

ANKARA ÜNİVERSİTESİ

BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**TROMBOSİTTEN ZENGİN PLAZMA (TZP) KAYNAKLI FİBRİN MİKROKÜRELERİN
ÜRETİMİ VE DOKU MÜHENDİSLİĞİNDE KULLANIMI**

Özge LALEGÜL

Danışman Öğretim Üyesi

Prof. Dr. Y. Murat ELÇİN

ANKARA

2013

Her Hakkı Saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

TROMBOSİTTEN ZENGİN PLAZMA (TZP) KAYNAKLI FİBRİN MİKROKÜRELERİN ÜRETİMİ VE DOKU MÜHENDİSLİĞİNDE KULLANIMI

Özge LALEGÜL

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

Danışman: Prof. Dr. Y. Murat ELÇİN

Üç boyutlu işlevsel bir iskele yardımıyla rejeneratif kök hücrelerin hasarlı vücut bölgesine iletimini sağlayan doku mühendisliği yaklaşımı travmatik kas doku kaybının tedavisi için potansiyel taşımaktadır. Bu çalışmada, sıçan kemik iliği mezenkimal kök hücreleri (Kİ-MKH) sağlıklı sıçanların tam kanındaki trombositten zengin plazma (TZP) ile trombositten fakir plazma (TFP)'dan elde edilen fibrin malzeme ve alginat içeren mikroküreler içerisine iyonotropik jelleşmeyle ayrı ayrı enkapsüle edildi (TPE 2012/01068). Alginat içermeyen fibrin mikroküreler sodyum sitrat tamponu ile alginatın uzaklaştırılması yoluyla elde edildi. Kİ-MKH enkapsüle edilmiş fibrin mikrokürelerin *in vitro* karakterizasyonu FT-IR, SEM, MTT ve ELISA gibi yöntemlerle gerçekleştirildi. Mikrokürelerin *in vivo* rejeneratif ve anjiyogenik özellikleri Wistar soyu sıçanlarda oluşturulan bir kas yara modelinde incelendi. Bu amaçla, herbir sıçanın biceps femoris (her iki taraf) kasında 4x5x6 mm³ boyutunda kas dokusu çıkarılarak yaralar oluşturuldu. Ardından, Kİ-MKH içeren ve içermeyen, TZP veya TFP kaynaklı fibrin mikroküreler bu yara bölgesine ayrı ayrı yerleştirilip denekler takibe alındı. Transplantların doku uyumluluğunun yanı sıra rejeneratif ve anjiyogenik etkileri, nakil sonrası 7. ve 14. günlerde eksplante edilen örnekler üzerinde histolojik olarak incelendi. Sonuçlar, her iki tür mikrokürenin doku uyumu gösterdiğini, ancak Kİ-MKH içeren TZP kaynaklı fibrin mikrokürelerin, hücresiz gruplara ve TFP mikrokürelerine göre yaralı kas bölgesinde yeniden damarlaşma ve doku rejenerasyonu bakımından üstünlüğünü ortaya koydu.

Ocak 2013, 80 sayfa

Anahtar Kelimeler: Trombositten zengin plazma, Doku mühendisliği, Fibrin, Enkapsülasyon, Mikroküre, Mezenkimal kök hücreler, İskelet kası rejenerasyonu, Rejeneratif tıp.

ABSTRACT

Master Thesis

FABRICATION OF FIBRIN MICROBEADS OBTAINED FROM PLATELET RICH PLASMA (PRP) AND THEIR USE IN TISSUE ENGINEERING

Özge LALEGÜL

Ankara University Biotechnology Institute

Supervisor: Prof. Dr. Y. Murat ELÇİN

Tissue engineering approach can be considered as a useful approach to treat traumatic skeletal muscle loss by providing an adequate method to deliver regenerative stem cells through a functional three-dimensional scaffold. In this work, rat bone marrow mesenchymal stem cells (BM-MSCs) were encapsulated in alginate and fibrin microbeads (FMBs) derived either from the platelet rich plasma (PRP) or platelet poor plasma (PPP) of rat whole blood samples of healthy rats via ionotropic gelation (TPE 2012/01068). Pure fibrin microbeads were obtained by removing alginate using sodium citrate buffer. *In vitro* characterisation of FMBs containing BM-MSCs was evaluated by using methods such as, FT-IR, SEM, MTT and ELISA. The regenerative and angiogenic capacity of the microbeads was evaluated in a Wistar rat muscle injury model. For this purpose, a 4x5x6 mm³-size muscle tissue was removed from the biceps femoris of each rat (both sides). Then, bare or BM-MSCs-containing fibrin microbeads from either PRP or PPP were placed inside the defects and followed. Apart from tissue compatibility, the regenerative and angiogenic effect of the transplants were evaluated on specimens retrieved at 7 and 14 days post-transplantation using histology. Findings supported the notion that while both types of microbeads were histocompatible, BM-MSCs containing fibrin microbeads made up of PRP was superior to that of empty microbead-, and to PPP microbead-transplanted groups.

January 2013, 80 pages

Keywords: Platelet rich plasma, Tissue engineering, Fibrin, Encapsulation, Microbead, Mesenchymal stem cells, Skeletal muscle regeneration, Regenerative medicine.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans kapsamında tüm çalışmalarımı yönlendiren, araştırmalarımın her aşamasında bilgi, öneri ve yardımlarını esirgemeyerek bana yol gösteren danışman hocam Sayın Prof. Dr. Y. Murat ELÇİN'e (Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya ABD),

Yaptıkları katkı ve harcadıkları zamandan dolayı tez jüri üyeleri Sayın Prof. Dr. Günhan GÜRMAN ve Doç. Dr. Hilal ÖZDAĞ'a

Histokimya çalışmalarındaki yardımları için Sayın Prof. Dr. A. Eser ELÇİN'e (Gazi Üniversitesi Gazi Eğitim Fakültesi),

Tez çalışmam sırasında bilgisini, önerilerini ve yardımlarını esirgemeyen değerli hocam Dr. Şükran ŞEKER'e,

Yüksek lisans eğitimim boyunca bana her konuda yardımcı olan Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Eğitim Programları Ofisi'nden Sayın Asuman ERZİNCAN' a,

Ayrıca tüm bu süreç boyunca manevi destek sağlayan Erdoğan ÜLKER, Buket ÖZTAŞ, Gizem ATA, Esra BAYKAN, Bermali DEMİRDÖGEN ve tüm laboratuvar arkadaşlarıma,

Ve hayatım boyunca her alanda maddi ve manevi desteğini esirgemeyen babam Kemal LALEGÜL ve annem Sevim LALEGÜL'e göstermiş oldukları sabır, anlayış ve fedakârlıklardan dolayı sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Özge LALEGÜL

Ankara, Ocak 2013

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
SİMGELER DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER	5
2.1 İskelet Kası	5
2.1.1 İskelet kasının anatomisi	5
2.1.2 İskelet kasının kasılma elemanları	6
2.1.3 İskelet kasının kasılma mekanizması	8
2.1.4 İskelet kasının metabolizması	10
2.1.5 İskelet kası iyileşmesinin biyolojik süreçleri	10
2.1.5.1 İskelet kası iyileşmesinde görevli büyüme faktörleri	10
2.2 Doku Mühendisliği	14
2.2.1 Kas doku mühendisliği ve kullanılan biyomalzemeler	20
2.2.3.1 Trombositten zengin plazma	22
2.2.3.2 Fibrin	28
2.2.3.2 Alginat	33
3. MATERYAL ve YÖNTEM	34
3.1 Materyal	34
3.2 Yöntem	35
3.2.1 Fibrin mikrokürelerin oluşturulması	35
3.2.2 <i>In vitro</i> hücre kültürü çalışmaları	38
3.2.2.1 Sıçan Kİ-MKH'lerinin izolasyonu	38
3.2.2.2 Hücre kültürü	39
3.2.3. <i>In vivo</i> çalışmalar	39
3.2.3.1 <i>In vivo</i> yara modelinin oluşturulması	39
3.2.3.2. Fibrin mikrokürelerin transplantasyonu	40
3.2.3.3 Eksplantasyon işlemi	40
3.2.4. Histokimyasal analizler	41

3.2.4.1 Hematoksilin ve eozin boyaması (H&E).....	41
3.2.4.2 Masson-trikrom boyaması	42
3.2.4.3 Periodik asit schiff (PAS) boyaması.....	43
3.2.5 Taramalı elektron mikroskopisi (SEM).....	43
3.2.6 MTT analizi.....	44
3.2.7 Fourier Dönüşüm Kızılötesi (FT-IR) analizi.....	44
3.2.8 Enzim Bağlı Immünosorbent Analizi (ELISA).....	45
3.2.9 Fibrin mikrokürelerin su tutma kapasitesinin belirlenmesi	46
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	47
4.1 <i>In Vitro</i> Bulgular	47
4.1.1 Faz kontrast mikroskobu bulguları.....	47
4.1.2. SEM bulguları	52
4.1.3. MTT bulguları	54
4.1.4 FT-IR bulguları.....	55
4.1.5 ELISA bulguları	57
4.1.6 Fibrin mikrokürelerin su tutma deneyi bulguları.....	58
4.2 <i>In Vivo</i> Bulgular	59
4.2.1 Histokimya bulguları.....	59
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	67
KAYNAKLAR.....	74
ÖZGEÇMİŞ	80

SİMGELER DİZİNİ

Kİ-MKH	Kemik iliği mezenkimal kök hücre
TZP	Trombositten zengin plazma
TFP	Trombositten fakir plazma
FBS	Fetal sığır serumu
EDTA	Etilen diammin tetraasetik asit
H&E	Hematoksin-eozin
MTT	[3-(4,5-dimetildiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür]
PAS	Periyodik asit Schiff
PBS	Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
SEM	Taramalı elektron mikroskopisi
ELISA	Enzim bağlı immünosorbent analizi
FT-IR	Fourier dönüşüm kızılötesi spektroskopisi
MT	Masson-Trikrom
DM	Doku mühendisliği

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1 Çalışmanın akış şeması	4
Şekil 2.1 İskelet kasının yapısal düzenlenmesi	5
Şekil 2.2 İskelet kasının yapısal katmanları	6
Şekil 2.3 Miyofibril yapısının şematik gösterimi	7
Şekil 2.4 Sarkomer yapısının şematik gösterimi	8
Şekil 2.5 Sarkomer yapısının şematik gösterimi	8
Şekil 2.6 Sarkomer yapısının şematik gösterimi	9
Şekil 2.7 Transplantasyon tiplerinin şematik gösterilişi	15
Şekil 2.8 Doku mühendisliği yaklaşımı	16
Şekil 2.9 Düzenlenmiş ve düzenlenmemiş kas yenilenmesinde TGF- β 1' in rolü	24
Şekil 2.10 Fibrinojen/trombin etkileşimi ile fibrin jel oluşumu	33
Şekil 3.1 TZP eldesinin basamakları	35
Şekil 3.2 (A) Hüresiz liyofilize TZP-alginat, (B) Hüresiz liyofilize TFP-alginat	37
Şekil 3.3 (A) Hüresiz liyofilize TZP, (B) Hüresiz liyofilize TFP	38
Şekil 3.4 (A) Kİ-MKH kültür işlemi, (B) faz-kontrast mikroskobu görüntüsü.	39
Şekil 3.5 <i>In vivo</i> implantasyon çalışmaları (A) Her bir sıçanın biceps femoris kasında bir defekt oluşturuldu. (B) Fibrin mikroküreler sıçanda oluşturulan yaralı bölgeye transplante edildi.	40
Şekil 3.6 Enzim Bağlı Immünosorbent Analizi basamakları	46
Şekil 4.1 (A) Sıçan Kİ-MKH'lerinin 1. pasajdan hemen önce (8. gün), (B) 2. pasajdan hemen önce (8. gün) elde edilen faz kontrast mikroskobu görüntüleri. Ölçek çubuğu: 150 μ m	47
Şekil 4.2 Kİ-MKH'lerini içeren TZP kaynaklı fibrin mikrokürenin faz-kontrast görüntüsü. Ölçek çubuğu: 500 μ m	48
Şekil 4.3 Kİ-MKH'lerini içeren TFP kaynaklı fibrin mikrokürenin faz-kontrast görüntüsü. Ölçek çubuğu: 500 μ m	49

Şekil 4.4 Kİ-MKH'lerini içermeyen TZP kaynaklı fibrin mikrokürenin faz-kontrast görüntüsü. Ölçek çubuğu: 500 μ m.....	50
Şekil 4.5 Kİ-MKH'lerini içermeyen TFP kaynaklı fibrin mikrokürenin faz-kontrast görüntüsü. Ölçek çubuğu: 500 μ m.....	51
Şekil 4.6 Fibrin mikrokürenin SEM görüntüsü	52
Şekil 4.7 (A) Fibrin mikrokürenin enine kesit görüntüsü, (B) enine kesitin daha yüksek büyütmedeki görüntüsü.....	53
Şekil 4.8 TZP ve TFP kaynaklı fibrin mikroküreler içerisine enkapsüle edilmiş Kİ- MKH'lerinin kültürün belirli zaman noktalarında MTT ile belirlenen hücre canlılığı	54
Şekil 4.9 Sodyum Alginat'ın FT-IR spektrumu	55
Şekil 4.10 (A) TZP kaynaklı fibrin mikrokürelerin FT-IR analizi, (B) TZP kaynaklı fibrin- alginat mikrokürelerin FT-IR spektrumları	56
Şekil 4.11 (A) TFP kaynaklı fibrin mikrokürelerin FT-IR analizi, (B) Sitratsız TFP kaynaklı fibrin-alginat mikrokürelerin FT-IR spektrumları	57
Şekil 4.12 Fibrin mikrokürelerin su tutma kapasitesi	58
Şekil 4.13 Belirli zaman noktalarında kontrol olarak eksplante edilen örneklerin PAS boyamaları. (A) Kontrol, 7. gün; (B) kontrol 28. gün.	59
Şekil 4.14 TFP kaynaklı hücreli fibrin mikroküre grubundan belirli zaman noktalarında eksplante edilen örneklerin PAS boyamaları. (A) Hüresiz TFP, 7. gün; (B) Hüresiz TFP, 28. gün; (C) Hücreli TFP, 7. gün; (D) Hücreli TFP, 28. gün	60
Şekil 4.15 TZP kaynaklı hücreli fibrin mikroküre grubundan belirli zaman noktalarında eksplante edilen örneklerin PAS boyamaları. (A) Hüresiz TZP, 7. gün; (B) Hüresiz TZP, 28. gün (C) Hücreli TZP, 7. gün (D) Hücreli TZP, 28 gün. (Üçgenler yeni oluşan kapilerleri işaret etmektedir.).....	61
Şekil 4.16 TZP kaynaklı hücreli fibrin mikroküre grubundan 4. günde eksplante edilen örneklerin H&E boyamaları. (A) Kontrol, (B) Hücreli TZP, (C) Hüresiz TZP	62
Şekil 4.17 TZP kaynaklı hücreli fibrin mikroküre grubundan 7. günde eksplante edilen örneklerin H&E boyamaları. (A) Kontrol, (B) Hücreli TZP, (C) Hüresiz TZP	63

- Şekil 4.18 TZP kaynaklı hücreli fibrin mikroküre grubundan 14. günde eksplante edilen örneklerin H&E boyamaları. (A) Kontrol, (B) Hücreli TZP, (C) Hücesiz TZP, (D) Hücreli TFP, (E) Hücesiz TFP 64
- Şekil 4.19 TFP kaynaklı olarak oluşturulan hücreli fibrin mikroküre grubundan 7. ve 14. günde eksplante edilen örneklerin H&E boyamaları 65
- Şekil 4.20 TFP kaynaklı olarak oluşturulan hücreli fibrin mikroküre grubundan 4., 7. ve 14. günde eksplante edilen örneklerin MT boyamaları (200µm ve 100µm) 66

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Çeşitli büyüme faktörlerinin miyoblastlar üzerindeki *in vitro* etkisi 12

Çizelge 2.2 Doku mühendisliğinde kullanılan bazı iskele malzemeleri 18

1. GİRİŞ

Travmatik iskelet kası yaralanmaları uzun dönemli ciddi ağrılara ve fonksiyon bozukluklarına neden olmakta ve dünya genelinde yüz milyonlarca kişiyi etkilemektedir. Kas yaralanmalarının %55'inden fazlasını spor yaralanmaları oluşturur. Sporla ilişkili tüm yaralanmaların %90'ından fazlasını oluşturan gerilmeler ve ezilmeler sık rastlanan kas lezyonlarıdır. Bu kas lezyonları yırtılma, ezilme ve gerilmeleri içermektedir. Ağrılı ezilmeler ve kas atrofisini içeren hastalıklar, uzun süreli hareket kaybı ve tekrarlayan yaralanma riskinin artmasına neden olabilir. Özellikle kas dokusunda bölgesel bir eksilmeye neden olan bazı olaylar (kesilme, trafik kazaları, savaşlar, maden göçükleri, doğal ve insanların yol açtığı suni felaketler) travmatik iskelet kası yaralanmaları ile ilişkilidir. Bu tür kas hasarlarının tedavisinde, ilaç tedavisi tipik olarak steroid olmayan anti-inflamatuar ilaçları (nonsteroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs) ve intramüsküler kortikosteroidleri içerir. Cerrahi yöntem ise sadece belirli kas hastalıklarında ya da yaralanmalarında uygulanır (Longo vd. 2012).

Kas dokusu kendi kendini yenileyebilme özelliğine sahiptir. Ancak bazı durumlarda hasarın boyutuna bağlı olarak iyileşme süreci uzayabilir ve hatta kas dokusu kendini yenileyemez hale gelebilir. Mevcut tedavi yöntemlerinin tatmin edici bir iyileşme sağlayamadığı durumlarda kas yaralanmaları için daha etkin stratejiler sunabilen yeni biyolojik tedavi yöntemlerine ilgi gösterilmeye başlanmıştır. Biyolojik tedaviler, hücre tedavisi, doku mühendisliği ve büyüme faktörlerinin kontrolünü içermektedir.

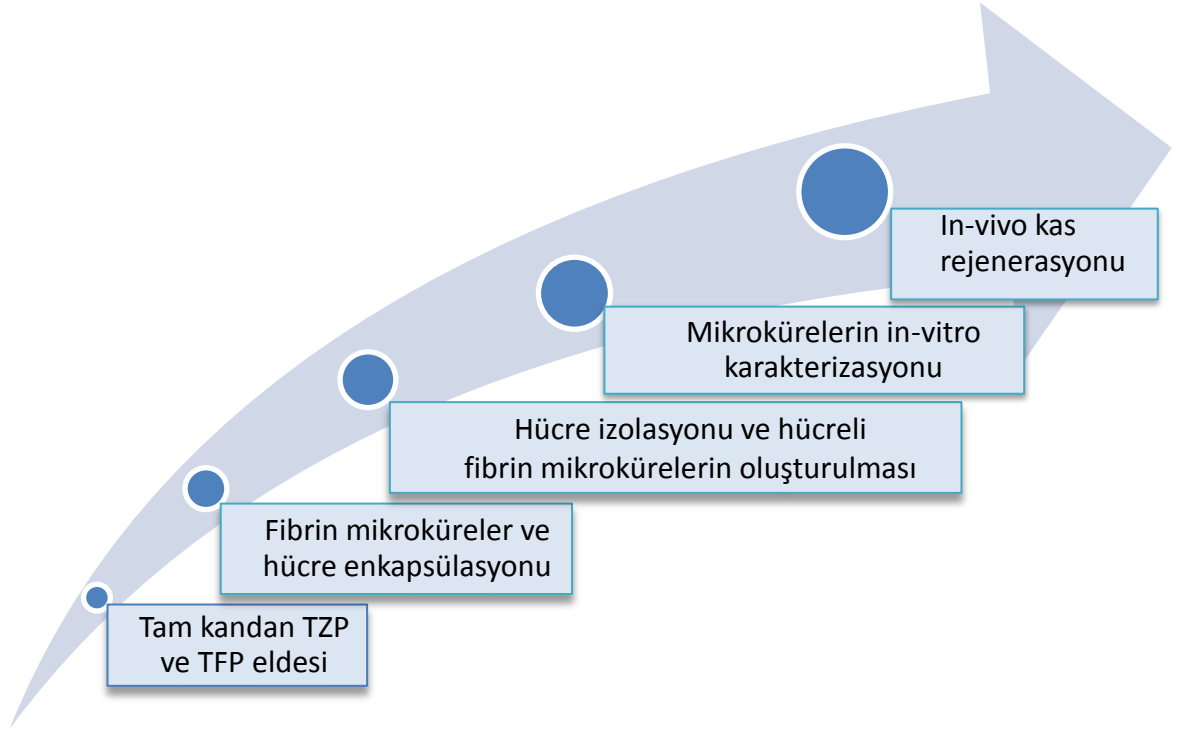
İskelet kasında doku mühendisliği yaklaşımı, ağır hasarlardan sonra oluşan geniş doku kaybı bölgelerine eşdeğer bir biyolojik alternatif potansiyeli sunmaktadır. *In vitro* iskelet kası doku mühendisliğinde yetişkin kas dokusundan elde edilen kök hücreler, bir hücre-biyomalzeme yapısı oluşturmak için üç boyutlu bir iskeleye ekilir. Kök hücrelerin farklılaşmasından sonra, yeni oluşan doku grefti hasarlı bölgeye transplante edilebilir. Verimli bir iskelet kası yenilenmesi, iskele yapımında kullanılan biyomalzemenin özelliği ve iskeleye ekilen hücrelerin rejenerasyon potansiyeli ile doğrudan ilişkilidir. Kas doku mühendisliği için iskele eğilebilir ve esneyebilir olmalıdır. Aynı zamanda kullanılan iskele biyoyumlu ve biyobozunur özellikte olmalıdır.

Biyoyumluluk kasta biyomalzeme ilişkili immün yanıtı ve toksisiteyi önlemek için önemlidir. Biyobozunurluk ise iskeletin yeni oluşan kas dokusu ile kademeli olarak yerdeğiştirmesine olanak sağlar. İskele yapımında kullanılan bu tür biyomalzemeler doğal ya da sentetik olabilirler. Sentetik biyomalzemelerin düşük maliyet, uzun ömürlü olmaları ve toksik olmamaları gibi avantajlarına karşın doğal biyomalzemeler içerdikleri kas dokusundaki yara iyileşme basamaklarını tetikleyici biyolojik moleküllerden ve iyi biyobozunma özelliklerinden dolayı iyileşme sürecinde daha etkili olabilmektedirler. Ayrıca iskele, büyüme faktörlerinin, plazmitlerin, ilaçların ya da diğer uyarıların kontrollü iletimini sağlayarak molekülleri ya da hücreleri entegre edebilmelidir. İskelet kası doku mühendisliğinde biyomalzemeler, hasarlı dokunun yenilenmesi ve/veya tamiri için hücre canlılığı, çoğalması ve/veya farklılaşmasını sağlayarak miyojenik süreci desteklemelidir.

Kas rejenerasyonunu sağlamak amacıyla doku mühendisliği yaklaşımları için hem sentetik hem de doğal iskeleler kullanılmaktadır. Polilaktik-ko-glikolik asit (PLGA) uygun sertlik ve bağlantı gösteren, kas doku mühendisliğinde kullanılan, sentetik biyobozunur bir polimerdir. PLGA'nın, kas fiberlerinin yeniden düzenlenmesini sağlayarak miyotüplerin düzenlenmesi ve miyoblastların hizalanmasına izin verdiği bilinmektedir. Kas rejenerasyonunda doğal biyobozunur biyomalzemeler kullanılarak farklı üç boyutlu iskeleler geliştirilmiştir. Gözenekli kollajen iskeleler iskelet kasının üç boyutlu yapısını oluşturmak amacıyla kullanılmıştır (Kroehne vd. 2008). Bu iskeleler gözenek yapısının yönüne göre çok-çekirdekli miyotüplerin hizalanmasıyla iskelet kası benzeri doku rejenerasyonunu teşvik etme yeteneği göstermiştir (Yan vd. 2007).

Diğer bir doğal malzemeye dayalı iskele ise kök hücrelerin ya da mezenkimal progenitor hücrelerin iletimini sağlamak için kullanılan hiyalüronan-temelli hidrojeldir. Kök hücre-hidrojel yapısının kullanılmasıyla, mezenkimal progenitor hücre-hidrojel ya da hücre-siz hidrojel yapılarına oranla miyofiber sayısının daha fazla olduğu dolayısıyla rejenerasyon sürecinin daha iyiye gittiği gösterilmiştir. Ayrıca, kök hücrelerin hasarlı kas dokusuna iletildiğinde bölgede, nöral ve vasküler ağlar ile ilişki olan fonksiyonel bir kök hücre nişinin varlığı gösterilmiştir (Rossi vd. 2011).

hücrelerin canlılığı ve çoğalması MTT [3-(4,5-dimetildiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür] yöntemi kullanılarak ve histokimyasal olarak edilmştir. TZIP kaynaklı fibrin mikrokürelerin yapısında bulunan büyüme faktörlerinin (TGF- β 1, PDGF, VEGF) miktarları, Enzim Bağlı Immünosorbent Analizi (ELISA) ile incelenmiştir. Elde edilen bulgular, bu büyüme faktörlerinin TZIP kaynaklı fibrin mikrokürelere salındığını göstermiştir (Şekil 1.1).



Şekil 1.1 Çalışmanın akış şeması

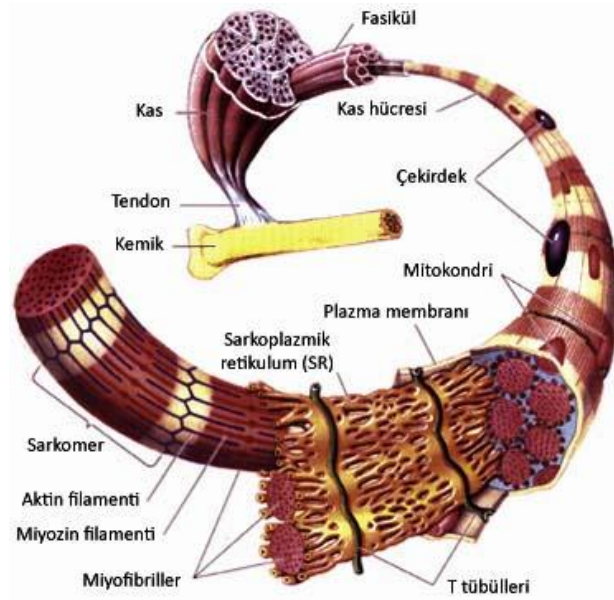
Kİ-MKH'leri içeren ve içermeyen fibrin mikrokürelere sıçanlarda oluşturulan travmatik kas defekti modelindeki etkinliğinin belirlenmesi amacıyla *in vivo* çalışmalar yürütülmüştür. İyileşme süreci histokimyasal çalışmalarla incelenmiştir. Belirli zaman noktalarında alınan örneklerin histokimyasal analizi sonucunda fibrin mikrokürelere konak dokuda dikkat çekici bir immün reaksiyona yol açmadığı ve konak dokuya uyum sağladığı belirlendi. Sonuçlar genelde fibrin mikrokürelere, ancak özellikle Kİ-MKH enkapsüle edilmiş TZIP kaynaklı fibrin mikrokürelere, defektli bölgedeki doku yenilenmesini, kontrol deneklere göre dikkat çekici düzeyde hızlandırdığını ve neovaskülarizasyonu tetiklediğini göstermektedir.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1 İskelet Kası

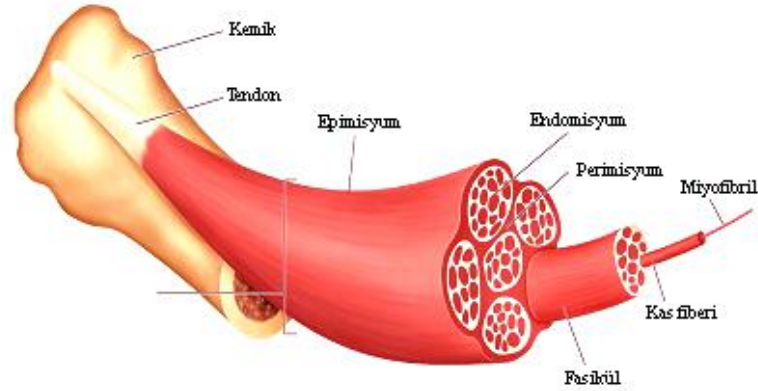
2.1.1 İskelet kasının anatomisi

İskelet sistemini oluşturan ve kemik dokusunun hareketini sağlayan iskelet kası, morfolojik ve fonksiyonel özelliklerine göre memelilerde bulunan üç kas tipinden birisidir. Enine çizgilenme gösteren iskelet kası organize sinir ve kan damarı ağları, kas hücreleri ve hücre dışı bağ doku matriksini içeren karmaşık bir yapıdır. İskelet kasının en temel yapısal bileşenine miyofibril adı verilir. Kas hücresi diğer hücrelerden farklı olarak uzun ve iğ şeklindedir, yapısında miyofibriller bulunur. Kas hücresi sarkolemma adı verilen hücre membranı ile çevrilidir ve birçok ince kollajen fibril içeren bir polisakkarit tabakasından meydana gelmiş dış kılıftan oluşmaktadır. Kas lifinin ucunda, sarkolemmannın yüzeyinde bulunan bu polisakkarit tabaka, bir tendon lifiyle kaynaşır. Tendon lifleri demetler halinde birleşerek kas tendonunu oluştururlar ve kemiğe yapışırlar (Guyton vd. 2001). Kas ve kas liflerinin yapısı Şekil 2.1’de gösterilmektedir.



Şekil 2.1 İskelet kasının yapısal düzenlenmesi
(<http://thesportsscienceundergrad.wordpress.com>)

Kasın tamamı ve kası oluşturan alt birimlerden fasiküller ile kas fibrilleri fasya adı verilen bir bağ dokusu ile örtülüdür ve bu bağ doku birkaç katmandan oluşur. Kalın kas demetleri en dıştan epimisyum, daha küçükleri perimisyum ve her bir kas lifi de endomisyum denen bağ dokusu kılıfıyla çevrilidir (Şekil 2.2).



Şekil 2.2 İskelet kasının yapısal katmanları

(<http://www.kisiselsporhocam.com>)

Bilinen hücre plazmasına benzer olarak kas liflerinin matriksine sarkoplazma denir. Sarkoplazma sıvısı potasyum, magnezyum, fosfat, protein ve enzimleri içerir. Miyofibriller bu sıvının içinde asılı olarak yerleşmişlerdir. Miyofibrillere paralel yerleşen çok sayıda mitokondri, kas kasılması için gerekli enerjiyi sağlar (Burks ve Cohn 2011). Sarkoplazma içerisinde bulunan ve diğer hücre tiplerindeki endoplazmik retikuluma benzer olan sarkoplazmik retikulum kas dokusuna özgü bir membran sistemidir. Hücre içi Ca^{2+} derişimini düzenleyerek kas kasılmasında önemli bir rol oynar (MacLennan vd. 1979). Kas lifleri için enerji santralleri olarak kabul edilen mitokondriler hücre içinde enerji metabolizmasının yoğun olduğu bölgelerde bulunmaktadır.

