

T.C.  
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İNSAN MİYOBLAST VE MEZENKİMAL KÖK HÜCRE YÜKLENMİŞ  
ASELÜLER ÇİZGİLİ KAS KAYNAKLI DOĞAL VE YARI-YAPAY İSKELELERİN  
ÇİZGİLİ KAS DOKUSU OLUŞTURMA POTANSİYELİ

Hazırlayan Birol AY

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

KOCAELİ  
2012

T.C.  
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İNSAN MİYOBLAST VE MEZENKİMAL KÖK HÜCRE YÜKLENMİŞ ASELÜLER  
ÇİZGİLİ KAS KAYNAKLI DOĞAL VE YARI-YAPAY İSKELELERİN ÇİZGİLİ KAS  
DOKUSU OLUŞTURMA POTANSİYELİ

Hazırlayan Birol AY

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

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Halime Kenar

Destekleyen Kurum ve Proje Kodu: Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu  
(TÜBİTAK)-111S248

KOCAELİ

2012

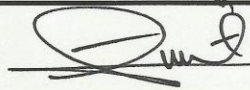

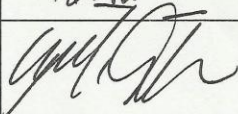
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE**

Tez Adı: İnsan Miyoblast Ve Mezenkimal Kök Hücre Yüklenmiş Asetüler Çizgili Kas Kaynaklı Doğal Ve Yarı-Yapay İskelelerin Çizgili Kas Dokusu Oluşturma Potansiyeli  
Tez yazarı: Birol Ay

Tez savunma tarihi: 25.06.2012

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Halime Kenar

İşbu çalışma, jürimiz tarafından Kök Hücre Anabilim Dalında bilim uzmanlığı yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ ÜYELERİ		İMZA
ÜNVANI	ADI SOYADI	
BAŞKAN:	Prof. Dr. Erdal Karaöz	
ÜYE(DANIŞMAN):	Yrd. Doç. Dr. Halime Kenar	
ÜYE:	Doç. Dr. Güralp Özkoç	
ÜYE:		
ÜYE:		

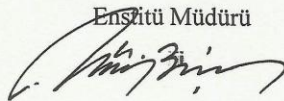
**ONAY**

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylıyorum.

27.06.2012

Prof.Dr. Ümit BİÇER

Enstitü Müdürü



Tezimi kök hücre çalışmalarından umut bekleyen tüm hasta ve hasta yakınlarına  
atfediyorum...

## ÖZET

Bu çalışmada amaç, hücrelerinden arındırılmış doğal kas iskeleleri ve hücresiz doğal kas komponentleri (protein, glikoprotein) tutturulmuş daha geniş boyuttaki yarı-yapay iskeleler kullanarak, doğuştan (örn: yarı dudak hastalığı) veya kaza sonrası meydana gelen (özellikle yüz kaslarında) kas eksikliklerini gidermek için kas yamalarının üretilmesidir. Çalışmada iskelelerin hücresel bileşenleri miyoblast ve mezenkimal kök hücreler (MKH'ler) gibi iki farklı hücre kaynağından seçilmiş ve kas yaması üretimi için en uygun iskele ve hücre tipi araştırılmıştır. Miyoblastlar insan çizgili kas dokusundan, MKH'ler de insan menstrual kanından izole edilmiş, akım sitometri ve kemik ile yağ dokusuna farklılaşma testleri ile karakterize edilmiştir. İnsan çizgili kas parçalarının deterjan türevli maddelerle hücrelerinden arındırılması ile doğal iskeleler, elektro-eğirme yöntemi ile üretilen paralel mikrofiberli iskeleler üzerine çapraz bağlayıcı moleküllerle doğal kas komponentlerinin (protein, glikoprotein) bağlanması ile de yarı-yapay iskeleler üretilmiştir. Doğal, yapay ve yarı-yapay iskeleler üzerine menstrual kan kökenli MKH ve miyoblast hücreleri ekilerek, 21 gün boyunca inkübe edilmiştir. 21 günün sonunda sabitlenen hücreler kas dokusuna özgü çeşitli proteinlerin (MyoD, Desmin, Alfa-aktinin) ifadelerinin belirlenmesi amacıyla immünfloresan olarak boyanmış ve ayrıca da SEM mikrofotografı alınmıştır. Ayrıca 21 günün sonunda iskeleler üzerindeki hücre çoğalması WST-1 hücre canlılık testi ile belirlenmiştir. Yapılan tüm bu analizler sonucunda, doğal dokunun ve yapay iskelenin, hücre tipi olarak ise miyoblastların kas yaması üretiminde en etkili oldukları belirlenmiştir. Yapay iskelenin ve miyoblastların kullanımıyla yönlendirilmiş kas yaması eldesi daha başarılı olmuştur.

**Anahtar Kelimeler:** miyoblast, mezenkimal kök hücre, mikrofiberli hücre taşıyıcıları, doğal taşıyıcılar, hücre farklılaşması, kas dokusu yaması

## ABSTRACT

Production of skeletal muscle grafts on the acellular native scaffolds and on larger size semi-synthetic scaffolds with crosslinked acellular native skeletal muscle components (Protein, glycoprotein) was aimed in this project to heal congenital (for example: Cleft Lip Disease) or accidental maxillofacial (especially due to traffic accidents) skeletal muscle tissue defects. In addition, two different stem cell types, MSC and myoblasts, were used as a cellular component of these scaffolds, so the most suitable cell and scaffold types were studied to produce a skeletal muscle patch. Myoblasts were isolated from human muscle tissue, MSCs were obtained from human menstrual blood, and they were characterized by using flow cytometry and by differentiation to osteogenic and adipogenic lineages. Skeletal muscle pieces were treated with detergent like chemicals to remove the donor cells existing in the native tissue and so the native acellular scaffolds were obtained by this way, and with the aim of producing semi-synthetic scaffolds, native skeletal muscle components (Protein, glycoprotein) were cross-linked to the electrospun synthetic scaffolds. Human myoblasts and human menstrual blood derived mesenchymal stem cells (hMB-MSK) were seeded on the native, synthetic and semi-synthetic scaffolds and cultured on them for 21 days. After 21 days, the cells were fixed and stained immunocytochemically against some skeletal muscle tissue specific proteins (MyoD, Desmin, Alpha-actinin) to determine the specific protein expression. In addition, the cells were examined with SEM. Separately, after 21 days, cell proliferation on scaffolds was determined by using WST-1 test. After all analyses, it was determined that native acellular and synthetic scaffolds, and myoblasts as a cell type were effective in producing a muscle tissue graft. Producing oriented muscle tissue patch was more successful when synthetic scaffolds and myoblasts were used together.

**Keywords:** myoblast, mesenchymal stem cells, microfiber scaffolds, native scaffolds, cell differentiation, muscle tissue patch

## TEŞEKKÜR

Bilimsel anlamda özellikle kök hücreler konusunda her zaman kendisinden ilham aldığım ve almaya da devam edeceğim, tezim ve yüksek lisans çalışmalarım boyunca her sıkıntıyı çözmem için bana yardımcı olan bölüm başkanım sayın hocam Prof. Dr. Erdal Karaöz'e,

Bu günlere gelmemde emeğinin büyük olduğunu düşündüğüm ve çalışmam süresince tez danışmanlığımı üstlenerek, bana destek olan, tez konumun belirlenmesinde, çalışmamın planlanmasında ve sonuçlandırılmasında bilimsel ve manevi katkılarını esirgemeyen sayın hocam Yrd. Doç. Dr. Halime Kenar'a,

Tez çalışmalarımda bana laboratuvarını açan sayın hocam Prof. Dr. Vasıf Hasırcı'ya, çalışmalarımda floresan boyalı örneklerin görüntülenmesinde yardımcı olan arkadaşım Biyolog Cansu Subaşı'ya, Akım Sitometrisi çalışmalarında yardımcı olan Biyolog Gülay Erman'a, tez çalışmalarım boyunca örneklerimin kesit alma aşamasında desteklerini esirgemeyen Kocaeli Üniversitesi Patoloji laboratuvarları şefi Biyolog Hakan Topal'a, örneklerimin SEM görüntülerinin alınmasında yardımcı olan Kocaeli Üniversitesi Metalurji ve Malzeme Bölümünden sayın Prof. Dr. Muzaffer Zeren ve sayın Uzman Serap Gümüş'e, tezimin cerrahi kısmında yardımcı olan sayın Prof. Dr. Cumhuriyet Kesemenli ve Uzm. Dr. Adem Aydın'a ve bilimsel ve dostluk anlamında her zaman desteğini gördüğüm Araştırma Görevlisi Biyomühendis sayın Esra Korurer'e,

Ayrıca, Kocaeli Üniversitesi Kök Hücre ve Gen Tedavileri Araştırma ve Uygulama Merkezi (KÖGEM) çalışanlarına ve hocalarına, deneysel çalışmalarımı yürütebilmem için, 111S248 no'lu proje kapsamında maddi destek sağlayan Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) Hızlı Destek Fonu'na, bu zor dönemde yanımda olup bana destek olan tüm dostlarıma ve çalışma arkadaşlarıma, her durumda yanımda olup bana maddi ve manevi destek sağlayan aileme

**TEŞEKKÜR EDERİM.**

## İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	v
ABSTRACT.....	vi
TEŞEKKÜR.....	vii
İÇİNDEKİLER.....	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xvi
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Kök Hücreler.....	3
2.2. Kök Hücre Çeşitleri.....	5
2.2.1. Embriyonik Kök Hücreler (EKH).....	5
2.2.2. Embriyonik Olmayan Kök Hücreler.....	7
2.2.2.1. Hematopoietik Kök Hücreler.....	7
2.2.2.2. Mezenkimal Kök Hücreler (MKH).....	8
2.2.2.3. Organ ve ya Dokulardaki Kök Hücreler.....	10
2.3. İskelet Kasları.....	10
2.3.1. Yapı ve Fonksiyon.....	10
2.3.2. Kas Dokunun Doğal Yolla Onarımı.....	13
2.4. Doku Mühendisliği.....	13



2.4.1. İskelet Kası Doku Mühendisliği.....	15
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	20
3.1. Menstruasyon Döngüsü Kanından MKH Elde Edilmesi Ve Karakterizasyonu.....	20
3.2. Patolojik Olmayan İnsan Çizgili Kas Örneklerinden İskelet Kası Öncül Hücrelerinin Elde Edilmesi.....	21
3.3. İnsan Çizgili Kas Dokusunun Hücrelerden Arındırılması ve Hücresiz Doğal Kas İskeleleri Eldesi.....	22
3.4. Yapay ve Yarı-Yapay İskelelerin Üretimi Ve İskelelerin Mekanik Karakterizasyonu.....	23
3.5. Elde edilen yapay, yarı-yapay ve hücresiz doğal kas iskeleleri üzerine öncül hücrelerin ekimi, iskelet kasına dönüşme potansiyellerinin incelenmesi.....	24
4. BULGULAR.....	27
4.1. Hücre Kültürü ve Karakterizasyonu.....	27
4.1.1. Menstrual Kandan İzole Edilmiş Mezenkimal Kök Hücreler (MK-MKH).....	27
4.1.2. İnsan iskelet kası öncül hücreleri (miyoblastlar).....	30
4.2. İskelelerin Üretimi.....	34
4.2.1. Hücresiz Doğal Kas İskelelerinin Eldesi.....	34
4.2.2. Yapay ve yarı-yapay iskelelerin üretimi ve iskelelerin mekanik karakterizasyonu.....	36
4.3. Hücrelerin Kas Oluşturma Potansiyellerinin İncelenmesi.....	38
4.3.1. Kas Oluşturma Potansiyellerinin Işık Mikroskopunda Gösterimi.....	38
4.3.2. Hücrelerin İskeleler Üzerindeki Canlılıklarının Belirlenmesi.....	40
4.3.3. Kas Oluşturma Potansiyellerinin Spesifik Antikor Boyamaları ile Gösterimi.....	42
4.3.3.1. İskeleler Üzerinde Alfa-aktinin Antikoru Boyaması.....	42

4.3.3.2. İskeleler Üzerinde Desmin Antikoru Boyaması.....	46
4.3.3.3. İskeleler Üzerinde MyoD Antikoru Boyaması.....	48
4.3.3.4. İskeleler Üzerinde Falloidin Boyaması.....	50
4.3.4. Kas Oluşturma Potansiyellerinin SEM ile Gösterimi.....	53
4.3.4.1. 4.3.4.1. MK-MKH'lerin Çeşitli İskeleler Üzerindeki Yerleşimi ve Kas Oluşturma Potansiyellerinin SEM ile Gösterimi.....	53
4.3.4.2. 4.3.4.2. Miyoblastların Çeşitli İskeleler Üzerindeki Yerleşimi ve Kas Oluşturma Potansiyellerinin SEM ile Gösterimi.....	54
5. TARTIŞMA.....	55
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	57
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	58
EKLER.....	62
ÖZGEÇMİŞ.....	63

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

µm : mikrometre

bFGF : human basic Fibroblast Growth Factor

CLI : kritik limb iskemisi

cm : santimetre

dk: Dakika

DMD : Duchenne kas distrofisi

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

DMF : Dimethylformamide

DNA : Deoksiribonükleik asit

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

EKH : Embriyonik Kök Hücreler

FBS : Fetal Sığır Serumu

HBSS : Hank's Buffered Salt Solution

hEGF : human Endotelial Growth Factor

IBMX : 3-isobutyl-1-methylxanthine

IVD : *in vitro* dölleme

mA: miliamper

MEM : Minimum Essential Medium

MES : (2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid)

MKH : Mezenkimal Kök Hücre

MK-MKH : Menstrual Kandan İzole Edilmiş Mezenkimal Kök Hücre

mm: Milimetre

NHS : (N-Hydroxysuccinimide)

PBS : Phosphate-buffered saline

PCL : Polikaprolakton

PDMS : Polydimethylsiloxane

Pen/Strep : Penisilin/Streptomisin

PFA : Paraformaldehit

PGA : Polyglidikolik asit

PLLA : Polilaktik asit

RNA : Ribonükleik asit

SDS : Sodium dodecyl sulfate

vb : ve benzeri

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2. 1. Telomeraz enzimi.....	3
Şekil 2. 2. İnsan embriyolojik gelişim evreleri ve germ tabakalarından köken alan hücre çeşitleri.....	4
Şekil 2. 3. Pluripotent embriyonik kök hücrelerin eldesi ve kültüre alınması.....	6
Şekil 2. 4. Mezengenezis.....	8
Şekil 2. 5. Bir İskelet Kasının Yapısı.....	12
Şekil 2. 6. İskelet Kası Dokusunun Doğal Yolla Yenilenmesi.....	13
Şekil 2. 7. Elektro-eğirme sisteminin şematik gösterimi.....	16
Şekil 2. 8. Elektro-eğirme yöntemi ile üretilmiş polilaktasit-polikaprolakton kopolimeri mikrofiberlerin taramalı elektron mikroskobu görüntüsü.....	17
Şekil 2. 9. Enjeksiyona Dayalı İskelet Kası Onarım Stratejisi.....	18
Şekil 2. 10. Üzerine kas öncül hücreleri ekilmiş doğal iskeleye mekanik uyarma yapılan düzenek.....	19
Şekil 3. 1. Elektro-eğirme sistemi.....	23
Şekil 3. 2. Yapay ve yarı-yapay iskelelerin kültür sırasında plaka içindeki görüntüsü.....	25
Şekil 3. 3. Cam slayt üzerinde yer alan doğal iskelelerin kültür sırasında plaka içindeki görüntüsü.....	25
Şekil 4. 1. MK-MKH'lerin morfolojik görünümleri.....	27
Şekil 4. 2. İnsan menstrual kanından izole edilmiş MKH'lerin (P3) akım sitometri cihazında saptanan immunofenotipik özellikleri.....	28
Şekil 4. 3. İnsan menstrual kanından izole edilmiş MKH'lerin (P3) kemik farklılaşmaları.....	29

Şekil 4. 4. İnsan menstrual kanından izole edilmiş MKH'lerin (P3) yağ farklılaşmaları...	30
Şekil 4. 5. İnsan iskelet kas dokusundan izole edilmiş miyoblastların (P3) mikroskopik görüntüleri.....	31
Şekil 4.6. İnsan iskelet kas dokusundan izole edilmiş miyoblastların (P3) akım sitometri cihazında saptanan immunofenotipik özellikleri.....	32
Şekil 4. 7. İnsan iskelet kası öncül hücreleri (miyoblastlar) (P3) kemik farklılaşmaları....	33
Şekil 4. 8. İnsan iskelet kası öncül hücreleri (miyoblastlar) yağ farklılaşmaları.....	33
Şekil 4. 9. İnsan iskelet kası parçasının doğal hali ve kasın hücrelerinden arındırıldıktan sonraki makro görüntüsü.....	34
Şekil 4.10. Doğal Hücrelerinden arındırılmış insan kas parçalarının hematoksilin ve eozin boyamaları.....	35
Şekil 4.11.Masson trikrom boyaması sonrasında doğal ve hücrelerinden arındırılmış kas doku örneklerinin ışık mikroskobu görüntüleri.....	35
Şekil 4.12. Elektro-eğirme yöntemi ile üretilen iskelelerin makro ve ışık mikroskobu görüntüleri.....	36
Şekil 4.13. Komasi mavisiyle boyanmış normal iskele ve Yarı-yapay iskelenin mikroskopik görüntüleri.....	37
Şekil 4.14. Normal yapay iskelenin Kas parçaları bağlanmış yarı-yapay iskelenin SEM mikrofotografı.....	37
Şekil 4.15. MK-MKH ve Miyoblast hücreleri ekilmiş aselüler doğal kas iskelesi 1. hafta ışık mikroskobu görüntüleri.....	39
Şekil 4.16. MK-MKH ve Miyoblast hücreleri ekilmiş doğal aselüler kas iskelesi 3. hafta ışık mikroskobu görüntüleri.....	39
Şekil 4.17. Miyoblastların 1, 5 ve 10. günlerde yapay ve yarı-yapay iskeleler üzerindeki çoğalma oranları.....	40
Şekil 4.18. MK-MKH'lerin 21. günde iskeleler üzerindeki çoğalma oranları.....	41

Şekil 4. 19. Miyoblastların 21. günde iskeleler üzerindeki çoğalma oranları.....	41
Şekil 4. 20. Miyoblastların yapay ve yarı-yapay iskeleler ile cam slayt üzerindeki alfa-aktinin antikor boyamaları.....	43
Şekil 4. 21. MK-MKH'lerin yapay, yarı-yapay, doğal iskeleler ve sürüntü üzerindeki alfa-aktinin antikor boyamaları.....	44
Şekil 4. 22. Miyoblastların yapay, yarı-yapay, doğal iskeleler ve sürüntü üzerindeki alfa-aktinin antikor boyamaları.....	45
Şekil 4. 23. MK-MKH'lerin yapay, yarı-yapay, doğal iskeleler ve sürüntü üzerindeki desmin antikor boyamaları.....	46
Şekil 4. 24. Miyoblastların yapay, yarı-yapay, doğal iskeleler ve sürüntü üzerindeki desmin antikor boyamaları.....	47
Şekil 4. 25. MK-MKH'lerin yapay, yarı-yapay, doğal iskeleler ve sürüntü üzerindeki MyoD antikor boyamaları.....	48
Şekil 4.26. Miyoblastların yapay, yarı-yapay, doğal iskeleler ve sürüntü üzerindeki MyoD antikor boyamaları.....	49
Şekil 4. 27. Miyoblastların yapay ve yarı-yapay iskeleler ile cam slayt üzerindeki falloidin boyamaları.....	50
Şekil 4. 28. MK-MKH'lerin yapay, yarı-yapay, doğal iskeleler ve sürüntü üzerindeki falloidin boyamaları.....	51
Şekil 4.29. Miyoblastların yapay, yarı-yapay, doğal iskeleler ve sürüntü üzerindeki falloidin boyamaları.....	52
Şekil 4. 30. MK-MKH'lerin yapay, yarı-yapay ve doğal iskeleler üzerindeki SEM mikrofotografı.....	53
Şekil 4. 31. Miyoblastların yapay, yarı-yapay ve doğal iskeleler üzerindeki SEM mikrofotografı.....	54

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2. 1. Farklılaşma yeteneklerine göre diğer kök hücre çeşitlerinin isimlendirilmesi.....	5
Çizelge 4.1. Yapay islenin mekanik test cihazıyla elde edilen karakteristik özellikleri.....	38



## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Günümüzde geleneksel tıbbi tedavi yöntemleri kullanılarak doğuştan (yarık dudak hastalığı) veya kaza sonrası meydana gelen (özellikle yüz kaslarında) kas eksiklikleri gibi doku kaybı temelli patolojik süreçlerin onarılması, vücudun başka bir kısmından kas yaması alınıp hasarlı bölgeye nakledilmesi şeklinde gerçekleşmektedir. Bu geleneksel yöntemde, hastanın kas doku hasarı giderilmeye çalışılırken, vücudunun bir başka yerinde kas kaybına neden olunmaktadır. Ayrıca, bu yöntem ile vücudun bütünlüğünü tehdit edebilecek ciddi kas kayıplarına (travmatik kayıplar gibi) kesin çözüm üretilememektedir (Kumar and Hassan, 2002). Bu sorunu giderebilmek için, son yıllarda doku mühendisliği yöntemleri kullanılarak laboratuvar koşullarında işlevsel iskelet kası yaması üretimi gerçekleştirilerek kas doku kaybının giderilmesi amaçlanmaktadır (Yan et al. 2007, Meyer et al. 2009, Koning et al. 2009).

Bu çalışmada, insan kas hücresi öncülleri (miyoblast) ile menstrual kan kaynaklı mezenkimal kök hücreler (MKH'ler) kullanılarak aselüler çizgili kas kaynaklı doğal ve yarı-yapay iskelelerden iskelet kas dokusu elde edilmesi hedeflenmiştir. Ortopedik ameliyatlarda ameliyatın özelliği gereği hastadan alınan ve tıbbi atık olarak değerlendirilen patolojik olmayan çizgili kas dokusu parçalarından çeşitli doku parçalayıcı enzimler yardımıyla insan iskelet kası öncül hücreleri (miyoblastlar) elde edilmiştir. Yine çizgili kas dokusu parçaları çeşitli deterjan türevli maddelerle donör hücrelerinden arındırılmış ve böylece hücresiz doğal kas iskeleleri elde edilmiştir. Az miktarda doğal doku kullanarak daha geniş boyutlu kas doku özdeşi elde etme amacıyla da hücrelerinden arındırılmış iskeleler homojenizatör yardımıyla toz haline getirilmiş ve elde edilen ekstrakt yapay iskelelere çapraz bağlayıcı moleküller ile bağlanmıştır. Doğal, yapay ve yarı-yapay iskeleler üzerine insan miyoblast hücreleri ve menstrual kandan izole edilen MKH'ler ekilerek kültür ortamında büyütülmüş ve iskelet kas dokusu oluşturma potansiyelleri incelenmiştir. Bu aşamada, kültüre herhangi bir büyüme faktörü, hormon vb. eklenmemiş, farklılaşmanın sadece iskele özellikleri ile gerçekleşip gerçekleşmediği araştırılmıştır.

Bu çalışma ile hücrelerinden arındırılmış doğal kas iskelelerin ve hücresiz doğal kas komponentleri (protein, glikoprotein) tutuklanmış daha geniş boyuttaki yarı-yapay iskelelerin kullanımı ile farklı iki yöntem uygulanarak kas yamalarının üretilmesi amaçlanmıştır. Bununla birlikte, bu iskelelerin hücresel bileşenlerini de miyoblast ve

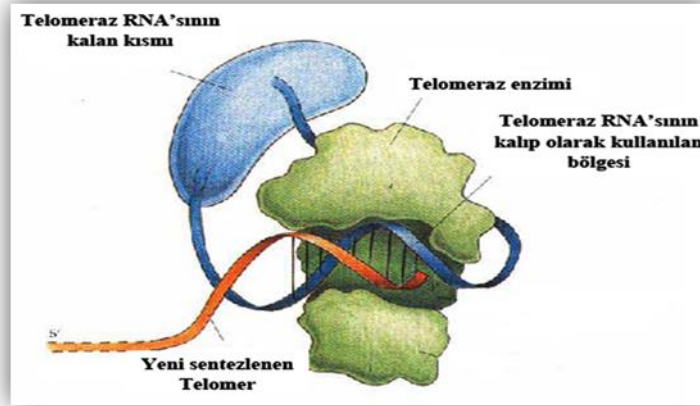
MKH'ler gibi iki farklı hücre kaynağından seçerek, kas yaması üretimi için en uygun iskele ve hücre tipi de araştırılmıştır.

Yarı-yapay veya yapay iskeleler kullanılarak doğal eşdeğer çizgili kas oluşumunun elde edilmesi halinde, bu yöntem gelecekte kas hasarı bulunan hastalara kendilerinden alınacak küçük bir biyopsi ile çok daha geniş boyutlarda otolog çizgili kas dokusu sağlamanın yolunu açmış olacaktır. Bu çalışma ile doğuştan (yarık dudak hastalığı) veya kaza sonrası meydana gelen (özellikle yüz kaslarında) kas eksikliklerinin giderilmesini sağlayacak prototip model geliştirilmeye çalışılmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Kök Hücreler

Kök hücreler, vücudumuzdaki farklı özelleşmiş hücelere dönüşebilme kapasitesine sahip, kendini yenileyebilen ve sınırsız çoğalma kapasitesi bulunan öncül hücrelerdir (Hayes, 2006). Bu hücrelerde, her bölünme sonucunda kısalan telomer adı verilen Deoksiribonükleik asit (DNA) bölgelerini (insanda TTAGGG) kendi Ribonükleik asit (RNA) kalıbını kullanarak ifade eden, telomeraz enzim aktivitesi yüksektir. Bu durum onlara bölünmelerinin teorik olarak sınırsız olması özelliği kazandırır. Bunun aksine, söz konusu enzim, vücut hücrelerinde aktif olmadığı için, belli bir bölünmeden sonra vücut hücreleri canlılığını yitirecektir (Yui et al. 1998, Karaöz ve Ovalı, 2004).

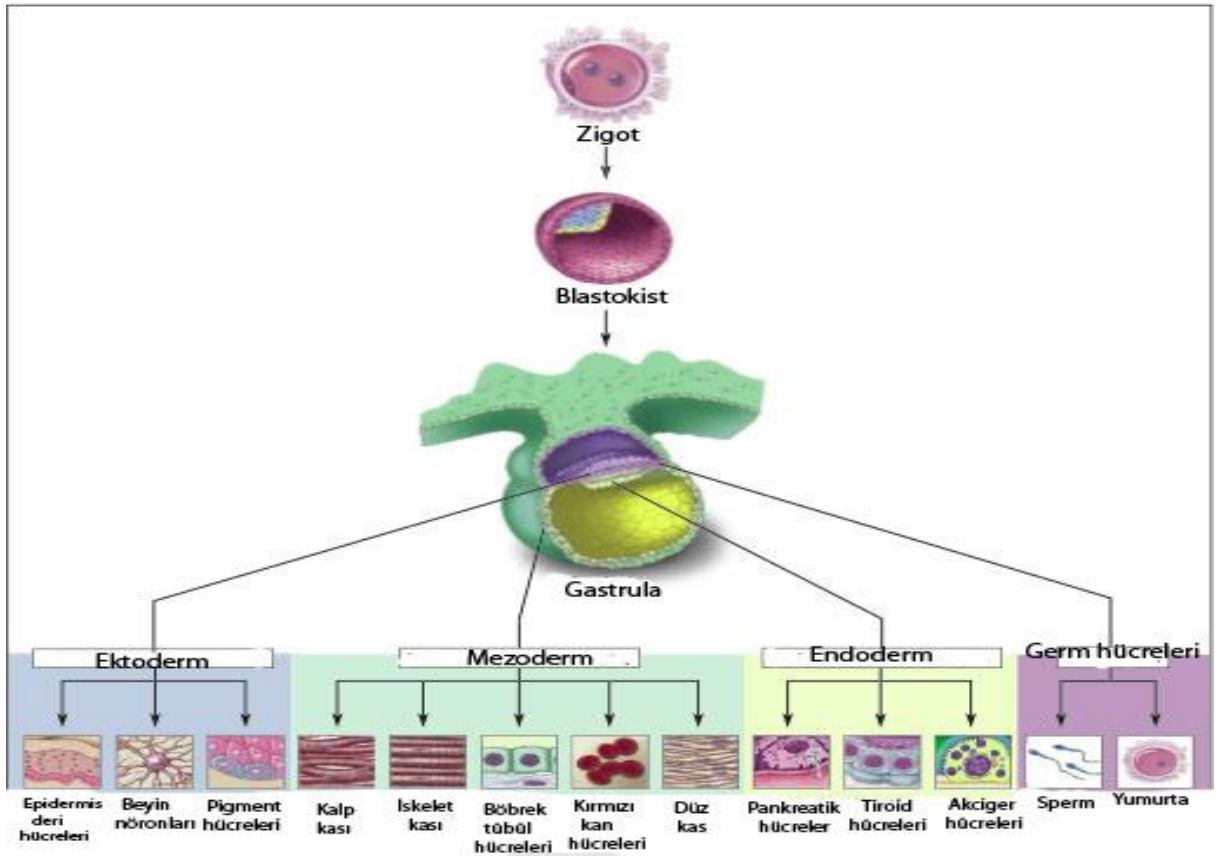


Şekil 2. 1. Telomeraz enzimi (Alberts, 2002).

