

**NANOMODİFİYELİ KARDİYOPLEJİ SOLÜSYONUNUN
MİYOKARD KORUNMASINDAKİ ETKİSİNİN
GÖZLENMESİ**

**OBSERVATION OF THE EFFECT OF NANOMODIFIED
CARDIOPLEGIA SOLUTION ON MYOCARDIAL
PROTECTION**

ZÜLEYHA YAVUZ

PROF. DR. İBRAHİM VARGEL

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim - Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı için öngördüğü
YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2019

Züleyha YAVUZ'un hazırladığı "Nanomodifiyeli Kardiyopleji Solüsyonunun Miyokard Korunmasındaki Etkisinin Gözlenmesi" adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Adil DENİZLİ

Başkan



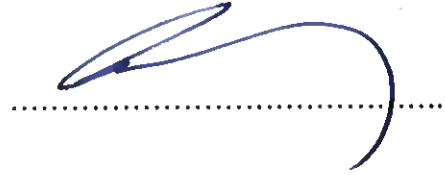
Prof. Dr. İbrahim VARGEL

Danışman



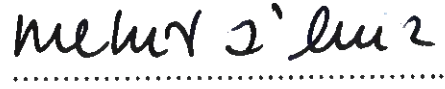
Prof. Dr. Serdar GÜNAYDIN

Üye




Prof. Dr. Mehmet Ali ONUR

Üye



Prof. Dr. Kanat ÖZİŞİK

Üye



Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak .../.../..... tarihinde onaylanmıştır.

Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada,

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

14..06/2019

ZÜLEYHA YAVUZ

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kâğıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayımlanan *“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”* kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricinde YÖK Ulusal Tez Merkezi / H. Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir.
- Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren ay ertelenmiştir.
- Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir.

14.06/2019


Züleyha YAVUZ

ÖZET

NANOMODİFİYELİ KARDİYOPELJİ SOLÜSYONUNUN MİYOKARD KORUNMASINDAKİ ETKİSİNİN GÖZLENMESİ

ZÜLEYHA YAVUZ

Yüksek Lisans, Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. İbrahim VARGEL

Haziran 2019, 77 sayfa

Bu tez çalışmasında, Poli(2-hidroksietil metakrilat) (PHEMA) ve Poli(2-hidroksietil metakrilat)-N-metakriloil-(L)-histidin metil ester (PHEMAH) nanopartiküller ile modifiye edilmiş kardiyopleji solüsyonlarının miyokard koruması üzerindeki etkisi *in-vitro* olarak incelenmiştir. Sentezlenen nanopartiküllerin karakterizasyonu için zeta boyut analizi, taramalı elektron mikroskobu (SEM), Fourier Transform İnfrared Spektroskopisi (FTIR), şişme deneyi ve yüzey alanı ölçümleri yapılmıştır. PHEMAH nanopartiküllerin L-histidin adsorpsiyon davranışı nanopartikül ve L-histidin arasındaki etkileşimler incelenerek açıklanmıştır. Farklı tampon çözeltilerin, başlangıç L-histidin derişiminin, adsorpsiyon süresinin ve sıcaklığın L-histidin adsorpsiyonuna etkisi incelenmiştir. En yüksek adsorpsiyon kapasitesine MES tamponunda, 1,5 mg/ml L-histidin başlangıç derişiminde ve 45 dakikalık adsorpsiyon süresinde ulaşılmıştır. En yüksek adsorpsiyon kapasitesi 251,2 mg/g'dır. Farklı derişimlerde nanopartikül içeren, farklı hacimlerdeki Histidin, Triptofan, Ketoglutarat (HTK) solüsyonuna ait örneklerin, 3-[4,5-dimetil-2-tiazolil]-2,5-difenil tetrazolyum bromid (MTT) Testi ile *in-vitro* etkileri karşılaştırılmıştır. HUVEC (İnsan Umblikal Ven Endotel Hücreleri) hücre hattında miyokard korunmasındaki rolleri için gruplar arası başarı durumları ortaya konulmuştur. PHEMA ve PHEMAH nanopartiküller ile modifiye edilmiş kardiyopleji solüsyonunun HTK'ye göre daha az hacimde daha iyi hücre canlılığı yüzdesi sağladığı ve miyokard

korumasını destekleyebileceği yönünde üstün bir potansiyel taşıdığı gösterilmiştir.