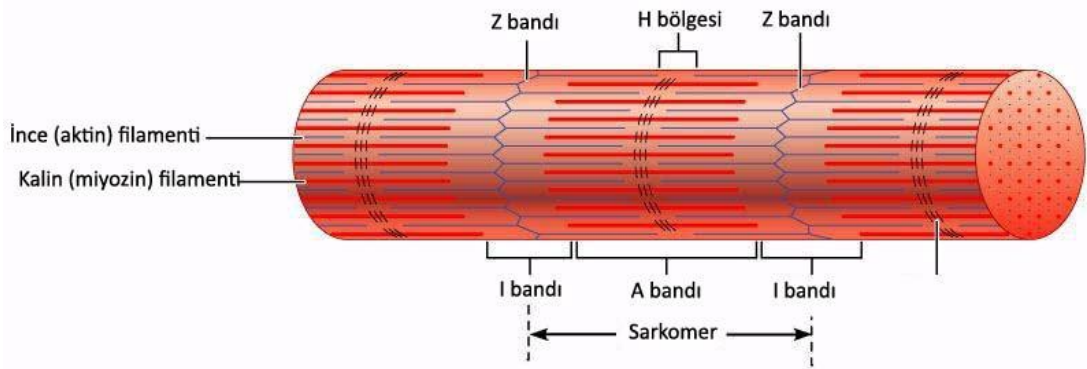
2.1.2 İskelet kasının kasılma elemanları

Kas lifleri sarkomer adı verilen işlevsel birimlerden oluşur. Her sarkomer miyozin (kalın filaman) ve aktin (ince filaman) miyofibriler proteinlerini içerir. Bu iki miyofibriler protein arasındaki etkileşim kasların kasılmasından sorumludur.

Komşu miyofibrillerdeki sarkomerlerin yatay düzeni tüm kas lifinin enine çizgilenmeler gösteren kendine özgü bir yapı göstermesine neden olur. Aktin ve miyozin miyofibril yapısının %85'lik bir kısmını oluşturur. Bu yapıda ayrıca tropomiyozin, troponin, α -aktinin, β -aktinin, M proteini ve C proteini gibi proteinler de bulunmaktadır (Bozkurt 2006).

Miyofibrillerin yapısında koyu olarak görünen A bantları (anizotropik) ve açık renkte görünen I bantları (izotropik) bulunmaktadır. Farklı kırılma indisleri gösteren bu bantlar, iskelet kasının enine çizgili görünmesine neden olur. Koyu renkli A bandı kalın miyozin filamentlerini içerirken, açık renkli I bandı ince aktin filamentlerini içerir. I bandını ikiye bölen ve sarkolemmaya bağlanan kalın ve koyu renkli çizgiye Z çizgisi adı verilir. Bu çizgi tüm yapıya kararlılık kazandırır. A bandının merkezinde daha açık renkli H bölgesi bulunur. Bu bölge aktin proteinlerinin varlığından dolayı düşük optik aktivite gösterir. M bandı, iki Z çizgisinin merkezini gösteren H bölgesini ya da bandını merkezden ikiye böler. İki Z çizgisi arasında tekrarlayan basit birimler olan sarkomer iskelet kasının fonksiyonel birimidir.

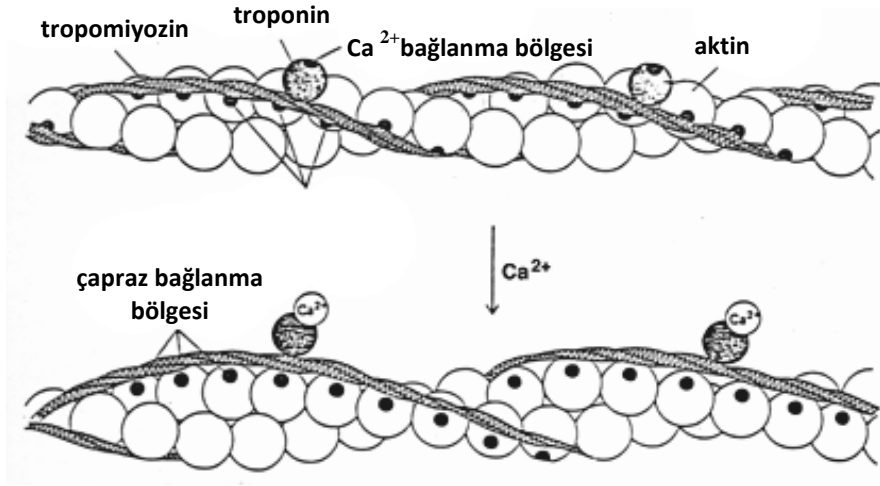
Miyofibrillerin yapısının şematik gösterimi Şekil 2.3'de ve sarkomer yapısı Şekil 2.4'de verilmektedir.



Şekil 2.3 Miyofibril yapısının şematik gösterimi

(<http://en.wikibooks.org>)

Kasılma sırasında filamanlar birbiri üzerinde kayarak kısalırken ATP hidrolizinden elde edilen enerji ile aktin ve miyozin molekülleri çapraz bağ oluşturur, bu bağ daha sonra kırılır ve tekrar oluşur. İskelet kası hücreleri kasılma için gerekli enerjiyi kreatin fosfat ve ATP şeklinde depolamaktadır. Yüksek enerjili fosfat bağlarının hidrolizi, miyozin başlarında bulunan adenozin trifosfataz (ATPaz) aktivitesi ile olur. Aksiyon potansiyeli T sistemi ile kaslındaki tüm fibrillere yayılır. Aksiyon potansiyeli sarkoplazmik retikulumun (SR) T sistemi ile ilişkili olan terminal sisterninden Ca^{2+} serbestleşmesine ve bu da Ca^{2+} troponin C ile bağlanarak kasılmaya yol açar. İstirahat halindeki kasta troponin I aktin ile bağlıdır, tropomiyozin ise miyozin başının aktine bağlanma yerlerini örtmüş olarak bulunur. Troponin-tropomiyozin kompleksi bu şekilde aktin ile miyozinin bağlanmasını engellediğinden bu protein kompleksine “gevşetici proteinler” de denir. Ca^{2+} 'un serbestleşmesinden kısabir süre sonra, SR'da bulunan aktif transport mekanizması, kalsiyumun tekrar retikulumun içinde toplanmasını sağlar ve buradan terminal sisternalara difüze olur (Kasymova 2006).



Şekil 2.6 Sarkomer yapısının şematik gösterimi (Papenburg vd. 2009)

2.1.4 İskelet kasının metabolizması

ATP'nin kaynağı çizgili kas hücresinde çok miktarda bulunan mitokondrilerdeki oksidatif fosforilasyondur. Ancak hammadde olarak glikojen ve fosfat kullanılmakta ve bir takım biyokimyasal reaksiyonlar sonucunda glukoz ve yağ asitleri yıkıma uğratarak gerekli enerji elde edilmektedir. Yağ asitleri, kasın uzun ve devamlı kasılmasını gerektiren durumlarda enerji kaynağı olarak kullanırken, kısa süredeki kasılmalar için glikojene (glukoz halinde kullanılır) gerek duyulmaktadır (Bozkurt 2006).

İskelet kası glukozu glikojenolizden ya da kandan taşıma ile sağlar. Egzersiz sırasında kası besleyen kan damarlarının genişlemesi sonucu kan akımında artış meydana gelerek daha fazla oksijene ihtiyaç duyulur. Kas çok fazla kullanılmaya devam edilirse aerobik glikoliz ile kastaki enerji depolarının yerine konmaları, enerjinin kullanım hızından düşük kalır (Kasymova 2006). Glukoz, kas dokusunun yaş ağırlığının %4-5'inden daha yüksek seviyelerde glikojen olarak depolanabilir. Glikojen, yoğun ve orta seviyede egzersizler süresince ve maraton gibi dayanıklılık gerektiren olaylarda glukozun önemli bir kaynağıdır.

Glukozun depo formu olan glikojen, kas içerisindeki enerjinin kaynağı olan ATP üretimini sağlamak için elektrokimyasal reaksiyonlar döngüsünde kullanılır. Bu enerji deposunu kullanmak için, hücre içerisinde glikojenin glukoz-1-fosfata dönüştüğü glikojenoliz işlemi gerçekleşir. ATP daha sonra hücresel solunum ile glukozdan elde edilir.

2.1.5 İskelet kası iyileşmesinin biyolojik süreçleri

Kas yaralanmaları, doğrudan (yırılma, ezilme ve gerilme vb.) ve dolaylı (iskemi ve nörolojik fonksiyon bozukluğu vb.) travmaları içermektedir (Guyton ve Hall 2001). Hasarlı kas içinde meydana gelen iyileşmenin farklı evreleri kas yaralanmalarının çeşitli tipleri arasında benzerdir. Ancak hasarlı kastaki fonksiyonel iyileşme kas yaralanmalarının tipine göre değişiklik gösterir. Uzun yıllar süren araştırmalardan sonra, hasarlı kasta meydana gelen süreçlerin (nekroz/dejenerasyon, inflamasyon, onarım ve skar doku oluşumu/fibrosiz) hepsinin birbiriyle ilişkili ve zamana bağımlı olduğu açık hale gelmiştir (Huard vd. 2002; Crisco vd. 1994; Jarvinen vd. 2000).

Hasarlı kas dokusunda, mekanik travma hücre dışı kalsiyumun girişine neden olarak miyofiber, plazma membranı ve bazal laminanın bütünlüğünü bozar. Hasarlı miyofiberler yapısal proteazlar aracılığı ile kendi kendini sindirir ve nekroza başlar. Yaralanmadan kısa bir süre sonra bölgesel büyüme ve hematoma oluşumu meydana gelir ve kas dejenerasyonu tetiklenir (Huard vd. 2002). Daha sonra, nekrotik bölge küçük kan damarları tarafından işgal edilir ve mononükleer hücreler, aktif makrofajlar ve T-lenfositler ilgili doku bölgesinin içine sızarlar. Bu aktif lenfositler aynı anda, inflamasyon sürecinde bir dizi fonksiyon gösteren birkaç sitokin ve büyüme faktörünü salgılar (Honda vd. 1990; Schneider vd. 1999).

Adezyon molekülleri (P-selektin, L-selektin ve E-selektin gibi.), sitokinler ve tümör nekroz faktör- α (TNF- α) gibi moleküllerin salgılanması bölgesel kan akışını, vasküler geçirgenliği ve inflamatuvar yanıtı hızlandırır. Daha önemlisi, yaralı bölgede insülin benzeri büyüme faktörü (insulin-like growth factor-1, IGF-1), hepatosit büyüme faktörü (hepatocyte growth factor, HGF), epidermal büyüme faktörü (epidermal growth factor, EGF), dönüştürücü büyüme faktörleri (transforming growth factors, TGF- α ve TGF- β) ve trombosit kaynaklı büyüme faktörleri (platelet-derived growth factors, PDGF-AA ve PDGF-BB) gibi moleküllerin salınması, kas rejenerasyonunu ve onarımını tetikleyerek miyoblastların çoğalmasını ve farklılaşmasını düzenler (Çizelge 2.2). Bu faz, satelit hücrelerin aktivasyonu ile ilişkilidir. Kas yaralanması sonrasında, bazal laminanın ve plazma membranının parçalanması ile satelit hücreler salınır ve aktive edilir. Çeşitli büyüme faktörlerinin etkisi altındaki satelit hücreler daha sonra aktif hale geçer, çoğalır ve çok çekirdekli miyotüplere ve sonunda rejenerasyon miyofiberlere farklılaşır.

Çizelge 2.2 Çeşitli büyüme faktörlerinin miyoblastlar üzerindeki *in vitro* etkisi

Büyüme Faktörü	Hücre Çoğalması	Hücre Farklılaşması
Hepatosit büyüme faktörü (HGF)	Uyarır	Uyarır
Bazik fibroblast büyüme faktörü (bFGF)	Uyarır	Uyarır
İnsülin benzeri büyüme faktörü (IGF-1)	Uyarır	Uyarır
Sinir büyüme faktörü (NGF)	Uyarır	Uyarır
Lösemi inhibitör faktör (LIF)	Uyarır	Uyarır
Asidik fibroblast büyüme faktörü (aFGF)	Engeller	Uyarır
Trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF-AA)	Engeller	Uyarır
Trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF-BB)	Uyarır	Engeller
Epidermal büyüme faktörü (EGF)	Engeller	Engeller
Dönüştürücü büyüme faktör- α (TGF- α)	Engeller	Engeller
Dönüştürücü büyüme faktör- β 1 (TGF- β 1)	Engeller	Engeller

Yaralanma sonrası kas, dejenerasyon, inflamasyon, rejenerasyon ve fibrozis olmak üzere bir dizi iyileşme sürecinden geçer. Yaralanma sonrası ilk birkaç gün içerisinde aktif kas dejenerasyonu ve inflamasyonu meydana gelir, ancak kas rejenerasyonu genellikle yaralanma sonrası 7 ila 10 gün arasında gerçekleşir. Rejenerasyon süreci genellikle ikinci haftada maksimum noktasına ulaşır ve daha sonra 3. ila 4. haftalarda azalır. Skar doku oluşumu (fibrozis) yaralanma sonrası 2. ve 3. haftalarda başlar ve zamanla skar dokunun boyutu artar. Skar dokunun oluşumu kas onarım sürecinin son basamağını göstermektedir. Skar dokunun oluştuğu aşamada kas dokusu rejenerasyonunun tamamlanmadığı anlaşılmaktadır.

2.1.5.1 İskelet kası iyileşmesinde görevli büyüme faktörleri

Hasarlı iskelet kasının iyileşme süreci, proinflamatuvar sitokinler, dönüştürücü büyüme faktörü- β (Transforming growth factor-beta, TGF- β) ailesi üyeleri ve anjiyogenik faktörleri içeren biyoaktif moleküller ile karakterize edilir. Bu amaçla, büyüme faktörleri ve sitokinler hasarlı iskelet kasının yenilenmesi/tamiri sürecini geliştirmek için potansiyel

tedavi seçeneğidir. Bu sinyal molekülleri, miyojenik öncü hücrelerin aktivasyonu ile mitojenik bir uyarı sağlayarak hasarlı kas dokusunun yenilenmesini hızlandırırlar.

Bu moleküllerin herbiri kendine özgü biyolojik aktiviteler gösterirler. Dönüştürücü büyüme faktörü- β mezenkimal hücre çoğalmasını uyarır, fibroblastların çoğalmasını ve özellikle tip I kollajen olmak üzere hücre dışı ortamın biyosentezini tetikler, endotelial hücre aktivitesini ve anjiyogenezi düzenler. Buna ek olarak satelit hücrelerin çoğalması ve farklılaşmasını inhibe eder (Longo vd. 2012).

Fibroblast büyüme faktörü (Fibroblast growth factor, FGF) fibroblastların çoğalmasını tetikler. Satelit hücrelerin çoğalmasını uyarır ancak bunların farklılaşmasını inhibe eder, ayrıca mezenkimal hücrelerin mitogenezini tetikler. Epidermal büyüme faktörü (Epidermal growth factor, EGF) fibroblast göçünü ve çoğalmasını düzenlerken, anjiyogenez ve hücre dışı ortamın homeostazını düzenler. Trombosit kaynaklı büyüme faktörü (platelet-derived growth factor, PDGF) mezenimal kök hücreler ve fibroblastların mitogenezini tetikler, satelit hücrelerin çoğalmasını uyarır ve miyoblast farklılaşmasının son aşamasını inhibe eder. Damar endotelial büyüme faktörü (Vascular endothelial growth factor, VEGF) endotelial hücre mitogenezini ve göçünü tetikler, miyoblast göçünü uyarır. Anjiyoneogenez, yara iyileşmesi sürecinde kritik bir rol oynar. Yaralı bölge çevresindeki sağlıklı dokudan yeni damarlar oluşur ve yenilenme sürecini zenginleştirmek için oksijen, büyüme faktörü ve kan kök hücresi desteği sağlar. Böylece yaralı bölgedeki vasküler yapının oluşumu, kas dokusunun morfolojik ve fonksiyonel iyileşmesi ve yenilenmesi için erken ve gerekli olan ilk fazı temsil eder. Biyolojik etkilerinin çokluğuna dayanarak, büyüme faktörlerinin klinik uygulaması önemli ölçüde yan etkilerden etkilenir. TGF- β ve FGF gibi büyüme faktörlerinin fazla salınımı miyoblast inhibisyonu ve kas fiberlerinin yenilenmesi ile ilişkilidir. Ek olarak büyüme faktörlerinin fibroblastlar ve kas hücreleri üzerinde uyarıcı etkileri vardır.

Özellikle TGF- β , iyileşme sırasında yara oluşumu ile ilişkili en önemli büyüme faktörlerinden biridir. Ayrıca miyojenik hücrelerin miyofibroblastik hücrelere farklılaşmasını yönlendirdiği görülmüştür. Bu sebepten dolayı, kas fiberlerinin yenilenmesi ve yaralı doku üretimi eşzamanlı ve yarışmalı iki süreç olarak düşünülebilir (Franceschi vd. 2006). Ayrıca, büyüme faktörlerinin ifadesi heparan sülfat, proteoglikanlar ve küçük lösince zengin proteoglikanlar gibi çok sayıda hücre dışı ortam (extracellular

matrix, ECM) proteinleri tarafından düzenlenir. Birçok büyüme faktörünün heparan sülfat proteoglikanlarına bağlanması gerekir.

Küçük lösince zengin proteoglikanlar ise onların biyolojik etkilerini sağlar. Böylece hasarlı kas dokusunun iyileşmesini desteklemek için büyüme faktörleri uygulaması bu özel hücre dışı ortam moleküllerinin kontrolünü gerektirir. Bugüne kadar mevcut deneysel veriler çelişkilidir. Bazı yazarlar, yara bölgesinde IGF-1'in iskelet kasına özgü izoformunun (mIGF-1) fazla ifadesi ile ya da FGF-2'nin kontrolü ile hiçbir yararlı etkiyi rapor etmemiştir (Shavlakadze vd. 2004). FGF-2, IGF-1 ve sinir büyüme faktörleri kas iyileşme sürecini tetiklerler ve tedavi görmemiş kas ile karşılaştırıldığında çekme ve germelere karşı dayanımı artırırlar. Büyüme faktörlerinin kombinasyonu kas dokusu yenilenmesinin ve yaralı doku oluşumunun farklı süreçlerini düzenlemek için kullanılabilir. Böylece, IGF-1 ve TGF- β 'nın birlikte uygulanması, fibröz dokunun oluşumunu engelleyerek kas yenilenmesinin uyarılmasına izin verir.

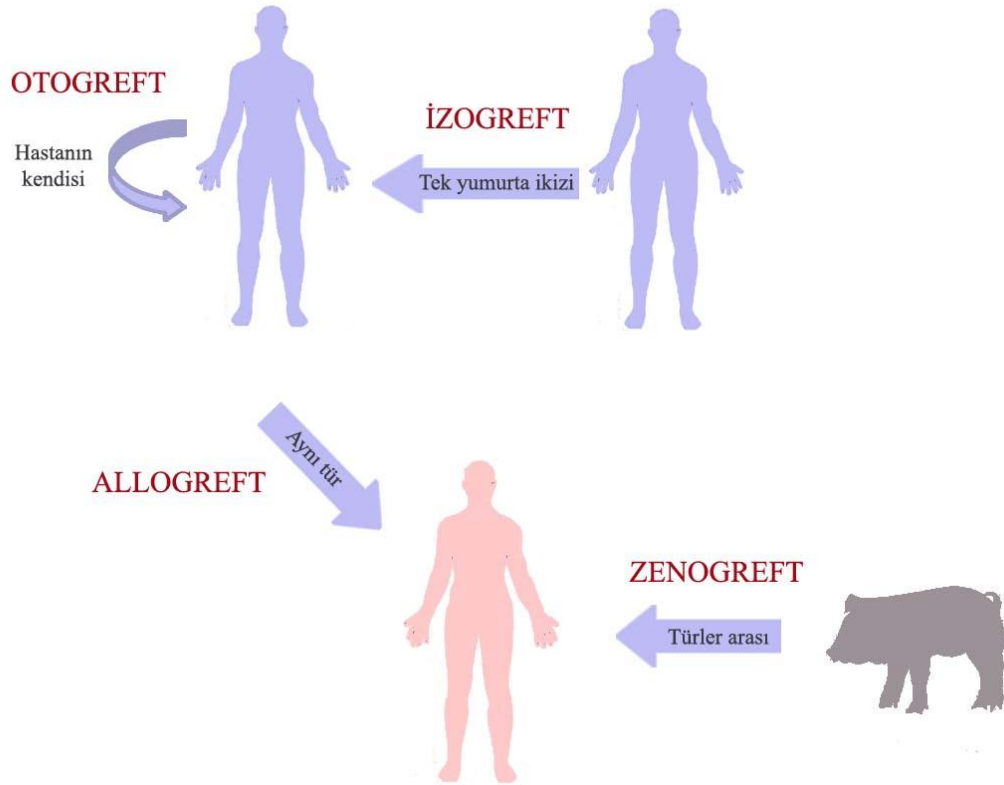
2.2 Doku Mühendisliği

Kalp, karaciğer veya böbrek gibi organların nakli bu organlara ait ileri evre hastalıkların tedavisinde son derece başarılı bir yöntemdir. Bununla birlikte, organ bağışının yaygın olmaması ve uygun organın bulunamaması gibi zorluklar vardır. A.B.D.'nde her yıl organ transplantasyonu için bekleyen hastaların %15'i nakil listesinde sırasını beklerken hayatını kaybetmektedir. Avrupa Birliği ülkelerinde de benzer istatistiklerle karşılaşılmaktadır. Organların bulunmasında yaşanan bu zorluklar yeni cerrahi tekniklerin (örneğin hastaların ebeveynleri ya da çocuklarından alınan akciğer ya da karaciğer gibi dokuların bir kısmının nakledilmesi gibi) ortaya çıkması ile sonuçlanmıştır. Bu nakil yöntemi ile mükemmel sonuçlar alınmasına rağmen donör azlığı problemi ortadan kalkmamıştır.

Bu zorluklar karşısında, bilim adamları farklı organ kaynakları bulma yoluna gitmişlerdir. Vücut içerisindeki eksikliklerin ve hasarların tedavisinde hastanın kendisinden temin edilen otoplastlar, tek yumurta ikizlerinden temin edilen izoplastlar, başka insanlardan temin edilen allograftlar, farklı türlerden temin edilen xenoplastlar ve implant malzemeler kullanılmaktadır (Duckeyna ve Qui 1999). Tedavilerde genellikle

otogreftler kullanılmaktadır. Ancak donör bölgede oluşacak kısmi doku ölümü, acı, cerrahi yöntemin pahalı ve zaman alıcı olması, ayrıca donör bölge bulmada yaşanan zorluklar tedavi yönteminde allogreftlere yönelmeye neden olmuştur.

Zenotransplantasyon kaynakları olarak da adlandırılan diğer türlerdeki donör kaynaklarının uygun olup olmaması uzun vadede tartışmaya açıktır (örn. domuz). İmmünolojik bariyerin yanı sıra, domuz endojen retrovirüs (Pig endogenous retrovirus, PERV) gibi potansiyel mikrobiyolojik tehlikeler de mevcuttur. Donör hayvanın organı vücut tarafından yabancı olarak algılanmakta ve vücut ona karşı şiddetli bir savaş başlatmaktadır, bu da organın ölümüne neden olmaktadır (Stock vd. 2001).



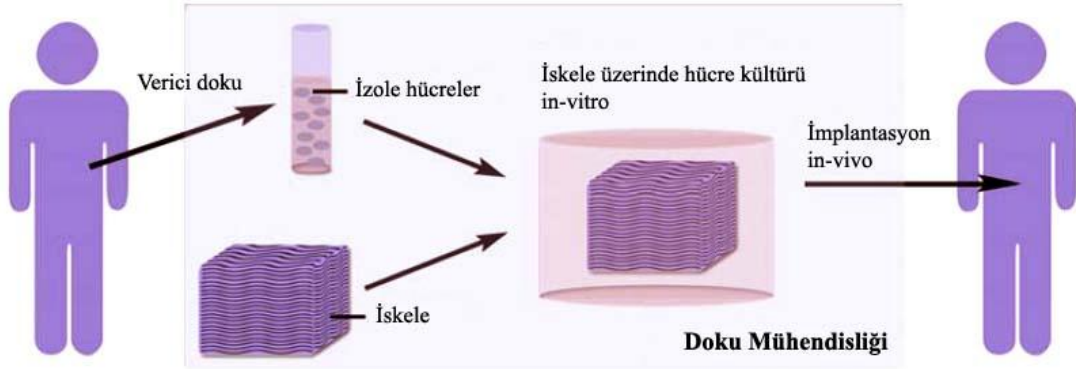
Şekil 2.7 Transplantasyon tiplerinin şemantik gösterilişi

Öncelerde hasar görmüş doku ve organların yalnızca transplantasyon ya da yapay olan plastik ve metallerin implantasyonu ile değiştirilebileceği düşünülmekteydi. Ancak

daha sonra canlı hücrelerle doğal ya da sentetik polimerlerin birleşiminden oluşan ve biyoyapay organ olarak adlandırılan organların oluşturulması fikri ve bu noktada da doku mühendisliği kavramı ortaya çıkmaktadır.

Doku mühendisliği (DM) kavramı temel olarak istenilen doku ya da organın biyolojik eş değerlerinin geliştirilmesi amacıyla hastaya nakilden önce *ex vivo* şartlarda hücrelerin uygun bir iskele üzerine ekilmesi ve bu iskele üzerinde farklılaştırılarak çoğaltılması prensibine dayanır. Bu iskele, hücreler yeterli miktarda ekstraselüler matriks üretene kadar yapıya biyomekanik bir destek sağlar.

Yeni üretilen matriksin oluşumu, depolanması ve organizasyonu süresince iskele ya degrade olur ya da metabolize edilir. Doku mühendisliğinde otolog hücrelerin kullanımı, viral enfeksiyonlar ve red cevabı gibi (hiperakut ve gecikmeli) riskleri tamamen önlemektedir. (Elçin 2003). DM (*in vitro* oluşturulan hücreli matrikslerin implantasyonu) ile yönlendirilmiş doku rejenerasyonunu (implantasyon sonrası konakçı doku tarafından yeniden doldurulan hücresiz matrikslerin kullanımı yaklaşımı) birbirinden farklıdır (Stock vd. 2001).



Şekil 2.8 Doku mühendisliği yaklaşımı

Doku mühendisliğinde iskele kullanımına dayalı genel yaklaşımın temel prensibi Şekil 2.8’de gösterilmektedir. Hücreler hastadan (otojenik) ya da bir vericiden (allojenik) izole edilir. İzolasyondan sonra, hücreler *in vitro* olarak kültüre edilir ve daha sonra iskele üzerine ekilir. Son olarak, üzerine hücre ekilmiş iskele *in vivo* olarak hastaya nakledilir.

Hücrelerin izolasyonu ve *in vitro* kültürü en uygun işlemleri ve çevresel şartları gerektirir (örneğin pH, sıcaklık, ortam içeriği gibi). Her doku tipi ayrı koşullar gerektirir ve böylece dokuya özel doğal biyolojik çevreyi *in vivo* olarak anlamak *in vitro* kültürün optimizasyonuna olanak sağlar.

Doku uyarıcı faktörlerin eklenmesi, yolak aktivasyonu yoluyla spesifik reaksiyonları tetikler. Hücre davranışını yönlendiren bu faktörler iskele tabanlı yaklaşım ile birleştirilebilir. Hücre davranışını yönlendiren diğer bir yaklaşım da iskelenin mimarisine dayanmaktadır. İskele, hücrelerin bağlanmasını, çoğalmasını ve organize olmasını iyi bir şekilde desteklemeli, hücrelerden gelen atıkların bertaraf etmeli ve hücreler için yeterli besin kaynağını sağlayarak üç boyutlu doku oluşumuna olanak sağlamalıdır. İyi işleyen doku mühendisliği yapılarının tasarlanması bu yaklaşımların spesifik uygulamalar için optimizasyonunu gerektirir (Papenburg 2009).

DM için iskele malzemeleri biyouyumlu olmalı ve doku oluşumunda görevli belirli hücre popülasyonlarının, hem besin hem de biyolojik ihtiyaçlarını karşılamak üzere tasarlanmalıdır. Doku mühendisliğinde kullanılmak üzere birçok farklı malzeme potansiyel iskeleler olarak halen araştırma aşamasındadır. Yaygın olarak kullanılan destek malzemeler polimerik yapıda olup sentetik ya da doğal olmak üzere iki sınıfa ayrılmaktadır. Doku mühendisliğinde sık kullanılan malzemeler Çizelge 2.1'de gösterilmektedir.

Çizelge 2.1 Doku mühendisliğinde kullanılan bazı iskele malzemeleri

Biyolojik	Sentetik
Fibrin	Poliglikolik asit (PGA)
Fibrinojen	Polilaktik asit (PLA)
Kollajen	Poli(laktik asit-ko-glikolik asit) (PLGA)
Jelatin	Hidrojel
Kazein	Polihidroksibütirat
Deselülerize zenojenik matriksler	Polihidroksioktanoat
İnce bağırsak submukoza	Polipeptitler

DM yaklaşımlardan bir diğeri ise deselülerize biyolojik matrikslerin kullanımı ile ilgilidir. Biyolojik olarak elde edilen bu matriksler enzimatik veya deterjan içeren yöntemlerle deselülerize edilen ya allojenik ya da zenojenik dokulardır. Doğal ekstraselüler matriks sürekli olarak oluşturulur ve daha sonra matriks metalloproteinazlar tarafından yıkılır. Matriks metalloproteinazlar doğal antagonistleri olan doku inhibitörleri ile birlikte canlı dokudaki matriks devrini belirler ve düzenlerler. Bu deselülerize matriksler teorik olarak biyobozunur, yeniden emilebilir ve hücre ekimi için uygun bir iskele olabilir. Ekstraselüler matrikse zarar vermeden gerçekleştirilen deselülerizasyon işleminin zorlukları olmasına rağmen, deselülerizasyon için en az dört farklı yöntem kısmen başarı ile uygulanmıştır (Stock vd. 2001; Courtman vd. 1994; Bader vd. 1998). Örneğin kalp kapakçığı doku mühendisliği için zenojenik dokuların kullanımında kaynak açısından belirgin üstünlükler vardır. Bir hayvanın kapakçığından elde edilen matriksin normal dolaşımdaki zorlamalara dayanım bakımından adapte olacağı görülmektedir. Bununla birlikte iki önemli konu ele alınmalıdır. Birincisi, insanın anatomik yapısı hayvandan genellikle büyük ölçüde farklıdır. Örneğin normal insan aortik kapak-kök sistemi asimetrik sinüs yapısı ile domuz gibi hayvanlardan önemli ölçüde farklıdır. Ek olarak, bu deselülerize matriksler tüm uygulamalar için özellikle iskelet kası,

karaciğer ya da kalp gibi daha karmaşık sistemler için uygun olmayacaktır (Stock vd. 2001).

