

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

TEMEL BİYOTEKNOLOJİ YÜKSEK LİSANS TEZİ

FONKSİYONEL DOKU MÜHENDİSLİĞİ YÖNTEMİ İLE İSKELET KASI
GELİŞTİRİLMESİNDE YAĞ KAYNAKLI MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN
KULLANILMASI

EMRE ERGENE

AĞUSTOS

2017

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

TEMEL BİYOTEKNOLOJİ YÜKSEK LİSANS TEZİ

FONKSİYONEL DOKU MÜHENDİSLİĞİ YÖNTEMİ İLE İSKELET KASI
GELİŞTİRİLMESİNDE YAĞ KAYNAKLI MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN
KULLANILMASI

Emre ERGENE

Danışman Öğretim Üyesi

Doç. Dr. Pınar YILGÖR HURİ

AĞUSTOS

2017

ETİK BEYAN

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

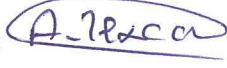
Emre ERGENE



ONAY

Doç. Dr. Pınar YILGÖR HURİ danışmanlığında Emre ERGENE tarafından hazırlanan bu çalışma 24/08/2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Ayşen TEZCANER

İmza: 

Üye: Doç. Dr. Pınar YILGÖR HURİ

İmza: 

Üye: Yrd. Doç. Dr. Evren Doruk ENGİN

İmza: 

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Aykut ÖZKUL

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Fonksiyonel Doku Mühendisliği Yöntemi İle İskelet Kası Geliştirilmesinde Yağ Kaynaklı
Mezenkimal Kök Hücrelerin Kullanılması

Emre ERGENE

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

Danışman: Doç. Dr. Pınar YILGÖR HURİ

Vücut ağırlığının yaklaşık yarısını oluşturan iskelet kası çeşitli nedenlerle sıklıkla hasar görmektedir. Her ne kadar iskelet kası, içeriğindeki kök hücrelerin aktivitesiyle kendini yenileme mekanizmasına sahip olsa da, özellikle büyük hacimli kas kaybı vakalarında rejenerasyon tam olarak gerçekleşmemektedir. Bu gibi durumlarda iskelet kası rejenerasyonunun sağlanabilmesi için literatürde hücre taşıyıcılarının, kök hücrelerin, iyileştirmeyi artırıcı faktörlerin kullanıldığı ve gen tedavisi yaklaşımının uygulandığı çeşitli çalışmalar mevcuttur. Ancak tüm bu çalışmaların kısıtlı başarısı, kas iyileşmesinde hücre sel tedavilerin tek başına yeterli olmadığı, özellikle büyük hacimli kas kayıplarının iyileşme sürecinde fiziksel olarak da desteklenmesi gerekliliği ve hücrelerin doku iskeleleri ile beraber kullanılmasının etkin sonuçlar elde edilmesinde gerekli olduğu sonuçlarını işaret etmektedir. Bu noktadan hareketle, hücrelerin, doku iskelelerinin ve biyoaktif moleküllerin bir arada kullanılmasıyla kaybedilmiş veya zarar görmüş dokuların onarılması ya da değiştirilmesi amacıyla biyolojik sistemler geliştiren disiplinlerarası bir araştırma alanı olan doku mühendisliği, fonksiyonel bir kas grefti geliştirilmesi için büyük önem taşımaktadır.

Bu tez çalışması, iskelet kasının doğal yapısını taklit edecek şekilde paralel yönlenmiş fiber yapıların üretilmesine ve bu fiberlerin içerisine yerleştirilen yağ kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin (ASC) serbest ve yönlenmiş durumda, statik ve dinamik hücre kültürü koşullarında miyojenik farklılaşma kapasitesinin araştırılmasına odaklanmıştır. Dolayısıyla bu tez çalışmasında, yapısal ve fizyolojik olarak kas mikroçevresinin taklit edilmesi amacıyla ASC içeren fibrin fiberlerin yönlenme ekseninde periyodik gerilme uygulanarak

ASC miyojenik farklılaşması sağlanması ve 3 boyutlu fonksiyonel kas grefti geliştirilmesi amaçlanmıştır.

Üretilen fibrin temelli fiberlerin kas mikroçevresini taklit edecek sertlikte olduğu ve bunun fiberler içinde hücre büyümesi ve paralel yönlenmesiyle arttığı belirlenmiştir. Serbest fiberler içlerinde hücre olsa dahi paralel yönlenmenin sağlanamaması nedeniyle 8-10 kPa sertliğe sahiptir fakat bu sertlik doğal kas yapısı için yeterli değildir. Hücreli ve yönlendirilmiş fiberler ise yeterli sertlik olan 12 kPa üzerinde bir sertliğe sahiptir.

ASC miyojenik farklılaşmasının sağlanması için 5-azasitidin ile kimyasal indüklemeye uygulanmıştır. 5-azasitidin uygulanan örneklerde hücre çoğalması uygulanmayanlara göre yavaş seyretmiştir. Statik kültürde miyojenik belirteçlerin tayini için yapılan immünfloresan boyama sonuçlarına göre kimyasal indüklemeye tek başına yeterli olmamıştır.

Kas mikroçevresinin yapısal olduğu kadar mekanik olarak da taklit edilmesi için uygulanan dinamik kültür koşullarında ise hücreler statik kültüre göre daha düzensiz hizalanmış olsalar da yapılan immünfloresan boyama sonuçlarına göre kas spesifik belirteçleri olan MyoD-1, Desmin ve Myogenin'i 21 günlük deney periyodunda artan oranda ifade ettiği belirlenmiştir.

Sonuç olarak, kimyasal olarak indüklenen ASC hücrelerinin dinamik kültür ortamında statik kültür ortamına göre kas spesifik belirteçleri göstererek miyojenik farklılaşma yolağına girdikleri gösterilmiştir.

2017, 68 sayfa

Anahtar kelimeler: Doku Mühendisliği; Biyomalzeme; İskelet Kası; Yağ Kaynaklı Kök Hücre; Dinamik Kültür

ABSTRACT

MSc Thesis

Use of Adipose Derived Mesenchymal Stem Cells in Functional Skeletal Muscle Tissue
Engineering

Emre Ergene

Ankara University Biotechnology Institute

Supervisor: Assoc. Prof. Pınar Yılmaz Huri

The skeletal muscle that constitutes of almost half of the body weight is often damaged for various reasons. Despite the fact that skeletal muscle has a self-renewal mechanism by the activity of its stem cells, regeneration is never absolute, especially in situations such as volumetric muscle loss. In such cases, there are various studies in the literature to obtain skeletal muscle regeneration, using scaffolds, stem cells, growth enhancing factors and gene therapy. However, it is observed that cellular therapy alone is not sufficient for muscle healing, and regeneration of large volume muscle loss should also be physically supported during the healing period, and that cells used together with scaffolds are more effective. From this viewpoint, tissue engineering, an interdisciplinary field that develops biological systems for repairing or replacing lost or diseased tissues using cells, scaffolds, and bioactive molecules together, is of great importance for the development of functional muscle grafts.

This thesis focuses on the production of the aligned fiber structures that mimic natural skeletal muscle and investigation of the myogenic differentiation capacity in static and dynamic cell culture conditions in the free and aligned fiber of adipose derived mesenchymal stem cells (ASC) encapsulated within these fibers. Therefore, in this thesis, it was aimed to provide ASC myogenic differentiation and to develop 3D functional muscle graft by applying periodic stress on the orientation axis of ASC-laden fibrin fibers in order to imitate the structural and physiological muscle microenvironment.

It has been determined that the fibrin-based fibers produced are stiff enough to mimic the muscle microenvironment and that stiffness increases with cell growth and parallel

orientation in the fibers. Because of the inability to provide parallel orientation, in spite of with cells, free fibers' stiffness is 8-10 kPa. So this stiffness is not enough for natural muscle structure. Contrary to free fibers, aligned fibers' stiffness is more than 12 kPa due to cell alignment.

Chemical induction with 5-azacitidine was applied to ensure ASC myogenic differentiation. Induced cells proliferation was slower than uninduced ones and according to the results of immunofluorescence staining for identification of myogenic markers in static culture, chemical induction alone was not sufficient for myogenesis.

ASC-laden fibers, in order for the muscular microenvironment to be initiated mechanically as well as structurally, was dynamically cultured. Even though the cells are more irregularly aligned than the static culture, that was expressed MyoD-1, Desmin, and Myogenin, which are muscle specific markers.

In conclusion, the studies have shown that chemically induced ASC cells in the dynamic culture according to in the static culture have been entered myogenic differentiation pathway by showing muscle specific markers.

2017, 68 pages

Keywords: Tissue engineering; Biomaterials; Skeletal muscle; Adipose-Derived Stem Cell; Dynamic Culture

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam sırasında kıymetli bilgi, birikim ve tecrübeleri ile bana yol gösterici ve destek olan değerli danışman hocam sayın Doç. Dr. Pınar Yılgör Huri'ye, sağladığı altyapı imkanları ile laboratuvar çalışmalarımı gerçekleştirmemi sağlayan BIOMATEN'e ve ilgi ve önerilerini hiçbir zaman esirgemeyen sayın Prof. Dr. Vasıf HASIRCI'ya sonsuz teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Yüksek lisans eğitimim boyunca yardım, bilgi ve tecrübeleri ile bana sürekli destek olan Deniz SEZLEV BİLECEN, Dr. Menekşe ERMİŞ ŞEN ve Dr. Arda BÜYÜKSUNGUR hocalarıma teşekkür ederim.

Çalışmalarım boyunca yardımlarını hiç esirgemeyen, başta değerli arkadaşlarım Onur HASTÜRK ve Elbay MALİKMAMMADOV olmak üzere tüm laboratuvar arkadaşlarıma teşekkürü bir borç bilirim.

Tez çalışmasında kullanılan hücre kaynağını sağlayan Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi ana bilim dalından sayın Doç. Dr. Burak KAYA'ya teşekkür ederim.

Verdikleri finansal destek için TÜBİTAK 214M160 nolu projeye ve Ankara Üniversitesi BAP 16L0443010 nolu projeye teşekkürlerimi sunarım.

Tüm iyi ve kötü zamanlarımda yanımda olan Arzu COŞGUN'a özel teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak çalışmalarım boyunca maddi ve manevi destekleriyle beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan aileme teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

<u>ETİK BEYAN</u>	<u>I</u>
<u>ÖZET</u>	<u>III</u>
<u>ABSTRACT</u>	<u>V</u>
<u>TEŞEKKÜR.....</u>	<u>VII</u>
<u>İÇİNDEKİLER.....</u>	<u>VIII</u>
<u>SEKİLLER DİZİNİ.....</u>	<u>X</u>
<u>ÇİZELGELER DİZİNİ.....</u>	<u>XV</u>
<u>SİMGELER DİZİNİ</u>	<u>XVI</u>
<u>1. GİRİŞ</u>	<u>1</u>
<u>2. KURAMSAL TEMELLER.....</u>	<u>2</u>
2.1. İSKELET KASININ YAPISI VE REJENERASYONUNDA KLİNİK YAKLAŞIMLAR.....	2
2.2. DOKU MÜHENDİSLİĞİ	5
2.2.1. İSKELET KASI DOKU MÜHENDİSLİĞİ	7
2.2.1.1. Hücre Kaynakları.....	9
2.2.1.2. Hücre Taşıyıcı Sistemler.....	10
2.2.1.2.1. Sentetik Polimerler.....	11
2.2.1.2.2. Doğal Polimerler	12
2.2.1.3. Hücre Uyarım Yöntemleri	15
2.2.1.3.1. Biyoaktif Moleküller.....	15
2.2.1.3.2. Mekanotransdüksiyon	15
<u>3. GEREKÇE VE AMAÇ.....</u>	<u>17</u>
<u>4. MATERYAL VE YÖNTEM.....</u>	<u>18</u>
4.1. MATERYAL	18
4.2. YÖNTEM.....	19
4.2.1. ASC HÜCRELERİNİN İZOLASYONU	19

4.2.2. AKIŞ SİTOMETRİSİ	20
4.2.3. ASC İÇEREN YÖNLENMİŞ FİBRİN FİBERLERİN ÜRETİLMESİ	20
4.2.4. SERBEST FİBRİN FİBERLERİN HAZIRLANMASI	22
4.2.5. ALJİNAT LİYAZ ENZİMİ UYGULAMASI.....	22
4.2.6. FİBERLERİN MEKANİK KARAKTERİZASYONU	23
4.2.7. STATİK HÜCRE KÜLTÜRÜ	23
4.2.8. DİNAMİK HÜCRE KÜLTÜRÜ	24
4.2.9. ALAMAR BLUE HÜCRE CANLILIK TESTİ	25
4.2.10. CANLI/ÖLÜ (LİVE/DEAD) BOYAMASI.....	25
4.2.11. İMMÜN FLORESAN BOYAMA	26
<u>5. ARAŞTIRMA BULGULARI.....</u>	28
5.1. HÜCRE KARAKTERİZASYONU	28
5.2. FİBRİN FİBER ÜRETİM OPTİMİZASYONU	29
5.2.1. YÖNLENDİRİLMİŞ FİBERLERİN OPTİMİZASYONU	30
5.2.2. ALJİNAT LİYAZ ENZİMİ UYGULAMASI.....	33
5.2.3. SERBEST FİBERLERİN OPTİMİZASYONU	34
5.3. ASC YÜKLÜ FİBRİN FİBERLERİN STATİK KÜLTÜR İNCELEMESİ.....	35
5.3.1. MEKANİK TEST BULGULARI.....	46
5.4. ASC YÜKLÜ FİBRİN FİBERLERİN DİNAMİK KÜLTÜR İNCELEMESİ	46
<u>6. TARTIŞMA VE SONUÇ.....</u>	56
6.1. TARTIŞMA	56
6.1.1. FİBRİN FİBER ÜRETİM SONUÇLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ	56
6.1.2. HÜCRE CANLILIK TESTLERİ DEĞERLENDİRMESİ.....	57
6.1.2.1. Canlı/Ölü Boyama Sonuçları Değerlendirmesi	57
6.1.2.2. Alamar Blue Sonuçları Değerlendirmesi	57
6.1.3. İMMÜN FLORESAN BOYAMA SONUÇLARI DEĞERLENDİRMESİ	58
6.1.4. MEKANİK TEST SONUÇLARI DEĞERLENDİRMESİ	59
6.2. SONUÇ.....	59
<u>KAYNAKLAR.....</u>	61
<u>ÖZGEÇMİŞ</u>	65
<u>TEZ KAYNAKLI YAYINLAR.....</u>	66

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 İskelet kası yapısının şematik gösterimi.(3)..... 2

Şekil 2.2 Miyoblast enjekte edilmiş kasın Hematoksilen/Eozin ile boyanmış görüntüleri. (A) Enjeksiyonu takiben ilk gün myoblastların boşlukları tamamen kapladığı gözlenmesine rağmen, (B) 24 saat sonunda miktarın azaldığı, ve (C) 7. gün sonunda çok az hücrenin ortamda kaldığı gözlemlenmiştir. (D) Alternatif olarak hücreler bir hücre taşıyıcısı ile birlikte vücuda verildiğinde, defekt bölgesinde lokalize olurlar, immün hücrelerden korunabilir ve difüzyona imkan veren yapısı ile parakrin sinyal iletimi sağlanabilir (7)..... 4

Şekil 2.3 Doku mühendisliği süreçleri. [1] Öncelikle gerekli hücreler hastadan izole edilir ve [2] in vitro şartlarda çoğaltılır, [3] çoğaltılan bu hücreler vücutta yerleştirileceği alana özel olmak üzere tasarlanan taşıyıcı üzerine ekilir. [4] Hücrelerin taşıyıcı ortam içerisinde büyüme ve farklılaşmasını sağlamak için çeşitli büyüme faktörleri eklenir ve [5] ihtiyaç duyulan bölgeye yerleştirilir (14). 6

Şekil 2.4 Kas doku rejenerasyonun şematik gösterimi. (A) normal bir durumda uydu hücreler bazal tabakanın altında uyku halindedir. (B) Bir yaralanma meydana geldiğinde ise aktive olarak yara bölgesine geçerler ve çoğalmaya başlarlar. (C) Çoğalan bu uydu hücrelerin bir kısmı birbirleri ile kaynaşarak olgunlaşmamış miyofiberleri oluştururlarken diğer bir kısmı uydu hücre olarak eski yerlerine geri dönerler. (D) Daha sonra bu olgunlaşmamış hücreler, yara bölgesinde sağlam kalmış miyofiberlerle kaynaşarak olgunlaşırlar. (E) Fakat büyük hacimli kas kayıplarında ise bazal tabaka büyük oranda parçalandığı için yara bölgesini kapatmak üzere gelen fibroblastlar (F) uydu hücrelerinin aktivitesinden çok daha hızlı şekilde bölgeyi kollajenle doldurmaya başlarlar ve (G) kas dokusu yerine bölgede bir yara dokusu oluşur (15)..... 8

Şekil 2.5 Kas rejenerasyonunda uydu hücreleri (3)..... 9

Şekil 2.6 Mezenkimal kök hücreler, çeşitli hormon, kimyasal ya da mekanik sinyaller kullanılarak farklı hücre tiplerine dönüşebilirler (19). 10

Şekil 2.7 Büyük hacimli kas kayıplarının hücre yönlendirme özelliği taşıyan taşıyıcı malzemeler ile tedavi edilmesinin öneminin şematik gösterimi. (B) hasarlı bölgeyi destekleyecek şekilde herhangi bir yönlendirme özelliği bulunmayan jel yapıda hücre taşıyıcısı kullanılan tedavi yaklaşımlarında her ne kadar kas dokusu onarımı olsa da,

miyofiber oluşumu dağınık gerçekleşmekte ve tam bir rejenerasyon olmamaktadır. (C) Daha organize miyofiber oluşumu ve tam bir rejenerasyon için hücre taşıyıcıların kas liflerini taklit edecek şekilde yönlendirilmiş bir yapıda tasarlanması gerekmektedir (15). 13

Şekil 4.1 ASC hücrelerinin izolasyon aşamaları. (a) Steril reseptal poşeti içerisinde ameliyathaneden temin edilen lipoaspirat. (b) Lipoaspirat yıkanarak tüplere alınmış ve kollajenaz çözeltisi ile inkübe edilmiştir. (c) Kollajenaz ile inkübasyon süresi sonunda santrifüjlenen dokuda yağ, kollajenaz ve hücre pelleti faz ayrımı gerçekleşmiştir..... 19

Şekil 4.2 Islak eğirme yöntemiyle fiber üretimi. (a) Fiber üretiminde ıslak eğirme yöntemi kullanılmış; fibrinojen bazlı çözelti şırınga içerisinde şırınga pompası yardımıyla enjekte edilirken çöktürme banyosu içerisinde toplanmıştır. (b) Fiber toplama banyosu döner bir mekanizma üzerine yerleştirilen petri kabı içerisine yerleştirilmiştir. (c, d) Fiberler petri kabı içinde toplanmıştır. Bu görüntülerde fiber oluşumunun net izlenebilmesi için fibrinojen içerisine mavi renkli tripan blue boyası eklenmiştir..... 21

Şekil 4.3 Üretim sonrası fibrin/aljinat fiberler (a) kesilerek (b) teflon çerçeveler etrafına sarılmış ve (c, d) toplama banyosu içerisinde tek eksenle yönlendirmeleri sağlanmıştır. 22

Şekil 4.4 Fiberlere mekanik karakterizasyon için çekme testi uygulanması. (a) Serbest fiberler ve (b) yönlendirilmiş fiberler, (d) mekanik test cihazının çekme çeneleri arasına bağlanan fiber örnekler kopma noktasına kadar çekilmiştir. (c) İki çekme çenesi arasındaki 1 cm boyundaki fiber örneğin yakın görüntüsüdür. 23

Şekil 4.5 Fiberlerin biyoreaktöre yerleştirilmesi. Fiberler yönlendirilmek amacıyla etrafına sarıldıkları çerçeveler üzerinden (a) gösterildiği gibi kesilerek çıkarılmış, (b,c) biyoreaktöre aktararak tutucu çeneler arasına sıkıştırılıp sabitlenmiştir. (d) Hücre kültür ortamı eklenerek CO₂ inkübatörü içerisine aktarılan biyoreaktör içerisinde 21 gün süreyle günde 1 saat tek eksenli periyodik gerilme uygulanarak (%10, 0.5 Hz) dinamik kültür gerçekleştirilmiştir.25

Şekil 4.6 İmmünfloresan boyama için doku kesitlerinin alınması. (a) OCT içerisinde kalıba alma ve (b) alınan kesitler. 27

Şekil 5.1 ASC hücrelerinin (a) izotip kontrol, (b) CD105, (c) CD73 ve (d) CD31 yüzey işaretçilerine karşı akış sitometrisi analizi sonuçları. Siyah renk ile gösterilmiş eğriler boyanmamış hücrelerden alınan sinyalleri temsil etmektedir. 28

Şekil 5.2 Islak eğirme metodu ile üretilen fibrinojen/aljinat fiberlerin faz kontrast mikroskopik görüntüleri (Ölçek: 200 µm).....	29
Şekil 5.3 FA-6015 fiber yapıları içindeki ASC hücrelerinin 1. gün canlı/ölü hücre boyama sonuçları. Yeşil: Kalsein, Kırmızı: EthD-1	31
Şekil 5.4 FA-1015 ve FA-2015 kodlu fiberler içerisinde ASC hücrelerinin 1, 3 ve 7 gün canlı/ölü hücre boyama sonuçları. Yeşil: Kalsein, Kırmızı: EthD-1.....	32
Şekil 5.5 FA-1015 fiberler içerisinde ASC hücrelerinin 3. gün canlı/ölü hücre boyama sonuçları. Yeşil: Kalsein, Kırmızı: EthD-1. Alt sıradaki görüntülerde floresan görüntüleri faz-kontrast görüntülerle karşılaştırılmıştır. AL: 30 dk. boyunca 0.05 u/mL Aljinat liyaz enzimi uygulanmış örnekler.	34
Şekil 5.6 Sarılmış fiberler ve serbest fiberler içerisindeki ASC hücrelerinin 7. gündeki yerleşimleri. Yeşil: Kalsein, Kırmızı: EthD-1.....	35
Şekil 5.7 Serbest fiber deneyi canlı/ölü hücre boyama sonuçları. 1.gün (a), 7.gün (b-c), 14.gün (d-e), 21.gün (f-g). (Üst Panel: İndüklenmemiş, Alt Panel: İndüklenmiş) Yeşil: Kalsein, Kırmızı: EthD-1.....	36
Şekil 5.8 Yönlendirilmiş fiber deneyi canlı/ölü hücre boyama sonuçları. 1.gün (a), 7.gün (b-c), 14.gün (d-e), 21.gün (f-g). (Üst Panel: İndüklenmemiş, Alt Panel: İndüklenmiş) Yeşil: Kalsein, Kırmızı: EthD-1.....	37
Şekil 5.9 Serbest fiberlerde Alamar Blue yöntemiyle canlı hücre sayısı belirlenmesi. Mavi barlar, normal kültür altındaki fiberleri (N.K.O), kırmızı barlar ise indükleme kültür ortamı altındaki fiberleri (İ.K.O), göstermektedir. İndükleme işlemi 24 saat sonra yapıldığı için ilk gün fiberlerinin her ikisi de normal kültür altındadır.	38
Şekil 5.10 Yönlendirilmiş fiberlerde Alamar Blue yöntemiyle canlı hücre sayısı belirlenmesi. Mavi barlar, normal kültür altındaki fiberleri (N.K.O), kırmızı barlar ise indükleme kültür ortamı altındaki fiberleri (İ.K.O) göstermektedir. İndükleme işlemi 24 saat sonra yapıldığı için ilk gün fiberlerinin her ikisi de normal kültür altındadır.	39
Şekil 5.11 Serbest fiber deneyi MyoD-1 immünfloresan boyama sonuçları. 1.gün (a), 7.gün (b-c), 14.gün (d-e), 21.gün (f-g). (Üst Panel: İndüklenmemiş, Alt Panel: İndüklenmiş) Kırmızı: Draç-5, Yeşil: MyoD-1	40

Şekil 5.12 Serbest fiber deneyi Desmin immünfloresan boyama sonuçları. 1.gün (a), 7.gün (b-c), 14.gün (d-e), 21.gün (f-g). (Üst Panel: İndüklenmemiş, Alt Panel: İndüklenmiş) Kırmızı: Drağ-5, Yeşil: Desmin	41
Şekil 5.13 Serbest fiber deneyi Myogenin immünfloresan boyama sonuçları 1.gün (a), 7.gün (b-c), 14.gün (d-e), 21.gün (f-g). (Üst Panel: İndüklenmemiş, Alt Panel: İndüklenmiş) Kırmızı: Drağ-5, Yeşil: Myogenin	42
Şekil 5.14 Yönlendirilmiş fiber deneyi MyoD-1 immünfloresan boyama sonuçları. 1.gün (a), 7.gün (b-c), 14.gün (d-e), 21.gün (f-g). (Üst Panel: İndüklenmemiş, Alt Panel: İndüklenmiş) Kırmızı: Drağ-5, Yeşil: MyoD-1	43
Şekil 5.15 Yönlendirilmiş fiber deneyi Desmin immünfloresan boyama sonuçları. 1.gün (a), 7.gün (b-c), 14.gün (d-e), 21.gün (f-g). (Üst Panel: İndüklenmemiş, Alt Panel: İndüklenmiş) Kırmızı: Drağ-5, Yeşil: Desmin	44
Şekil 5.16 Yönlendirilmiş fiber deneyi Myogenin immünfloresan boyama sonuçları. 1.gün (a), 7.gün (b-c), 14.gün (d-e), 21.gün (f-g). (Üst Panel: İndüklenmemiş, Alt Panel: İndüklenmiş) Kırmızı: Drağ-5, Yeşil: Myogenin	45
Şekil 5.17 Çekme testi uygulanan fiberlerin elastisite modülleri.....	46
Şekil 5.18 Dinamik kültür deneyi canlı/ölü boyama sonuçları. 1.gün (a), 7.gün (b-c), 14.gün (d-e), 21.gün (f-g). (Üst Panel: İndüklenmemiş, Alt Panel: İndüklenmiş) Yeşil: Kalsein, Kırmızı: EthD-1	48
Şekil 5.19 Dinamik kültür deneyi MyoD-1 immünfloresan boyama sonuçları 1.gün (a), 7.gün (b-c), 14.gün (d-e), 21.gün (f-g). (Üst Panel: İndüklenmemiş, Alt Panel: İndüklenmiş) Kırmızı: Drağ-5, Yeşil: MyoD-1	49
Şekil 5.20 Dinamik kültür deneyi Desmin immünfloresan boyama sonuçları. 1.gün (a), 7.gün (b-c), 14.gün (d-e), 21.gün (f-g). (Üst Panel: İndüklenmemiş, Alt Panel: İndüklenmiş) Kırmızı: Drağ-5, Yeşil: Desmin	50
Şekil 5.21 Dinamik kültür deneyi Myogenin immünfloresan boyama sonuçları. 1.gün (a), 7.gün (b-c), 14.gün (d-e), 21.gün (f-g). (Üst Panel: İndüklenmemiş, Alt Panel: İndüklenmiş) Kırmızı: Drağ-5, Yeşil: Myogenin	51

Şekil 5.22 Statik ve dinamik kültür canlı/ölü hücre karşılaştırılması. Statik kültür 14. ve 21. gün (a,b). Dinamik kültür 14. ve 21. gün (c,d).....	52
Şekil 5.23 Dinamik kültür tüm fiber MyoD-1 immünfloresan boyama görüntüleri. 7.gün (a-b), 14.gün (c-d), 21.gün (e-f) (Üst Panel: İndüklenmemiş, Alt Panel: İndüklenmiş), Kırmızı: Draç5, Yeşil: MyoD-1	53
Şekil 5.24 Dinamik kültür tüm fiber Desmin immünfloresan boyama görüntüleri. 7.gün (a-b), 14.gün (c-d), 21.gün (e-f) (Üst Panel: İndüklenmemiş, Alt Panel: İndüklenmiş), Kırmızı: Draç5, Yeşil: Desmin	54
Şekil 5.25 Dinamik kültür tüm fiber Myogenin immünfloresan boyama görüntüleri. 7.gün (a-b), 14.gün (c-d), 21.gün (e-f) (Üst Panel: İndüklenmemiş, Alt Panel: İndüklenmiş), Kırmızı: Draç5, Yeşil: Myogenin.....	55

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Literatürde iskelet kası rejenerasyonunda kullanılan sentetik polimer hücre taşıyıcılarından bazı örnekler	12
Çizelge 2.2 İskelet kası rejenerasyonunda kullanılan doğal polimer hücre taşıyıcıları	14
Çizelge 4.1 Hücrelerin tipleri, kullanılan besiyerleri, nereden temin edildikleri ve pasaj numaraları.....	18
Çizelge 4.2 Deney grupları ve kullanılan konsantrasyonlar	21
Çizelge 5.1 Deney grupları ve ulaşılan sonuçlar özet çizelge.	30



SİMGELER DİZİNİ

AL	Aljinat Liyaz
ASC	Adipose-derived stem cells (Yağ kaynaklı kök hücreler)
BSA	Bovine Serum Albumin (sığır serum albümini)
CD105	Endoglin
CD31	Platelet endothelial cell adhesion molecule (PECAM-1)
CD73	Ekto-5'-nükleotidaz
DMEM	Dulbecco'nun modifiye Eagle ortamı
DMSO	Dimetil sülfoksit
EthD-1	Ethidium Homodimer-1
OCT	Optimum Cutting Temperature (Optimal Kesme Sıcaklığı)
PANI	Polianilin
PCL	Poli(ϵ -kaprolakton)
PEDOT	Poli(3,4-etilendioksitiyofen)
PET	Poli(etilen tereftalat)
PGA	Poli(glikolik asit)
PLA	Poli(laktik asit)
PLGA	Poli(laktik asit-ko-glikolik asit)
PLLA	Poli(L-laktik asit)
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor (Vasküler Endotel Büyüme Faktörü)

1. GİRİŞ

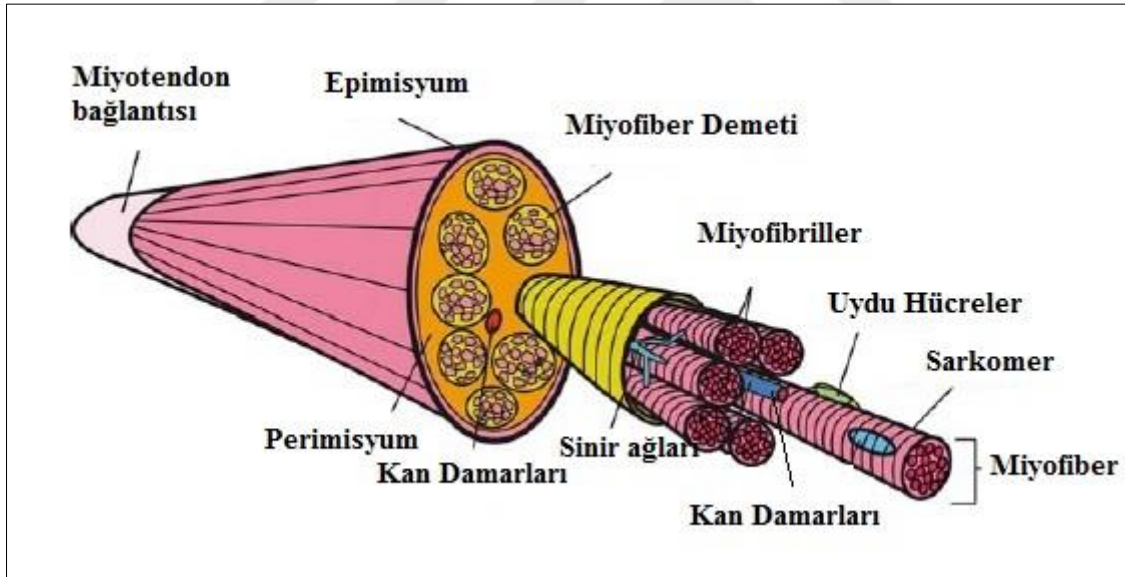
İskelet kası vücut ağırlığının yaklaşık yarısını oluşturan en büyük dokulardan biridir ve spor aktiviteleri ve travma gibi çok çeşitli nedenlerle sıklıkla hasar görmektedir. İskelet kası dokusu, içeriğinde normalde uyku halinde bulunan uydu hücrelerinin, bir hasar sonrası aktive olup, çoğalıp farklılaşması, birbiriyle birleşerek çok çekirdekli miyofiberleri oluşturması ve bunların defekt bölgesi çevresindeki sağlıklı miyofiberlerle entegrasyonu ile kendini yenileyebilme özelliğine sahiptir. Ancak yüksek enerjili travma ya da tümör çıkarılması gibi işlemler sonucunda oluşan büyük hacimli kas defektleri bu doğal yol ile tamir edilemeden kalmaktadır. Günümüzde kas iyileşmesini tetikleyen ya da hızlandıran etkin bir ilaç tedavisi bulunmamaktadır. Cerrahi tedavi seçenekleri ise kullanılabilir otojen greftlerin (kas flepleri) miktarı ile kısıtlıdır (1). Bu nedenlerle büyük hacimli kas kaybı yaşanan vakalarda genellikle uzun ampütasyonu yoluna gidilmektedir. Dünya genelinde büyük hacimli kas kayıplarının tedavisi için harcanan sağlık masrafları yılda 5-6 milyar dolar seviyesindedir (2).