Anahtar kelimeler: Afinite, Nanopartikül, L-histidin, HTK, MTT

ABSTRACT

OBSERVATION OF THE EFFECT OF NANOMODIFIED CARDIOPLEGIA SOLUTION ON MYOCARDIAL PROTECTION

ZULEYHA YAVUZ

Master of Science, Department of Nanotechnology and Nanomedicine

Supervisor: Prof. Dr. Ibrahim VARGEL

Haziran 2019, 77 pages

In this thesis study, the effects of cardioplegia solutions modified with Poly(2-hydroxyethyl methacrylate) (PHEMA) and Poly(2-hydroxyethyl methacrylate) - N-methacryloyl-L-histidine methyl ester (PHEMAH) nanoparticles on myocardial protection was investigated *in-vitro*. To characterization the synthesized nanoparticles; zeta size analysis, scanning electron microscopy (SEM), Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR), swelling experiments and surface area measurements were performed. Adsorption behaviors of PHEMAH nanoparticles were explained by investigating the interactions between nanoparticles and L-histidine. Effects of adsorption of L-histidine; different buffer solutions, initial concentration of L-histidine, adsorption time and temperature were investigated. The maximum adsorption capacity was reached at Tris buffer, at 1.5 mg/mL initial concentration of L-histidine and at 45 minute adsorption time. The maximum adsorption capacity was found as 251.2 mg/g. Effects of Histidine, Tryptophan, Ketoglutarate (HTK) solutions in different volumes containing different nanoparticle concentrations were compared with 3- [4,5-dimethyl-2-thiazolyl] - 2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) test *in-vitro*. Success between groups was demonstrated for the role of myocardial protection in the HUVEC cell line. This study showed that cardioplegia solution which was modified with PHEMA and PHEMAH nanoparticles provided better cell viability percentage at a lower volume as compared to

HTK and has a potential to support myocardial protection.

Keywords: Affinity, Nanoparticle, L-histidine, HTK, MTT

TEŞEKKÜR

Aklı ve bilimi her şeyin üzerinde tutan, çağdaş uygarlık düzeyine çıkma hedefiyle “En büyük gerçekler ve görüşler, fikirlerin serbestçe ortaya konulması ve görüşülüp tartışılması ile meydana çıkar ve yükselir.” sözüyle her alanda gelişmeyi, araştırmayı öğütleyen öncü lider Mustafa Kemal ATATÜRK’e bizlere açtığı bu yolda teşviklerinden ve yadsınamaz katkılarından dolayı minnettarım.

Lisansüstü eğitimimin her aşamasında, her sıkıntıda desteğini esirgemeyen, pozitif tavrıyla beni yüreklendiren, yoğun çalışma temposuna rağmen yalnızca bana değil herkese, her yere yetiştirebilen güzel yürekli, değerli bilim insanı tez danışmanım Prof. Dr. İbrahim VARGEL’e,

Tez konumun ilham kaynağı olan, tezimin her aşamasında verdiği destek ve katkı için, değerli hocam Prof. Dr. Serdar GÜNAYDIN’a,

Çalışmalarım boyunca hem deneysel çalışmalarında hem de çıkmaza düştüğüm her noktada bilgi, tecrübe ve vaktini esirgemeyen, yalnızca bana değil tüm öğrencilere verdiği cömert destekleriyle gönüllere taht kurmuş kıymetli bilim insanı Prof. Dr. Adil DENİZLİ ile bu aşamada yanımda bulunan, hiçbir konuda geri çevirmeyen, güler yüzü ve pozitif tutumuyla beni cesaretlendiren Dr. Ilgım GÖKTÜRK’e ve deneylerimde yardımcı olan Melek ÖZSEVGİÇ’e,

Çalışmalarımın bir basamağı için içtenlikle laboratuvarının kapısını açan ve desteğini esirgemeyen Prof. Dr. Mehmet Ali ONUR’a ve bu aşamadaki değerli destekleri için Dr. Esin AKBAY’a,

Tez konumun temelini oluşturan kalp damar cerrahisi konusundaki sorularım için her zaman arayıp yardım isteyebildiğim, bilgi ve tecrübesinden faydalandığım Uzm. Dr. Eren GÜNERTEM’e,

Yüksek lisansa başlamamın ilk gününden itibaren gerek ders gerekse tez dönemimde bilgi, tecrübe ve dostluklarını esirgemeyen Zeynep KARAHALİLOĞLU ve Eda YALÇIN’a,

Yüksek lisansımın bitmesi yönünde tüm umutlarım tükendiğinde, bir dönem daha uzatma almamız için çaba gösteren ve başaran, tezimin her aşamasında verdiği katkı ve manevi desteği için enstitümüz öğrenci temsilcisi Serhat ERTUĞRUL’a,

