedenstein, A., Chailakhjan, R., and Lalykina, K. (1970). The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Proliferation* 3, 393-403.
- Gepstein, L. (2002). Derivation and potential applications of human embryonic stem cells. *Circulation research* 91, 866-876.
- Gimble, J., and Guilak, F. (2003). Adipose-derived adult stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential. *Cytotherapy* 5, 362-369.
- Goldstein, L.S.B., and Schneider, M. (2010). *Stem Cells for Dummies (For Dummies)*.
- Gregoire, F.M., Smas, C.M., and Sul, H.S. (1998). Understanding adipocyte differentiation. *Physiological reviews* 78, 783-809.
- Guilak, F., Awad, H.A., Fermor, B., Leddy, H.A., and Gimble, J.M. (2004). Adipose-derived adult stem cells for cartilage tissue engineering. *Biorheology* 41, 389-400.
- Guilak, F., Awad, H. A. (2004). Adipose-derived adult stem cells for cartilage tissue engineering. *Biorheology* 41(3-4): 389-399.
- Horb, M.E., and Thomsen, G.H. (1999). Tbx5 is essential for heart development. *Development* 126, 1739-1751.
- Howard, D., BATTERY, L.D., Shakesheff, K.M., and Roberts, S.J. (2008). Tissue engineering: strategies, stem cells and scaffolds. *Journal of anatomy* 213, 66-72.
- Hu, X., Li, D., Zhou, F., and Gao, C. (2011). Biological hydrogel synthesized from hyaluronic acid, gelatin and chondroitin sulfate by click chemistry. *Acta Biomaterialia* 7, 1618-1626.
- Jiang, Y., Jahagirdar, B.N., Reinhardt, R.L., Schwartz, R.E., Keene, C.D., Ortiz-Gonzalez, X.R., Reyes, M., Lenvik, T., Lund, T., and Blackstad, M. (2002). Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 418, 41-49.

Karaoz, E., Aksoy, A., Ayhan, S., Sariboyacı, A.E., Kaymaz, F., and Kasap, M. (2009). Characterization of mesenchymal stem cells from rat bone marrow: ultrastructural properties, differentiation potential and immunophenotypic markers. *Histochemistry and cell biology* 132, 533-546.

Karaoz, E., Ayhan, S., Gacar, G., Aksoy, A., Duruksu, G., Okçu, A., Demircan, P.Ç., Sariboyacı, A.E., Kaymaz, F., and Kasap, M. (2010). Isolation and characterization of stem cells from pancreatic islet: pluripotency, differentiation potential and ultrastructural characteristics. *Cytotherapy* 12, 288-302.

Karaoz, E., Ayhan, S., Okçu, A., Aksoy, A., Bayazit, G., Osman Gürol, A., and Duruksu, G. (2011). Bone marrow- derived mesenchymal stem cells co- cultured with pancreatic islets display  $\beta$  cell plasticity. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine* 5, 491-500.

Karaöz E., Ovalı E. (2004) Kök Hücreler, 1-15. Türkiye:Derya Kitapevi.

Karaöz, E., Doğan, B.N., Aksoy, A., Gacar, G., Akyüz, S., Ayhan, S., Genç, Z.S., Yürüker, S., Duruksu, G., and Demircan, P.Ç. (2010). Isolation and in vitro characterisation of dental pulp stem cells from natal teeth. *Histochemistry and cell biology* 133, 95-112.

Kehat, I., Kenyagin-Karsenti, D., Snir, M., Segev, H., Amit, M., Gepstein, A., Livne, E., Binah, O., Itskovitz-Eldor, J., and Gepstein, L. (2001). Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes. *Journal of Clinical Investigation* 108, 407-493.

Klattenhoff, D., Escobar, R., and Aliste, E. (2006). Synthesis Of Hydrogels Containing Indolbutyric Acid As Rooting Auxin. *Journal of the Chilean Chemical Society* 51, 887-889.

Kooreman, N.G., and Wu, J.C. (2010). Tumorigenicity of pluripotent stem cells: biological insights from molecular imaging. *Journal of the Royal Society Interface* 7, S753-S763.