Bu soruna bir çözüm üretebilmek amacıyla çeşitli çalışmalar yürütülmüştür. İskelet kas dokusu rejenerasyonunda son dönemde kök hücreler, iyileştirmeyi artırıcı faktörler ve gen tedavileri üzerine yoğunlaşmıştır. Ancak, özellikle büyük hacimli (volumetrik) kas hasarlarının tedavisinde hücresel tedavilerin tek başına yeterli olmadığı ve iyileşme süresince defekt bölgesinin fiziksel olarak da desteklenmesi gerektiği gösterilmiştir. Bu nedenle, hücrelerin doku iskeleleri ile beraber kullanılmasının kas rejenerasyon terapilerindeki önemi açıktır. Doku mühendisliği yöntemiyle geliştirilecek bir iskelet kası grefti, volumetrik kas hasarları başta olmak üzere kas rejenerasyon problemlerine etkin bir alternatif çözüm getirecektir. Doku mühendisliği, hücreler, taşıyıcı biyomalzemeler ve indüktif ajanlar kullanılarak laboratuvar ortamında fonksiyonel doku ve organlar geliştirilmesini hedefleyen bir araştırma alanıdır.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. İSKELET KASININ YAPISI VE REJENERASYONUNDA KLİNİK YAKLAŞIMLAR

İskelet kası, kemik ve eklemlerin birlikte hareket etmesini sağlayarak iskelete hareket kabiliyetini vermesinin yanı sıra, vücudu maruz kalabileceği darbelerden korur ve sağlamlık verir. İskelet kasının yapısı Şekil 2.1’de gösterildiği şekilde iç içe geçmiş, birbirine paralel uzanan liflerden oluşmaktadır. İskelet kası, miyofiber demetlerinin perimisyum ve epimisyum içerisinde biraraya gelmesi ile oluşur. Miyofiberler, myofibril adı verilen daha küçük lifler içeren çok çekirdekli tek hücrelerdir. Miyofibriller ise sarkomer adı verilen organize, kalın ve ince filamentlerden oluşur ve kasılma sürecinden sorumlu proteinler olan aktin ve miyozinleri içerir. Miyofibriller, uyku halinde bulunan ve gerekli durumlarda aktive olarak kasa rejenerasyon kabiliyetini veren uydu hücreleri içeren bir bazal tabakayla çevrilidir. Kasların bitim noktası, çoğunlukla aktif kasılma özelliği göstermeyen tendonlar ile kemiğe bağlanır.



Şekil 2.1 İskelet kası yapısının şematik gösterimi.(3)

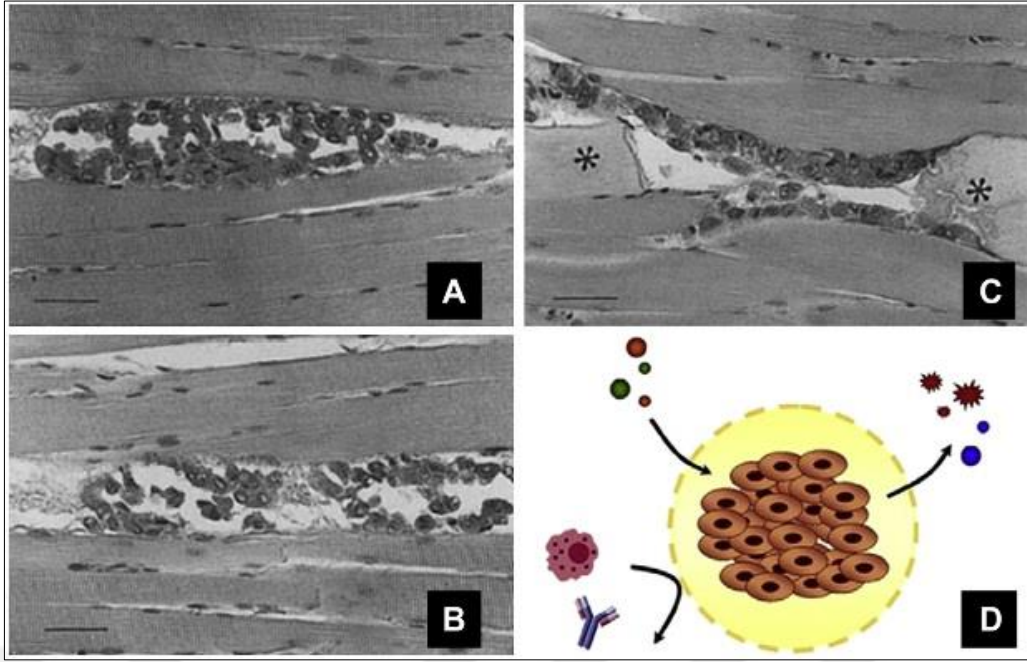
Miyofiber demetleri perimisyum içerisinde paralel şekilde tüm kas boyunca uzanırlar ve miyotendonlar ile kemiğe bağlanırlar. İskelet kası, miyofiberler ve aralarındaki kan damarları ve sinir ağlarından oluşan kompleks bir yapıdır (Şekil 2.1) (3).

Kasların bilinçsiz fazla çalıştırılmasından, Duchenne Musküler Distrofi gibi konjenital ya da edinilmiş hastalıklara, yüksek enerjili travmalardan, tümör çıkarılması operasyonlarına kadar çok geniş bir yelpazede iskelet kası hasarlarıyla karşılaşmaktadır. İskelet kası, normalde uyku halindeki uydu hücreleri aracılığı ile kendisini yenileyebilme yeteneğine sahip olsa da, bahsedilen hastalık ve travmalarda rejenerasyon yeteneği kısıtlıdır. Bu nedenle, klinikte kas hastalıklarını tedavi etme ve kas defektlerini rejenere etme konusunda çeşitli yaklaşımlar geliştirilmiştir.

Klinikte özellikle volumetrik kas defektlerinin onarımında altın standart tedavi olarak kullanılan yöntem otogreftleme yöntemidir. Otogreft yöntemi, vücuttaki bir doku parçasının bulunduğu yerden çıkarılarak, eksik dokunun bulunduğu alana yerleştirilmesi işlemidir. Fakat özellikle büyük hacimli kas kayıplarını telafi edebilecek miktarda sağlam dokunun her zaman bulunabilmesi mümkün olmamaktadır. Ayrıca sağlıklı bir bölgeye cerrahi müdahale gerektirmesi ve yaşlı hastalarda dokuların kendini yenileme yüzdesinin düşük olması sebebiyle her yaş grubuna uygulanabilir olmaması gibi bazı dezavantajlara sahiptir (4).

Otogreftlerin yanısıra, kullanılan diğer tedavi yöntemleri hücre temelli ve biyomalzeme temelli yöntemler olarak iki başlık altında incelenebilir.

Kas hastalıkları tedavilerinde kullanılan hücre temelli yöntemlerden biri kasın primer hücreleri olan miyoblastların enjekte edilmesi yöntemidir. Bu yöntemde hastanın kendisinden alınan miyoblast hücreler laboratuvar ortamında kültür edildikten sonra kas içerisine rejenerasyonu sağlaması amacıyla enjekte edilmektedir. Yapılan klinik çalışmalarda bu yöntemin güvenli bir yöntem olduğu, ancak çok etkin olmadığı ortaya konulmuştur (5). Tedesco ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmalarda, enjekte edilen hücrelerin hızla ölümü, dokuya entegre olamayıp dağılması ve bağışıklık sistemi tarafından reddi gibi sorunlarla karşılaşmıştır (Şekil 2.2) (6).



Şekil 2.2 Miyoblast enjekte edilmiş kasın Hematoksilen/Eozin ile boyanmış görüntüleri. (A) Enjeksiyonu takiben ilk gün myoblastların boşlukları tamamen kapladığı gözlenmesine rağmen, (B) 24 saat sonunda miktarın azaldığı, ve (C) 7. gün sonunda çok az hücrenin ortamda kaldığı gözlemlenmiştir. (D) Alternatif olarak hücreler bir hücre taşıyıcısı ile birlikte vücuda verildiğinde, defekt bölgesinde lokalize olurlar, immün hücrelerden korunabilir ve difüzyona imkan veren yapısı ile parakrin sinyal iletimi sağlanabilir (7).

Literatürde kullanılmış olan diğer bir tedavi yöntemi ise kök hücre terapisi. Kas-kaynaklı kök hücreler (8), kemik iliği-kökenli mezenkimal kök hücreler (9) ya da embriyonik kök hücreler (10) kullanılarak yapılan hücre transplantasyon terapileri bunlara örnek olarak sayılabilir. Ancak tüm bu uygulamalar çeşitli yan etkiler içermektedir. Örneğin G. Ferrari ve arkadaşlarının kemik iliği kaynaklı kök hücreler kullanılarak yapılan çalışmalarında, nakilden sonra defekt bölgesinde çok düşük bir tutunma gözlenmiştir (11). Bhagavati ve Xu'nun embriyonik kök hücre kullanılarak yapılan çalışmalarında ise her ne kadar organize ve damarlanmış kas dokuları oluşturulmuş olsa da, enjeksiyon sonrası ortaya çıkan teratom oluşum riski ve bağışıklık sisteminin hücre reddi riski rapor edilmiştir (10).

Biyomalzeme temelli tedavi yöntemlerinde ise vücuda uyumlu metal, seramik ya da polimer temelli malzemeler kullanılarak üretilen biyomalzemeler tedavi edilmek istenen bölgeye yerleştirilir. Biyomalzemeler, doku iskelesi olarak üretilebileceği gibi, destekleyici bir yama olarak da üretilip kullanılabilir. Örneğin J. Muhammed ve arkadaşlarının polietilen tereftalat (PET) kullanarak yaptıkları çalışmada, yara dokusu oluşumunun (fibrosis) bu

yama sayesinde azaldığı ve böylelikle kas doku iyileşmesine katkı sağlanabildiği gösterilmiştir (12). Fakat bu uygulamaların da yerleştirilen malzemelerin vücuda tam uyum göstermemesi, kontaminasyon riski içermesi gibi bazı sorunlar mevcuttur (4).

Bu yöntemlerin her birinin yukarıda bahsedildiği gibi çeşitli dezavantajları mevcuttur. Oysaki ideal bir iskelet kas grefti:

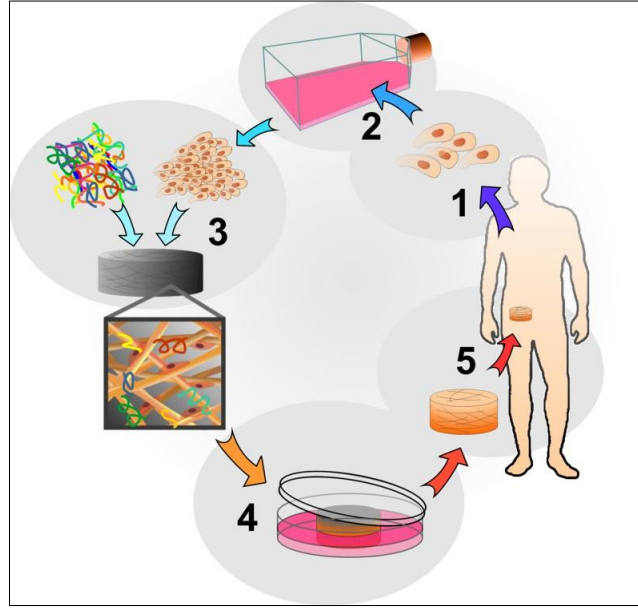
- 1) Toksik etki göstermemeli,
- 2) İmmün yanıt oluşturmamalı,
- 3) Biyobozuma süresi tedavi için gereken süre ile uyumlu olmalı,
- 4) Biyobozuma ürünleri sitotoksik olmamalı ve kolayca vücuttan elimine edilmeli,
- 5) Biyobozunma tamamlanana kadar görev yapacağı bölgede istenilen mekanik bütünlüğü korumalı, ve
- 6) Kolay sterilize edilebilir olmalıdır.

Tüm bu özellikleri barındıran ve otolog hücreler kullanılarak doku mühendisliği yöntemiyle geliştirilecek bir iskelet kası grefti, volumetrik kas hasarları başta olmak üzere kas rejenerasyon problemlerine etkin bir alternatif çözüm getirecektir.

2.2. DOKU MÜHENDİSLİĞİ

Doku ve organların çeşitli nedenlerle işlevini yitirmesi günümüzde dünya çapında büyük bir sağlık problemi olarak kabul edilmektedir. Günümüzde bu problemin çözümü için doku ve organ nakli yöntemi kullanılmaktadır. Ancak yeterli sayıda verici bulunamaması hastaların organ bekleme sıralarında hayatlarını kaybetmelerine yol açmaktadır. Bu noktadan hareketle hastanın kendi hücreleri kullanılarak laboratuvar ortamında doku ve organ üretimi fikri son yıllarda giderek artan bir öneme sahiptir.

Doku mühendisliği terimi ilk olarak 1993 yılında Robert Langer ve Joseph Vacanti'nin yaptıkları çalışma ile tanımlanmıştır (13). Doku mühendisliği, hasar görmüş ve işlevini kaybetmiş olan doku ve organların yerine; hücreler, taşıyıcı biyomalzemeler ve indüktif ajanlar kullanılarak laboratuvar ortamında fonksiyonel doku ve organlar geliştirilmesini hedefleyen disiplinler arası bir araştırma alanıdır. Doku mühendisliği Şekil 2.3'de gösterildiği şekilde temelde beş süreçten oluşur.



Şekil 2.3 Doku mühendisliği süreçleri. [1] Öncelikle gerekli hücreler hastadan izole edilir ve [2] in vitro şartlarda çoğaltılır, [3] çoğaltılan bu hücreler vücutta yerleştirileceği alana özel olmak üzere tasarlanan taşıyıcı üzerine ekilir. [4] Hücrelerin taşıyıcı ortam içerisinde büyüme ve farklılaşmasını sağlamak için çeşitli büyüme faktörleri eklenir ve [5] ihtiyaç duyulan bölgeye yerleştirilir (14).

Doku mühendisliği uygulamalarının en önemli basamaklarından biri hücre kaynağının belirlenmesidir. Teorik olarak ideal hücre kaynağı hedef dokudan direkt izole edilen primer hücrelerdir. Örneğin kıkırdak doku için kondrositler, kemik doku için osteoblastlar, kas dokusu için miyoblastlar bu görevi görürler. Ancak, kemik ve kas dokusu gibi primer hücrelerin izole ve kültür edilmesinin zor olduğu uygulamalarda (izolasyonun zor olması ya da kültür ortamında çoğaltılmasının zor olması gibi nedenler) kök hücreler önemli bir alternatif hücre kaynağı olarak karşımıza çıkmaktadır. Kök hücre, kendini yenileme ve farklı hücre tiplerine farklılaşma potansiyeline sahip hücrelerdir. Embriyonik kök hücreler ve erişkin kök hücreler olarak iki grupta incelenirler. Embriyonik kök hücreler, zigotun seri bölünmeleri sonucu oluşan blastokistin içerisinde bulunan ve canlılardaki en yetkin farklılaşma kapasitesine sahip olan hücrelerdir. Erişkin kök hücreler ise gelişmekte olan organizmalarda bulunur. Gerekliğinde kendilerini çoğaltıp, farklılaşarak dokunun ihtiyacı olan yenilenme ve tamir görevlerini yerine getirebilirler. Kemik iliği, yağ, deri, iskelet kası, diş gibi çeşitli dokularda bulunurlar (15). Erişkin kök hücrelerin laboratuvar ortamında çeşitli hormon ve kimyasallar veya mekanik sinyaller kullanılarak farklı doku hücrelerine de dönüşebildiği bilinmektedir (16). Bu noktadan yola çıkarak doku mühendisliği

uygulamalarında erişkin kök hücreler izolasyonu zor olan primer hücrelerin yerine kullanılabilir.

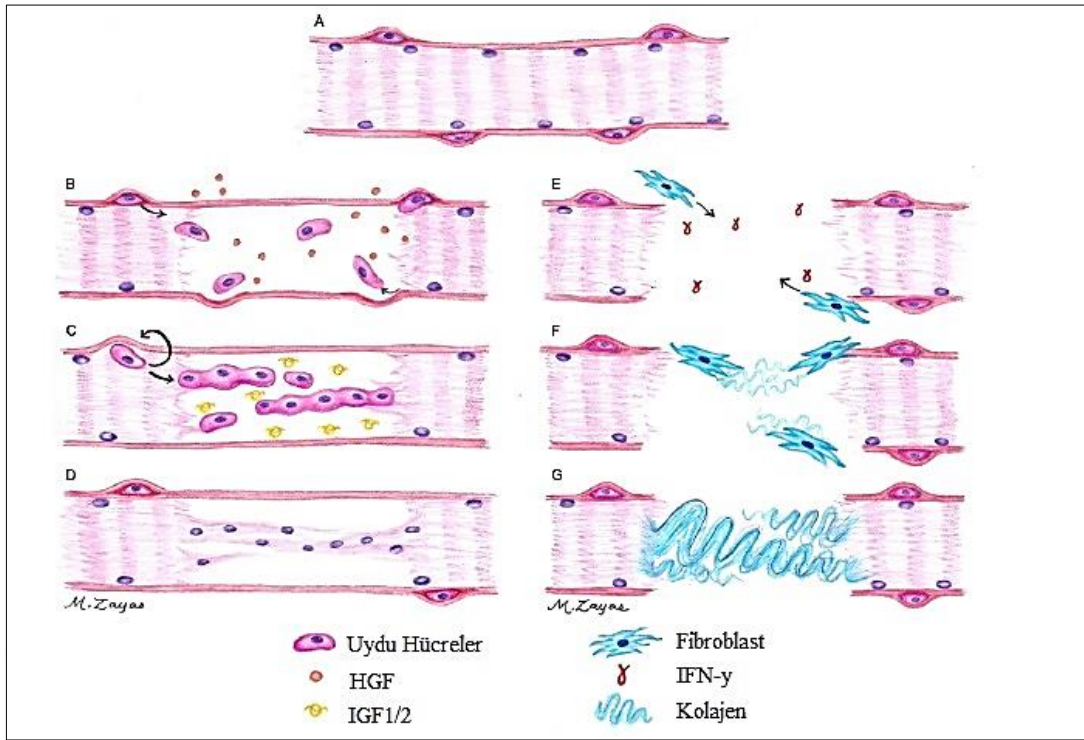
Doku mühendisliği yönteminin bir diğer önemli bileşeni hücre taşıyıcılarıdır. Çeşitli nedenlerle kaybedilmiş olan dokunun tekrar oluşturulabilmesi için destek malzemelerine ihtiyaç duyulmaktadır. Hücre taşıyıcısı dokunun üzerine büyüyüp gelişmesine izin verecek mekanik ve yapısal bazı özelliklere sahip olmalıdır;

- Biyouyumlu
- Biyobozunur
- Gözenekli
- Yeterli mekanik dayanımda
- Yerleştirilecek alana uygun şekil ve boyutta olmalıdır.

Hücre taşıyıcılarıyla birlikte ya da tek başına kullanılan hücrelerin aktivitelerini düzenlemek için büyüme faktörleri de kullanılır. Doku mühendisliği yöntemiyle üretilen greftlere fonksiyonellik (kasılma vb.) kazandırma ve bu greftlerde damarlanma, sinir gelişimi gibi uygulamalar için de biyoaktif moleküllerden yararlanır. Bunlar çözünür halde hücre kültürü ortamına eklenebildiği gibi, çeşitli taşıyıcı sistemler içine hapsedilerek de kullanılabilir.

2.2.1. İskelet Kası Doku Mühendisliği

İskelet kası yaralanmaları dokunun çeşitli nedenlerle zarar görmesi sonucu oluşur (travma, tümör çıkarılması, ateşli silah yaralanması, sportif aktiviteler, vb.). Bu gibi yaralanmalar, özellikle de yüksek enerjili travma ve tümör çıkarma operasyonları, büyük hacimli kas kayıpları ile sonuçlanabilir. Her ne kadar iskelet kasının kendini yenileme özelliği olsa da; doku entegrasyonun bozulduğu vakalarda ve yara dokusu oluşumunun miyojenez sürecinden daha hızlı ilerlediği büyük hacim kas kayıplarında, kendi kendine yenilenme sürecinin yetersiz kaldığı bilinmektedir (Şekil 2.4).



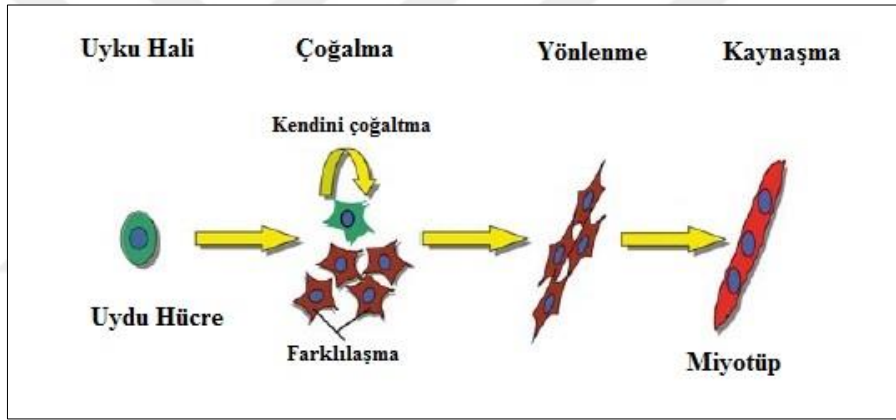
Şekil 2.4 Kas doku rejenerasyonunun şematik gösterimi. (A) normal bir durumda uydu hücreler bazal tabakanın altında uyku halindedir. (B) Bir yaralanma meydana geldiğinde ise aktive olarak yara bölgesine geçerler ve çoğalmaya başlarlar. (C) Çoğalan bu uydu hücrelerin bir kısmı birbirleri ile kaynaşarak olgunlaşmamış miyofiberleri oluştururlarken diğer bir kısmı uydu hücre olarak eski yerlerine geri dönerler. (D) Daha sonra bu olgunlaşmamış hücreler, yara bölgesinde sağlam kalmış miyofiberlerle kaynaşarak olgunlaşırlar. (E) Fakat büyük hacimli kas kayıplarında ise bazal tabaka büyük oranda parçalandığı için yara bölgesini kapatmak üzere gelen fibroblastlar (F) uydu hücrelerinin aktivitesinden çok daha hızlı şekilde bölgeyi kollajenle doldurmaya başlarlar ve (G) kas dokusu yerine bölgede bir yara dokusu oluşur (15).

Bu gibi durumlarda kas rejenerasyonunu sağlayabilmek adına biyomimetik hücre taşıyıcı sistemlerin tasarımına ihtiyaç duyulmaktadır.(15) Son yıllarda yapılan doku mühendisliği çalışmaları, iskelet kas dokusunu üç boyutlu olarak geliştirmeye imkan tanımıştır. Böylelikle bu geliştirilen dokuların, hastalık tanılama, ilaç geliştirme ve işlevsel kas tedavisi gibi alanlarda kullanılma potansiyeli doğmuştur. Bu alanda yapılan çalışmalar fonksiyonel doku mühendisliği yöntemi ile iskelet kasının yapay ortamda üretilebileceği fikrinin doğmasına yol açmıştır (17).

Laboratuvar ortamında fonksiyonel kas dokusu geliştirme çalışmaları hücre kaynakları, hücre taşıyıcı sistemleri ve hücre uyarım yöntemleri olmak üzere üç başlık altında incelenebilir.

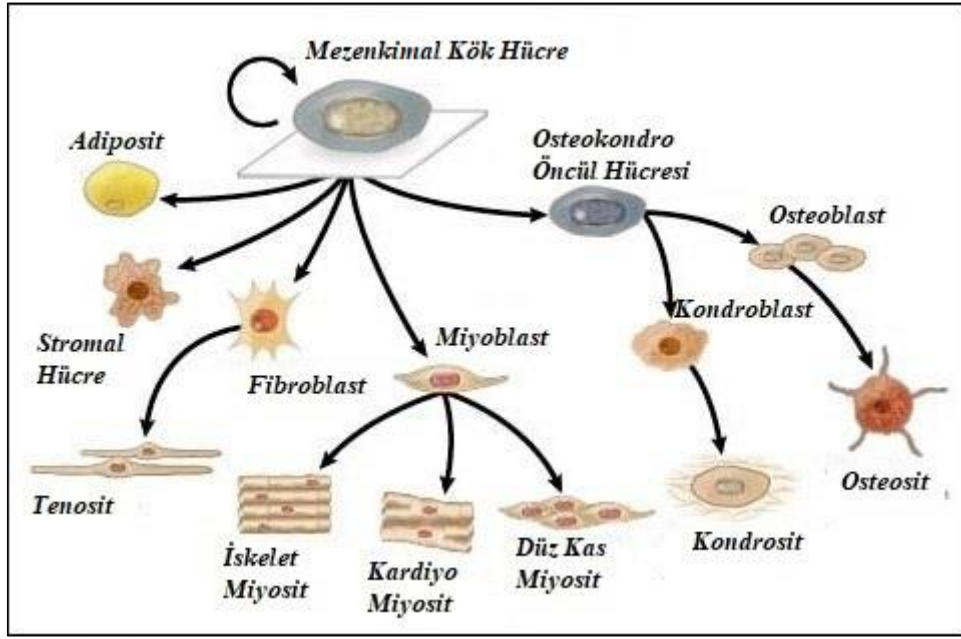
2.2.1.1. Hücre Kaynakları

Doku mühendisliği yöntemiyle üç boyutlu kas grefti geliştirilmesinde en önemli noktalardan biri kullanılacak hücre kaynağının belirlenmesidir. Doğal rejenerasyon sürecinde, kasın yapısında bulunan uydu hücreler Şekil 2.5'te gösterildiği gibi aktive olmakta, miyoblastlara farklılaşarak paralel yönlenecek ve birbirleri ile birleşerek çok çekirdekli miyotüpleri oluşturmakta ve mevcut miyotüplerle birleşerek rejenerasyonu gerçekleştirmektedir. Ancak uydu hücrelerinin miktarı çok azdır (tüm kas hücreleri içerisinde %1-5 arasında) ve bu nedenle hücre terapisi ve doku mühendisliği gibi uygulamalarda hücre kaynağı olarak kullanımları kısıtlıdır.



Şekil 2.5 Kas rejenerasyonunda uydu hücreleri (3).

Bu nedenle kas kaynaklı ve kas kaynaklı olmayan çeşitli kök hücreler miyojenik farklılaşma potansiyelleri bakımından incelenmektedir. Yeterli miyojenik farklılaşma kapasitesine sahip, çok miktarda ve kolaylıkla elde edilebilen bir kök hücre kaynağının belirlenmesi kas rejenerasyon terapileri açısından büyük önem taşımaktadır. Uydu hücrelerinin yerine vücutta daha fazla bulunan çeşitli mezenkimal kök hücrelerin kullanılabilmesi gösterilmiştir. Örneğin kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin ve yağ kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin miyojenik farklılaşma kapasitesi olduğu çeşitli çalışmalarla ortaya çıkarılmıştır. Bu farklılaşma kapasitesinin verimliliği ise kültür ortamının farklılığına göre değişiklik göstermektedir (18).



Şekil 2.6 Mezenkimal kök hücreler, çeşitli hormon, kimyasal ya da mekanik sinyaller kullanılarak farklı hücre tiplerine dönüşebilirler (19).

Yağ kaynaklı kök hücreler (adipose-derived stem cells, ASCs), vücutta görece çok miktarda bulunan ve kolay erişilebilir bir kaynak olan yağ dokusundan yüksek verimle izole edilmektedir. Bununla birlikte ASCler, pek çok farklı hücre tipine dönüşebilmeleri nedeniyle rekonstrüktif tedaviler için gelecek vaat etmektedir. Bu hücrelerin kemik, yağ, sinir gibi farklı dokulara özgü hücre tiplerine farklılaşma kapasiteleri literatürde gösterilmiştir (20). Bu nedenlerle ASC'ler, klinik uygulamalar açısından yüksek uygulanabilirlik özelliğine sahiptir ve son yıllarda giderek artan bir öneme sahip olmaktadır.

ASC'lerin in vitro koşullar altında miyojenik farklılaşma gösterebildiği çeşitli araştırma grupları tarafından incelenmiştir. Miyojenik farklılaşma için kullanılan kültür ortamında ASC'lerin uzamış morfoloji gösterdikleri ve MyoD1 ile miyozin heavy chain kas belirteçlerini ifade ettikleri görülmüştür (21).

2.2.1.2. Hücre Taşıyıcı Sistemler

Son yıllarda biyobozunur ve biyouyumlu biyomalzemeler kullanılarak doku mühendisliği yöntemi ile laboratuvar ortamında üç boyutlu canlı dokular oluşturma çalışmaları, kas rejenerasyon problemlerinin çözümü için de potansiyel olarak görülmektedir.

Literatürde, kas doku rejenerasyonu için doku desteği üretiminde çoğunlukla doğal ve sentetik polimer malzemeler kullanılmaktadır. Her iki grubun da birbirlerine göre avantaj ve

dezavantajları bulunmaktadır. Sentetik polimerler proses edilebilme ve mekanik kararlılık açılarından doğal polimerlerden daha iyi sonuç vermelerine karşın hücre tutunması gibi amaçlarla yüzeylerinin modifiye edilmesi gerekebilmektedir. Doğal polimerler ise doğal dokuya uyum ve biyoaktif sinyal içeriği bakımından daha uyumlu malzemeler olmaları nedeniyle hücre tutunması ve çoğalması gibi faktörler açısından kullanımları daha uygundur.

İskelet kası gibi yumuşak dokuların doku mühendisliği yöntemiyle üretilmelerinde, doğal doku mikro çevresini mekanik olarak taklit edebilmek için, poli(laktik asit) (PGA), poli(laktik asit-ko-glikolik asit) (PLGA) ve poli(-ε-kaprolakton) (PCL) gibi sentetik polimerlerin yanı sıra aljinat, kolajen, fibrin gibi doğal polimerler de sıklıkla kullanılmaktadır. Hücre taşıyıcıları çoğunlukla hidrojel, sünger yapı ve fiber ağ yapı olarak farklı formlarda üretilirler.