Ne zaman motivasyonum düşse yanımda beliren, desteklerini hep hissettiğim Hatice ÖZCAN, Melih YETİŞ, Esra GÜDER ve Korhan BÜYÜKTÜRKOĞLU’na,

Bu stresli dönemde yanımda olan, emek veren, sabır gösteren biricik iş arkadaşlarım Efnan MUCİ, Hakan BÜZKAYA, Burçin ÇAĞAN, Meral GÜLER ve Soner BAY’a,

Hayatımın her alanında ilgi ve sevgilerini derinden hissettiren, her koşulda yanımda olan, varlıklarına şükrettiğim canım ailem; annem Zeliha YAVUZ, babam Hamit YAVUZ, biricik kardeşlerim Zuhale YAVUZ ve Umut YAVUZ’a,

Ne kadar teşekkür etsem az kalır. İyi ki varsınız. İyi ki sizlerle kesişti yolum. Umarım sizleri seven, destek veren, kıymetinizi hak eden insanlar eksik olmaz hayatınızdan. Her şey için sonsuz teşekkürler...

*Züleyha YAVUZ
Haziran 2019, Ankara*

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
ÇİZELGELER	viii
ŞEKİLLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xi
1. GİRİŞ VE GENEL BİLGİLER	1
1.1. Tarihçe	2
1.2. Miyokardın Yapısı	6
1.3. Miyokard Metabolizması	6
1.4. Miyokard Koruması	6
1.4.1. İskemi – Reperfüzyon Hasarı	7
1.4.2. Hipotermi.....	8
1.4.3. Kardiyopleji	9
1.5. Nanoteknoloji	15
1.5.1. Nanoteknolojinin Uygulama Alanları	16
1.5.2. Nanoteknolojinin Avantajları ve Dezavantajları	16
1.5.3. Kalp Korumasında Nanoteknoloji	17
1.5.4. Polimerler	18
1.5.4.1. Miniemülsiyon Yöntemi	20
1.5.4.2. PHEMA	20
2. DENEYSEL ÇALIŞMALAR	22
2.1. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Kimyasallar	22
2.2. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar	22
2.3. Nanopartiküllerinin Hazırlanması	23
2.4. Nanopartiküllerin Karakterizasyonu	24
2.4.1. Zeta Boyut Analizi.....	24
2.4.2. Yüzey Morfolojisi.....	25

2.4.3. Şişme Deneyi	25
2.4.4. Yüzey Alanı Ölçümleri	25
2.4.5. FT-IR Çalışmaları	26
2.4.6. Elementel Analiz	26
2.5. Sulu Çözeltiden Adsorpsiyon Çalışmaları.....	26
2.6. Mitokondriyal Aktivitenin MTT Testi ile Ölçülmesi	28
2.6.1. İstatistiksel Değerlendirme.....	30
3. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	31
3.1. Nanopartiküllerinin Sentezi ve Karakterizasyonu.....	31
3.1.1. Zeta Boyut Analizi	31
3.1.2. Yüzey Morfolojisi	32
3.1.3. Şişme Özellikleri.....	34
3.1.4. Yüzey Alanı Ölçümleri	36
3.1.5. FT-IR Çalışmaları	36
3.1.6. Elementel Analiz.....	38
3.2. Sulu Çözeltiden Adsorpsiyon Çalışmaları.....	38
3.2.1. Farklı Tampon Çözeltilerin Adsorpsiyon Kapasitesine Etkisi.....	40
3.2.2. Başlangıç L-histidin Derişiminin Adsorpsiyon Kapasitesine Etkisi.....	40
3.2.3. Sıcaklığın Adsorpsiyon Kapasitesine Etkisi	42
3.2.4. Adsorpsiyon İzotermi.....	43
3.2.5. Adsorpsiyon Süresinin Adsorpsiyon Kapasitesine Etkisi	45
3.2.6. Termodinamik Hesaplamalar	46
3.2.7. Kinetik Analiz	47
3.3. MTT Testi Çalışmaları.....	50
4. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	62
5. KAYNAKLAR	64
ORİJİNALLİK RAPORU	76
ÖZGEÇMİŞ	77