Alternatif olarak, kollajen tabanlı matriksler doku mühendisliğinde yaygın olarak kullanılmaktadır. İnce bağırsak submukoza ise yine doku mühendisliğinde kullanılan diğer bir potansiyel matrikstir. Bu malzeme 1965'lerde damar yedeği olarak denenmiştir (Matsumoto vd. 1965; Fraser vd. 1968) ve otuz yıldan fazla süredir submukoza damar doku mühendisliği için umut verici matriks olarak görünmektedir. Ancak matrikse zarar vermeden deselülerizasyon işlemlerini gerçekleştirmek bu yöntemin zorluklarından biridir.

En yaygın olarak kullanılan iskeleler ve hücrelerin enkapsüle edildiği malzemelerden biri sentetik kökenli malzemelerdir. PGA yeni dokunun başarılı bir şekilde oluşumunda kullanılan ilk polimerdir (Vacanti vd. 1988). Poli-4-hidroksibütirat (P-4-HB) gibi yüksek esnekliği ve kontrollü degradasyon profili olan ve biyolojik olarak elde edilen yeni polimerlerin tanınmasıyla birlikte polimer bilimindeki bu gelişim tamamen yeni bir bakış açısı getirmiştir.

Çok gözenekli alginat hidrojellerin otolog kondrositlerle kombinasyonunda, pediatrik üriner reflü tedavisi için ilk uygulamada umut vadeci sonuçlar gösterilmiştir (Stock vd. 2001). Ancak alginat ve PGA gibi malzemeler biyobozunur olmasına rağmen, bu malzemelere oranla daha yüksek bozunma profili gösteren malzemelere ihtiyaç duyulmuştur.

Fibrin, doku mühendisliğinde sıkça kullanılan diğer bir biyobozunur doğal malzemedir. Son zamanlarda cerrahi işlemlerde aktif doku yapıştırıcısı olarak kullanılmaktadır. Yapılan bir çalışmada üç boyutlu fibrin matriks bir sıçan modelinin yaralı kas bölgesinde miyoblastların enjeksiyonu için taşıyıcı olarak kullanılmıştır. Fibrin taşıyıcı hiçbir inflamatuvar reaksiyonu indüklememiş ve kas fiberlerinde miyoblastların entegrasyonuna izin vermiştir (Beier vd. 2006). Fibrin, biyobozunurluk ve biyouyumluluk özelliklerinin yanında immünolojik yanıtı neden olmamasından dolayı doku mühendisliğinin amaçlarını karşılayan ve bu alanda umut vadeci olan bir doğal malzeme olarak görülmektedir.

Polimer kimyası ile üç boyutlu baskı gibi malzeme işleme tekniklerinin kombinasyonu yüksek oranda karmaşık matrikslerin üretimine olanak sağlamaktadır. Bu iki temel bilimin birleştirilmesi doku mühendisliği alanında multidisipliner yaklaşımın önemini vurgulamaktadır (Stock vd. 2001).

2.2.1 Kas doku mühendisliği ve kullanılan biyomalzemeler

Rejeneratif tıp, hasar görmüş organ ya da dokunun fonksiyonunu geliştirmek ya da yeniden inşa etmek için canlı ve fonksiyonel bir eşdeğer üretimini içeren multidisipliner bir yaklaşımdır. Doku mühendisliği rejeneratif tıp alanının içinde bulunan özel bir yaklaşımdır. Doku mühendisliği hücreler, faktörler ya da uyarıcılar ve biyomalzemeler olmak üzere üç ana bileşen arasındaki ilişkiyi kapsar. İskelet kası doku mühendisliği kayıp ya da hasarlı kemik, kırık, iskelet kası ve tendonların fonksiyonel eşdeğerlerinin elde edilmesini amaçlar. İskelet kasında doku mühendisliği yaklaşımı, ağır hasarlardan sonra oluşan geniş doku kayıplarına eşdeğer bir biyolojik alternatif sunar. İskelet kası doku mühendisliği iki farklı yaklaşımla gerçekleştirilebilir: *in vitro* ve *in vivo*.

In vitro doku mühendisliğinde yetişkin kas dokusundan elde edilen kök hücreler, bir hücre-biyomalzeme yapısı oluşturmak için üç boyutlu bir iskeleyle ekilir. Kök hücrelerin farklılaşmasından sonra, yeni oluşan doku grefti hasarlı bölgeye transplante edilebilir. *In vivo* doku mühendisliğinde ise, izole edilmiş kök hücreler üç boyutlu taşıyıcı bir iskeleyle yüklenir ve hemen nakledilir. Böylece kök hücrelerin yaralı bölgeye iletimi gerçekleştirilir (Rossi vd. 2010).

Verimli iskelet kası yenilenmesi iskele yapımında kullanılan biyomalzemenin özelliği ve iskeleyle ekilen hücrelerin rejenerasyon potansiyeli ile güçlü bir şekilde ilişkilidir. İskeleyle ekilen hücrenin kaynağı hasarlı dokunun özellikleri dikkate alınarak seçilmelidir. Hücreler otolog ya da allojenik olabilir.

İskele, doğal dokunun anatomik ve biyomekanik özelliklerini taklit edebilen üç boyutlu bir yapıdır. Kas doku mühendisliği için iskele eğilebilir ve esneyebilir olmalıdır. Nano-yapılı iskeleler miyotüplerin derlenmesini sağlamada mikro-yapılı iskelelere göre daha etkindir. İskele yapımında kullanılan bu biyomalzemeler kollajen gibi doğal ya da

seramikler, laktik asit ve glikolik asit polimerleri gibi sentetik ve çözünebilir ya da çözünmez olabilirler. Kullanılan iskeleler biyoyumlu ve biyobozunur özellikte olmalıdır. Biyoyum kasta biyomalzeme ilişkili immün yanıtı ve toksisiteyi önlemek için önemlidir. Biyobozunurluk ise iskelenin yeni oluşan kas dokusu ile kademeli olarak yerdeğiştirmesine olanak sağlar. Ayrıca iskele, büyüme faktörlerinin, plazmitlerin, ilaçların ya da diğer uyaranların kontrollü iletimini sağlayarak molekülleri ya da hücreleri entegre etmelidir. İskelet kası doku mühendisliğinde biyomalzemeler, hasarlı dokunun yenilenmesi ve/veya tamiri için hücre canlılığı, çoğalması ve/veya farklılaşmasını sağlayarak miyogenik süreci desteklemelidir (Longo vd. 2012).

Kas rejenerasyonunu sağlamak amacıyla doku mühendisliği yaklaşımları için hem sentetik hem de doğal iskeleler kullanılmaktadır. Polilaktik-ko-glikolik asit (PLGA) uygun sertlik ve bağlantı gösteren kas doku mühendisliği için uygun, sentetik biyobozunur bir malzemedir. PLGA, kas fiberlerinin yeniden düzenlenmesini sağlayarak miyotüplerin derlenmesi ve miyoblastların hizalanmasına izin verir.

Doğal biyobozunur biyomalzemeler alanında farklı üç boyutlu iskeleler geliştirilmiştir. Gözenekli yapıya sahip olan kollajen iskeleler iskelet kasının üç boyutlu yapısını sağlamak için kullanılmıştır (Kroehne vd. 2008). Bu iskeleler gözenek, yapısının yönüne göre multinükleer miyotüplerin hizalanmasıyla iskelet kası benzeri doku rejenerasyonunu indüklemeye yeteneği göstermiştir (Yan vd. 2008).

Diğer tip doğal iskele ise kök hücrelerin ya da mezenkimal progenitor hücrelerin iletimini sağlamak için kullanılan hiyalüronan temelli hidrojeldir. Kök hücre-hidrojel yapısının kullanılmasıyla, mezenkimal progenitor hücre-hidrojel ya da hücre-siz hidrojel yapılarına oranla miyofiber sayısının daha fazla olduğu dolayısıyla rejenerasyon sürecinin daha iyiye gittiği gösterilmiştir. Ayrıca, kök hücrelerin hasarlı kas dokusuna iletiliğinde bubölgede, nöral ve vasküler ağlar ile ilişki olan fonksiyonel bir kök hücre nişinin varlığı gösterilmiştir (Rossi vd. 2011). Hücre-siz kas hücre dışı matriksi de kas doku mühendisliği alanında kullanılmaktadır. Hücre-siz kas iskelesi ekstensör digitorum longus kasından elde edilmiş ve miyoblastlarla etkileştirilmiştir. Elde edilen bu iskele hücrelerin yaşamasına ve çoğalmasına izin vermiş ve elektriksel uyarı altında boyuna kasılma kuvveti göstermiştir (Borschel vd. 2004).

Fibrin kas rejenerasyonunun gerçekleştirilmesinde kullanılan diğer bir biyobozunur doğal bir üç boyutlu iskeledir. Üç boyutlu fibrin matriks bir sıçan modelinin yaralı kas bölgesinde miyoblastların enjeksiyonu için taşıyıcı olarak kullanılmıştır. Fibrin taşıyıcı hiçbir inflamatuvar reaksiyonu indüklememiş ve kas fiberlerinde miyoblastların integrasyonuna izin vermiştir. (Beier vd. 2006). Fibrin matriks üç boyutlu kültürde ve elektriksel uyarımı altında miyoblastların farklılaşmasına izin verir (Stern-Straeter vd. 2005). Bir çalışmada, fibrin iskeleler tibialis anterior kasında geniş bir hasarı olan fare modelindeki büyük doku kaybı sonrası kasın yenilenmesi için insan erişkin hücreleri ile etkileştirilmiştir. Fibrin şeritler bağ doku, iskelet kası fiberlerini oluşturarak ilgili dokunun rejenerasyonunda önemli rol oynamıştır (Page vd.2011).

Her tip iskele kendine özgü özellikler ve avantajlara sahiptir. İskele üretiminin nihai hedefi iskelet kası hücrelerinin çoğalmasını, farklılaşmasını ve yeni iskelet kası benzeri doku oluşturmak için paralel olarak hizalanmasını içerir ayrıca iskele malzemesinin biyobozunur ve biyouyumlu olması da genel esastır. Bu durumda doğal iskelelerin kullanılması önem kazanmaktadır.

2.2.3.1 Trombositten zengin plazma

Fibrinojen, kanın pıhtılaşmasında meydana gelen “fibrin” in öncü maddesidir. Pıhtılaşma olayında fibrinojen, trombin ve kalsiyum iyonlarının etkisiyle fibrine dönüşür. Fibrin protein yapısında bir maddedir ve fibrine tutunarak aktif hale gelen trombositlerle beraber pıhtıyı oluşturur. Trombositler, kan pıhtısının oluşumunda rol almalarının dışında doğal yara iyileşmesinde görev alan büyüme faktörlerinin ana kaynağıdır. Bu büyüme faktörleri trombosit-kökenli büyüme faktörü (platelet-derived growth factor, PDGF) dönüştürücü büyüme faktörü-beta (transforming growth factor-beta, TGF- β), vasküler endotel büyüme faktörü (vascular endothelial growth factor, VEGF), epitelyal büyüme faktörü (epithelial growth factor, EGF), hepatosit büyüme faktörü (hepatocyte growth factor, HGF) ve insülin-benzeri büyüme faktörüdür (insulin-like growth factor, IGF-I).

Dönüştürücü Büyüme Faktörü: TGF- β süper ailesi bir dizi dokunun patogenezinde hayati bir rol oynar. TGF- β , sitokinlerin kırktan fazla üyesi olan TGF- β süper ailesinin bir parçasıdır. TGF- β , TGF- β 1, TGF- β 2, and TGF- β 3 olmak üzere en az üç izoforma sahiptir. Herbiri homodimerdir, ancak TGF- β izoformları ve TGF- β süper ailesinin diğer üyeleri arasında heterodimerler oluşabilmektedir.

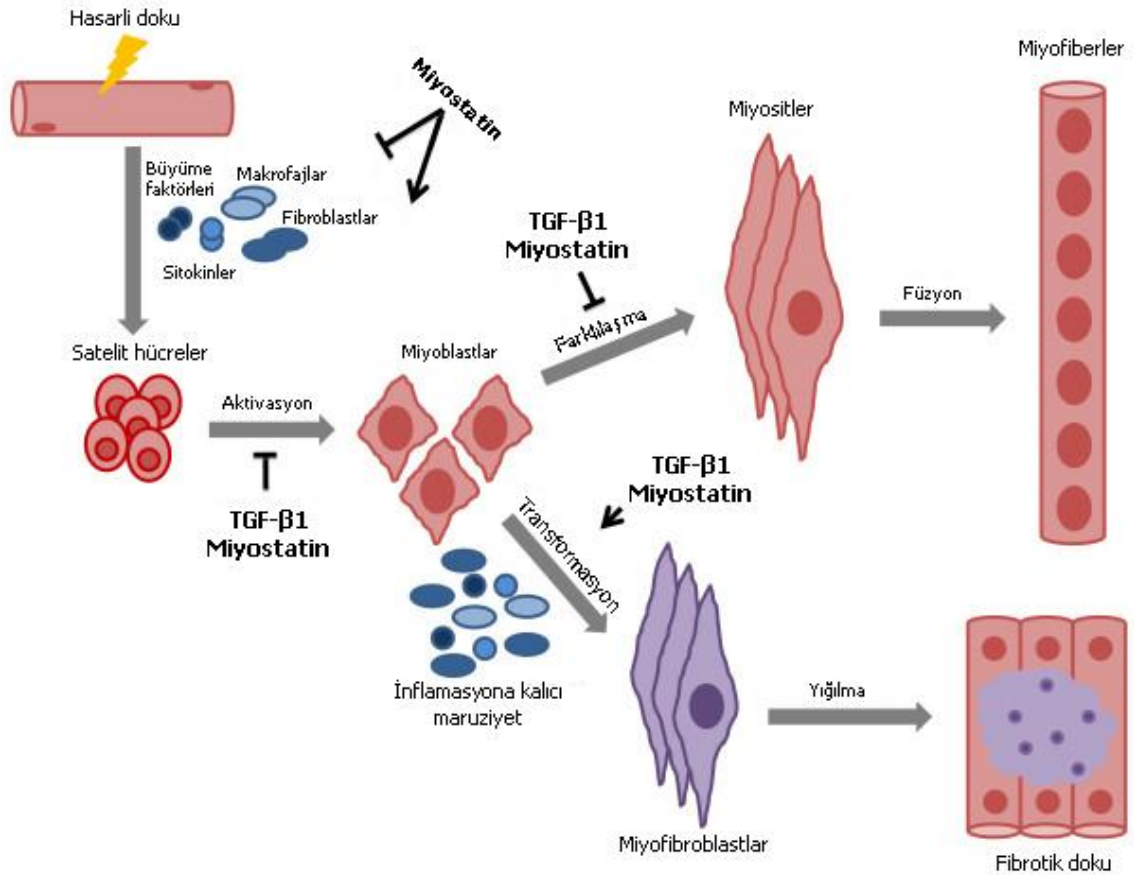
TGF- β süper ailesi ayrıca, kemik morfojenik proteinleri (bone morphogenic proteins, BMP), büyüme ve farklılaşma faktörleri (growth and differentiation factors, GDF), aktivinler ve inhibinler gibi çeşitli sinyal moleküllerini de içerirler. Farklı dokularda çok yönlü etkileri göz önüne alındığında TGF- β sinyalleşme kaskatındaki düzensizlik gelişimsel bozukluklara ve/veya hastalıklara yol açabilir. TGF- β ailesinin bazı üyeleri kas büyümesinin düzenlenmesi ve atrofide önemli rol oynar. İskelet kası üzerindeki etkileri bakımından en yaygın karakterize ligandlar TGF- β 1, mitogen aktif protein kinaz (MAPK) ve miyostatindir. Bu süper ailenin embriyonik gelişim, yetişkin doku homeostazı ve hastalık patogenezinde rol aldığı bilinmektedir. Özellikle, proliferasyon, farklılaşma, apoptozis, göç, hücre dışı matriksin yeniden modellenmesi, immün fonksiyonlar ve tümör invazyon/metastazı gibi durumları kontrol ettiği gösterilmiştir (Wang vd. 2009).

TGF- β 1 miyogenez süresince ifade edilir. Bağ dokunun gelişimdeki ifadesi miyotüpleri çevreleyen fibrillerin tiplerinin bileşimi ile ilişkilidir. TGF- β 1 ifadesinden önce oluşan miyotüpler yavaş kasılan fiberlere dönüşürken, miyoblastlar TGF- β 1 ifade eden bağ dokuya yakın olduğunda hızlı fiberler oluşur (McLennan vd. 1993). TGF- β 1'in fetal miyoblastların farklılaşmasını baskıladığı ancak embriyonik miyoblastları etkilemediği gösterilmiştir (Cusella-De Angelis vd. 1994). Olgun erişkin kasında TGF- β , satelit hücre proliferasyonunu, miyofiber füzyonunu ve bazı kas spesifik genlerin ifadesini baskılayarak iskelet kası rejenerasyonunu negatif yönde etkiler (Allen vd. 1987). Ayrıca yaralanma sonrası TGF- β 1, miyojenik hücrelerin fibrotik hücrelere dönüşümüne sebep olur.

Yara iyileşmesi ve fibrozisin potansiyel bir düzenleyicisi olan TGF- β 1, yaralanma ve egzersiz sonrası iskelet kası yenilenmesinde fizyolojik olarak pozitif yönde düzenleyicidir. Ayrıca, kas hasarı için geçici bir inflamatuvar cevaba katıldığı düşünülmektedir (Serrano vd. 2010; Gosselin vd. 2004). İnflamatuvar cevaba sürekli maruz

kalmak hücre dışı matris birikmesine ve fibrotik doku oluşumunu destekleyen TGF- β 1 dahil bazı sitokinlerin ve büyüme faktörlerinin seviyelerinde artışa neden olur. Bu nedenle TGF- β 1, yaralanmadan sonra miyoblastların fibrotik dokuya dönüşümünü teşvik eden önemli faktörlerden birisidir (Ailen vd. 1989).

Şekil 2.9'da düzenlenmiş ve düzenlenmemiş kas yenilenmesi şematik olarak gösterilmektedir. Düzenlenen kas yenilenmesinde hasar sonrası büyüme faktörleri, sitokinler, makrofajlar ve fibroblastların kemotaksisini içeren geçici bir inflammatuar yanıt oluşur. Bunu satelit hücrelerin aktivasyonu takip eder. Aktive miyoblastlar miyositlere farklılaşır ve daha sonra birleşerek merkezi çekirdekler sergileyen miyofiberleri oluşturur. Bu işlem temel olarak miyojenik düzenleyici faktörlerin ifadesi ile yönetilir. Düzenlenmemiş kas yenilenmesinde ise sürekli bir inflammatuar yanıt ile birlikte hasarlı miyofiberler ile yer değiştiren fibrotik dokunun oluşumunu tetikleyen TGF- β 1 ve miyostatin gibi proteinlerin aşırı ifadesi söz konusudur.



Şekil 2.9Kas yenilenmesinde TGF- β 1'in rolü (Burks vd. 2011)

Trombosit-Kökenli Büyüme Faktörü: Trombositlerin alfa granülleri içinde bulunur. 32.000 dalton ağırlığında bir glikoprotein olan PDGF, iki disülfür bağıyla bağlanmış alt birimlerden oluşur. A ve B adını alan bu birimler %56 oranında benzerlik gösterirler. AA, AB ve BB şekillerinde ifade edilen faktörün her üç formunun biyolojik aktiviteleri temelde benzer olup B birimi mitogenezi biraz daha güçlü uyarabilir. Tümörler, endotel hücreler, makrofajlar, düz kas hücreleri ve trombositler PDGF benzeri büyüme faktörleri salgırlar. Trombosit kaynaklı büyüme faktörü, makrofajlar ve polimorf nüveli lökositlerin kemotaksisini uyarır. Fibroblast ve düz kas hücrelerinde hem kemotaksis hem mitogenezi uyarır. Trombosit kaynaklı büyüme faktörü, kollajen, hiyalüron ve fibronektin sentezini uyarır; ayrıca kollajenaz aktivitesini arttırır.

Trombosit kaynaklı büyüme faktörünün bir bölgedekiderişimi, hangi hücrelerin ona daha çok yanıt verme yeteneğinde olduğunu gösterir.Çünkü farklı hücreler, farklı PDGF derişimleri ile o ortama çekilirler. Trombosit kaynaklı büyüme faktörü, hayvan modellerinde, etkili bir yara iyileşmesi destekleyicisi olarak gösterilmiştir. Yapılan bir çalışmada tavşan kulağı modelinde epitelizasyon hızını arttırdığı saptanmıştır. Farelere subkutan olarak yerleştirilen iskelelere hergün PDGF enjekte edilmiş ve enjeksiyon yapılmayanlara oranla, yapılanlarda, tedavinin 7. gününde hücre miktarında ve kollajen içeriğinde artma saptanmıştır. Farelerdeki insizyonel yaralanmalara kollajen taşıyıcı içinde PDGF-BB uygulandığında, 7 hafta sonunda kontrollere oranla yara iyileşmesi daha belirgin olarak gerçekleştiği belirlenmiştir. Radyasyon uygulanmış kobaylardaki insizyonel yaralar, kollajen taşıyıcı içinde PDGF-BB ile desteklendiğinde, 7. ve 12. günlerde yaranın sağlamlığında belirgin artma olduğu gösterilmiştir. Diabetik farelerde eksizyonel yaralar, PDGF'ün topikal uygulanımı ile desteklendiğinde daha hızlı kapanmıştır (Ciğer 2006).

*Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü:*Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) anjiyogenez ve vaskülogenezin önemli bir düzenleyicisidir. Anjiyonegez, kadın üreme döngüsü ile ilgili normal süreçlerde, tümör büyümesi ve metastaz, diyabetik retinopati, romatoid artrid ya da iskemi sonrası gibi patolojik süreçlerde oluşur. Vaskülogenez ise, mezodermal prokürsörlerden endotelial farklılaşma boyunca kan damarlarının oluşumunu içerir. Vaskülogenez embriyonik gelişimle sınırlı olduğu halde, yeni bir vaskülarizasyon gerektiğinde anjiyogenez, tüm yaşam boyunca etki eder.

VEGF için bilinen iki tane yüksek afiniteli reseptör vardır. Bunlar, fms-benzeri tirozin kinaz (Flt-1) ve fetal karaciğer kinazdır (Flk-1). Her ikisi de tirozin kinazdır ve endotelial hücrelerde özel olarak ifade edildiği görülmüştür. VEGF'in reseptörlerine bağlanması, mitojen aktif kinaz (MAPK) ve sırasıyla inositol 1,4,5- trifosfat ve kalsiyumun hücre içi düzeylerinde artışa yol açan fosfolipaz tirozin fosforilasyon aktivasyonu C γ 1 (PLC γ 1) ile sonuçlanan bir sinyal kademesini aktive eder. Kalsiyumdaki bu artış, NO üretmek için nitrik oksit sentazı (NOS) tetikler. Bu NOS aktivitesi VEGF'in anjiyogenezi uyarması ve vasküler geçirimsizliğin artması için gereklidir. VEGF ve reseptörlerinin ifadesi, anjiyogenez ve vaskülogenez sırasında oluşur.

TZP tedavisi kemotaktik, proliferatif ve anabolik ana hücrel yanıtları indükleyerek doku tamirini sağlama konusunda ilginç bir biyolojik teknik sunmaktadır. TZP, hastanın kendi trombositlerinden elde edilen biyoaktif ajanları içeren otolog bir üründür. TZP genellikle ameliyat sırasında çözelti ya da jel formunda lokal enjeksiyon yoluyla hastaya uygulanır (Castricini vd. 2011). Doku onarımı için gerekli biyolojik ajanların büyük bir miktarını sağlayan TZP, iyileşme sürecini ilerletmek için gerekli araçların dengeli bir kombinasyonunu sağlayan biyolojik olarak ideal otolog bir ürün olabilir. Klinik uygulamalarda, yara çevresindeki kan pıhtısı, TZP solüsyonu ya da jelinin küçük bir hacmi ile yer değiştirir. Yara bölgesindeki trombositlerin artan miktarı, iyileştirici biyoaktif faktörlerin miktarının fizyolojik koşullarda olduğundan daha fazla olmasını sağlar. Bugüne kadar TZP tendon, ligament, kas, sinir, kemik ve eklem çalışmaları için önerilmiştir.

TZP, tam kandaki trombositlerden sağlanan otojen büyüme faktörlerinin elde edilmesi için ideal bir kaynak olması ve TZP elde etme yönteminin kolaylığı nedeniyle oldukça yaygın olarak tercih edilen bir kan kaynaklı üründür. Otolog TZP ilk kez 1987 yılında Ferrari vd. tarafından açık kalp ameliyatı sonrasında, homolog kan ürünlerinin aşırı transfüzyonunu önlemek için kullanılmıştır (Ferrari vd. 1987). 1990'ların başında fibrin yapıştırıcıya bir alternatif olarak kullanılmıştır. O zamandan bu yana otolog TZP, ortopedi, diş hekimliği, beyin cerrahisi, göz, üroloji ve yara iyileşmesi alanlarının yanı sıra; kozmetik, çene ve yüz cerrahisi dahil olmak üzere pek çok alanda güvenle kullanılmaktadır (Sampson vd. 2008).

TZP eldesi genel olarak iki aşamada gerçekleştirilir (Everts vd 2006). İlk olarak antikoagülanlı kan örneği, trombositten fakir plazma (TFP) ve TZP'den eritrositleri ayırmak için santrifüjlenir. Santrifüj işleminin sonunda elde edilen süpernatant kısım TZP ve TFP'dır. Bu kısım bir enjektör yardımıyla ayrılır. TFP'dan TZP'ı ayırmak için ikinci santrifüj işlemi yapılır. Santrifüj işlemi sonucunda oluşan süpernatant kısım TFP'dır.

Elde edilen TZP belirli miktarda kalsiyum klorür ve trombin bulunduran çözelti ile karıştırıldığında TZP jel elde edilmiş olur. TZP jel kompleks bir üç boyutlu yapıya sahip olup sağlam bir fibrin matriksten oluşur. Bu yapı tam kan içinde bulunan trombositlerin ve lökositlerin büyük bir kısmını konsantre halde içermektedir.

Yöntemde kullanılan kalsiyum klorür, kan içinde bulunan antikoagülanın etkisini ortadan kaldırırken; trombositlerin trombin ile aktive edilmesi trombositlerde bulunan büyüme faktörlerinin hızlı bir şekilde salınmasına neden olur. Trombin aynı zamanda pıhtılaşma işleminde görev almaktadır.

TZP eldesi ve TZP'nın trombin ve kalsiyum klorür ile muamele edilmesi sonucu TZP jel oluşum yöntemi (Antanavich vd. 1996;Antanavich vd. 1998) belgelendiği ilk yıldan itibaren hızla geliştirilmiş ve çeşitli doku hasarlarının tamirinde kullanılmıştır. Örnek olarak otolog TZP kullanılarak gerçekleştirilen bir çalışmada, TZP kullanılarak memelilerde doku vaskülarizasyonunu arttırmak için bir yöntemi açıklamaktadır. Tam kandan elde edilen TZP'nın tendinosis, lateral epikondilit ve plantar fasiit gibi doku hasarı bulunan rahatsızlıkların tedavisi için kullanılabilirliği incelenmiştir (Mishra vd. 2009).Başka bir çalışma, TZP'nin epidural boşluğa enjeksiyonu ile dural sızıntıların tedavisi açıklamıştır (Ferree vd. 2003).

Bir başka çalışmada tam kandan elde edilen TZP kalsiyum klorürle muamele edilerek fibrin jel oluşturulmuş, ardından buzlu ortamda sonikasyon işlemi yapılarak büyüme faktörlerinin ve sitokinlerin trombositler içinden salımı gerçekleştirilmiştir.

Sonikasyon ile aktive edilmiş trombositleri içeren TZP jelin kemik, kırık ve deri hasarlarının tedavisinde kullanımı açıklanmıştır (Meury vd. 2007).

Tam kandan elde edilen otolog TZP kullanılarak yapılan başka bir çalışmada ise, belirli koşullarda liyofilize edilen TZP, deiyonize su içerisinde bekletildikten sonra trombin ile aktive edilmiş ve aktive edilen TZP'nın yara iyileşmesi üzerine etkisi incelenmiştir (Gandy vd. 2008).

TZP'nın kullanıldığı bir başka uygulamada ise, fare modelinde ligasyonla meydana gelen kalp krizi sonrası oluşan doku hasarının, miyokard içine intramüsküler TZP enjeksiyonu ile onarımı açıklanmıştır. Çalışmada, trombosit ve beyaz kan hücrelerini farklı oranlarda içeren TZP formülasyonları kullanılmıştır (Mishra vd. 2010).

Bir diğer uygulamada ise, hastanın doku hasarının bulunduğu bölgeye TZP enjeksiyonu ve lazerle tedavi uygulanarak hasarlı olan dokunun tamirini amaçlayan bir yöntem anlatılmıştır (Lim vd. 2010). Fibrin mikroküre oluşumuna yönelik geliştirilen bir yöntemde fibrin mikroküreler, fibrinojen, trombin ve faktör XIII kullanılarak sıcak yağ emülsiyon yöntemine göre 50-80°C sıcaklıkta yağ ortamında oluşturulmuştur. Hücreler, bu yöntemle oluşturulan mikroküreler üzerine ekilmiştir (Marx vd. 2003).

2.2.3.2 Fibrin

Fibrinojen ve fibrin kanın pıhtılaşması, fibrinoliz, hücre ve matriks etkileşimleri, inflamatuvar yanıt, yara iyileşmesi ve neoplazide birbiriyle örtüşen rollere sahiptir. Bu fonksiyonlar fibrin(ojen) üzerindeki inaktif bölgeler tarafından düzenlenirler. Bunlar genellikle fibrin oluşumu ya da fibrinojen yüzey etkileşimlerin bir sonucu olarak evrim geçirmektedir.

Fibrinojen molekülü üç farklı peptid zincirinin ikili setlerinden oluşmaktadır. İki A α -zinciri, iki B β -zinciri ve iki γ -zincirini içeren bu yapılar disülfür köprüleri ile birbirine bağlanır. Her fibrinojen zinciri ayrı bir gen tarafından kodlanır ve bu üç gen birlikte kromozom üzerinde bulunan fibrinojen gen kümesini oluşturur. Bu moleküller, her biri çift

sarmal bölümler tarafından merkezi E-bölgesine bağlı iki dış D-bölgesi içererek 46nm yapılar şekilde uzamıştır. E bölgesi kadar D bölgesi de fibrinojenin fibrine dönüşümü, fibrinin düzenlenmesi, çapraz bağlanması, trombosit etkileşimi (trombin substratı) gibi birçok olayda önemli bir rol oynamaktadır. Fibrinojen bir akut-faz proteinidir. Fibrinojen sentezi ya inflamasyonun erken aşamalarında ya da interlökin-6 (IL-6) ve glukokortikoidler ile muamele edildiğinde artar. Fibrinojen sentezi doğrudan bu üç genin artan transkripsiyonu ile ilgilidir (Laurens vd. 2006; Brissett vd. 2003). Bu üç fibrinojen zincirinin transkripsiyonu sıkı eşgüdüm içindedir. *In vitro* çalışmalar β -zincirinin sentezinin hız sınırlayıcı olduğunu ve diğer iki genin ifadesi ile yukarı doğru regüle olduğunu göstermektedir (Laurens vd. 2006; Roy vd. 1994). A α -zincirinin COOH-terminal bölgesi çeşitli süreçlerin düzenlenmesinde önemli bir rol oynar. Bu süreçler, fibrin oluşumu, faktör XIII aktivasyonunu, fibrinolizisin düzenlenmesini ve hücre adezyonunu içermektedir.