2.2.1.2.1. Sentetik Polimerler

İskelet kas dokusunu taklit edebilmek için hücre taşıyıcı üretiminde kullanılan PLA, PLGA ve PCL gibi malzemeler, mekanik dayanım açısından doğal polimerlere göre daha avantajlıdır. Ayrıca farklı geometrik şekillerde yönlendirilmiş olarak ve elektrik iletkenliği gibi özellikleri barındıracak şekilde üretilebilirler. J. S. Choi ve arkadaşlarının elektro eğirme yöntemiyle yönlendirilmiş fiberler üzerinde kültür etmiş oldukları miyoblast hücrelerinin, farklılaşma kültür ortamına alındıklarında hızla miyotüpleri oluşturdukları rapor edilmiştir (22). S. Sirivisoot ve arkadaşlarının iletken sentetik polimere ektikleri miyoblast hücrelerinin, kültür ortamında elektrik yoluyla indüklenen hücrelerden daha yoğun bir şekilde farklılaşmaya uğradıkları gösterilmiştir (23). Bir başka çalışmada ise D. M. Nelson ve arkadaşları sentetik polimerlerin kimyasal yapıları içerisine konulan büyüme faktörlerinin kontrollü şekilde hasarlı bölgeye salınımını yapılabileceğini göstermişlerdir (24). Sentetik polimerlerin bu avantajlarının yanında bazı dezavantajları da mevcuttur. En çok karşılaşılan problem yüzey sorunları nedeniyle hücre tutunmasının sınırlı düzeyde kalmasıdır (15). Bu sorunun çözümü için çeşitli yüzey modifikasyonları yapılması gereklidir. Bu çalışmalar, Çizelge 2.1’de özetlenmiştir.

Çizelge 2.1 Literatürde iskelet kası rejenerasyonunda kullanılan sentetik polimer hücre taşıyıcılarından bazı örnekler (15).

Hücre taşıyıcı malzemesi	Hücre tipi	Fonksiyonel sonuç	Limitasyon	Kaynak
Poli(glikolik asit) (PGA)	Fare miyoblast	Çok çekirdekli miyotüp oluşumu gözlemlendi.	Doku oluşumu için gerekli olan damarlanma sağlanamadı.	(25)
Poli-e-kaprolakton (PCL)	İnsan ve fare miyoblast	Yüzeğe kaplanan protein sayesinde miyoblastlar çoğaldı ve kaynaştı.	Tek başına hücre taşıyıcı miyofiber oluşumunu desteklemedi.	(22)
Polianilin (PANI) ve poli(3,4-etilendoksitiofen) (PEDOT)	Fare miyoblast	Elektrik iletken hidrojeller sayesinde daha yoğun farklılaşma yüzdesi elde edildi.	Uzun dönemli çalışma yapılmadı.	(7)

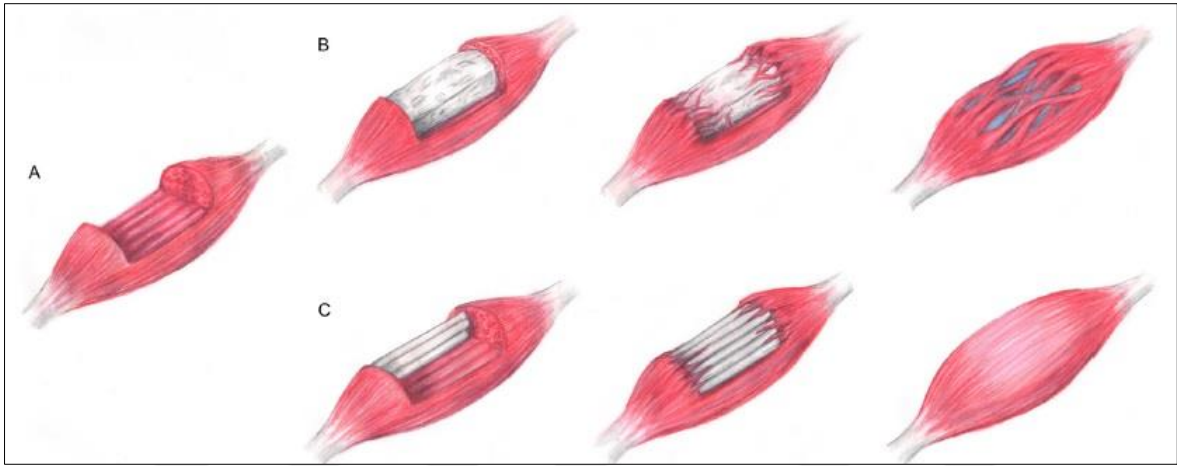
2.2.1.2.2. Doğal Polimerler

İskelet kası doku mühendisliği çalışmalarında doğal polimerler olan aljinat, fibrin ve kolajen sıklıkla kullanılmaktadır. Sentetik polimerlerden farklı olarak, doğal polimerler, biyoaktif sinyal ipuçlarına sahiptir ve bu sayede hücre migrasyonu, çoğalması veya farklılaşmasını daha fazla destekleyebilirler. Ayrıca hidrofilik yapıları nedeniyle büyüme faktörlerinin daha kolaylıkla absorbe edilebilmesi de avantaj sağlayabilmektedir.

Literatürde iskelet kası doku mühendisliği uygulamalarında en sık malzemelerden biri olan aljinat, mekanik dayanımı ve yapısal özellikleri nedeniyle tercih edilmektedir. Ayrıca aljinat jelin miyoblastların büyüme ve farklılaşması için uygun sertlik aralığında (13-45 kPa) hazırlanabilmesi bir diğer avantajıdır (26). C. Borselli ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, kas rejenerasyonu için önemli olan büyüme faktörlerinin de aljinat jel içerisine yüklenerek, hasarlı bölgede kontrollü şekilde salımının sağlanabileceği de gösterilmiştir (27). Bir diğer çalışmada D. Shvartsman ve arkadaşları VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) büyüme faktörü yüklü aljinat hidrojelini kullanarak hasarlı bölgede damar oluşumunu göstermişlerdir (28).

Kolajen tip I en çok kullanılan doğal polimerlerden biridir. Deri, kıkırdak, kemik, tendon, iskelet kası ve sinir de dahil olmak üzere çok çeşitli doku mühendisliği

uygulamalarında kullanılmaktadır (29). Örneğin, iskelet kası rejenerasyonunda direk yapılan miyoblast enjeksiyonu hücrelerin ölümüne neden olduğunun gösterildiği çalışmalar olması nedeniyle (6), bu probleme çözüm olarak kollajen bazlı jeller hücre taşıyıcı olarak kullanılmıştır. Kollajen hidrojellere yüklenen miyoblastların jel dışına göç ederek hasarlı bölgedeki sağlam miyoblastlarla kaynaştıkları gösterilmiştir (30). Bazı çalışmalarda kollajenin amorf yapısı nedeniyle miyofiber oluşumu dağınık gerçekleşmektedir. Meydana gelen bu durum yara iyileşmesinin kısıtlı kalmasına neden olmaktadır (31). Problemin çözümü için kollajen jeller içindeki gözeneklerin hizalı şekilde üretilmesi sağlanarak miyofiberlerin hizalı ve organize şekilde dokuyla bütünleşmesi sağlanmıştır (Şekil 2.7) (32).



Şekil 2.7 Büyük hacimli kas kayıplarının hücre yönlendirme özelliği taşıyan taşıyıcı malzemeler ile tedavi edilmesinin önemini şematik gösterimi. (B) hasarlı bölgeyi destekleyecek şekilde herhangi bir yönlendirme özelliği bulunmayan jel yapıda hücre taşıyıcısı kullanılan tedavi yaklaşımlarında her ne kadar kas dokusu onarımı olsa da, miyofiber oluşumu dağınık gerçekleşmekte ve tam bir rejenerasyon olmamaktadır. (C) Daha organize miyofiber oluşumu ve tam bir rejenerasyon için hücre taşıyıcıların kas liflerini taklit edecek şekilde yönlendirilmiş bir yapıda tasarlanması gerekmektedir (15).

İskelet kası rejenerasyonunda kullanılan bazı doğal polimerden üretilmiş hücre taşıyıcıları ve bu çalışmalardan elde edilen bilgiler Çizelge 2.2'de özetlenmiştir.

Çizelge 2.2 İskelet kası rejenerasyonunda kullanılan doğal polimer hücre taşıyıcıları (15).

Hücre taşıyıcı malzemesi	Hücre tipi	Fonksiyonel sonuç	Limitasyon	Kaynak
Aljinat	Fare miyoblast	1 ay sonunda yara bölgesinde kapanma ve damar oluşumuna yardım etmiştir.	Hücre taşıyıcı hasar görmüş dokunun yerini almamıştır.	(33)
Aljinat	Hücesiz	Yara bölgesinde kapanma ve damar oluşumuna yardım etmiştir.	Hücre taşıyıcı hasar görmüş dokunun yerini almamıştır.	(27)
Kolajen	Fare miyoblast	Hücre taşıyıcı hücre büyümesini ve doku entegrasyonunu desteklemiştir	Tam bir kas rejenerasyon sağlamadı. Hücreler dağınık kalmıştır.	(32)
Kolajen	Hücesiz	Hücre taşıyıcı miyoblast entegrasyonunu desteklemiştir.	İmplantasyonun uzun dönemli sonuçları elde edilememiştir.	(34)
Fibrin	Fare miyoblast	Kan damarları oluştu, miyoblastlar hayatta kalıp çoğaldı ve dokuya entegre olmuştur.	Hücre taşıyıcının hızlı bozunması nedeniyle tam bir kas rejenerasyonu sağlamadı. Bu nedenle uzun dönemli veri elde edilememiştir.	(35)
Fibrin	İnsan miyoblast	Hücre taşıyıcıların uzunlamasına yapısı miyoblastların dokuya entegrasyonunu kolaylaştırmıştır.	Hücre taşıyıcının hızlı bozunması kas rejenerasyonunu kısıtlamıştır.	(36)

Fibrin, doğal yara iyileşme sürecinin ilk aşamalarındaki geçici matris rolünden dolayı iskelet kas mühendisliğinde sıklıkla kullanılan bir diğer doğal polimerdir. Trombin tarafından aktive edilen fibrinojen dallanmış mikrofiberlerden oluşan bir yapıda olan fibrine dönüşür. Miyoblast yüklü fibrin jellerin kan damarlarının yanına yerleştirildiği bir çalışmada, yaklaşık 3 hafta sonra miyoblastların iskelet kas dokusunu oluşturduğu rapor edilmiştir (35). Bir diğer çalışmada ise fibrin-PLLA/PLGA malzemelerinden üretilen hücre taşıyıcı içerisine fibroblast ve miyoblast hücrelerin yanısıra endotel hücreler de eklenmiş ve damarlanmanın oluşumu sağlanmıştır (37). Bu çalışmada fibrine ek olarak PLLA/PLGA malzemelerinin

kullanılmasının nedeni fibrin yapının mekanik dayanımını artırmaya yönelik bir stratejidir (15).

2.2.1.3. Hücre Uyarım Yöntemleri

Hücre uyarım yöntemleri, kültür esnasında kök hücrelerin istenilen yönde ve işlevde farklılaşma geliştirmesini sağlamak için uygulanan yöntemlerdir. Bu uyarımlar statik kültür ortamına eklenebilen biyoaktif moleküllerle sağlanabileceği gibi, dinamik kültür ortamı oluşturularak mekanotransdüksiyon etkiyle hücrelere uygulanması yoluyla da sağlanabilir.

2.2.1.3.1. Biyoaktif Moleküller

Biyoaktif moleküller, vücuda hücre taşıyıcısı ile birlikte yerleştirilen kök hücrelerin işlevsel bir doku oluşturabilmesinde önemli rol oynayabilirler.

Biyoaktif moleküller hücre çoğalması ve farklılaşmasının yanı sıra damarlanma, sinir oluşumu ve kasılma gibi özelliklerin sağlanmasında kullanılırlar. C. Borselli ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, fonksiyonel kas rejenerasyonunun artırılması için insulin benzeri büyüme faktörü-1 ve VEGF (Vascular endothelial growth factor) yüklü aljinat jeller sayesinde uydu hücrelerinin etkili mobilizasyonu ve manipülasyonu sağlanmış ve böylelikle tam bir rejenerasyon için önemli olan damar oluşumu indüklenmiştir (27).

2.2.1.3.2. Mekanotransdüksiyon

Mekanobiyoloji, hücrelerin çevrelerinden gelen fiziksel sinyallere (çekme kuvveti, basma kuvveti, kesme kuvveti, sertlik, viskozite vb.) nasıl tepki verdiklerini inceleyen bir bilim dalıdır (38). Mekanotransdüksiyon ise hücreler tarafından alınan mekanik etkilerin kimyasal ve elektriksel sinyallere dönüştürülerek hücrelerin hayatta kalma, göç etme ya da farklılaşma gibi temel biyolojik süreçlerini etkileyen bir mekanizma olarak tanımlanabilir (39).

Literatürdeki son çalışmalar, kas, tendon, kıkırdak ve kemik gibi normal nişlerinde çeşitli mekanik kuvvetlerin etkisi altında bulunan, fizyolojik olarak aktif dokuların hücrelerinin doğal ortamlarını taklit edecek şekilde dinamik kültür edildikleri durumda, statik kültüre göre daha etkin hücresel aktivite gösterdiklerini belirtmektedir. Bu gözlemlerin ışığında 2000'li yılların başında ortaya atılmış bir konsept olan fonksiyonel doku mühendisliği, hücresel mikroçevrede fizyolojik biyomekanik kuvvetlerin taklit edilmesinin doku spesifik gen ve protein ekspresyonunu arttırdığını ve hücre dışı matrisin yapısında da değişmelere neden olarak daha verimli sonuçlar elde edildiğini ortaya koymaktadır.

Örneğin, S.F Clarke ve L. Feeback'in yaptıkları çalışmada insan iskelet kası hücreleri statik ve dinamik olarak kültüre edilmiş ve oluşturdukları miyotüpler kreatin kinaz belirteci yardımıyla ölçülmüştür. Çalışmada dinamik olarak kültüre edilen (7 gün boyunca, günde 10 dk. %20 oranında periyodik çekme uygulaması) hücrelerin, daha fazla miyotüp oluşturdukları rapor edilmiştir (40). Adam J. Engler ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada ise mezenkimal kök hücrelerin ekildikleri yüzeylerin sertliğine göre farklı tiplerine farklılaştıkları gösterilmiştir (39). Bu ve benzeri çalışmalar, fonksiyonel doku mühendisliği uygulamalarında hücrelerin doğal kas mikroçevresini taklit eden sertlikte hücre taşıyıcıları ile birlikte dinamik bir mikroçevrede kültür edilmesinin önemini göstermektedir.

İskelet kası embryogenezden itibaren doğal ortamında çoğunlukla çekme kuvvetine maruz kalır. Bu nedenle projemizde bu etkiyi yaratacak bir dinamik kültür uygulaması yapılmış olup, mekanotransdüksiyon etki statik kültürle karşılaştırmalı olarak incelenmiştir.

3. GEREKÇE VE AMAÇ

Kasların bilinçsiz fazla çalıştırılmasından, Duchenne Musküler Distrofi gibi konjenital ya da edinilmiş hastalıklara, yüksek enerjili travmalardan, tümör çıkarılması operasyonlarına kadar çok geniş bir yelpazede iskelet kası hasarlarıyla karşılaşmaktadır. Bu gibi durumlarda kas rejenerasyonunun sağlanması için her yıl dünya çapında 6 milyar dolar seviyesinde bir sağlık harcaması yapılmaktadır. Özellikle de bu sağlık harcamalarının büyük bir kısmını oluşturan büyük hacimli kas defektlerinin tedavisi için henüz etkin bir çözüm bulunabilmiş değildir. Doku mühendisliği, mühendislik ve yaşam bilimleri prensiplerini kullanarak, doku ya da organların fonksiyonlarını yerine getirmek ya da destek olmak, ya da tamamen yerini almak üzere tasarlanan biyolojik sistemler geliştiren disiplinler arası bir araştırma alanıdır. Bu yolla doku mühendisliği yöntemi, iskelet kası rejenerasyonu için hastanın kendi hücreleri kullanılarak laboratuvar ortamında fonksiyonel kas dokusu üretilmesi ile bu global sağlık problemine bir çözüm getirmeyi hedeflemektedir.

Bu tez çalışmasının amacı vücutta görece çok miktarda bulunan ve kolaylıkla izole edilebilen, dolayısıyla hücre kaynağı olarak klinik uygulamada kullanılma potansiyeline sahip yağ kaynaklı ASC hücreleri kullanılarak, doku mühendisliği yöntemiyle iskelet kası dokusu üretilmesidir. Tez çalışmasında, son yıllarda yüksek önem kazanan fonksiyonel doku mühendisliği prensibi kullanılarak ASC hücrelerinin yönlendirilmiş fibrin taşıyıcılar içerisinde dinamik kültürünün gerçekleştirilmesi amaçlanmıştır. Ayrıca çalışmamız ASC hücrelerinin fibrin fiber içerisine hapsedilerek dinamik kültür uygulaması ile miyojenik farklılaşma yolağına yönlendirilmesi açısından özgün bir çalışmadır.

4. MATERYAL VE YÖNTEM

4.1. MATERYAL

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 31 Ağustos 2015 tarihli ve 13-525-15 Karar No'lu etik kurul onayına dayanarak, yağ kaynaklı kök hücreler (Adiposed derived stem cells, ASC), Ankara Üniversitesi Cebeci Hastanesinde Doç. Dr. Burak KAYA tarafından gerçekleştirilen yağ aldırma (liposuction) ameliyatından steril şekilde temin edilmiş olan lipoaspirattan izole edilmiştir. Hücreler pasaj 0'dan kültüre edilerek çoğaltılmış ve yeterli sayının yakalandığı pasaj 3'te tarafımızca üretilen fibrin liflerin içerisine ekilerek kullanılmıştır.

Çizelge 4.1 Hücrelerin tipleri, kullanılan besiyerleri, nereden temin edildikleri ve pasaj numaraları.

Pasaj no	Hücre	Hücre adı	Kullanılan besiyeri katalog numaraları	Besiyeri Özelliği	Ortam içeriği
0	ASC	Yağ kaynaklı kök hücre	Biological Industries, <u>Ref.No:</u> 01-052-1A, <u>Lot.No:</u> 1704122	Çoğaltma	DMEM (yüksek glukoz) içinde % 10 FBS % 1 P/S 1 ng/mL FGF-2
3	ASC	Yağ kaynaklı kök hücre	Lonza, <u>Cat.No:</u> BE12-707F <u>Lot.No:</u> 4MB120	İndükleme	DMEM (düşük glukoz) içinde % 1 FBS % 1 P/S % 5 At Serumu 2.4 µg/mL 5-Azasitidin

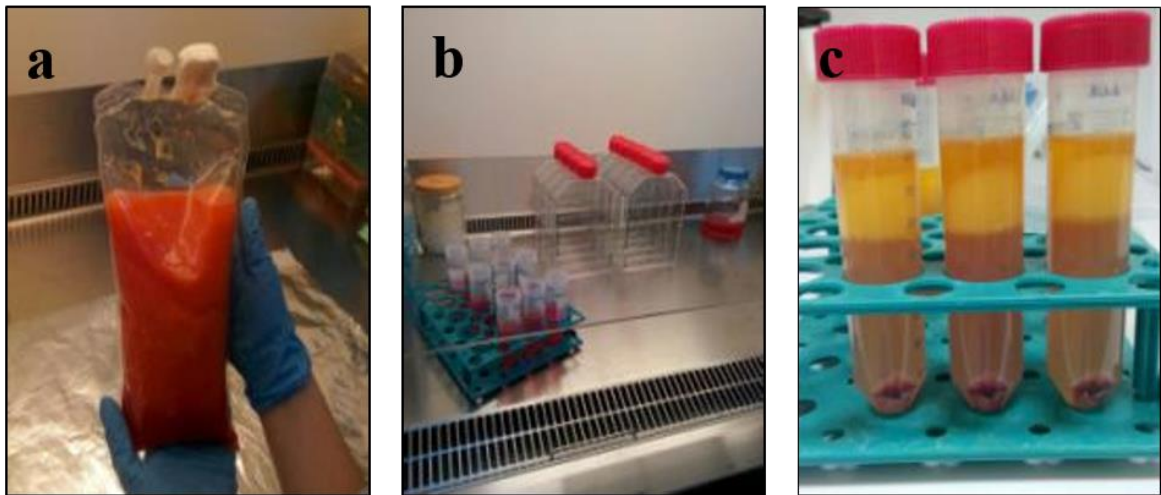
Fiber üretiminde ana malzemeler olarak; Fibrinojen (Sigma, ABD) ve aljinat (Sigma, ABD) kullanılmıştır. Fibrinojen çözücüsü olarak Ca^{2+} ve Mg^{2+} içermeyen PBS çözeltisi (BI, İsrail), aljinat çözücüsü olarak ise otoklavlanmış distile su kullanılmıştır. Islak eğirme aşamasında, $CaCl_2$ çözeltisi ve trombin (Sigma, ABD)'den hazırlanan çöktürücü banyosu kullanılmıştır. Üretilen fiberlerden, yapının gözenekliliğini arttırarak hücre çoğalması ve yayılmasını arttırmak amacıyla, aljinat bileşeni aljinat liyaz enzimi (Sigma, ABD) kullanılarak ayrılmıştır. Kültür süresince fiberlerin içerisinde bulunan canlı (metabolik olarak aktif) hücre sayısı Alamar Blue testi (Thermo Fisher, ABD) ile belirlenmiştir. Fiber içerisinde canlı ve

ölü hücrelerin görüntülenebilmesi ve hücre morfolojisinin izlenebilmesi için Live/Dead kit ile boyanması (Thermo Fisher, ABD) yapılmıştır. Kit içeriğinde canlı hücreleri işaretlemek için Kalsein-AM ve ölü hücreleri işaretlemek Ethidium Homodimer-1 (EthD-1) bulunmaktadır. ASC hücrelerinin miyojenik farklılaşmasının belirlenmesi için kas spesifik belirteçler olan Myogenin (Abcam-ab1835, UK), MyoD (Abcam-ab16148, UK) ve Desmin (Abcam-ab8592, UK) antikoları kullanılarak immünfloresan boyama gerçekleştirilmiştir. İmmünfloresan boyama örneklerini fikslemek için paraformaldehit (PFA) kullanılmıştır.

4.2. YÖNTEM

4.2.1. ASC Hücrelerinin İzolasyonu

Yağ aldırma (liposuction) ameliyatından steril şekilde temin edilmiş olan lipoaspirat hızla laboratuvara getirilmiştir (Şekil 4.1 (a)). Daha sonra steril şişelere aktarılmış ve eşit miktarda PBS ile yıkanmıştır. Faz ayrımının sağlanmasının ardından altta kalan sulu kısım atılmıştır. Bu işlem kanın tamamen yıkanması ile altta kalan kısım berrak olana kadar 3-4 kez daha tekrarlanmıştır. Ardından aspirat 50 mL falkon tüpler içerisine aktarılmış (yaklaşık 20 mL) ve eşit miktarda kollajenaz çözeltisi (PBS içerisinde 0.1% kollajenaz tip I (Sigma, ABD), 1% bovine serum albümin (Sigma, ABD), 2 mM CaCl₂) eklenerek doku parçalanması sağlanana kadar 1 saat süreyle 37°C'de çalkalamalı inkübatörde steril şartlarda inkübe edilmiştir (Şekil 4.1 (b)). 1 saat sonunda alınan tüpler 300 g'de 5 dakika süreyle santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemlerinin ardından serolojik pipet yardımı ile üst katmanlarda biriken yağ ve PBS ile orta katmanda biriken kollajenaz atılmıştır (Şekil 4.1 (c)).



Şekil 4.1 ASC hücrelerinin izolasyon aşamaları. (a) Steril reseptal poşeti içerisinde ameliyathaneden temin edilen lipoaspirat. (b) Lipoaspirat yıkanarak tüplere alınmış ve

kollajenaz çözeltisi ile inkübe edilmiştir. (c) Kollajenaz ile inkübasyon süresi sonunda santrifüjlenen dokuda yağ, kollajenaz ve hücre pelleti faz ayrımı gerçekleşmiştir.

Santrifüj işlemi sonucu oluşan hücre pelleti PBS içerisinde tekrar dağıtılmıştır. Hücre süspansiyonu 100 µm boyutlu steril hücre eleğinden geçirilerek temiz 50 mL falkon tüpler içerisine toplanmıştır. 300 g'de 5 dakika santrifüjün ardından tekrar beliren yağ ve sulu tabakalar atılmış, hücre pelleti 10 mL kültür ortamı içerisinde dağıtılmıştır. Kültür ortamı şu şekilde hazırlanmıştır: Yüksek glikozlu DMEM içerisinde %10 FBS (BI, İsrail), %1 penisilin/streptomisin (P/S) (Lonza, ABD) 1 ng/mL FGF-2 (Sigma, ABD). Daha sonra hücreler kültür ortamı içerisinde T-175 flasklara aktarılmıştır. 24-48 saat sonra flasktaki ortam yenisi ile değiştirilmiş ve hücreler %80-90 konfluent duruma gelene kadar her iki günde bir ortam değişimi tekrarlanarak kültür edilmiştir. Hücreler %10 DMSO, %50 DMEM ve %40 FBS içeren dondurma çözeltisi içerisinde sıvı azot tankında kullanıma kadar saklanmış ve depolanmıştır.

4.2.2. Akış Sitometrisi

İzole edilen hücrelerin mezenkimal belirteçlere göre fenotipik profilleri akış sitometrisi ile belirlenmiştir. Elde edilen hücreler (P3), izotip kontrol, CD31, CD73 ve CD105 yüzey işaretçilerine spesifik Alexa Fluor 488 ile işaretli antikolar ile boyanmıştır. Fare IgG1 κ izotip kontrol antikoları, hücrelerin kullanılan fare antikolarına karşı gösterebileceği spesifik olmayan olası bağlanmaları saptamak için kullanılmıştır. Analizler BD AccuriC6 akış sitometre cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar boyanmamış hücrelerden elde edilen sinyal ile karşılaştırılmıştır. Toplam popülasyonun % 50'sinden fazlası pozitif sinyal veren hücreler, o yüzey işaretleyicisi için pozitif kabul edilmiştir.

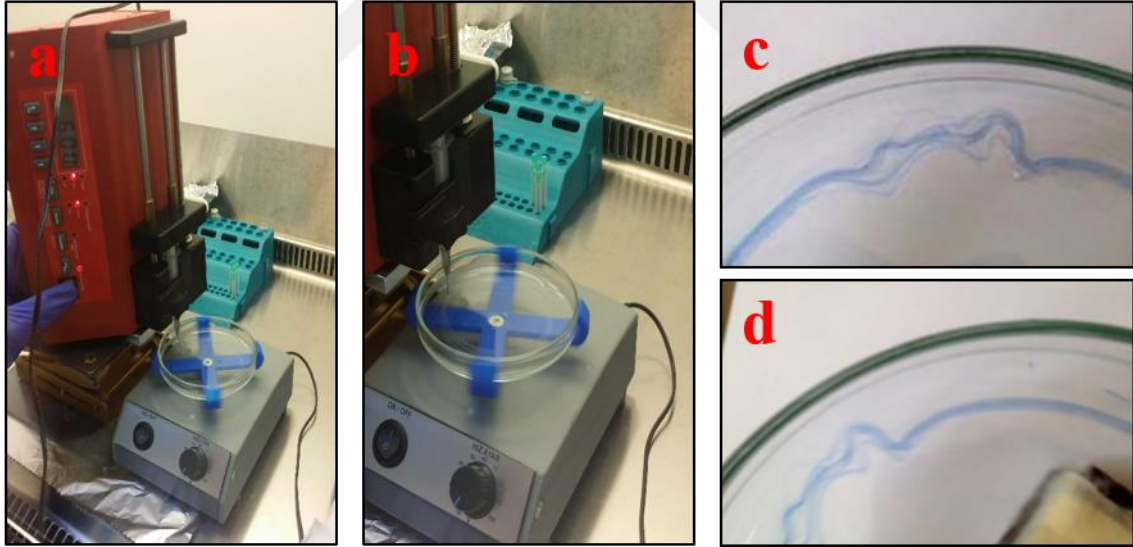
4.2.3. ASC İçeren Yönlenmiş Fibrin Fiberlerin Üretilmesi

Toz halindeki fibrinojen, Ca²⁺ ve Mg²⁺ iyonlarını içermeyen PBS içerisinde çeşitli konsantrasyonlarda çözülmüş ve steril şırınga filtresinden geçirilerek sterilize edilmiştir (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2 Deney grupları ve kullanılan konsantrasyonlar

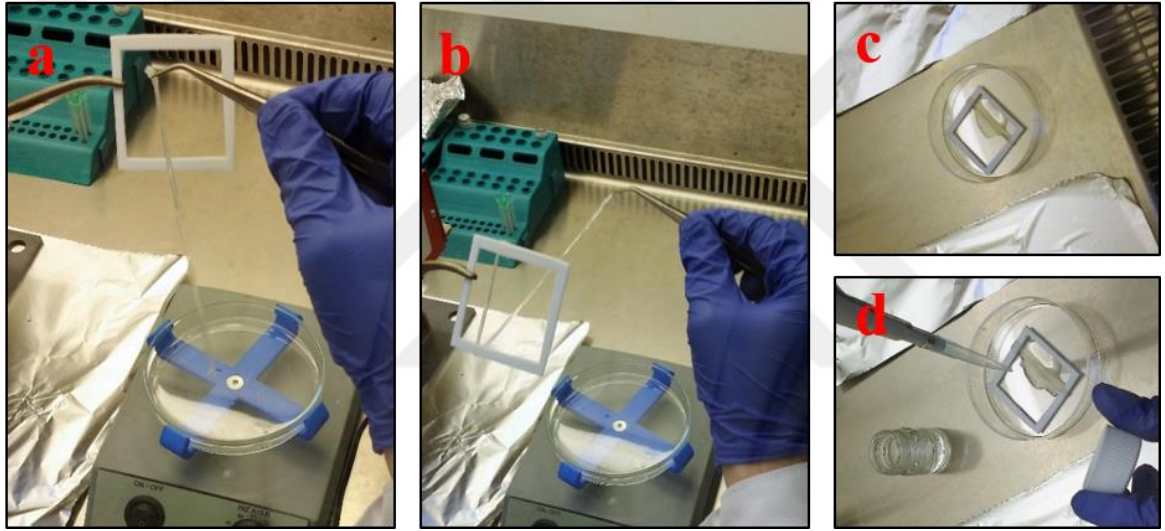
Kod	Fibrinojen (mg/ml)	Aljinat (mg/ml)	Trombin (U/ml)
FA-6000	60	0	5, 10, 20
FA-3000	30	0	5, 10, 20
FA-1000	10	0	5, 10, 20
FA-6015	60	15	20
FA-2015	20	15	20
FA-1015	10	15	20
FA-1015	10	15	50

Hazırlanan karışımlar, steril 5 mL plastik şırınga içerisine yüklenerak şırınga pompası (Landgraf HLL) yardımı ile 6 mL/dk hızla fibrinojeni çapraz bağlayacak çeşitli konsantrasyonlarda trombin banyosu içerisine enjekte edilmiştir. Fiberlerin düzgün şekilde toplanabilmesi için toplama banyosu bir petri kabı içerisinde belli bir hızla döner şekilde kullanılmıştır (Şekil 4.2). Hücre kültürü için hazırlanan örneklerde tüm bu işlemler steril şartlarda gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.2 Islak eğirme yöntemiyle fiber üretimi. (a) Fiber üretiminde ıslak eğirme yöntemi kullanılmış; fibrinojen bazlı çözelti şırınga içerisinden şırınga pompası yardımıyla enjekte edilirken çöktürme banyosu içerisinde toplanmıştır. (b) Fiber toplama banyosu döner bir mekanizma üzerine yerleştirilen petri kabı içerisine yerleştirilmiştir. (c, d) Fiberler petri kabı içinde toplanmıştır. Bu görüntülerde fiber oluşumunun net izlenebilmesi için fibrinojen içerisine mavi renkli tripan blue boyası eklenmiştir.