Kök hücrelerin, *in vivo* ve *in vitro* koşullarda, dönüştürülmek istenen özelleşmiş hücelere farklılaşmaları da uygun uyarıyı almaları yoluyla gerçekleşebilir. Bu uyarılar, canlıda genellikle hasar sinyalleri, laboratuvarında ise çeşitli kimyasal maddeler ve proteinlerdir (Freshney, 2005).

Embriyolojik dönemde, döllenmeden sonraki üç gün içerisinde gerçekleşen bölünmeler sonucunda oluşan 4 hücrenin tamamı, yeni bir canlı oluşturabilme

kapasitesinde olup, totipotent (*totus*: tüm) kök hücreler olarak adlandırılırlar. Daha sonraki aşamada, bu hücreler blastokist denilen yapıyı oluşturarak yeni bir canlı şekillendirebilme özelliklerini yitirirler. Fakat insan vücudundaki iki yüz farklı özelleşmiş hücre tipine dönüşebilme potansiyellerinden ötürü pluripotent (*pluri*: daha fazla) kök hücreler adını alırlar. Embriyoda bu aşamadan sonra gastrulasyon aşaması başlar ve *germ* tabakaları (ektoderm, mezoderm ve endoderm) oluşur. Bu tabakalara göç eden hücrelerin hangi tip hücrelere dönüşebilecekleri büyük ölçüde bellidir. Dolayısıyla, bu dönemdeki kök hücreler multipotent (*multi*: fazla, çok) kök hücreler adını alırlar. Embriyonik evre haricinde, multipotent kök hücreler insanların kemik iliği, kordon kanı ve diş pulpası gibi kısımlarında bulunarak insanın canlılığını bir denge içerisinde sürdürmesini sağlarlar (Bedhesta, 2009).



**Şekil 2. 2.** İnsan embriyolojik gelişim evreleri ve germ tabakalarından köken alan hücre çeşitleri (Bedhesta, 2009).

Bilimsel çalışmalarda, totipotent, pluripotent ve multipotent kök hücelere ağırlık verilse de vücudumuzda özelleşmiş hücrelerin üretimini sağlayan farklılaşma kapasitesi daha sınırlı kök hücreler de mevcuttur. Bu hücrelerin isimlendirilmesi ve oluşturabildikleri hücre tipleri Çizelge 1’de belirtilmiştir.

**Çizelge 2. 1.** Farklılaşma yeteneklerine göre diğer kök hücre çeşitlerinin isimlendirilmesi (Kochar, 2004).

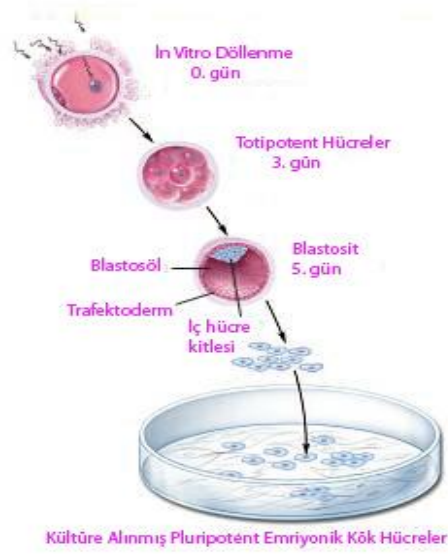
<b>Farklılaşma Potansiyeli</b>	<b>Dönüşebildiği Hücre Tiplerinin Sayısı</b>	<b>Örnek Kök Hücre Tipi</b>	<b>Farklılaşma Sonucunda Oluşan Hücre Tipi</b>
Oligopotent	5	Miyeloid öncülleri	Beş kan hücresi tipine (Monosit, makrofaj, eozinofil, nötrofil, eritrosit)
Quadripotent	4	Mezenkimal öncül hücreler	Kıkırdak, yağ, stromal, kemik oluşturan hücreler
Tripotent	3	Glial-sınırlanmış öncüller	Astrositlerin iki tipi, oligodentrositler
Bipotent	2	Murine fetal karaciğer hücresi öncülleri	B hücreleri, makrofajlar
Unipotent	1	Mast hücre öncülleri	Mast hücreleri

## 2.2. Kök Hücre Çeşitleri

### 2.2.1. Embriyonik Kök Hücreler (EKH)

Bu tip kök hücreler, *in vitro* döllenen sonra takip eden beş gün içerisinde oluşan Blastokist’in, embriyoyu oluşturacak iç hücre kitlesinden elde edilir. Yapılan denemelerde,

kültürde çoğaltılan embriyonik kök hücrelerin, bağışıklığı baskılanmış farelere nakledildiklerinde her üç germ tabakasını içeren bir tümör dokusu olan teratomları oluşturabildikleri gözlenmiştir. Bu özellik, çoğul potansiyel (pluripotensi) özelliği olarak ifade edilmektedir (Elçin, 2009). Ayrıca bu hücrelerin karakteristik özelliklerinden biri de farklılaşmayı önleyici kültür şartları sağlandığında, uzun bir zaman boyunca farklılaşmadan kendi kopyalarını oluşturmak üzere bölünebilmeleridir. Morfolojik olarak da bu hücreler bol sitoplazmalı ve büyük çekirdekli yapılara sahiptirler. Karakteristik olarak, alkalen fosfataz enzim aktiviteleri yüksek olup, Oct3/4 ve Sox2 gibi pluripotensi genlerinin ifadesi bu hücrelerde yüksektir (Yu and Thomson, 2006).



**Şekil 2. 3.** Pluripotent embriyonik kök hücrelerin eldesi ve kültüre alınması (Yu and Thomson, 2006).

1998 yılında ilk insan EKH dizisinin üretildiği, Thomson ve ark. tarafından rapor edilmiştir (Thomson et al. 1998). Bu tarihten sonra yapılan çalışmalarda, EKH'lerin yüksek farklılaşma kapasitesine sahip olmaları ve erişkin kök hücreleri gibi kültürde çoğaltılma zorlukları şeklinde bazı dezavantajları olmamasından dolayı, hücrel tedavi ve doku mühendisliği stratejileri için daha uygun bir kaynak oldukları görülmüştür (Elçin, 2009). Ayrıca, EKH'ler insan embriyonik gelişim safhalarının incelenmesi ve ilaç denemelerinde model olabilme kapasiteleriyle de kök hücre çalışmalarında önemli bir yer tutmaktadırlar (Yu and Thomson, 2006).

Tüm bu avantajlarına rağmen, kısırlık tedavisi sonucu çocuk sahibi olmak için IVD (*in vitro* dölleme) ile oluşturulan fazla embriyoların kullanımı amaçlansa da, EK hücrelerle ilgili etik tartışmalar sürmektedir. Ayrıca teratom oluşturmak EKH'lerin karakteristiklerinden olduğu için yenilenebilir tıpta kullanılma aşamasında dikkatli davranılmalıdır.

## **2.2.2. Embriyonik Olmayan Kök Hücreler**

### **2.2.2.1. Hematopoietik Kök Hücreler**

Hematopoietik kök hücreler, kemik iliğinde sürekli olarak kendilerini yenilerler ve kanda bulunan tüm hücre türlerine farklılaşabilme yetenekleri mevcuttur. Kemik iliğinde yerleşik olan bu hücreler, fetüsün karaciğerinde, dalağında, göbek kordonunda, plasentada ve erişkin periferik kanında da bulunabilirler. Bu hücreler, erişkin insanlardan kolaylıkla elde edilebilen değerli bir kök hücre türüdür. Erişkin insanlarda periferik kandan aferez denilen özel bir yöntemiyle ve kalça kemiğinden uzman hematologlarca özel bir iğne yardımıyla ve bebeklerde de doğum sonrası kordonlarından alınan kordon kanından kolayca elde edilebilirler. Bu hücreleri tanımlamak için ise yüzey işaretçisi olarak CD34 ve CD45 gibi yüzey işaretçileri kullanılmaktadır (Karaöz ve Ovalı, 2004).

Hematopoietik kök hücreler başta lösemiler olmak üzere çeşitli hastalık durumlarında kan sistemini tekrar elde etmek amacı ile uzun yıllardır kullanılmaktadır. Günümüzde ise, lösemiler dışında solit organ tümörlerinde, doğumsal genetik hastalıklarda ve bazı edinsel kan hastalıklarının tedavisinde de kullanılmaya başlanmıştır.

**Kemik İliği Kök Hücre Nakillerinin Bugün En Çok Kullanıldığı Alanlar;**

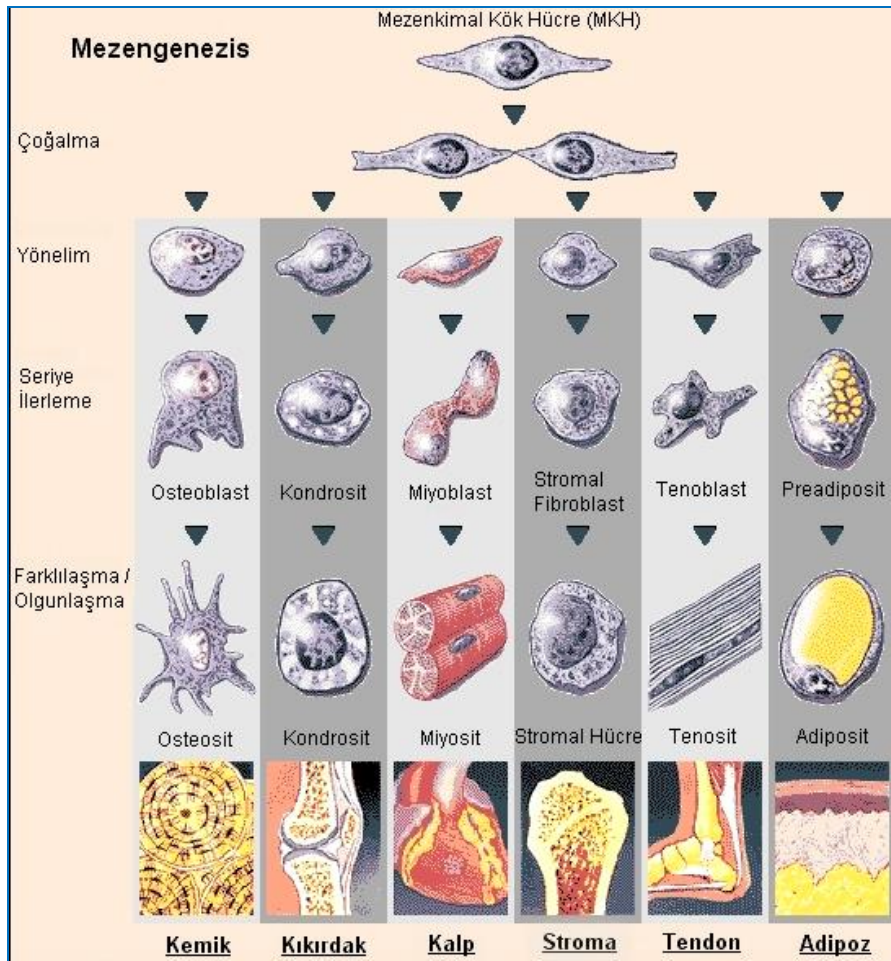
- 1- Lösemiler
- 2- Lenf bezi kanserleri olan Hodgkin hastalığı ve Non-Hodgkin lenfomalar,
- 3- Çeşitli solit organ kanserleri (meme, testis, a.c. kanseri gibi)
- 4- Kemik iliğinin yetersiz çalıştığı veya çalışmadığı durumlarda

(Aplastik anemi)

5- Talasemi başta olmak üzere bazı genetik geçişli hastalıklarda (Karaöz ve Ovalı, 2004).

### 2.2.2.2. Mezenkimal Kök Hücreler (MKH)

Mezenkimal kök hücrelerin ana kaynağı kemik iliği olmakla beraber birçok dokudan izole edilebileceği bilinmektedir. Bu dokuların başlıcaları, dental pulpa, sinovial sıvı, adet kanı ve yağ dokuları, kordon kanı ve matriksidir. Bu hücreler buldukları dokularda, Mezenjenezis hipotezine göre çoğalma, yönelim, seviye ilerleme, farklılaşma aşamalarından geçerek ilgili hücre tipine farklılaşırlar. Böylece vücutta doku onarımının başrol oyuncularını olarak görev alırlar (Karaöz ve Ovalı, 2004).



Şekil 2. 4. Mezenjenezis (Karaöz ve Ovalı, 2004).



Bu hücreler, embriyonik kök hücreler gibi teratom oluşturması riski olmaması, etik sorunlar taşımaması ve dokuya özgü olabilmesi nedeniyle, yenileyici tıpta tedaviye yönelik araştırmalarda çok sık olarak tercih edilmektedir. Bu anlamda, mezenkimal kök hücrenin birçok alanda klinik kullanım potansiyeli mevcuttur:

- kemik dokularının tamiri,
- osteoporoz,
- kırık dokusu tamiri,
- dejeneratif nöron hastalıkları,
- kalp dokusu yenilenmesi
- kemik iliği nakilleri,
- konjenital genetik hastalıklar

bu alanların başlıcalarıdır (Karaöz ve Ovalı, 2004).

MKH'lerin kesin bir yüzey işaretçileri olmamakla birlikte bu hücreler klinik ve ya araştırma amaçlı kullanılmadan önce akım sitometrisi yöntemiyle mutlaka CD13, CD29, CD44, CD90, CD 73, CD 105, CD146, CD166, HLA ABC pozitif; CD3, CD8, CD11b, CD14, CD15, CD19, CD33, CD34, CD45, CD117 ve HLA-DR negatif olmaları açısından karakterize edilmelidir. Bu tür bir işaretçi ifadesini sağlayan hücrelerin MKH olduklarına dair tüm bilim adamlarınca bir ortak fikir oluşturulmuştur.

Güncel gelişmeler ışığında, yağ kökenli MKH'lerin kemik, kırık dokusu ve yağ oluşturmaya, dental pulpadan elde edilenlerin ise sinir hücreleri oluşturmaya eğilimli oldukları bilinmektedir. Son gelişmelerde ise oldukça yeni bir MKH kaynağı olarak gösterilen adet kanından elde edilen kök hücrelerin ise çizgili kas oluşturmaya eğilimli oldukları görülmektedir (Cui et al. 2007, Patel and Silva, 2008).

Ayrıca menstruasyon döngüsü kanı mezenkimal kök hücreleri (MK-MKH), deney hayvanı modellerinde felç ve Duchenne kas distrofisi (DMD) gibi hastalıkların tedavisinde tetikleyici bir rol üstlenmektedirler (Borlongan et al. 2010, Cui et al. 2007). Ayrıca, a) yüksek büyüme faktörü seviyesi b) immün cevabı baskılayabilme özelliği c) karyotipik özelliklerini ve ya farklılaşma özelliklerini kaybetmeden büyük oranda çoğaltılabilme

özellikleri MK-MKH'lerin kritik limb iskemisi (CLI) gibi hastalıkların tedavisinde de kullanılabileceğini göstermektedir (Murphy et al. 2008).

MK-MKH'lerin iskelet kasına dönüşmelerinin yanı sıra kardiyak ve kondrojenik farklılaşma potansiyellerinin de keşfi, bu hücrelerin doku mühendisliği uygulamalarında kullanılmasını cazip hale getirmiştir (Toyoda et al. 2007, Hida et al. 2008, Kazemnejad et al. 2012).

### **2.2.2.3. Organ ve ya Dokulardaki Kök Hücreler**

Organ ve ya dokuya özgü hücreleri gerektiğinde oluşturmak ve ya oluşmasına destek vermek için organ ve ya dokuların çeşitli kısımlarına yerleşmiş öncül hücrelerdir. Bu hücrelere en belirgin örnekler, çizgili kasta bulunan ve suskun halde bulunarak gerektiğinde hasar gören kas liflerini onaran satellit hücreleri ile pankreastaki insülin üreten langerhans adacıklarında bulunan adacık kök hücreleridir (Karaöz ve Ovalı, 2004, Meyer et al. 2009).

## **2.3. İskelet Kasları**

### **2.3.1. Yapı ve Fonksiyon**

İskelet kasları iskelet sistemine bağlanan vücut ağırlığının %48'ini oluşturarak temel görevleri organizmanın hareketini sağlamak olan yapılardır. İskelet kaslarının diğer görevleri ise aşağıda sıralanmıştır:

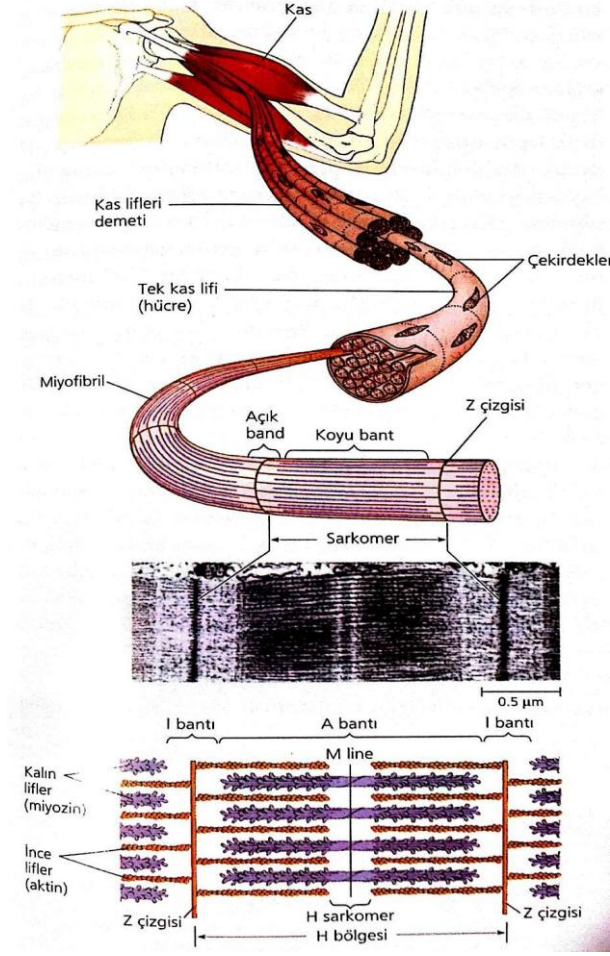
- İç organların korunması (Karın Kasları )
- Solunuma yardımcı olmak (Solunum kasları)
- Yüz ifadelerini kontrol etmek
- Dil, göz ve çene hareketliliğini sağlamak.

İskelet kası, uzanmış, çok hücreli fiberler ile kaplanmış bağ doku tabakasıdır. Kas lifleri miyofibril adı verilen daha küçük lifler içerir, miyofibrillerde miyoflament adı verilen ince ve kalın uzantılardan oluşur. Miyoflamentler kasılabilir proteinlerden oluşmuştur.

Bunlar;

- Myozin,
- Aktin,
- Tropomyozin
- Troponin: Troponin I, Troponin T, Troponin C'dir.

Myofibriller birleşerek fibrili (kas lifini) oluşturur. Her bir kas lifi sarkolemmannın üzerindeki konnektif doku katmanı (endomisyum) ile sarılıdır. Kasın çok çekirdekli ve iyi organize olmuş bu yapısı kasa güçlü kasılabilir bir özellik kazandırmaktadır (Meyer et al. 2009).

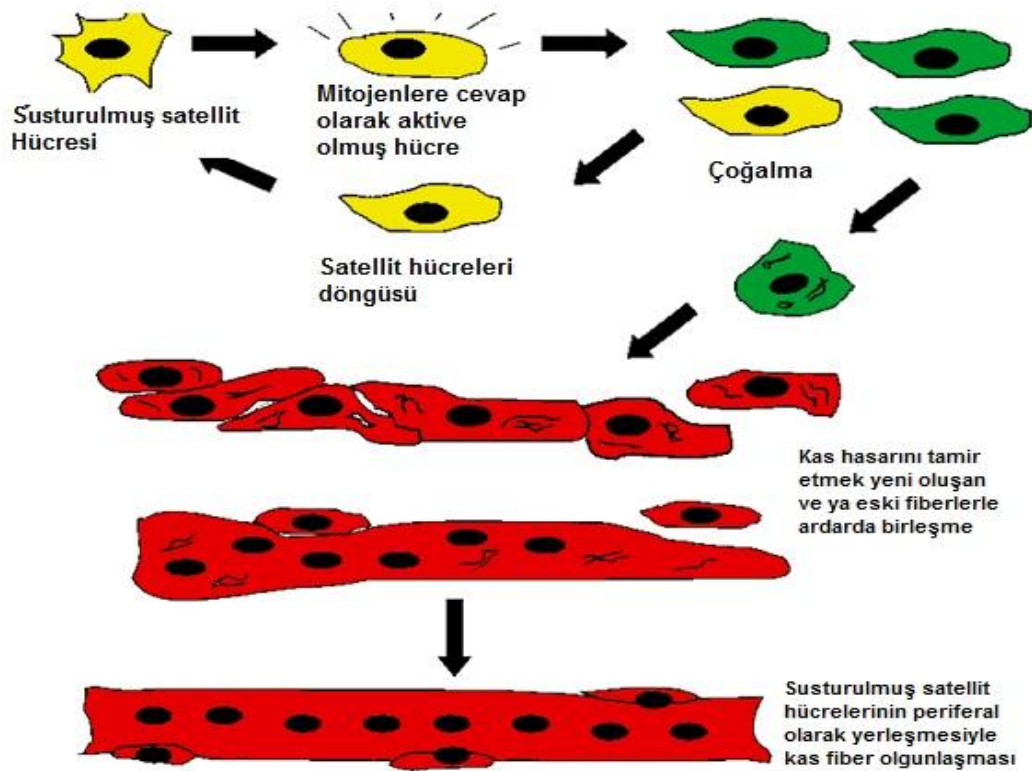


**Şekil 2. 5.** Bir İskelet Kasının Yapısı (Campbell and Reece, 2006)

İskelet kasının kasılması kayan filament modeline göre açıklanmaktadır. Bu modele göre, kas kasıldığında ne ince filamentlerin ne de kalın filamentlerin boylarında bir kısalma olmaz. Sadece filamentler birbiri üzerinde uzunlamasına kayarak, ince ve kalın filamentlerin birbiri üzerine örtüşme derecesi artar. Filamentlerin bu kayma hareketleri aktin ve miyozin moleküllerinin etkileşimiyle gerçekleşmektedir. Çeşitli biyokimyasal etkileşimlerle miyozin molekülleri aktin filamentleri üzerinde hareket ederek kas kasılmasını oluştururlar (Campbell and Reece, 2006).

### 2.3.2. Kas Dokunun Doğal Yolla Onarımı

Kasın yapısında bulunan fiberler arasında sessiz halde duran erişkin kök hücreler iskelet kaslarının doğal yolla yenilenmesinde en önemli etkidir. İskelet kasında bir hasar olduğunda, hasarlı bölgedeki hücreler hasar sinyalleri salgırlar. Kasta bulunan ve bu sinyalleri alan satelit ve miyoblast hücreleri sayılarını arttırarak, hasarlı bölgeye geçer ve kas lifine ardarda eklenerek hasarlı bölgede onarımın gerçekleşmesini sağlarlar (Meyer et al. 2009).



Şekil 2. 6. İskelet Kası Dokusunun Doğal Yolla Yenilenmesi (Meyer et al. 2009)

### 2.4. Doku Mühendisliği

Günümüzde geleneksel tıbbi tedavi yöntemleri kullanılarak doğuştan (yarık dudak hastalığı) veya kaza sonrası meydana gelen (özellikle yüz kaslarında) kas eksiklikleri ve ya

adipoz doku kayıpları vücudun başka bir kısmından doku alınıp hasarlı bölgeye nakledilmesi şeklinde gerçekleşmektedir. Bu durum özellikle kas doku kayıplarında hastaların hasarlı bölgelerini onarıırken başka bir bölgede yeni bir hasar oluşturmaya sebep olmaktadır. Tümör cerrahisi ile çıkarılan dokularda ise bazen çıkarılan kısmın yerine bölgeyi tamamlayıcı bir doku nakledilememekte hasarlı bölge de kendini doğal yolla onaramamaktadır (Örneğin; tümör cerrahisi sonucu çene kemiğinin alınması durumunda) (Kumar and Hassan, 2002). Bunlar ve benzeri sorunları giderebilmek için, son yıllarda doku mühendisliği yöntemleri kullanılarak laboratuvar koşullarında işlevsel doku yamaları üretimi gerçekleştirilerek doku kayıplarının giderilmesi amaçlanmaktadır.

Doku mühendisliği bileşenleri hücre, iskele ve düzenleyiciler olup işlevsel bir doku elde edebilmek için çok miktarda hücreye ihtiyaç duyulmaktadır. Doku mühendisliği uygulamaları için laboratuvar ortamında kolayca çoğaltılabilmesi ve birçok hücre tipine dönüşebilme özelliği sayesinde en çok kullanılan hücre tipi mezenkimal kök hücrelerdir. Bunun yanı sıra, dokuya özgü (Myoblast, Osteoblast vb) hücreler de doku mühendisliğinde hücre kaynağı olarak tercih edilmektedir (Lanza et al. 2007).

Bir kök hücrenin veya öncül hücrenin farklılaşma veya kendini yenileme yollarına yönelmesinde nişin (mikroçevre, yatak, yuva) etkisi son derece önemlidir. Niş, temelde yapısal, biyolojik ve mekanik özellikleri ile hücre davranışına yön verir. Laboratuvar ortamında büyüme faktörlerinin yanı sıra kök hücrelere veya öncül hücrelere çeşitli mikroçevre özelliklerinin sağlanması ile hedef hücre farklılaşmasının daha verimli bir şekilde gerçekleştirilmesi hedeflenmektedir. Bu bağlamda, oluşturulmak istenen dokunun özelliğine göre iskele tipleri belirlenmelidir. Nano/mikrofiber ağ yapıları, süngerimsi yapılar ve ya doğal hücresiz matriks yapıları tercih edilebilir. Bu yapılarda biyolojik ve ya yapay polimerlerin yanı sıra doğal bileşenler de tercih edilebilir (Lanza et al. 2007).

Doku mühendisliğinde düzenleyiciler olarak hormonlar, büyüme faktörleri, proteinler ve ya çeşitli kimyasallar kullanılmaktadır. Oluşturulmak istenen dokunun tipine göre bu düzenleyiciler seçilerek, kök ve ya öncül hücrelerin verimli bir biçimde üretilmek istenen dokunun özgün hücrelerine farklılaşması sağlanabilir (Fresney, 2005).