Krampera, M., Marconi, S., Pasini, A., Galiè, M., Rigotti, G., Mosna, F., Tinelli, M., Lovato, L., Anghileri, E., and Andreini, A. (2007). Induction of neural-like differentiation in human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, fat, spleen and thymus. *Bone* 40, 382-390.

Lago, G., Oruña, L., Cremata, J.A., Pérez, C., Coto, G., Lauzan, E., and Kennedy, J.F. (2005). Isolation, purification and characterization of hyaluronan from human umbilical cord residues. *Carbohydrate polymers* 62, 321-326.

Laurent, T.C., Laurent, U.B.G., and Fraser, J.R.E. (1996). The structure and function of hyaluronan: An overview. *Immunology and cell biology* 74, A1-A7.

Lee, S. B.; Jeon, H. W.; Lee, Y. W.; Lee, Y. M.; Song, K. W.; Park, M. H.; Nam, Y. S.; Ahn, H. C. (2003). Bio-artificial skin composed of gelatin and (1  $\rightarrow$  3), (1  $\rightarrow$  6)-beta-glucan. *Biomaterials* 24, (14): 2503-2511.

Lei, Y., Gojgini, S., Lam, J., and Segura, T. (2011). The spreading, migration and proliferation of mouse mesenchymal stem cells cultured inside hyaluronic acid hydrogels. *Biomaterials* 32, 39-47.

Leor, J., Amsalem, Y., and Cohen, S. (2005). Cells, scaffolds, and molecules for myocardial tissue engineering. *Pharmacology & therapeutics* 105, 151-163.

Li, Z., and Guan, J. (2011). Hydrogels for cardiac tissue engineering. *Polymers* 3, 740-761.

Lorentz, K.M., Kontos, S., Frey, P., and Hubbell, J.A. (2011). Engineered aprotinin for improved stability of fibrin biomaterials. *Biomaterials* 32, 430-438.

Maes, D.H., Marenus, K.D. Baran R., Maibach, H.I. (1994) *Cosmetology for normal skin*. Cosmetic Dermatology. Martin Dunitz Ltd, London 77-110.



Marsano, A., Maidhof, R., Wan, L.Q., Wang, Y., Gao, J., Tandon, N., and Vunjak-Novakovic, G. (2010). Scaffold stiffness affects the contractile function of three-dimensional engineered cardiac constructs. *Biotechnology progress* 26, 1382-1390.

Martinez, E.C., and Kofidis, T. (2011). Adult stem cells for cardiac tissue engineering. *Journal of molecular and cellular cardiology* 50, 312-319.

Mol, A., van Lieshout, M.I., Dam-de Veen, C.G., Neuenschwander, S., Hoerstrup, S.P., Baaijens, F., and Bouten, C.V.C. (2005). Fibrin as a cell carrier in cardiovascular tissue engineering applications. *Biomaterials* 26, 3113-3121.

Moriscot, C., de Fraipont, F., Richard, M.J., Marchand, M., Savatier, P., Bosco, D., Favrot, M., and Benhamou, P.Y. (2005). Human bone marrow mesenchymal stem cells can express insulin and key transcription factors of the endocrine pancreas developmental pathway upon genetic and/or microenvironmental manipulation in vitro. *Stem cells* 23, 594-603.

Mummery, C.L., Davis, R.P., and Krieger, J.E. (2010). Challenges in using stem cells for cardiac repair. *Science translational medicine* 2, 27ps17-27ps17.

Murry, C.E., Soonpaa, M.H., Reinecke, H., Nakajima, H., Nakajima, H.O., Rubart, M., Pasumarthi, K.B.S., Virag, J.I., Bartelmez, S.H., and Poppa, V. (2004). Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature* 428, 664-668.

Novakofski, J. (2004). Adipogenesis: usefulness of in vitro and in vivo experimental models. *Journal of animal science* 82, 905-915.

Oka, T., Maillet, M., Watt, A.J., Schwartz, R.J., Aronow, B.J., Duncan, S.A., and Molkentin, J.D. (2006). Cardiac-specific deletion of Gata4 reveals its requirement for hypertrophy, compensation, and myocyte viability. *Circulation research* 98, 837-845.