Fibrinojenin viskozitesini arttırabilmek ve dolayısıyla fiber oluşturma özelliğini iyileştirebilmek için fibrinojen ve aljinat çeşitli oranlarda karıştırılarak da fiber üretimi yapılmıştır. Hücre kültürü deneyleri için hazırlanan örneklerde enjeksiyon öncesi hücreler 1250 hücre/ μ L konsantrasyonda olacak şekilde fibrinojen/aljinat içerisinde homojen dağıtılmıştır. Fibrinojen/aljinat fiber üretiminde toplama banyosu içerisinde 0.5 M CaCl_2 trombine ek olarak eklenmiştir. Oluşan fiberlerde aljinatın çapraz bağlanmasının gerçekleşmesi amacıyla 15 dakika süreyle toplama banyosu içerisinde bekletilmiştir. Daha sonra fibrinojenin çapraz bağlanmasının gerçekleşmesi amacıyla fiberler toplanarak teflon levhalardan kesilerek şekillendirilmiş çerçeveler etrafına sarılmış ve bu halde toplama banyosundan eklenerek 30 dakika süreyle 37°C 'de inkübasyona bırakılmıştır. Çerçeve etrafına sarılan fiberlerin bu şekilde tek eksende yönlendirilmesi sağlanmıştır (Şekil 4.3).



Şekil 4.3 Üretim sonrası fibrin/aljinat fiberler (a) kesilerek (b) teflon çerçeveler etrafına sarılmış ve (c, d) toplama banyosu içerisinde tek eksende yönlendirmeleri sağlanmıştır.

4.2.4. Serbest Fibrin Fiberlerin Hazırlanması

Yönlendirme etkisinin hücreler üzerindeki etkisinin araştırılması için kontrol grubu olarak aynı yöntemler kullanılarak fakat çerçevelere sarılmadan üretilmiştir.

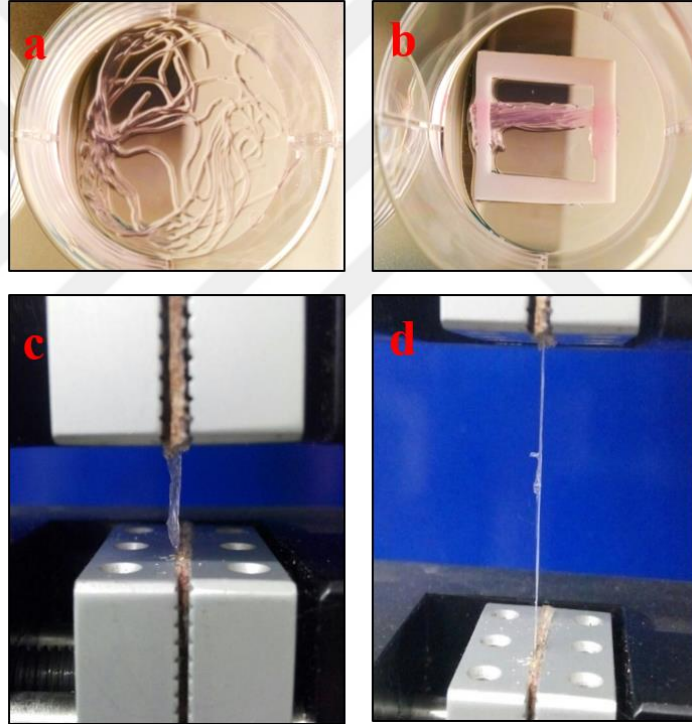
4.2.5. Aljinat Liyaz Enzimi Uygulaması

Fiberlerin oluşturulma ve sarılma aşamalarında yeterli mukavemet gösterebilmesi için yapıya eklenmiş olan aljinat, fibrinojenin çapraz bağlanmasının tamamlanmasının ardından, sistemden aljinat liyaz enzimi yardımıyla çıkarılmıştır. Bu işlem için fiberler üretimden 18 saat sonra 30 dakika süreyle 0.05 U/mL konsantrasyonda aljinat liyaz enzimi ile CO_2

inkübatöründe inkübe edilmiştir. 30 dakika inkübasyonun ardından kuyucuklardaki kültür ortamı tazeysiyle değiştirilerek kültür devam ettirilmiştir.

4.2.6. Fiberlerin Mekanik Karakterizasyonu

Üretilen fiberlerin elastiklik modülü (Young Modülü) ve kas dokusu ile yapısal uyumluluklarının belirlenmesi amacıyla çekme testi uygulanmıştır. Fiberler yönlendirilmiş ve serbest olarak Bölüm 4.2.3’de anlatıldığı şekliyle üretilmiştir. Ayrıca hücre varlığının mekanik dayanım üzerine etkisini inceleyebilmek için hücre içermeyen yönlendirilmiş ve serbest fiberler aynı yöntemlerle üretilmiştir. Mekanik test cihazının (LRX 5K, LLoyd Instruments Limited, UK) çekme çeneleri arasına sıkıştırılan fiberler (Lo: 1 cm; D: 0.6 mm), 100 N kapasiteli yük hücresi kullanılarak 5 mm/dk hızla kopma noktasına kadar çekilmiştir (Şekil 4.4).



Şekil 4.4 Fiberlere mekanik karakterizasyon için çekme testi uygulanması. (a) Serbest fiberler ve (b) yönlendirilmiş fiberler, (d) mekanik test cihazının çekme çeneleri arasına bağlanan fiber örnekler kopma noktasına kadar çekilmiştir. (c) İki çekme çenesi arasındaki 1 cm boyundaki fiber örneğin yakın görüntüsüdür.

4.2.7. Statik Hücre Kültürü

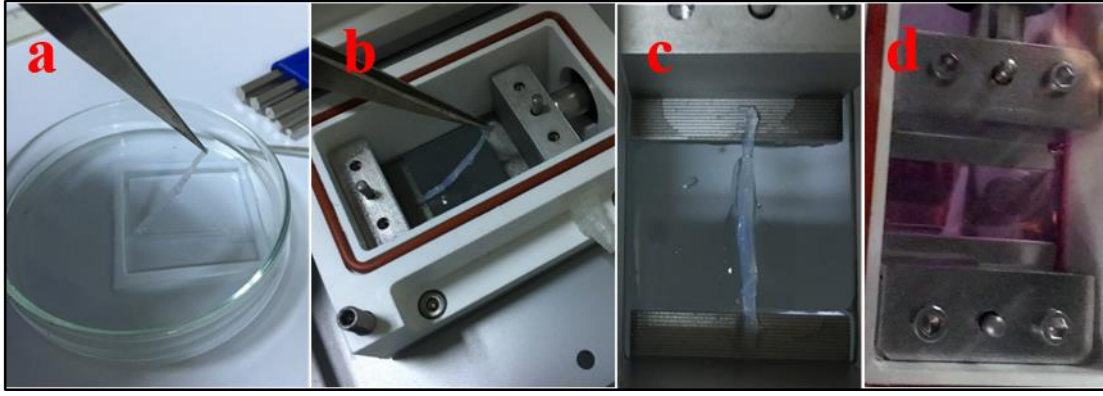
2 cm boyunda ve 2 mm kalınlığında hazırlanan ASC yüklü fibrin bazlı fiberler, toplama banyosu içerisinde sırasıyla 15 dakika oda sıcaklığında ve çerçeve etrafına sarılarak 30

dakika 37°C CO₂ inkübatöründe tam jelleşmenin sağlanması amacıyla bekletilmiş ve ardından kültür ortamı içerisine aktarılmıştır. Kültür ortamı bileşimi şu şekilde hazırlanmıştır: Yüksek glikozlu DMEM içerisinde %10 FBS, %1 P/S ve 1 ng/mL FGF-2. Kültür ortamı deney süresi boyunca gün aşırı tazelenmiştir. Statik kültür deneyleri 6 kuyucuklu kültür kapları içerisinde, fiber örnekler çerçevelere sarılmış durumda normal hücre kültürü koşullarında (37°C, %5 CO₂, nem) gerçekleştirilmiştir.

ASC hücrelerinin miyojenik farklılaşmasının indüklenmesi amacıyla örneklerin hazırlanmasından 18 saat sonra (aljinat liyaz enzimi uygulamasını takiben), 24 saat süreyle 5-azasitidin kullanarak miyojenik indükleme ortamı uygulanmıştır. Bu ortamın bileşimi şu şekildedir: Düşük glikozlu DMEM içerisinde %1 FBS, %5 at serumu, 10 µM 5-azasitidin ve %1 P/S. 24 saat miyojenik indükleme ortamı içerisinde inkübe edilen örnekler daha sonra normal kültür ortamı ile kültüre devam edilmiştir.

4.2.8. Dinamik Hücre Kültürü

Statik kültür için hazırlanan ASC yüklü fibrin fiberlerin aynısı 4 cm boyunda ve 2 mm kalınlığında olmak üzere dinamik kültür için hazırlanmıştır. Normal kültür ortamına alınan fiberlere üretimden 18 saat sonra aljinat liyaz enzimi uygulaması yapılmış ve ardından 24 saat süreyle miyojenik indükleme kültür ortamı uygulanmıştır. 24 saatlik inkübasyonun ardından örnekler biyoreaktör içerisine hareketli ve sabit örnek tutucuları arasına her iki uçtan sıkıştırılmak suretiyle yüklenmiştir (Şekil 4.5 (b, c)). Fiberlerin yerleştirilmesinin ardından, haznelere örneklerin üzeri tamamen örtülene kadar yaklaşık 10 mL normal kültür ortamı beslemesi gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.5 (d)). Örnek ve ortam eklenmesinin ardından biyoreaktörün pleksiglas kapağı kapatılmış ve cihaz CO₂ inkübatörü içerisine alınmıştır. Örneklerle 21 gün süreyle 0.5 Hz, 1 saat/gün, örnek uzunluğunun %10'u kadar hareketle tek eksenli periyodik gerilme uygulanmıştır. Kültürün toplamda 7. 14. ve 21. gün sonlarında örnekler ikiye bölünmüş ve bir parçasıyla Live/Dead boyaması yapılarak fiberler içerisinde hücre canlılığı test edilirken, diğer parçası %3.7 (w/v) derişimde formaldehit çözeltisi kullanılarak fikslenmiş ve immünfloresan boyama için kullanılmıştır.



Şekil 4.5 Fiberlerin biyoreaktöre yerleştirilmesi. Fiberler yönlendirilmek amacıyla etrafına sarıldıkları çerçeveler üzerinden (a) gösterildiği gibi kesilerek çıkarılmış, (b,c) biyoreaktöre aktararak tutucu çeneler arasına sıkıştırılıp sabitlenmiştir. (d) Hücre kültür ortamı eklenerek CO₂ inkübatörü içerisine aktarılan biyoreaktör içerisinde 21 gün süreyle günde 1 saat tek eksenli periyodik gerilme uygulanarak (%10, 0.5 Hz) dinamik kültür gerçekleştirilmiştir.

4.2.9. Alamar Blue Hücre Canlılık Testi

Kültür süresince fiberlerin içerisinde bulunan canlı (metabolik olarak aktif) hücre sayısı Alamar Blue testi ile belirlenmiştir. Kısaca, kuyucuklar içerisindeki ortam uzaklaştırılıp steril PBS ile yıkamanın ardından renksiz DMEM içerisinde %10 derişimde hazırlanmış olan Alamar Blue çözeltisi kuyucuklara eklenmiştir. 1 saat süreyle 37°C ve %5 CO₂ koşullarında inkübatör içerisinde ve ışıktan koruyarak inkübasyon yapılmıştır. 1 saat sonunda her kuyucuktan 200 µL test örneği alınarak 96 kuyucuklu mikropalakalara aktarılmıştır. 570 nm ve 595 nm dalga boyunda absorbands değerleri mikropalaka okuyucusu ile belirlenmiştir. Tüm işlemler steril koşullarda gerçekleştirilmiş ve her okuma en az üç kuyucuktan yapılmıştır. Daha sonra örneklerin bulunduğu kuyucuklar içerisindeki Alamar Blue test çözeltisi PBS ile yıkılarak uzaklaştırılmış ve normal hücre kültürü ortamı eklenmesiyle kültüre devam edilmiştir. Alamar Blue testinin özelliği hücre canlılığı ve metabolizmasına etki etmeden metabolik aktivitenin belirlenebilmesidir. Böylelikle aynı örnekler kültür süresince belirlenen zamanlarda (1, 7, 14, ve 21. gün) hücre sayısı belirlenmesi için kullanılmıştır. Alamar Blue boyasının absorbands değerleri üzerinden belirlenen redüksiyon miktarı bir kalibrasyon eğrisi yardımıyla canlı hücre sayısına çevrilmiştir.

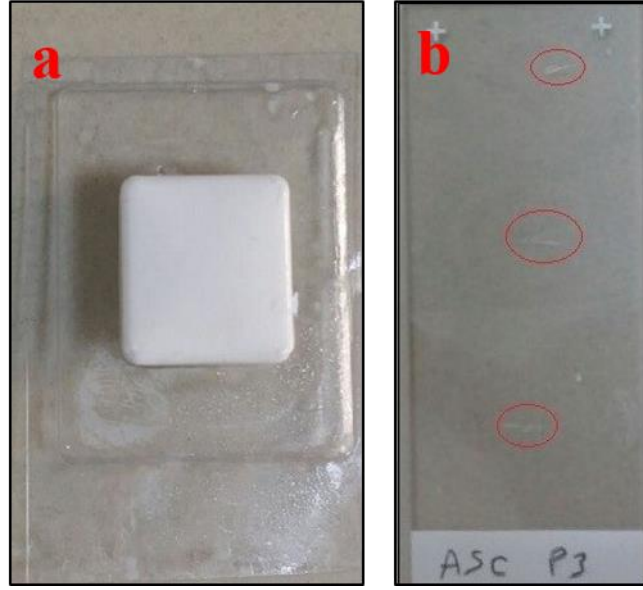
4.2.10. Canlı/Ölü (Live/Dead) Boyaması

Fiber içerisinde canlı ve ölü hücrelerin görüntülenebilmesi ve hücre morfolojisinin izlenebilmesi için Live/Dead Kit boyaması yapılmıştır. Yöntemde canlı ve ölü hücreler

sırasıyla Kalsein-AM ve Ethidium Homodimer-1 (EthD-1) ile işaretlenmektedir. Boyama çözeltisinin bileşimi şu şekilde hazırlanmıştır: 10 mL PBS içerisinde 2 μ M Kalsein ve 4 μ M EthD-1. Boyama uygulanacak örnekler temiz kuyucuklara aktarılmış ve PBS ile yıkanmıştır. Üzerlerine boyama çözeltisi eklenmiş ve 20 dakika süreyle 37°C'de ışıktan korunarak inkübasyon gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda boyama çözeltisi PBS ile yıkanarak uzaklaştırılmış ve bekletmeden lazer taramalı konfokal mikroskop (Leica) ile görüntülenmeleri gerçekleştirilmiştir. Kalsein ve EthD-1 ile işaretlenmiş hücrelerin görüntülenmesi için konfokal mikroskopta sırasıyla 488 nm ve 528 nm dalga boyundaki lazerler kullanılmıştır.

4.2.11. İmmü Floresan Boyama

ASC hücrelerinin miyojenik farklılaşmasının belirlenmesi için kas spesifik belirteçler olan Myogenin, MyoD ve Desmin antikoları kullanılarak immü floresan boyama gerçekleştirilmiştir. Boyamanın gerçekleştirilmesi için fiber örnekler kültürün 1, 7, 14, ve 21. günlerinde fikse edilmiştir. Kısaca, örnekler temiz kuyucuklara alınmalarının ardından PBS ile yıkanmış ve üzerlerine %3.7 (w/v) derişimde formaldehit çözeltisi eklenmiştir. 30 dakika süreyle oda sıcaklığında hafif çalkalama altında formaldehit ile fikse edilen örnekler daha sonra 3 x 10 dakika süreyle PBS ile yıkanmıştır. Fiksasyonun ardından örnekler sırasıyla %15 sükröz, %30 sükröz ve %30 sükröz:OCT (1:1) çözeltileri içerisinde 15'er dakika süreyle çalkalamalı şekilde inkübe edilerek OCT (Tissue-Tek, ABD) içerisinde gömülme için hazırlanmıştır. Gömme işlemi için, örnekler Şekil 4.6 (a)'da gösterilen plastik kalıpların dibine yerleştirilmiş ve üzerleri OCT ile doldurulmuştur. Daha sonra kalıplar kuru buz içerisinde bulunan bir kap içerisinde soğutulan etanolde bekletilerek dondurulmuştur. Dondurulan örnekler, -80°C'de muhafaza edilmiştir. Kryomikrotom (Leica) kullanılarak OCT içerisinde gömülü durumda bulunan örneklerden -25°C'de 5 μ m kalınlıkta kesitler alınmıştır. Alınan kesitler superfrost lam (Thermo-Fisher, ABD) üzerinde toplanmış ve lamlar oda sıcaklığında bir süre bekletilmesinin ardından -20°C'de muhafaza edilmiştir (Şekil 4.6 (b)).



Şekil 4.6 İmmünfloresan boyama için doku kesitlerinin alınması. (a) OCT içerisinde kalıba alma ve (b) alınan kesitler.

Alınmış olan kesitler, Şekil 4.6 (b)'de şematik olarak gösterildiği gibi, immünfloresan boyama öncesi su sızdırmaz kalem kullanılarak çerçeve içine alınmıştır. Gömme malzemesinin iyice temizlenebilmesi için kesitler 3 x 200µL PBS ile yıkanmıştır. Sonrasında spesifik olmayan bağlanmanın önlenmesi için %1 BSA ile 30 dk. boyunca 37°C'de inkübasyon yapılmıştır. İnkübasyon sonrasında her lamda bulunan 3 kesite 20 µL miktarda, yukarıdan aşağıya sırasıyla primer antikolar: fare anti-MyoD1 (1:100), tavşan anti-Desmin (1:50) ve fare anti-Myogenin (1:50) antikoları %0.1 BSA içeren PBS içerisinde seyreltilerek uygulanmıştır. Primer antikolar ile bağlanma gece boyu (18 saat) 4°C'de inkübasyon ile gerçekleştirilmiştir. Bu aşamadan itibaren kesitler her basamak sonunda 3 x 200 µL PBS ile yıkanmıştır.

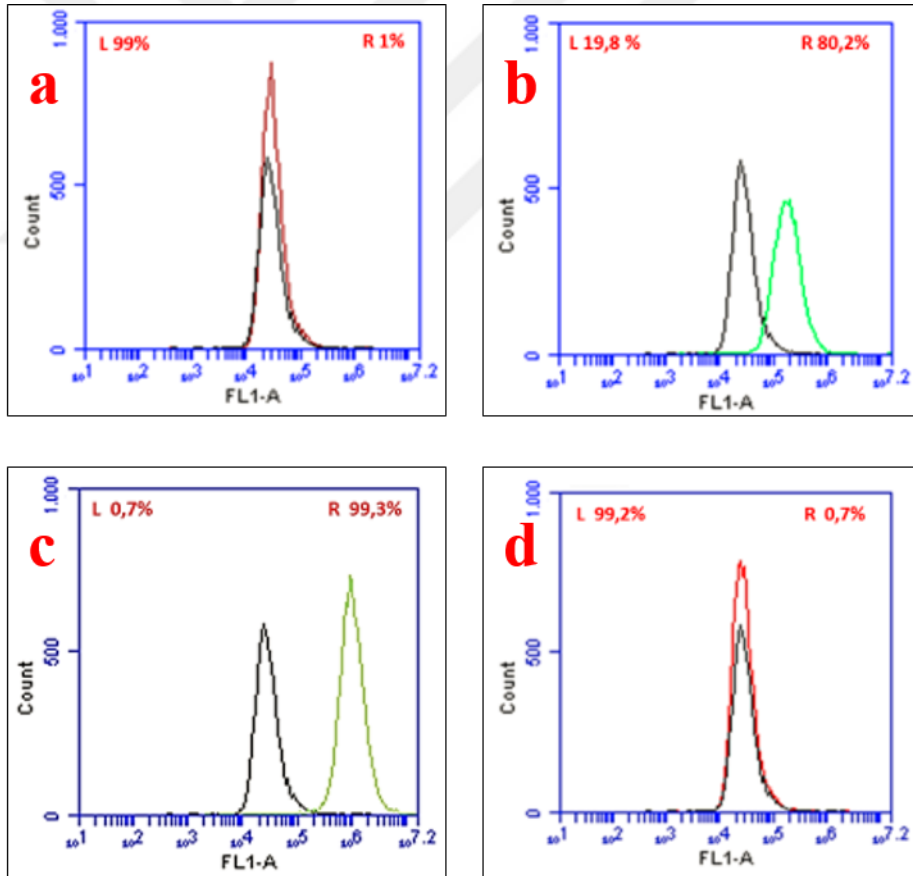
Primer antikoların bağlanmasının ardından sekonder antikolar ile 1 saat oda sıcaklığında inkübasyon ile bağlanma gerçekleştirilmiştir. Kullanılan florofor bağlı sekonder antikolar şunlardır: anti-MyoD1 ve anti-Myogenin için 20 µL 1:200 Goat anti-Mouse (Alexa Fluor® 488, ABD); anti-Desmin için 20 µL 1:200 Goat anti-Rabbit (Alexa Fluor® 488, ABD). Ayrıca tüm kesitler hücre çekirdeklerinin işaretlenmesi için 30 µL 1:1000 Draq5 (Sigma, ABD) (20 dakika, oda sıcaklığı) boyamasına tabi tutulmuştur. Boyanmış olan kesitlerin görüntülenmesi için konfokal mikroskopta sırasıyla şu dalga boyundaki lazerler kullanılmıştır: Antikolar: 488 nm ve Draq5: 635 nm.

5. ARAŞTIRMA BULGULARI

5.1. HÜCRE KARAKTERİZASYONU

Mezenkimal kök hücrelerin CD105 (endoglin) ve CD73 (ekto-5'-nükleotidaz) yüzey proteinlerini sentezlediği bilinmektedir (41). Ancak, yapılan çalışmalarda yağ dokusundan yeni izole edilmiş mezenkimal kök hücrelerde CD105 protein sentezinin düşük olduğu ancak bu işaretçiye karşı pozitifliğinin ileriki pasajlarda arttığı gösterilmiştir (42). CD31 (Platelet endothelial cell adhesion molecule (PECAM-1)) ise platelet, monosit-makrofaj ve endotel hücrelerinde bulunup, mezenkimal kök hücrelerde sentezi olmamaktadır.

Elde edilen izotip kontrol boyama sonuçlarına göre, hücre popülasyonunun kullanılan antikorlarla spesifik olmayan bağlanma göstermediği anlaşılmıştır. İzole edilen ASC hücrelerinin CD31 yüzey işaretçisine karşı negatif oldukları gözlenirken, CD105 ve CD73 işaretçileri için pozitif oldukları belirlenmiştir (Şekil 5.1).

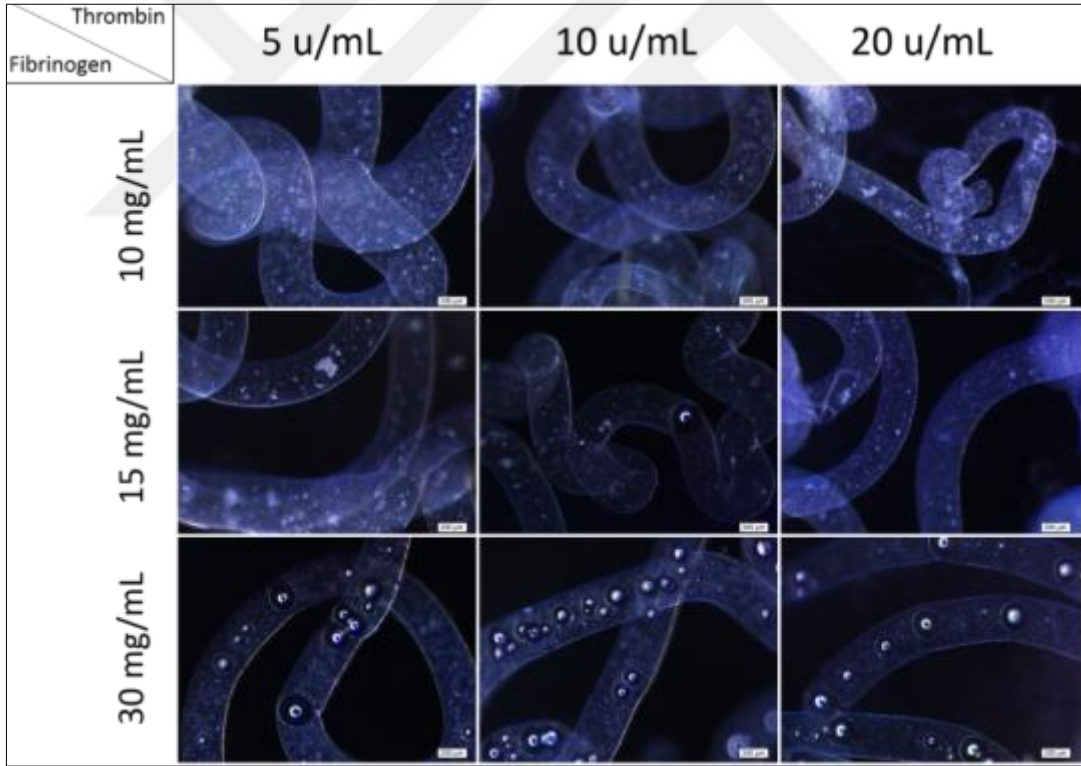


Şekil 5.1 ASC hücrelerinin (a) izotip kontrol, (b) CD105, (c) CD73 ve (d) CD31 yüzey işaretçilerine karşı akış sitometrisi analizi sonuçları. Siyah renk ile gösterilmiş eğriler boyanmamış hücrelerden alınan sinyalleri temsil etmektedir.

5.2. FİBRİN FİBER ÜRETİM OPTİMİZASYONU

Fibrin fiber üretimi için ilk olarak 10-60 mg/mL konsantrasyon aralığında fibrinojen çözeltileri 5-20 U/mL konsantrasyon aralığında trombin banyoları içine enjekte edilerek fiber oluşum özellikleri değerlendirilmiştir. Ancak, fibrinojen derişimi ne kadar arttırılırsa arttırılsın, toplama banyosu içerisinde kararlı bir fiber üretebilmek için gerekli viskoziteye sahip bir çözelti elde edilemediği görülmüştür.

Bunun üzerine, fiber oluşumu için gerekli viskoziteyi elde edebilmek için fibrinojen, viskoz bir çözelti (hidrojel) oluşturma özelliği bilinen biyoyumlu ve biyobozunur bir polisakkarit olan aljinat ile karıştırılmıştır. İlk çalışmada, 10, 15 ve 30 mg/mL konsantrasyonda fibrinojen, 15 mg/mL konsantrasyonda aljinat ile karıştırılarak ıslak eğirme yöntemi ile fiber oluşum özellikleri incelenmiştir. Toplama banyosu olarak 5, 10 ve 20 u/mL konsantrasyonda trombin içeren 0.5 M CaCl₂ çözeltisi kullanılmıştır. Elde edilen fiberlerin morfolojileri faz kontrast mikroskobu kullanılarak incelenmiştir (Şekil 5.2).



Şekil 5.2 Islak eğirme metodu ile üretilen fibrinojen/aljinat fiberlerin faz kontrast mikrografikleri (Ölçek: 200 µm).

Aljinat konsantrasyonunun sabit tutulduğu durumda, fibrinojen ve trombin konsantrasyonlarının fiber kalınlığına etki ettiği belirlenmiştir. Düşük fibrinojen

konsantrasyonunda (10 ve 15 mg/mL), trombin konsantrasyonundaki artış, fiber çapında düşüşü beraberinde getirmiştir. Fibrinojen konsantrasyonu 30 mg/mL olduğunda ise, değişen trombin konsantrasyonu fiber çapında bir değişikliğe yol açmamıştır (Şekil 5.2).

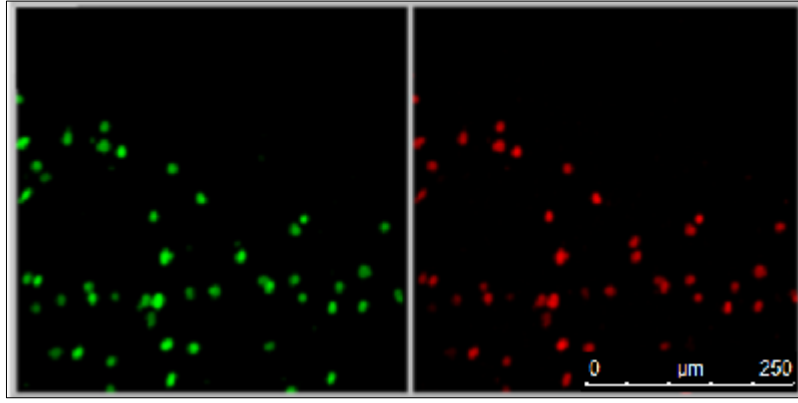
5.2.1. Yönlendirilmiş Fiberlerin Optimizasyonu

Bundan sonraki aşamada, aljinat ve trombin konsantrasyonları sırasıyla 15 mg/mL ve 20 u/mL değerlerinde sabit tutularak, fibrinojen konsantrasyonu artırılmıştır (40, 50 ve 60 mg/mL). Yüksek fibrinojen konsantrasyonunun fiberlerin mekanik dayanımını ve çerçeveler etrafına sarılarak paralel yönlendirilme özelliklerini arttırdığı belirlenmiştir. Bu nedenle, 60 mg/mL fibrinojen ve 15 mg/mL aljinat çözeltisinin (kod: FA-6015) 20 u/mL trombin banyosunda ıslak eğirilmesiyle elde edilen fiberlerin içerisine hapsedilen ASC hücrelerinin canlılık analizleri yapılmıştır (Çizelge 5.1).

Çizelge 5.1 Deney grupları ve ulaşılan sonuçlar özet çizelge.

Kod	Fibrinojen (mg/ml)	Aljinat (mg/ml)	Trombin (U/ml)	Sonuçlar	
FA-6000	60	0	5, 10, 20	---	-Hiçbir örnekte fiber oluşumu sağlanamadı.
FA-3000	30	0	5, 10, 20		
FA-1000	10	0	5, 10, 20		
FA-6015	60	15	20	-Sağlam fiber oluştu.	-Hücreler yaşamadı.
FA-2015	20	15	20	-Sağlam fiber oluştu. -Hücreler yaşadı.	-İstenilen hücre yayılması sağlanamadı.
FA-1015	10	15	20	-Sağlam fiber oluştu. -Hücreler yaşadı ve bir miktar yayıldı.	-Aljinatın çıkarılması fiber yapıyı bozdu.
FA-1015	10	15	50	-İstenilen fiber sağlamlığı ve hücre yayılması sağlandı.	---

Steril koşullarda üretilen 1250 hücre/ μ L konsantrasyonda hücre içeren fiber yapılarına 1. günde canlı/ölü hücre boyaması yapılmıştır (Şekil 5.3).