## 2.4.1. İskelet Kası Doku Mühendisliği

İskelet kası doku mühendisliğinde hedef, çizgili kas doku özdeşleri (yamaları) üreterek, doğuştan (yarık dudak hastalığı) veya kaza sonrası meydana gelen (özellikle daha küçük ölçekli olan yüz kaslarında) kas eksikliklerini gidermek, cerrahi ile çıkarılan kanserli bölgeleri onarmak ve gerekli görülen bazı estetik düzeltmelerin yapılmasına imkan sağlamaktır. Çizgili kas doku özdeşlerini üretmek için doku mühendisliğinin temel bileşenleri olan hücre, iskele ve düzenleyicilere ihtiyaç duyulmaktadır (Lanza et al. 2007).

Bu bağlamda hücre tipi olarak, doğal süreçte meydana gelen hasarlarda kas hücrelerine dönüşerek dokuyu tamir edebilme özelliğine sahip, laboratuvar ortamında çok miktarda çoğaltılabilen ve kas hücrelerine dönüşme potansiyeli yüksek olan kas öncül hücreleri (miyoblastlar) kas doku mühendisliğinde sıklıkla kullanılmaktadır. Bununla birlikte, hücre kaynağı olarak laboratuvar ortamında rahatlıkla çoğaltılabilen ve birçok hücre tipine farklılaşabilen ve alloimmüniteye neden olmaması nedeniyle güvenilir bir kaynak olan MKH'ler de son yıllarda denenmektedir (Meyer et al. 2009).

Kullanılması muhtemel diğer hücreler ise aşağıda sıralanmıştır:

- Transforme olmuş miyosit hücre hatları (klinik için kullanımları uygunsuz)
- Ko-kültürler: Hücre Hatları (Örn: Miyoblast/fibroblast)

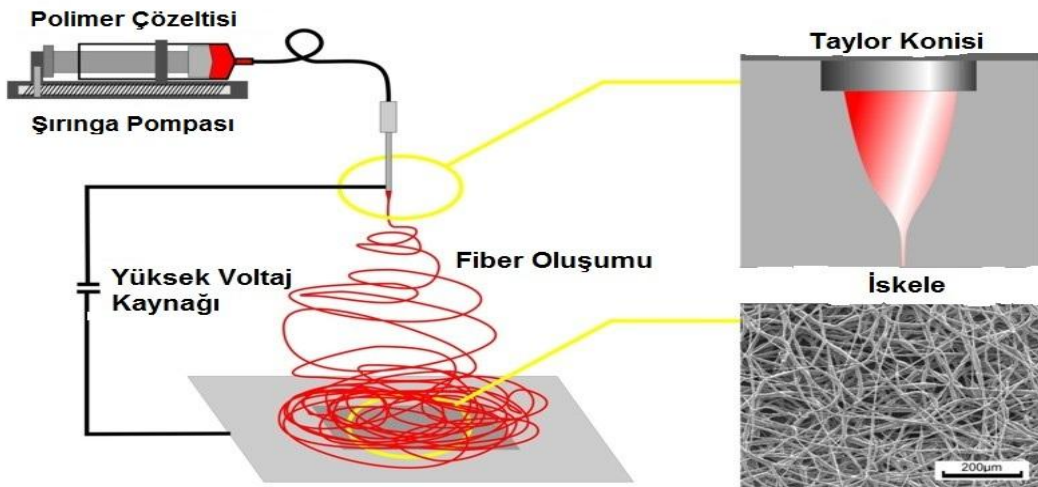
İskelet kası doku mühendisliğinde iskele olarak kullanılacak çeşitli stratejilerle üretilen yapılar mevcuttur:

**Doğal Hücresiz İskelet Kası Matrisi:** Doğal çizgili kas parçalarının hücrelerinden arındırılarak, bu hücresiz iskelelerde yeniden, transfer yapılması düşünülen bireyin kas kök hücrelerinin organize edilerek yeni bir kasın meydana getirilmesine yönelik bir stratejidir. Bu yöntemde, iskelenin doğal yapısının korunması sayesinde yeniden organize edilecek hücrelere kendi nişlerine benzer doğal bir iskele sağlanmış olacaktır. Ayrıca, bu yöntemde bazı büyüme faktörlerinin doğal hücresiz iskele içerisinde korunduğunun gösterilmesinin de işlevsel çizgili kas yamaları üretimi açısından olumlu bir etki oluşturacağı düşünülmektedir (De Coppi et al. 2006, Merritt et al. 2010)

**Elektro-eğirme Yöntemi ile oluşturulan Mikro/Nanofiber Yapılar:** Elektro-eğirme yöntemi, polimerlerden yüksek derecede poroz ve düzgün mikro/nano düzeyde fiberler oluşturulabilen bir yöntemdir. Yönlenmiş fiber yapıların oluşması hücrelerin paralel bir şekilde organize olmasını sağlayarak, yönlenmiş hücrelere sahip kas dokusu oluşumunu kolaylaştıracağından bu yöntem sıkça tercih edilmektedir. Poli (glikolik asit) (PGA), poli (laktik asit) (PLLA) ve poli (kaprolakton) (PCL) gibi birçok biyoyumlu polimer bu yöntemle %90'a kadar poroz hale getirilebilir. Bunların dışında, kolajen ve aljinat başta olmak üzere, biyolojik polimerlerden de bu yöntemde iskele olarak yararlanılmaktadır (Meyer et al. 2009).

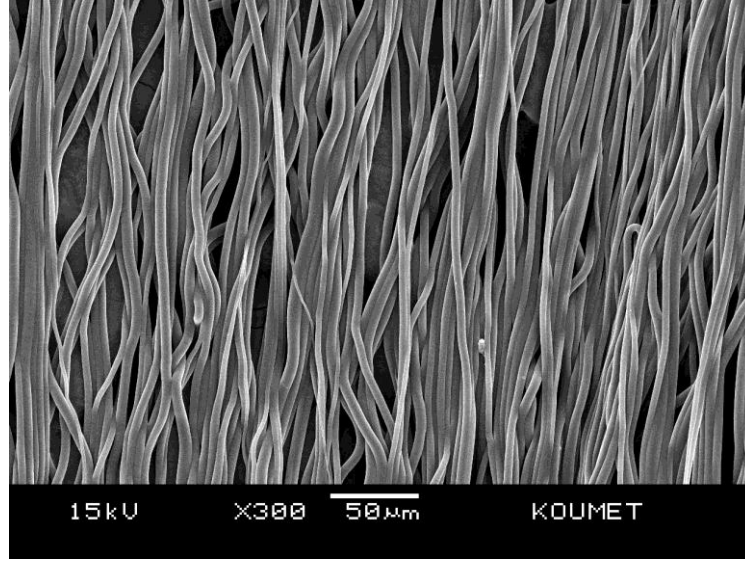
Yöntemde, uygun bir çözücü içerisinde akıcı hale getirilmiş polimer bir şırınga içersine çekilerek şırınga, şırınga pompasına yerleştirilir. İğnenin ucundaki metal uç ile karşı tarafa konulan ve polimerin üzerinde birikmesi istenen metal toplayıcı arasına teller ve bir voltaj kaynağı yardımıyla yüksek voltaj (10–15 kV) uygulanır. Şırınganın polimeri basmaya başlamasının ardından polimer ince bir çizgi halinde hareket eder ve yüksek voltajın etkisiyle metal levha üzerinde ince fiberler halinde birikir. İnce fiberler metal aparatın üzerinde görüldüğünde çözücüde uçarak poroz iskeleden ayrılır.

Bu düzenekle fiber kalınlığı ve ortalama gözenek çapı, polimer konsantrasyonu, çözücü seçimi, şırınga itme hızı, uygulanan voltaj, iğne ucunun çapı, fiberlerin toplandığı metal toplayıcı ve iğne ucu ile metal toplayıcı arasındaki mesafe ayarlanarak kontrol edilebilir (Meyer et al. 2009).



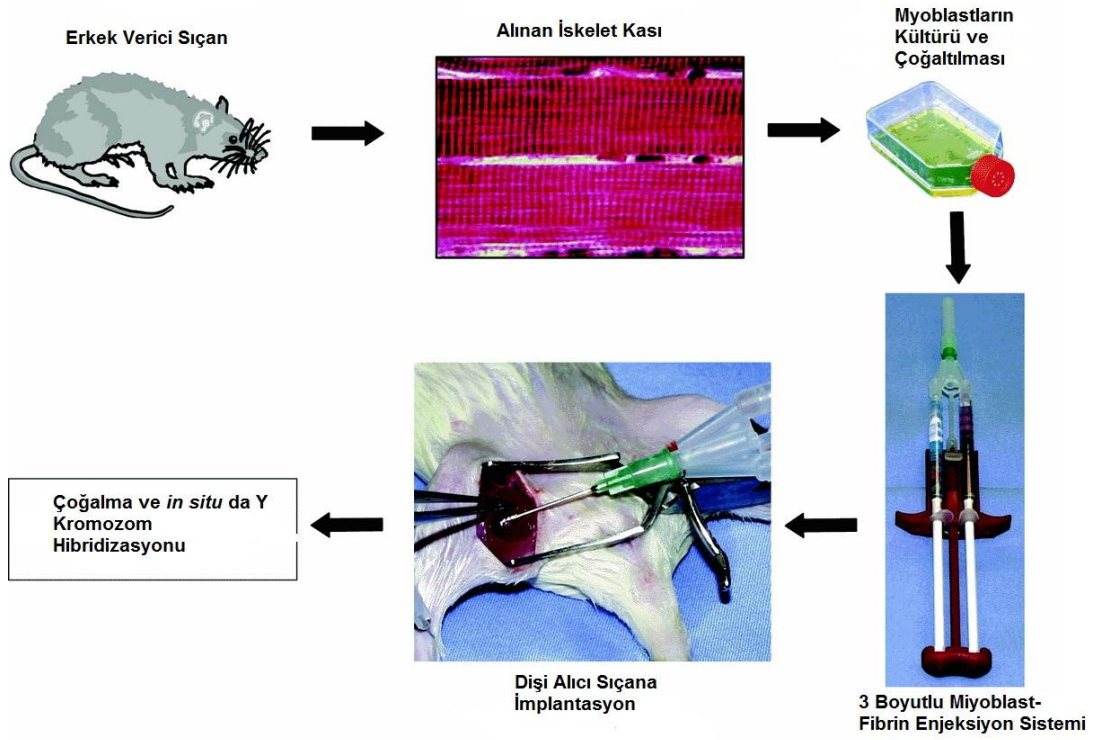
**Şekil 2. 7.** Elektro-eğirme sisteminin şematik gösterimi (Stevens et al. 2006)





**Şekil 2. 8.** Elektro-eğirme yöntemi ile üretilmiş poli(L-laktit-ko-kaprolakton) kopolimeri mikrofiberlerinin taramalı elektron mikroskobu görüntüsü

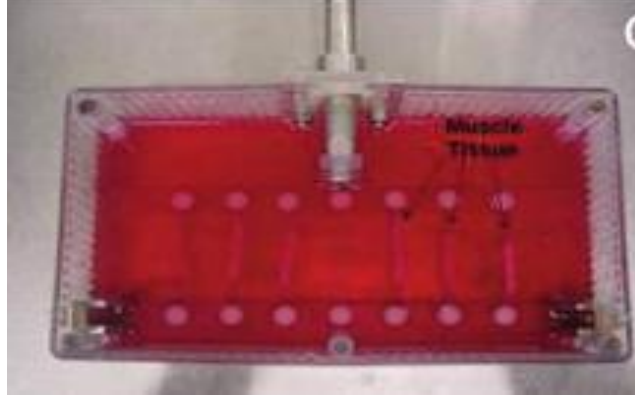
**Enjeksiyona Dayalı Metot:** Yöntemde, iskelet kası öncül hücreleri trombin ile karıştırılıp, hayvanda hasar bölgesine fibrinojen ile eş zamanlı olarak enjekte edilmesiyle polimerizasyon olması hedeflenmektedir. Hasarlı bölgeye trombin ve fibrinojenin eş zamanlı enjeksiyonu sonrası fibrin jeller dakikalar içinde bölgede oluşur. Fibrin jeller içersinde kalan iskelet kası öncül hücrelerinin de bu jeli geçici bir iskele olarak kullanması ve böylece kas hücrelerinin büyüyerek hasarlı bölgeyi onarması metodun temel stratejisini oluşturmaktadır (Beier et al. 2006).



**Şekil 2. 9.** Enjeksiyona Dayalı İskelet Kası Onarım Stratejisi (Beier et al. 2006)

İskelet kası doku özdeşlerini daha verimli bir biçimde üretmek amacıyla yapılan çeşitli uygulamalar da mevcuttur:

**Mekanik Uygulamalar:** Mekanik uyarılar iskelet kası öncül hücrelerinden kas hücresi oluşumunu başlatan ve kontrol eden önemli bir parametredir. Bu amaçla, kas öncül hücrelerini miyotüp oluşturmaya yöneltmek amacıyla çeşitli mekanik uyarıların (mekanik hücre sitümlatörleri) kullanılması yeni geliştirilen stratejilerdendir (Powell et al. 2002, Moon Du et al. 2008)



**Şekil 2. 10.** Üzerine kas öncül hücreleri ekilmiş doğal iskelele mekanik uyarma yapılan düzenek (Moon Du et al. 2008)

**Yüzeyel Özelliklerin Dizaynı:** Miyogenezde anahtar olay, öncül hücrelerin uç uca eklenmesidir. Bunu sağlamak için, katı yüzeyler düzgün oyuklar şeklinde düzenlenebilir. Lazer teknolojisi ile biyolojik polimerlerin yüzeyleri işlenebilir ve ya UV uygulama ile polimerik filmlerde mikrokanallar yapılandırılabilir (Meyer et al. 2009).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Menstruasyon Döngüsü Kanından MKH Elde Edilmesi Ve Karakterizasyonu

Bilgilendirme ve onam formunun imzalatılması sonrası vericilerden Regl döneminin ikinci gününde steril falkon tüpleri içerisine menstrual kan biriktirmeleri istendi. Bu kan örneği, besiyeri ile karıştırılarak filtre edildi ve hücre kültürü flasklarında kültüre alındı. Besiyeri değişimiyle ve pasajla eritrosit ve diğer hücreler elenirken, MK-MKH'lerin flaska tutunduğu gözlemlendi. Her üç günde bir hücrelerin besiyeri değiştirildi ve yüzeyin %70'i hücrelerce kaplandıktan sonra hücrelerin üzerine %0.25 Tripsin-EDTA (Gibco) solüsyonu uygulandı ve 5 dakika %5 CO<sub>2</sub> li 37 °C inkübatörde inkübe edildi. Tripsin yardımıyla kültür kabından ayrılan hücreler toplandı ve Thoma lamında sayılarak bir T-75 kültür kabına 10 x 10<sup>5</sup>/cm<sup>2</sup> hücre olacak şekilde aktarılarak pasaj yapıldı. Üçüncü pasaja geldiklerinde hücreler akım sitometri cihazı (BD Biosciences FACSCalibur) ile CellQuest yazılımı (BD Pharmingen) kullanılarak yüzey antijenleri (CD13, CD29, CD44, CD90, CD146, CD166, HLA ABC pozitif; CD3, CD8, CD11b, CD14, CD15, CD19, CD33, CD34, CD45, CD117 ve HLA-DR negatif) açısından karakterize edildi.

Eş zamanlı olarak MKH'ler 6x10<sup>4</sup> hücre/kuyucuk olacak şekilde 6 kuyucuklu plakalara ekildi. Ekilen hücreler karakterizasyon amaçlı yağ hücrelerine farklılaştırmak için %10 Fetal Sığır Serum (FBS) (Gibco), 200µM indometacin, 10µg/mL insülin, 0,5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX), 10<sup>-6</sup>M deksametazon ve %0.1 Primosin (Invivogen) içeren Minimum Essential Medium (MEM) (Gibco) besiyerini ile 4 hafta boyunca inkübe edildi. Kontrol olarak, %10 FBS ve %0.1 Primosin içeren MEM besiyerini ile 4 hafta boyunca inkübe edilmiş hücreler kullanıldı. Kemik hücrelerine farklılaştırmak için ise hücreler %10 FBS, 10<sup>-8</sup>M deksametazon, 10mM Gliserol-2-fosfat, 50 µg/ml askorbat-2-fosfat ve %0.1 Primosin'li MEM besiyerini ile 28 gün boyunca inkübe edildi. Kontrol olarak, %10 FBS, %0.1 Primosin'li MEM besiyerini ile 4 hafta boyunca inkübe edilmiş hücreler kullanıldı.

4 haftanın sonunda, yağ hücrelerine dönüştüğü gözlenen hücreler önce fosfat tamponlu tuz (PBS) içerisindeki %4 Paraformaldehit (PFA) (Merck) ile 15 dk oda sıcaklığında bekletilerek sabitlendi. Ardından sırasıyla PBS ve distile su ile yıkanan cam

slayt üzerindeki hücreler son olarak %60 2-propanol (Sigma-Aldrich) ile 5 dk oda sıcaklığında bekletildi. Sabitlenmeden sonra, 2-propanol ile Oil Red O (Sigma-Aldrich) 1:3 oranında karıştırılarak stok solüsyon oluşturuldu. Ardından stok solüsyon ile distile su 3:2 oranında karıştırılarak, karışım hücrelerle 40 dk boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi. Böylece, Oil Red O boyası ile yağ vezikülleri boyanarak MKH'lerin adipojenik olarak farklılaştığı gösterildi.

Kemik farklılaştırmasına alınan hücreler 28 günün ardından kalsiyum nodülleri oluşturdukları gözlenerek %70'lik alkol ile 5 dk +4°C'de bekletilerek sabitlendi. Sabitlenmenin ardından, distile su içerisinde %2 Alizarin Red (Fluka) olacak şekilde Alizarin Red çözeltisi hazırlandı. Boyanın pH'sı 4.1-4.3 arasında bir değere ayarlandı ve hücrelerin üzerine eklenerek 45 dk oda sıcaklığında bekletildi. Böylece, Alizarin Red boyası ile kalsiyum nodülleri boyanarak MKH'lerin osteojenik olarak farklılaştığı gösterildi.

Tüm bu denemelerden sonra MKH karakteri taşıdığı belirlenen hücreler pasaj dörde getirilerek iskeleler üzerine ekilmeye hazır hale getirildi.

### **3.2. Patolojik Olmayan İnsan Çizgili Kas Örneklerinden İskelet Kası Öncül Hücrelerinin Elde Edilmesi**

Patolojik olmayan insan çizgili kas parçaları, bistüri yardımıyla küçük parçalara ayrıldı. Eş zamanlı olarak, 10 mL Hank's Buffered Salt Solution (HBSS) (Gibco) içinde %0.1 kollojenaz I (Gibco) ve 1.38 mg/mL dispaz (Gibco) enzim yoğunluğu olacak şekilde enzimler tartıldı ve solüsyona aktarılarak 37 °C'lik su banyosunda çözdürüldü. HBSS içerisinde çözünen enzimler 20 µm gözenek çaplı filtreden geçirilerek sterilize edildi. Daha sonra, parçalanmış kas parçaları enzim çözeltisi içersine konuldu. Kas parçalarına, enzim çözeltisi ile 37 °C'lik su banyosunda 2 saat boyunca muamele edildi. İki saatin sonunda elde edilen doku parçaları ve hücreler 100 µm'lik gözenek çapına sahip süzgeçten geçirildi ve bu sayede doku parçalarının süzülerek hücrelerden ayrılması sağlandı. Bu aşamada elde edilen hücreleri süpernatanttan (dispaz ve kollajenaz I enzimi içeren çözeltiden) kurtarmak için 1500 rpm'de 5 dk santrifüj yapıldı. Santrifüj sonucu süpernatant döküldü ve elde edilen hücreler, bir miktar besiyeri ile karıştırıldıktan sonra yıkama amaçlı aynı hız ve süre

ile tekrar santrifüj edildi. Yıkamadan sonra elde edilen hücreler %20 FBS, 2.5 ng/mL human basic Fibroblast Growth Factor (bFGF),10 ng/mL human Endotelial Growth Factor (hEGF) ve %0.1 Primosin'li Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F12) besiyeri ile süspanse edildi ve daha önceden %1 jelatin ile kaplanmış T-25 kültür kaplarına alınarak burada ön kültür yapıldı. Bir saatin sonunda, ön kültür kabının besiyeri (miyoblast hücrelerinin bulunduğu sıvı) alınarak T-25 kültür kaplarına ekildi. Miyoblastları farklılaşmadan çoğaltmak için %20 FBS, 2.5 ng/mL bFGF,10 ng/mL hEGF ve %0.1 Primosin'li DMEM/F12 besiyeri kullanıldı ve hücreler 37 °C'de ve %5 CO<sub>2</sub>'li inkübatör içersinde kültüre edildi. Myoblast hücrelerinde de MK-MKH hücreleriyle aynı protokol uygulanarak yağ ve kemik farklılaşmaları 11 günde izlendi.

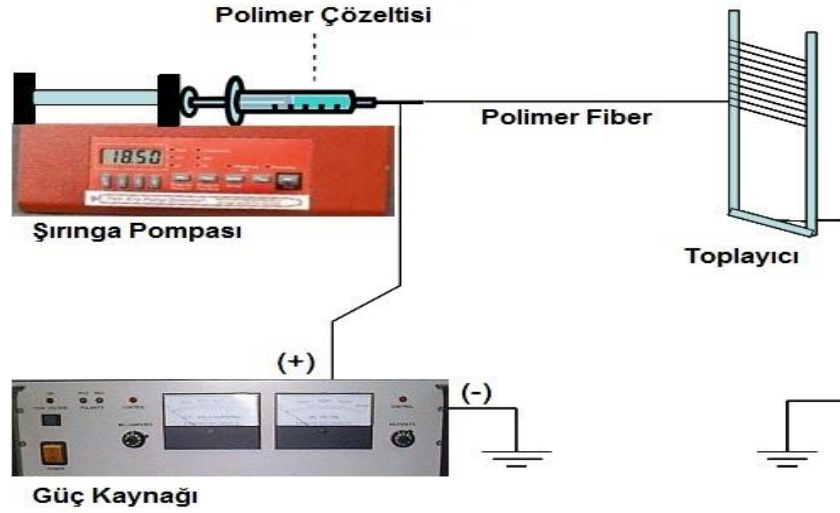
### **3.3. İnsan Çizgili Kas Dokusunun Hücrelerden Arındırılması ve Hücresiz Doğal Kas İskeleleri Eldesi**

Çizgili kas parçalarını hücrelerden arındırmak için deterjan türevli bir madde olan ve hücre zarında bulunan yağları çözerek hücreleri patlatan Sodyum dodesil sülfat (SDS) (Fluka) kullanıldı. Hücrelerinden uzaklaştırılacak çizgili kas doku parçaları çalkalamalı inkübatörde oda sıcaklığında gece boyunca %1 antibiyotikli (Pen/Strep) PBS içersinde yıkamaya bırakıldı. Ardından, kas parçaları %1 SDS içerecek şekilde hazırlanan PBS solüsyonu ile 2 gün boyunca çalkalamalı inkübatörde çalkalandı. Ardından, gece boyunca SDS ile aynı yüzdede TritonX-100 (Merck) ile çalkalamalı inkübatörde oda sıcaklığında çalkalandı. SDS ve Triton X-100 kalıntılarını uzaklaştırmak için 1 gün boyunca kas parçaları %1 antibiyotikli (Pen/Strep) PBS ile yıkandı. Elde edilen bu yapılardan hücrelerin uzaklaştırıldığını göstermek için hematoksilen (Merck) ve eozin (Merck) boyaması, kolajenin korunduğunu göstermek için de masson trikrom boyaması yapıldı. Çizgili kas parçalarından verici hücrelerinin uzaklaştırıldığı gösterilerek diğer aşamalara geçildi.

Hücrelerinden uzaklaştırılmış iskelet kası iskelelerinin bir kısmından kriyomikrotom (Shandon) yardımıyla 20 µm kalınlığında kesitler alındı ve elde edilen bu kesitler cam slaytlar üzerine alınıp kurutularak cam slayta yapışması sağlandı.

### 3.4. Yapay ve Yarı-Yapay İskelelerin Üretimi Ve İskelelerin Mekanik Karakterizasyonu

Poli(L-laktit-ko-kaprolakton) (70:30) (Purac, Purasorb 7015) kopolimeri konsantrasyonu %15 olacak şekilde kloroform (Sigma-Aldrich) içerisinde çözüldü. Ardından çözeltinin iletkenliği artırmak için %5 Dimethylformamide (DMF) (Sigma-Aldrich) çözeltiliye eklendi. Daha sonra çözelti şırınga içersine çekilerek şırınga pompasına yerleştirildi. Elektro-eğirme sisteminde polimerin çıkış yapacağı 1mm çapındaki iğne ucuna 15 kV voltaj uygulandı. İğne ucu ile mikrofiberleri toplayacak zigzag yapıdaki bakır tel arasındaki mesafe 17.5 cm olarak ayarlandı ve polimer basma hızı da 30  $\mu$ L/dk olarak belirlendi. Koşullar bu şekilde optimize edilerek paralel mikrofiber yapıları yapay iskeleler üretildi.



Şekil 3. 1. Elektro-eğirme sistemi (Kenar, 2008)

SDS yardımıyla daha önceden hücrelerinden arındırılmış doğal iskeleler önce 2-(N-morpholino)ethanesulfonik asit (MES) tampon çözeltisi içersine konularak homojenizatör (gentleMACS) yardımı ile homojenize edildi. Ardından elde edilen solüsyon 70  $\mu$ m gözenek çapına sahip elekten geçirilerek parçacık boyutu 70  $\mu$ m'den az olacak şekilde optimize edildi. Daha önceden elektro-eğirme metodu ile yapay polimerden üretilmiş paralel mikrofiber yapıdaki iskelelere önce 2-Propanol içersinde %1 olacak şekilde hazırlanan 1,6- hexanediamine (Sigma-Aldrich) ile 37<sup>0</sup>C'de 3 dakika muamele edildi.

Daha sonra, %1 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) (Thermo Scientific) ve 0.2M N-Hydroxysuccinimide (NHS) (Thermo Scientific) olacak şekilde bu çapraz bağlayıcı moleküller tartıldı ve MES tampon çözeltisi içerisinde çözülerek kas parçalarının bulunduğu solüsyon içersine alındı. Solüsyon içersindeki çapraz bağlayıcı moleküller ile kas parçalarının birbirine bağlanması için oda sıcaklığında 15 dakika beklendi ve ardından bu bağlanmayı sonlandırmak için solüsyona %0.14 2-Merkaptoetanol (Merck) eklendi. Daha sonra, solüsyon fiberler üzerine alınarak oda sıcaklığında 16 saat boyunca kas parçalarının fiberlere bağlanması için beklendi. 16 saatin ardından, solüsyon fiberlerin üzerinden alındı ve fiberlerin üzerine 1M glisin eklenerek 1 saat oda sıcaklığında beklendi.

Bağlanmanın başarılı olduğunu göstermek için yarı-yapay iskeleler protein boyayan komasi mavisi (Commassie Brilliant Blue R250, Merck) boyası ile boyandı. Ayrıca iskeleler SEM (Scanning Electron Microscope) (JEOL JSM-6060) ile görüntülenerek kas parçalarının iskeleler üzerine bağlanıp bağlanmadığı kontrol edildi.