Pıhtılaşma kademesinin son aşamasında trombin, fibrinopeptit A ve B'yi fibrinojen A α ve B β -zincirlerinin amino terminal bölgelerinden ayırır. Çözünür fibrinojen fibrin monomerlerine dönüşür ve bu da çözünmeyen fibrin polimerlerini ve fibrin fiber ağlarını oluşturur. Bu fibrin ağı iki γ -zinciri ya da bir γ -zinciri ile bir α -zinciri arasında gerçekleşen transglutaminaz reaksiyonları tarafından fibrin pıhtısının çapraz bağlandığı polimerizasyon süresi boyunca trombin tarafından aktive edilen FXIIIa ile kararlı hale getirilir (Weisel vd. 1993). Bu çapraz bağlar fibrine kararlılık sağlar ve plazmin tarafından fibrinin degradasyonunu önleyen koruyucu bir bariyer olarak işlev görür (Scott vd. 2004).

Karaciğer, plazma fibrinojeninin birincil kaynağıdır. Ancak fibrinojenin küçük bir kısmı akciğer epitelinden üretilmektedir. Bu süreç IL-6, IL-1 β ve glukokortikoidler gibi sitokinler tarafından düzenlenmektedir (Nguyen vd. 2000). Fibrinojen matrikse bağlanmanın yanısıra, ayrıca hücre yüzeyine de bağlanır. Fibroblast büyüme faktörü-2 (FGF-2) ve vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) gibi büyüme faktörleri özel olarak fibrinojene (ve fibrine) bağlanır. Bu durum gösteriyor ki fibrinojen yalnızca hemostaz için değil aynı zamanda homeostaz içinde önemlidir. Bu verilere göre fibrinojen, yara iyileşmesinde hücre tipine spesifik mekanizmalara katkıda bulunabileceği hasarlı dokuların hücre dışı matriks bölgelerinde toplanmaktadır (Rybarczyk vd. 2003).

Fibrin yapısı, fiberlerin kalınlığı, dallanma noktalarının sayısı, gözeneklilik ve geçirgenlik gibi değişkenler ile açıklanabilir. Fibrin matriksin yapısı onun biyolojik fonksiyonunu etkilemektedir. Örneğin daha kalın matriksler daha hızlı fibrinolizis gösterir. Pıhtılaşma hızı (trombin derişimi ve tuz içeriği ile düzenlenebilir) ve polimerleşme hızı (FXIII derişimi ve FXIII aktivasyon hızı ile belirlenebilir) gibi birçok koşul fibrin yapısını etkiler. Klor iyonları fibrin polimerizasyonunun düzenleyicisi olarak ifade edilir çünkü bu iyonlar kalınlaşmayı ve sertleşmeyi engelleyerek fiberlerin boyutlarını kontrol eder (Di Stasio vd. 1998; Standeven vd. 2005). Trombin derişimi polimerizasyon sürecinde önemli bir etkidir. Yüksek derişimler (1U/mL) ince fiberlerin oluşumunu artırırken, düşük derişimler (0,001 U/mL) kalın fiberlerin oluşumuna neden olur (Carr vd. 1978).

Fibrin(ojen) ve proteinler: Doku tipi plazminojen aktivatörü, plazminojen ve FXIII gibi birçok hemostaz proteini fibrinojen ve fibrine bağlanır. Özellikle fibrinolitik sistemde hemostaz anjiyogenezi de içerdiği için bunların yara iyileşmesinde önemli etkileri vardır. Bir yaranın fibrinöz matriksi ayrıca fibronektin ve vitronektin gibi diğer plazma proteinlerini de içerir. Fibronektin ve vitronektin, endotel hücreler üzerindeki $\alpha_5\beta_1$ ya da $\alpha_v\beta_3$ reseptörlerine bağlanarak düz kas hücreleri ile fibrin arasında köprü molekülü olarak davranabilir (Ikari vd. 2000). Ek olarak, fibronektin özellikle α_C bölgesi aracılığıyla fibrin bağlar. Bu bağlanma bölgesi fibrinojende etkin değildir ancak fibrinde meydana çıkar. Vitronektin ise doğrudan fibrin ile ilişkilidir (Makogonenko vd. 2002).

Fibrin(ojen) ve hücreler: Fibrin(ojen) birçok hücre-hücre etkileşiminde köprü molekül olarak işlev görmektedir. Ayrıca hasarlı, inflamasyonlu ya da enfeksiyonlu bölgede hücrelerin çoğalabileceği, kendilerine özgü işlevlerini yürütebileceği geçici kritik bir matriks sağlar. Fibrinojen ve fibrin kaplı matrikslerin endotel hücrelere, düz kas hücrelerine, keratinositlere, fibroblastlara ve lökositlere bağlandığı düşünülmektedir. Bu hücreler, hücre yüzey integrin reseptörleri ve integrin dışı (örneğin VE-Cadherin, I-CAM-1, P-Selektin ve GPIIb) reseptörler aracılığı ile doğrudan fibrin(ojen)e bağlanabilmektedir (Bennett vd. 2001). A ve B alt ünitelerini içeren zarlararası hücre adezyon molekülleri olan integrinlerin fibrinojen ya da fibrine bağlantığı gösterilmiştir. İntegrinler lökositlerde $\alpha_M\beta_2$, trombositlerde $\alpha_{IIb}\beta_3$ ve endotel hücreler ile fibroblastlarda $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$ ve $\alpha_5\beta_1$ şeklindedirler (Farrell vd. 1997; Gailit vd. 1997). Çekirdekli hücreler tarafından pıhtı

retraksiyonu yara iyileşmesinde uygun ortam sağlamada çok önemlidir. Pıhtıdaki fibrinojene $\alpha_5\beta_1$ integrinlerinin bağlanması pıhtı retraksiyonunu ve hücreşeklinin değişimini tetikler.

Fibrinojen ve fibroblastlar: Yara iyileşmesi süresince, fibroblastlar yara yatağına göç ederler ve bu süreç yaralanmadan sonraki beş gün içerisinde başlar. Özellikle PDGF ve TGF β gibi büyüme faktörleri, fibrin ve fibronektin ile birlikte fibroblastların çoğalmasını, uygun integrin moleküllerini ifade etmesini ve yara bölgesine göç etmesini uyarır (Laurens vd. 2006). Ayrıca, yara yatağındaki fibrin ağının yapısı fibroblastların çoğalmasını ve göçünü etkilemektedir.

Fibroblastlar yara bölgesine geldikten sonra, diğer hücre dışı matriks proteinlerinin yanı sıra tip I kollajen üreterek fibrin ile yer değiştirir. Yedinci günde çeşitli hücre dışı matriks elemanları birikmiş olur ve fibroblastlar miyofibroblast fenotipine geçer, plazma membranına yakın sitoplazmik bölgede aktin demetleri ile bütünleşir. Bu miyofibroblastlar hücre dışı matrikse ulaşır ulaşmaz yalancı ayaklarını genişletir ve fibronektin ve kollajen gibi hücre dışı matriks moleküllerine tutunduktan sonra yalancı ayaklarını yeri çekerler. Bu süreç bitmiş olduğunda fibroblastlar apoptozise girerler (Clark 1993).

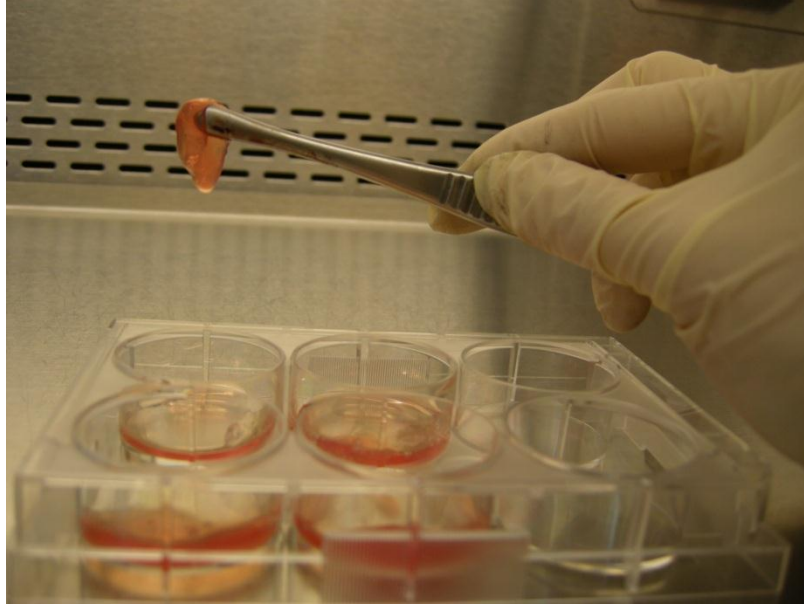
Fibrin ve Anjiyogenez: Anjiyogenez, endotelial hücrelerin yeni kapillerler üretmek amacıyla çoğalmasının ve hücre dışı matrikse göçünün VEGF yada FGF-2 gibi büyüme faktörleri tarafından uyarıldığı kompleks bir süreçtir. Hücre dışı matriksin endotelial hücreler tarafından işgali plazminojen aktivatör/plazmin sistem ve matriks metalloproteinazların proteolitik enzimleri tarafından kontrol edilir. Hücreler çoğalır ve uzar, damar stabilizasyonu perisitlerle etkileşim ve bazal membranın yeniden şekillenmesi ile sonunda tamamlanmış olur. VEGF ve FGF-2 gibi büyüme faktörlerine ek olarak fibrinin anjiyogenez üzerinde doğrudan etkili olduğu, subkutan olarak kobay farelere implante edilen fibrin içerikli haznelerin 4 gün içinde anjiyogenik yanıtı sebep olduğu çalışmalarla gösterilmiştir (Koolwijk vd. 1993; Pepper vd. 1990). Fibrinin endotelial adezyon ve anjiyogenez konusundaki destekleyici rolüne ek olarak, fibrinojen degradasyon ürünlerinin anjiyogenez inhibitörü olarak davrandığı son çalışmalarla daha açık hale

gelmiştir. Fibrinojen degradasyon ürünü E, alfastatin olarak bilinen kararlı β bandı dizisini içerir ve bu *in vitro* ve *in vivo* anjiyogenezi inhibe eder (Lauren vd. 2006).

Fibrin Yapıştırıcılar: Fibrin yapıştırıcı ürünleri saflaştırılmış fibronojen ve trombinden oluşur. Bu iki bileşen karıştırıldığında, fibrin pıhtı oluşur ve bu pıhtı hemostazı sağlamak için ve özellikle yaranın kapatılmasında diğer yöntemlerin kullanılmadığı durumlarda birçok cerrahi işlemde doku yapıştırıcısı olarak kullanılır (Rosso vd. 2005).

Fibrin yapıştırıcı matriksler ayrıca yara iyileşmesini tetiklemek için de kullanılabilir. Fibroblastlar ya da keratinositlerin fibrin çözeltisine eklendiği ve böylece fibrin yapıştırıcının yara bölgesine ekstra fibroblast taşıyıcısı olarak kullanılmasıyla iyileşme sürecinin geliştirildiği çalışmalarda umut vadeci sonuçlar elde edilmiştir (Horch vd. 2001; Cox vd. 2004). Farklı fibrin yapıştırıcı preparatlarının sonuçları birbirinden farklıdır. Bu durum fibrinojenin kalitesi ve fibrinojen çözeltisi içerisinde mevcut olan ek faktörlerin farklılığı ile açıklanabilir. Bu ek faktörler, koagülasyonu, fibrinolizisi (FXIII, plazminojeni plazminojen aktivatör inhibitör ve trombin) ve büyüme faktörlerini (TGF β , FGF-2 ve VEGF) içerir. Örneğin FXIII içeren yapıştırıcı gerilme kuvvetinin artmasını, pıhtının kararlılığını ve fibrinin α C-bölgesine fibronektin bağlanmasını tetikler (Makogonenko vd. 2002).

Özetle, fibrinojen pıhtılaşma mekanizmasında yapışkan bir ağ oluşturan ve yara iyileşmesinde geçici destek sağlayan fibrine dönüşür. Fibrinin yapısal içeriği ve hücrelere, proteinlere bağlanması yara iyileşmesi sürecini yüksek oranda belirler. Geçici bir matriks olarak davranmasının ötesinde fibrin, hücre adezyonu, göçü, çoğalması ve tübüler oluşum gibi fibrin aracılı yanıtları tetiklemek için hücreleri etkin bir şekilde toparlar. Bu olaylar ayrıca doğal olarak ortaya çıkan yüksek molekül ağırlıklı ve düşük molekül ağırlıklı fibrinojen varyantları ile düzenlenmektedir. Yüksek molekül ağırlıklı fibrinojen yara iyileşmesi sırasında yararlı olan hücre büyümesi ve damar oluşumunu tetiklemektedir.



Şekil 2.10 Fibrinojen/trombin etkileşimi ile fibrin jel oluşumu

2.2.3.2 Alginat

Alginat deniz yosunlarından ve bakterilerden elde edilen bir polisakkarit olup, β -D-mannuronik asit ve α -L-guluronik asit monomerlerinden oluşan lineer bir polisakkarittir. Ca^{2+} gibi iki değerlikli katyonlar varlığında iyonotropik jel formunda bulunur. İki ve çok değerlikli katyonlar alginatla çarpaz bağ yapar ve alginat jel oluşumu gerçekleşir. Alginat küreleri oluşturmak için en sık kullanılan yöntem iyonotropik jelasyon yöntemidir. Bu yöntemde jelleşmeyi sağlayan iyonu içeren bir çözelti ortamına (ör. 10-100 mM kalsiyum klorür çözeltisi) alginat çözeltisinin (~%2-4 arasında) bir enjektör kullanılarak damlatılmasıyla alginat küreler oluşturulur (Østberg vd. 1994). Bu çalışmada alginatın uygun şartlarda mikroküre oluşturma özelliği kullanılarak fibrin mikroküreler oluşturulmuştur.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1 Materyal

Deney hayvanlarıyla ilgili tez çalışması kapsamındaki tüm işlemler T.C. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü'nün çalışma izni verdiği Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi DMBNL Deney Hayvanları Birimi'nde ve Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 29/03/2012 tarih ve 2012-7-53 numaralı kararı çerçevesinde gerçekleştirildi.

TZP kaynağı olarak kullanılan tam kan, erişkin sağlıklı Wistar soyu sıçanlardan elde edildi. Fibrin mikrokürelerin eldesi boyunca kullanılan tüm kimyasallar Sigma firmasından (St. Louis, MO, ABD) temin edildi. Hücre kültürü çalışmalarında, hücrelerin ekilip çoğaltıldığı steril doku kültür kapları (Corning, NY, ABD), besiyeri olarak α -MEM (Minimum Essential Medium Alpha Medium) (Sigma), besiyeri katkısı olarak L-glutamin, penisilin-streptomisin (antibiyotik-antimikotik) ve fetal sığır serumu (FBS) (Sigma), hücrelerin pasajlanması işleminde ise tripsin/EDTA çözeltisi (Sigma) kullanıldı. Çalışmaların tamamı laminer akışlı steril kabinde (Nuaire) yapıldı ve hücre kültürleri 37°C, %5 CO₂, %95 nem ortamını sağlayan bir karbondioksitli inkübatörde (Heracell 240®, Waltham, MA, ABD) gerçekleştirildi.

Fibrin mikroküreler içerisine enkapsüle edilmiş hücrelerin belirli zaman noktalarındaki mitokondriyel dehidrogenaz aktivitelerinin belirlenmesinde MTT [3-(4,5-dimetildiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür] kiti (Sigma) kullanıldı ve ölçümler UV multi plaka okuyucu (Biotrak II, Amersham Biosciences, ABD) cihazında alındı.

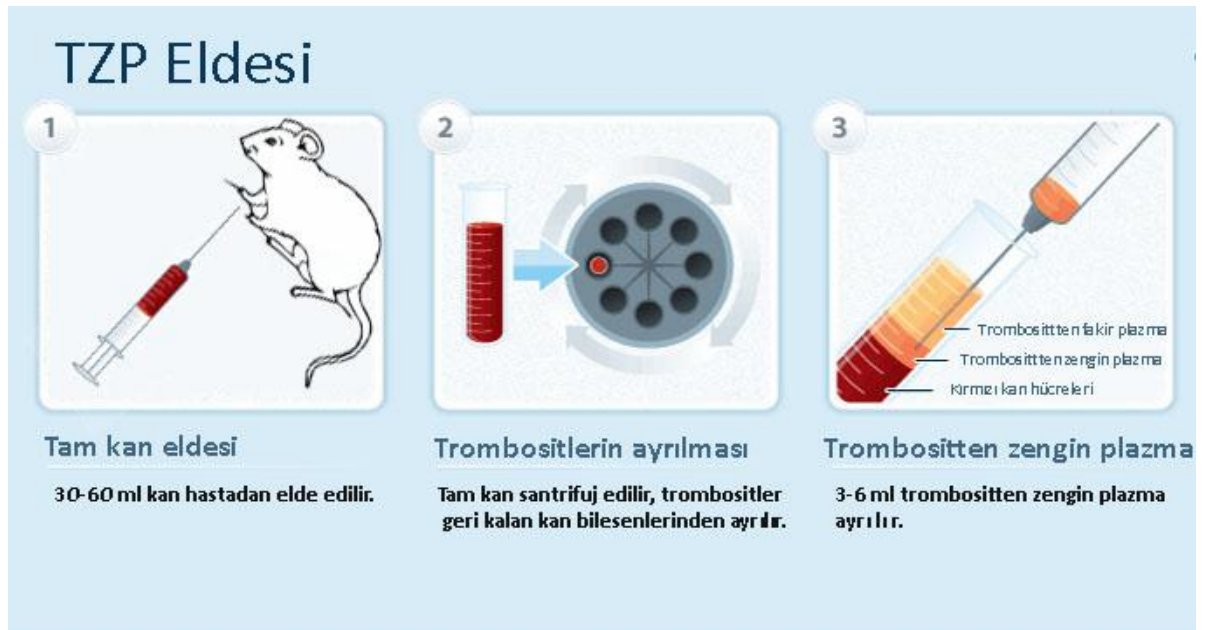
Kesit alma işleminden sonra örnekler, hematoksilin ve eosin (H&E) (Sigma), periyodik asit schiff (PAS) (Sigma) ve Masson trikrom (Sigma) ile boyanıp Leica araştırma mikroskobunda (Wetzler, Almanya) görüntülendi.

3.2 Yöntem

3.2.1 Fibrin mikrokürelerin oluşturulması

TZP Eldesi: 8-12 haftalık Wistar soyu sıçanların kalbinden tam kan aspire edildi. Elde edilen tam kan antikoagülan olarak sitrat çözeltisi içeren santrifüjtüplerine aktarılarak 1800 rpm’de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası üst kısmı kan plazması, alt kısmı ise eritrositlerden meydana gelen iki fazlı bir karışım elde edildi.

TZP’nin eldesi için üst faz ayrı bir santrifüj tüpüne aktarıldı ve 3600 rpm’de süre ile santrifüj edildi. İşlem sonrası elde edilen iki fazın alt kısmından TZP, üst kısmından ise TFP elde edildi. Elde edilen her iki plazma da kullanıma kadar aksiyel karıştırıcı üzerinde ve oda sıcaklığında bekletildi.

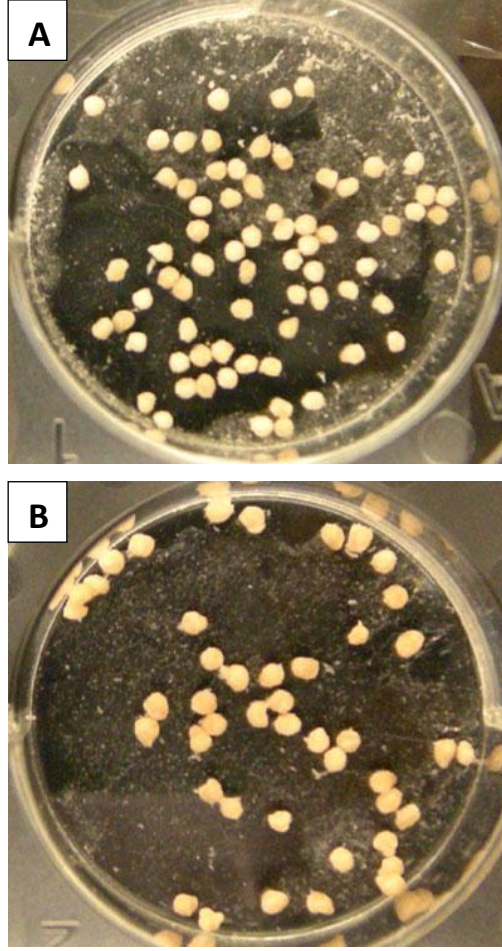


Şekil 3.1 TZP eldesinin basamakları.

Fibrin-alginat mikrokürelerin oluşturulması: Deneyde kullanılmak üzere üretilen mikroküreler, hücreli TZP mikroküre, hücresiz TZP mikroküre ve kontrol amaçlı olarak hücreli TFP mikroküre, hücresiz TFP mikroküre olmak üzere dört gruba ayrıldı. Bu amaçla, 0,9 M kalsiyum klorür çözeltisi serum fizyolojik (%0,85 NaCl) içerisinde hazırlandı.

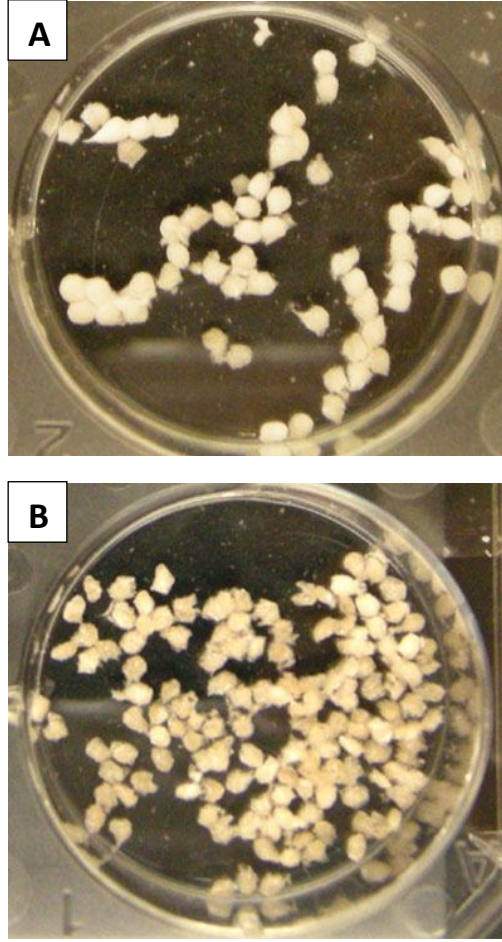
Sitratlı tam kandan elde edilen TZP, kullanılabildiği kadar oda sıcaklığında aksiyel karıştırıcı üzerinde çalkalandı. Daha sonra TZP-alginat karışımı elde edildi. İzole edilen ve pasaj 3'e kadar kültüre edilen hücreler 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 10 mM HEPES, 10 mM glukoz, 0,02% EDTA içeren çözelti içerisinde (Perka vd. 2001) süspansiyon haline getirildi (4.0×10^6 hücre/mL).

Elde edilen hücre süspansiyonu TZP-alginat çözeltisine ilave edilerek TZP-alginat-hücre karışımı elde edildi. Karışım dikkatli bir şekilde pipetleme yapılarak homojen hale getirildi ve iğne ucu iç çapı 25G olan bir enjektöre alındı. Enjektöre alınan TZP-alginat-hücre karışımı manyetik karıştırıcı üzerinde bulunan, trombin içeren kalsiyum klorür çözeltisi içerisine yavaş bir şekilde damla damla ilave edildi. Sodyum alginat ile Ca^{2+} kationlarının bağlanması sonucu oluşan mikroküreler, jelleşme ve çapraz bağlanma aşamasının tamamlanması amacıyla 15 dakika trombin çözeltisi içerisinde karıştırıldı. Elde edilen küreler 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 10 mM HEPES, 10 mM glukoz, 0.02% EDTA içeren çözelti ile iki kez yıkandı.



Şekil 3.2 (A) Hücresiz liyofilize TZP-alginat, (B) Hücresiz liyofilize TFP-alginat

Saf fibrin mikrokürelerin eldesi: Mikrokürelerin yapısında bulunan alginatın uzaklaştırılması amacıyla fibrin-alginat küreler 55 mM sodyum sitrat, 150 mM NaCl ve 30 mM EDTA (pH 6.8) içeren çözelti (Mok vd. 1994) içerisinde 15 dakika bekletildi. Besiyeri ile yıkanan hücreler, %20 fetal sığır serumu, 2 mM L-glutamin, 100 μ L/mL penisilin-streptomisin içeren besiyeri içerisinde, 37°C'da, %5 CO₂, %95 hava, %90 nem içeren ortam şartlarında inkübe edildi.



Şekil 3.3 (A) Hücresiz liyofilize TZP, (B) Hücresiz liyofilize TFP

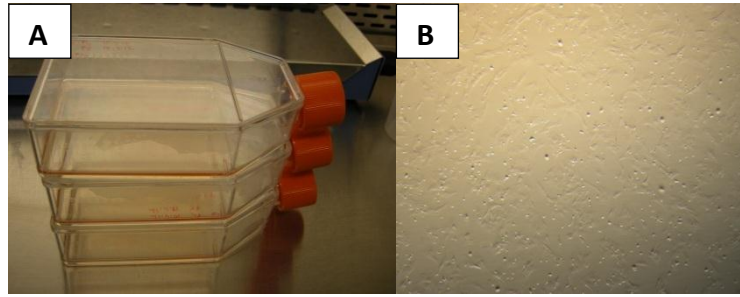
3.2.2 *In vitro* hücre kültürü çalışmaları

3.2.2.1 Sıçan Kİ-MKH'lerinin izolasyonu

Kİ-MKH'leri standart protokollere göre 8-12 haftalık 200-250g ağırlığındaki Wistar soyu sıçanların femur ve tibialarından izole edildi. Bu amaçla, avertin ile anestezi (10 mL/kg) sonrası sıçanın her iki bacağındaki femurlar ve tibialar çıkarıldı. %70'lik etanol ile etraflarındaki yağ ve kas kalıntıları iyice temizlenerek alt ve üst kısımlarından kesildi. İçerisinde 5 mL α -MEM besiyeri bulunan 25 G'lik enjektör yardımıyla kemik iliği hücreleri santrifüj tüpüne aktararak 1100 rpm'de 10 dakika süreyle santrifüj edildi. Santrifüj sonrası çözeltilinin üst kısmı atıldı ve 5'er dakika 1100 rpm'de 3 kere santrifüjleme işlemi yapılarak hücreler besiyeri ile yıkandı.

3.2.2.2 Hücre kültürü

Yıkama işlemlerinin ardından elde edilen Kİ-MKH'leri, %20 fetal sığır serumu (fetal bovine serum; FBS), 2 mM L-glutamin, 100 µL/mL penisilin-streptomisin içeren α -MEM içerisinde, 37°C'da, %5 CO₂, %95 hava, %90 nem içeren hücre kültürü şartlarında inkübe edildi. Kültürün üçüncü gününde kültür kabına yapışmayan hücreler, besiyeri değiştirilerek uzaklaştırıldı. Haftada üç kez besiyeri değiştirilerek, yapışan hücrelerin kültürüne devam edildi. Hücreler %80-90 bolluk noktasına geldiğinde, %0,25 tripsin ve 1 mM EDTA içeren çözelti yardımıyla kap yüzeyinden kaldırılarak pasajlama işlemi yapıldı.



Şekil 3.4 (A) Kİ-MKH kültür işlemi, (B) faz-kontrast mikroskobu görüntüsü.

3.2.3. *In vivo* çalışmalar

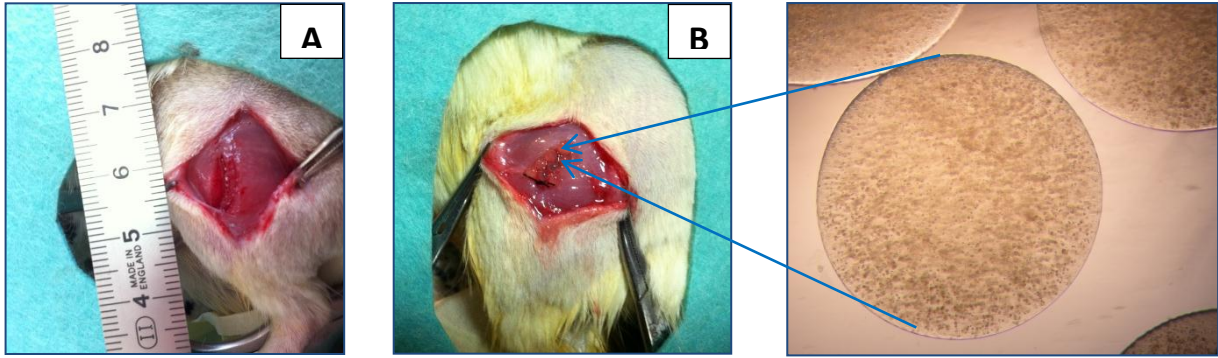
3.2.3.1 *In vivo* yara modelinin oluşturulması

20-24 haftalık Wistar soyu dişi sıçanlara ksilazin (10mg/kg) ve ketamin hidroklorür (60mg/kg) intraperitoneal ile anestezi uygulandı. Her bir sıçan (36 adet), operasyon bölgesi traş edilerek asepsi ve antisepsi kurallarına uygun olarak hazırlandı. Ameliyat nominal aseptik şartlar altında gerçekleştirildi. Sıçan, vücut sıcaklığının düşmemesi için izotermal bir destek üzerine yatırıldı. TZP, sıçan kalbindenşırınga ile aspire edilen kandan çeşitli santrifüj aşamaları sonucunda elde edildi. Standart hücre kültürü şartlarında (%5 CO₂, %95 bağıl nem, 37°C) çoğaltılan kök hücreler fibrin mikroküreler içerisinde küre başına 20.000 hücre olacak şekilde enkapsüle edildi ve küreler kültür ortamına alındı. Herbir sıçan için iki taraflı biceps femoris kasında 4x5x6 mm³ boyutlarında defekt oluşturuldu.

3.2.3.2. Fibrin mikrokürelerin transplantasyonu

In vivo çalışmalar 36 adet wistar sıçan ile yapıldı. Deneyler şu şekilde gruplandırıldı; 1)TZP kaynaklı hücreli/hücreli fibrin mikroküreler transplante edilen grup (12 adet denek), 2) TFP kaynaklı hücreli/hücreli fibrin mikroküreler transplante edilen grup (12 adet denek), Transplantasyon işlemi yapılmayan kontrol grubu (12 adet).