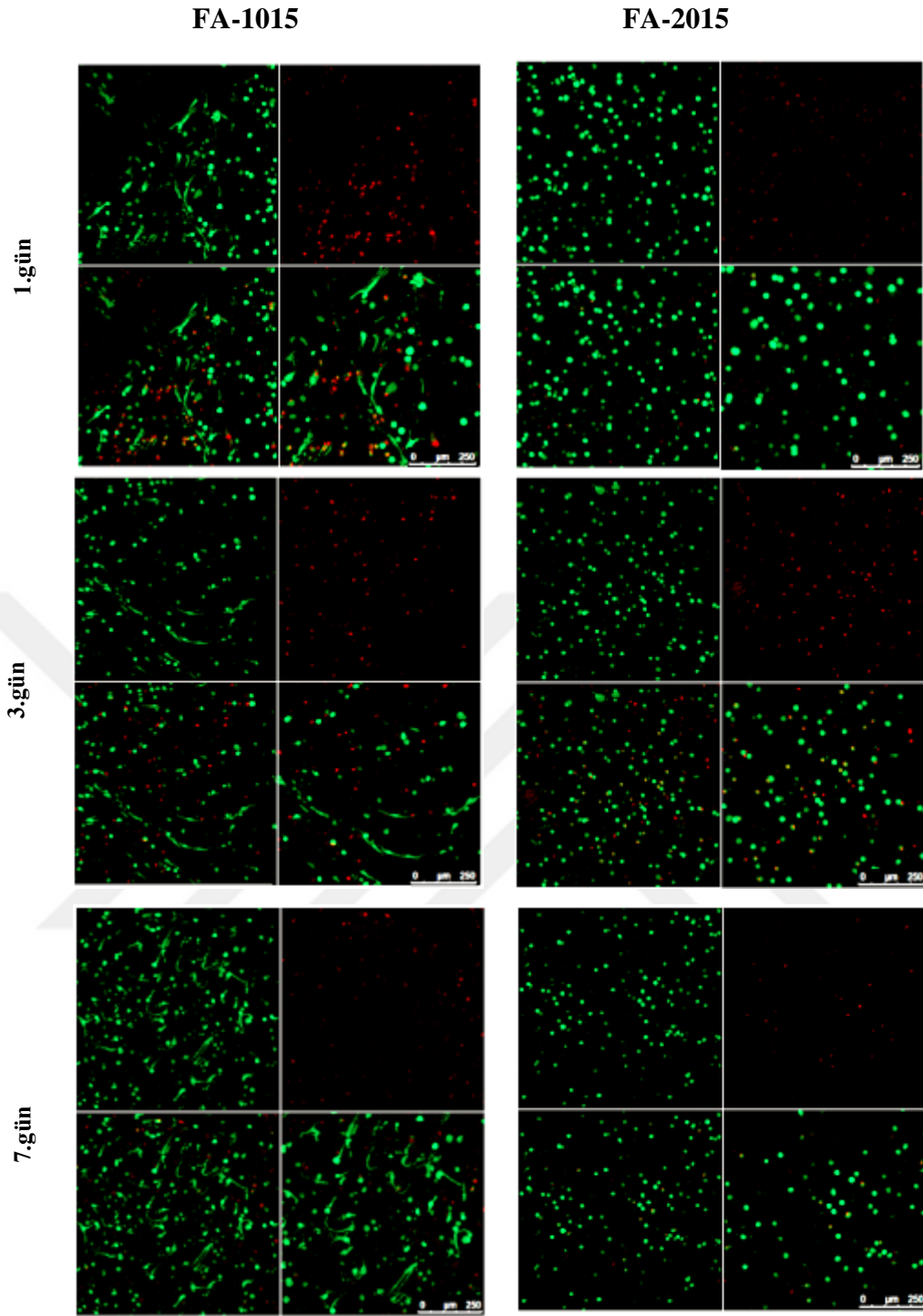


Şekil 5.3 FA-6015 fiber yapılar içindeki ASC hücrelerinin 1. gün canlı/ölü hücre boyama sonuçları. Yeşil: Kalsein, Kırmızı: EthD-1

10 mg/mL fibrinojen ve 15 mg/mL aljinat (FA-1015) (ve kontrol olarak 20 mg/mL fibrinojen ve 15 mg/mL aljinat (FA-2015)) içeren çözeltiler steril şekilde hazırlanarak içerisinde 1250 hücre/ μ L konsantrasyonda ASC hücreleri homojen dağıtılmıştır. Hücre canlılığı, 1. 3. ve 7. günlerde canlı/ölü hücre boyaması analizi ile değerlendirilmiştir (Şekil 5.4).

Yüksek fibrinojen konsantrasyonuna sahip fiberler içerisindeki ASC hücreleri ile gerçekleştirilen çalışmanın aksine (Şekil 5.3), daha düşük fibrinojen konsantrasyonuna sahip yapılarda tüm analiz günlerinde canlılığını korumuş hücrelerin varlığı tespit edilmiştir (Şekil 5.4).

ASC hücreleri kullanılarak yapılan canlı/ölü hücre boyaması sonuçları, fibrinojen konsantrasyonunun düşürülmesinin hücre canlılığı üzerinde gözle görülür bir iyileşmeye yol açtığını göstermiştir. Tüm analiz günlerinde, her iki konsantrasyon değeri ile üretilmiş fiber yapılarda hücrelerin canlılıklarını korudukları görülmüştür. Hücrelerin düşük konsantrasyona sahip fiberlerde daha yüksek canlılığa sahip olmalarının yanı sıra, görece yayılmış morfoloji sergiledikleri ve bu yayılmanın derecesinin 1. günden 7. güne doğru arttığı gözlenmiştir (Şekil 5.4).



Şekil 5.4 FA-1015 ve FA-2015 kodlu fiberler içerisinde ASC hücrelerinin 1, 3 ve 7 gün canlı/ölü hücre boyama sonuçları. Yeşil: Kalsein, Kırmızı: EthD-1.

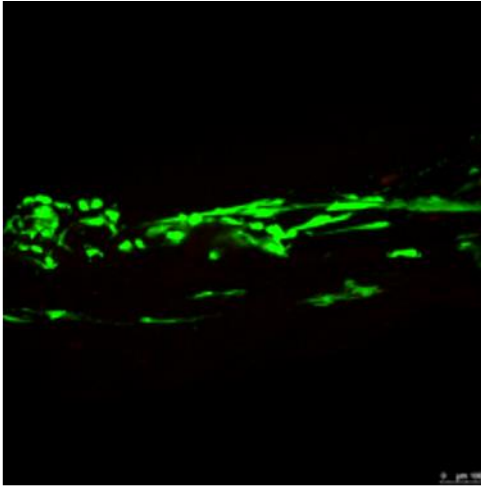
5.2.2. Aljinat Liyaz Enzimi Uygulaması

Her ne kadar fibrinojen konsantrasyonunun düşürülmesi hücre canlılığını olumlu yönde etkilemiş olsa da, yapılar içerisinde 7. günde tam olarak beklenen yayılmış hücre morfolojisine ulaşamamıştır.

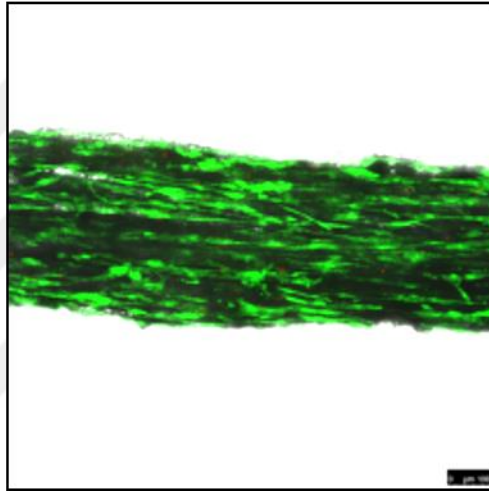
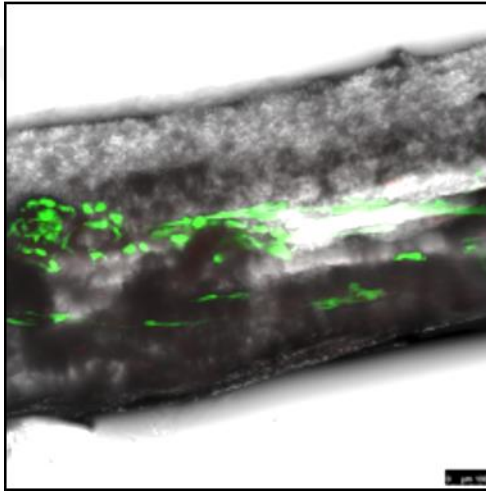
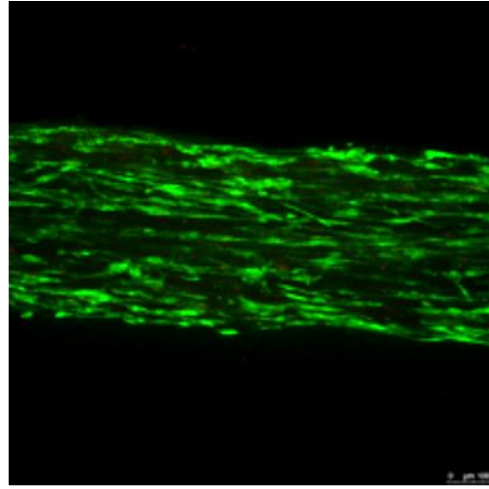
İlk fiber üretimi sırasında aljinat konsantrasyonunun 15 mg/mL'nin altına düşürülmesi durumunda düzgün yapılı fiberlerin elde edilemediği de daha önce belirlendiği için; üretimden sonra aljinatın, aljinat liyaz enzimi yardımıyla kademeli olarak yapıdan çıkarılmasının hücre yayılması için matris içerisinde gerekli gözenekliliği sağlayabileceği düşünülmüş ve denenmiştir. Aljinatın yapıdan çıkarılması, minimum seviyeye indirilmiş olan fibrinojenin de fibrin yapısının bozulmasına yol açmıştır. Bunu önleyebilmek adına toplama banyosundaki trombin konsantrasyonu 50 U/mL'ye çıkartılmış ve böylelikle fibrinojenin daha yüksek oranda çapraz bağlanma yapması sağlanmıştır.

ASC hücreleri kullanılarak, daha önce belirtilen şekilde fiberler üretilmiştir (FA-1015). Üretilen fiberler Şekil 4.3'de gösterildiği gibi çerçeveler üzerine sarılarak yönlendirilmiştir. ASC yüklü fiberlerin steril koşullar altında üretilmesinden 18 saat sonra, her örneğin bulunduğu kuyucuktaki hücre kültür ortamı içerisine 0.05 U/mL konsantrasyonda aljinat liyaz (AL) enzimi eklenmiştir. 30 dakikalık inkübasyonun ardından kuyucuklardaki kültür ortamı, taze hücre kültür ortamı ile değiştirilerek kültür devam ettirilmiştir. 3. günde daha önce belirtilen koşullarda canlı/ölü hücre boyaması gerçekleştirilmiştir (Şekil 5.5).

AL uygulaması yok



AL uygulaması var



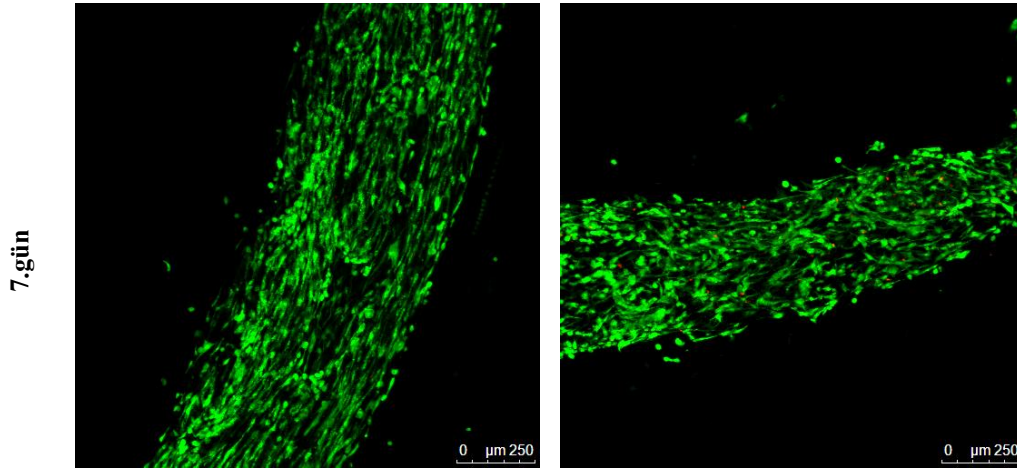
Şekil 5.5 FA-1015 fiberler içerisinde ASC hücrelerinin 3. gün canlı/ölü hücre boyama sonuçları. Yeşil: Kalsein, Kırmızı: EthD-1. Alt sıradaki görüntülerde floresan görüntüler faz-kontrast görüntülerle karşılaştırılmıştır. AL: 30 dk. boyunca 0.05 u/mL Aljinat liyaz enzimi uygulanmış örnekler.

5.2.3. Serbest Fiberlerin Optimizasyonu

Bölüm 5.2.1.'de bahsedildiği üzere; ASC hücrelerin fiber eksenine paralel yönlenmesini sağlamak için, fiberler çerçeveler etrafına sarılmıştır. Bu deneyin kontrol grubu olarak sarılmış fiberler ile aynı üretim koşulları ve hücre konsantrasyonuna sahip olmak üzere serbest fibrin fiberler üretilmiş ve canlı/ölü boyama yöntemiyle ASC hücrelerin her iki fiber tipindeki yerleşimleri incelenmiştir (Şekil 5.6).

Sarılmış Fiberler

Serbest Fiberler



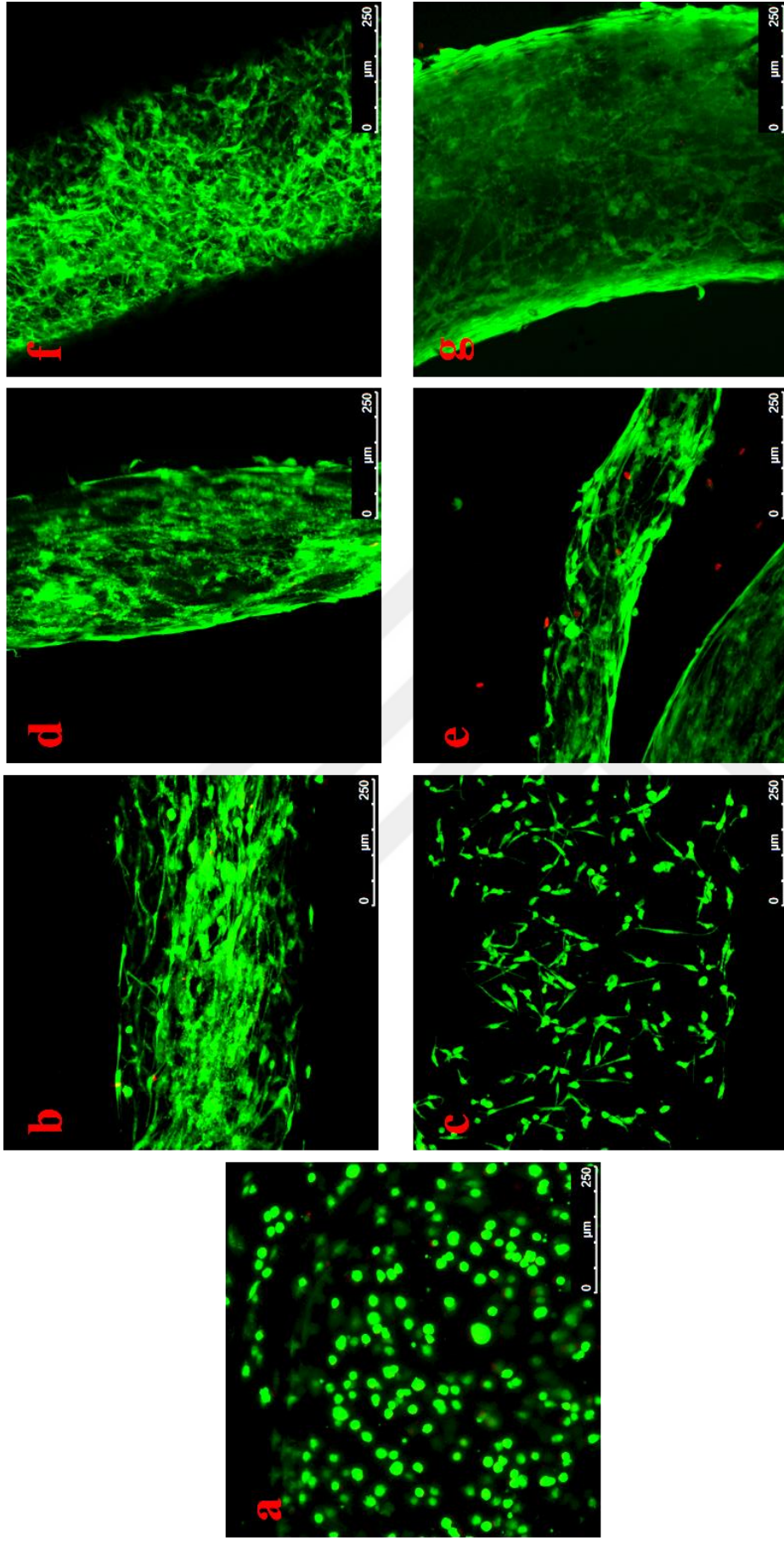
Şekil 5.6 Sarılmış fiberler ve serbest fiberler içerisindeki ASC hücrelerinin 7. gündeki yerleşimleri. Yeşil: Kalsein, Kırmızı: EthD-1.

Sarılmış fiberlerdeki ASC hücreleri Şekil 5.6.'da görüldüğü üzere 7. günde fiber eksenine paralel şekilde yerleşmiştir. Kontrol grubu olarak üretilen serbest fiberlerde ise hücrelerin dağınık yerleşimleri dikkat çekmektedir.

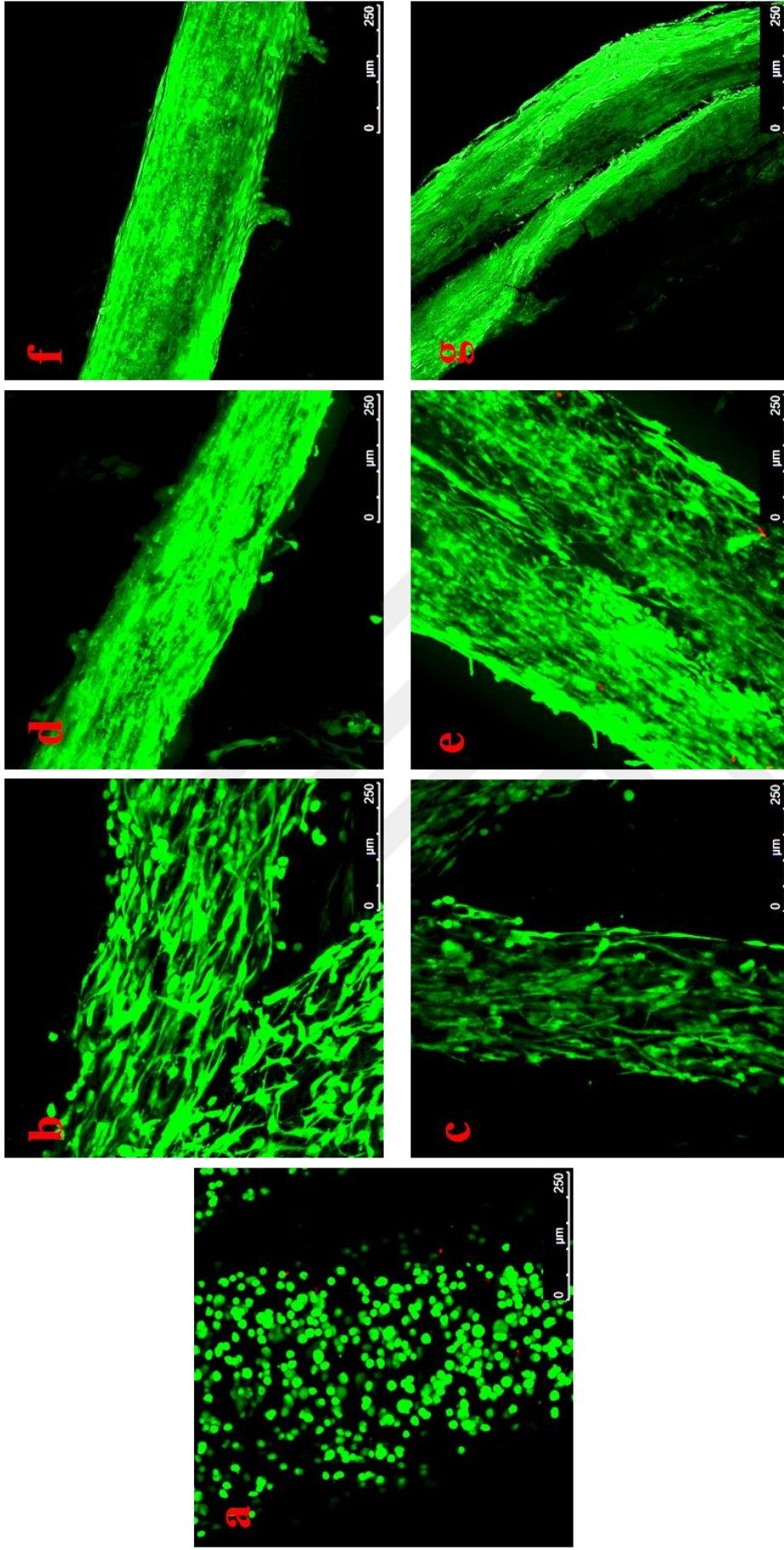
5.3. ASC YÜKLÜ FİBRİN FİBERLERİN STATİK KÜLTÜR İNCELEMESİ

Statik kültürde hücre yönlendirmesinin ASC miyojenik farklılaşması üzerindeki etkilerinin incelenmesi için serbest ve yönlendirilmiş fiberler içinde hapsedilen hücrelerin davranışları incelenmiştir. Bölüm 4.2.7'de ifade edildiği şekliyle iki grup halinde (normal kültür ortamında ve indükleyici kültür ortamında) üretilmiş olan fiberler 21 gün boyunca statik olarak kültür edilmişlerdir. 1., 7., 14. ve 21. günlerde canlı/ölü boyaması ve immünfloresan boyaması yapılarak hücre davranışları ve kas hücrelerine farklılaşma seviyeleri incelenmiştir.

Hem serbest hem de yönlendirilmiş fiberler içinde canlı/ölü boyama verilerinde her iki grupta da (indüklenmiş ve indüklenmemiş) tüm günlerde fiber içindeki hücrelerin canlılıklarını korudukları ve çoğaldıkları gözlemlenmiştir. Serbest fiberler içinde çoğalan hücrelerin belirli bir ekseninde yönelme göstermediği gözlemlenirken (Şekil 5.7), yönlendirilmiş fiberler içinde hücreler fiber eksenine paralel olarak yönelmiştir (Şekil 5.8).

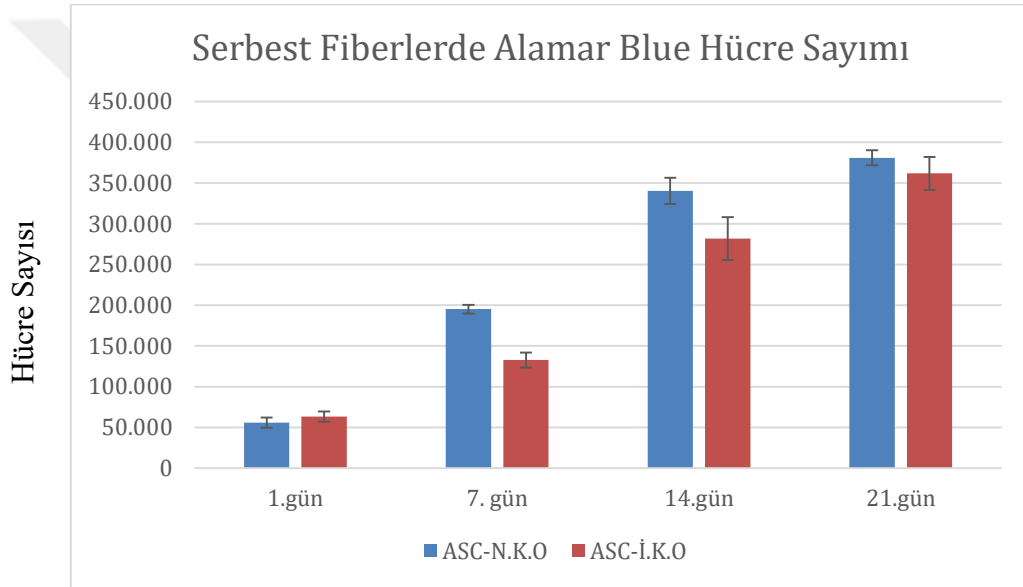


Şekil 5.7 Serbest fiber deneyi canlı/ölmü hücre boyama sonuçları. 1.gün (a), 7.gün (b-c), 14.gün (d-e), 21.gün (f-g). (Üst Panel: İndüklenmemiş, Alt Panel: İndüklenmiş) Yeşil: Kalsein, Kırmızı: EthD-1

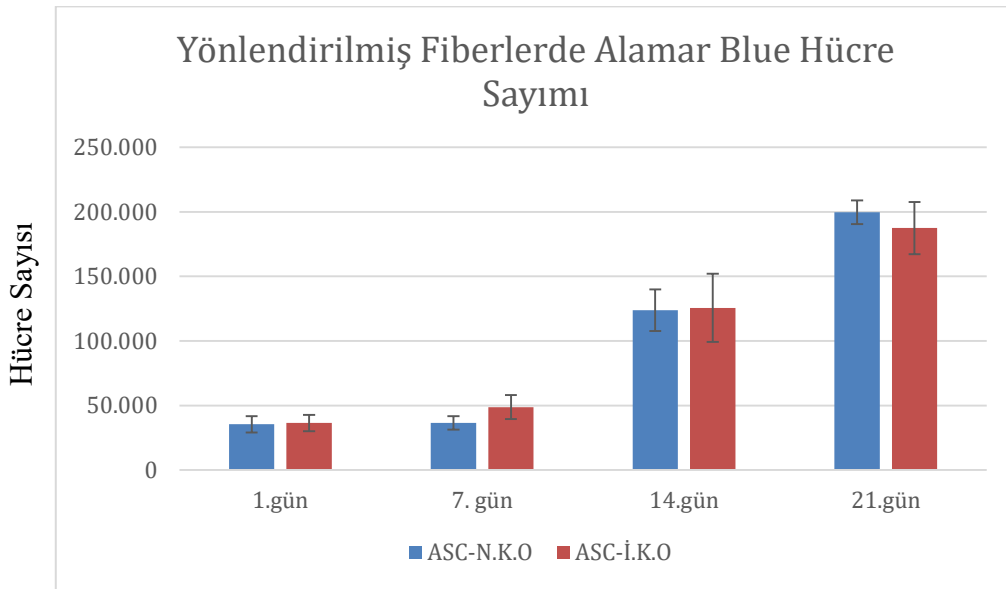


Şekil 5.8 Yönlendirilmiş fiber deneyi canlı/ölmü hücre boyama sonuçları. 1.gün (a), 7.gün (b-c), 14.gün (d-e), 21.gün (f-g). (Üst Panel: İndüklenmemiş, Alt Panel: İndüklenmiş) Yeşil: Kalsein, Kırmızı: EthD-1

Statik kültür edilen indüklenmiş/indüklenmemiş ve serbest/yönlenmiş fiberler içindeki canlı hücre sayısının kantitatif olarak belirlenebilmesi için kültürün 1., 7., 14. ve 21. günlerinde Alamar Blue testi uygulanmıştır. Buna göre, serbest fiberlerde 1. gün sonunda üretim esnasında ekilen tüm hücrelerin %20'si canlılığını korumuş ve sonraki günlerde çoğalma göstermişlerdir. Miyojenik indüksiyon uygulanmayan örneklerin hücre sayısı, uygulanan örneklerden tüm günlerde daha fazladır (Şekil 5.9). Yönlendirilmiş örneklerde ise 1. gün sonunda daha az hücre (yaklaşık %10) canlılığını korumuş ve sonraki günlerde çoğalma göstermişlerdir. 14. günden sonra miyojenik indüksiyon uygulanmamış örneklerdeki hücre sayısının, uygulanmış olanları geçtiği belirlenmiştir (Şekil 5.10). Hücrelerin 21 gün sonunda serbest fiberlerde her iki grupta (indüklenmiş ve indüklenmemiş) da yönlendirilmiş fiberlere göre daha fazla çoğaldıkları görülmektedir.



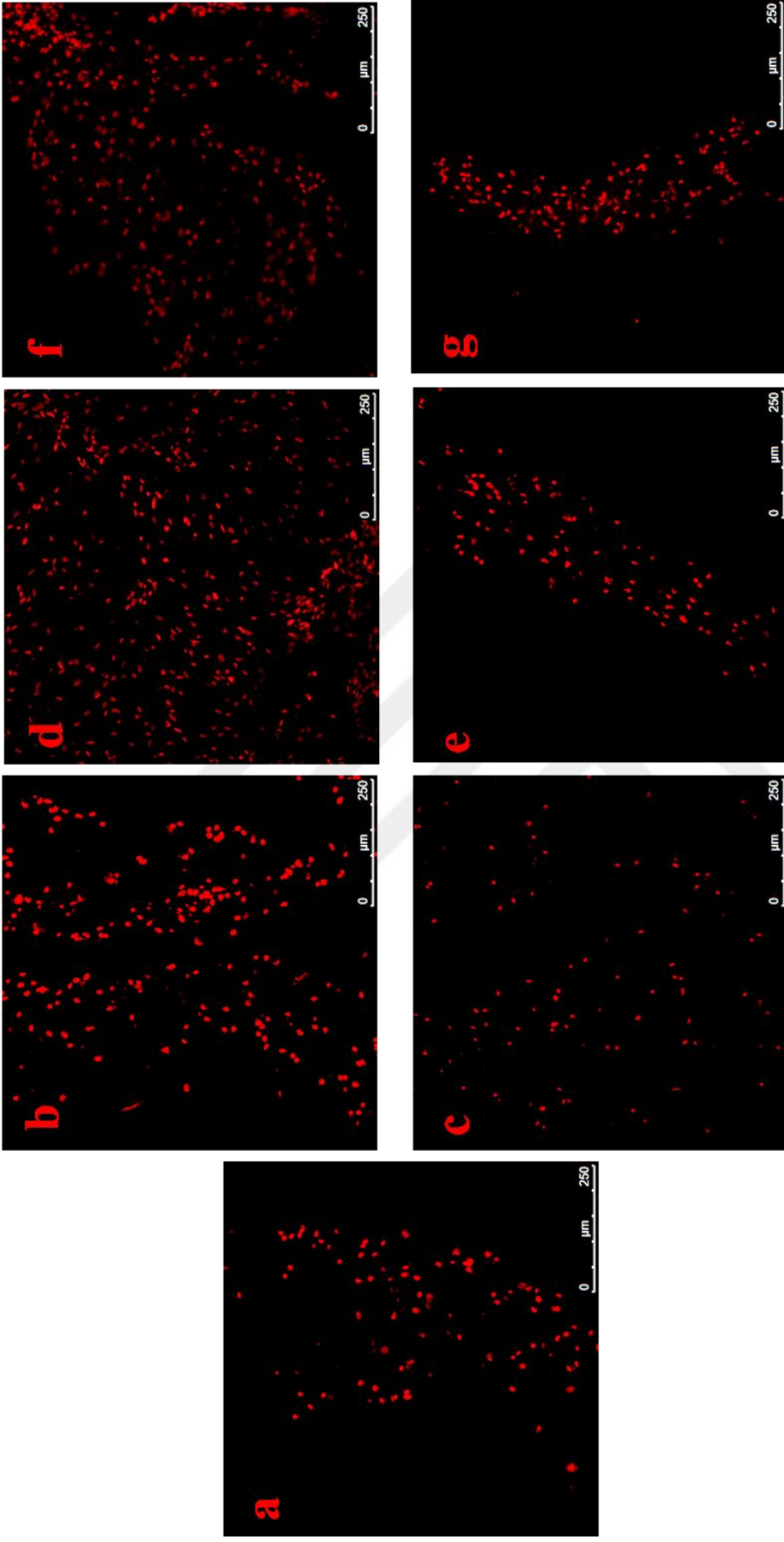
Şekil 5.9 Serbest fiberlerde Alamar Blue yöntemiyle canlı hücre sayısı belirlenmesi. Mavi barlar, normal kültür altındaki fiberleri (N.K.O), kırmızı barlar ise indükleme kültür ortamı altındaki fiberleri (İ.K.O), göstermektedir. İndükleme işlemi 24 saat sonra yapıldığı için ilk gün fiberlerinin her ikisi de normal kültür altındadır.