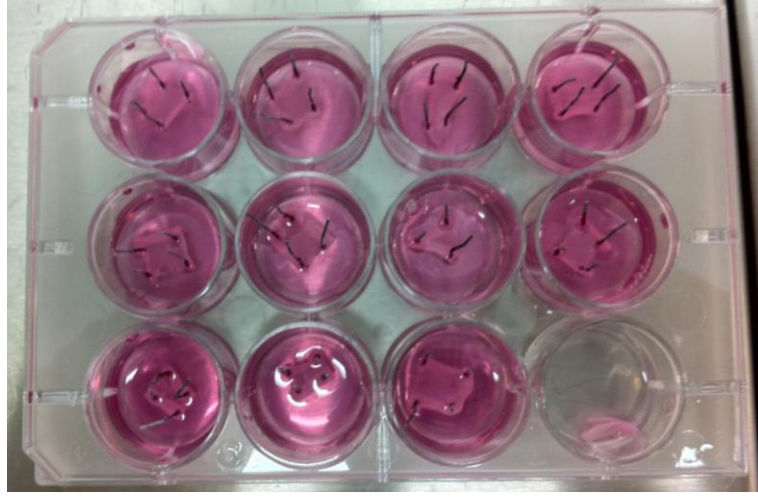
Yapay iskelelerin karakterizasyonu için mekanik analiz cihazı (Tinius Olsen H5KT) ile ASTM'nin D882 standardına uygun 37<sup>0</sup>C'deki su banyosu içerisinde 25.4 mm/dk hızda çekme testi yapıldı.

### **3.5. Elde edilen yapay, yarı-yapay ve hücresiz doğal kas iskeleleri üzerine öncül hücrelerin ekimi, iskelet kasına dönüşme potansiyellerinin incelenmesi**

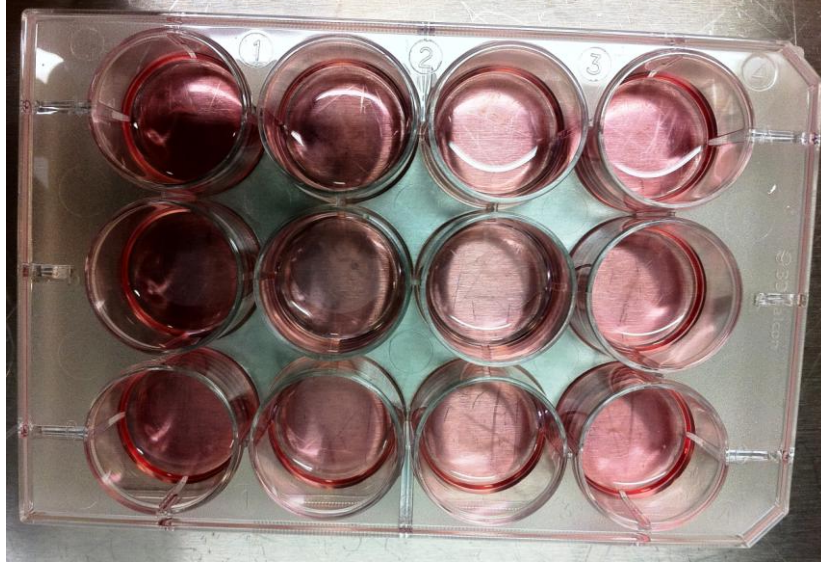
Poly (dimethyl siloxane) (PDMS) (Dow Corning Sylgard 184) yapay ve yarı-yapay iskelelerin inkübe edileceği kuyucuklara döküldü. PDMS dökülen plakalar vakum pompasında kabarcıklar patlayana kadar tutuldu. Daha sonra, 37<sup>0</sup>C'de gece boyunca bekletilerek PDMS'in kuruması sağlandı. Ardından, elde edilen yapay ve yarı-yapay iskeleler PDMS dökülmüş 12 kuyucuklu plakalara (Şekil 3.2), doğal iskeleler PDMS dökülmemiş 12 kuyucuklu plakalara alındı (Şekil 3.3). Yapay ve yarı-yapay iskelelerin hücre kültüründe kullanıma uygun olan kuyucuklara dökülen PDMS'e, steril küçük iğnelerle tutturularak gergin kalmaları sağlandı (Şekil 3.2). İskelelerin hangi hücre tipi için ayrıldığı göz önüne alınarak, Pasaj 4'e getirilmiş MK-MKH veya Miyoblast hücrelerinden her iskele üzerine  $8.0 \times 10^4$  hücre ekildi. Tüm bu iskeleler dışında farklılaşmada kas parçacıklarının etkisini görmek amacıyla, kas parçacıkları cam slaytlar üzerine konuldu



(sürüntü) ve kuruması beklenerek üzerine hücreler ekildi. Hücrelerin iskelelere tutunmasına imkan sağlamak amacıyla %10 FBS ve %0.1 Primosin'li DMEM/F12 besiyeri ile 24 saat boyunca 37<sup>0</sup>C'de, %5 CO<sub>2</sub>'li inkübatörde bekletildi.



**Şekil 3. 2.** Yapay ve yarı-yapay iskelelerin kültür sırasında plaka içindeki görüntüsü



**Şekil 3. 3.** Cam slayt üzerinde yer alan doğal iskelelerin kültür sırasında plaka içindeki görüntüsü

Daha sonra, MK-MKH'ler için kendiliğinden farklılaşma ortamı olan %10 FBS ve %0.1 Primosin'li Low Glucose-Dulbecco's Modified Eagle Medium (L-DMEM) (Gibco), miyoblastlar için de yine kendiliğinden farklılaşma ortamı olan %10 FBS ve %0.1 Primosin'li High Glucose-Dulbecco's Modified Eagle Medium (H-DMEM) (Gibco) kullanıldı. Kendiliğinden farklılaşma sağlayan besiyerleri haftada 2 kez olmak üzere değiştirildi. Bu şekilde 21 gün boyunca kültüre devam edildi. 21 günün sonunda, hücrelere %4 PFA ile oda sıcaklığında 15 dk muamele edilerek hücreler sabitlendi. Sabitlenmenin ardından hücreler, anti- $\alpha$  Aktinin (Sigma-Aldrich A7811), Desmin (Santa Cruz Biotechnology sc-14026), MyoD1 (Thermo Scientific MS-273-P) ve falloidin (Sigma-Aldrich P5282) antikorları ile boyanarak kas oluşturma potansiyelleri incelendi. Sekonder olarak Goat anti Mouse IgG-FITC (Santa Cruz Biotechnology Sc-2010) ve Goat anti Rabbit IgG-FITC (Santa Cruz Biotechnology Sc-2012) kullanıldı.

SEM'de üzerine hücre ekilmiş iskeleleri incelemek için örnekler, %2.5 glutraldehit (Merck) ile oda sıcaklığında 20 dk muamele edilerek sabitlendi. Ardından örneklere sırasıyla %15, 30, 50, 70 ve son olarak da saf etil alkol (Riedel-de Haen) olacak şekilde her birinde 15 dk tutularak dehidrasyon yapıldı. Daha sonra doğal, yapay ve yarı-yapay iskele örnekleri altın kaplama cihazında (Bal-tec SCD005) 21mA akımda 1.5 dk boyunca altın partikülleri ile kaplandı. Ardından oluşan miyotüp yapılarını gözlemlemek için örnekler SEM (JEOL JSM-6060) cihazında incelendi.

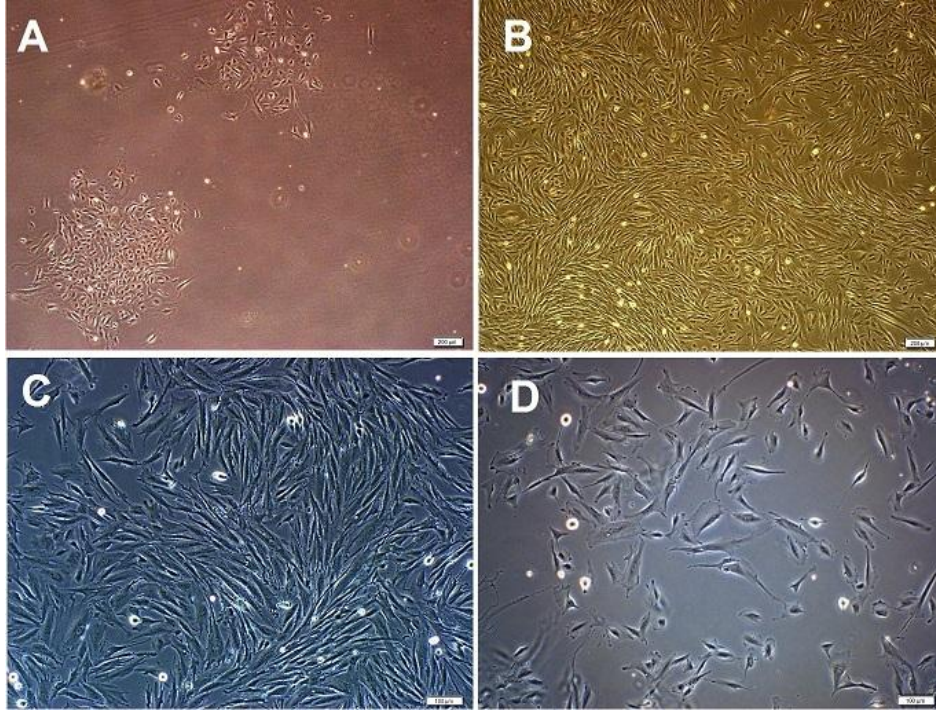
21. gündeki hücre canlılığını belirlemek için doğal, yapay ve yarı-yapay iskeleler üzerindeki hücrelere WST-1 (Roche) (canlılık testi) yapıldı. İskeleler buldukları plakalarda %10 FBS ve %0.1 Primosin içeren L-DMEM besiyeri ile 2 kez yıkandı ve ardından her iskele tipinden 3 adet alınarak 12 kuyucuklu plakalara aktarıldı. Burada örnekler üzerine, daha önceden %10 WST-1 boyası içerecek şekilde hazırlanan %10 FBS ve %0.1 Primosin içeren L-DMEM besiyeri konuldu. Daha sonra örnekler 37<sup>0</sup>C'de, %5 CO<sub>2</sub>'li inkübatörde 2 saat bekletildi. 96 kuyucuklu bir plakaya, her bir örneğin besi ortamından her bir kuyucuk için 200'er  $\mu$ L alınarak 3'er kuyucuk dolduruldu. Ardından mikropate okuyucu (VersaMax) kullanılarak 480 nm dalga boyunda absorbans değerleri okundu. Kontrol olarak hücresiz bir yapay iskelenin aynı koşullardaki absorbans değeri kullanıldı.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Hücre Kültürü ve Karakterizasyonu

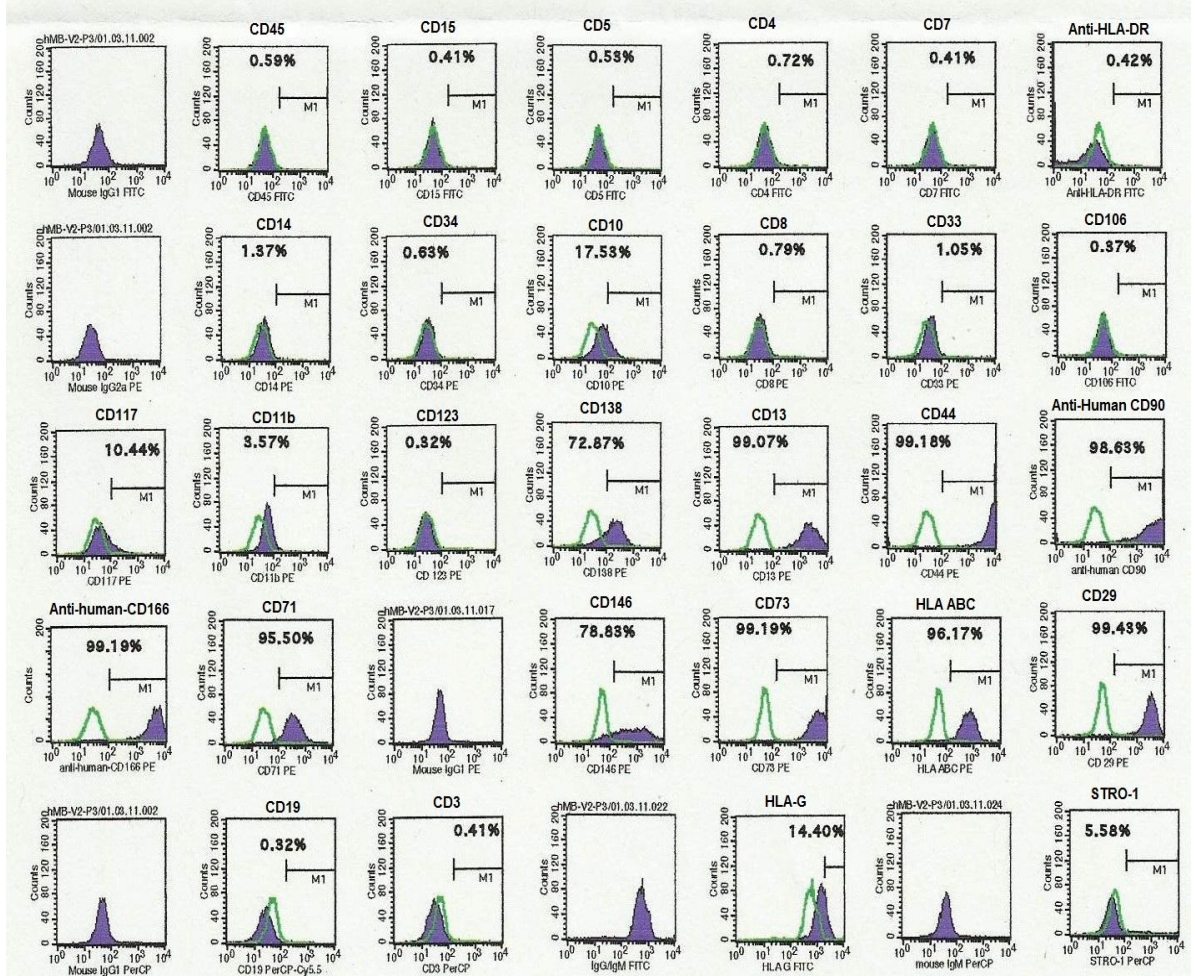
#### 4.1.1. Menstrual Kandan İzole Edilmiş Mezenkimal Kök Hücreler (MK-MKH)

Menstrual kandan izole edilen hücrelerin kök hücre olup olmadığını kanıtlamak için ışık mikroskopunda morfolojik incelemenin yanı sıra akım sitometrisi yöntemiyle kök hücre belirteçleri taşıyıp taşımadıklarına bakıldı. Ayrıca yağ ve kemik farklılaşmaları yapılarak bir kök hücre özelliği olan farklı hücre tiplerine dönüşebilme karakteristiği taşıyıp taşımadıkları belirlendi.



**Şekil 4. 1.** MK-MKH'lerin morfolojik görünüşleri. **A**-P0-17nci gün, **B**-P2-11inci gün, **C**- P3-7inci gün ve **D**-P4-3üncü güne ait invert mikroskop görüntüleri

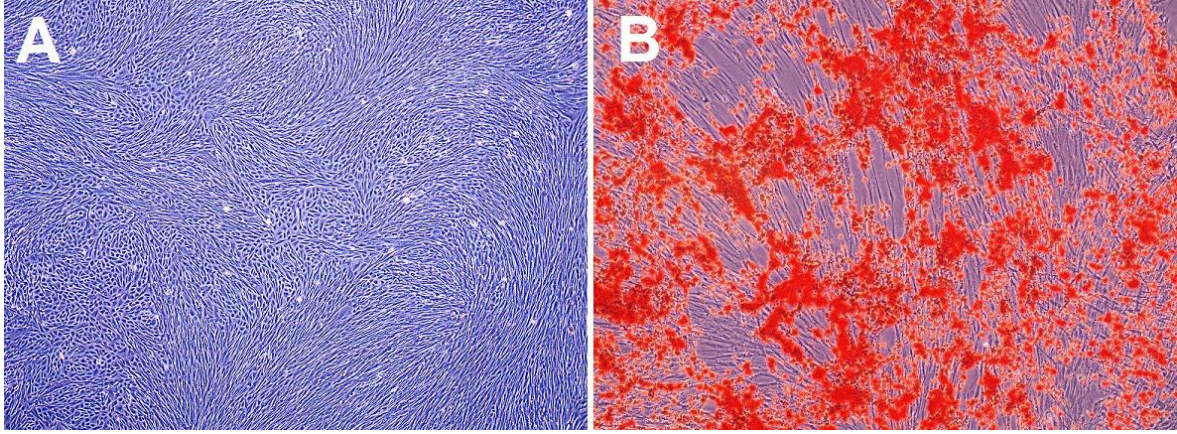
İzole edilen MK-MKH'lerin, kültürün 17. gününde daha çok kısa ve yuvarlak bir morfolojiye sahip oldukları ve MKH davranışlarından biri olan koloni oluşturmaya gerçekleştirdikleri gözlemlendi (Şekil 4.1.A). İlerleyen pasajlarda ise giderek uzun ve ince bir şekil alarak, normal MKH görünimleri kazandıkları gösterildi (Şekil 4.1.B,C,D). Şekil 4.1.C ve D'de görülen parlak yuvarlak şekilde kendini toplamış hücreler, kültürdeki bölünen hücrelerdir.



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

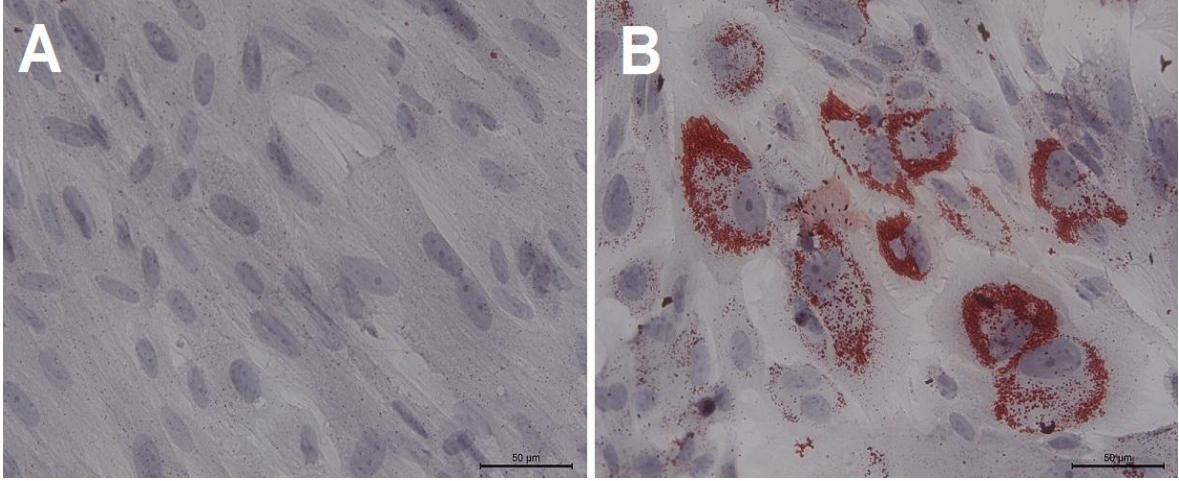
Yapılan akım sitometri analizi sonucunda, MK-MKH'lerin yüzey belirteci olarak CD13, CD29, CD44, CD90, CD146, CD166, HLA ABC yönünden pozitif; CD3, CD8,

CD11b, CD14, CD15, CD19, CD33, CD34, CD45, CD117 ve HLA-DR açısından negatif oldukları gösterildi.



**Şekil 4. 3.** İnsan menstrual kanından izole edilmiş MKH'lerin (P3) kemik farklılaşmaları  
**A-** Kontrol **B-** Osteojenik farklılaşma besiyeri ile inkübe edilmiş MK-MKH'ler (Alizarin Red Boyaması) (Orijinal Büyütme: X100)

MK-MKH'lerin 28 günlük kültürün sonunda sabitlenerek Alizarin Red ile boyandığında, deney grubunda oluşan kalsiyum fosfat nodüllerinin Alizarin Red boyasının kemik nodüllerine özgü rengi olan kırmızıya boyandığı saptandı (Şekil 4.3.B). Herhangi bir farklılaşma besiyeri uygulanmayan MK-MKH'lerin ise kalsiyum fosfat nodülleri biriktirmediği ve dolayısıyla da Alizarin Red boyası ile renk vermediği görüldü (Şekil 4.3.A).

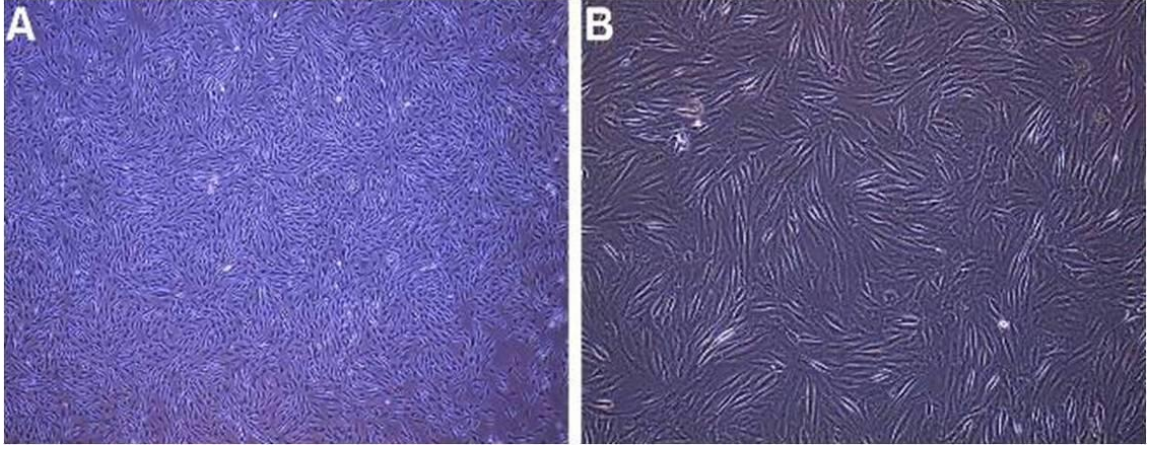


**Şekil 4. 4.** İnsan menstrual kanından izole edilmiş MKH'lerin (P3) yağ farklılaşmaları **A-** Kontrol **B-** Adipojenik farklılaşma besiyeri ile inkübe edilmiş MK-MKH'ler (Oil Red O Boyama)

MK-MKH'lerin 28 günlük kültürün sonunda sabitlenerek Oil Red O ile boyandığında, deney grubunda oluşan yağ veziküllerinin Oil Red O boyası ile kırmızı renk verdiği (Şekil 4.4.B), herhangi bir farklılaşma besiyeri uygulanmayan MK-MKH'lerin ise adipojenik farklılaşma yoluna gitmediği ve dolayısıyla da Oil Red O boyası ile renk vermediği görüldü (Şekil 4.4.A).

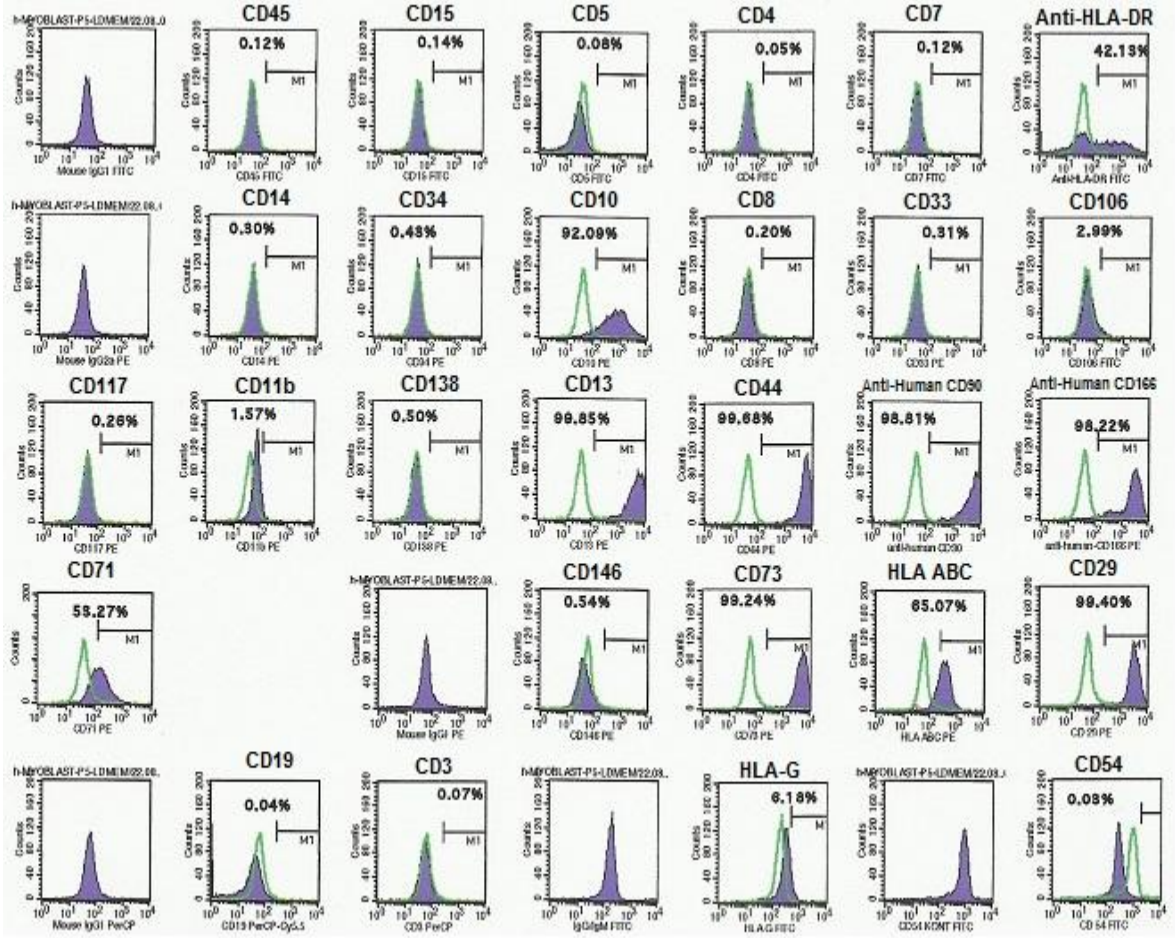
#### **4.1.2. İnsan iskelet kası öncül hücreleri (miyoblastlar)**

İnsan iskelet kası parçalarından izole edilen hücrelerin kök hücre olup olmadığını kanıtlamak için ışık mikroskopunda morfolojik inceleri yapıldı. Bunun yanı sıra akım sitometrisi yöntemiyle kök hücre belirteçleri taşıyıp taşımadıklarına bakıldı. Ayrıca yağ ve kemik farklılaşmaları yapılarak bir kök hücre özelliği olan farklı hücre tiplerine dönüşebilme karakteristiği taşıyıp taşımadıkları belirlendi.



**Şekil 4. 5.** İnsan iskelet kas dokusundan izole edilmiş miyoblastların (P3) mikroskobik görüntüleri (Orijinal Büyütme: A-X40 ve B-X100)

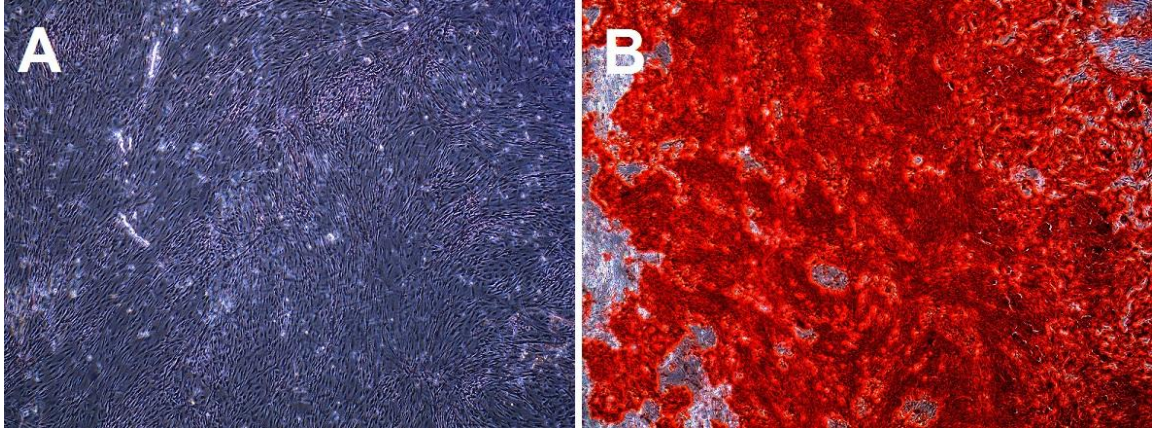
İzole edilen insan miyoblast hücrelerinin, 3. pasajda uzun ve ince bir şekil alarak, normal MKH görünümüne benzer bir görünüm kazandıkları gösterildi (Şekil 4.5.A,B). Şekil 4.5.A ve B’de görünen parlak yuvarlak şeklinde kendini toplamış hücreler, kültürdeki bölünen hücrelerdir.