Orlic, D., Kajstura, J., Chimenti, S., Jakoniuk, I., Anderson, S.M., Li, B., Pickel, J., McKay, R., Nadal-Ginard, B., and Bodine, D.M. (2001). Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 410, 701-705.

Oswald, J., Boxberger, S., Jørgensen, B., Feldmann, S., Ehninger, G., Bornhäuser, M., and Werner, C. (2004). Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro. *Stem cells* 22, 377-384.

Öztaş, P., Çalikoğlu, E. (2003) Hyaluronik asit preparatları. *T Klin Kozmetoloji*, 4: 36-39.

Palpant, N.J., and Metzger, J.M. (2010). Aesthetic cardiology: adipose-derived stem cells for myocardial repair. *Current stem cell research & therapy* 5, 145.

Papenburg, B.J. (2009). Design strategies for tissue engineering scaffolds (University of Twente).

Park J.J., Cintron J.R., Siedentop K.H., Orsay C.P., Pearl R.K., Nelson R.L., Abcarian H. (1999). Technical manual for manufacturing autologous fibrin tissue adhesive. *Diseases of the colon & rectum* 42(10):1334-1338.

Patrick, C.W., Jr. (2001). Tissue engineering strategies for adipose tissue repair. *Anat Rec* 263, 361-366.

Peppas, N., Bures, P., Leobandung, W., and Ichikawa, H. (2000). Hydrogels in pharmaceutical formulations. *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics* 50, 27-46.

Peran, M., Marchal, J.A., Lopez, E., Jimenez-Navarro, M., Boulaiz, H., Rodriguez-Serrano, F., Carrillo, E., Sanchez-Espin, G., de Teresa, E., Tosh, D., et al. (2010). Human cardiac tissue induces transdifferentiation of adult stem cells towards cardiomyocytes. *Cytherapy* 12, 332-337.

Pittenger, M.F., Mackay, A.M., Beck, S.C., Jaiswal, R.K., Douglas, R., Mosca, J.D., Moorman, M.A., Simonetti, D.W., Craig, S., and Marshak, D.R. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284, 143-147.

Porrello, E.R., Mahmoud, A.I., Simpson, E., Hill, J.A., Richardson, J.A., Olson, E.N., and Sadek, H.A. (2011). Transient regenerative potential of the neonatal mouse heart. *Science* 331, 1078-1080.

Rosellini, E., Cristallini, C., Barbani, N., Vozzi, G., and Giusti, P. (2008). Preparation and characterization of alginate/gelatin blend films for cardiac tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 91, 447-453.

Sanchez-Ramos, J., Song, S., Cardozo-Pelaez, F., Hazzi, C., Stedeford, T., Willing, A., Freeman, T., Saporta, S., Janssen, W., and Patel, N. (2000). Adult Bone Marrow Stromal Cells Differentiate into Neural Cells in Vitro *Experimental neurology* 164, 247-256.

Satish, C, Satish, K., and Shivakumar, H. (2006). Hydrogels as controlled drug delivery systems: Synthesis, crosslinking, water and drug transport mechanism. *Indian journal of pharmaceutical sciences* 68, 133.

Schussler, O., Chachques, J.C., Mesana, T.G., Suuronen, E.J., Lecarpentier, Y., and Ruel, M. (2010). 3-Dimensional structures to enhance cell therapy and engineer contractile tissue. *Asian cardiovascular & thoracic annals* 18, 188.

Sell, S. (2004), *Stem Cells Handbook*, Humana Press Inc.

Sharna, S, Jackson, P.G, Makan, J.(2008). Cardiac troponins. *European Journal of Cell Biology* 87:173–184

Shastri, V.P. (2003). Non-degradable biocompatible polymers in medicine: past, present and future. *Current pharmaceutical biotechnology* 4, 331-337.

Slaughter, B.V., Khurshid, S.S., Fisher, O.Z., Khademhosseini, A., and Peppas, N.A. (2009). Hydrogels in regenerative medicine. *Advanced Materials* 21, 3307-3329.

Smas, C.M., and Sul, H.S. (1995). Control of adipocyte differentiation. *Biochemical Journal* 309, 697.