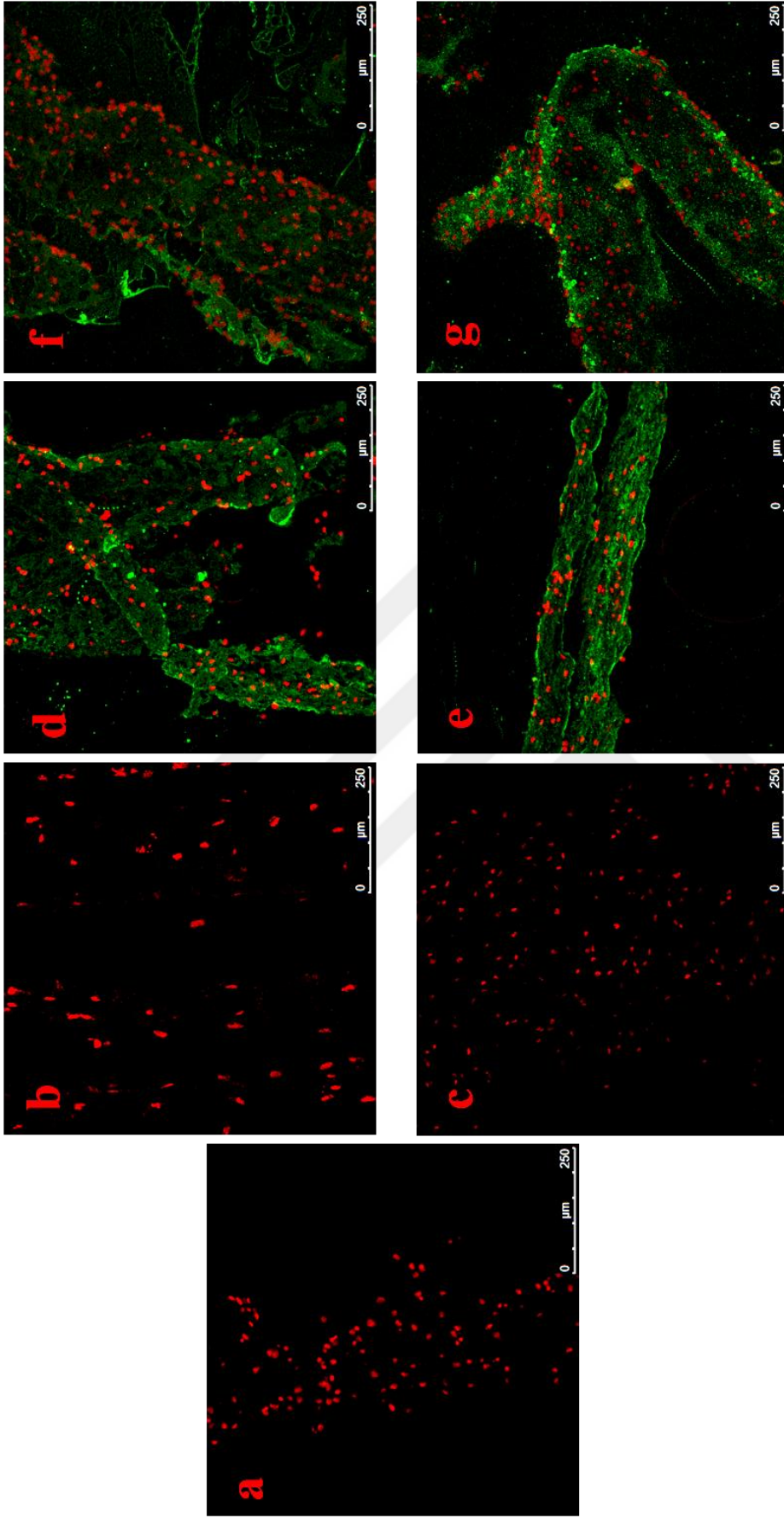
Şekil 5.10 Yönlendirilmiş fiberlerde Alamar Blue yöntemiyle canlı hücre sayısı belirlenmesi. Mavi barlar, normal kültür altındaki fiberleri (N.K.O), kırmızı barlar ise indüklemeye kültür ortamı altındaki fiberleri (İ.K.O) göstermektedir. İndüklemeye işlemi 24 saat sonra yapıldığı için ilk gün fiberlerinin her ikisi de normal kültür altındadır.

Serbest fiberlerin immünfloresan boyama verilerine göre, MyoD-1 ve Myogenin belirteçleri her iki grupta da (indüklenmiş ve indüklenmemiş) hiçbir zaman noktasında gözlemlenmemiştir (Şekil 5.11, Şekil 5.13). Desmin belirteci ise her iki grupta da 14 ve 21. günde görülmüştür (Şekil 5.12).

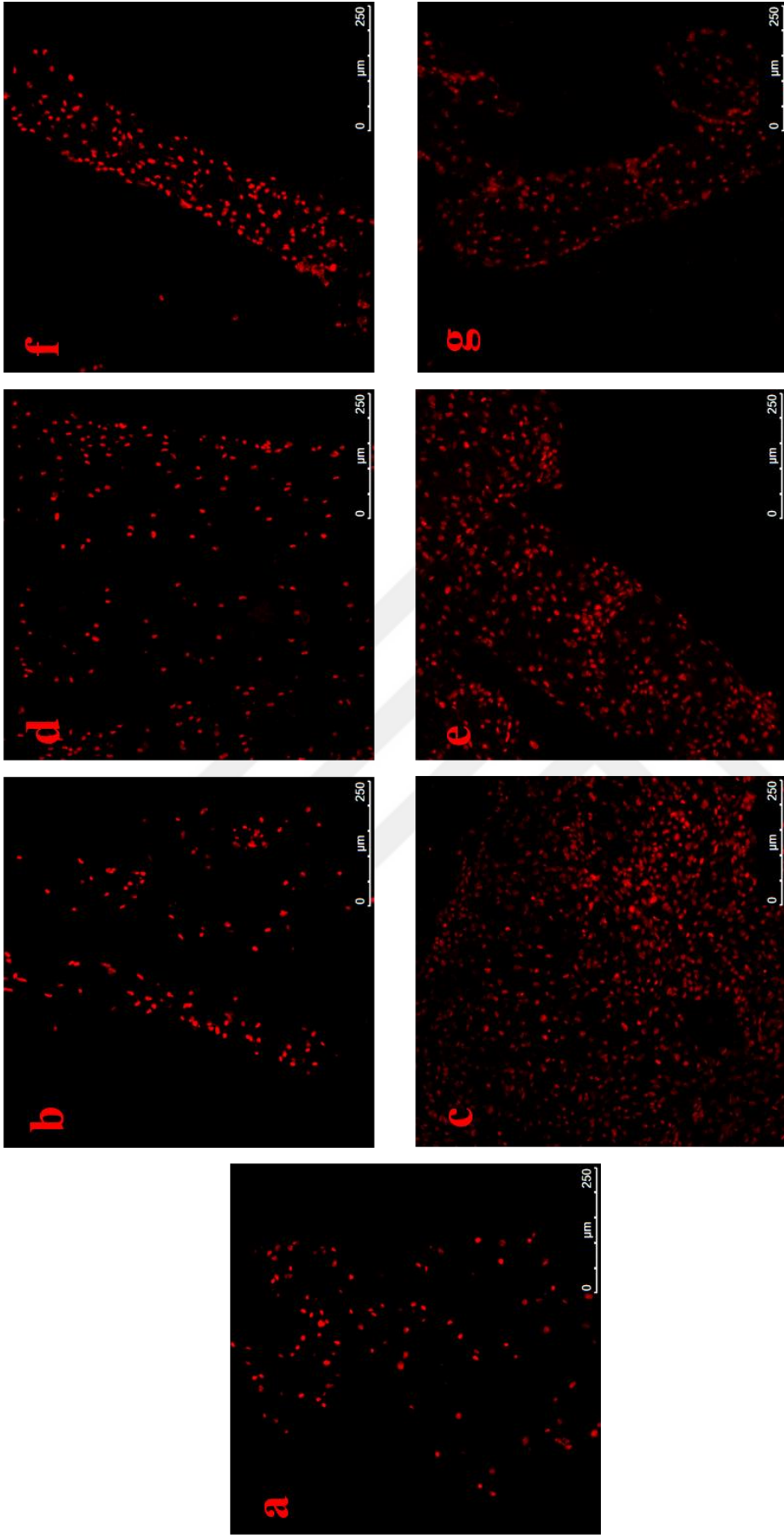
Yönlendirilmiş fiberler ile gerçekleştirilen immünfloresan boyama verilerinde; MyoD-1 belirteci indüklenmiş örnekte biraz daha yoğun olmak üzere sadece 21. günde gözlemlenmiştir (Şekil 5.14). Desmin belirteci her iki grubun 14. ve 21. gününde gözlemlenirken, indüklenmiş örneğin 7. gününde eser miktarda gözlemlenmiştir (Şekil 5.15). Myogenin belirteci ise iki grupta da hiç bir günde gözlemlenmemiştir (Şekil 5.16).



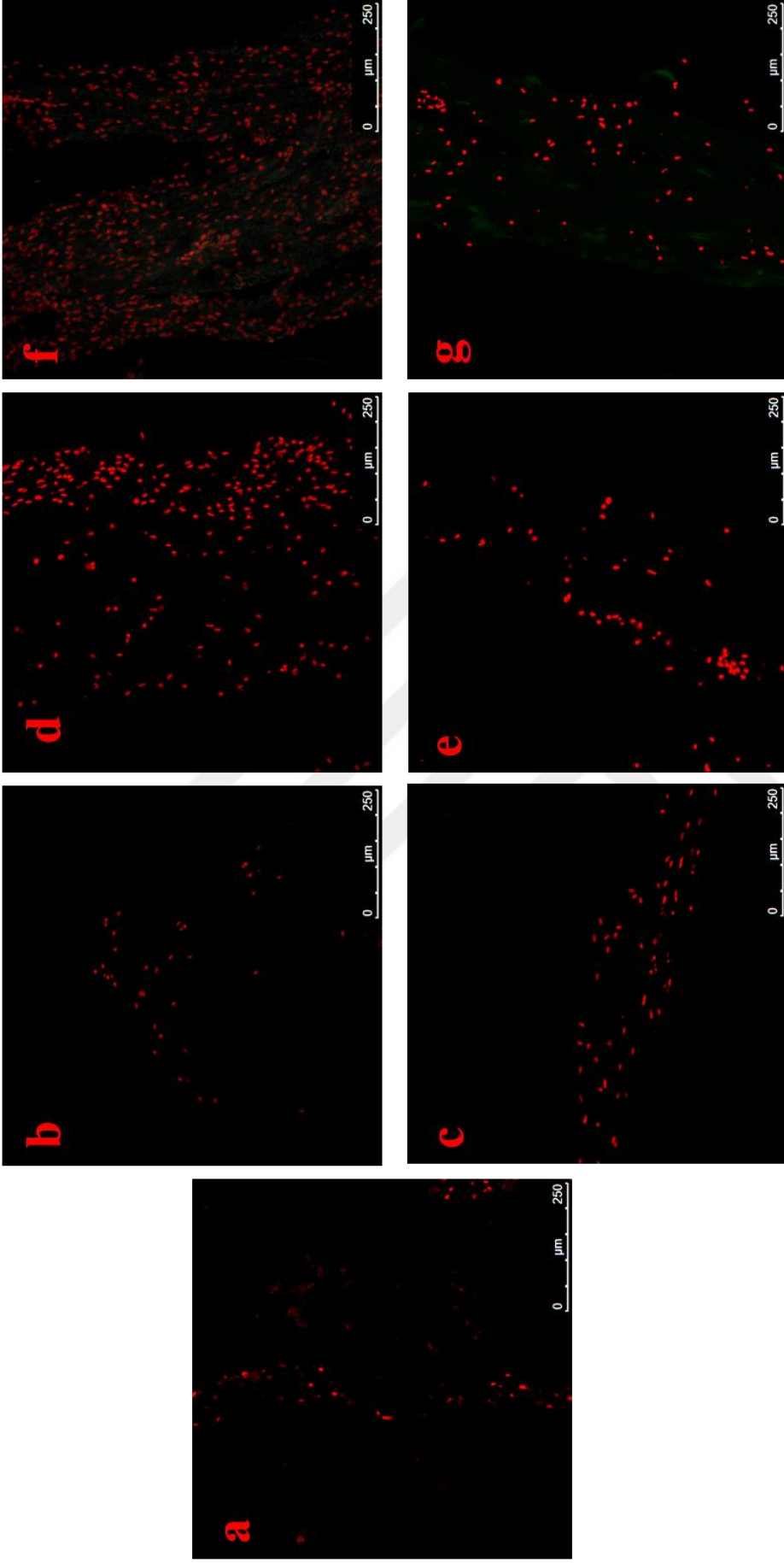
Şekil 5.11 Serbest fiber deneyi MyoD-1 immünfloresan boyama sonuçları. 1.gün (a), 7.gün (b-c), 14.gün (d-e), 21.gün (f-g). (Üst Panel: İndüklenmemiş, Alt Panel: İndüklenmiş) Kırmızı: Draq-5, Yeşil: MyoD-1



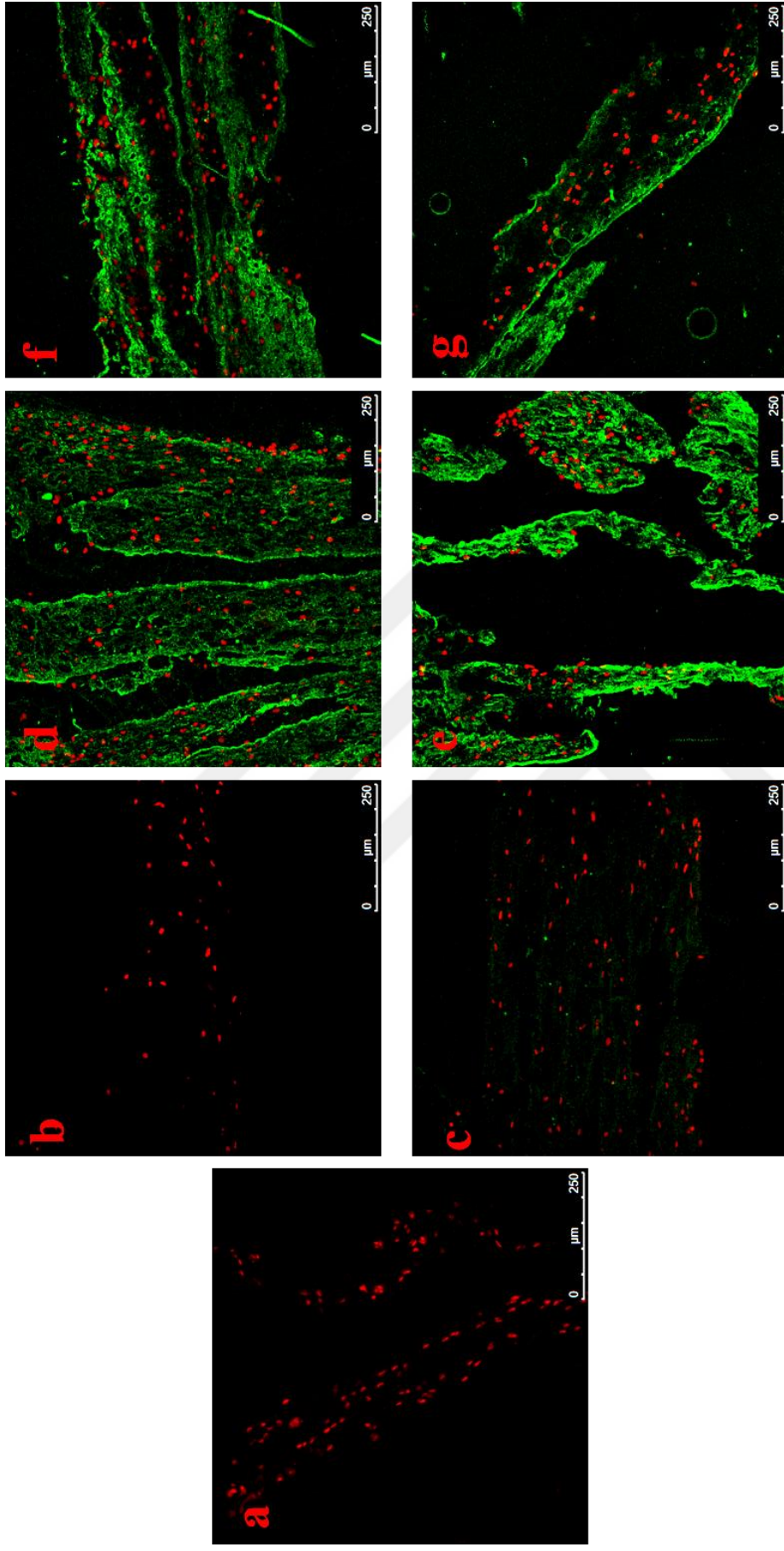
Şekil 5.12 Serbest fiber deneyi Desmin immünfloresan boyama sonuçları. 1.gün (a), 7.gün (b-c), 14.gün (d-e), 21.gün (f-g). (Üst Panel: İndüklelenmiş, Alt Panel: İndüklelenmemiş) Kırmızı: Drağ-5, Yeşil: Desmin



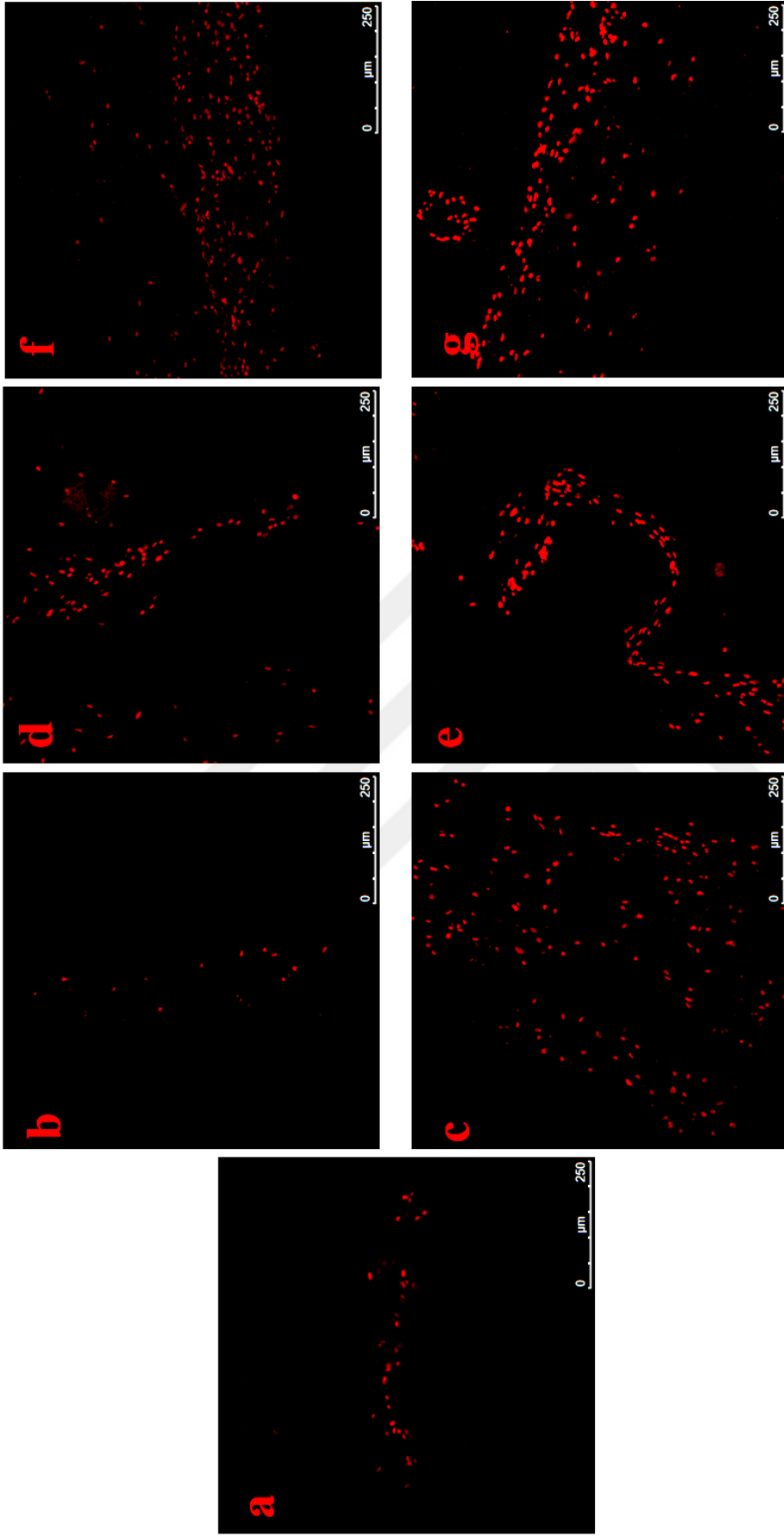
Şekil 5.13 Serbest fiber deneyi Myogenin immünofloresan boyama sonuçları 1.gün (a), 7.gün (b-c), 14.gün (d-e), 21.gün (f-g). (Üst Panel: İndüklelenmemiş, Alt Panel: İndüklelenmiş) Kırmızı: Draq-5, Yeşil: Myogenin



Şekil 5.14 Yönlendirilmiş fiber deneyi MyoD-1 immünfloresan boyama sonuçları. 1.gün (a), 7.gün (b-c), 14.gün (d-e), 21.gün (f-g). (Üst Panel: İndüklenmemiş, Alt Panel: İndüklenmiş) Kırmızı: Draç-5, Yeşil: MyoD-1



Şekil 5.15 Yönlendirilmiş fiber deneyi Desmin immünfloresan boyama sonuçları. 1.gün (a), 7.gün (b-c), 14.gün (d-e), 21.gün (f-g). (Üst Panel: İndüklenmemiş, Alt Panel: İndüklenmiş) Kırmızı: Draq-5, Yeşil: Desmin

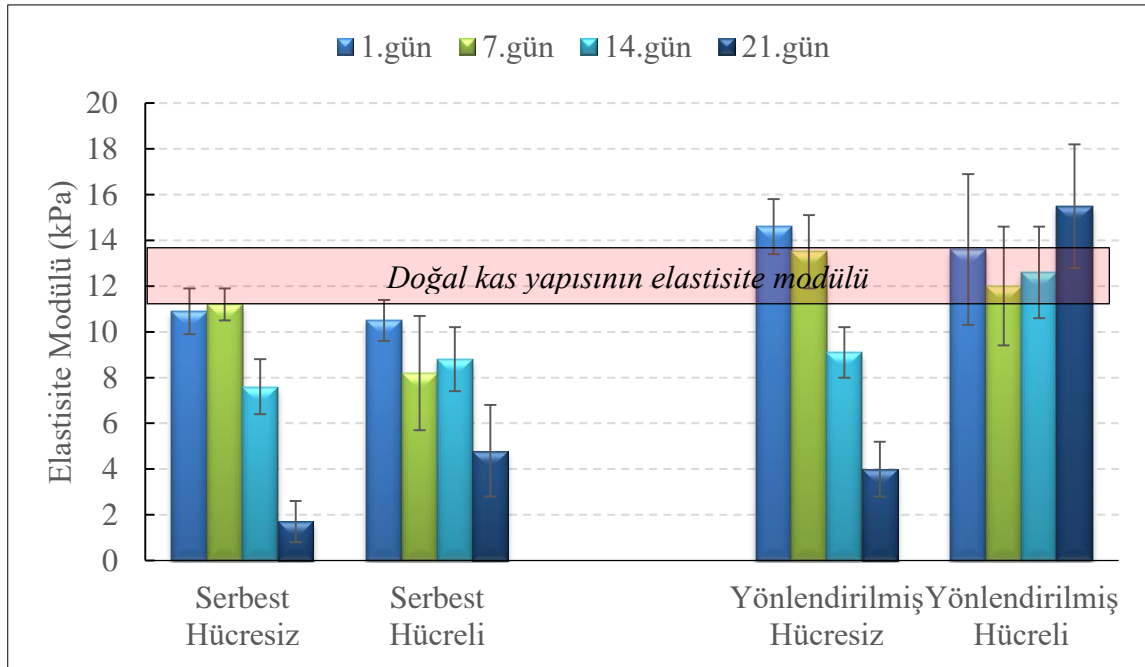


Şekil 5.1.16 Yönlendirilmiş fiber deneyi Myogenin immünfloresan boyama sonuçları. 1.gün (a), 7.gün (b-c), 14.gün (d-e), 21.gün (f-g). (Üst Panel: İndüklenmemiş, Alt Panel: İndüklenmiş) Kırmızı: Draq-5, Yeşil: Myogenin

5.3.1. Mekanik Test Bulguları

Üretilen fiberlere, kas dokusu ile mekanik uyumluluğun incelenmesi, yönlendirme etkisinin incelenmesi ve hücre varlığının etkisinin incelenmesi amacıyla çekme testi uygulanmıştır. Bu amaçla Bölüm 4.2.6’da ifade edildiği şekliyle fiberler üretilmiştir. Elde edilen veriler WindapR programı ile işlenmiş ve gerinim-gerilim (stress-strain) eğrileri oluşturulmuştur. Eğrinin doğrusal olduğu ilk kısmın eğimi kullanılarak fiberlerin elastisite modülü hesaplanmıştır. Veriler 3 ayrı fiberden alınan ölçümlerin ortalaması olarak verilmiştir.

Mekanik testler, hücrelerin fibrin fiberlerin mekanik dayanımını arttırdığını ve hücrelerin yönlendirildiği zaman daha fazla bir artışın meydana geldiğini ortaya koymuştur (Şekil 5.17).



Şekil 5.17 Çekme testi uygulanan fiberlerin elastisite modülleri.

Serbest fiberler, yönlendirilmiş fiberlere kıyasla daha düşük mekanik dayanım sergilerken, yönlendirilmiş hücreli fiberler, doğal iskelet kasının maruz kaldığı kuvvetlere dayanmak için gerekli olan mekanik özellikleri korumuştur (Şekil 5.17).

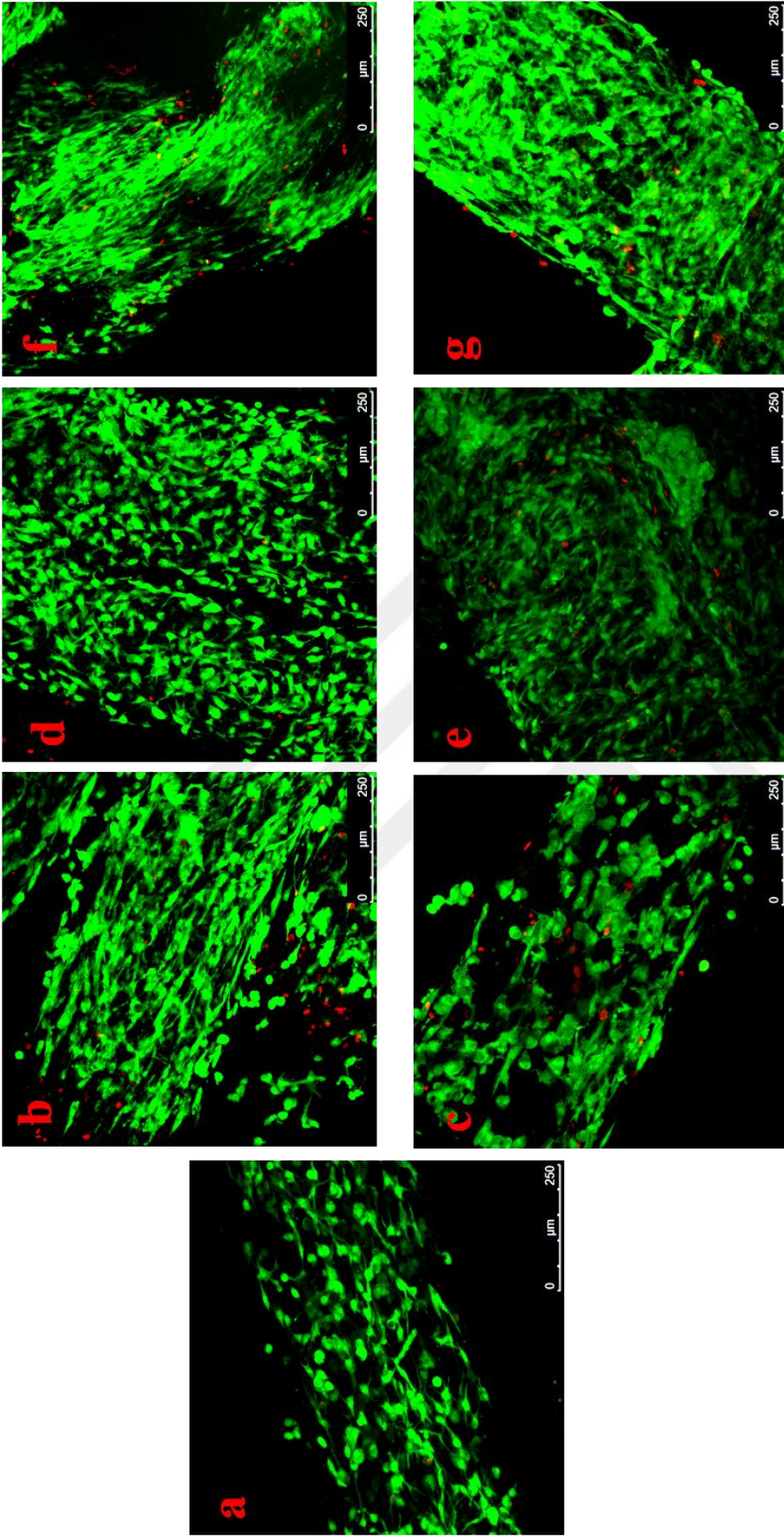
5.4. ASC YÜKLÜ FİBRİN FİBERLERİN DİNAMİK KÜLTÜR İNCELEMESİ

Statik kültür deneyi için hazırlanan ASC yüklü fibrin fiberlerle aynı koşullarda 4 cm boyunda ve 2 mm kalınlığında üretilen fiberler dinamik kültür deneyinde kullanılmıştır. Fiberler ajinat liyaz ve indükleme uygulamalarının hemen ardından biyoreaktör cihazına

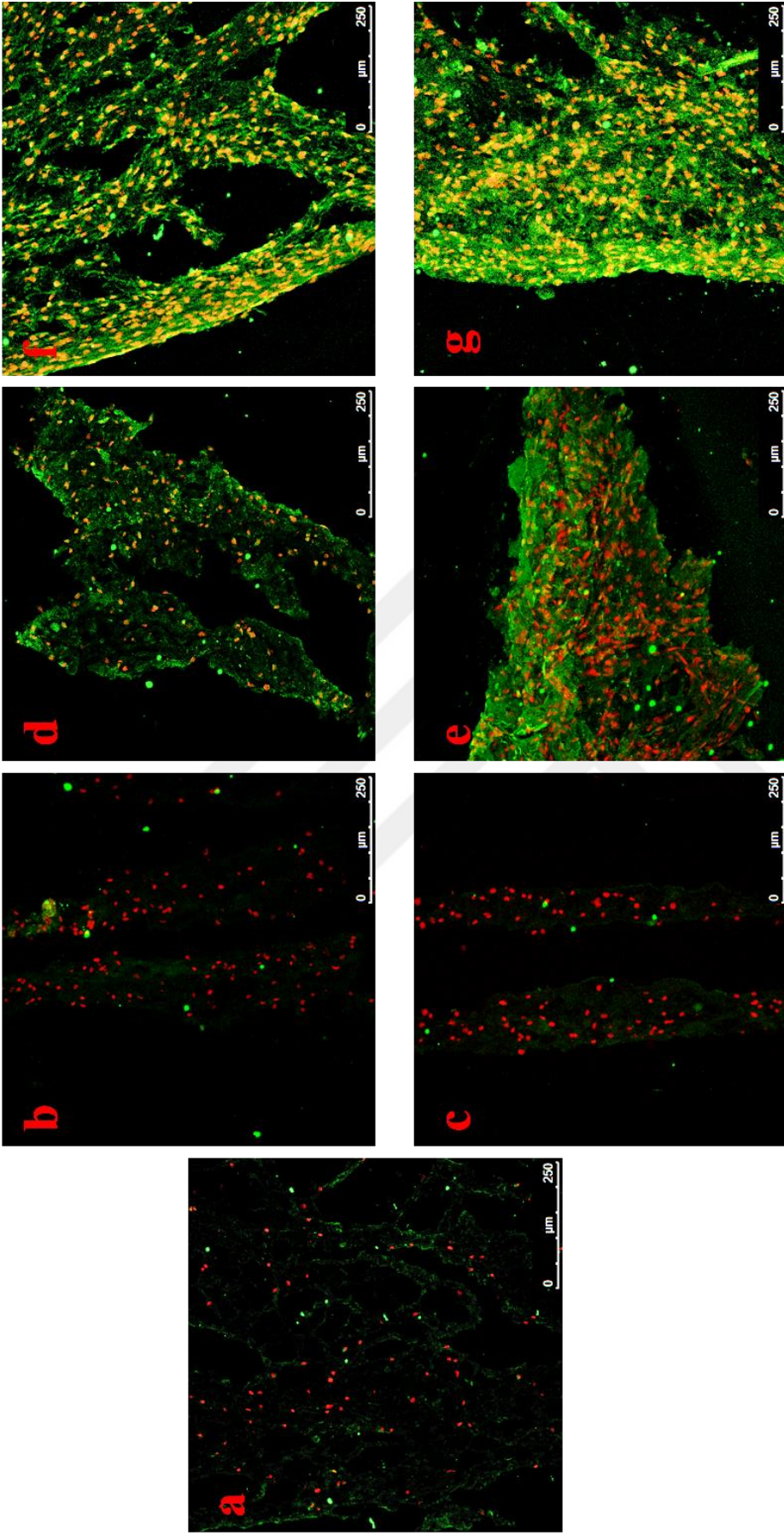
bağlanmış ve 21 gün boyunca 0.5 Hz, 1 saat/gün, örnek uzunluğunun %10'u kadar hareketle tek eksenli periyodik gerilme uygulanarak dinamik olarak kültür edilmiştir. 1, 7, 14 ve 21. günlerde canlı/ölü boyaması ve immünfloresan boyaması yapılarak hücre davranışları ve kas hücresine farklılaşma seviyeleri incelenmiştir.