**Şekil 4. 6.** İnsan iskelet kas dokusundan izole edilmiş miyoblastların (P3) akım sitometri cihazında saptanan immunofenotipik özellikleri

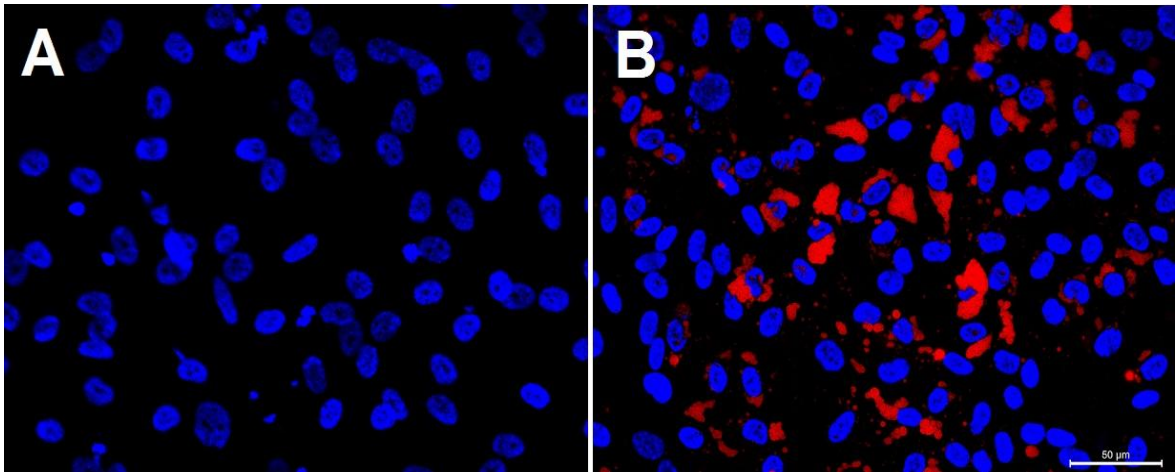
Akım sitometri analizi sonucunda, miyoblastların yüzey belirteci olarak CD10, CD13, CD29, CD44, CD90, CD146, CD166, HLA ABC ve HLA-DR yönünden pozitif; CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD11b, CD14, CD15, CD19, CD33, CD34, CD45, CD54, CD106, CD117 CD138 ve CD146 açısından negatif oldukları gösterildi.





**Şekil 4. 7.** İnsan iskelet kası öncül hücreleri (miyoblastlar) (P3) kemik farklılaşmaları **A-** Kontrol **B-** Osteojenik farklılaşma besiyeri ile inkübe edilmiş miyoblastlar (Alizarin Red Boyama) (Orijinal Büyütme: X100)

İnsan miyoblast hücrelerinin 11 günlük kültürün sonunda sabitlenerek Alizarin Red ile boyandığında, deney grubunda oluşan kalsiyum fosfat nodüllerinin Alizarin Red boyasının kemik nodüllerine özgü rengi olan kırmızıya boyandığı saptandı (Şekil 4.7.B). Herhangi bir farklılaşma besiyeri uygulanmayan insan miyoblast hücrelerinin ise kalsiyum fosfat nodülleri biriktirmediği ve dolayısıyla da Alizarin Red boyası ile renk vermediği tespit edildi (Şekil 4.7.A).



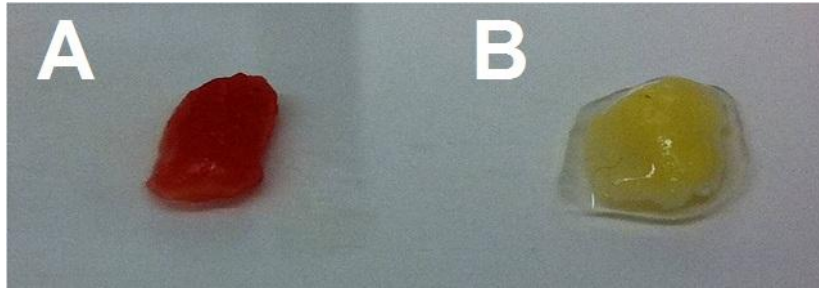
**Şekil 4. 8.** İnsan iskelet kası öncül hücreleri (miyoblastlar) yağ farklılaşmaları **A-** Kontrol **B-** Adipojenik farklılaşma besiyeri ile inkübe edilmiş miyoblastlar (Oil Red O Boyama) (Orijinal Büyütme: X200)

İnsan miyoblast hücrelerinin 11 günlük kültürün sonunda sabitlenerek Oil Red O ile boyandığında, deney grubunda oluşan yağ veziküllerinin Oil Red O boyası ile kırmızı renk verdiği (Şekil 4.8.B), kontrol grubundaki insan miyoblast hücrelerinin ise adipojenik farklılaşma yoluna gitmediği ve dolayısıyla da Oil Red O boyası ile renk vermediği görüldü (Şekil 4.8.A).

## 4.2. İskelelerin Üretimi

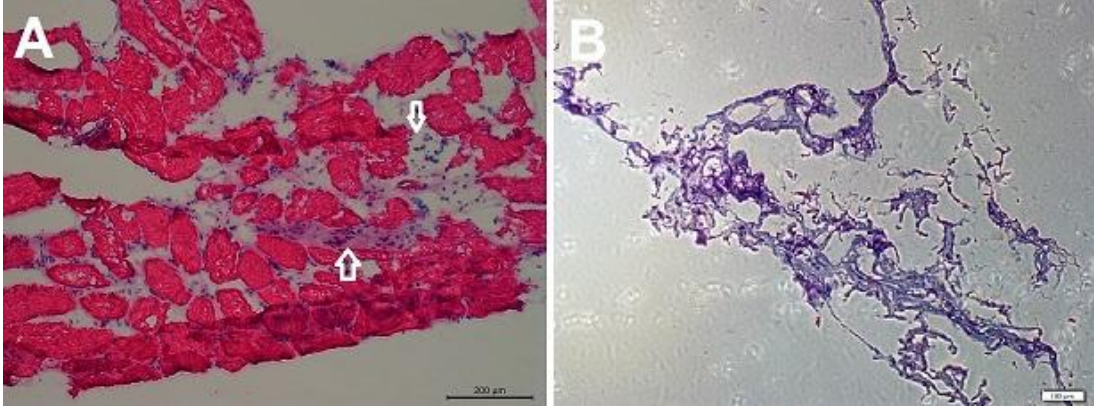
### 4.2.1. Hücresiz Doğal Kas İskelelerinin Eldesi

İnsan kas doku örneklerini hücrelerinden arındırmak için deterjan türevli bir madde olan SDS kullanıldı. Hücrelerin uzaklaştırılmasıyla yeni ekilecek hücelere iskele görevi yapacak olan hücresiz kas matriksi (doğal iskeleler) elde edilmiş oldu.



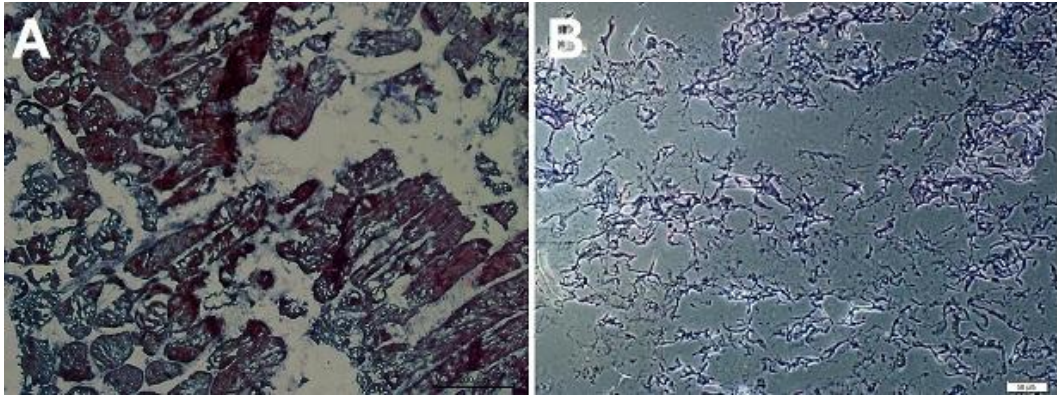
**Şekil 4. 9. A-**İnsan iskelet kası parçasının doğal hali ve **B-**Kasın hücrelerinden arındırıldıktan sonraki makro görüntüsü (sadece hücre dışı matriksi)

Makroskopik görüntüde, SDS ile muamele edilen kas parçalarının kırmızı rengini (Şekil 4.9.A) kaybederek beyaza yakın sarımsı bir renk aldığı ve ilk haline göre oldukça saydamlaştığı gözlemlendi (Şekil 4.9.B).



**Şekil 4. 10. A-Doğal B-Hücrelerinden arındırılmış insan kas parçalarının hematoksilin ve eozin boyamaları**

İskelet kası doku kesitlerinde beyaz oklarla gösterilmiş bölgelerde hematoksilin ile boyanmış çekirdekler izlenirken (Şekil 4.10.A), hücrelerinden arındırılmış kas doku örneklerinde hücre çekirdekleri izlenmedi (Şekil 4.10.B).

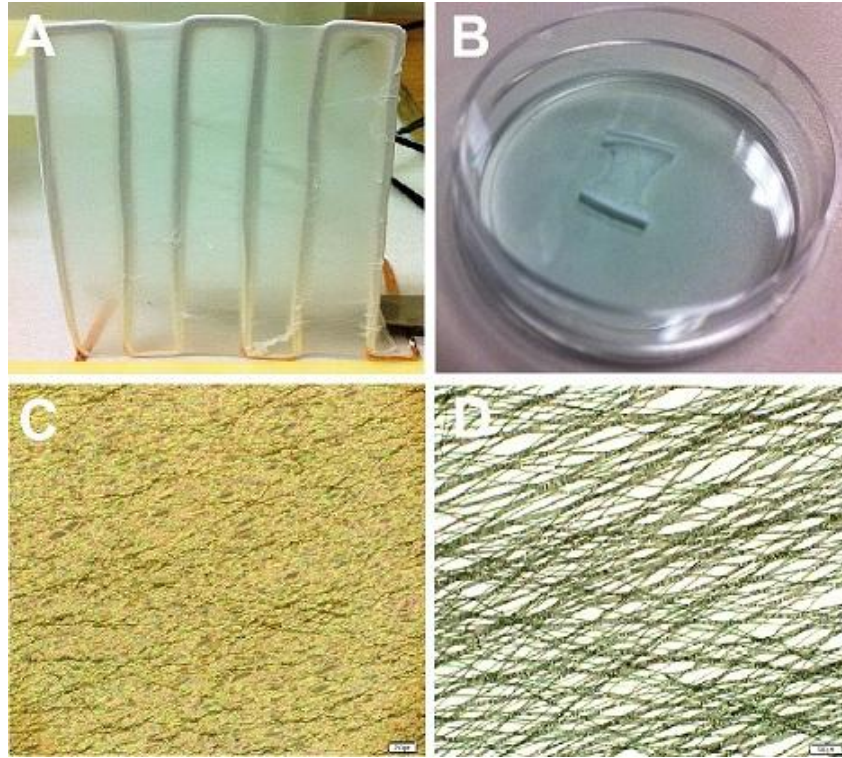


**Şekil 4. 11. Masson trikrom boyaması sonrasında A-Doğal ve B-Hücrelerinden arındırılmış kas doku örneklerinin ışık mikroskobu görüntüleri**

Doğal kas dokusunda mavi/kahverengi ile boyanmış kısımlarda doğal yapıdaki kollajen varlığı gösterildi (Şekil 4.11.A). Hücrelerinden arındırılmış kas dokuda gözlenen mavi/kahverengi kısımlar ise yapıdaki kollajenin hücrelerden arındırma işleminden sonra da korunduğunu gösterdi (Şekil 4.11.B).

#### 4.2.2. Yapay ve yarı-yapay iskelelerin üretimi ve iskelelerin mekanik karakterizasyonu

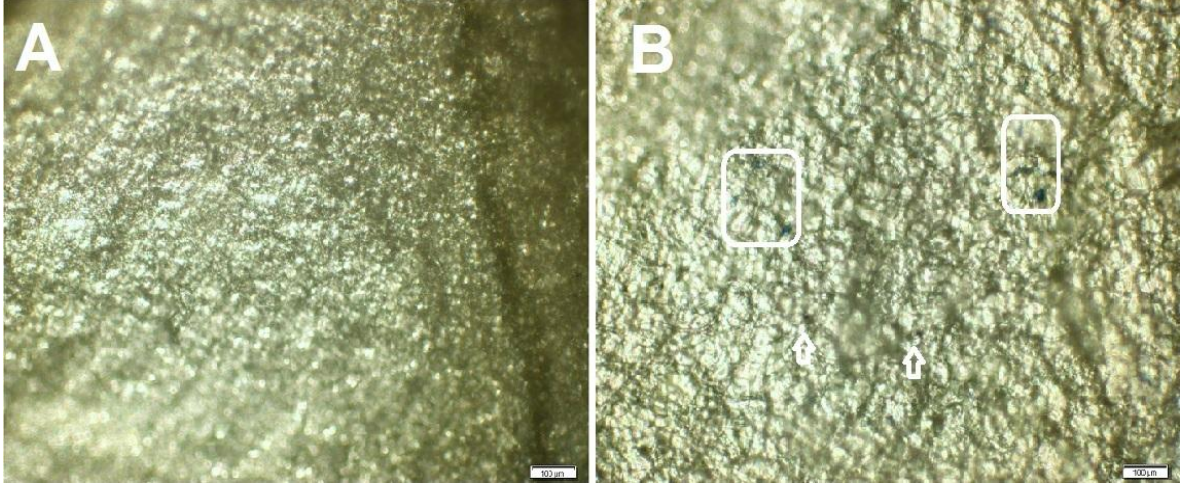
Yapay iskeleler üretilirken elektro-eğirme yöntemi kullanıldı. Üretilen bu yarı-yapay iskelelere hücrelerinden arındırılmış kas doku parçaları çeşitli çapraz bağlayıcı moleküller yardımıyla bağlanarak yarı-yapay iskeleler elde edildi.



**Şekil 4. 12.** Elektro-eğirme yöntemi ile üretilen iskelelerin makro (A ve B) ve ışık mikroskobu görüntüleri (C ve D) (Orijinal Büyütme: C-X40 ve D-X100)

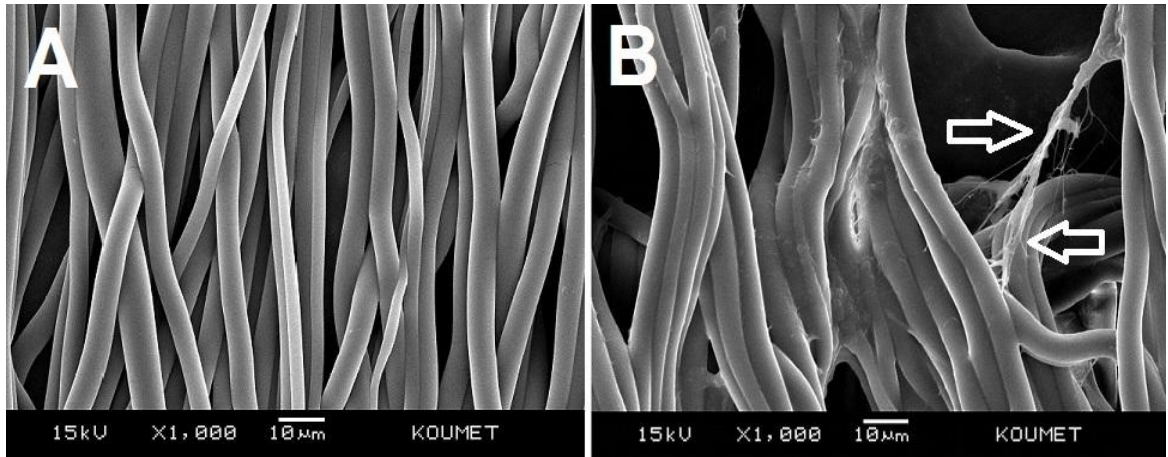
Elektro-eğirme yöntemi ile üretilen yapay iskelenin metal toplayıcı üzerinde, üretimden hemen sonraki halinde ve 1cm x 1cm boyutunda kesildikten sonraki kullanıma hazır halinde yapay iskelelerin düzgün bir şekilde, boğumsuz iplikçikler halinde örüldüğü gösterildi (Şekil 4.12.A, B). İskelelerin ışık mikroskobu görüntülerinde

de yapay iskeleyi oluşturan fiberlerin düzgün, sıralı ve paralel bir biçimde uzandığı gözlemlendi (Şekil 4.12.C, D).



**Şekil 4. 13. A-**Komasi mavisiyle boyanmış normal iskele ve **B-**Yarı-yapay iskelenin mikroskop görüntüleri (Orijinal Büyütme: X100)

Yarı-yapay iskelede oklarla gösterilen veya dikdörtgen kareler içerisine alınan mavilikler, iskele üzerinde protein varlığını gösterdi (Şekil 4.13.B). Kas parçaları bağlanmamış normal iskelede ise herhangi bir boyanma gözlenmedi (Şekil 4.13.A).



**Şekil 4. 14. A-**Normal yapay iskelenin **B-**Kas parçaları bağlanmış yarı-yapay iskelenin SEM mikrofotografı

Yarı-yapay iskele üzerine bağlanan hücre dışı matriks yapıları oklarla gösterildi (Şekil 4.14.B). Normal iskelede ise benzer bir yapı izlenmedi (Şekil 4.14.A).

**Çizelge 4.1.** Yapay islenin mekanik test cihazıyla elde edilen karakteristik özellikleri

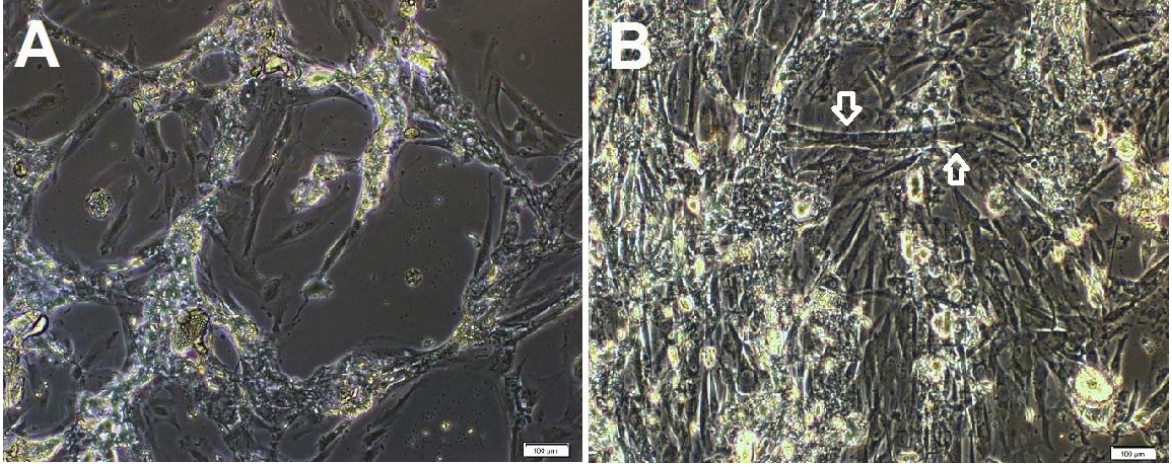
<b>Kopmadaki Gerilim (MPa)</b>	<b>Kopmadaki Uzama (%)</b>	<b>Elastik Modül (MPa)</b>
15.7 ± 0.6	246 ± 1	4.6 ± 0.7

Kullanılan yapay iskelenin karakteristik özelliklerini belirlemek için 5 örnek üzerinde yapılan çekme testinde Çizelge 4.1’de gösterilen sonuçlar elde edilmiştir. Ayrıca iskelelerin ortalama fiber çapı  $4.53 \pm 1.6 \mu\text{m}$  olarak ölçüldü.

### **4.3. Hücrelerin Kas Oluşturma Potansiyellerinin İncelenmesi**

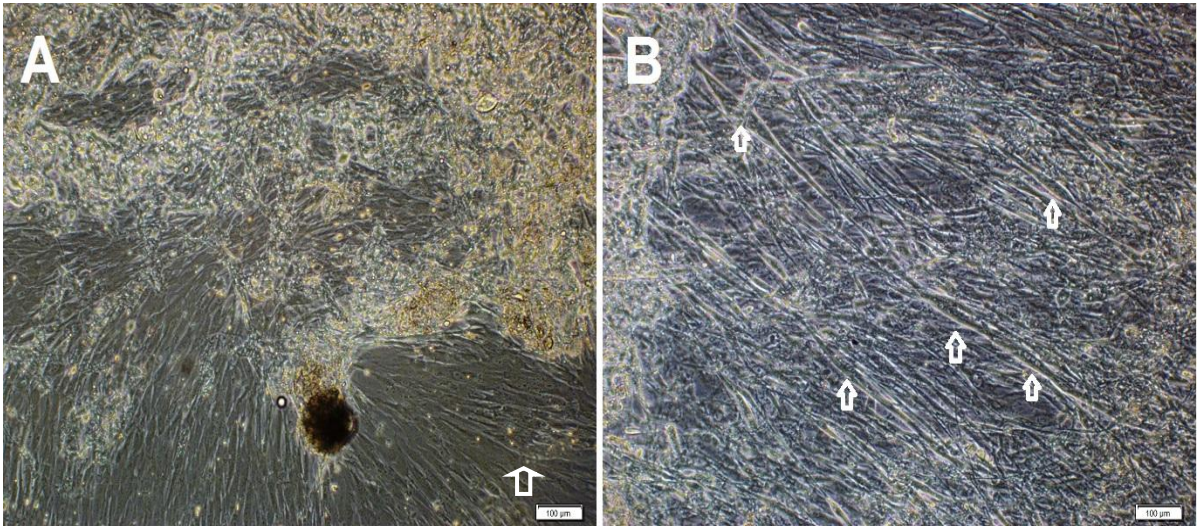
#### **4.3.1. Kas Oluşturma Potansiyellerinin Işık Mikroskopunda Gösterimi**

Hücreler 21 günlük kültür boyunca ilk hafta ve son hafta olmak üzere takip edilerek kas oluşturma potansiyelleri ışık mikroskobu ile incelendi.



**Şekil 4. 15. A-MK-MKH B-Miyoblast hücreleri ekilmiş aselüler doğal kas iskelesi 1. hafta ışık mikroskobu görüntüleri**

MK-MKH ve Miyoblast hücrelerinin doğal kas iskelesi üzerine ekilip kültüre alındıktan 1 hafta sonraki mikroskobik görünümünde MK-MKH'lerin herhangi bir miyotüp, çok çekirdekli uzun hücre, benzeri yapı oluşturmadığı gözlemlendi (Şekil 4.15.A). İnsan miyoblast hücrelerinin oluşturduğu miyotüp benzeri yapılar ise beyaz oklar ile gösterildi (Şekil 4.15.B).

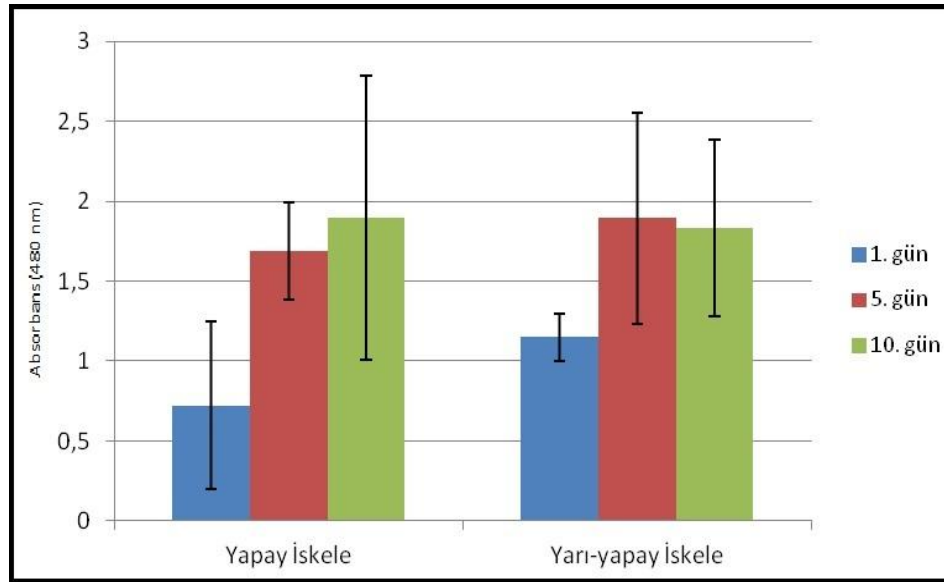


**Şekil 4. 16. A-MK-MKH B-Miyoblast hücreleri ekilmiş doğal aselüler kas iskelesi 3. hafta ışık mikroskobu görüntüleri**

MK-MKH ve miyoblast hücrelerinin doğal kas iskelesi üzerinde kültüre alındıktan 3 hafta sonraki mikroskopik görüntülerinde MK-MKH'lerin olsa bile çok az sayıda miyotüp benzeri uzun hücre oluşturduğu gözlemlendi (Şekil 4.16.A). İnsan miyoblast hücrelerinin oluşturduğu miyotüplerin sayıca arttığı gözlemlendi ve beyaz oklar ile gösterildi (Şekil 4.16.B).

#### 4.3.2. Hücrelerin İskeleler Üzerindeki Canlılıklarının Belirlenmesi

Yapılan ön çalışmada, yapay ve yarı-yapay iskeleler üzerine ekilen miyoblast hücrelerine 1, 5 ve 10. günlerde WST-1 testi uygulandı.