Sottile, V., Halleux, C., Bassilana, F., Keller, H., and Seuwen, K. (2002). Stem cell characteristics of human trabecular bone-derived cells. *Bone* 30, 699-704.

Sterodimas, A., de Faria, J., Nicaretta, B., and Pitanguy, I. (2010). Tissue engineering with adipose-derived stem cells (ADSCs): current and future applications. *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery* 63, 1886.

Stevens, K.R., Pabon, L., Muskheli, V., and Murry, C.E. (2008). Scaffold-free human cardiac tissue patch created from embryonic stem cells. *Tissue Engineering Part A* 15, 1211-1222.

Tam, P., Parameswaran, M., Kinder, S.J., and Weinberger, R.P. (1997). The allocation of epiblast cells to the embryonic heart and other mesodermal lineages: the role of ingression and tissue movement during gastrulation. *Development* 124, 1631-1642.

Toma, C., Pittenger, M.F., Cahill, K.S., Byrne, B.J., and Kessler, P.D. (2002). Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation* 105, 93-98.

Vacanti, C.A. (2006). The history of tissue engineering. *J Cell Mol Med* 10, 569-576.

Vats, A., Tolley, N., Polak, J., and Gough, J. (2003). Scaffolds and biomaterials for tissue engineering: a review of clinical applications. *Clinical Otolaryngology & Allied Sciences* 28, 165-172.

Vieira, J.M., and Riley, P.R. (2011). Epicardium-derived cells: a new source of regenerative capacity. *Heart* 97, 15-19.

Vunjak-Novakovic, G., Tandon, N., Godier, A., Maidhof, R., Marsano, A., Martens, T.P., and Radisic, M. (2009). Challenges in cardiac tissue engineering. *Tissue Engineering Part B: Reviews* 16, 169-187.

Weng, Y.S., Lin, H.Y., Hsiang, Y.J., Hsieh, C.T., and Li, W.T. (2003). The effects of different growth factors on human bone marrow stromal cells differentiating into hepatocyte-like cells. *Tissue Engineering, Stem Cells, and Gene Therapies*, 119-128.

Wu, K., Liu, Y.L., Cui, B., and Han, Z. (2006). Application of stem cells for cardiovascular grafts tissue engineering. *Transpl Immunol* 16, 1-7.

Ye, Q., Zünd, G., Benedikt, P., Jockenhoevel, S., Hoerstrup, S.P., Sakyama, S., Hubbell, J.A., and Turina, M. (2000). Fibrin gel as a three dimensional matrix in cardiovascular tissue engineering. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery* 17, 587-591.

Ye, Z., Zhou, Y., Cai, H., and Tan, W. (2011). Myocardial regeneration: Roles of stem cells and hydrogels. *Advanced drug delivery reviews* 63, 688-697.

Yokoo, N., Baba, S., Kaichi, S., Niwa, A., Mima, T., Doi, H., Yamanaka, S., Nakahata, T., and Heike, T. (2009). The effects of cardioactive drugs on cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells. *Biochemical and biophysical research communications* 387, 482-488.

Zammaretti, P., and Jaconi, M. (2004). Cardiac tissue engineering: regeneration of the wounded heart. *Current opinion in biotechnology* 15, 430-434.

Zhang, F., He, C., Cao, L., Feng, W., Wang, H., Mo, X., and Wang, J. (2011). Fabrication of gelatin-hyaluronic acid hybrid scaffolds with tunable porous structures for soft tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules* 48, 474-481.

Zhao, H., Ma, L., Zhou, J., Mao, Z., Gao, C., and Shen, J. (2007). Fabrication and physical and biological properties of fibrin gel derived from human plasma. *Biomedical Materials* 3, 015001.

Zuk, P.A., Zhu, M., Mizuno, H., Huang, J., Futrell, J.W., Katz, A.J., Benhaim, P., Lorenz, H.P., and Hedrick, M.H. (2001). Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue engineering* 7, 211-228.

Zvaifler, N.J., Marinova-Mutafchieva, L., Adams, G., Edwards, C.J., Moss, J., Burger, J.A., and Maini, R.N. (2000). Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. *Arthritis research* 2, 477-488.