ÇİZELGELER

Çizelge 1. Miyokard koruma yöntemlerinin gelişim basamakları	4
Çizelge 2. Hipoterminin pozitif ve negatif etkileri	9
Çizelge 3. Ticari olarak hazırlanmış kan içermeyen kardiyoplejik solüsyonlar	11
Çizelge 4. HTK solüsyonu içeriği.....	12
Çizelge 5. Kalibrasyon örneklerinin hazırlanması.....	27
Çizelge 6. MTT plaka düzeni.....	29
Çizelge 7. Şişme kinetiğine ait parametreler	36
Çizelge 8. Farklı adsorbentlerin amino asit adsorpsiyon kapasitelerinin karşılaştırılması.....	42
Çizelge 9. Adsorpsiyon modellerine ait veriler	45
Çizelge 10. Termodinamik parametrelere ait veriler	47
Çizelge 11. Kinetik parametrelere ait veriler	49

ŞEKİLLER

Şekil 1. HUVEC hücre hattında solüsyonların karşılaştırmalı grafiği	14
Şekil 2. HUVEC hücre hattında 24 saatteki floresan mikroskobu görüntüleri	15
Şekil 3. İntramiyokardiyal enjeksiyondan 24 saat sonra kontrol grubu (solda) ve PLGA-QD nanopartiküllerinin (sağda) in vivo görüntüleri	18
Şekil 4. Polimerik nanopartiküllerin sentez yöntemleri	19
Şekil 5. Sürfaktan moleküllerinden oluşan miseller	19
Şekil 6. Eş boyutlu polimer partikülleri.....	20
Şekil 7. Miniemülsiyon süreci	20
Şekil 8. PHEMA polimerinin kimyasal yapısı	21
Şekil 9. Polimerizasyon sistemi.....	23
Şekil 10. a) 30.000 rpm santrifüj sonrası çöken PHEMA nanopartiküller, b) Yıkama işlemi sonrası PHEMA nanopartikül çözeltisi.....	24
Şekil 11. PHEMA nanopartiküllerine ait boyut analizi.....	31
Şekil 12. PHEMAH nanopartiküllerine ait boyut analizi.....	32
Şekil 13. PHEMA nanopartikülleri yüzey morfolojisi	33
Şekil 14. PHEMAH nanopartikülleri yüzey morfolojisi	33
Şekil 15. PHEMA ve PHEMAH nanopartiküllerinin denge şişme yüzdeleri	34
Şekil 16. PHEMA ve PHEMAH nanopartiküllerine ait şişme kinetiği.....	35
Şekil 17. PHEMA nanopartiküllerine ait FT-IR Spektrumu	37
Şekil 18. PHEMAH nanopartiküllerine ait FT-IR Spektrumu	37
Şekil 19. L-histidin kalibrasyon grafiği.....	39
Şekil 20. Farklı tamponların adsorpsiyon kapasitesine etkisi.....	40
Şekil 21. Başlangıç L-histidin derişiminin adsorpsiyon kapasitesine etkisi.....	41
Şekil 25. Sıcaklığın adsorpsiyon kapasitesine etkisi	43
Şekil 22. Langmuir adsorpsiyon modeli.....	44
Şekil 23. Freundlich adsorpsiyon modeli	45
Şekil 24. Adsorpsiyon süresinin adsorpsiyon kapasitesine etkisi.....	46
Şekil 26. $1/T$ 'ye karşı $\ln K$ grafiği.....	47
Şekil 27. Yalancı-birinci derece kinetik grafiği.....	48
Şekil 28. Yalancı-ikinci derece kinetik grafiği.....	49
Şekil 29. Farklı derişimlerde PHEMA içeren DMEM ile HTK'nın karşılaştırılması	51

Şekil 30. HTK'nın farklı hacimleri ile farklı derişimlerde PHEMA içeren HTK'nın karşılaştırılması	54
Şekil 31. PHEMA örneklerine ait mikroskop görüntüleri	54
Şekil 32. HTK'nın farklı hacimleri ile farklı derişimlerde PHEMAH içeren HTK'nın karşılaştırılması	57
Şekil 33. PHEMAH örneklerine ait mikroskop görüntüleri	57
Şekil 34. PHEMA ve PHEMAH içeren HTK solüsyonlarının karşılaştırılması.....	60

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

°C	Celcius ölçeği
g	Gram
mg/L	Litrede miligram
mmol/L	Litrede milimol
mg	Miligram
ml	Mililitre
mg/ml	Mililitrede miligram
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
µm	Mikrometre
M	Molar
nm	Nanometre
π	Pi sayısı
cm	Santimetre
%	Yüzde