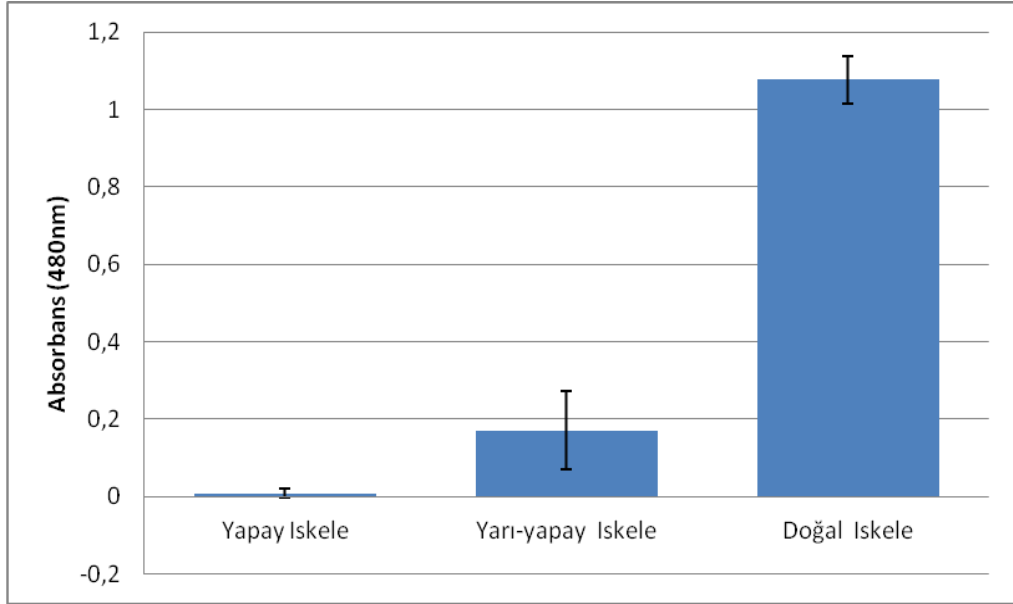


**Şekil 4. 17.** Miyoblastların 1, 5 ve 10. günlerde yapay ve yarı-yapay iskeleler üzerindeki sayıları

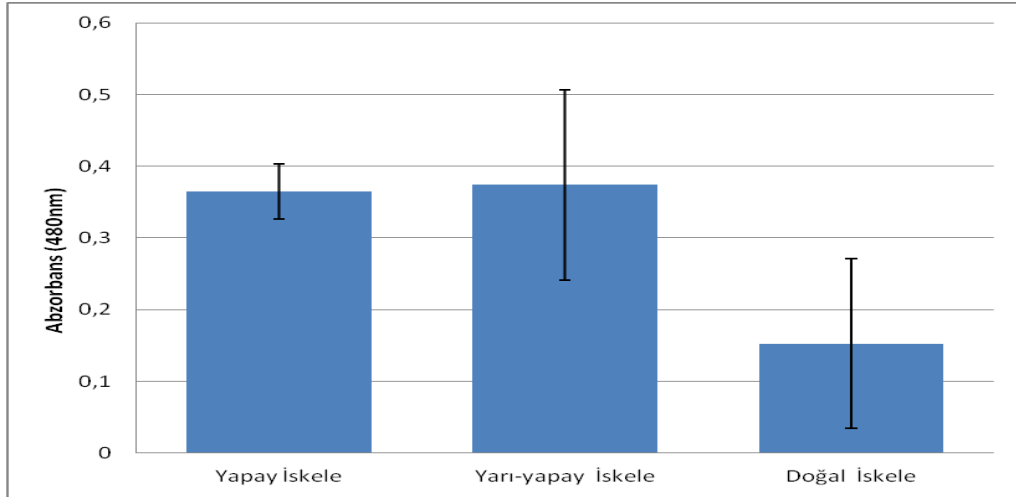
Miyoblastların sayıları, Minitab 13 programı kullanılarak one-way ANOVA testi ile istatistiksel olarak değerlendirildiğinde, hücre sayılarının yapay ve yarı-yapay iskelelerde 1, 5 ve 10. günler arasında farklılık gösterdiği tespit edildi ( $P < 0.05$ ) (Şekil 4. 17).



21 günlük inkübasyon süresinin sonunda hücrelerin iskeleler üzerindeki canlılık oranlarını tespit etmek için her iskele türünden 3 iskeleye WST-1 testi uygulandı.



**Şekil 4.18.** MK-MKH'lerin 21. günde iskeleler üzerindeki sayıları



**Şekil 4.19.** Miyoblastların 21. günde iskeleler üzerindeki sayıları

Hücre sayıları, Minitab 13 programı kullanılarak one-way ANOVA testi ile istatistiksel olarak değerlendirildiğinde, MK-MKH'lerin sayılarının yapay ve yarı-yapay iskelede farksız ( $P>0,05$ ), doğal iskelede ise diğerlerinden farklı ( $P<0,05$ ) olduğu

görüldü (Şekil 4.18). Miyoblastların iskeleler üzerindeki sayılarında ise iskele tipleri arasında bir fark görülmedi ( $P>0,05$ ) (Şekil 4.19).

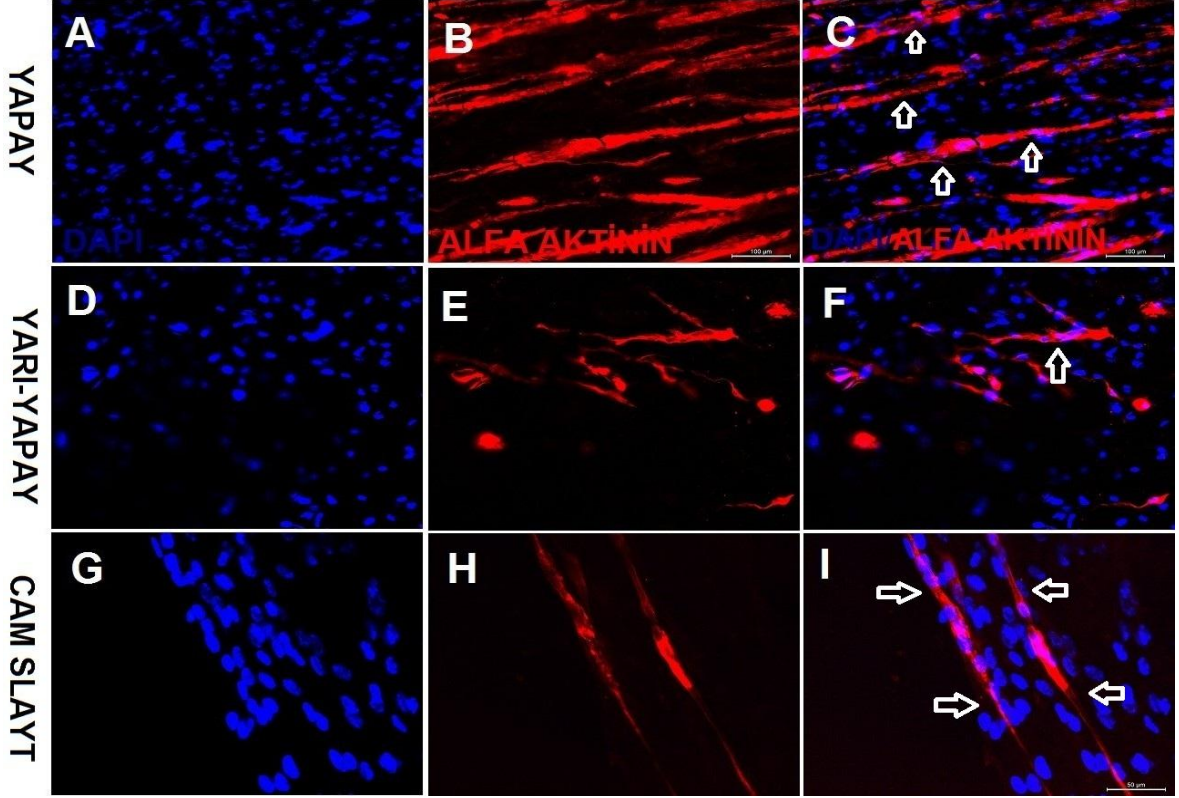
### **4.3.3. Kas Oluşturma Potansiyellerinin Spesifik Antikor Boyamaları ile Gösterimi**

21 gün süren kültürün ardından sabitlenen hücreler, kas proteinlerine özgü Alfa-aktinin, Desmin ve MyoD gibi antikorlarla ve hücrelerin filamentlerini boyayan Falloidin boyası ile boyandı.

#### **4.3.3.1. İskeleler Üzerinde Alfa-aktinin Antikoru Boyaması**

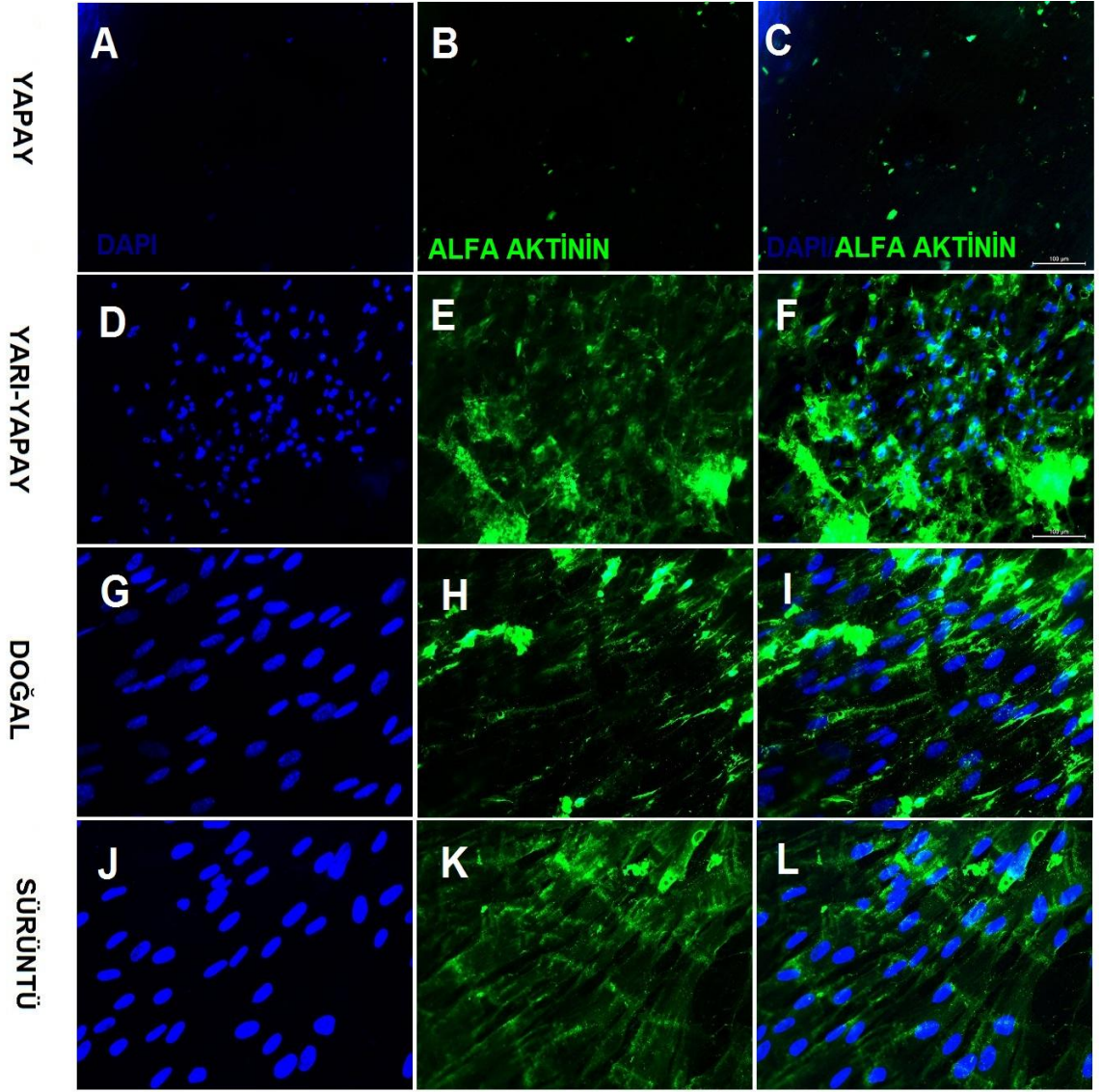
Bir iskelet kasının kasılmasını sağlayan en küçük birim olan sarkomerlerde bulunan ve kasılmada görev alan Alfa-aktinin proteini bu proteine özgü bir antikor ile boyanarak hücrelerin kas oluşturma potansiyelleri gösterildi.

Yapılan ön çalışmada yapay ve yarı-yapay iskeleler ile cam slaytlar üzerinde 10 gün boyunca insan miyoblast hücreleri büyütülmüş ve bu sürenin sonunda hücreler sabitlenerek alfa-aktinin antikoru ile boyandı.



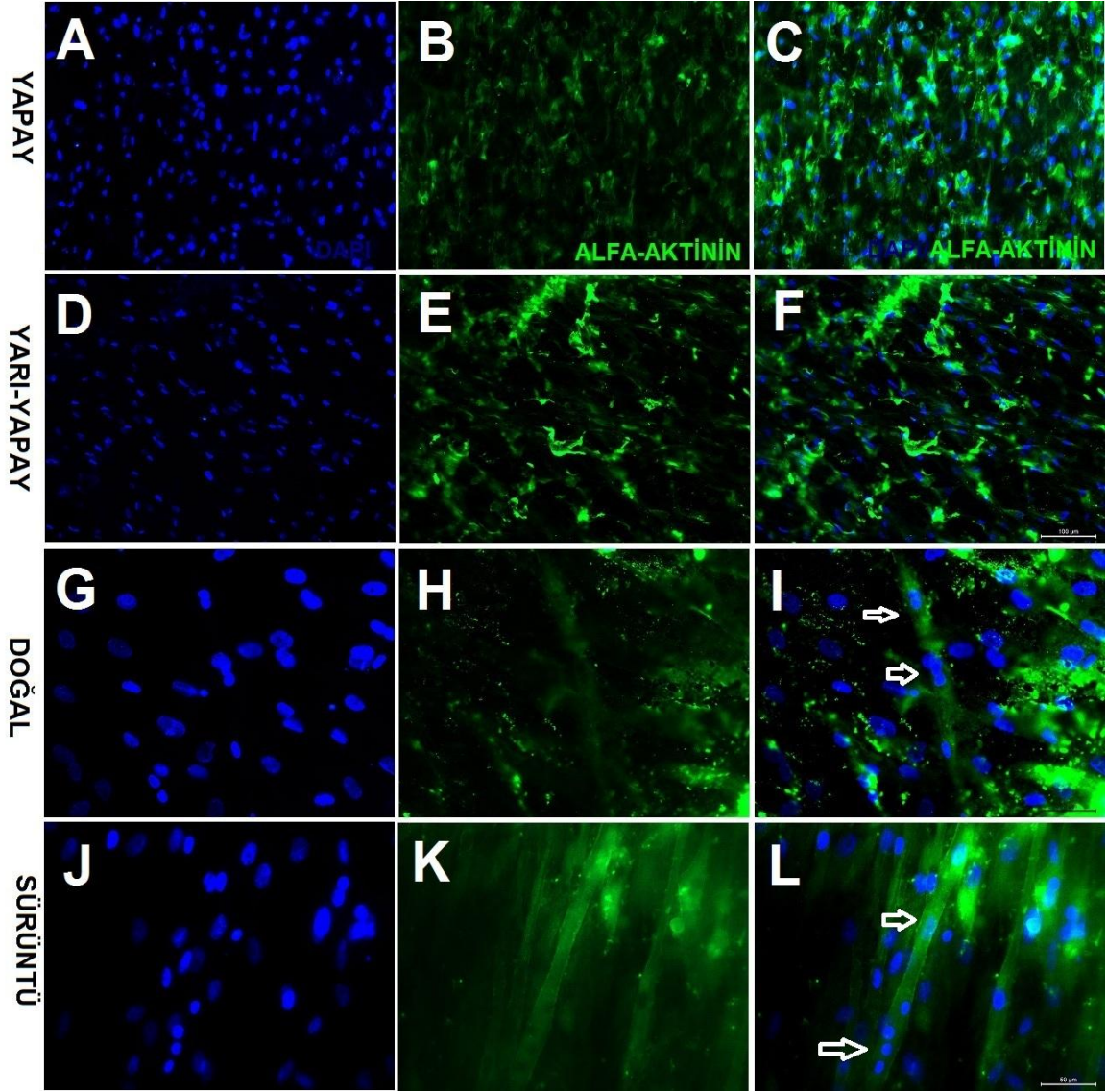
**Şekil 4.20.** Miyoblastların yapay ve yarı-yapay iskeleler ile cam slayt üzerindeki alfa-aktinin antikor boyamaları (Beyaz oklar miyotüp yapılarını göstermektedir.)

Ön çalışmada, miyoblastların yapay iskeleler üzerinde en fazla miyotüp oluşturarak en iyi alfa-aktinin ifadesini gösterdikleri belirlendi ve her üç yapı üzerinde de miyotüp oluşumu gözlenerek, alfa-aktinin ifadeleri gösterildi (Şekil 4.20).



**Şekil 4.21.** MK-MKH'lerin yapay, yarı-yapay, doğal iskeleler ve sürüntü üzerindeki alfa-aktinin antikor boyamaları

Yarı-yapay ve doğal iskeleler ile kas parçalarının cam slaytlar üzerine yayıldığı sürüntü üzerinde bulunan MK-MKH'lerin, kas doku hücrelerine özgü alfa-aktinin proteinini ifade ettikleri belirlendi. 21 günlük inkübasyon süresinin sonunda, yarı-yapay ve doğal iskeleler ile sürüntüde belirgin bir miyotüp oluşumu gözlenmezken, yapay iskelede alfa-aktinin ifadesinin çok zayıf olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.21).

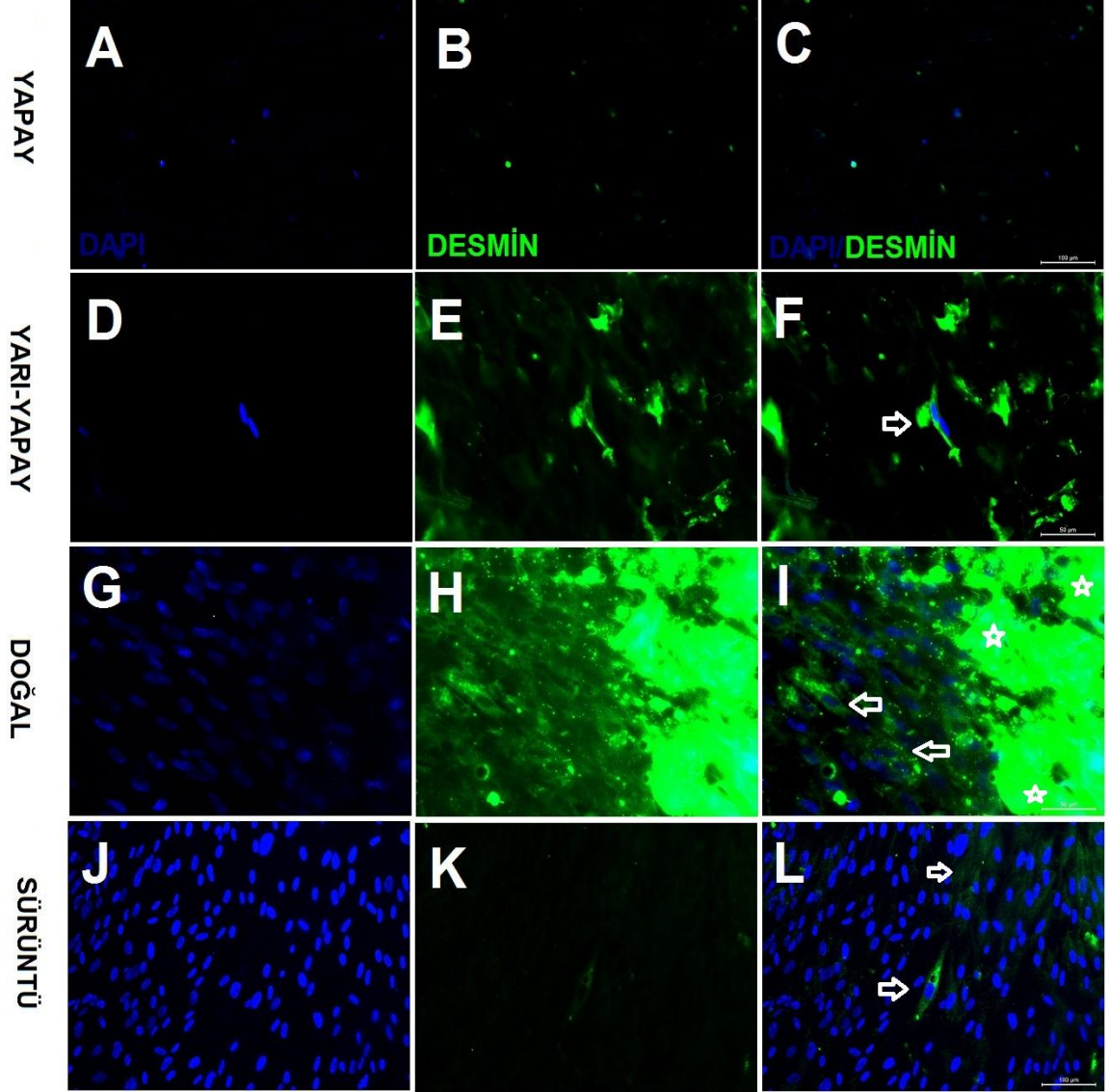


**Şekil 4.22.** Miyoblastların yapay, yarı-yapay, doğal iskeleler ve sürüntü üzerindeki alfa-aktinin antikor boyamaları (Beyaz oklar miyotüp yapılarını göstermektedir.)

Her üç iskele tipinde ve kas parçalarının cam slaytlar üzerine yayıldığı sürüntü üzerinde bulunan hücrelerin, kas doku hücrelerine özgü alfa-aktinin proteinini ifade ettikleri belirlendi. 21 günlük inkübasyon süresinin sonunda, yapay ve yarı-yapay iskelelerde belirgin bir miyotüp oluşumu gözlenmezken, doğal iskele ve sürüntü üzerinde miyotüp yapıları oluşmuştur (Şekil 4.22).

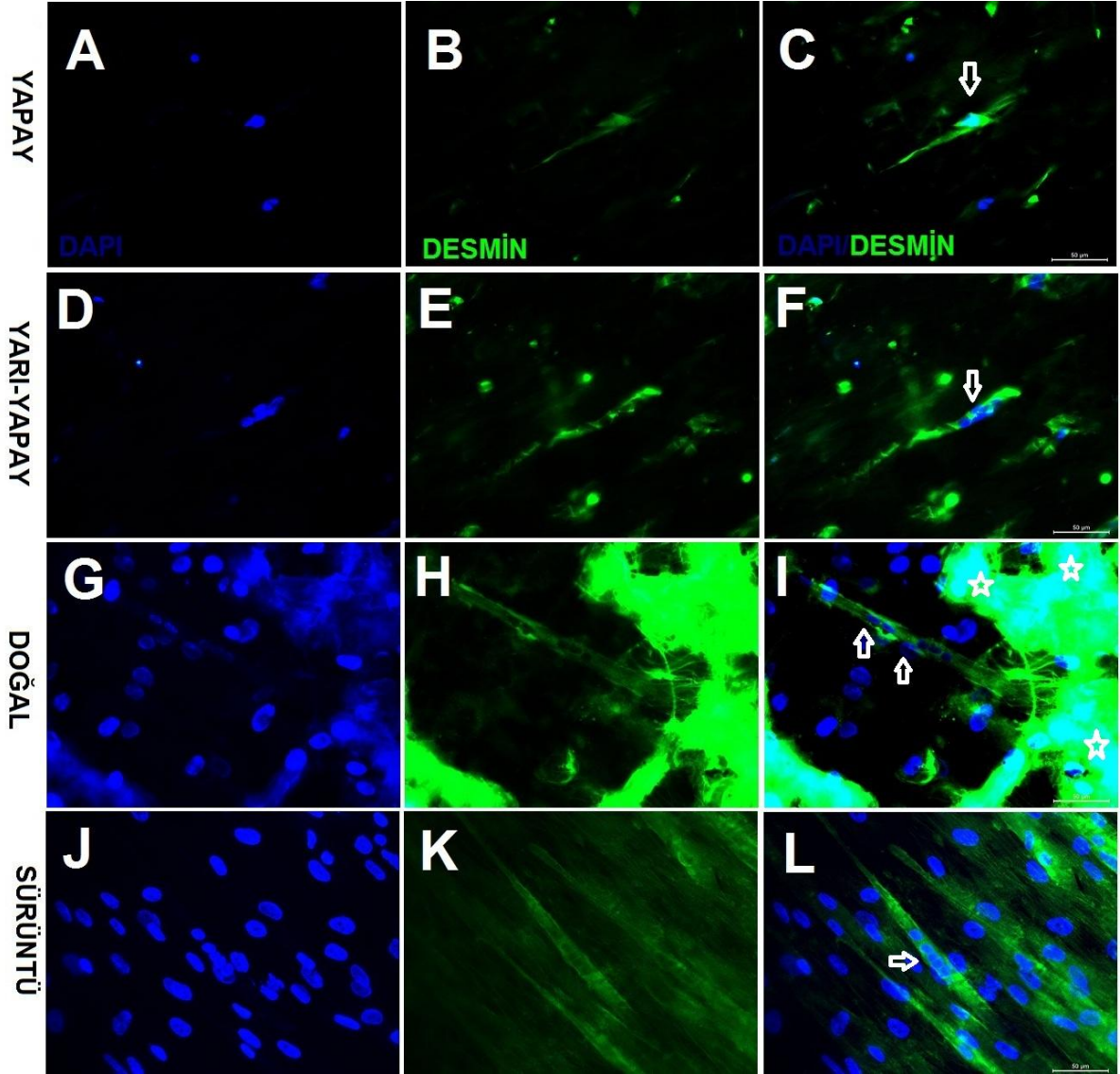
#### 4.3.3.2. İskeleler Üzerinde Desmin Antikoru Boyaması

Sarkomerlerin yakınılarında bulunan bir çeşit ara filament olan desmin proteinleri kasılmada görev alan ve embriyolojik dönemde en erken görülen kas proteinlerinden biridir. Bu bağlamda desmin proteinleri bu proteine özgü bir antikor ile boyanarak hücrelerin kas oluşturma potansiyelleri gösterildi.



Şekil 4.23. MK-MKH'lerin yapay, yarı-yapay, doğal iskeleler ve sürüntü üzerindeki desmin antikor boyamaları (Beyaz oklar miyotüp yapılarını, yıldız işaretleri doğal dokuyu göstermektedir.)

Doğal iskeleler üzerindeki MK-MKH'lerin kasa özgü bir protein olan desmin proteinini ifade ederken, yarı-yapay iskele ve sürüntü üzerindeki bu proteini düşük oranda ifade ettikleri belirlendi. Yapay iskelede ise bu proteinin ifadesi gösterilemedi (Şekil 4.23).

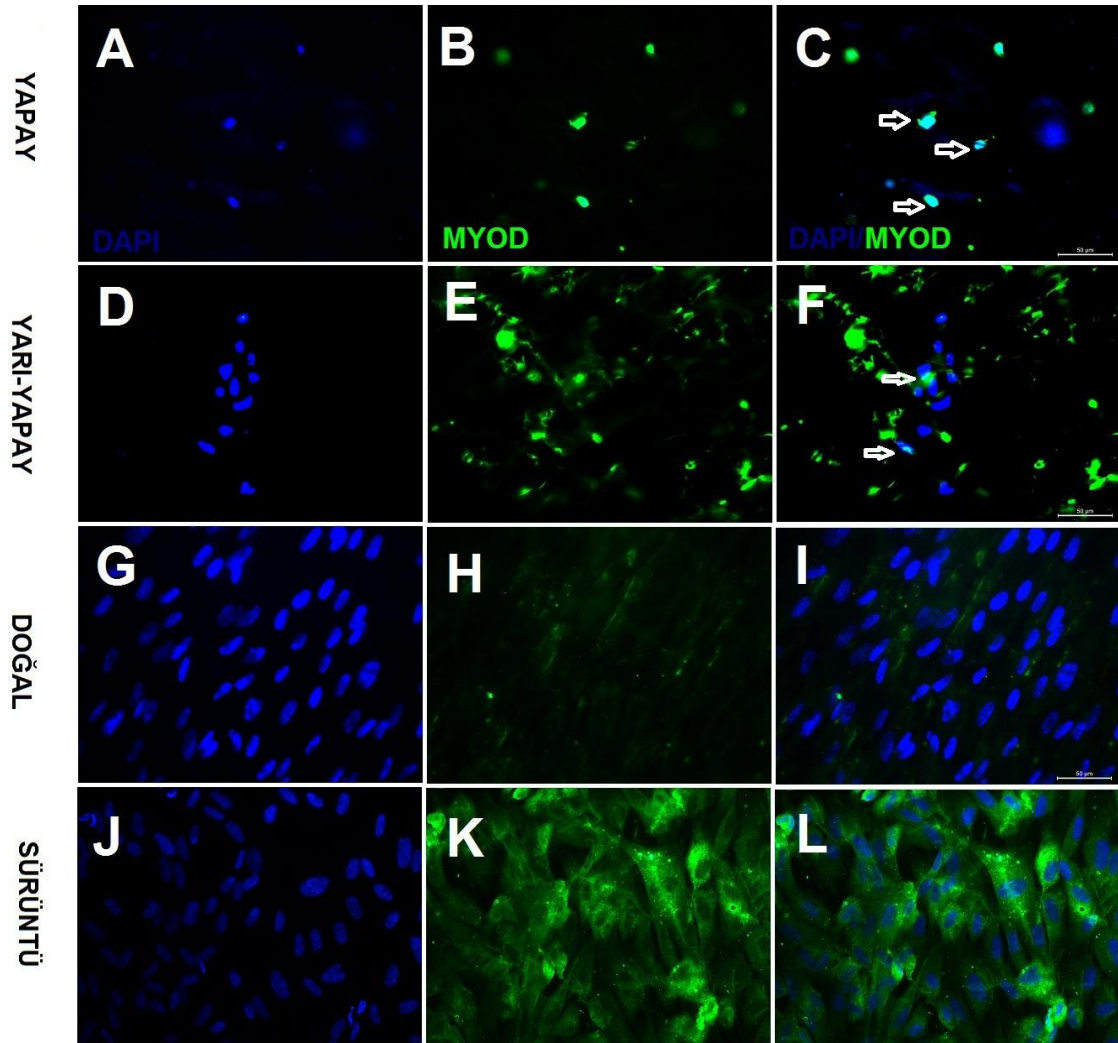


Şekil 4.24. Miyoblastların yapay, yarı-yapay, doğal iskeleler ve sürüntü üzerindeki desmin antikor boyamaları (Beyaz oklar miyotüp yapılarını, yıldız işaretleri doğal dokuyu göstermektedir.)