## EKLER

**Çizelge 7.1.** Gerçek zamanlı PZR sonucunda deney gruplarındaki GATA4 geninin CT değerleri

Deney Grupları	GATA4 CT değerleri (1)		GATA4 CT değerleri (2)		GATA4 CT değerleri (3)	
	Hedef gen CT	Referans gen CT	Hedef gen CT	Referans gen CT	Hedef gen CT	Referans gen CT
1	39,13	27,7	40,2	27,53	39,665	27,615
2	39,11	26,41	40,51	25,99	39,81	26,2
3	38,94	26,95	39,57	26,89	39,255	26,92
4	37,24	25,97	37,66	26,2	37,45	26,085
5	40,05	27,03	39,81	27,42	39,93	27,225
6	40,2	26,02	40,32	26,1	40,26	26,06
7	39	27,85	39,2	27,76	39,1	27,805
8	39,91	26,19	40,1	26,35	40,005	26,27
9	38,91	28,91	36,73	28,43	37,82	28,67
10	36,41	26,8	35,62	27,34	36,015	27,07
11	35,85	29,2	36,4	29,05	36,9	29,125
12	36,93	26,6	36,02	26,74	36,475	26,67
13	40,64	27,95	41,83	28,07	41,235	28,01
14		26,42		26,14	0	26,28
15	40	27,72	40,05	27,6	40,025	27,66
16	46,4	26,62	46,52	26,87	46,46	26,745

**Çizelge 7.2.** Gerçek zamanlı PZR sonucunda TBX5 geninin CT değerleri

Deney Grupları	TBX5 CT değerleri (1)		TBX5 CT değerleri (2)		TBX5 CT değerleri (3)	
	Hedef gen CT	Referans gen CT	Hedef gen CT	Referans gen CT	Hedef gen CT	Referans gen CT
1	33,55	27,62	33,61	27,12	33,58	27,37
2	33,26	26,64	32,57	25,89	32,915	26,265
3	32,48	27,1	32,29	26,85	32,385	26,975
4	33,02	26,42	31,92	26,08	32,47	26,25
5	34,25	27,36	33,72	27,2	33,985	27,28
6	33,59	26,36	32,93	25,9	33,26	26,13
7	35,79	28,65	35,27	27,94	35,53	28,295
8	33,58	26,72	32,94	26,48	33,26	26,6
9	33,55	28,94	33,87	28,8	33,71	28,87
10	34,16	26,95	33,51	26,84	33,835	26,895
11	35,87	29,46	35,78	29,02	35,825	29,24
12	33,18	27,14	32,44	26,6	32,81	26,87
13	34,67	27,89	34,44	28,23	34,555	28,06
14	36,81	26,57	37,92	26,14	37,365	26,355
15	34,2	27,68	34,01	27,88	34,105	27,78
16	35,95	26,6	35,82	27,29	35,885	26,945

**Çizelge 7.3.** Gerçek zamanlı PZR sonucunda cTn I geninin CT değerleri

Deney Grupları	cTn I CT değerleri (1)		cTn I CT değerleri (2)		cTn I CT değerleri (3)	
	Hedef gen CT	Referans gen CT	Hedef gen CT	Referans gen CT	Hedef gen CT	Referans gen CT
1	31,99	27,81	31,59	27,65	31,79	27,73
2	31,33	26,74	30,46	26,05	30,895	26,395
3	31,62	27,38	31,25	27,13	31,435	27,255
4	32,23	26,7	31,36	26,44	31,795	26,57
5	34,49	27,63	33,78	27,13	34,135	27,38
6	34,22	25,99	34,29	26,12	34,255	26,055
7	34,48	28,44	34,59	28,3	34,535	28,37
8	35,25	26,82	34,88	26,5	35,065	26,66
9	32,68	29,07	32,32	29,03	32,5	29,05
10	30,63	27,07	29,99	26,97	30,31	27,02
11	33,66	29,94	31,98	28,89	32,82	29,415
12	31,03	27,08	30,57	26,8	30,8	26,94
13	34,14	28,08	34,34	28,17	34,24	28,125
14	32,98	26,68	32,52	26,13	32,75	26,405
15	35,24	27,8	34,49	28,11	34,865	27,955
16	34,11	26,9	33,37	27,22	33,74	27,06