Canlı/ölü boyama verilerinde her iki grupta (indüklenmiş ve indüklenmemiş) da tüm günlerde fiber içindeki hücrelerin canlılıklarını korudukları ve çoğaldıkları gözlemlenmiştir (Şekil 5.18).

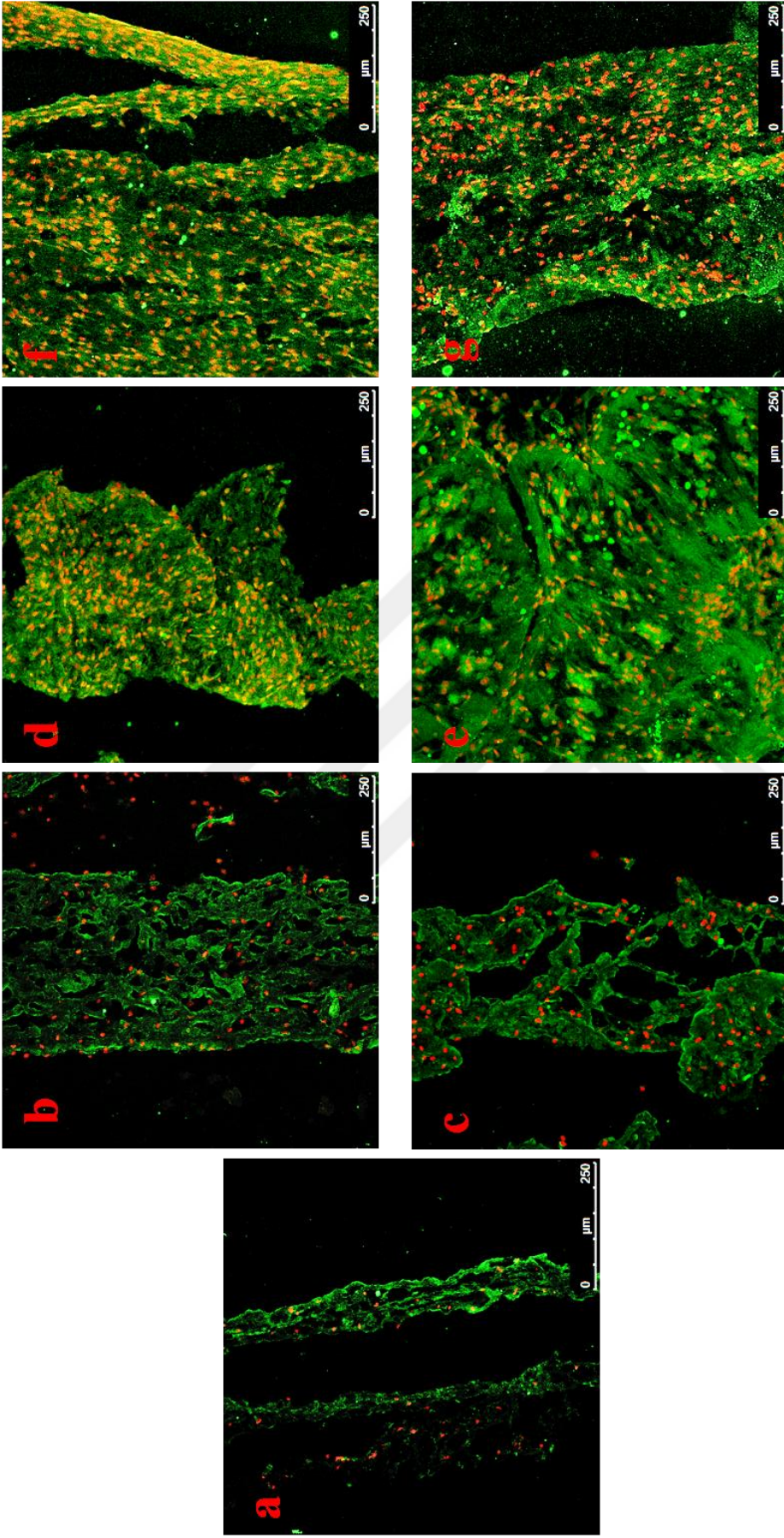
İmmünfloresan boyama verilerine göre MyoD-1 belirteci her iki grupta (indüklenmiş ve indüklenmemiş) da 14. ve 21. günde belirgin şekilde gözlenmiştir (Şekil 5.19). Desmin belirteci 1. günden itibaren artan şekilde her iki grubun tüm günlerinde, 14 ve 21. günlerde belirgin şekilde yoğun olmak üzere, gözlemlenmiştir (Şekil 5.20). Myogenin belirteci ise her iki grupta da, indüklenen örnekte daha fazla olmak üzere, 14. günde gözlemlenmeye başlamış olup 21. günde yoğunlaştığı görülmüştür (Şekil 5.21).



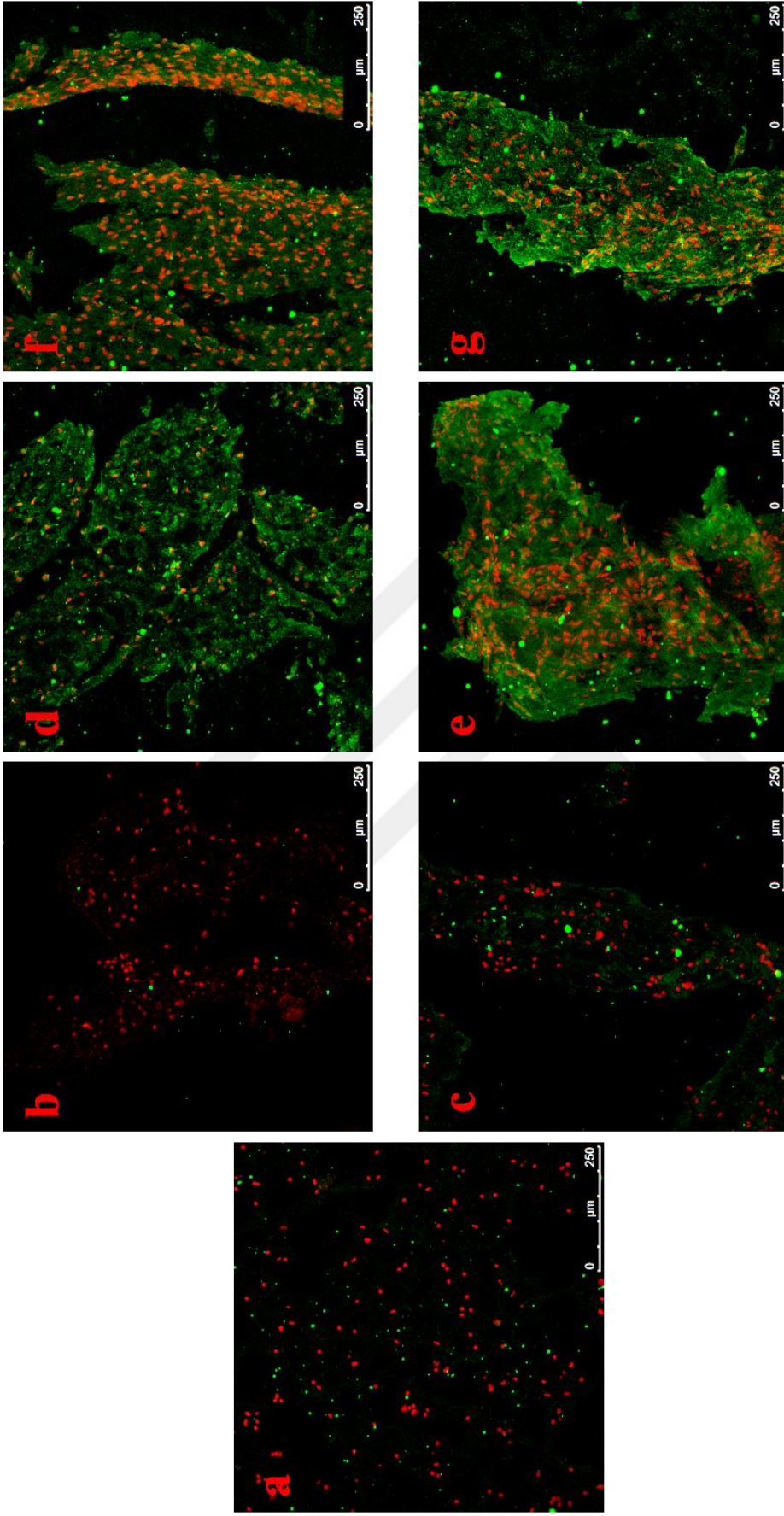
Şekil 5.18 Dinamik kültür deneyi canlı/ölu boyama sonuçları. 1.gün (a), 7.gün (b-c), 14.gün (d-e), 21.gün (f-g). (Üst Panel: İndüklenmemiş, Alt Panel: İndüklenmiş) Yeşil: Kalsein, Kırmızı: EthD-1



Şekil 5.19 Dinamik kültür deneyi MyoD-1 immünfloresan boyama sonuçları 1.gün (a), 7.gün (b-c), 14.gün (d-e), 21.gün (f-g). (Üst Panel: İndüklenmemiş, Alt Panel: İndüklenmiş) Kırmızı: Draq-5, Yeşil: MyoD-1

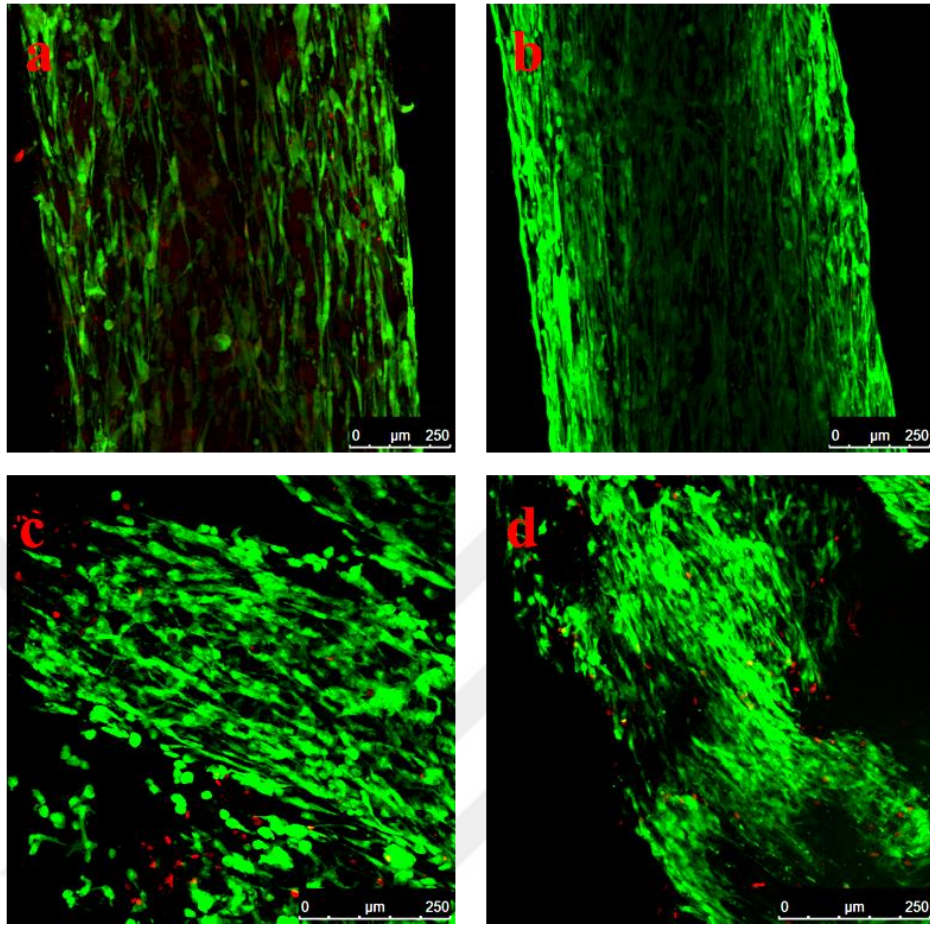


Şekil 5.20 Dinamik kültür deneyi Desmin immünfloresan boyama sonuçları. 1.gün (a), 7.gün (b-c), 14.gün (d-e), 21.gün (f-g). (Üst Panel: İndüklenmemiş, Alt Panel: İndüklenmiş) Kırmızı: Draq-5, Yeşil: Desmin



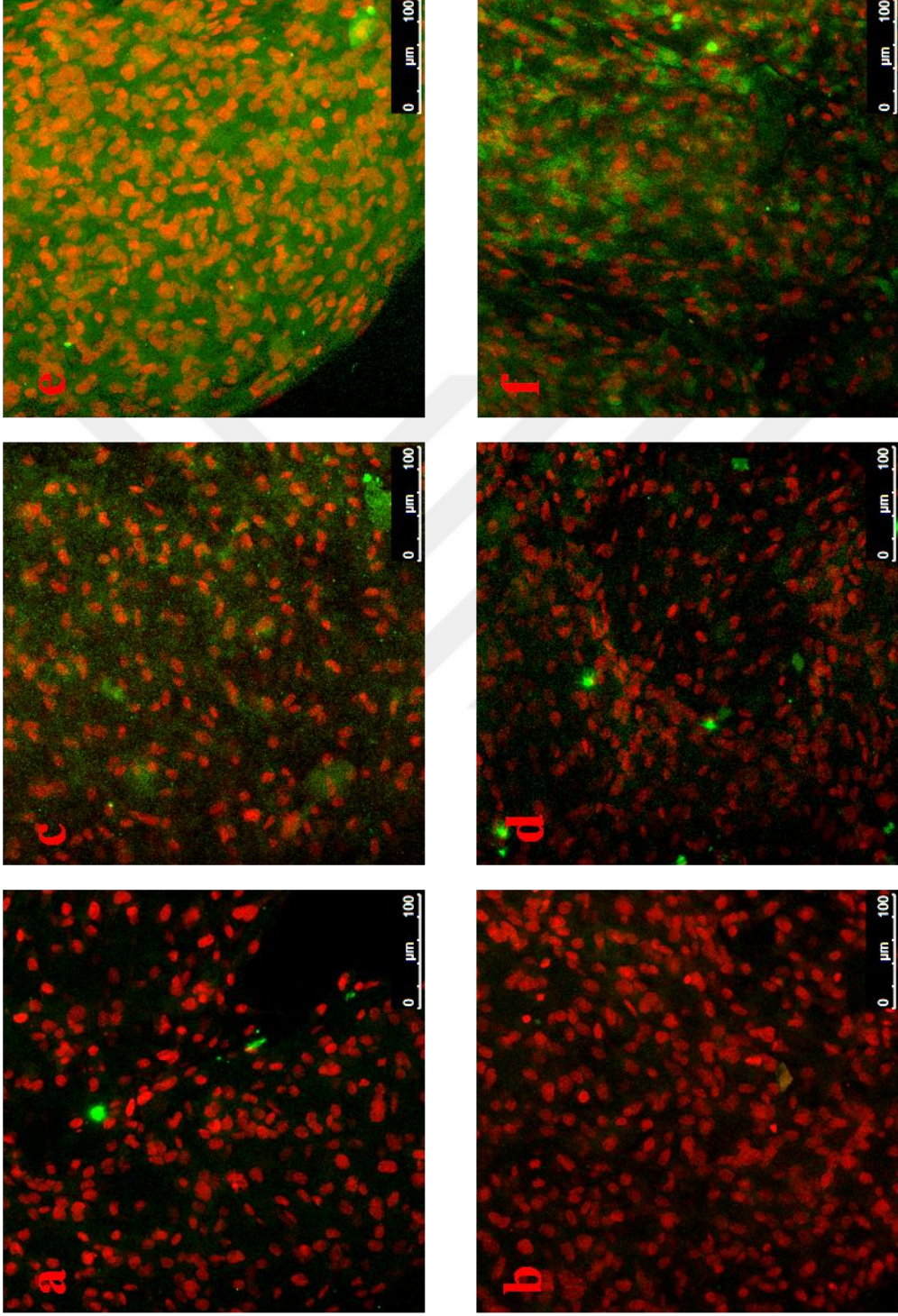
Şekil 5.21 Dinamik kültür deneyi Myogenin immünfloresan boyama sonuçları. 1.gün (a), 7.gün (b-c), 14.gün (d-e), 21.gün (f-g). (Üst Panel: İndüklenmemiş, Alt Panel: İndüklenmiş) Kırmızı: Draq-5, Yeşil: Myogenin

Dinamik ve statik kültür canlı/ölü boyaması karşılaştırmasına göre statik kültürde hücrelerin dinamik kültür örneklerine göre daha düzgün hizalandıkları gözlenmiştir. (Şekil 5.22)

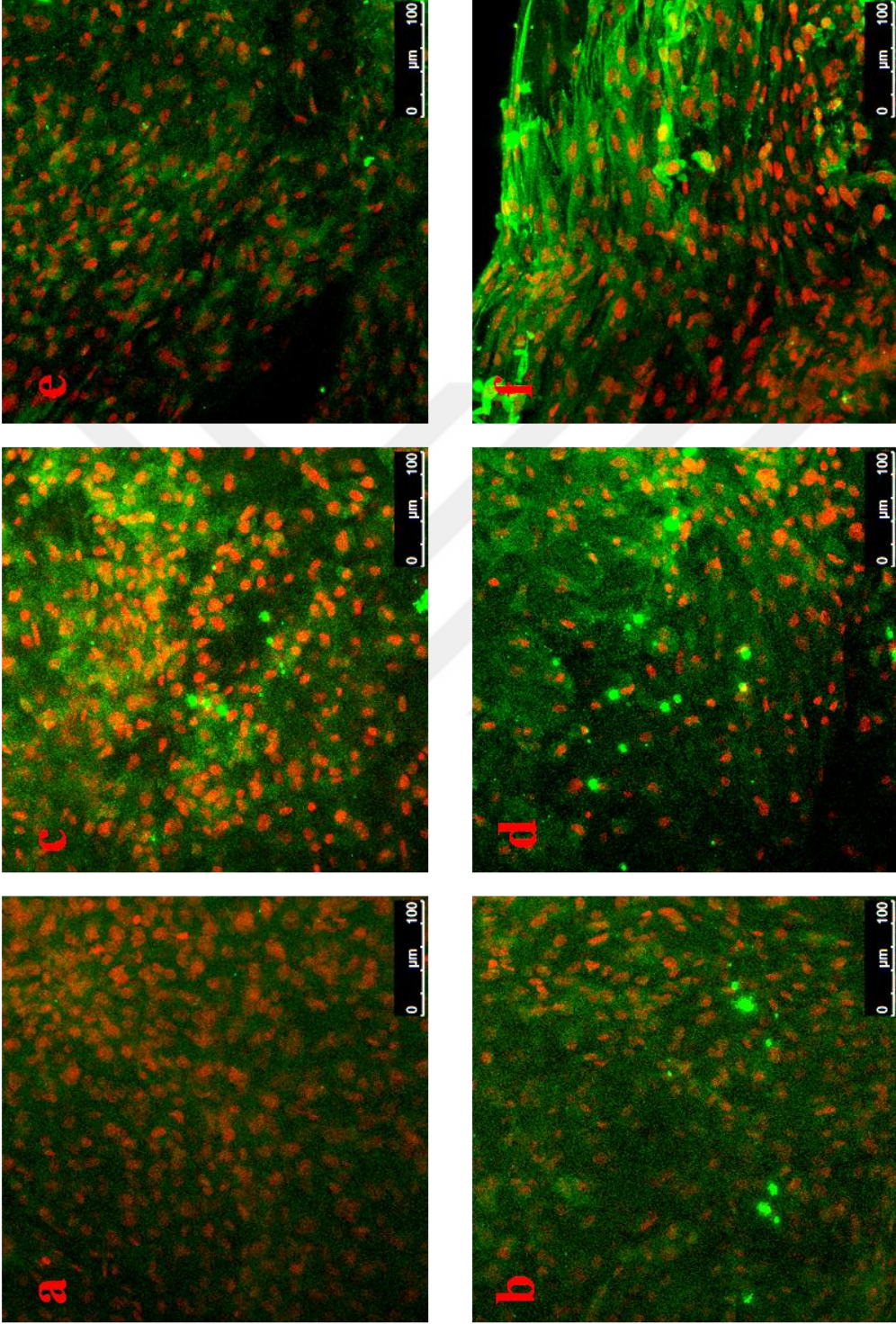


Şekil 5.22 Statik ve dinamik kültür canlı/ölü hücre karşılaştırılması. Statik kültür 14. ve 21. gün (a,b). Dinamik kültür 14. ve 21. gün (c,d)

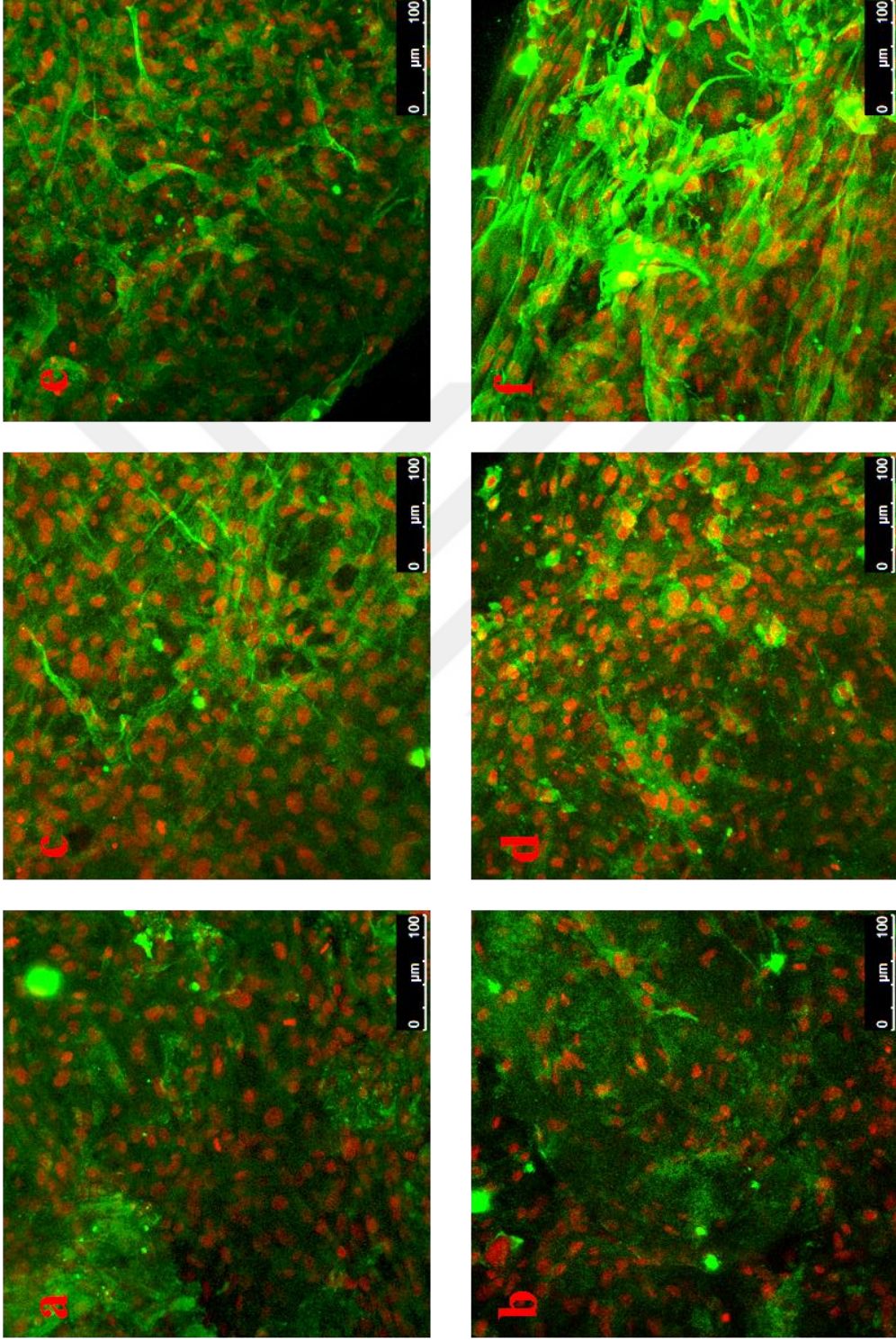
Dinamik kültür uygulanmış örnekler de tüm fiber yapısının durumunu görebilmek için kesit boyamanın yanı sıra tüm fiber parçasının da immünfloresan boyanması gerçekleştirilmiş ve tüm günlerde artan oranda tüm belirteçler gözlenmiştir. (Şekil 5.23, Şekil 5.24, Şekil 5.25)



Şekil 5.23 Dinamik kültür tüm fiber MyoD-1 immünfloresan boyama görüntüleri. 7.gün (a-b), 14.gün (c-d), 21.gün (e-f) (Üst Panel: İndüklenmemiş, Alt Panel: İndüklenmiş), Kırmızı: Draq5, Yeşil: MyoD-1



Şekil 5.24 Dinamik kültür tüm fiber Desmin immünfloresan boyama görüntüleri. 7.gün (a-b), 14.gün (c-d), 21.gün (e-f) (Üst Panel: İndüklenmemiş, Alt Panel: İndüklenmiş), Kırmızı: Draq5, Yeşil: Desmin



Şekil 5.25 Dinamik kültür tüm fiber Myogenin immünfloresan boyama görüntüleri. 7.gün (a-b), 14.gün (c-d), 21.gün (e-f) (Üst Panel: İndüklenmemiş, Alt Panel: İndüklenmiş), Kırmızı: Draq5, Yeşil: Myogenin

6. TARTIŞMA VE SONUÇ

6.1. TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında, miyojenik farklılaşması uyarılmış ASC hücreleriyle yüklü, mekanik özellikler bakımından doğal doku ile özdeş, yönlendirilmiş ve dinamik kültür ile stimüle edilmiş, doğal kas yapısının bir benzeri olabilecek fibrin bazlı fiberler üretilmiştir. Yapılan hücre canlılık testleri (ölü/canlı boyama ve Alamar Blue), immünfloresan boyama ve mekanik testlerin sonuçları değerlendirilmiştir.

6.1.1. Fibrin Fiber Üretim Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Tek başına fibrin kullanılarak yapılan fiber üretim denemelerde ulaşılan sonuçlar, çözeltinin düşük viskozitesi nedeniyle sadece fibrinojenin trombin banyosu içine enjeksiyonuyla kararlı bir fibrin üretilmesinin mümkün olmadığını göstermiştir. Bu nedenle toplama banyosuna enjekte edilen polimerin ilk anda bir fiber oluşturmasını sağlamak için biyouyumlu ve biyobozunur olduğu bilinen bir polisakkarit olan aljinat, fibrinojenle Bölüm 5.2.1’de ifade edilen çeşitli oranlarda karıştırılmıştır. Ancak mekanik dayanıklılığı ve sarılabılme özelliği yüksek olduğu için tercih edilen bu yüksek polimer yoğunluklu (fibrinojen ve aljinat) matrisler içerisinde hücrelerin yaşayamaması nedeniyle, bundan sonraki çalışmada fibrinojen ve aljinat konsantrasyonları, fiber oluşumuna izin veren en düşük konsantrasyonda (10 mg/mL fibrinojen ve 15 mg/mL aljinat) kullanılmıştır. Böylelikle, canlılığı etkileyen değerin polimer yoğunluğu olduğundan emin olunmak istenmiştir. Şekil 5.4’te görüldüğü üzere matris içerisindeki polimer yoğunluğu azaldıkça fiber içerisinde yaşayan hücre sayısı artmıştır.