Doğal iskeleler üzerindeki MK-MKH'lerin kasa özgü bir protein olan desmin proteinini ifade ederken, yapay, yarı-yapay iskele ve sürüntü üzerindeki bu proteini düşük oranda ifade ettikleri belirlendi (Şekil 4.24).

#### 4.3.3.3. İskeleler Üzerinde MyoD Antikoru Boyaması

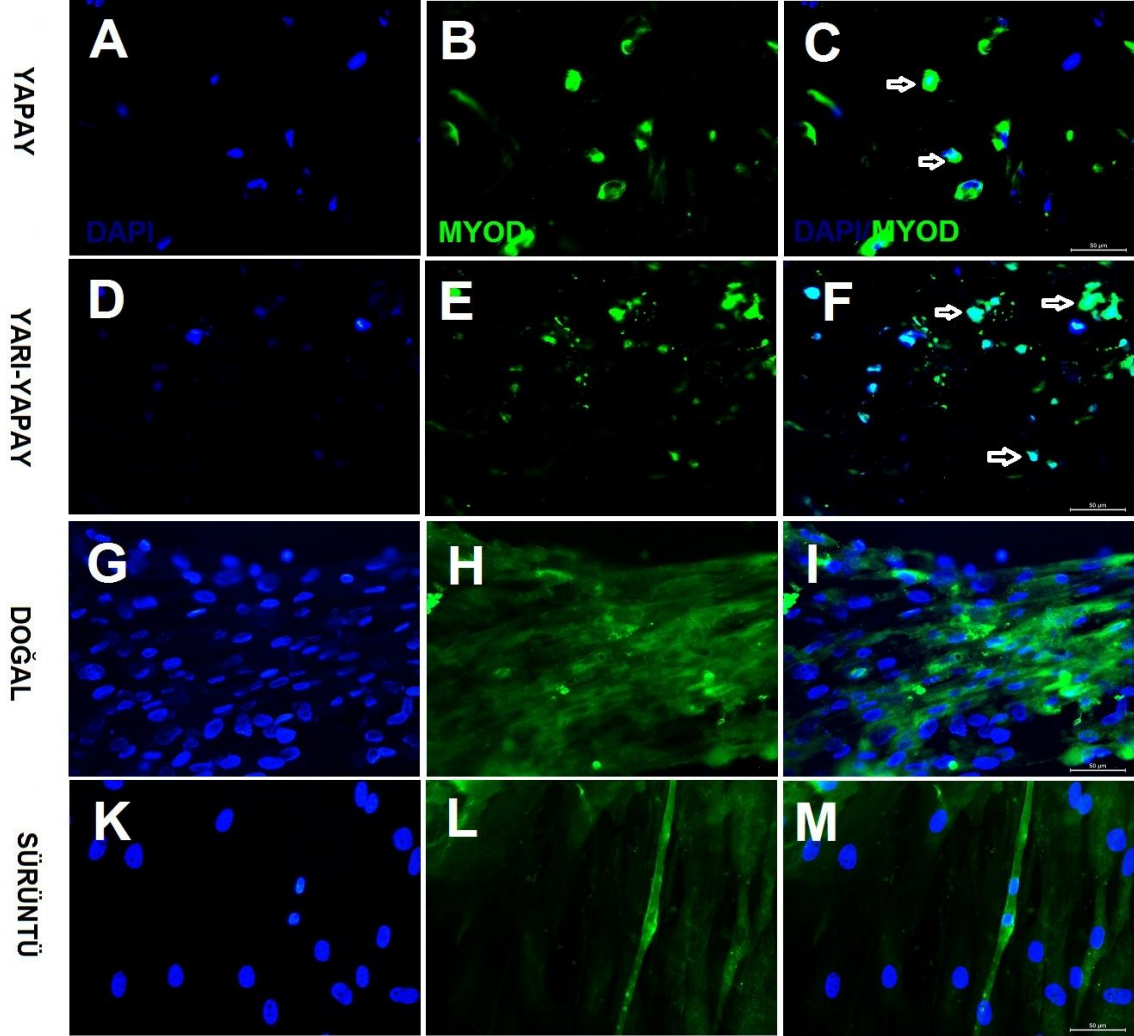
Kas farklılaşmasını düzenleyici rolü olan ve aktif satelit hücrelerinde kas hücrelerine dönüşümün bir göstergesi olarak gözlenen MyoD proteinlerinin bu proteine özgü bir antikor ile boyanarak hücrelerin kas oluşturma potansiyelleri gösterildi.



Şekil 4.25. MK-MKH'lerin yapay, yarı-yapay, doğal iskeleler ve sürüntü üzerindeki MyoD antikor boyamaları (Beyaz oklar hücre çekirdeğinde MyoD proteinini ifade eden hücreleri göstermektedir.)



Yapay ve yarı-yapay iskeleler üzerindeki MK-MKH'lerin MyoD proteinini hücre çekirdeğinde ifade ederken, sürüntü ve doğal iskeleler üzerindeki hücrelerin bu proteini sitoplazmalarında ifade ettikleri belirlendi (Şekil 4.25).



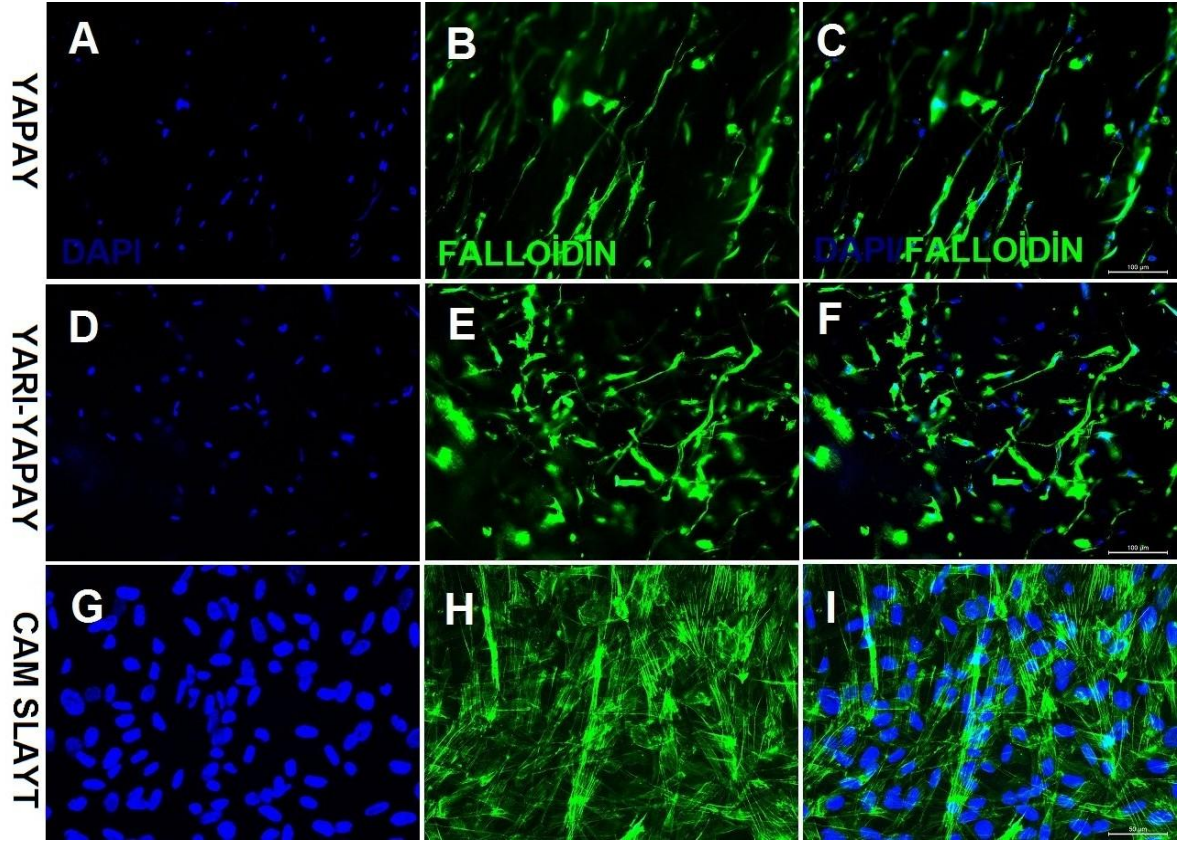
**Şekil 4.26.** Miyoblastların yapay, yarı-yapay, doğal iskeleler ve sürüntü üzerindeki MyoD antikor boyamaları (Beyaz oklar hücre çekirdeğinde MyoD proteinini ifade eden hücreleri göstermektedir.)

Yapay ve yarı-yapay iskeleler üzerindeki miyoblastların, MyoD proteinini hücre çekirdeğinde ifade ederken, sürüntü üzerindeki hücrelerin bu proteini sitoplazmalarında güçlü, doğal iskelelerin ise zayıf olarak ifade ettikleri belirlendi (Şekil 4.26).

#### 4.3.3.4. İskeleler Üzerinde Falloidin Boyaması

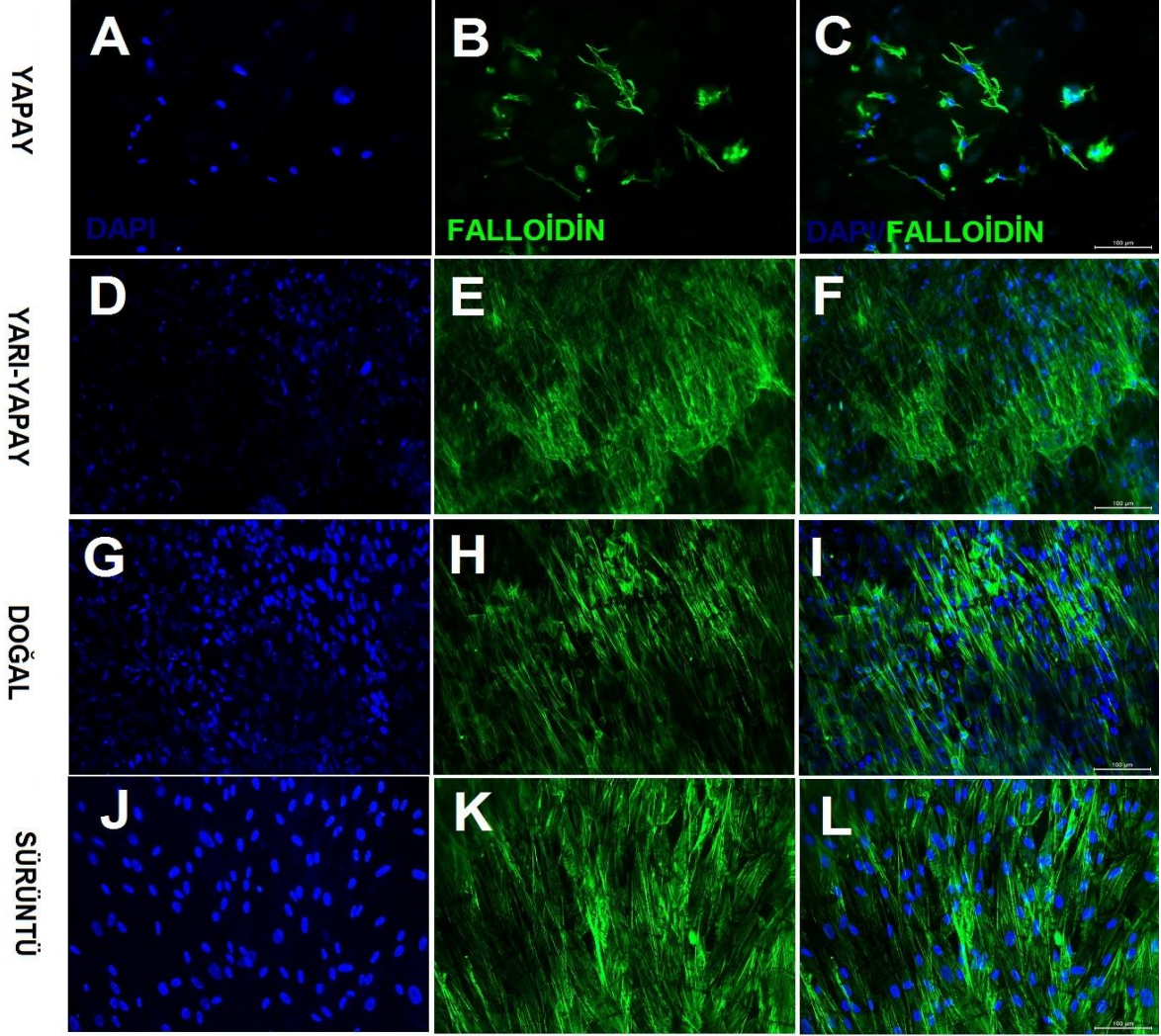
Bir antikor olmaktan çok hücre içerisindeki filamentleri boyayan floresan ışığa yapabilen bir boya olan falloidin ile hücrelerin boyanması ile hücrelerin iskeleler üzerindeki konumları ve davranışları ile ilgili bilgiler toplandı.

Yapılan ön çalışmada yapay ve yarı-yapay iskeleler ile cam slaytlar üzerinde 10 gün boyunca insan miyoblast hücreleri büyütülmüş ve bu sürenin sonunda hücreler sabitlenerek falloidin ile boyandı.



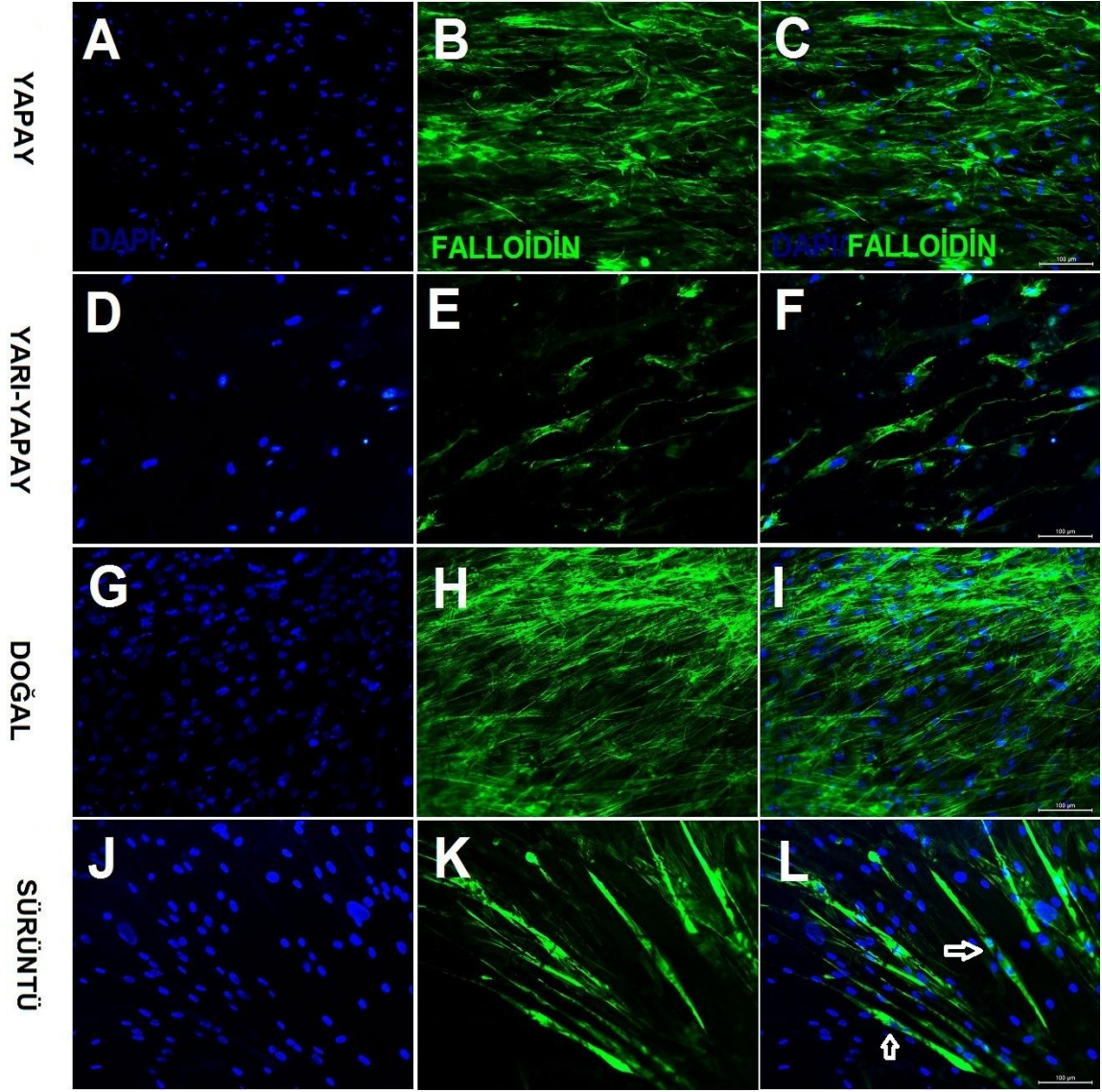
Şekil 4.27. Miyoblastların yapay ve yarı-yapay iskeleler ile cam slayt üzerindeki falloidin boyamaları

Ön çalışmada, miyoblastların hiç işlem görmemiş yapay iskeleler üzerinde sıralı bir biçimde dizildikleri gösterildi. İşlem görmüş yarı-yapay iskeleler de ise bu düzgün diziliş görülmedi (Şekil 4.27).



Şekil 4.28. MK-MKH'lerin yapay, yarı-yapay, doğal iskeleler ve sürüntü üzerindeki falloidin boyamaları

Yapay, yarı-yapay, doğal iskeleler ile sürüntü üzerindeki hücrelerin kas oluşumu için istenilen bir durum olan sıralı bir şekilde dizilmelerinin MK-MKH'ler tarafından gerçekleştirildiği gösterildi. Fakat 21 günlük kültürün sonunda herhangi bir miyotüp yapısı gözlenmedi (Şekil 4.28).



**Şekil 4.29.** Miyoblastların yapay, yarı-yapay, doğal iskeleler ve sürüntü üzerindeki falloidin boyamaları (Beyaz oklar miyotüp yapılarını göstermektedir.)

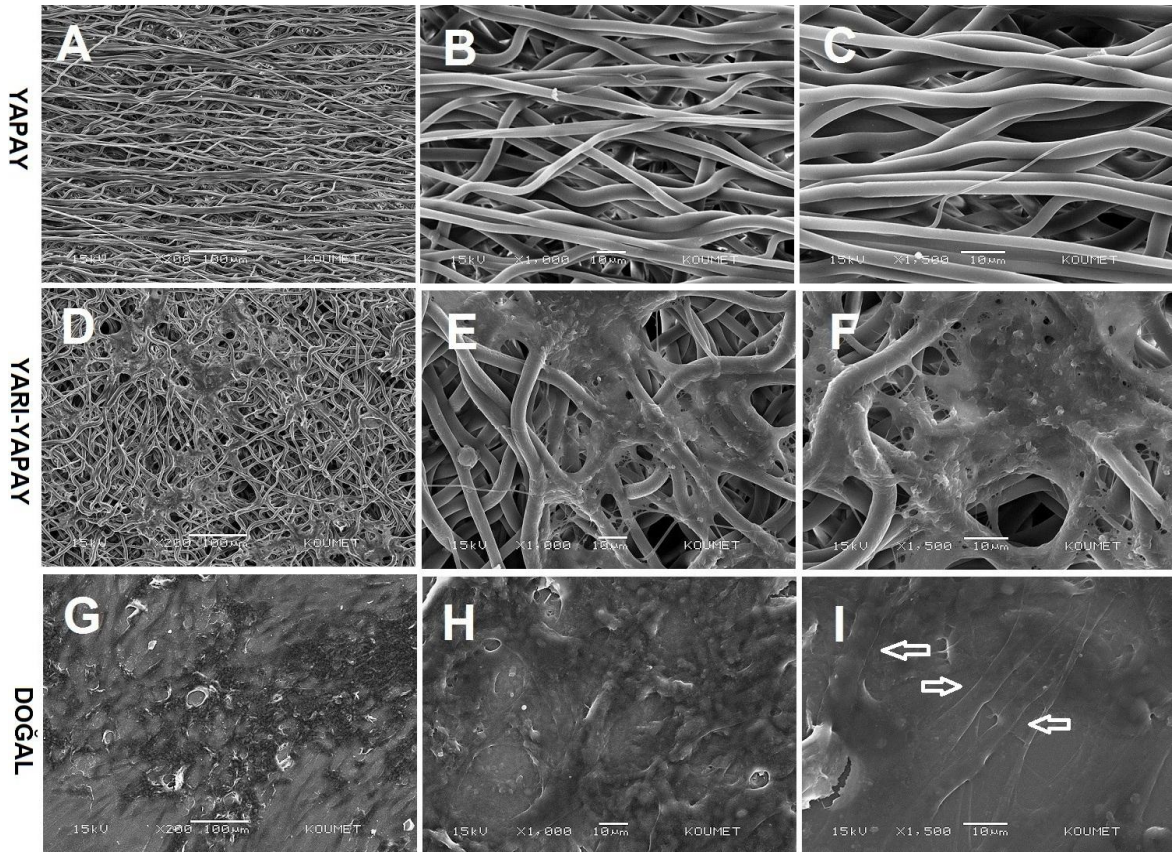
Yapay, yarı-yapay, doğal iskeleler ile sürüntü üzerindeki hücrelerin kas oluşumu için uygun bir durum olan sıralı bir şekilde dizilmelerinin miyoblastlar tarafından yapıldığı gösterildi. Fakat 21 günlük süre sonunda sürüntü üzerindeki hücreler hariç diğer iskelelerde herhangi bir miyotüp yapısı gözlenmedi (Şekil 4.29).

#### 4.3.4. Kas Oluşturma Potansiyellerinin SEM ile Gösterimi

Ayrıca iskelelerin SEM görüntüleri alınarak hücrelerin iskeleler üzerindeki davranışları gözlemlendi.

##### 4.3.4.1. MK-MKH'lerin Çeşitli İskeleler Üzerindeki Yerleşimi ve Kas Oluşturma Potansiyellerinin SEM ile Gösterimi

MK-MKH'lerin yapay, yarı-yapay ve doğal iskeleler üzerindeki kas oluşturma potansiyelleri SEM mikroskobu ile gösterildi.

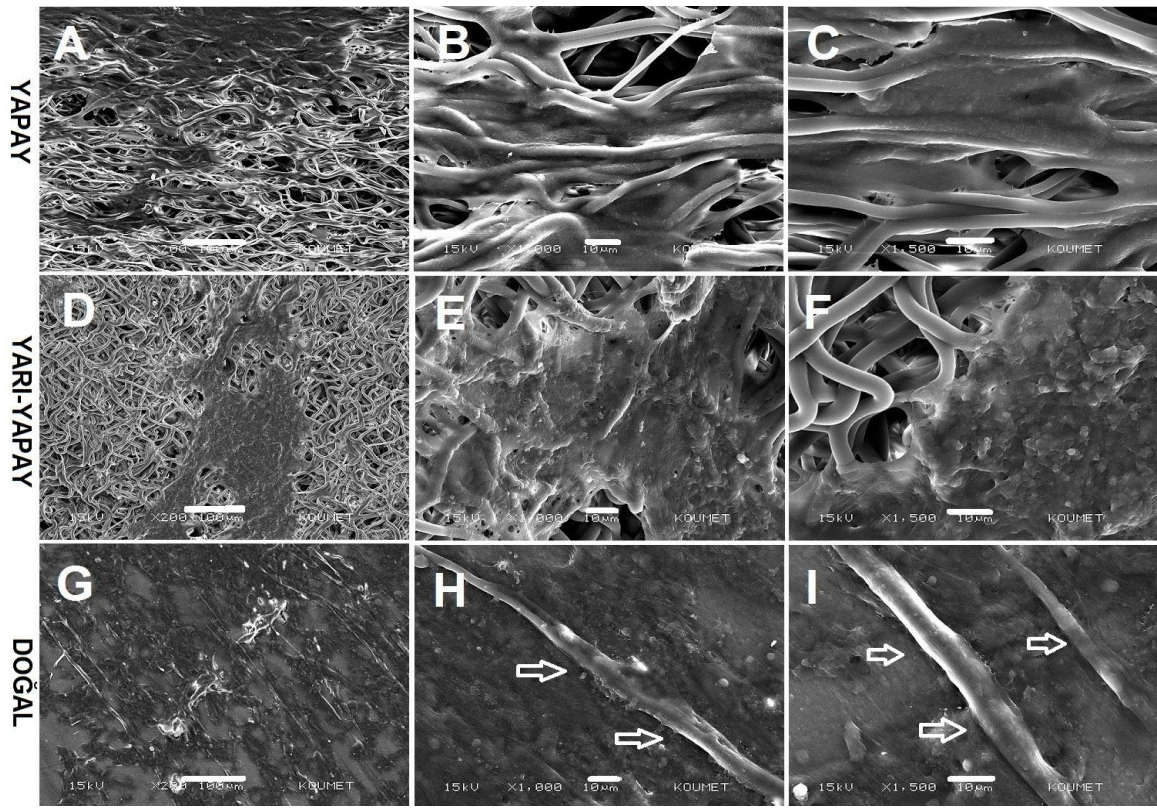


**Şekil 4.30.** MK-MKH'lerin yapay, yarı-yapay ve doğal iskeleler üzerindeki SEM mikrofotoğrafları (Beyaz oklar miyotüp benzeri yapıları göstermektedir.) (Skala çubuğu A,D,G: 100 µm, B,C,E,F,H,I: 10 µm)

Yarı-yapay iskelelerde hücrelerin iskelelere çıkıntılarıyla tutundukları gösterildi (Şekil 4.30. E,F). Doğal iskele hariç diğer iskelelerde miyotüp benzeri yapılar görüntülenemedi (Şekil 4.30).

#### 4.3.4.2. Miyoblastların Çeşitli İskeleler Üzerindeki Yerleşimi ve Kas Oluşturma Potansiyellerinin SEM ile Gösterimi

Miyoblastların yapay, yarı-yapay ve doğal iskeleler üzerindeki kas oluşturma potansiyelleri SEM mikroskobu ile gösterildi.