**Çizelge 7. 4.** Deney gruplarının ANOVA testi ile çoklu karşılaştırılması

		14.GÜN			21. GÜN		
		GATA 4geni P değerleri	TBX5 geni P değerleri	c TN I geni P değerleri	GATA 4geni P değerleri	TBX5 geni P değerleri	c TN I geni P değerleri
Kontrol-c.s	Kontrol -jel	.000	.332	.007	.000	.001	1.000
	İns- c.s	1.000	1.000	.000	1.000	.083	.000
	İns- jel	.008	.212	.000	.008	.000	.000
	Bmp- cs	.000	.201	.000	.000	.000	.000
	Bmp-jel	.103	.000	.000	.103	.009	.000
	Aza- c.s	.999	.521	1.000	.540	.990	1.000
	Aza- jel	.540	1.000	.233	.999	.004	1.000
Kontrol-jel	Kontrol-c.s	.000	.332	.007	.000	.001	1.000
	İns-cs	.000	.330	.000	.000	.383	.000
	İns-jel	.033	.003	.000	.033	.000	.000
	Bmp-cs	1.000	.003	.001	1.000	.540	.000
	Bmp-jel	.003	.000	.000	.003	.953	.000
	Aza- c.s	.000	1.000	.010	.000	.000	1.000
	Aza-jel	.000	.445	.561	.000	.996	.997
İns-c.s	Kontrol-c.s	1.000	1.000	.000	1.000	.083	.000
	Kontrol-jel	.000	.330	.000	.000	.383	.000
	İns-jel	.020	.214	.000	.020	.000	.887
	Bmp-c.s	.000	.203	.000	.000	.013	.023
	Bmp-jel	.214	.000	.007	.214	.934	.987
	Aza-c.s	.977	.518	.000	.789	.018	.000
	Aza-jel	.789	1.000	.000	.977	.771	.000
İns-jel	Kontrol-c.s	.008	.212	.000	.008	.000	.000
	Kontrol-jel	.033	.003	.000	.033	.000	.000
	İns-c.s	.020	.214	.000	.020	.000	.887
	Bmp-c.s	.082	1.000	.000	.082	.000	.234
	Bmp-jel	.879	.000	.515	.879	.000	1.000
	Aza-c.s	.003	.005	.000	.289	.000	.000
	Aza-jel	.289	.147	.000	.003	.000	.000
Bmp-c.s	Kontrol-c.s	.000	.201	.000	.000	.000	.000
	Kontrol-jel	1.000	.003	.001	1.000	.540	.000
	İns-c.s	.000	.203	.000	.000	.013	.023
	İns-jel	.082	1.000	.000	.082	.000	.234
	Bmp-jel	.007	.000	.000	.007	.110	.110
	Aza-c.s	.000	.005	.000	.001	.000	.000
	Aza-jel	.001	.139	.000	.000	.214	.000
Bmp-jel	Kontrol-c.s	.103	.000	.000	.103	.009	.000
	Kontrol-jel	.003	.000	.000	.003	.953	.000
	İns-c.s	.214	.000	.007	.214	.934	.987
	İns-jel	.879	.000	.515	.879	.000	1.000
	Bmp-c.s	.007	.000	.000	.007	.110	.110
	Aza-c.s	.041	.000	.000	.944	.002	.000
	Aza-jel	.944	.000	.000	.041	1.000	.000
Aza-c.s	Kontrol-c.s	.999	.521	.233	.999	.990	1.000
	Kontrol-jel	.000	1.000	.561	.000	.000	1.000
	İns-c.s	.977	.518	.000	.977	.018	.000
	İns-jel	.003	.005	.000	.003	.000	.000
	Bmp-c.s	.000	.005	.000	.000	.000	.000
	Bmp-jel	.041	.000	.000	.041	.002	.000
	Aza-jel	.282	.653	.307	.282	.001	1.000
Aza-jel	Kontrol-c.s	.540	1.000	.999	.540	.004	1.000