Kısaltmalar

ABD: Amerika Birleşik Devletleri

ADP: Adenozin difosfat

AMP: Adenozin monofosfat

APS: Amonyum persülfat

ATP: Adenozin trifosfat

DMEM: Dulbecco'nun modifiye besiyeri

DNA: Deoksiribo nükleik asit

EDTA: Etilen diamin tetraasetik asit

EGDMA: Etilen glikol dimetakrilat

FT-IR: Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi

HEMA: 2-Hidroksietil metakrilat

HTK: Histidin Triptofan Ketoglutarat kardiyopleji solüsyonu

HUVEC: İnsan umbilikal ven endotel hücreleri

MAH: N-metakriloil-(L)-histidin metil ester

MES: 2-(N-morfolin)etan sülfonik asit

MTT: 3-[4,5-dimetil-2-tiazolil]-2,5-difenil tetrazolyum bromid

NK: Negatif kontrol

PBS: Fosfat tamponlu tuz çözeltisi

PHEMA: Poli(2-hidroksietil metakrilat)

PHEMAH: Poli(2-hidroksietil metakrilat)-N-metakriloil-(L)-histidin metil ester

PITC: Fenil izotiyosiyanat

PK: Pozitif kontrol

PVA: Poli vinil alkol

RNA: Ribo nükleik asit

RPM: Bir dakikadaki devir sayısı

SDS: Sodyum dodesil sülfat

SEM: Taramalı elektron mikroskobu

TRIS: Tris(hidroksimetil)aminometan

UV: Ultraviyole

1. GİRİŞ VE GENEL BİLGİLER

Kalp ameliyatlarında kalp, hareketsiz ve kandan yoksun olmalıdır. Hem kardiyak arrest hem de reperfüzyon takibi miyokardiyal hasar ile sonuçlanabilir [1]. Bu nedenle alınan koruyucu ve önleyici tedbirler mekanik ve farmakolojik yöntemlerdir. Mekanik yöntem, prosedürün uzun sürmesi halinde hücresel hasara ve ölüme neden olabilen aortun klemplenmesidir [2, 3]. Farmakolojik yöntem ise kardiyopleji solüsyonları ile sağlanır. Geleneksel kardiyopleji yöntemlerinde kan kardiyoplejisi ve kristaloid kardiyopleji kullanılırken, solüsyonlara eklenen bazı katkı maddeleriyle etkinliğin artırılması hedeflenmektedir [1].

İyi bir kardiyopleji solüsyonundan beklenen; miyokard hücrelerinde yüksek enerjili fosfat bileşiklerinin (Adenozin Trifosfat (ATP) ve fosfokreatin) kullanımının azaltılması amacıyla, hızlı bir diastolik arrest sağlayabilmesidir. Ayrıca miyokardın korunması yönüyle, reperfüzyon hasarını sınırlandırarak geri dönüşümsüz hasarı geciktirebilmelidir. Hiperkalemik çözümler (yüksek potasyum) bu amaca hizmet etmektedir. Hastanın ameliyat sonrası kardiyopulmoner bypasstan güvenli bir şekilde çıkabilmesi için geri döndürülebilir bir kardiyoplejik etki yüksek önem taşımaktadır. Bu süreçte kalbe veya diğer organlara herhangi bir toksik etkisi olmamalıdır. Özellikle iskemi süresinin uzadığı ve yüksek konsantrasyonların kullanıldığı durumlarda toksik etki önemlidir [1].

Uzun yıllardır miyokardiyal korumanın temel taşı olarak bilinen ve kullanılan kardiyopleji solüsyonlarının hazırlanmasında kullanılan içeriğin farklılık göstermesi sonucunda çeşitlilik ve bu alandaki araştırmalar artmıştır [4, 5].

1.1. Tarihçe

İskemiden doğan hasarı azaltmak için 1950'li yıllarda, kalbin elektromekanik aktivitesini durdurma kavramı gündeme gelmiştir. Bu dönemde Melrose solüsyonu kardiyoplejik ajan olarak kullanılmıştır. Kardiyopleji kavramının gelişmesinde öncü olan bilim insanları Spieckman, Hoelscher, Kirsch ve Bretschneider'dır [6].

Amerika Birleşik Devletlerinde, bir süre kardiyoplejik çözümlerin herhangi bir avantajı gözlenemediğinden yöntem terk edilmiş ve uzun yıllar kullanılmamıştır ancak Avrupa'da, Hoelscher Spieckerman [7], Bretschneider ve Kirsch kardiyoplejiye ilişkin araştırmalara devam etmişlerdir [8, 9].