36 adet sıçanın biceps femoris kasında açılanyara 4.0 poliglaktin iplikle iç dikiş ve 3.0 ipek iplikle dış dikiş atılarak sağlam bir şekilde dikildi. Cerrahi işlem sırasında yara bölgesi PBS ile nemli tutuldu.



Şekil 3.5 *In vivo* implantasyon çalışmaları (A) Her bir sıçanın biceps femoris kasında bir defekt oluşturuldu. (B) Fibrin mikroküreler sıçanda oluşturulan yaralı bölgeye transplante edildi.

3.2.3.3 Eksplantasyon işlemi

Transplantasyon işleminden sonraki 7. ve 14. günlerde sıçanlar eksplantasyon işlemi için tekrar ksilazin (10mg/kg) ve ketamin hidroklorür'ün (60mg/kg) intraperitoneal olarak uygulanmasıyla anesteziye alındı. Transplante edilmiş olan malzemeler eksplante edilip %10'luk formalin ile tesbit edildi. Tesbit edilen örnekler histokimya çalışmaları için 4°C de saklandı.

Örnekler alındıktan sonra hayvanlara servikal dislokasyon ile ötenazi yapıldı. Açılan her bir yaradaki şişme, sıvı sızıntısı, iltihaplanma, dikişlerin sağlamlığı gibi faktörler iyileşme süreci boyunca takip edildi.

3.2.4. Histokimyasal analizler

TZP ve TFP kullanılarak elde edilen fibrin mikroküreleri içeren hücreli ve hücresiz örnekler *in vivo* çalışmalar sonunda histoloji analizleri için tespit çözeltisi olarak kullanılan %10'luk formalin çözeltisi içerisinde bir gece boyunca bekletildi. Ertesi gün PBS ile 3 defa 10'ar dakika süreyle yıkama işlemi yapılarak örneklerdeki fazla fiksatif ve kalıntılar uzaklaştırıldı. Dehidrasyon işleminde örnekler %50, %70, %80 ve %95'lik etanol serilerinden 2x10 dakika olacak şekilde geçirilerek içerdikleri su uzaklaştırıldı. Ksilen aşamasından sonra örnekler parafine gömülüp bloklar elde edildi. Sonra, parafin blokları soğuduktan sonra kesit alma işlemine geçildi. Kesit alma işleminin ardından, lam üzerindeki örnekler hematoksilin ve eozin (H&E), periyodik asit schiff (PAS) ve masson-trikrom (MT) boya ile boyanıp Leica marka ışık mikroskopunda görüntülendi.

3.2.4.1 Hematoksilin ve eozin boyaması (H&E)

Nükleer boya olarak en fazla kullanılan hematoksilin, ağaç kabuğundan elde edilir. Hematoksilin kendi başına bir boya değildir, aslında oksidasyon ürünü olan hematein zayıf anyonik boyadır. Hemateinin dokuya afinitesi azdır, fakat metalik mordantlar eklendiğinde özellikle hücre çekirdeğine afinitesi artar ve kuvvetli boyar. Eosin, kesitlerin rutin boyanmasında en fazla kullanılan zıt boyadır.

Eosin ile en iyi boyanma yaklaşık pH 4-6'da meydana gelir. Bu boya ile eritrositler, kollajen, kas veya epitelyal hücre sitoplazmalarının boyanmasında pembenin farklı tonları seçilmelidir. Genel doku boyası olarak; nükleus ve sitoplazma ayırımında kullanılan, histolojik boyalar içinde en geniş kullanımı olan ve dokunun farklı bölgelerini farklı olarak boyayan Hematoksilin-Eosin boyasıdır.

Hematoksilin genellikle; çekirdeği mavi-siyah renkte boyayarak intranükleer detayı iyi gösterir. Eosin ise, hücre sitoplazmasını ve bağ dokusu elemanlarını çeşitli varyasyonlarda pembe, turuncu ve kırmızı renkte boyar (Ekicioğlu vd. 2005).

H&E boyaması için lam üzerindeki örnekler;

1. 2-3 dakika süreyle distile su ile nemlendirildi.
2. 8 dk süreyle Hematoksilin ile muamele edildi.
3. Hematoksilini uzaklaştırmak için 10 dakika akan su altında yıkandı.
4. %95'lik etil alkol ile muamele edildi.
5. 30 saniye-1 dakika arası Eozin ile boyandı.
6. % 95'lik etil alkolden geçirilerek fazla boyanın uzaklaşması sağlandı.
7. Hazırlanan örnekler ışık mikroskobu ile incelendi

3.2.4.2 Masson-trikrom boyaması

Üç farklı boyanın kullanıldığı bu teknik ile bağ dokusunun boyanması sağlanır. Çekirdek ve bazofilik yapılar mavi, sitoplazma açık kırmızı ya da pembe, keratin ve kas hücreleri kırmızı, kollajen ve kemik mavi ve yeşil tonlarında, hücre çekirdekleri kahverengi-siyah tonlarında görünür.

Masson Trikrom boyaması için lam üzerindeki örnekler;

1. 10 dk Weighert'in demir hematoksilin çözeltisi ile muamele edildi.
2. Distile su ile yıkandı.
3. 15 dk Biebrich Scarlet-Asit fuksin çözeltisi ile muamele edildi.
4. 5 dk distile su ile iyice yıkandı.
5. 15 dk fosfomolibdik asit-fosfotungustik asit çözeltisinde tutuldu.
6. Kesitler doğrudan (yikanmadan) 5 dk anilin mavisi çözeltisi ile boyandı.
7. Distile su ile yıkandı.
8. 1 dk asetik asit çözeltisinde tutuldu.
9. Distile su ile yıkandı
10. 1 dk % 80 ve 1 dk % 95 alkol ile muamele edildi.
11. Hazırlanan örnekler ışık mikroskobu ile incelendi

3.2.4.3 Periodik asit schiff (PAS) boyaması

PAS glikojen gibi doku karbonhidratlarının gösterilmesinde kullanılan bir tekniktir. Boyama sonucunda, glikojen, bazal membranlar, kollajen lifleri, glikolipitler ve fosfolipitler pembe-kırmızı ile mor renk arasında tonlarda (menekşe) boyanmaktadır.

Periodik asit schiff boyaması için lam üzerindeki örnekler;

1. 5 dakika distile su ile yıkandı.
2. Periyodik asit solüsyonu içinde 5 dakika tutuldu.
3. Distile su ile yıkandı.
4. Schiff reaktifi içinde 15 dakika tutuldu.
5. Distile su ile 10 dakika yıkanır.
6. Hematoksilin Gill çözeltisi ile 6 dakika muamele edildi.
7. Distile su ile 10 dakika yıkandı.
8. Diferansiyasyon işlemi için asit alkol solüsyonuna 1-3 saniye batırılıp çıkarıldı.
9. Akar su altında 10 dakika yıkandı.
10. 1 dakika % 80 alkol içinde tutuldu.
11. 1 dakika % 95 alkol içinde tutuldu.
12. Hazırlanan preparatlar ışık mikroskobu ile incelendi.

3.2.5 Taramalı elektron mikroskopisi (SEM)

TZP'den elde edilen fibrin mikrokürelerin iç yapısı SEM yöntemi ile incelendi. Bu amaçla % 2,5'lik glutaraldehit içerisinde tespit edilen bütün örneklerden fiksatifi uzaklaştırmak amacıyla saf su ile yıkama yapıldı. Daha sonra örnekler etanol serilerinden(%50, %70, %80, %90 ve %95) geçirilerek dehidrate edildi. Ardından, ince bir altın-paladyum (15 nM) tabakasıyla kaplanan örnekler Jeol JSM 5600 (Japonya) marka elektron mikroskobu ile incelendi.

3.2.6 MTT analizi

Fibrin mikroküreler içerisine enkapüle edilmiş sıçan Kİ-MKH'lerinin belirli zaman noktalarındaki (0., 7., 14. ve 21. gün) mitokondriyel dehidrogenaz aktiviteleri MTT [3-(4,5-dimetildiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür] kiti (CGD1 Sigma) kullanılarak belirlendi. Bu amaçla TZP ve TFP'den elde edilmiş hücreli ve hücretsiz mikroküreleri içeren deney gruplarından belirli zaman noktalarında eşit sayıda küre örnekleri (her bir deney grubu için 4 adet) alındı ve 96-kuyucuklu petri kabına konuldu. Petrinin içerisine 30 μ L MTT çözeltisi ve 270 μ L serumsuz besiyeri ilave edildi ve örnekler 4 saat boyunca karbondioksit inkübatöründe bekletildi. Bu sürenin sonunda mor renkli formazan kristallerinin oluştuğu gözlemlendi. Daha sonra, besiyeri ortamdan uzaklaştırıldı ve çözünmeyen formazan kristalleri, 300 μ l MTT çözücüsü (Sigma) ile çözülerek spektrofotometre cihazı ile (Biotrak II, Amersham Biosciences) 570 nm dalga boyunda absorbans ölçümü yapıldı.

3.2.7 Fourier Dönüşüm Kızılötesi (FT-IR) analizi

Mikroküre oluşumunda destek malzeme olarak kullanılan alginat, sitrat çözeltisi (PH 6.8) kullanılarak kürelerin yapısından uzaklaştırıldı. Bu amaçla küreler sitrat çözeltisinde 15 dakika bekletildi ve alginatın çapraz ağları kırılarak yapıdan ayrılması sağlandı. Alginatın kürelerin yapısından ayrıldığını doğrulamak için FT-IR spektroskopisi tekniği kullanıldı. Bu teknik incelenen örnekteki makromoleküllerin fonksiyonel gruplarının titreşimlerinden kaynaklanan yapı, bileşim ve fonksiyonel grup bilgilerinin elde edilmesini sağlar. FTIR matematiksel Fourier dönüşümü yöntemi ile ışığın infrared yoğunluğuna karşı dalga sayısını ölçen bir kimyasal analitik yöntemdir. Elektromanyetik ışık dizisinin kızıl ötesi bölgesi 14000 cm^{-1} ile 10 cm^{-1} arasındadır.

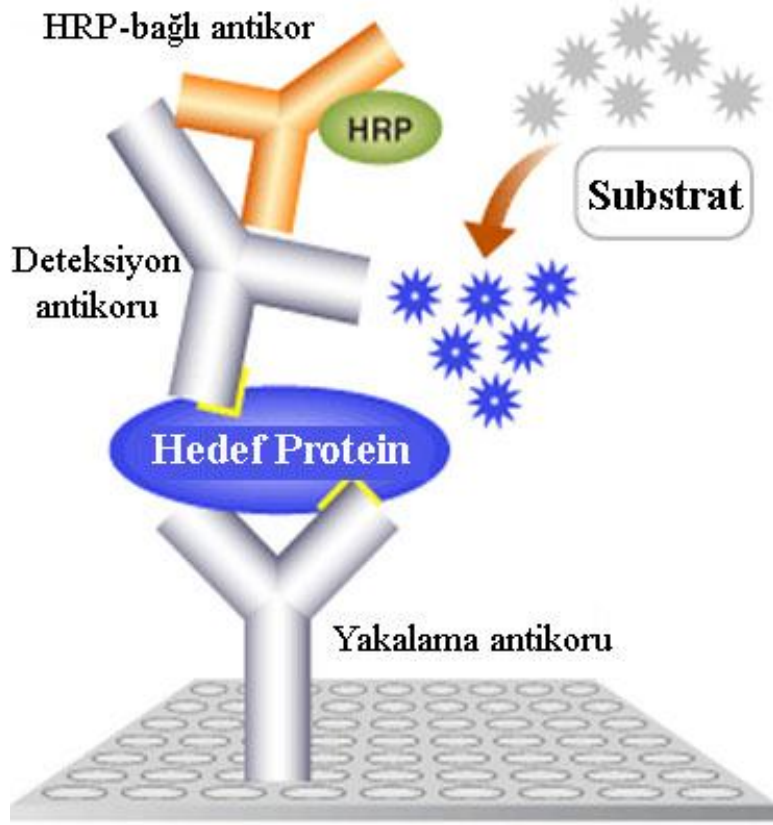
TZP/TFP kaynaklı fibrin mikroküreler ile sodyum alginat örnekleri vakum altında bir gece kurutuldu. ATR-FTIR spektrum ölçümleri Perkin Elmer-Spectrum 100 model cihazı (Waltham, MA, U.S.A.) kullanılarak gerçekleştirildi. Örnek ATR kristal yüzeyine yerleştirildi. Spektrumlar $650\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$ aralığında ve $0,5\text{ cm}^{-1}$ çözünürlükte 4 kez tarama yapılarak ölçüldü. Essential FTIR yazılımı kullanılarak veriler değerlendirildi.

Alginat kullanılarak elde edilen fibrin-alginat mikroküre, saf alginat mikroküre ve sitrat çözeltisi (PH 6.8) ile muamele edilmiş alginatın mikroküre yapısından uzaklaştırıldığı fibrin mikroküre bu yöntemde örnek olarak kullanıldı.

3.2.8 Enzim Bağlı Immünosorbent Analizi (ELISA)

Bu yöntem, bir immünosorbent (katı bir desteğe bağlı antijen veya antikor) ve enzim bağlı bir immüno-reaktant (tepki veren) kullanılan bir enzim immüno analizidir. Protein miktarını ve karmaşık biyolojik örneklerde proteinlerin aktivasyon durumunu ölçmek için güçlü bir araçtır. Bu analiz klinik tanılarda, gıda örneklerinde ve proteomik uygulamalarda mikrodizi olarak yaygınca kullanılmaktadır.

Bu çalışmada TZP kaynaklı fibrin mikrokürelerin saldığı büyüme faktörü miktarını belirlemek ve TFP kaynaklı fibrin mikrokürelerle karşılaştırmak amacıyla sandviç ELISA yöntemi kullanıldı (Invitrogen ELISA Kit, Katalog KAC1688) Sandviç ELISA'da bir antikor (yakalama antikoru) saflaştırılır ve mikrotitre kabının kuyucuklarının katı fazına bağlanır. Antijeni içeren örnek daha sonra ilave edilir ve antijen-antikor kompleksinin oluşması beklenir. Bağlanmamış proteinler yıkama basamakları ile uzaklaştırılır. Enzim işaretle ikinci bir antikor (deteksiyon antikoru), yakalama antikoruna bağlanmış antijene bağlanır ve bu sayede sandviç oluşturulmuş olur (Şekil 3.3). Bağlanmayan ikincil antikorun yıkama işlemi ile uzaklaştırılmasından sonra ortama enzime ait substrat eklenir. Substrat deteksiyon antikoruna bağlı halde bulunan enzimle reaksiyona girerek kuyucuk içinde renk değişimine neden olur. Renk yoğunluğu spektrofotometre ile ölçülür. Bu renkli ürünün yoğunluğu, fibrin mikrokürelerin saldığı büyüme faktörlerinin derişimi ile doğru orantılıdır. Çalışma, kültür ortamında bekletilen fibrin mikroküre gruplarının içerisinde buldukları besiyerlerinden 200 µl örnek alınarak ve kite ait protokole uygun olarak yapılmıştır.



Şekil 3.6 Enzim Bağlı Immünosorbent Analizi basamakları (<http://www.cellsignal.com>)

3.2.9 Fibrin mikrokürelerin su tutma kapasitesinin belirlenmesi

TZP ve TFP kaynaklı fibrin-alginat mikroküreler ile alginatı uzaklaştırılmış fibrin mikroküreler liyofilize edilerek yapısındaki su uzaklaştırıldı. Sıfırıncı zaman noktasında (t_0) kürelerin kuru ağırlıkları tartıldı (M_i). Daha sonra küreler, herbirinde 20ml distile su bulunan tüplere konularak 37 °C’de inkübe edildi. 48. saatte örnekler toplanıp yüzeylerinde bulunan su dikkatli bir şekilde uzaklaştırıldı ve su tutmuş kürelerin son ağırlıkları tartıldı (M_s). Küre gruplarının yüzde olarak su tutma kapasiteleri (%STK) eşitlik 1’e göre hesaplandı.

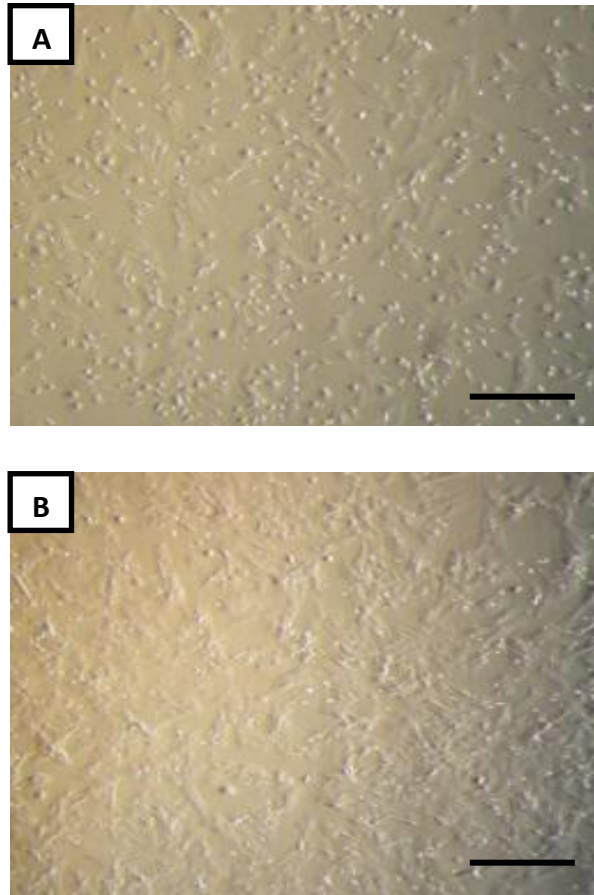
$$\% \text{ STK} = \frac{M_s - M_i}{M_i} \times 100 \quad (\text{Eşitlik 1})$$

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1 *In Vitro* Bulgular

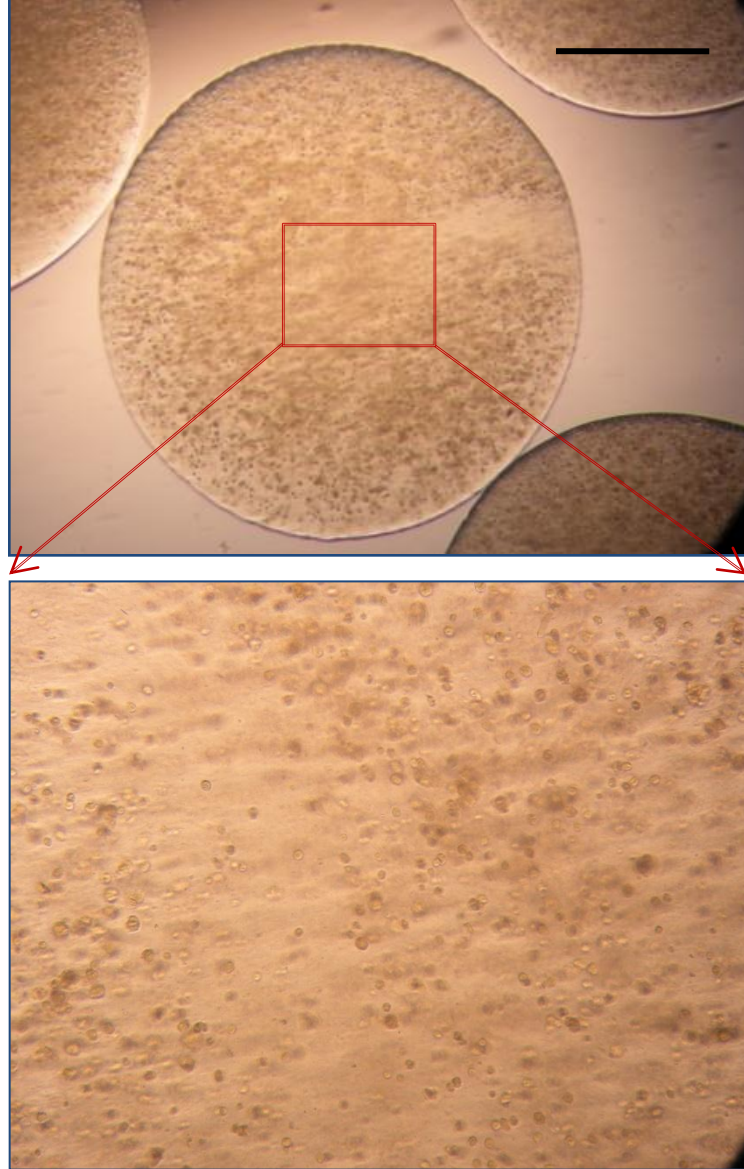
4.1.1 Faz kontrast mikroskobu bulguları

Sıçan Kİ-MKH'lerinin, 1. ve 2. pasajlardan hemen önceki faz kontrast mikroskobu görüntüleri Şekil 4.1'de gösterilmektedir. Pasajlama işlemleri ortalama 8 gün arayla gerçekleştirilmiştir. Hücrelerin ortalama 8 günde %80-90 bolluğa ulaştığı ve ilk pasajda küresel formda olan hücrelerin, ikinci pasajın 8. gününde iğ görünümlü karakteristik morfolojiye sahip olduğu Şekil 4.1'de görülmektedir.

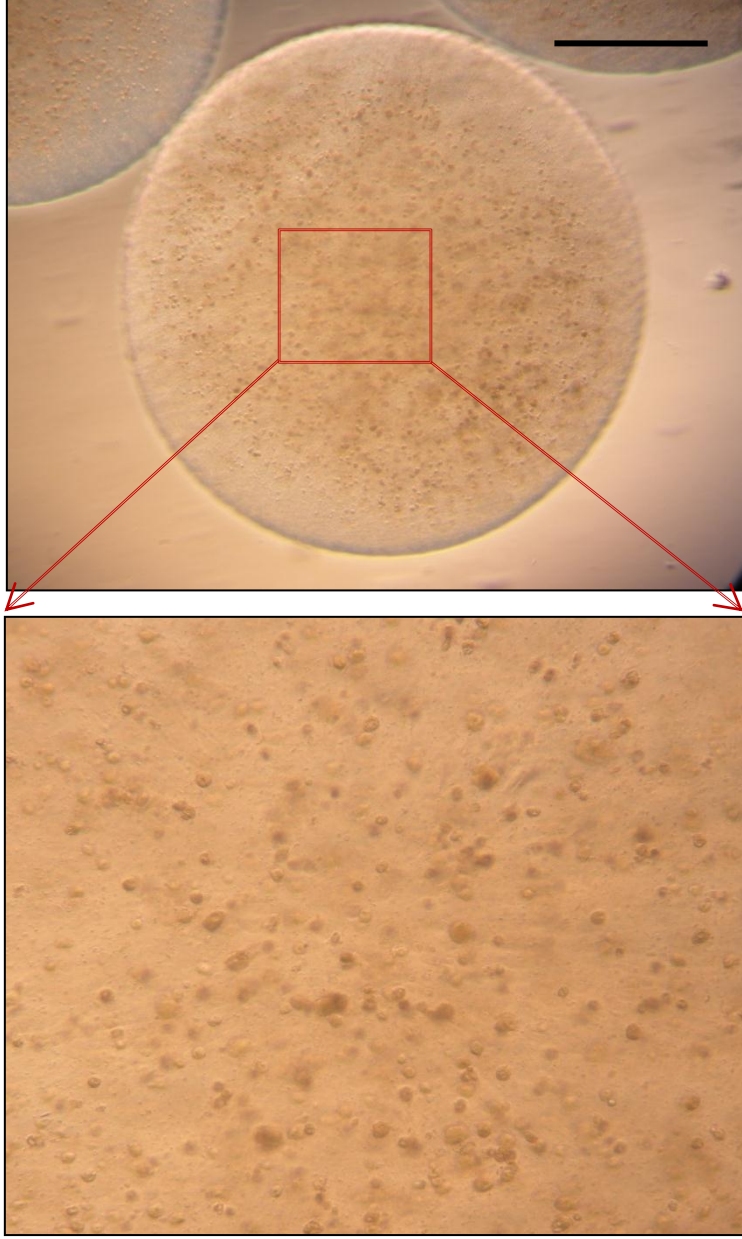


Şekil 4.1 (A) Sıçan Kİ-MKH'lerinin 1. pasajdan hemen önce (8.gün), (B) 2. pasajdan hemen önce (8. gün) elde edilen faz kontrast mikroskobu görüntüleri. Ölçek çubuğu: 150 µm

Kİ-MKH'lerini içeren ve içermeyen fibrin mikrokürelerin faz-kontrast görüntüleri incelendi ve mikrokürelerin çoğunun düzgün bir küresel şekle sahip olduğu gözlemlendi. Trombosit miktarının TZP'den elde edilen hücreli ve hücreli fibrin mikrokürelerde, TFP'dan elde edilen hücreli ve hücreli fibrin mikrokürelere oranla daha fazla olduğu görüldü (Şekil 4.2).

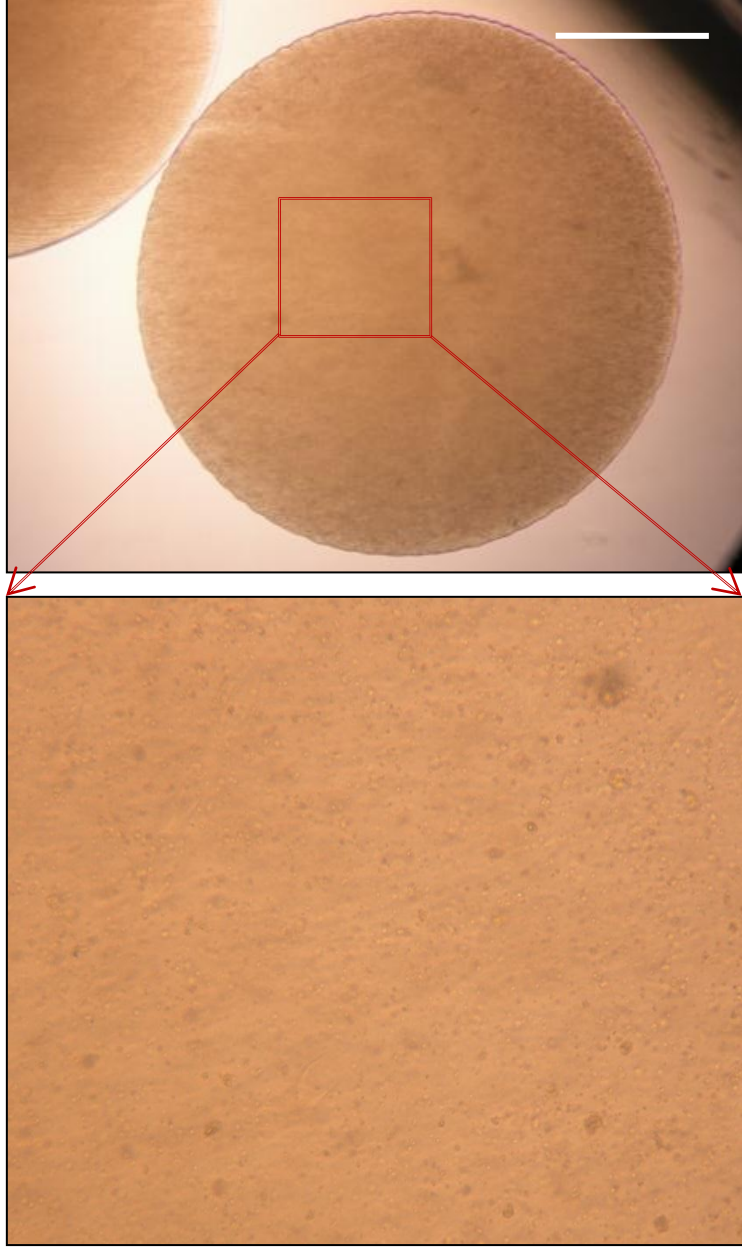


Şekil 4.2 Kİ-MKH'lerini içeren TZP kaynaklı fibrin mikrokürenin faz-kontrast görüntüsü. Ölçek çubuğu: 500 μ m

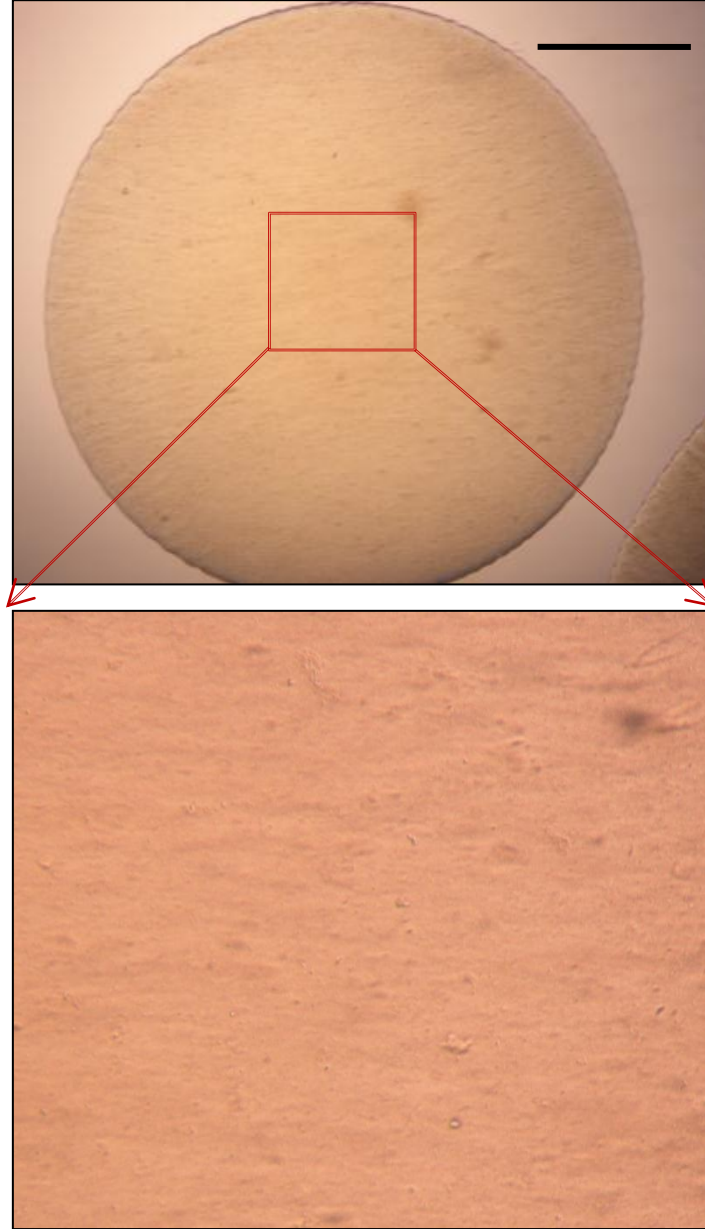


Şekil 4.3 KI-MKH'lerini içeren TFP kaynaklı fibrin mikrokürenin faz-kontrast görüntüsü.