Kontrol-jel	.000	.445	.000	.000	.996	.997
İns-c.s	.789	1.000	.977	.789	.771	.000
İns-jel	.289	.147	.003	.289	.000	.000
Bmp-c.s	.001	.139	.000	.001	.214	.000
Bmp-jel	.944	.000	.041	.944	1.000	.000
Aza-c.s	.282	.653	.282	.282	.001	1.000

\*İns: insülin, valproik asit içeren besiyeri, Bmp: BMP-4, valproik asit içeren besiyeri

Aza: 5-azasitidin içeren besiyeri, c.s: cam slayt,

**Çizelge 7.5.** 14. ve 21. günlerdeki aynı deney gruplarının Paired Sample Test ile karşılaştırılması

Kıyaslanan gruplar	GATA 4geni P değerleri	TBX5 geni P değerleri	c TN I geni P değerleri
Kontrol-c.s 14 - Kontrol-c.s 21	.000	.009	.075
Kontrol-jel 14 – Kontrol-jel 21	.019	.034	.170
İns-c.s 14 – İns-c.s 21	.060	.211	.025
İns-jel 14 – İns-jel 21	.098	.015	.009
Bmp-c.s 14 – Bmp-c.s 21	.074	.305	.000
Bmp-jel 14 – Bmp-jel 21	.021	.002	.063
Aza-c.s 14 – Aza-c.s 21	.000	.004	.001
Aza-jel 14 – Aza-jel 21	.009	.307	.018



## ÖZGEÇMİŞ

İsim-Soyisim, Unvan: Esra Korurer, Biyomühendis

Adres: Fırat Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü, Merkez/Elazığ

Telefon: 0536 271 2716

E-posta: [korureresra@gmail.com](mailto:korureresra@gmail.com)

### KİŞİSEL BİLGİLER

Doğum Tarihi: 14/04/1988

Medeni Hal: Bekar

### EĞİTİM BİLGİLERİ

09/2010 – **Yüksek Lisans**

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

09/2005 – 06/2010 **Lisans**

Ege Üniversitesi – Biyomühendislik Bölümü – İzmir/ TÜRKİYE

### BİLGİSAYAR BECERİLERİ

Microsoft Office

Mat Lab

Chemcad

SPSS

Dizayn Expert

### KONUŞMA BECERİLERİ

İngilizce -Batı Dilleri Yabancı Dil Kursu, İzmir, Ege Üniversitesi hazırlık

**Çalıştığı yurt dışı ortak projeler:** 2234 - Bilimsel İşbirliğine Yönelik Etkinlikleri Destekleme Programı (New INDIGO) " Mekanik kalp kapakçıkları üzerine kaplama ile yapılandırılmış yüzey: Tromboz teshisi (HeartSen)" başlıklı proje araştırmacısı, 04. 2011-04. 2012.

**Güncel Araştırma Alanları:** Kalp Kası Doku Mühendisliği, yumuşak doku mühendisliği, üç boyutlu doku üretimi, biyobozunur polimerik yapılar, hidrojeller.

### ULUSAL BİLİMSEL ETKİNLİKLERDE POSTER BİLDİRİLERİ

**1.Korurer E,** Kenar H, Karaöz E. Effect of Scaffold Based Mechanical Influence on Differentiation of Mesenchymal Stem Cells to Muscle Cells **1. Kök Hücre Araştırmaları Kongresi (Uluslar arası katılımlı), PP- 26, p215, 28 Eylül -02 Ekim 2011, Sapanca** (En iyi ikinci poster seçilmiştir).

**2.Korurer E,** Kenar H, Karaöz E. Production Of A Composite Hyaluronic Acid/Gelatin/Blood Plasma Gel For Soft Tissue Engineerin Applications, **3. TERMIS World Congress, Tissue Engineering and Regenerative Medicine, September 5-8, 2012, Vienna- Austria**

**3.Korurer E, Kenar H, Z.S. Unal, Karaöz E. Cardiomyogenic Differentiation of Human Lipoaspirate Derived Stem Cells on Hyaluronic Acid/Gelatin Blood Plasma Gels, 18. Uluslararası Biyomedikal Bilimleri ve Teknolojileri Sempozyumu, PP-22, p69, 10- 13 Eylül, 2012, Tokat**