**Şekil 4.31.** Miyoblastların yapay, yarı-yapay ve doğal iskeleler üzerindeki SEM mikrofotoğrafları (Beyaz oklar miyotüp benzeri yapıları göstermektedir.) (Skala çubuğu A,D,G: 100 µm, B,C,E,F,H,I: 10 µm)

Yapay ve yarı-yapay iskelelerde hücrelerin sıralı bir biçimde dizildiği görüntüldü (Şekil 4.31. B,C). Doğal iskele hariç diğer iskelelerde miyotüp oluşumu görüntülenemedi (Şekil 4.31).

## 5. TARTIŞMA

Son yıllarda, kadavradan alınan karaciğer ve kalp gibi hayati organlardan kadavraya ait hücrelerin uzaklaştırılıp elde edilen üç boyutlu yapının doğal bir iskele olarak kullanıldığı ve bu hücresiz doğal iskelelerin alıcının hücreleriyle yeniden işlevselleştirilmeye çalışıldığı önemli çalışmalar yapılmıştır (Ott et al. 2008, Uygun et al. 2010). Güncel gelişmeleri takiben bu çalışmamızda, doğal iskelelerin kas oluşumuna etkisinin yapay ve yarı-yapay iskelelere göre karşılaştırılması yapılmıştır. Literatürde, tüm bir rat iskelet kasının (örneğin; sıçan Gastrocnemius kası) alınarak hücrelerinden arındırıldığı ve alıcı miyoblastları ve ya kemik iliği kökenli MKH üç boyutlu iskelelere iğne ile enjekte edilerek tekrar organize edilmeye çalışıldığı yayınlar da mevcuttur. Bu yayınlarda, kısmi olarak bir organizasyon gözlenmekle birlikte işlevsel bir kas yaması oluşturulamamıştır (De Coppi et al. 2006, Valentin et al. 2010). Hücrelerinden arındırılmış insan aselular çizgili kası üzerine insan miyoblastlarının ve MK-MKH'lerin ekilerek bu hücrelerin kas hücrelerine farklılaşma potansiyelinin incelenmesi ise literatürde bir ilk olmuştur. Kullandığımız poli(L-laktit-ko-kaprolakton) kopolimeri (70/30 mol oranı) daha önce kas doku üretimiyle ilgili herhangi bir araştırmada kullanılmamıştır. Çalışmamız bu polimerin doku mühendisliğinde kullanımıyla ilgili bilgi vermesi bakımından önemlidir. Ayrıca, yapay iskelelere çapraz bağlayıcı moleküller yardımıyla kas parçalarının bağlanması ve bunların miyoblast ve MK-MKH'lerin miyojenik farklılaşmasına etkilerinin gösterilmesi de literatürde bir ilktir.

Çalışmamızda, akım sitometri sonuçlarına bakıldığında menstrual kandan izole edilen hücrelerin ve miyoblastların CD29, CD44, CD90 gibi MKH belirteçlerini yüzeylerinde ifade ederken, CD33, CD34, CD45 gibi kan yapıcı kök hücrelere ait belirteçleri ifade etmemeleri, her iki hücre tipinin kültürdeki morfolojik özellikleri ayrıca da yağ ve kemik hücrelerine farklılaşmaları literatürdeki MKH özellikleri ile benzer özelliklerdir (Karaöz et al. 2009, Karaöz et al. 2010).

Yapay iskeleler elde etmek için poli(L-laktit-ko-kaprolakton) kopolimeri, iskelet kası kasılma modeline uygun bir polimer olarak seçilmiştir. Çekildiğinde açılabilen, bırakıldığında ise çok kısa bir sürede eski haline tekrar dönebilen elastik bir karakteristiğe sahiptir. Bu anlamda, kas doku mühendisliği için mekanik özellikler olarak doğru bir polimer seçilmiştir. Ayrıca elastik modülü, literatürde yer alan ve sadece

iskelenin mekanik özelliklerine göre kök hücrelerin kas hücrelerine farklılaştığının gösterildiği çalışmadaki iskelenin elastik modülüne yakın bir değerde bulunmuştur (Engler et al. 2010).

Yapılan ön çalışmada, kas hücrelerine özgü bir protein olan alfa-aktinin proteinin ifadesi ve miyotüp yapıları, yapay iskelelerde sayıca fazla olmak üzere yarı-yapay ve cam slayt üzerine ekilen miyoblastlarda gösterilmiştir. 21 günlük kültürde ise yapay, yarı-yapay ve doğal iskeleler ile sürüntü üzerindeki miyoblastlarda alfa-aktinin ifadesi tespit edilmiş, fakat miyotüp oluşumu yalnızca sürüntü ve doğal iskele üzerinde gözlenmiştir. Bu durum, ön çalışmayla 21 günlük kültürde kullanılan hücrelerin, farklı kişilerden alınmasıyla ve kültür süresinin uzunluğuyla açıklanabilir. Yarı-yapay ve doğal iskeleler ile sürüntü üzerine ekilen MK-MKH'lerde alfa-aktinin ifadesi tespit edilirken, yapay iskelede hücre sayısının da azlığına paralel olarak çok zayıf bir ifade belirlenmiştir. Bu durum, MK-MKH'lerin yapay iskele üzerine tutunamamış olabileceği ile açıklanabilir.

Yarı-yapay ve yapay iskeleler ile sürüntü üzerindeki MK-MKH'lerde desmin ifadesinin zayıf olarak belirlenmiş olmasıyla birlikte doğal iskeleler üzerindeki hücrelerde güçlü desmin ifadesi mevcuttur. Fakat miyotüp oluşumu her üç iskele tipinde ve sürüntüde gözlenmemiştir. Yapay iskeledeki desmin ifadesinin zayıflığı yine hücre sayısının azlığından kaynaklanmakta ve bu da MK-MKH'lerin yapay iskelelere tutunmasındaki eksiklikle açıklanabilmektedir. Sonuç olarak, MK-MKH'lerde kayda değer bir kas farklılaşması gözlenmemiştir. Yarı-yapay, yapay ve doğal iskeleler ile sürüntü üzerine ekilen miyoblastlarda desmin ifadesi ve miyotüp yapıları gözlenmiştir.

MK-MKH'lerde ve miyoblastlarda MyoD ifadesi, yapay ve yarı-yapay iskelelerde hücre çekirdeğinde gözlenirken doğal iskelelerde ve sürüntüde hücre sitoplazmasında görüntülenmiştir. Bu durum, hücrelerin 21 günlük süreçte MyoD proteinini ifade ettikleri fakat sadece yapay ve yarı-yapay iskeledeki hücrelerin çekirdeğe taşıyabildiğiyle açıklanabilir.

Yapılan ön çalışmada, falloidin 21 günlük kültüre benzer olarak hücrelerin yapay iskelede düzgün bir biçimde uzandığını fakat yarı-yapay iskelede uygulanan çapraz bağlama prosedürü sonucu iskelenin büzüşmesiyle hücrelerin düzgün, sıralı bir şekilde



fiberler üzerinde uzanamadığını göstermektedir. Yönlendirilmiş bir miyotüp yapısı elde etmek, işlevsel ve tek yönde kasılabilen bir kas yaması elde etmek açısından önemli bir basamak olduğundan bu çalışmamızda yönlendirilmiş fiber oluşturarak gerçekleştirilmeye çalışılmıştır. Paralel mikrofiber yapısı, sadece yapay iskelede muhafaza edilebildiği için yönlendirilmiş hücre yapısı sadece bu iskelelerde düzgün bir şekilde elde edilebilmiştir. Bununla birlikte, falloidin ile sadece miyoblastların ekildiği sürüntü üzerinde miyotüp yapıları gözlenmiş diğer iskelelerde hücrelerin yayıldığı tespit edilebilmiş fakat hücre katmanlarından dolayı herhangi bir miyotüp yapısı ayırt edilememiştir.

Yarı-yapay iskeledeki başarısız hücre dağılımı (kümelenme var, homojen değil) ve çok az sayıda miyotüp oluşmasının nedeni, çapraz bağlamada kullanılan kimyasal maddeler olabilir. Bu nedenle, hücreler için daha zararsız olan bir çapraz bağlayıcı veya farklı bir çapraz bağlama yöntemi kullanıldığında sonuçlar daha olumlu olabilir.

Canlılık testi sonuçlarından, MK-MKH'lerin yapay iskeleye hiç tutunmadıkları ve en fazla çoğalmayı doğal iskeleler üzerinde gösterdikleri, buna rağmen miyoblastların ise yapay ve yarı-yapay iskeleler üzerinde çoğaldıkları görülmüştür. Bu durum farklı hücre tiplerinin farklı iskelelere daha iyi tutunabilmesiyle açıklanabilir. Bu tutunma farklılıklarının sebebi ise hücrelerin yüzeylerinde ifade ettikleri integrinler gibi tutunma proteinlerindeki farklılıklar olabilir.

SEM mikrofotografına bakıldığında ise yarı-yapay iskelelerin işlem gördükten sonra düzgün fiber yapısının kaybolduğu ve büzüştüğü gözlenmiştir. Bu durumun sebebi, çapraz bağlayıcı moleküllerle muamele edilmesi olup, düzgün fiber yapısını bozduğu için MK-MKH'lerin ve miyoblastların iskele üzerinde düzgün bir biçimde yerleşmesine de imkan vermemiştir. Yapay iskelelerde ise böyle bir sorun olmayıp, miyoblastların düzgün bir biçimde fiberler üzerinde uzandıkları tespit edilmiş, fakat fiberler arasına girdikleri için miyotüp yapıları oluşturup oluşturmadıklarına dair net bir görüntü alınamamıştır. Yapay iskelelerde MK-MKH'ler tespit edilemediği için bu hücreler hakkında bilgi edinilememiştir. Doğal iskeleler üzerinde ise her iki hücre tipinin de miyotüp benzeri yapılar oluşturdukları gözlenmiştir.

## 6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu projemizdeki kas yamaları oluşturmada en etkin iskele ve hücre tipi belirleme hedefimiz proje sonunda başarıya ulaşmıştır. En etkin hücre tipi miyoblast hücreleri, en etkili iskele tipi ise doğal iskele ve yapay iskeleler olarak belirlenmiştir.

Kas doku mühendisliğinde ideal bir iskelenin hücreleri hem çoğaltması hem de miyotüp oluşturmaya teşvik etmesi gerektiği düşünüldüğünde, MK-MKH'lerle oluşturulacak bir kas yaması modelinde doğal iskeleler veya doğal iskele parçacıkları barındıran yarı-yapay iskeleler, miyoblastlarla oluşturulacak bir kas yaması modelinde ise yapay veya doğal iskeleler tercih edilmelidir. Ayrıca, bu çalışmamızda kullanılan kopolimerin mekanik özelliklerinin kas doku için uygun olmasının yanı sıra, bileşenleri olan kaprolaktonun parçalanma ürünleri toksik olmadığından ve PLA'nın da zamanla laktik asite parçalanması ve laktik asitin de temelde zararsız olmasından dolayı bu kopolimer *in vivo* çalışmalarda da kullanılabilir (Lanza et al. 2007).

Tüm bunlardan hariç, çalışmamızda çizgili kas özdeşi oluşturmak için kas dokunun temel bileşeni olan miyotüp yapılarını oluşturmaya odaklansak da bilindiği üzere kas doku sadece miyotüp yapılarından meydana gelmemektedir. Kas dokunun diğer önemli bileşenleri olan kas-sinir kavşakları ile kasın beslenmesini sağlayan damar yapılarının *in vitro* veya *in vivo*'da oluşturulması da bu projenin ilerleyen safhalarında önerilebilir.

## KAYNAKLAR DİZİNİ

Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. (2002) DNA Replication, Repair, and Recombination: Molecular Biology of the Cell, 120-121. USA: Garland science.

Bedhesta, M.D. (2009) The Stem Cell, In *Stem Cell Information* [online]. National Institutes of Health, U.S. Department of Health and Human Services. <http://stemcells.nih.gov/info/scireport/chapter1.asp> (Ulaşım 4 Nisan 2011).

Beier J.P., Stern-Straeter J., Foerster V.T., Kneser U., Stark G.B., Bach A.D. (2006) Tissue engineering of injectable muscle: three-dimensional myoblast-fibrin injection in the syngeneic rat animal model. *Plast Reconstr Surg.*, 118(5):1113-1121.

Borlongan C.V., Kaneko Y., Maki M., Yu S.J., Ali M., Allickson J.G., Sanberg C.D., Kuzmin-Nichols N., Sanberg P.R. (2010) Menstrual blood cells display stem cell-like phenotypic markers and exert neuroprotection following transplantation in experimental stroke. *Stem Cells Dev.*, 19(4):439-452.

Campbell N.A., Reece J.B. (2006) Hayvan yapı ve işlevi: Biyoloji, 1075-1084. USA: Benjamin Cummings-Pearson Education.

Cui C.H., Uyama T., Miyado K., Terai M., Kyo S., Kiyono T., Umezawa A. (2007) Menstrual blood-derived cells confer human dystrophin expression in the murine model of Duchenne muscular dystrophy via cell fusion and myogenic transdifferentiation. *Mol Biol Cell*, 18:1586-1594.

De Coppi P., Bellini S., Conconi M.T., Sabatti M., Simonato E., Gamba P.G., Nussdorfer G.G., Parnigotto P.P. (2006) Myoblast–acellular skeletal muscle matrix constructs guarantee a long-term repair of experimental full-thickness abdominal wall defects. *Tissue Eng.*, 12(7):1929-1936.

Elçin Y.M. (2009) Embriyonik kök hücreler: Kök Hücre Biyolojisi ve Klinik Uygulamalar, 23-27. Türkiye: Türkiye Bilimler Akademisi Raporlar.

Engler A.J., Sen S., Sweeney H.L., Discher D.E. (2006) Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell*, 126(4):677-689.

Freshney R.I. (2005) Defined media and supplements: Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique, 115-143. USA: John Wiley&Sons.

Hayes R. (2006) Stem Cells and Public Policy, 4-5. USA: The Century Foundation Press.

Hida N., Nishiyama N., Miyoshi S., Kira S., Segawa K., Uyama T., Mori T., Miyado K., Ikegami Y., Cui C., Kiyono T., Kyo S., Shimizu T., Okano T., Sakamoto M., Ogawa S., Umezawa A. (2008) Novel cardiac precursor-like cells from human menstrual blood-derived mesenchymal cells. *Stem Cells*, 26(7):1695-1704.

Karaoz E., Aksoy A., Ayhan S., Sariboyaci A.E., Kaymaz F., Kasap M. (2009) Characterization of mesenchymal stem cells from rat bone marrow: ultrastructural properties, differentiation potential and immunophenotypic markers. *Histochem Cell Biol.*, 132(5):533-546.

Karaöz E., Doğan B.N., Aksoy A., Gacar G., Akyüz S., Ayhan S., Genç Z.S., Yürüker S., Duruksu G., Demircan P.C., Sariboyaci A.E. (2010) Isolation and in vitro characterisation of dental pulp stem cells from natal teeth. *Histochem Cell Biol.*, 133(1):95-112.

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

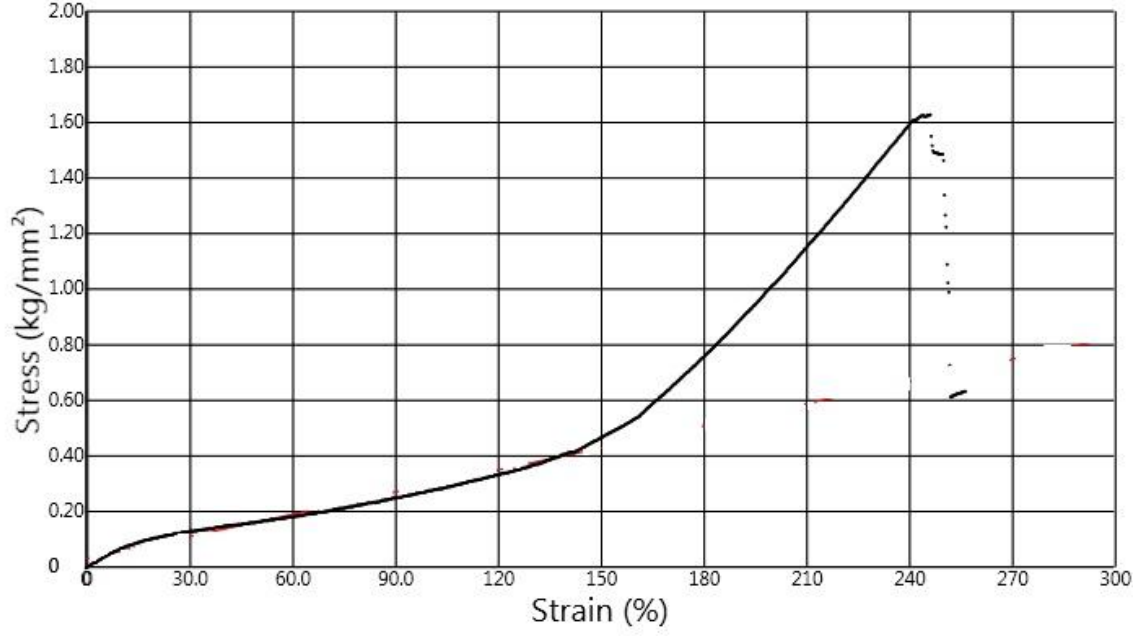
- Kazemnejad S., Akhondi M.M., Soleimani M., Zarnani A.H., Khanmohammadi M., Darzi S., Alimoghadam K. (2012) Characterization and chondrogenic differentiation of menstrual blood-derived stem cells on a nanofibrous scaffold. *Int J Artif Organs*, 35(1):55-66.
- Kenar H. (2008) 3D patterned cardiac tissue construct formation using biodegradable materials. Thesis (PhD). Middle East Technical University.
- Kochar, P.G. (2004) What are stem Cells [online]. Cambridge Information Group, Proquest. <http://www.csa.com/discoveryguides/stemcell/overview.php> (Ulaşım: 4 Nisan 2012).
- Kumar P.A., Hassan K.M. (2002) Cross-face nerve graft with free-muscle transfer for reanimation of the paralyzed face: a comparative study of the single-stage and two-stage procedures. *Plast Reconstr Surg*, 109: 451-462.
- Lanza R., Langer R., Vacanti J. (2007) Principles of Tissue Engineering: Introduction to Tissue Engineering. USA: Elsevier Academic Press.
- Merritt E.K., Cannon M.V., Hammers D.W., Le L.N., Gokhale R., Sarathy A., Song T.J., Tierney M.T., Suggs L.J., Walters T.J., Farrar R.P. (2010) Repair of traumatic skeletal muscle injury with bone-marrow-derived mesenchymal stem cells seeded on extracellular matrix. *Tissue Engineering: Part A* 16-9, 2871-2881.
- Meyer U., Meyer T., Handschel J., Wiesmann H.P. (2009) Muscle Tissue Engineering: Fundamentals of Tissue Engineering and Regenerative Medicine. Berlin Heidelberg: Springer.
- Moon Du G., Christ G., Stitzel J.D., Atala A., Yoo J.J. (2008) Cyclic mechanical preconditioning improves engineered muscle contraction. *Tissue Eng Part A*. 14(4):473-482.
- Murphy M.P., Wang H., Patel A.N., Kambhampati S., Angle N., Chan K., Marleau A.M., Pysznik A., Carrier E., Ichim T.E., Riordan N.H. (2008) Allogeneic endometrial regenerative cells: an "Off the shelf solution" for critical limb ischemia? *J Transl Med.*, 19;6:45.
- Ott H.C., Matthiesen T.S., Goh S.K., Black L.D., Kren S.M., Netoff T.I., Taylor D.A. (2008) Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart. *Nat Med.*, 14(2):213-21.
- Patel A.N., Silva F. (2008) Menstrual blood stromal cells: the potential for regenerative medicine, *Regen Med.*, 3(4):443-444.
- Powell C.A., Smiley B.L., Mills J., Vandeburgh H.H. (2002) Mechanical stimulation improves tissue-engineered human skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol.*, 283(5): C1557-1565.
- Stevens M. M., George J. H. S., Shaffer M. M. (2006) Investigating the cellular response to multiwalled Carbon Nanotubes. *5th Conference and Post Graduate day, 28-29 June 2006 Manchester*.
- Thomson J.A., Itskovitz-Eldor J., Shapiro S.S., Waknitz M.A., Swiergiel J.J., Marshall V.S., Jones J.M. (1998) Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 282, 1145-1147.
- Toyoda M., Cui C., Umezawa A. (2007) Myogenic transdifferentiation of menstrual blood-derived cells. *Acta Myol.*, 26(3):176-178.
- Uygun B.E., Soto-Gutierrez A., Yagi H., Izamis M.L., Guzzardi M.A., Shulman C., Milwid J., Kobayashi N., Tilles A., Berthiaume F., Hertl M., Nahmias Y., Yarmush M.L., Uygun K. (2010) Organ reengineering through development of a transplantable recellularized liver graft using decellularized liver matrix. *Nat Med.*, 16(7):814-820.
- Valentin J.E., Turner N.J., Gilbert T.W., Badyal S.F. (2010) Functional skeletal muscle formation with a biologic scaffold. *Biomaterials*, 31(29):7475-7484.

Yu J., Thomson J.A. (2006) Stem cell basics, 1-8. USA:National Institute of Health Information Center.

Yui J., Chiu C.P., Lansdorp P.M. (1998) Telomerase activity in candidate stem cells from fetal liver and adult bone marrow. *Blood*, 91(9), 3255-3262.

## EKLER

### EK 1. Mekanik test yapılan polimerlerin örnek gerilim-uzama grafiđi



## ÖZGEÇMİŞ

İsim-Soyisim, Unvan: Birol AY, Biyomühendis

Adres: Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Biyomühendislik  
Bölümü 70100 Merkez/Karaman

Telefon: 0338 2262374

E-posta: birol\_ay@hotmail.com

## KİŞİSEL BİLGİLER

Doğum Tarihi : 08/08/1988

Medeni Hal: Bekar

Sürücü Belgesi: B

## EĞİTİM BİLGİLERİ

09/2010 – 06/2012

### **Yüksek Lisans**

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

06/2011 - 08/2011

### **Misafir Araştırmacı**

Wake Forest Üniversitesi, Wake Forest Institute for  
Regenerative Medicine (WFIRM)-North Carolina/USA

09/2006 – 06/2010

### **Lisans**

Ege Üniversitesi – Biyomühendislik Bölümü – İzmir/  
TÜRKİYE

## BİLGİSAYAR BECERİLERİ

Microsoft Office

Mat Lab

Joomla

Photo Shop

SPSS

## **KONUŞMA BECERİLERİ**

Anadil: Türkçe

İngilizce: Okuma: 9/10, Yazma: 9/10, Konuşma: 8/10

## **YÖNETİM GÖREVLERİ**

1. Ege Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Topluluğu ( EBİLTET ) Yönetim Kurulu Başkan Yardımcısı, 2008-2009
2. Ege Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Topluluğu ( EBİLTET ) Yönetim Kurulu Başkanı, 2009-2010
3. Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü 4. Sınıflar ve Bölüm Öğrenci Temsilciliği, 2009-2010
4. Kocaeli Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Öğrenci Temsilciliği, 2010-2011

## **ÇALIŞTIĞI PROJELER**

1. TÜBİTAK Hızlı Destek 111S248 Nolu, "İnsan Miyoblast ve Mezenkimal Kök Hücre Yüklenmiş Aselüler Çizgili Kas Kaynaklı Doğal Ve Yarı-Yapay İskelelerin Çizgili Kas Dokusu Oluşturma Potansiyeli" başlıklı proje bursiyeri, 01/11/2011-01/06/2012

## **BİLİMSEL AKTİVİTELER**

### **Organize Ettiğim Etkinlikler**

1. 2007-2008 Eğitim Dönemi, Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü “HÜCRE 2007” Dergisi Editörlüğü, İzmir
2. 1 Nisan 2008, Ege Üniversitesi, “Küresel Isınmaya Karşı Çevre Bilinci ve Alternatif Enerji Kaynakları” Sempozyumu Organizasyon Komitesi Üyesi, İzmir
3. 22 Nisan 2008, Ege Üniversitesi, “Köy Okullarına 23 Nisan Hediyesi” Sosyal Sorumluluk Projesi Organizasyon Komitesi Başkanı, Manisa
4. 16 Mart 2009, Ege Üniversitesi, “1. Kök Hücre Sempozyumu” Organizasyon Komitesi Eşbaşkanı, İzmir
5. 23 Mart 2010, Ege Üniversitesi, “2. Kök Hücre Sempozyumu” Organizasyon Komitesi Eşbaşkanı, İzmir



## **Basın**

1. Tokat Haber Gazetesi Özel Röportaj: “Kök Hücreler ve Hastalıkları Tedavi Potansiyelleri” 16.08.2010 Tarihli Sayısı, Tokat
2. Kanal 60 Televizyonu “Mahmut Delen ile Söz Konusu” Programı Konuğu: “Kök Hücreler” 08.02.2011 Tarihli Yayın, Tokat

## **Yayınlar**

### **SCI Kapsamına Giren Yayınlar**

1. Karaöz E, Katabaş S, Duruksu G, Okçu A, Subaşı C, Ay B, Müslüman M, Civelek E, Reduction of Lesion in Injured Rat Spinal Cord and Partial Functional Recovery of Motility After Bone Marrow Derived Mesenchymal Stem Cell Transplantation, Turkish Neurosurgery 2012, Vol: 22, No: 2, 214-224.

### **Poster ve Sözlü Sunumlar**

1. Ay B, Şahin F, Kök Hücrelerin Biyoteknolojik Önemi. Fatih Üniversitesi, 1. Ulusal Biyoteknoloji Öğrenci Kongresi Poster Sunumu, PN8, 8-10 Mayıs 2009, İstanbul.
2. Ay B, Deliloğlu Gürhan İ, Doğrudan Yeniden Programlama Yöntemiyle İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücre (iPKH) Üretimi. Ondokuz Mayıs Üniversitesi, 1. Uluslararası Katılımlı Kök Hücre Sempozyumu, PN2, s:72, 29 Eylül-1 Ekim 2010, Samsun.
3. Karaöz E, Kabataş S, Ay B, Okçu A, Subaşı C, Duruksu G, Müslüman M, Civelek E, Infiltrated Bone Marrow Derived Mesenchymal Stem Cells In The Injured Rat Spinal Cord Reduces Lesion And Impacts Partially Functionally Recovery, 1. Uluslararası Katılımlı Kök Hücre Araştırmaları Kongresi, OP-22, S185, 28 Eylül-2 Ekim 2011, Sakarya/TÜRKİYE.
4. Ay B, Hwang CM, Yoo J, Atala A, Lee SJ, Optimization of Alginate-Fibrin System for Injectable Hydrogel Based Soft Tissue Regeneration, 1. Uluslararası Katılımlı Kök Hücre Araştırmaları Kongresi, OP-03, S166, 28 Eylül-2 Ekim 2011, Sakarya/TÜRKİYE.

## **Ödüller**

1. Ege Üniversitesi 1. Moleküler Biyoloji ve Genetik Kongresi Bilimsel Klip Yarışması Birincilik Ödülü; Klip Konusu: Kök Hücreler, 27-30 Ağustos 2008, İzmir/TÜRKİYE

2. 1. Uluslararası Katılımlı Kök Hücre Araştırmaları Kongresi En İyi 2. Sunum Ödülü  
Karaöz E, Kabataş S, Ay B, Okçu A, Subaşı C, Duruksu G, Müslüman M, Civelek E,  
Infiltrated Bone Marrow Derived Mesenchymal Stem Cells In The Injured Rat Spinal Cord  
Reduces Lesion And Impacts Partially Functionally Recovery, 1. Uluslararası Katılımlı  
Kök Hücre Araştırmaları Kongresi, OP-22, S185, 28 Eylül-2 Ekim 2011,  
Sakarya/TÜRKİYE.