Bruekers ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada üretilen fibrin fiberlerin mimarisinin hücre yayılması ve farklılaşmasını etkilediği gösterilmiştir (43). Bu nedenle hücre yayılmasının sağlanabilmesi fibrin fiberin optimizasyonu ile doğrudan ilişkilidir. ASC hücrelerinin miyojenik farklılaşma ile miyoblastları oluşturması, miyoblastların ise birbiri ile birleşip kaynaşarak çok çekirdekli miyotüpleri oluşturabilmesi için fiber içerisindeki hücrelerin yaşaması kadar yayılarak fiber boyunca yönlenebilmesi de bu çalışma için çok önemlidir. Her ne kadar Şekil 5.4’te fiber içerisindeki hücre canlılığının arttığı görülmüş olsa da yeterli yayılmış morfoloji gözlenememiştir. Bu nedenle, matris polimer yoğunluğunun kararlı bir fiber üretilebilecek en düşük konsantrasyonlardan (10mg/mL fibrinojen ve 15mg/mL aljinat) taviz vermeden azaltılabilmesi için üretimden sonra aljinat liyaz enzimi kullanılarak aljinat bileşiği matristen çıkarılmış ve hücre yayılması için matris gözenekliliği arttırılmıştır.

Şekil 5.5'te görüldüğü gibi aljinat bileşeninin yapıdan çıkarılmadığı durumda, yayılma eğilimi örnek boyunca bazı lokal bölgelerle sınırlı kalmıştır ve homojen bir hücre popülasyonu izlenememiştir. Aljinat liyaz enzimi uygulamasından sonra hücrelerin fiber eksenine paralel şekilde yayılma gösterdikleri gözlenmiştir. Özellikle faz-kontrast görüntüleriyle çakıştırılan floresan görüntüler dikkate alındığında, aljinat liyaz enzimi uygulanmadığı durumda hücrelerin yalnızca kısıtlı bir miktarda fiber aralarında canlılığını sürdürebildiği gözlenirken; aljinat liyaz enzimi uygulandığı zaman tüm fiber matrisi boyunca homojen şekilde yayılmış ve yönlendirilmiş ASC hücreleri izlenmiştir. Bu sonuçlar, doğal kas yapısını taklit edebilecek bir fiber yapısının optimize edildiğini göstermektedir.

6.1.2. Hücre Canlılık Testleri Değerlendirmesi

Hücre canlılık testleri olarak fiber içerisindeki hücrelerin davranışlarını gözlemleyebilmek için canlı/ölü boyama testi ile fiber içerisindeki hücre sayısının tespiti için Alamar Blue testi yapılmıştır.

6.1.2.1. Canlı/Ölü Boyama Sonuçları Değerlendirmesi

Riboldi ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada DegraPol hücre taşıyıcılar içerisine ekilen C2C12'nin (fare miyoblast hücre hattı) tutunma ve çoğalması incelenmiştir. 21 gün boyunca hücrelerin hayatta kaldıkları ve çoğaldıkları görülmüştür (44). Madden ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada ise kas biopsisinden elde edilen miyojenik hücrelerin fibrinojen ve matrigel kullanılarak üretilen fiber demetlerinin içerisinde hayatta kaldıkları gösterilmiştir (45). Çalışmamızda ise Şekil 5.8 ve Şekil 5.18'te görüldüğü üzere hem statik hem de dinamik kültürde 21. gün boyunca ASC hücre canlılığı ve yönlendirilmesinin korunduğu gözlenmiştir. Serbest fiberlerle yapılan canlı/ölü boyama sonuçlarına göre ise hücre canlılığı 21 gün boyunca korunmuş ve belirli bir hücre yönlendirilmesi görülmemiştir (Şekil 5.7). Dinamik kültür örneklerinde 14.güne kadar statik kültür örneklerine göre daha az sayıda canlı hücre olduğu canlı/ölü boyama görüntülerinde görülmektedir.

Dinamik kültürde fiberlere uygulanan çekme kuvvetinin hücrelerin çoğalmasını geciktirdiği düşünülmektedir. Ayrıca hücrelerin fiber eksenini boyunca hizalanmasını da etkilemektedir. Statik kültürde hücreler dinamik kültüre göre daha düzgün hizalanmaktadır. (Şekil 5.22)

6.1.2.2. Alamar Blue Sonuçları Değerlendirmesi

Üretim esnasında hücrelerin maruz kaldığı çeşitli durumların (şırınga ve iğne ucu kesme kuvveti, toplama banyosu içerisinde çapraz bağlanma için bekleme vb.) hücrelerin bir

kısının üretim esnasında ölmesine veya fiber içerisinde çıkmasına yol açtığı değerlendirilmektedir. Bu nedenlerle, 1. gün sonunda serbest fiberlerde üretim esnasında hapsedilen edilen tüm hücrelerin yaklaşık %20'si canlı kalırken yönlendirilmiş fiberlerde sürekli gerilimin devam ediyor olması nedeniyle tüm hücrelerin yaklaşık %10'u canlı kalmıştır. (Şekil 5.9 ve Şekil 5.10). 14. günden sonra miyojenik indüksiyon uygulanan örneklerde, uygulanmamış olanlara göre daha düşük hücre sayısı belirlenmiştir. Bu durum, miyojenik indüksiyonunun hücrelerin çoğalma yolağından ziyade, farklılaşma yolağına yönlendirilmesi anlamına gelebileceği şeklinde değerlendirilmiştir.

6.1.3. İmmüno Floresan Boyama Sonuçları Değerlendirmesi

ASC'lerin in vitro koşullar altında miyojenik farklılaşma gösterebildiği çeşitli araştırma grupları tarafından gösterilmiştir. Zuk ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, miyojenik farklılaşma için kullanılan kültür ortamında ASC'lerin uzamış morfoloji gösterdikleri ve MyoD-1 ile miyozin heavy chain kas belirteçlerini ifade ettikleri görülmüştür (21). Bu çalışmadan farklı olarak bizim çalışmamızda kullanılan dinamik kültür ortamı daha fazla sayıda ASC hücresinin farklılaşmasını sağlamıştır (Şekil 5.23, Şekil 5.24, Şekil 5.25). Yılığör ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada ise bizim sonuçlarımıza da paralel olarak, ASC hücrelerinin dinamik kültür altında kas belirteçlerini gösterdikleri gösterilmiştir (46).

Çalışmamızda doğal kas yapısının mikro çevresini taklit ederek, yağ kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin miyojenik farklılaşma yolağına yönlendirilmesi amaçlanmıştır. Üretilen ASC yüklü fiberlere indükleme ortamı yardımıyla biyokimyasal, uygulanan düzenli tek eksenli gerilme kuvveti yardımıyla da mekanik sinyaller gönderilerek miyojenik farklılaşma açısından incelenmiştir.

Statik ve dinamik olarak kültür edilmiş olan ASC yüklü fiberler, deney sonlarında fikslenmiş ve kas spesifik belirteçler olan MyoD-1, Desmin ve Myogenin antikoru ile işaretlenmiştir.

Statik kültür uygulanan yönlendirilmiş örneklerde MyoD-1 belirteci sadece 21.günlerde az miktarda izlenmiştir (Şekil 5.14). Her iki grup için de Desmin 14 ve 21. günlerde ifade edilirken (Şekil 5.15), Myogenin her iki grupta da hiçbir günde gözlenmemiştir (Şekil 5.16). Serbest fiberlerin immüno floresan boyama sonuçlarında ise her iki grubun 14 ve 21. günlerinde sadece Desmin görülmüş olup MyoD-1 ve Myogenin hiçbir günde gözlenmemiştir (Şekil 5.11, Şekil 5.12, Şekil 5.13). Bu iki belirtecin görülmemesi nedeni miyotüp oluşumu için gerekli olan hücre yönelmesinin serbest fiberlerde görülmemesi olarak değerlendirilmiştir.

Dinamik kültür örneklerinde ise MyoD-1 belirteci her iki grupta da 14 ve 21.günlerde belirgin şekilde görülmekle birlikte indüksiyon uygulanan örneklerde biraz daha yoğun oldukları gözlenmiştir (Şekil 5.19). Desmin belirteci 1. günden 21. güne doğru her iki grupta da artan oranlarda görülmüştür (Şekil 5.20). Myogenin ise her iki grubun 14 ve 21. günlerinde ifade edilmiştir. İndüksiyon uygulanan örnekler de daha fazla görüldüğü değerlendirilmektedir (Şekil 5.21).

Statik ve dinamik kültür sonuçları karşılaştırıldığında tek başına uygulanan biyokimyasal indüksiyonun ASC hücrelerinin miyojenik farklılaşma yolağına girebilmesine yeterli olmadığı değerlendirilmektedir. Biyokimyasal indüksiyonun, mekanik indüksiyon ile desteklendiği dinamik kültür çalışmasında, özellikle statik kültür de hiçbir sinyal alınmayan Myogenin belirtecinin belirgin şekilde ortaya çıkması ASC'lerin miyojenez sürecinde olduğu şeklinde değerlendirilmektedir.

6.1.4. Mekanik Test Sonuçları Değerlendirmesi

Aljinat bileşenin sistemden çıkarılması mekanik dayanımı düşürse de Bruekers ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada da gösterildiği gibi trombin kullanımının artırılması fibrin polimerizasyon oranını artırdığı için dayanımı yeterli seviyeye çıkarmıştır (43).

Serbest ve yönlendirilmiş olarak iki grup halinde üretilen fiberler ayrıca kontrol grubu olarak hücresiz olarak da test edilmiştir. Yönlendirilmiş fiberlerin hem hücreleri hem hücresiz durumda daha yüksek bir mekanik dayanım gösterdikleri gözlenmiştir. Ancak her iki grupta da 7. günden sonra mekanik dayanım düşmeye başlamıştır. Hücreli ve yönlendirilmiş örneklerde ise 14. günden itibaren hücrelerin çoğalmasının ve fiber eksenine paralel yönelmesinin mekanik dayanımı artırdığı değerlendirilmektedir (Şekil 5.17).

6.2. SONUÇ

En büyük dokulardan biri olan kas dokusu toplam vücut ağırlığının yaklaşık %45'ini oluşturur. Motor sinir uyarımı ile kasılma işlevi gören miyofiber demetlerden oluşan iskelet kas dokusu, egzersiz ve ağırlık kaldırma gibi hafif hasar durumlarında uydu hücreleri vasıtasıyla kendini yenileyebilmektedir. Ancak doku bütünlüğünün ciddi bir şekilde hasar görmesi durumunda kendini yenilemek için sınırlı bir kapasiteye sahiptir. Kaybın kas hacminin %20'sinden fazla olduğu durumlarda doğal tamir mekanizmasının yetersiz kaldığı ve kayıpların tamir edilemediği bilinmektedir. Yaralanma düzgün bir şekilde onarılamazsa kas güçsüzlüğü ve atrofi meydana gelmektedir (47).

Günümüzde kas hastalıklarını tedavi edebilen etkin bir ilaç tedavisinin bulunmamaktadır. Cerrahi tedavi seçenekleri ise yukarıda bahsi geçen nedenlerden ötürü oldukça kısıtlıdır. Bu nedenle hücreler, taşıyıcı biyomalzemeler ve indüktif ajanlar kullanılarak laboratuvar ortamında fonksiyonel doku ve organlar geliştirilmesini hedefleyen doku mühendisliği odaklı tedavi yöntemleri popüler hale gelmektedir.

Doku mühendisliği çalışmaları, önceleri sadece yapısal destek sağlayan pasif malzemelerden oluşurken, artık doku oluşumunu yönlendiren indükleyici malzemelere doğru ilerlemiştir (15). Erişkin kök hücrelerin gerekli hormon ve kimyasallar kullanılarak farklı doku hücrelerine dönüşebildikleri gösterilmiştir (16). Bu noktadan hareketle vücutta diğer kaynaklara kıyasla çok daha fazla bulunan yağ kaynaklı kök hücreler kas doku mühendisliği çalışmalarında kullanılmaya başlanılmış ve miyojenik farklılaşma gösterebildikleri rapor edilmiştir (21). Biyouyumlu sentetik ve doğal polimerlerden üretilen taşıyıcılar, bu hücrelerle yüklenerek kas rejenerasyonunu, biyoaktif moleküller veya mekanik sinyaller yardımı ile gerçekleştirebilirler.

Çalışmamız, mekanik indüksiyonun, biyokimyasal indüksiyon yardımıyla, ASC hücrelerinin miyojenik farklılaşma yolağına yönlendirilebileceğini göstermesi açısından sonraki araştırmalarımız için motivasyon teşkil etmektedir. Bununla birlikte bu yöntem çeşitli limitasyonları aşmak adına optimize edilmelidir. ASC hücrelerinin miyojenik farklılaşma oranlarının artırılması ve kasılma işlevinin kazandırılabilmesi önemli parametrelerdir. Ayrıca, iskelet kas dokusunun rejenerasyonu tamamlanana kadar, taşıyıcının destek olabilmesini sağlama adına malzemenin yapısal ve mekanik özellikleri geliştirilmelidir.

KAYNAKLAR

1. Turner NJ, Badylak SF. Regeneration of skeletal muscle. *Cell Tissue Res.* 2012;759–74.
2. Quintero AJ, Wright VJ, Fu FH, Huard J. Stem Cells for the Treatment of Skeletal Muscle Injury. *Clin Sports Med.* 2009 Jan;28(1):1–11.
3. Scime A, Caron AZ, Grenier G. Regenerative Medicine Program and Center for Stem Cell and Gene Therapy, Ottawa Health Research Institute, 501 Smyth Road, Ottawa, Ontario, Canada, K1H 8L6, 2 Research Center on Aging, Faculty of Medicine, Department of Orthopedic Surgery, Universite de Sherbrooke, Quebec, Canada, J1H 4C3. 2009;3012–23.
4. Gümüřdereliođlu M. Doku Mühendisliği ve Ürünleri. *Bilim Tek.* 2010;71.
5. Cezar CA, Mooney DJ. Biomaterial-based delivery for skeletal muscle repair. *Adv Drug Deliv Rev.* 2015 Apr 28;84:188–97.
6. Tedesco FS, Cossu G. Stem cell therapies for muscle disorders. *Curr Opin Neurol.* 2012;597–603.
7. Qazi TH, Mooney DJ, Pumberger M, Geißler S, Duda GN. Biomaterials based strategies for skeletal muscle tissue engineering : Existing technologies and future trends. *Biomaterials.* 2015;53:502–21.
8. Carr LK, Steele D, Steele S, Wagner D, Pruchnic R, Jankowski R, et al. 1-year follow-up of autologous muscle-derived stem cell injection pilot study to treat stress urinary incontinence. *Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct.* 2008;
9. Brazelton TR, Nystrom M, Blau HM. Significant differences among skeletal muscles in the incorporation of bone marrow-derived cells. *Dev Biol.* 2003 Oct 1;262(1):64–74.
10. Bhagavati S, Xu W. Generation of skeletal muscle from transplanted embryonic stem cells in dystrophic mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005 Jul 29;333(2):644–9.
11. Ferrari G, Stornaiuolo A, Mavilio F. Bone-marrow transplantation: Failure to correct murine muscular dystrophy. *Nature.* 2001 Jun 28;411(6841):1014–5.
12. Muhamed J, Revi D, Joseph R, Anilkumar T. Phenotypic Modulation of Cell Types around Implanted Polyethylene Terephthalate Fabric in Rabbit Muscle. *Toxicol Pathol.* SAGE Publications; 2012 Sep 18;41(3):497–507.
13. Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science* (80-). 1993 May 14;260(5110):920 LP-926.

14. Tissue Engineering Process [Internet]. [cited 2017 Aug 22]. Available from: <http://www.stevensgroup.org/index.php/research/bioactive>
15. Grasman JM, Zayas MJ, Page RL, Pins GD. Acta Biomaterialia Biomimetic scaffolds for regeneration of volumetric muscle loss in skeletal muscle injuries. *Acta Biomater.* 2015;25:2–15.
16. Yilgor P, Tuzlakoglu K, Reis RL, Hasirci N, Hasirci V. Incorporation of a sequential BMP-2/BMP-7 delivery system into chitosan-based scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials.* 2009 Jul;30(21):3551–9.
17. Juhas M, Ye J, Bursac N. Design , evaluation , and application of engineered skeletal muscle. *METHODS.* 2015;
18. Bitto FF, Klumpp D, Lange C, Boos AM, Arkudas A, Bleiziffer O, et al. Myogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells in a Newly Developed Neurotised AV-Loop Model. 2013;2013.
19. Mesenchymal Stem Cell Isolation [Internet]. [cited 2017 Aug 22]. Available from: <https://stemcellthailand.org/mesenchymal-stem-cells-repair-factory/>
20. Dai R, Wang Z, Samanipour R, Koo K, Kim K. Adipose-Derived Stem Cells for Tissue Engineering and Regenerative Medicine Applications. 2016;2016.
21. Zuk PA, Ph D, Zhu MIN, Mizuno H, Benhaim P, Lorenz HP. Multilineage Cells from Human Adipose Tissue : Implications for Cell-Based Therapies. 2001;7(2):211–28.
22. Choi JS, Lee SJ, Christ GJ, Atala A, Yoo JJ. The influence of electrospun aligned poly(ϵ -caprolactone)/collagen nanofiber meshes on the formation of self-aligned skeletal muscle myotubes. *Biomaterials.* 2008 Jul;29(19):2899–906.
23. Sirivisoot S, Pareta R, Harrison BS. Protocol and cell responses in three-dimensional conductive collagen gel scaffolds with conductive polymer nanofibres for tissue regeneration. *Interface Focus.* 2013 Dec 20;4(1).
24. Nelson DM, Baraniak PR, Ma Z, Guan J, Mason NS, Wagner WR. Controlled release of IGF-1 and HGF from a biodegradable polyurethane scaffold. *Pharm Res.* 2011 Jun 23;28(6):1282–93.
25. Kamelger FS, Marksteiner R, Margreiter E, Klima G, Wechselberger G, Hering S, et al. A comparative study of three different biomaterials in the engineering of skeletal muscle using a rat animal model. *Biomaterials.* 2004;25(9):1649–55.
26. Kong H, Ph D, Mooney DJ, Ph D. Controlled Gel Stiffness and Degradation. *Tissue Eng.* 2007;13(7).
27. Borselli C, Storrie H, Benesch-Lee F, Shvartsman D, Cezar C, Lichtman JW, et al.

- Functional muscle regeneration with combined delivery of angiogenesis and myogenesis factors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Feb 23;107(8):3287–92.
28. Shvartsman D, Storrie-White H, Lee K, Kearney C, Brudno Y, Ho N, et al. Sustained Delivery of VEGF Maintains Innervation and Promotes Reperfusion in Ischemic Skeletal Muscles Via NGF/GDNF Signaling. *Mol Ther*. 2014 Jul 20;22(7):1243–53.
 29. Chattopadhyay S, Raines RT. Collagen-Based Biomaterials for Wound Healing. *Biopolymers*. 2014;1–42.
 30. Carnio S, Serena E, Rossi CA, De Coppi P, Elvassore N, Vitiello L. Three-dimensional porous scaffold allows long-term wild-type cell delivery in dystrophic muscle. *J Tissue Eng Regen Med*. 2011;5(1):1–10.
 31. van Wachem PB, Brouwer LA, van Luyn MJA. Absence of muscle regeneration after implantation of a collagen matrix seeded with myoblasts. *Biomaterials*. 1999;20(5):419–26.
 32. Kroehne V, Heschel I, Schügner F, Lasrich D, Bartsch JW, Jockusch H. Use of a novel collagen matrix with oriented pore structure for muscle cell differentiation in cell culture and in grafts. *J Cell Mol Med*. 2008 Sep 11;12(5a):1640–8.
 33. Wang L, Cao L, Shansky J, Wang Z, Mooney D, Vandenberg H. Minimally Invasive Approach to the Repair of Injured Skeletal Muscle With a Shape-memory Scaffold. *Mol Ther*. 2014 Aug 3;22(8):1441–9.
 34. Ko IK, Lee SJ, Atala A, Yoo JJ. In situ tissue regeneration through host stem cell recruitment. *Exp & Mol Med*. 2013;45(11):e57-11.
 35. Borschel GH, Dow DE, Dennis RG, Brown DL. Tissue-Engineered Axially Vascularized Contractile Skeletal Muscle. :2235–42.
 36. Page RL, Ph D, Malcuit C, Ph D, Vilner L, Vojtic I, et al. Restoration of Skeletal Muscle Defects with Adult Human Cells Delivered on Fibrin Microthreads. *Tissue Eng*. 2011;17:2629–40.
 37. Lesman A, Koffler J, Atlas R, Blinder YJ, Kam Z, Levenberg S. Engineering vessel-like networks within multicellular fibrin-based constructs. *Biomaterials*. 2011 Nov;32(31):7856–69.
 38. Cram EJ. Mechanotransduction in *C. elegans* Morphogenesis and Tissue Function. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2014;126:281–316.
 39. Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, Discher DE. Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification. *Cell*. 2006;126(4):677–89.
 40. Clarke SF. Mechanical load induces sarcoplasmic wounding and FGF release in

- differentiated human skeletal muscle cultures. *J Fed Am Soc Exp Biol.* 1996;10(4):502–9.
41. Lin C-S, Xin Z-C, Dai J, Lue TF. Commonly Used Mesenchymal Stem Cell Markers and Tracking Labels: Limitations and Challenges. *Histol Histopathol.* 2013 Sep 16;28(9):1109–16.
 42. Yoshimura K, Shigeura T, Matsumoto D, Sato T, Takaki Y, Aiba-Kojima E, et al. Characterization of freshly isolated and cultured cells derived from the fatty and fluid portions of liposuction aspirates. *J Cell Physiol.* 2006;208(1):64–76.
 43. Bruekers SMC, Jaspers M, Hendriks JMA, Kurniawan NA, Koenderink GH, Kouwer PHJ, et al. Fibrin-fiber architecture influences cell spreading and differentiation. *Cell Adh Migr.* 2016 Feb 24;10(5):495–504.
 44. Riboldi SA, Sadr N, Pignini L, Neuenschwander P, Simonet M, Mognol P, et al. Skeletal myogenesis on highly orientated microfibrillar polyesterurethane scaffolds. *J Biomed Mater Res.* 2007;
 45. Madden L, Juhas M, Kraus WE, Truskey GA, Bursac N. Bioengineered human myobundles mimic clinical responses of skeletal muscle to drugs. *Elife.* 2015 Jan 9;4:e04885.
 46. Huri PY, Cook CA, Hutton DL, Goh BC, Gimble JM, DiGirolamo DJ, et al. Biophysical cues enhance myogenesis of human adipose derived stem/stromal cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013 Aug 16;438(1):180–5.
 47. Huard J, Li Y, Fu FH. Muscle Injuries and Repair: Current Trends in Research. *J Bone Jt Surg.* 2002 May 1;84(5):822 LP-832.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Emre Ergene

Doğum Yeri: Eskişehir

Doğum Tarihi: 23.01.1988

Medeni Hali: Bekar

Yabancı Dili: İngilizce

Eğitim Durumu

Lise: Eskişehir Kılıçoğlu Anadolu Lisesi (2002-2006)

Lisans: Anadolu Üniversitesi Mühendislik-Mimarlık Fakültesi Malzeme Bilimi ve Mühendisliği (2007-2012)

Anadolu Üniversitesi İşletme Fakültesi İşletme (2008-2013)

İş Tecrübesi

Kurumu: T.C. Ziraat Bankası, Bursa

Görevi: Mali Analiz ve İstihbarat Uzman Yardımcısı

Yılları: Ocak 2013 - Nisan 2014

Kurumu: T.C. Maliye Bakanlığı, Kahramanmaraş

Görevi: Vergi Müfettiş Yardımcısı

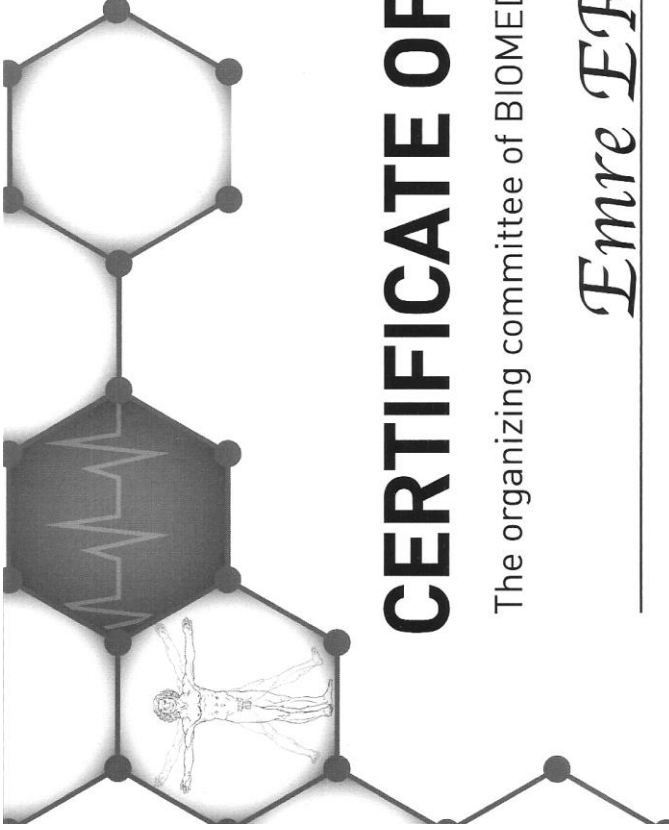
Yılları: Temmuz 2014 - Ekim 2015

TEZ KAYNAKLI YAYINLAR

1. Poster: Ergene E, Malikmammadov E, Yılğör Huri P, Hasırcı V. Cellular Alignment Enhance the Mechanical Properties of ASC Laden Fibrin Microfibers, 22nd International Biomedical Science and Technology Symposium (BIOMED 2017), Ankara, Turkey, May 12-14, 2017.

2. Sözlü Sunum: Ergene E, Sezlev Bilecen D, Ermis Sen M, Yilgor Huri P, Hasirci V. 3D Cellular Alignment Enhance ASC Myogenesis for Skeletal Muscle Tissue Engineering. 28th Annual Conference of the European Society for Biomaterials (ESB 2017), Athens, Greece, September 4-8, 2017.





BIOMED2017

**22ND INTERNATIONAL BIOMEDICAL
SCIENCE & TECHNOLOGY SYMPOSIUM**

12-14 MAY 2017 - ANKARA | TURKEY

CERTIFICATE OF ATTENDANCE

The organizing committee of BIOMED 2017 certifies the attendance of

Emre ERGENE

held at Anadolu Downtown Hotel, Ankara, Türkiye
on 12th-14th of May 2017.

Prof.Dr. Y. Murat ELÇİN
Chair, BIOMED 2017

Organised By

BIOVALDA

www.biomed2017.org

Cellular Alignment Enhances the Mechanical Properties of ASC Laden Fibrin Microfibers

Emre Ergene^{1,2}, Elbay Malikmammadov^{2,5}, Pinar Yılmaz Huri^{2,3}, Vasif Hasırcı^{2,4,5}

eergene@ankara.edu.tr



¹Biotechnology Institute, Ankara University, Ankara, Turkey
²BIOMATEN, METU Center of Excellence in Biomaterials and Tissue Engineering, Ankara, Turkey
³Department of Biomedical Engineering, Ankara University, Ankara, Turkey
⁴METU Departments of Biological Sciences and ⁵Biotechnology, Ankara, Turkey



Introduction

The importance of biomimetic scaffolds, both in terms of architecture and mechanical properties, have long been appreciated in tissue engineering strategy. Skeletal muscle is an aligned tissue with a stiffness of ca. 12 kPa [1]. The importance of mimicking the cellular alignment and substrate stiffness in the production of functional engineered skeletal muscle has been shown in 2D cultures through enhanced myoblast fusion [2, 3]. In our study, we encapsulated human adipose-derived stem cells (ASCs) in 3D fibrin microfibers for differentiation into myoblasts by biochemical and biomechanical induction. We investigated the effect of fiber alignment and loading on the cellular behavior and mechanical properties of the constructs with the intention of obtaining a suitable 3D tissue engineered skeletal muscle.

Methods

Human ASCs were isolated from abdominal lipoaspirates and were encapsulated within wet spun fibrin microfibers at a density of 1250 cells/ μ L. Fibrous constructs were either cultured free floating within the media (**random**) or were wrapped around frames by the application of uniaxial tension through stretch (**aligned**) (Fig 1 a, b). Acellular fibers produced using identical conditions were used as controls.

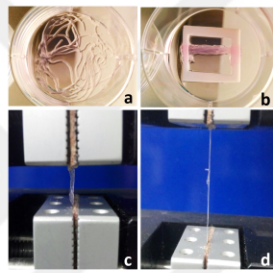


Figure 1. (a) Random, and (b) aligned fibers in culture. (c, d) Tensile tests were conducted to assess fiber stiffness.

Culture was continued for 21 days within DMEM supplemented with 10% FBS and 1% antibiotics. Cellular viability was assessed using LIVE/DEAD® assay, imaged using CLSM (Leica, Germany) and was quantified by alamarBlue® assay (ThermoFisher, USA) throughout the culture. Fiber stiffness or Young's Modulus was determined from the linear portion of the stress-strain curves obtained from tensile testing of the fibers (L: 10 mm, D: 0.4 mm) on a universal testing machine (Shimadzu, Japan) (Fig. 1 c, d).

Results and Discussion

ASCs oriented parallel to the fiber axis within aligned fibers on Days 7, 14 and 21; while no cellular alignment and orientation was observed on the random fibers at these time points (Fig. 2). Cells induced biochemically for myogenesis proliferated more within random fibers as compared to aligned, probably indicating higher rate of differentiation in the latter case (ongoing study) (Fig. 3).

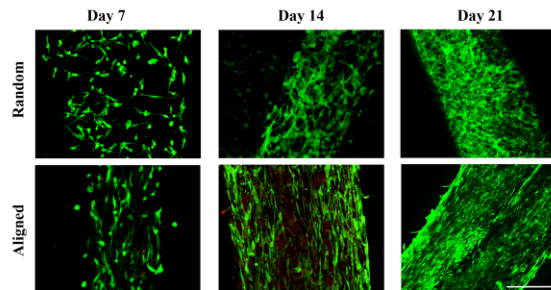


Figure 2. ASC alignment within fibrin fibers. In aligned fibers, cells align parallel to the fiber axis while they distribute freely within random fibers on Days 7-21. Green: Calcein AM staining for live cells, Red: EthD-1 staining for dead cells. Scale bar: 250 μ m.

Mechanical tests revealed that cells enhance the stiffness of the fibrin fibers, and a further increase was observed when the cells were aligned (Fig. 4). The loss of stiffness of acellular fibers within cell culture environment is recapitulated by the presence and specifically, by the alignment of the cells within the fibers.

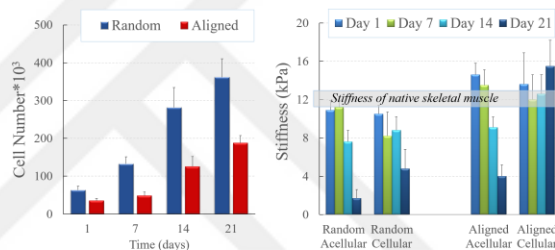


Figure 3. Viable cell number within random and aligned fibrin fibers during 21 days of culture. Cells proliferated more within random fibers when biochemically induced for myogenic differentiation.

Figure 4. Stiffness of tensile tested fibers. Random fibers exhibited less stiffness compared to aligned, while fibers housing aligned cells maintained the mechanical properties necessary to withstand the forces in the skeletal muscle microenvironment.

Conclusion

In parallel fibers, ASCs aligned along the axis and preserved this organization for 21 days. Fibers with cells were stiffer than fibers without cells, and cellular alignment contributed to fiber stiffness.

References

- Huard J., et. al., Journal of Bone and Joint Surgery American (2002) 84: 822-832.
- Choi YS., et. al., Biomaterials (2012) 33: 6943-6951.
- Tanaka T., Aramaki H.N., International Journal of Tissue Engineering (2014) ID 621529.

We gratefully acknowledge the support of TUBITAK through project 214M160.

BIOMED 2017

22nd International Biomedical Science & Technology Symposium
 12-14 May 2017 - Ankara - Turkey