Ölçek çubuğu: 500 μm



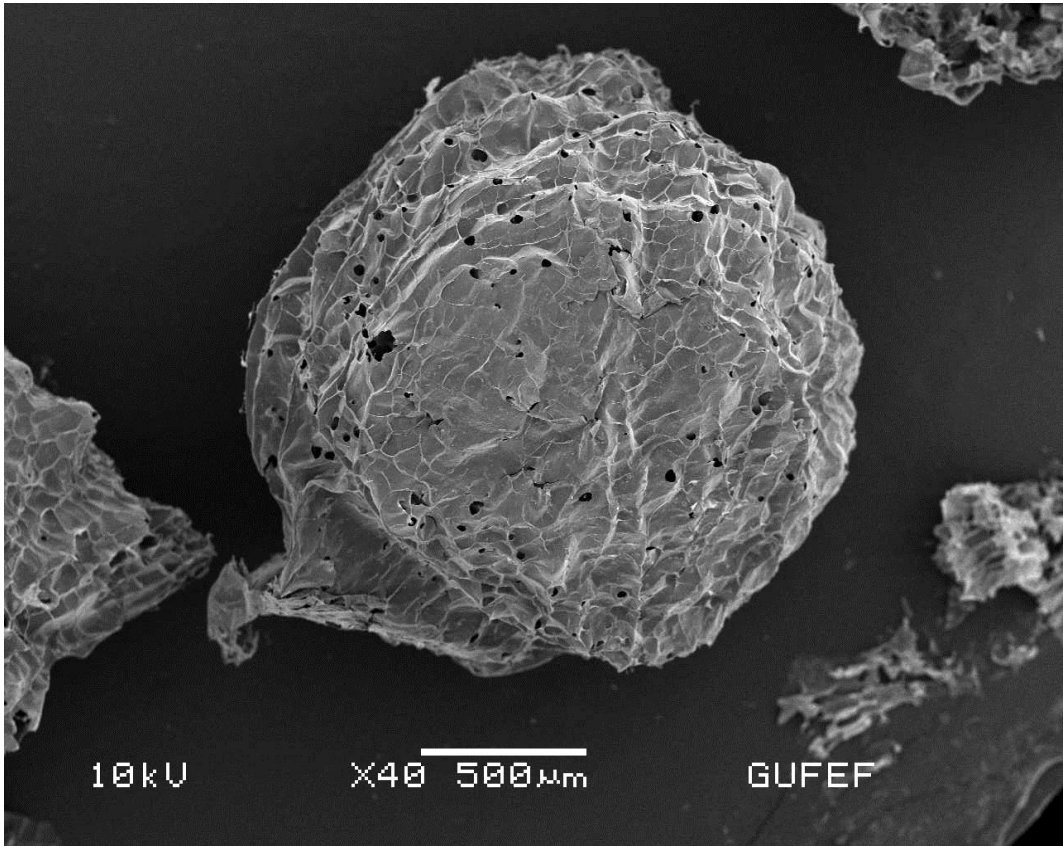
Şekil 4.4 KI-MKH'lerini içermeyen TZP kaynaklı fibrin mikrokürenin faz-
kontrastgörüntüsü. Ölçek çubuğu: 500 μm



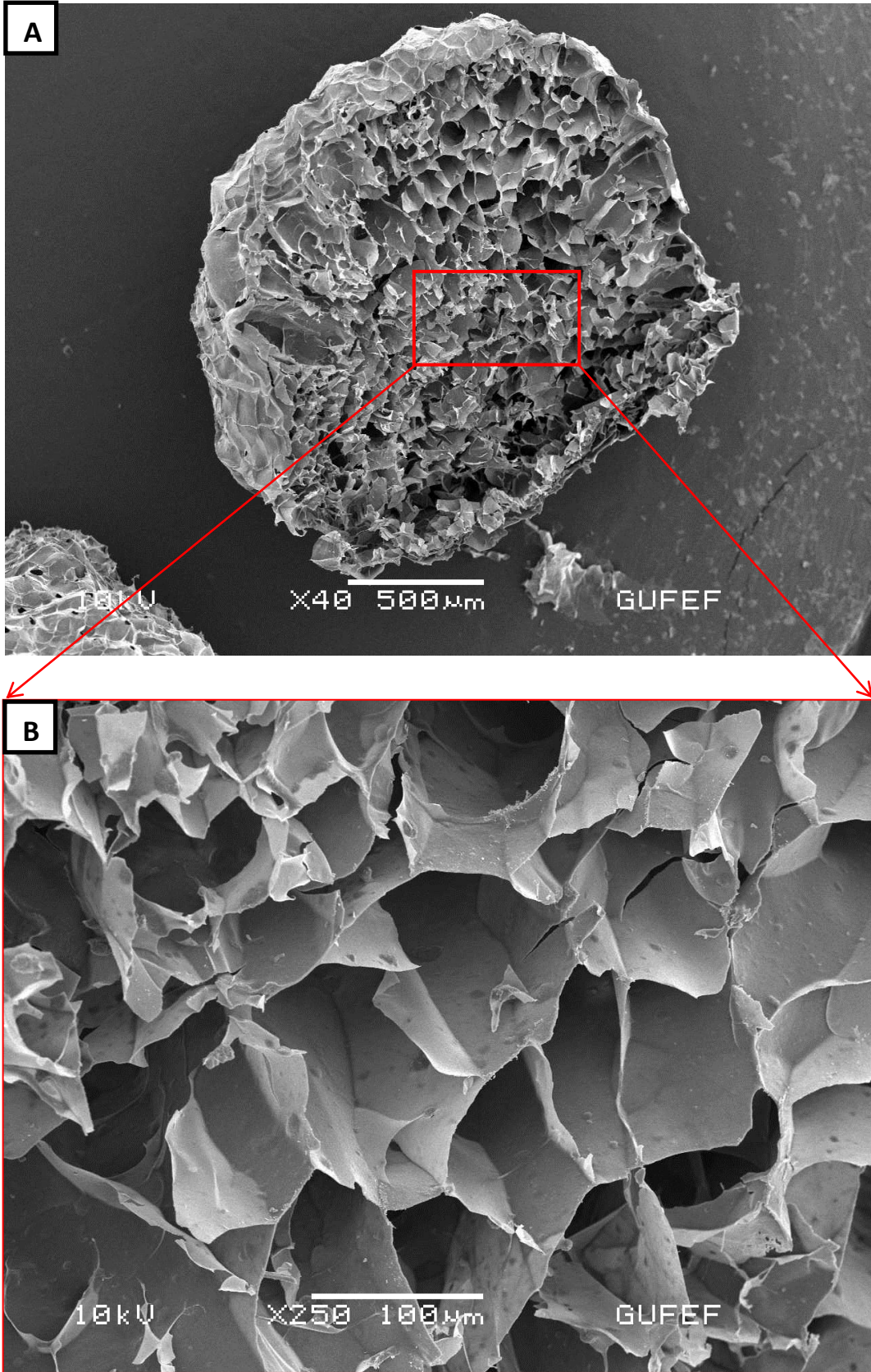
Şekil 4.5Kİ-MKH'lerini içermeyen TFP kaynaklı fibrin mikrokürenin faz-kontrast görüntüsü. Ölçek çubuğu: 500 μm

4.1.2. SEM bulguları

Bu çalışma, fibrin mikrokürelerin yüzeysel yapısını ve gözenekliliğini incelemek amacıyla gerçekleştirildi. Kürenin gözenekliliği, hücrelerin tutunması ve büyümesi için geniş bir yüzey alanı sağlamaktadır. SEM görüntüleri fibrin mikrokürelerin hücreler için adhezyon yapabilecekleri yüksek gözenekli bir yapıya sahip olduğunu gösterdi (Şekil 4.6).



Şekil 4.6 Fibrin mikrokürenin SEM görüntüsü

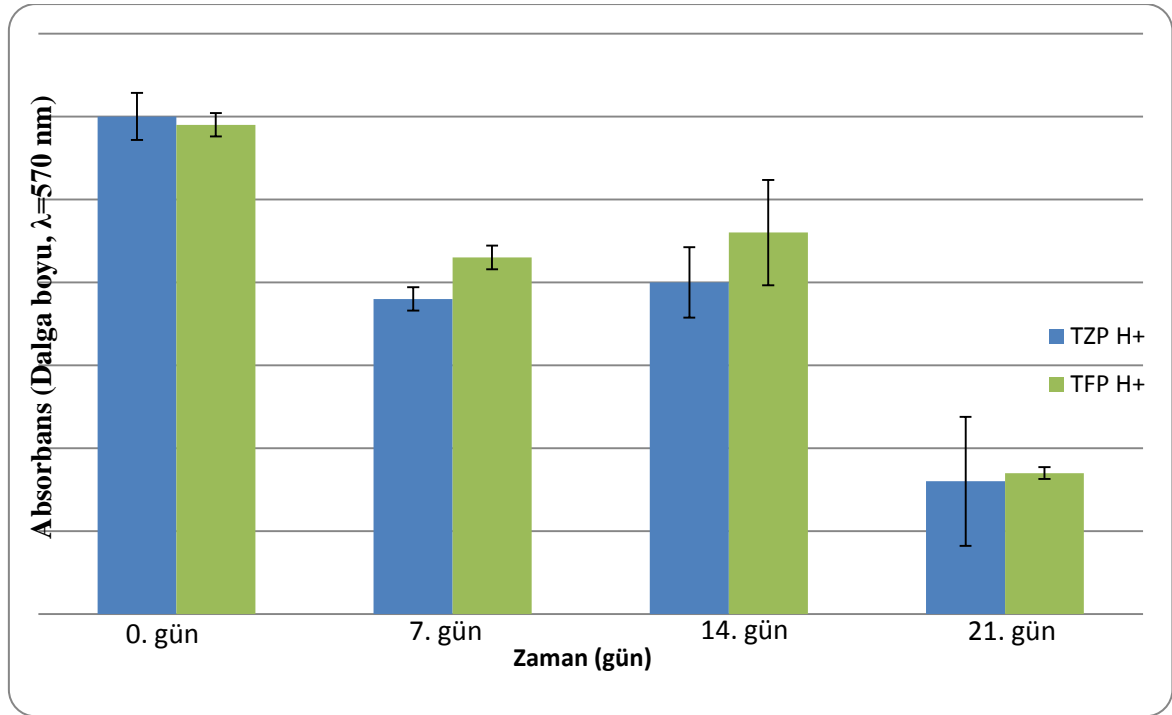


Şekil 4.7(A)Fibrin mikrokürenin enine kesit görüntüsü, (B) enine kesitin daha yüksek büyütmedeki görüntüsü

4.1.3. MTT bulguları

Belirli zaman noktalarında MTT reaktifi ile 4 saat boyunca inkübe edilen fibrin mikrokürelerin içerisindeki sıçan Kİ-MKH'lerinin mitokondriyel dehidrogenaz aktivitelerini deneysel çalışmalar boyunca sürdürdüğü spektrofotometrik ölçümlerde açıkça görülmektedir.

TZP ve TFP kaynaklı hücreli fibrin mikrokürelerin içeriğindeki trombositlerin canlılığını yitirmesi ile absorbanbs değerleri 7. günde azalmış ancak mezenkimal kök hücrelerin çoğalması ile bu değer tekrar artmıştır. 21. güne gelindiğinde hücrelerin mitokondriyel aktiviteleri azalarak sürmektedir (Şekil 4.8).

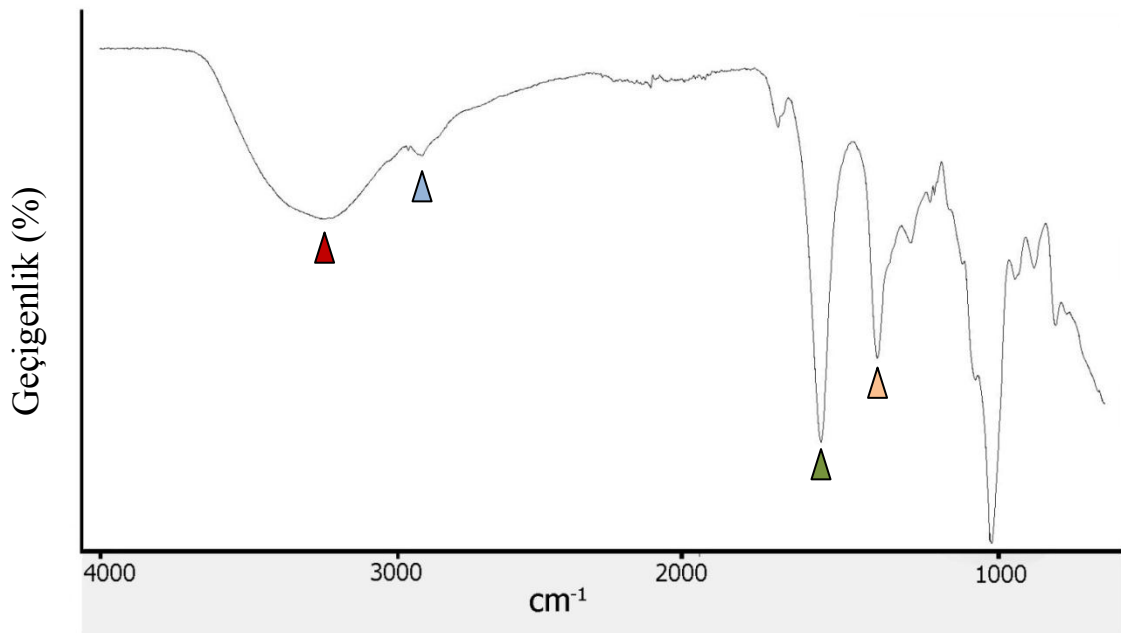


Şekil 4.8 TZP ve TFP kaynaklı fibrin mikroküreler içerisine enkapsüle edilmiş Kİ-MKH'lerinin kültürün belirli zaman noktalarında MTT ile belirlenen hücre canlılığı

P < 0,05 (P=0,46, hücreli TZP ve TFP grupları)

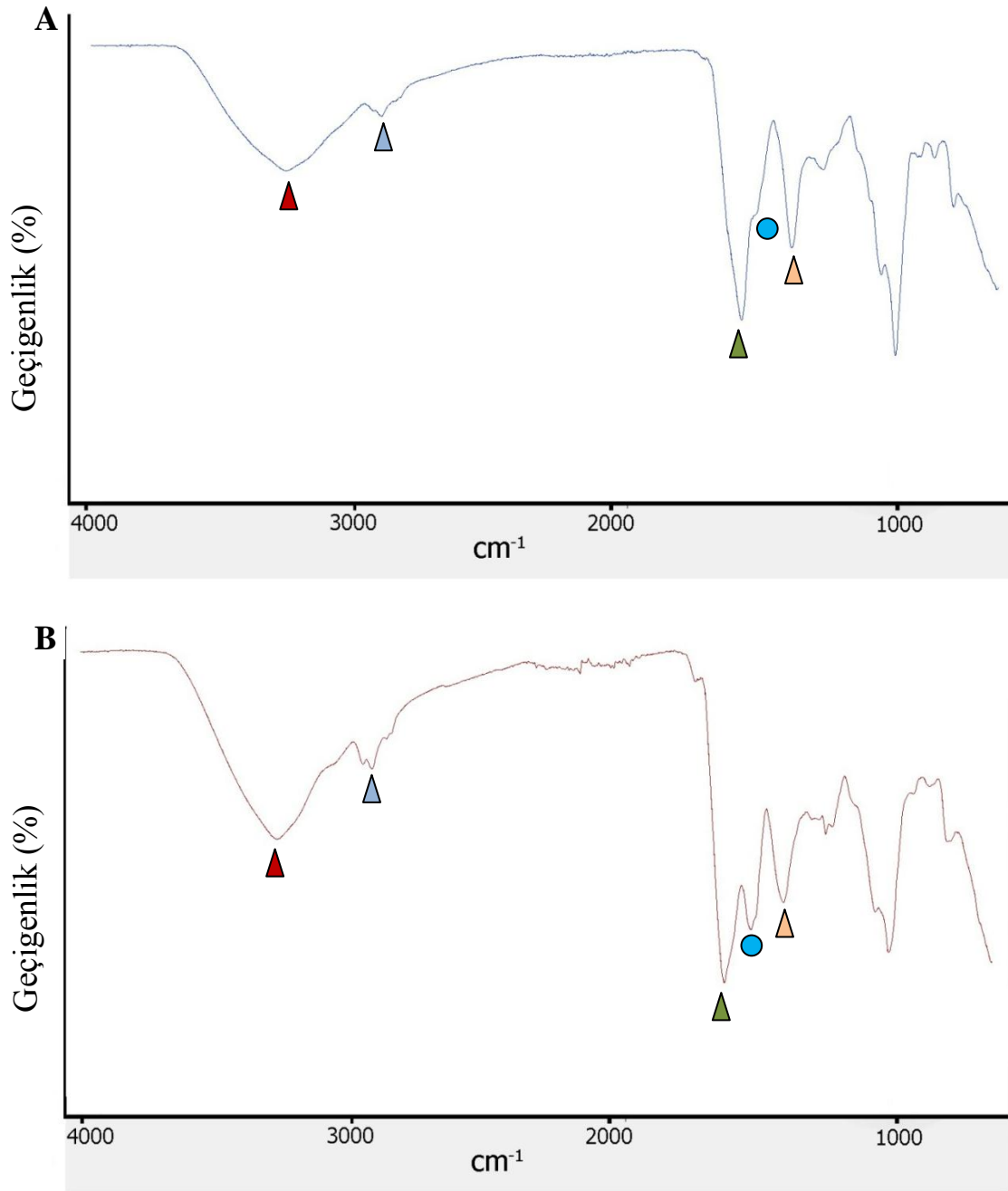
4.1.4 FT-IR bulguları

FT-IR analizleriyle TZP ve TFP kaynaklı mikrokürelerin yapısındaki alginatın sitrat çözeltisi ile muamele edilmesi sonucu uzaklaşıp uzaklaşmadığı incelenmiştir (Şekil 4.9). Sitratla muamele edilmemiş TZP ve TFP kaynaklı fibrin mikrokürelerin FT-IR analizi sonucunda alginata spesifik pikler gözlenmiştir (Şekil 4.11). Alginat için karakteristik olan –O-H piki (3428 cm^{-1}), $>\text{C}=\text{O}$ - piki (1618 cm^{-1}), –C-C piki (1418 cm^{-1}) ve –C-O-C pikinin (1091 cm^{-1} ve 1031 cm^{-1}) sitratla muamele edilmiş gruplarda şiddeti azalmıştır. Bununla birlikte fibrin mikroküre gruplarının FT-IR spektrumlarında fibrine spesifik amit II piki (1500 cm^{-1}) gözlenmiştir. TZP ve TFP kaynaklı fibrin mikroküre gruplarının FT-IR spektrumları arasında belirgin bir farka rastlanmamıştır.



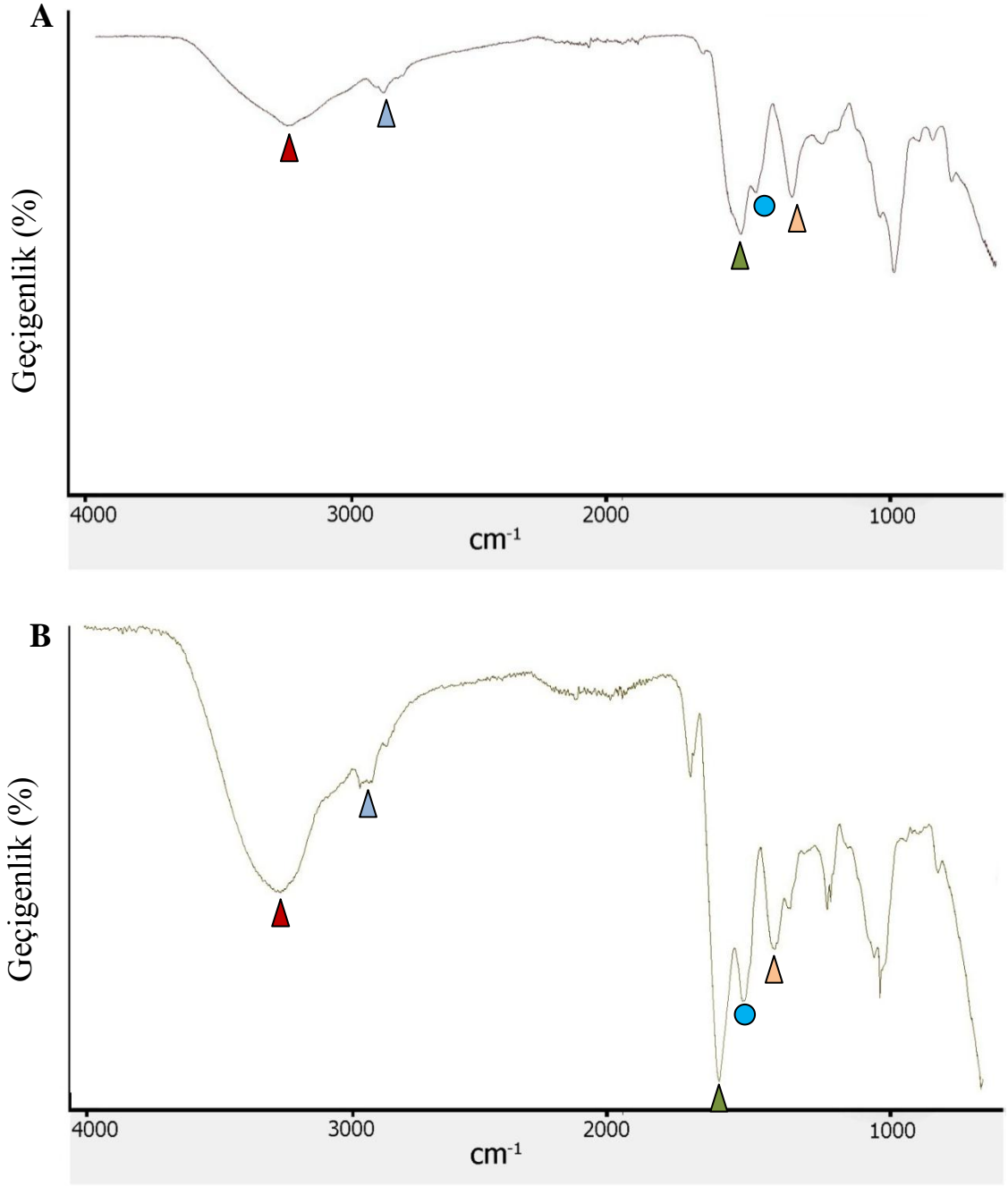
Şekil 4.9Sodyum Alginat'ın FT-IRspektrumu

▲ : O-H (3428 cm^{-1}), ▲ : C-H (2928 cm^{-1}), ▲ : $>\text{C}=\text{O}$ - (1618 cm^{-1}), ▲: C-C (1418 cm^{-1})



Şekil 4.10 (A) TZP kaynaklı fibrin mikrokürelerin FT-IR analizi, (B) TZP kaynaklı fibrin-alginat mikrokürelerin FT-IR spektrumları

▲ : O-H (3428 cm⁻¹), ▲ : C-H (2928 cm⁻¹), ▲ : >C=O-(1618 cm⁻¹),
 ▲ : C-C (1418 cm⁻¹), ● : N-H II (1500 cm⁻¹)



Şekil 4.11 (A) TFP kaynaklı fibrin mikrokürelerin FT-IR analizi, (B) TFP kaynaklı fibrin-alginat mikrokürelerin FT-IR spektrumları

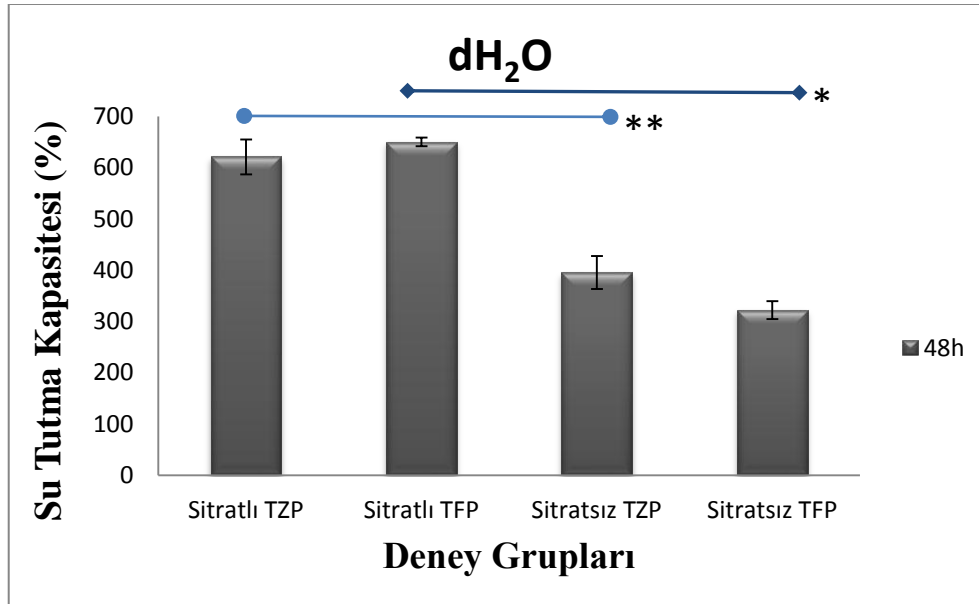
▲ : O-H (3428 cm⁻¹), ▲ : C-H (2928 cm⁻¹), ▲ : >C=O-(1618 cm⁻¹),
 ▲ : C-C (1418 cm⁻¹), ● : N-H II (1500 cm⁻¹)

4.1.5 ELISA bulguları

TFP ve TZP kaynaklı fibrin mikrokürelerin saldıkları TGF- β 1, PDGF ve VEGF miktarları ELISA yöntemi ile belirlenmiştir. Bu amaçla deney gruplarındaki küreler kültür ortamına alınmıştır. Kültürün ikinci gününde vasat örnekleri alınarak ELISA kitleri ile bu büyüme faktörlerinin pg/ml cinsinden salım değerleri elde edilmiştir. Sonuçlara göre, TZP kaynaklı fibrin mikrokürelerden TGF- β 1 salımı 400pg/ml iken TFP kaynaklı fibrin mikrokürelerden TGF- β 1 salımı 320pg/ml civarında bulunmuştur. VEGF salım miktarı her iki grupta 50 pg/ml'den düşük miktarda bulunurken, PDGF miktarı TZP grubunda 270 pg/ml, TFP grubunda ise 170 pg/ml civarında hesaplanmıştır.

4.1.6 Fibrin mikrokürelerin su tutma deneyi bulguları

37°C'de 48 saat boyunca distile su içerisinde inkübasyon işleminin sonunda, alginat içermeyen fibrin mikrokürelerde su tutma kapasitesinin alginat içerikli fibrin mikrokürelere göre daha yüksek olduğu belirlendi. Ayrıca TZP kaynaklı fibrin mikroküreler ile TFP kaynaklı fibrin mikrokürelerin su tutma kapasiteleri arasında önemli bir fark gözlenmedi (Şekil 4.12).



Şekil 4.12 Fibrin mikrokürelerin su tutma kapasitesi

* $p < 0,1$ ($p=0,012$, Citratlı ve sitratsız TZP grupları)

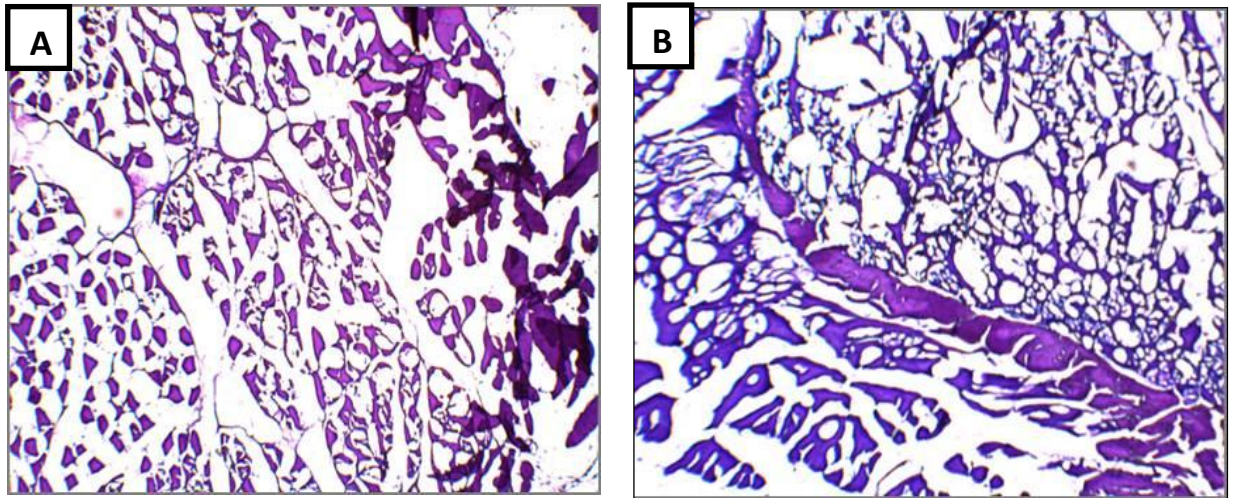
** $p < 0,1$ ($p=0,1$ Citratlı ve sitratsız TFP grupları)

4.2 *In Vivo* Bulgular

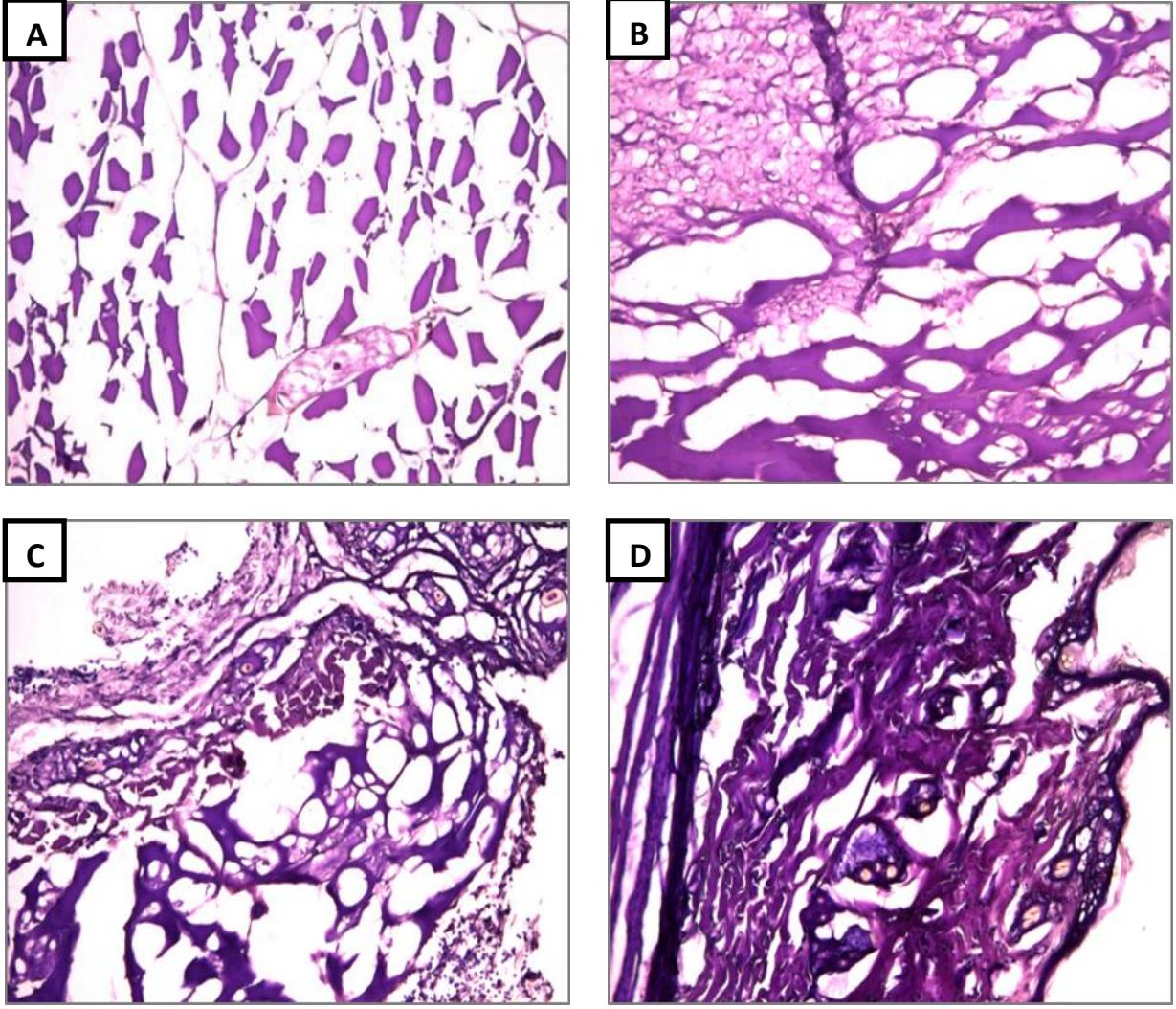
4.2.1 Histokimya bulguları

Doku örneklerinde yara iyileşmesi belirli zaman noktalarında histolojik olarak takip edildi. Doku yenilenmesi fibrin mikrokürelerin implantasyonunun 1. haftasında başladı ve ileri haftalarda devam etti. PAS boyası kullanılarak gerçekleştirilen histolojik analizler, dördüncü haftada TZP kaynaklı hücreli mikroküre grubunda yüksek miktarda yeniden damarlanma ve kollajen oluşumu ile rejenerasyonun gerçekleştiğini gösterdi.

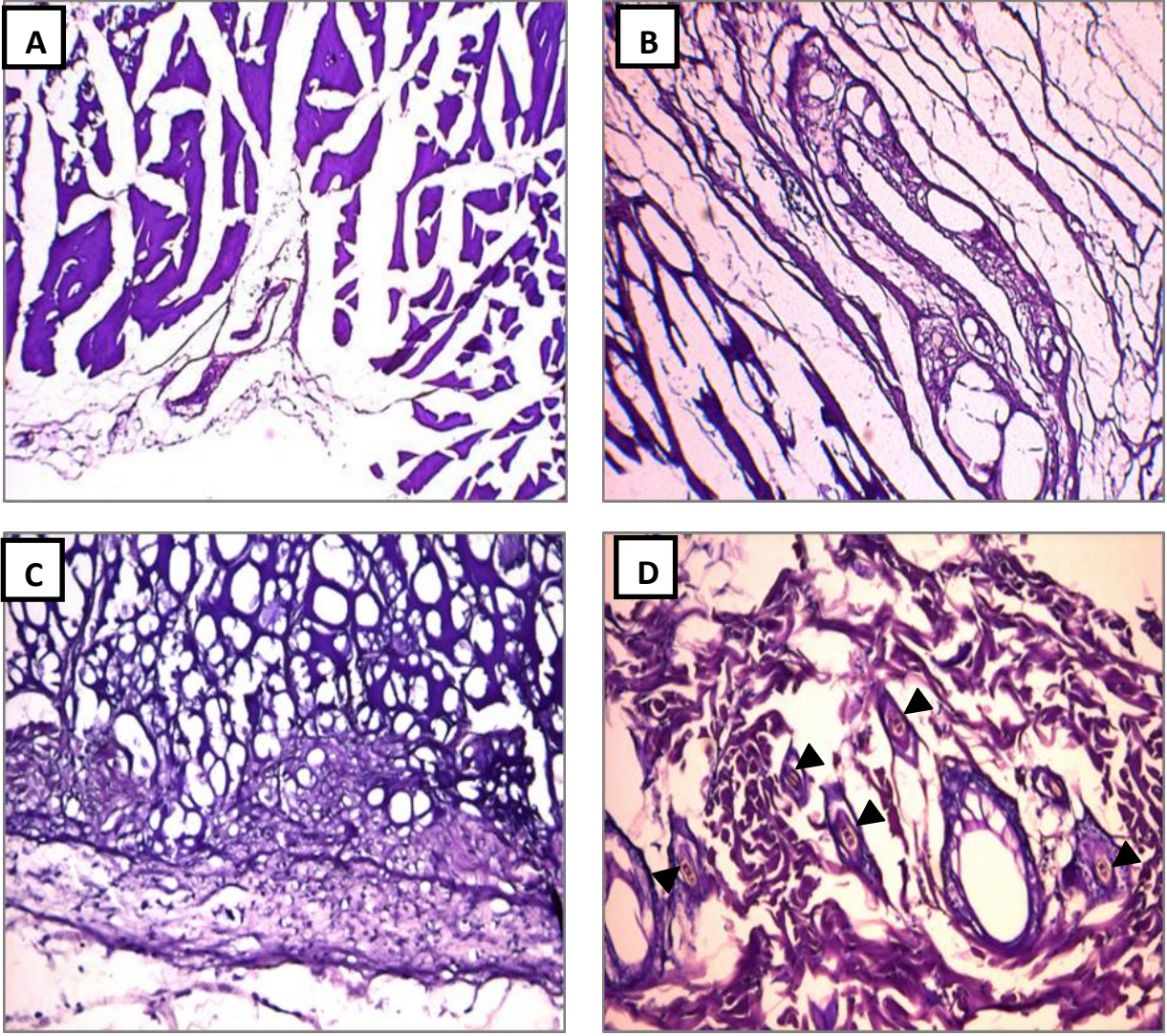
Sonuçlar TZP kaynaklı olarak oluşturulan ve KI-MKH'lerinin enkapsüle edildiği fibrin mikroküre grubunda daha kısa zamanda ve daha iyi kalitede yara iyileşmesinin gerçekleştiğini gösterdi (Şekil 4.13)



Şekil 4.13 Belirli zaman noktalarında kontrol olarak eksplante edilen örneklerin PAS boyamaları. (A) Kontrol, 7. gün; (B) kontrol 28. gün.

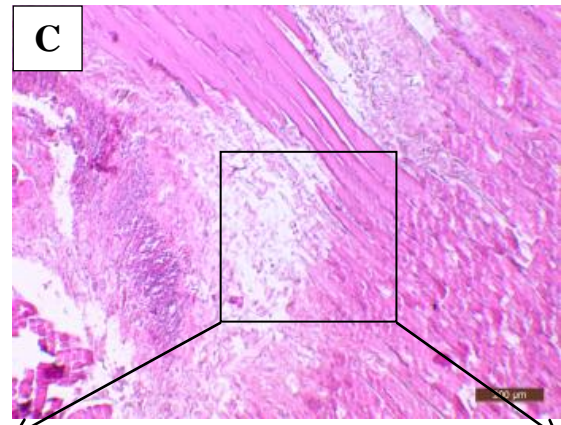
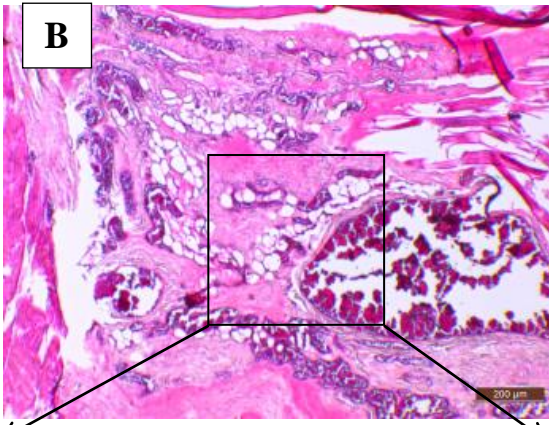
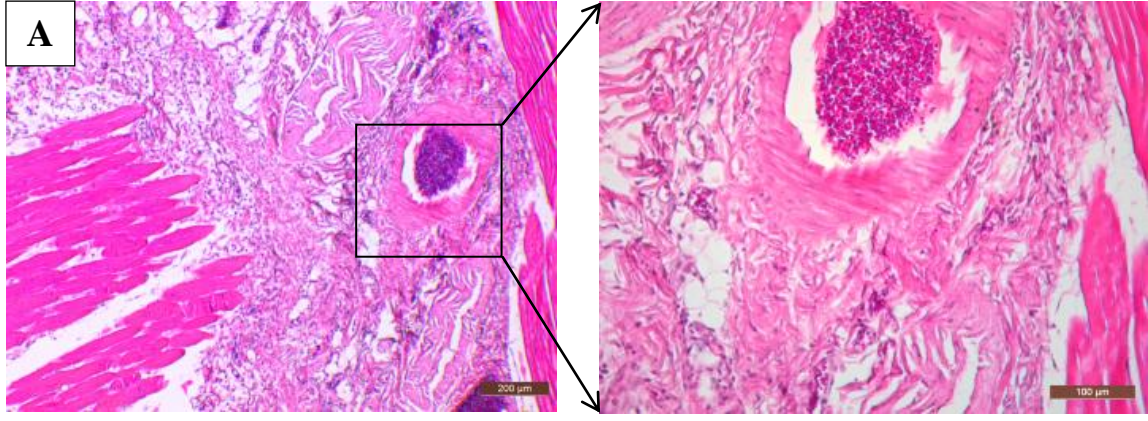


Şekil 4.14 TFP kaynaklı hücreli fibrin mikroküre grubundan belirli zaman noktalarında eksplante edilen örneklerin PAS boyamaları. (A) Hücresiz TFP, 7. gün; (B) Hücresiz TFP, 28. gün; (C) Hücreli TFP, 7. gün; (D) Hücreli TFP, 28. gün

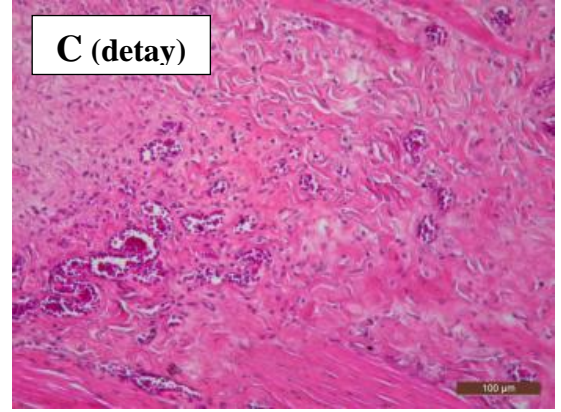
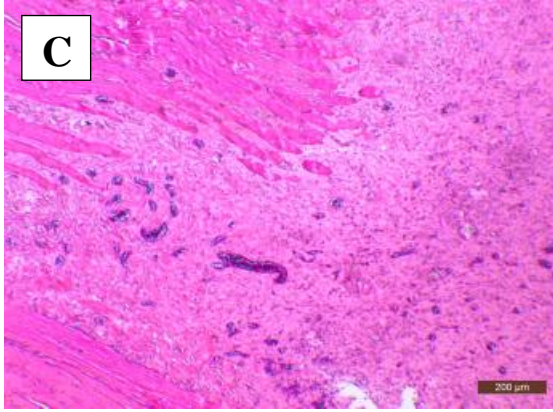
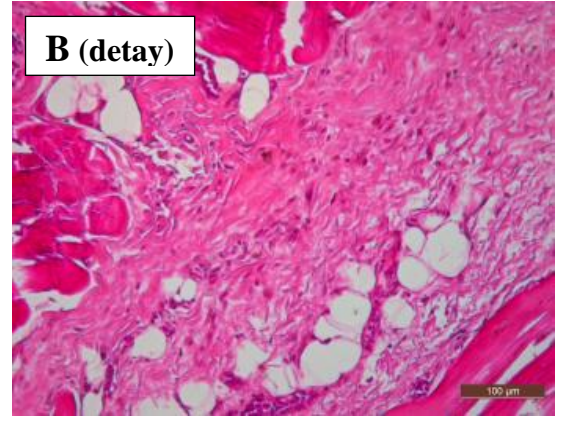
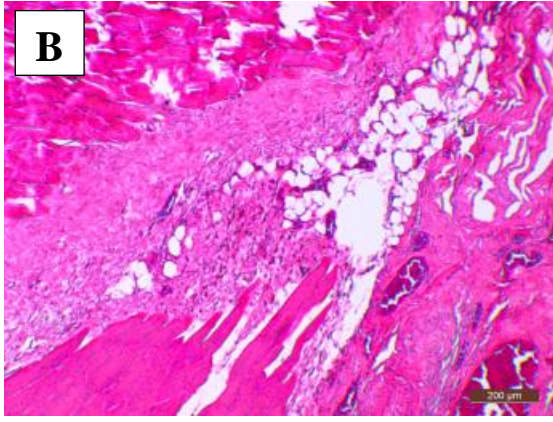
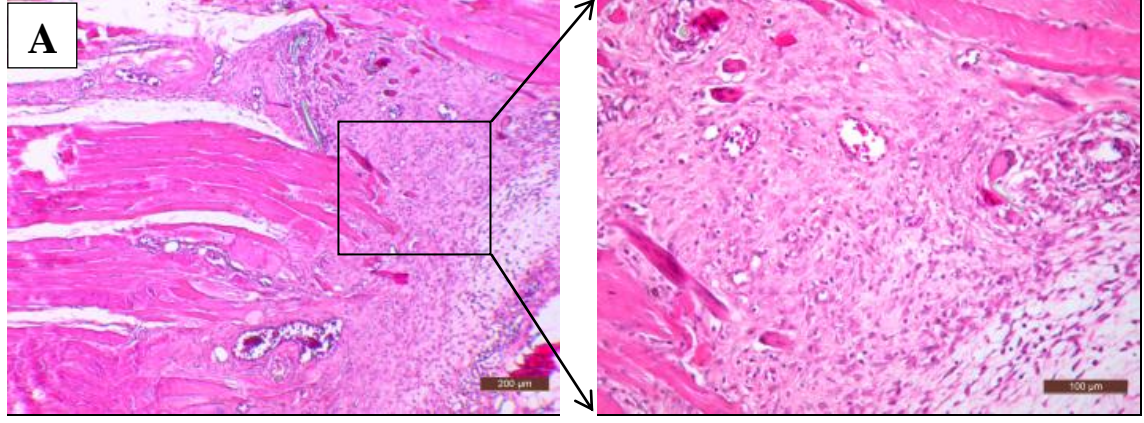


Şekil 4.15 TZP kaynaklı hücreli fibrin mikroküre grubundan belirli zaman noktalarında eksplante edilen örneklerin PAS boyamaları. (A) Hücresiz TZP, 7. gün; (B) Hücresiz TZP, 28. gün (C) Hücreli TZP, 7. gün (D) Hücreli TZP, 28 gün. (Üçgenler yeni oluşan kapillerleri işaret etmektedir.)

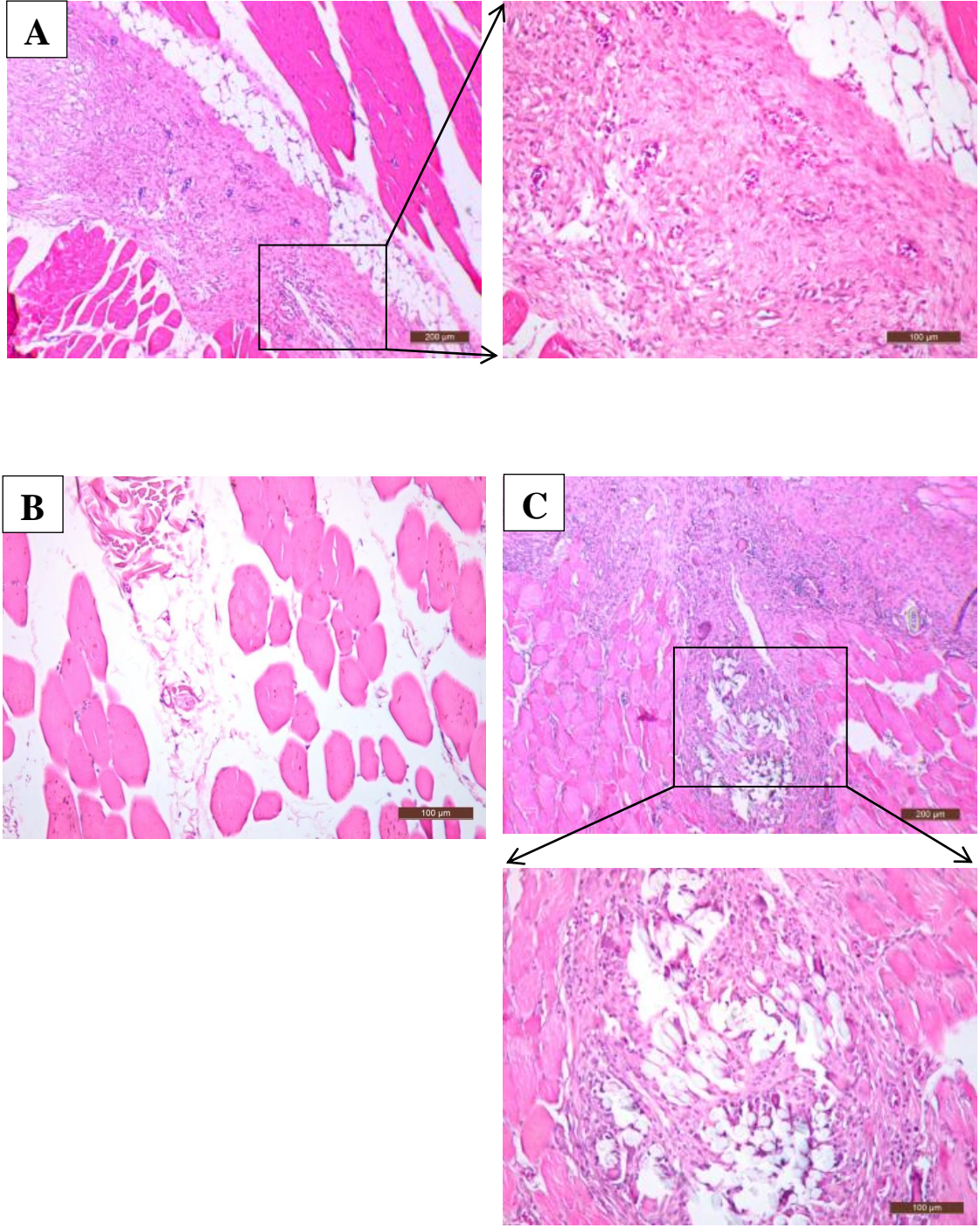
Bunun yanı sıra, *in vivo* çalışmaları takiben belirli zaman noktalarında eksplante edilen kas dokusu örneklerinde, H&E ile boyamalar sonucunda nakil ilk evrelerinde hücrelerin yoğun olduğu ve malzemenin henüz yara bölgesinde bulunduğu gözlenirken (Şekil 4.16) ileriki zaman noktalarında mikroküreler içerisindeki hücrelerin dokuyla bütünleşmeye başladığı ve mikrokürelerin yavaş yavaş degrades olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.18).



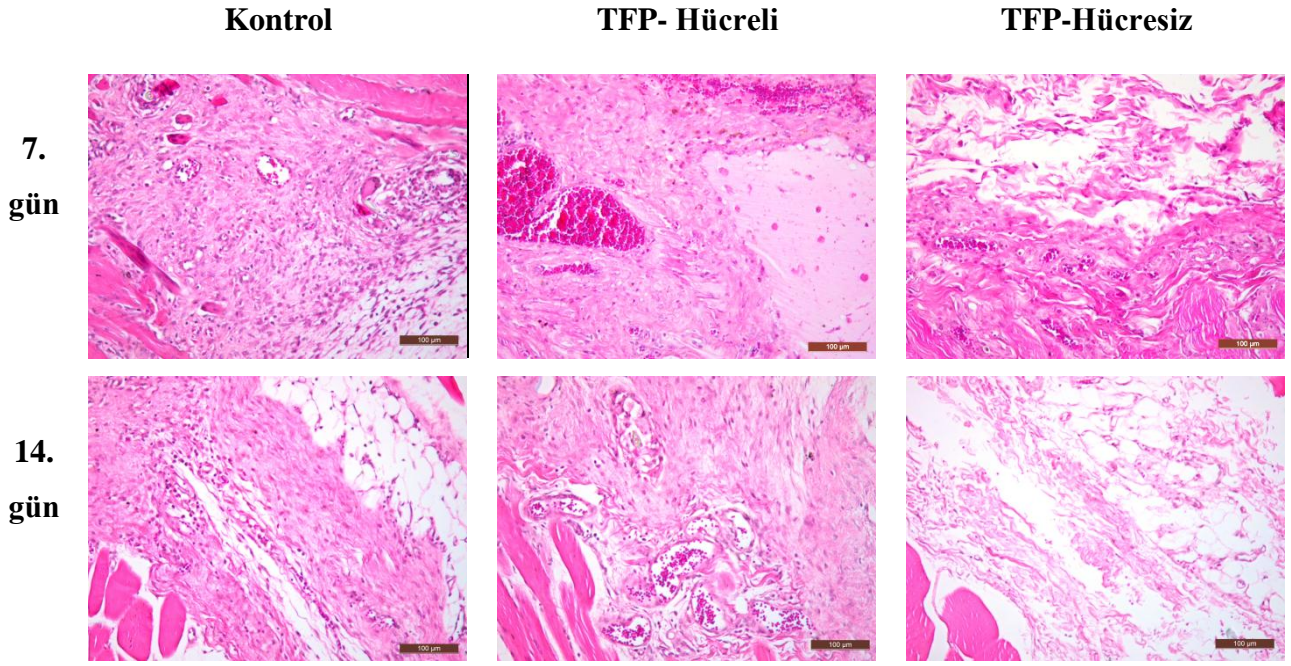
Şekil 4.16 TZP kaynaklı hücreli fibrin mikroküre grubundan 4. günde eksplante edilen örneklerin H&E boyamaları. (A) Kontrol,(B) Hücreli TZP, (C) Hücresiz TZP



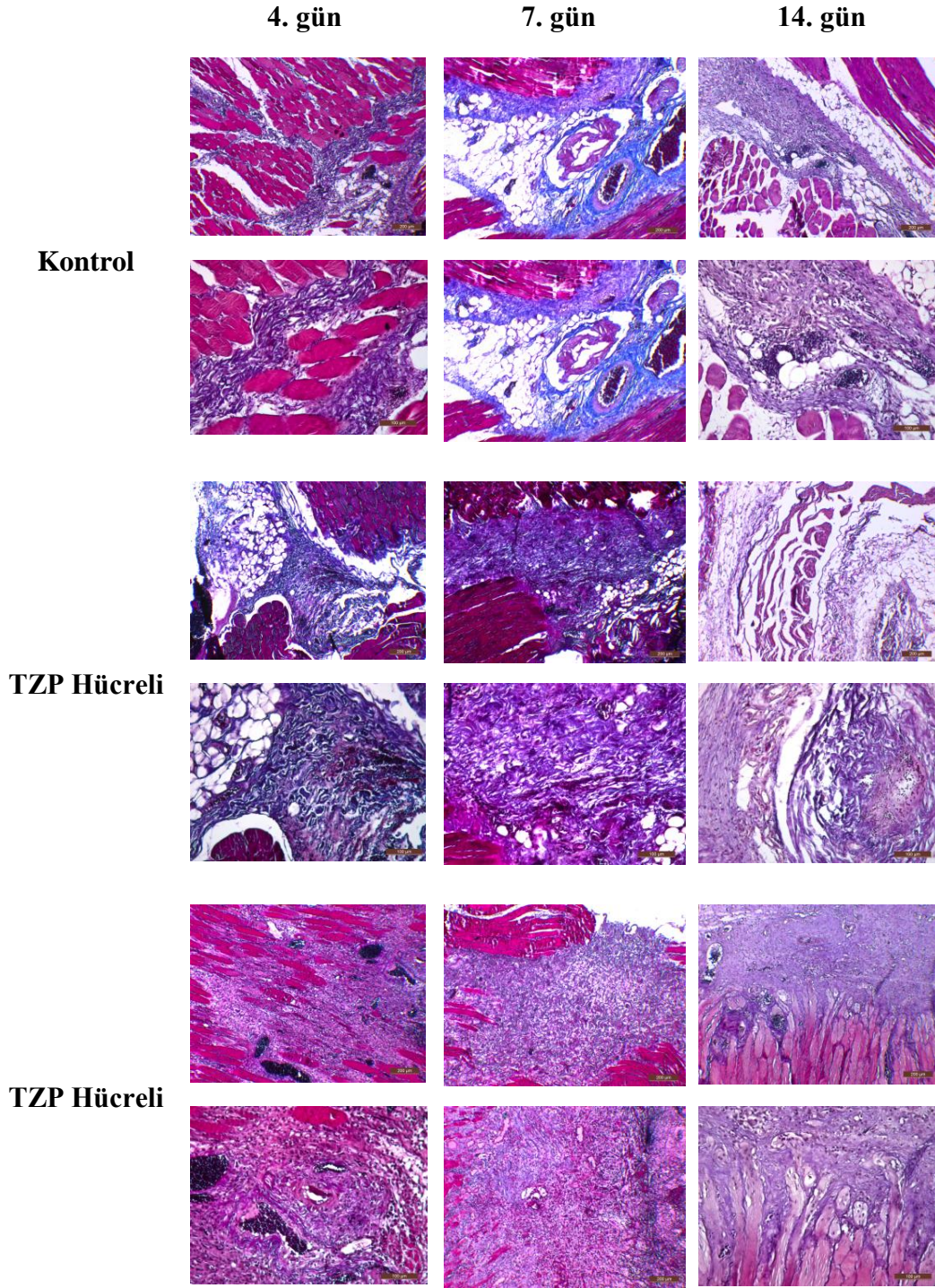
Şekil 4.17 TSP kaynaklı hücreli fibrin mikroküre grubundan 7. günde eksplante edilen örneklerin H&E boyamaları. (A) Kontrol, (B) Hücreli TSP, (C) Hücresiz TSP



Şekil 4.18 TZP kaynaklı hücreli fibrin mikroküre grubundan 14. günde eksplante edilen örneklerin H&E boyamaları. (A) Kontrol, (B) Hücreli TZP, (C) Hücesiz TZP, (D) Hücreli TFP, (E) Hücesiz TFP



Şekil 4.19 TFP kaynaklı olarak oluşturulan hücreli fibrin mikroküre grubundan 7. ve 14. günde eksplante edilen örneklerin H&E boyamaları



Şekil 4.20 TFP kaynaklı olarak oluşturulan hücreli fibrin mikroküre grubundan 4., 7. ve 14. günde eksplante edilen örneklerin MT boyamaları (200µm ve 100µm)

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışmada, içerisine sıçan KI-MKH'leri enkapsüle edilmiş trombosit zengin ve fakir plazma kaynaklı fibrin mikrokürelerin üretim yöntemi geliştirilmiş, ve sıçanlarda oluşturulan travmatikiskelet kası yara modelindeki etkinliği üzerine *in vivo* çalışmalar tasarlanmıştır.

Çalışmada TZP ve TFP eldesi için tam kan, Wistar soyu sıçanlardan aspirasyon yoluyla elde edildi. Çalışmanın ilk aşamasında öncelikle literatürde yaygın olarak kullanılan insan kaynaklı tam kan yerine sıçandan otolog olarak elde edilen tam kan kullanıldı ve bu tam kandan TZF ve TFP çeşitli santrifüj işlemleriyle başarılı bir şekilde ayrıldı. Burada alıcı organizma olan sıçanın tranplante edilen fibrin mikrokürelere karşı immun reaksiyonu önemlidir. Alıcı ile verici arasında gerçekleşen immünolojik reaksiyonun şiddeti iki grubun birbirine yakınlığı ile ters orantılıdır. Bu durumda farklı bir türdeki verici kaynaklı fibrin mikrokürelerin sıçana nakli immünolojik reaksiyona neden olup alıcı tarafından reddedilebilir. Ancak otolog kaynaklı fibrin mikrokürelerin kullanımı immünolojik reaksiyonları engeller. Bu nedenle TZP ve TFP eldesi için sıçan kalbinden aspire edilen otolog kaynaklı tam kan kullanılarak fibrin mikrokürelerin üretildiği yeni bir yöntem geliştirildi (TPE 2012/01068).

Trombosit zengin ve fakir plazmanın sıçan kalbinden aspire edilen tam kandan ayrılarak elde edilmesi için öncelikle literatürde kullanılan santrifüj işlemleri denendi (Atanasov vd. 2007). Ancak daha düşük santrifüj hızı uygulandığında da TZP ve TFP'nin elde edilebildiği tespit edildi ve bu yöntem kullanıldı. Yüksek hızlarda santifigürasyon işlemi kan hücrelerin hemolizine neden olur. Düşük hızda santifigürasyon işlemi ise kan bileşenlerinin ayrılmasını önler. Bu durumda en uygun hızı kullanmak gerektiğinden dolayı denemeler sonucu uygun bir santrifüj yöntemi belirlendi.

Sıçan Kİ-MKH'lerinin, 1. ve 2. pasajlardan hemen önceki faz kontrast mikroskobu görüntüleri hücrelerin ortalama 8 günde %80-90 bolluğa ulaştığını ve ilk pasajda küresel formda olan hücrelerin, ikinci pasajın 8. gününde iç görünümlü karakteristik morfoloji kazandıklarını göstermektedir. Kİ-MKH, ikinci pasaj sonunda uygun karakteristik morfolojisini kazandığında TZP ve TFP kaynaklı fibrin mikroküreler içine enkapsüle edilmeye hazır hale gelmiştir (Şekil 4.1). Kİ-MKH'lerini içeren ve içermeyen fibrin mikrokürelerin faz-kontrast görüntülerini incelenmiş ve mikrokürelerin çoğunun düzgün bir küresel şekle sahip olduğu gözlenmiştir. Trombosit miktarının TZP'den elde edilen fibrin mikrokürelerde, TFP'dan elde edilen fibrin mikrokürelere oranla daha fazla olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.2).

Fibrin, kas rejenerasyonunun gerçekleştirilmesinde kullanılan biyobozunur doğal bir üç boyutlu iskeledir. Genellikle çalışmalarda fibrin hücrelerle etkileştirilerek jel formunda kullanılmış ya da hücreler olarak doku yapıştırıcısı amacıyla cerrahi operasyonlarda kullanılmıştır (Singh vd. 2011). Bu çalışmada fibrinin mikroküre formunda kullanılmasının amacı TZP kaynaklı fibrin mikrokürelerin aktif biyomalzeme olmasından ötürü yapısında bulunan büyüme faktörlerinin kontrollü bir şekilde gözenekli fibrin malzemeden salınmasını sağlamaktır. Kök hücrelerin çoğalma kapasiteleri yüksek olduğundan dolayı iletildikleri bölgede tümörlü doku oluşturma olasılıkları mevcuttur. Fibrin mikrokürelere hapsedilen kök hücrelerin göçünün bu küre yaklaşımı sayesinde engellenebileceği düşünülmektedir.

Hücreler fibrin mikroküreler kullanılarak yapılan SEM analizi mikrokürelerin yüzeysel yapısını ve gözenekliliğini göstermek için gerçekleştirildi. Kürenin gözenekliliği, hücrelerin tutunması ve büyümesi için geniş bir yüzey alanı sağlamaktadır. SEM görüntüleri fibrin mikrokürelerin hücreler açısından bağlayıcı özellikte olan oldukça gözenekli bir yapıya sahip olduğunu gösterdi (Şekil 4.6). Farklı bir çalışmada hiyaluronik asit jel iskelet kısı hücreleri ile etkileştirilmiş ve *in vitro* çalışma gerçekleştirilmiştir. Farklı derişimlerde üretilen jellerin en uygun derişimde olan grubunda bile SEM analizi sonuçlarına göre ortalama gözenek boyutu yaklaşık 80 µm ölçülmüştür (Wang vd. 2009). Bu çalışmada ise fibrin mikrokürelerin SEM analizi sonucu ölçülen ortalama por boyunu

110 µm civarındadır. Bu da fibrin mikrokürelerin hücreler açısından bağlayıcı özelliğinin daha fazla olduğunu desteklemektedir.

Hazırlanan fibrin mikroküreler içerisine enkapsüle edilen sıçan Kİ-MKH'lerinin canlılığı ve çoğalması MTT testi kullanılarak takip edildi. Sonuçlar incelendiğinde deney boyunca bu hücrelerin fibrin mikroküreler içerisinde canlı kaldıkları gözlemlendi. Bu sonuç, hem TZP hem de TFP kaynaklı fibrin mikrokürelerin hücrelerin canlılığını koruma konusunda uygun bir yapıya sahip olduklarını göstermektedir. Belirli zaman noktalarında deney gruplarına uygulanan MTT analizleri ile elde edilen absorbans değerleri incelendi. Sonuçlara göre enkapsülasyon işleminden sonra TZP kaynaklı fibrin mikroküreler ile TFP kaynaklı fibrin mikrokürelerin hücre miktarı arasında gözle görülür bir fark olmadığı gözlemlendi. Trombositlerin ömrünün 7 ila 10 gün olduğu düşünüldüğünde 7. güne gelindiğinde hem TZP hem de TFP kaynaklı fibrin mikrokürelerin absorbans değerlerinin azalması anlamlı bir sonuçtur (Şekil 4.8). Ayrıca sonuçlar incelendiğinde 7. günde TZP'deki absorbans düşüşünün TFP'ye oranla daha fazla olduğu gözlemlenmiştir. Bu durum TZP kaynaklı fibrin mikroküreler içerisindeki trombosit miktarının başlangıçta fazla olması ve trombositler canlılığını yitirdiğinde absorbans değerinin daha hızlı düşmesi ile açıklanabilir. İstatistiksel sonuçlar anlamlı olmasa da diğer zaman noktalarında TFP kaynaklı fibrin mikrokürelerin absorbans değerlerinin daha yüksek olmasının nedeni başlangıçta içeriğinde trombositler daha fazla yer kaplayan TZP kaynaklı fibrin mikrokürelerde enkapsüle edilebilen Kİ-MKH miktarının daha az olduğu düşünülmektedir.

Çalışmanın mikroküre oluşturma aşamasında destek malzemesi olarak kullanılan alginat, sitrat tamponu kullanılarak kürelerin yapısından uzaklaştırıldı. Böylece alginat içermeyen fibrin mikroküreler elde edildi. FT-IR analizleriyle TZP ve TFP kaynaklı mikrokürelerin yapısındaki alginatın sitrat tamponu ile muamelesi sonucu uzaklaşp ayrılmadığı incelenmiştir (Şekil 4.9). Sitratla muamele edilmemiş TZP ve TFP kaynaklı fibrin mikrokürelerin FT-IR analizi sonucunda alginata spesifik pikler gözlemlenmiştir (Şekil 4.11). Ancak sitrat tamponuyla muamele edilen grupta fibrin proteinine ait pikler gözlemlenirken alginata ait piklerin şiddetinde azalma olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.10). Alginat için karakteristik olan -O-H piki (3428 cm⁻¹), >C=O- piki (1618 cm⁻¹), -C-C piki (1418 cm⁻¹) ve -C-O-C pikinin (1091 cm⁻¹ ve 1031 cm⁻¹) sitratla muamele edilmiş

gruplarda şiddeti azalmıştır. Bununla birlikte fibrin mikroküre gruplarının FT-IR spektrumlarında fibrine spesifik amit II piki (1500 cm^{-1}) gözlenmiştir. TZP ve TFP kaynaklı fibrin mikroküre gruplarının FT-IR spektrumları arasında belirgin bir farka rastlanmamıştır. Bu verilerinden yola çıkarak alginatın sitrat tamponu ile fibrin mikrokürelerin yapısından uzaklaştığı düşünülmektedir.

Elde edilen TZP ve TFP kaynaklı fibrin mikrokürelerin, *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar öncesinde su ve tampon tutma kapasiteleri belirlenmiştir. Sonuçlara bakıldığında, enkapsülasyon işleminin ardından TZP ve TFP kaynaklı fibrin-alginat mikroküreler ve alginat mikrokürelerin su tutma kapasiteleri TZP ve TFP kaynaklı fibrin mikroküreler ile karşılaştırılmıştır. Buna göre alginat içermeyen fibrin mikrokürelerin su tutma kapasitesinin alginat içeren fibrin mikrokürelere göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Ayrıca yine saf alginat mikrokürelerin su tutma kapasitesinin, fibrin-alginat mikroküreler ve fibrin mikrokürelere oranla daha fazla olduğu belirlenmiştir. Bu durumun fibrinin gözenekli yapısından kaynaklandığı düşünülmektedir. Bir çalışmada hücre taşıyıcısı olarak farklı derişimlerde üretilen hiyaluronik asidin su tutma kapasiteleri ölçülmüş ve en uygun derişimde dahi su tutma kapasitesi %95 olarak bulunmuştur (Wang vd. 2009). Ancak bu çalışmada alginatı uzaklaştırılmış fibrin mikrokürelerin su tutma kapasitesinin %600 civarında olduğu belirlenmiştir. Fibrinin sahip olduğu bu gözenekli yapı, fibrin mikroküreler içerisine enkapsüle edilmiş hücrelerin yapıya tutunması ve büyümesi için geniş bir yüzey alanı sağlamaktadır. Ayrıca fibrin mikrokürelerin su tutma kapasitesinin, fibrin-alginat mikrokürelere göre daha fazla olması, sitrat ile muamele sonucunda alginatın yapıdan uzaklaştırıldığına ikinci bir kanıtı olabileceği düşünülmektedir.

Fibrin mikrokürelerin saldıkları TGF- β 1 ve VEGF miktarları ELISA yöntemi ile belirlenmiştir. Bu amaçla TFP ve TZP kaynaklı fibrin mikroküreler kültür ortamına alınmıştır. Kültürün ikinci gününde vasat örnekleri alınarak ELISA kitleri ile bu büyüme faktörlerinin pg/ml cinsinden salım değerleri ölçülmüştür. Sonuçlara göre, TZP kaynaklı fibrin mikrokürelere TGF- β 1 salım 400pg/ml iken TFP kaynaklı fibrin mikrokürelere TGF- β 1 salımı 300pg/ml civarında bulunmuştur. TZP'nin içeriğinde yüksek miktarda bulunan trombositler, kan pıhtısının oluşumunda rol almalarının dışında doğal yara

iyileşmesinde görev alan büyüme faktörlerinin ana kaynağıdır (Landesberg vd. 2000). TZP’de özellikle TGF- β 1 ve PDGF içeriği çok yüksektir. Bu durumda TZP kaynaklı fibrin mikrokürelerden TGF- β 1 salımının belirtildiği gibi TFP kaynaklı fibrin mikrokürelere göre daha yüksek bulunması beklenen bir sonuçtur. Bir çalışmada TGF- β 1’in aktifleştikten sonra PDGF üretimi ve salgılanması ile ilgili sinyalleşmeyi başlattığı belirtilmiştir. Ayrıca yine aynı çalışmada TGF- β 1’in baskılanmasıyla PDGF ifadesinin de azaldığı belirtilmektedir (Geng vd. 2012). TGF- β 1’in yüksek olmasının bir sonucu olarak PDGF üretimi dolayısıyla miktarının artması da beklenen bir sonuçtur. VEGF salım miktarı ise her iki grupta da 50 pg/ml’den düşük miktarda bulunmuştur.

TZP ve TFP kaynaklı fibrin mikrokürelerin, kritik boyutlarda yara modelinde etkinliğinin belirlenmesi amacıyla *in vivo* çalışmalar tasarlanmıştır. Bu amaçla, her bir sıçan için iki taraflı biceps femoris kasında 4x5x6 mm³ boyutlarında defekt modeli oluşturulmuştur. Kontrol grubu ile hücreli ve hücresiz TFP ve TZP kaynaklı fibrin mikroküre grupları oluşturularak transplante edilmiştir. Kontrol olarak, aynı boyutlarda bir yara modeli seçilmiş, herhangi bir işlem yapılmadan dikilmiştir. Her bir grubun iyileşme süreci düzenli periyotlarla takip edilmiştir.

Yaralanma sonrası kas, dejenerasyon, inflamasyon, rejenerasyon ve fibrozis olmak üzere bir dizi iyileşme sürecinden geçer. Yaralanma sonrası ilk birkaç gün içerisinde aktif kas dejenerasyonu ve inflamasyonu meydana gelir ve yaralı bölgeye inflamasyon hücreleri hızlı bir şekilde ulaşırlar ve bir haftalık bir süreç içerisinde etkin olurlar. Bu hücreler fagositoz ile hasarlı dokuyu parçalar ve aynı zamanda enfeksiyonu önler. Ancak kas rejenerasyonu genellikle yaralanma sonrası 7 ila 10 gün arasında gerçekleşir. Rejenerasyon süreci genellikle ikinci haftada maksimum noktasına ulaşır ve daha sonra 3. ila 4. haftalarda azalır. Skar doku oluşumu (fibrozis) yaralanma sonrası 2. ve 3. haftalarda başlar ve zamanla skar dokunun boyutu artar. Skar dokunun oluşumu kas onarım sürecinin son basamağını göstermektedir. Skar doku oluştuğu sürece kas dokusu rejenerasyonunun tamamlanmadığı anlaşılmaktadır.

Belirli zaman noktalarında eksplante edilen örneklerin histokimyasal sonuçlarına bakıldığında, H&E boyamalarında 4. günde her bir grupta yoğun olarak inflamatuvar

hücrelerinin varlığına rastlanmıştır (Şekil 4.16). Ayrıca yaralı gölgeye göç eden makrofajlar, nötrofiller gibi inflamatuvar hücrelerin genellikle fibrin malzeme etrafına toplandığı gözlenmiştir. Bu durum hücrelerin fibrin malzemeye olan eğilimini göstermektedir. 4. günün kontrol grubunda inflamasyon hücrelerinin sayısının özellikle hücreli gruplara göre daha fazla olduğu gözlenmiştir. İnflamasyon evresi yara iyileşmesinde önemli bir basamaktır ancak uzun süren inflamasyon istenmeyen bir durumdur. Hücreli grup inflamasyon sürecini hızlandırmıştır, kemik iliği mezenkimal kök hücrelerinin immün baskılama özelliğinden dolayı bu durumun gerçekleştiği düşünülmektedir. Hücreli ve hücreli gruplar karşılaştırıldığında inflamasyon basamağının hücreli grupta hücreli gruba göre daha uzun ancak kontrol grubuna göre daha kısa sürdüğü gözlenmiştir. TFP ve TFP kaynaklı fibrin mikroküre gruplarının H&E boyaması görüntüleri incelendiğinde TFP grubunun inflamasyon evresinin TFP grubuna göre daha hızlı geçmesine neden olduğu gözlenmiştir. TFP içeriğinde yüksek miktarda trombosit bulundurur. Trombositlerden salınan yara iyileşmesinde görev alan büyüme faktörlerinin salınımı ile TFP grubunda inflamasyon basamağının TFP grubuna göre daha etkin ve hızlı bir biçimde tamamlandığı düşünülmektedir. Yara iyileşmesinin ilk evrelerinde fibroblastlar ve vasküler endotel hücreler çoğalarak yara yüzeyinde pembe renkte hematoksilin ile boyanan rejeneratif granülasyon dokusunu meydana getirirler. Bu yeni doku oluşumlarında belirli yoğunlukta kapillerlerin de varlığı belirlenmiştir. Fibroblastlar ve endotel hücrelerin çoğalmasına paralel olarak gelişen anjiyogenez, hücrelerin göçü ve çoğalması için gerekli enerji ve oksijeni sağlayacağından dolayı önemli bir süreçtir. 7. ve 14. günlerde inflamatuvar hücrelerin kaybolmaya başladığı ve granülasyon dokusunun oluşmaya başladığı gözlenmiştir. Bu basamağa geçiş ilk olarak hücreli TFP grubunda gözlenmiştir. Ayrıca 14. günde rejenerasyon basamağının devam ederken fibrin malzemenin kısmen degrades olduğu gözlenmiştir.

Periyodik asit schiff (PAS) ve MT boyamaları incelendiğinde, ilk günlerde belli bir düzen içerisinde bulunmayan kollajen liflerinin, ileriki evrelerde olgunlaşmaya başladıkları belirlenmiştir (Şekil 4.20). TFP kaynaklı fibrin mikrokürelerde TFP kaynaklı fibrin mikrokürelere oranla kollajen miktarının daha fazla olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.15).

Sonuç olarak, tam kandan TZP eldesi ile yüksek gözenekliliğe sahip, biyouyumlu ve biyobozunur, elde edildiği malzemeden dolayı kas yara iyileşmesinde görevli çeşitli büyüme faktörlerini salgılayabilen, bu nedenle de aktif bir biyomalzeme olan fibrin temelli mikroküreler oluşturulmuştur. Fibrin mikrokürelerin konak dokuda dikkat çekici bir immün reaksiyona yol açmadığı ve konak dokuya zaman içinde uyum sağladığı belirlenmiştir. Ayrıca, elde edilen sonuçlar fibrin mikrokürelerin defektli bölgedeki doku yenilenmesini, kontrol deneklere göre dikkat çekici düzeyde hızlandırdığını göstermiştir. Bu durumun fibrin mikrokürelerin rejeneratif tıpta kullanım potansiyelini gösterdiği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Aspenberg, P. ve Virchenko, O. 2004. Platelet concentrate injection improves Achilles tendon repair in rats. *Acta Orthopaedica Scandinavica*, 75(1): 93-99.
- Bader, A., Schilling, T., Teebken, O.E., ve ark.1998. Tissue engineering of heart valves-human endothelial cell seeding of detergent acellularized porcine valves. *Eur. J.Cardiothorac. Surg.*, 14: 279–84.
- Badylak, SF. 2007. The extracellular matrix as a biologic scaffold material. *Biomaterials*, 28(25): 3587-3593.
- Baoge, L., Steen, V. D. E., Rimbaut, S., Philips, N., Witvrouw, E., Almqvist, K. F., Vanderstraeten, G. ve VandenBossche, L. C. 2012. Treatment of SkeletalMuscle Injury: A Review. *ISRN Orthopedics*,2012(2012): 1-7.
- Beier, J. P., Stern-Straeter, J., Foerster, V. T., Kneser, U., Stark, G.B. ve Bach, A. D. 2006. Tissue engineering of injectable muscle: three-dimensional myoblast-fibrin injection in the syngeneic rat animal model. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 118(5): 113–1121.
- Borschel, G. H., Dennis, R. G., ve Kuzon Jr., W. M. 2004. Contractile skeletal muscle tissue-engineered on an acellular scaffold. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 113(2): 595–602.
- Bozkurt, Ö. 2006. The effect of diabetes on rat skeletal muscle tissues at molecular level. Yüksek Lisans Tezi. Orta Doğu Teknik Üniversitesi, p. 3.
- Burks, T.N. ve Cohn, R.D. 2011. Role of TGF- β signaling in inherited and acquired myopathies. *Skeletal Muscle*, 1(19): 1-13.
- Butterfield, T. A. ve Herzog, W. 2005. Quantification of muscle fiber strain during *in vivo* repetitive stretch-shortening cycles. *Journal of Applied Physiology*, 99: 593-602.
- Chhatbar, M. U., Meena, R., Prasad, K. ve Siddhanta, A. K. 2009. Agar/sodium alginate-graft-polyacrylonitrile, a stable hydrogel system. *Indian Journal of Chemistry*, 48A: 1085-1090.
- Christman, K. L., Fok, H. H., Sievers, R. E., Fang, Q. ve Lee, R. J. 2004. Fibrin Glue Alone and Skeletal Myoblasts in a Fibrin Scaffold Preserve Cardiac Function after Myocardial Infarction. *Tissue Engineering*, 10: 403-409.
- Crisco, J.J., Jokl, P., Heinen, G.T., Connell, M.D., Panjabi, M.M. 1994. A muscle contusion injury model. *Biomechanics, physiology, and histology. Am J Sports Med.*, 22: 702-10.

- Courtman, D.W., Pereira, C.A., Kashef, V., ve ark. 1994. Development of a pericardial acellular matrix biomaterial: biochemical and mechanical effects of cell extraction. *J. Biomed. Mater. Res.*, 18: 655–66.
- Dorothee, K., Raymund, H. E. ve Justus, B. P. 2011. *Tissue Engineering of Skeletal Muscle. Tissue Engineering for Tissue and Organ Regeneration.* Publisher: In-tech.
- Elcin, Y.M. 2003. *Tissue Engineering, Stem Cells and Gene Therapies, Advances in Experimental Medicine and Biology Series: 534*, NY and London, Kluwer Academic-Plenum Publishers, 350, ISBN 0-306-47788-2.
- Elcin, Y. M., Dixit, V., Gitnick, G. (2001). Extensive in vivo angiogenesis from the controlled release of human vascular endothelial cell growth factor: Implications for tissue engineering and wound healing. *Artif Organs*, 25(7): 558-565.
- Elcin, A.E., Elcin, Y. M. (2006). Localized angiogenesis induced by human vascular endothelial growth factor-activated PLGA sponge. *Tissue Eng*, 12(4): 959-968.
- Franceschi, F., Marinozzi, A., Papalia, R., Longo, U. G., Gualdi, G. ve Denaro, E. 2006. Intra- and juxta-articular osteoid osteoma: a diagnostic challenge. Misdiagnosis and successful treatment: a report of four cases. *Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery*, 126(10): 660–667.
- Fraser, R.E., Halseth, W.L., Johnson, B., Paton, B.C. 1968. Experimental replacement of the superior vena cava. Autologous vein, free inverted jejunal grafts, and Dacron grafts treated with graphite-benzalkoniumheparin. *Arch. Surg.*, 96: 378–85.
- Forriol, F., Longo, U. G., Concejo, C., Ripalda, P., Maffulli, N., ve Denaro, V. 2009. Platelet-rich plasma, rhOP-1 (rhBMP-7) and frozen rib allograft for the reconstruction of bony mandibular defects in sheep. A pilot experimental study. *Injury*, 40: S44–S49.
- Gorodetsky, R., Clark, R. A. F., An, J., Gailit, J. Levdansky, L. Vexler, A., Berman, E. ve Marx, G. 1999. Fibrin microbeads (FMB) as biodegradable carriers for culturing cells and for accelerating wound healing. *The Journal of Investigative Dermatology*. 112(6): 866-872.
- Guyton, A.C., Hall, J.E. 2001. *Tıbbi Fizyoloji.* (Çavusoglu, H. (Ed.), Çev.). Ankara: Nobel Tıp Kitabevi.
- Hamilton, B., Knez, W., Eirale, C. ve Chalabi, H. 2010. Platelet enriched plasma for acute muscle injury. *Acta Orthopaedica Belgica*. 76: 443-448.

- Hammond, J. W., Hinton, Y. R., Curl, L. A., Muriel, J. M. ve Lovering, R. M. 2009. Use of Autologous Platelet-rich Plasma to Treat Muscle Strain Injuries. *The American Journal of Sports Medicine*. 37(6): 1135-1142.
- Harmon, K. G. 2010. Muscle injuries and TZP: what does the science say?. *British Journal of Sports Medicine*. 44(9): 616-617
- Ho, M., Garau, G., Walley, G., vd. 2009. Minimally invasive dynamic hip screw for fixation of hip fractures. *International Orthopaedics*, 33: 555–560.
- Hollister, S.J. 2005. Porous scaffold design for tissue engineering. *Nature Materials*, 4: 518-524.
- Honda, H., Kimura, H., Rostami, A. 1990. Demonstration and phenotypic characterization of resident macrophages in rat skeletal muscle. *Immunology*, 70: 272-279.
- Huang, N. F., Patel, S., Thakar, R. G., vd. 2006. Myotube assembly on nanofibrous and micropatterned polymers. *Nano Letters*, 6: 537–542.
- Huard, J., Li, Y. ve Fu, F. H. 2002. Current Concepts Review Muscle Injuries and Repair: Current Trends in Research. *The Journal of Bone & Joint Surgery*, 84A(5): 822-832.
- Hurme, T., Kalimo, H., Lehto, H., Jarvinen, M. 1991. Healing of skeletal muscle injury: an ultrastructural and immunohistochemical study. *Med Sci Sports Exerc.*,23: 801-10.
- Kasemkijwattana, C., Menetrey, J., Day, C.S., Bosch, P., Buranapanitkit, B., Moreland, M.S., Fu, F.H., Watkins, S.C., Huard, J. 1998. Biologic intervention in muscle healing and regeneration. *Sports Med Arthroscopy*, 6: 95-102.
- Kasymova, Z. 2006. Deneysel olarak distrakte edilen sıçan tibiasında hiperbarik oksijen uygulamalarının kas dokusu üzerine olan etkilerinin histolojik ve biyokimyasal yöntemlerle incelenmesi. Doktora Tezi. T.C. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- Kroehne, V., Heschel, I., Schügner, F., Lasrich, D., Bartsch, J.W. ve Jockusch, H. 2008. Use of a novel collagen matrix with oriented pore structure for muscle cell differentiation in cell culture and in grafts. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 12(5A): 1640–1648.
- Landesberg R., Roy, M. ve Glickman, R. 2000. Quantification of Growth Factor Levels Using a Simplified Method of Platelet-Rich Plasma Gel Preparation. *Journal Oral Maxillofac Surg.*, 58:297-300
- Levenberg, S., Rouwkema, J., Macdonald, M., Garfein, E. S., Kohane, D. S., Darland, D. C., Marini, R., Van Blitterswijk, C. A., Mulligan, R. C., D'Amore, P. A. ve Langer, R. 2005. Engineering vascularized skeletal muscle tissue. *Nature Biotechnology*, 23(7):879-884.

- Longo, U.G., Loppini, M., Berton, A., Spiezia, F., Maffulli, N., Denaro, V. 2011. Tissue Engineered Strategies for Skeletal Muscle Injury. *Stem Cells International*, Vol. 2012(2012): 1-13.
- Laurens, N., Koolwijk, P. ve De Maat, P. M. 2006. Fibrin structure and wound healing. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 4: 932-939.
- Li, Y., Foster, W., Deasy, B. M., Chan, Y., Prisk, V., Tang, Y., Cummis, J. ve Huard, J. 2004. Transforming Growth Factor- β 1 Induces the Differentiation of Myogenic Cells into Fibrotic Cells in Injured Skeletal Muscle. *American Journal of Pathology*, 164(3): 1007-1019.
- MacLennan, D.H. ve Campbell, K.P. 1979. Structure, function and biosynthesis of sarcoplasmic reticulum proteins. *Trends in Biochemical Sciences*,4 (7): 148-151.
- Mandal, S., Kumar, S. S., Krishnamoorthy, B. ve Basu, S. K. 2010. Development and evaluation of calcium alginate beads prepared by sequential and simultaneous methods. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 46(4): 785-793.
- Matsumoto, T., Holmes, R.H., Burdick, C.O., ve ark. 1965. The fate of the inverted segment of small bowel used for the replacement of major veins. *Surgery*, 60: 739-43.
- Mejia, H. A. ve Bradley, J. P. 2011. The Effects of Platelet-Rich Plasma on Muscle: Basic Science and Clinical Application. *Operative Techniques in Sports Medicine*, 19: 149-153.
- Menetrey, J., Kasemkijwattana, C., Day, C. S., Bosch, P., Vogt, M., Fu, F. H., Moreland, M. S. ve Huard, J. 2000. Growth factors improve muscle healing *in vivo*. *The journal of bone & joint surgery*, 82-b(1): 131-137.
- Menetrey J., Kasemkijwattana, C., Moreland , M.S., Huard, J. Suturing versus immobilization of a muscle laceration. A morphological and functional study in a mouse model. *Am J Sports Med*, 27: 222-9.
- Mishra, A., Woodball, J. ve Vieira, A. 2009. Treatment of Tendon and Muscle Using Platelet-Rich Plasma. *Clinical Journal of Sport Medicine*, 28: 113-125.
- Mosesson, M. W. 2005. Fibrinogen and fibrin structure and functions. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 3: 1894-1904.
- Neufeld, G., Cohen, T., Gengrinovitch, S. ve Poltorak, Z. 1999. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *The FASEB Journal*, 13: 9-22.

- Page, R. L., Malcuit, C., Vilner, L. ve ark. 2011. Restoration of skeletal muscle defects with adult human cells delivered on fibrin microthreads. *Tissue Engineering Part A*, 17: 21-22.
- Papenburg, B.J. Design Strategies For Tissue Engineering Scaffolds. Ph.D. thesis. University of Twente, 2629–2640.
- Perumcherry, S. R., Chennazhi, K. P., Nair, S. V., Menon, D. ve Afeesh, R. 2011. A Novel Method for the Fabrication of Fibrin-Based Electrospun Nanofibrous Scaffold for Tissue-Engineering Applications. *Tissue Engineering: Part C*. 17(11): 1121-1130.
- Pukstad, B.S., Ryan, L., Flo, T.H., Stenvik, J., Moseley, R., Harding, K., Thomas, D.W. and Espevik, T. 2010. Non-healing is associated with persistent stimulation of the innate immune response in chronic venous leg ulcers. *J Dermatol Sci.*,59(2): 115-122.
- Rossi, A.E. ve Dirksen, R.T. 2006. Sarcoplasmic reticulum: The dynamic calcium governor of muscle. *Muscle Nerve*, 33: 715-731.
- Rossi, C. A., Flaibani, M., Blaauw B. ve ark. 2011. *In vivo* tissue engineering of functional skeletal muscle by freshly isolated satellite cells embedded in a photopolymerizable hydrogel. *FASEB Journal*, 25(7): 2296–2304.
- Shavlakadze, T., Davies, M., White, J. D., Grounds, M. D. 2004. Early regeneration of whole skeletal muscle grafts is unaffected by overexpression of IGF-1 in MLC/mIGF-1 transgenic mice. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 52: 873–883.
- Shen, W. 2006. The role of inflammation in skeletal muscle healing. Doktora tezi. University of Pittsburgh.
- Shi, Y., Su, J., Roberts, A. I., Shou, P. Rabson, A. B. ve Ren, G. 2012. How mesenchymal stem cells interact with tissue immune responses. *Trends in Immunology*. 33(3): 136-143
- St Pierre Schneider, B., Correia, L.A., Cannon, J.G. 1999. Sex differences in leukocyte invasion in injured murine skeletal muscle. *Res Nurs Health*, 22: 243-293.
- Stern-Straeter, J., Bach, A. D., Stangenberg L. ve ark. 2005. Impact of electrical stimulation on three-dimensional myoblast cultures—a real-time RT-PCR study. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 9(4): 883–892.
- Stock, U.A. and Vacanti J.P. 2001. Tissue Engineering: Current State and Prospects. *Annual Review of Medicine*, 52: 443-451.

- Sürenk k,  . 2007. Sıanlarda l-karnitin desteğinin kullanılmamaya bağlı kas atrofisine etkileri. Doktora Tezi. T.C. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- Takezawa, T. 2003. A strategy for the development of tissue engineering scaffolds that regulate cellbehavior. *Biomaterials*, 24(13): 2267-2275.
- Thorrez, L., Shansky, J., Wang, L., Fast, L.,VandenDriessche, T., Chuah, M., Mooney, D. ve Vanderburgh, H. 2008. Growth, differentiation, transplantation and survival of human skeletal myofibers on biodegradable scaffolds. *Biomaterials*,29: 75-84.
- Tidball, J. G. 2005. Inflammatory processes in muscle injury and repair. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 288: R345-R353.
- Vacanti, J.P., Morse, M.A., Saltzman, W.M., ve ark. 1988. Selective cell transplantation using bioabsorbable artificial polymers as matrices. *J. Pediatr. Surg.*, 23: 3–9.
- Vacanti, J.P., Morse, M.A., Saltzman, W.M., ve ark. 1988. Selective cell transplantation using bioabsorbable artificial polymers as matrices. *J. Pediatr. Surg.*, 23: 3–9.
- Wolf, M. T., Daly, K. A., Reing, J. E. ve Badylak, S. F. 2012. Biologic scaffold composed of skeletal muscle extracellular matrix. *Biomaterials*, 33: 2916-2925.
- Yan, W., George, S., Fotadar, U. 2007. Tissue engineering of skeletal muscle. *Tissue Engineering*, 13(11): 2781–2790.
- Yang, L., Zhang, B., Wen, L., Liang, Q. ve Zhang, L. 2007. Amphiphilic cholesteryl grafted sodium alginate derivative: Synthesis and self-assembly in aqueous solution. *Carbohydrate Polymers*, 68: 218-225.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Özge LALEGÜL

Doğum Yeri : Ankara

Doğum Tarihi : 23.11.1987

Medeni Hali : Bekar

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Eryaman Lisesi, Ankara (2004)

Lisans : Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi, Kimya Bölümü (2009) –ÇAP

Lisans : Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi, Astronomi ve Uzay Bilimleri Bölümü (2008)

Yüksek Lisans: Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü, Temel Biyoteknoloji Anabilim Dalı
(Şubat 2010 – Ocak 2013)

Bilgisayar : HTML, Dreamweaver, CSS, Ofis Programları, Adobe Photoshop, Java Script,
PHP, SQL Server, MySQL.

Sosyal Aktiviteler

Türkiye Buz Hokeyi Federasyonu Lisanslı Sporcu

Türkiye Buz Pateni Federasyonu Lisanslı Sporcu (Curling)

Hacettepe Üniversitesi Çocuk ve Gençlik Halk Dansları Topluluğu