1952'de yapılan ilk açık kalp ameliyatı operasyonunda tüm vücut sistemik hipotermi (~28 °C) altındayken kısa süreli arest uygulanmıştır. O dönemde hipotermimin beyne giden oksijen ihtiyacını azaltan koruyucu bir mekanizma olduğu bilinmektedir [10].

Kardiyopulmoner bypass için bir sonraki gelişme 1954 yılında [11] beyin ve sistemik organlarda meydana gelecek hasarı önlemeye yönelik olmuştur. İskemi süresince ATP'nin kullanımı nedeniyle ortaya çıkan ve devam eden geri dönüşümsüz hızlı kalp kontraktürü olarak "*stone heart*" fenomeni tanımlanmış [12] ve bu sorunu gidermek amacıyla 1955 [13] yılında, kan eklenen yüksek bir potasyum sitrat (77 mmol/L) konsantrasyonunun intrakoroner arter infüzyonu kullanarak "seçici geri dönüşümlü kardiyak arest" kavramını ortaya koymuştur. Şu anda *kardiyopleji* olarak adlandırılan bu farmakolojik arest; hücre membranı depolarizasyonuna neden olmuş, bu da aksiyon potansiyelinin iletilmesini önlemiş ve kardiyak arest ile sonuçlanmıştır. Solüsyonun geri çekilmesiyle kardiyak arestin geri dönüşü kolayca gerçekleştirilebilmiştir. Bununla birlikte yüksek potasyum sitrat solüsyonunun, odaklı miyokardiyal nekrozu tetiklediği ve birçok hastanın ölümüne yol açtığı ortaya çıkmış ve hiperkalemik solüsyonların kullanımı uzun yıllar terk edilmiştir. Bu sürede cerrahlar iskemi sırasında kalbi korumak için sürekli ya da aralıklı olarak normotermik perfüzyon, elektriksel olarak indüklenen ventriküler fibrilasyon veya topikal hipotermi gibi çeşitli teknikler kullanmışlardır [1].

Aortun klempli olduğu dönemde kalbin kanlanabilmesi için koroner sinüs aracılığıyla kanın bir kısmının retrograd olarak dolaşıma verilmesiyle gerçekleştirilen ilk özel yöntem Lillehei ve arkadaşları tarafından 1956'da yayımlanmıştır [14].

1961 yılında yapılan bir çalışmada, aortun klempeli olduğu süre boyunca kalp çevresine buz uygulaması yapılarak kalp soğutulmuş ve düşük sıcaklığın miyokard korumasını destekleyeceği fikri savunulmuştur [15].

1964 yılında Almanya'da Bretschneider tarafından geliştirilen ve HTK (histidin-triptofan-ketoglutarat) solüsyonu olarak bilinen kardiyopleji solüsyonu kullanılarak kardiyoplejik arrest sağlanmıştır. Bu çözelti, sodyumca fakir, kalsiyum içermeyen ve prokain ihtiva eden bir sodyum kanal blokeridir. Kardiyak arrest sağlanırken polarize hücre membranı başarılı şekilde korunmuştur [16, 17]. Sondergaard [18], 1967'de Bretschneider'in solüsyonunun ve 1972'de Kirsch, Rodewald ve meslektaşları [19] ise Kirsch kardiyoplejik solüsyonunun klinik kardiyak cerrahide kullanımını bildirmişlerdir.

1970'lerde miyokardiyal iskeminin patofizyolojisi hakkında daha fazla bilgiye sahip olunması ile iskeminin tahrip edici etkisine karşı miyokardiyal koruma sağlamak için verapamil, nifedipin ve propranolol'ün kullanıldığı farmakolojik müdahale yöntemi geliştirilmiştir [20].

ABD'de ve İngiltere'de 1970'lerin ortasında geliştirilen solüsyonlar, kardiyak cerrahi sırasında iskemik hasarın devam eden etkisine dikkat çekmek amacıyla cerrahi uygulamaya dâhil edilmiştir. Bu solüsyonlar "hücre dışı" iyonik formülasyona dayanmış ve potasyum klorür konsantrasyonları kısmen artırılmıştır [21, 22]. Daha önce yapılan çalışmalarda, hastalarda görülen fokal nekrozun yüksek potasyumdan ziyade yüksek sitrat konsantrasyonlarından kaynaklandığı gösterilse de daha sonra bu teyit edilememiştir [23]. 1970'lerin sonlarına gelindiğinde Clark ve arkadaşları, kalsiyum kanalını bloke eden bir ajan olan nifedipin üzerine çalışmış ve olumlu etkisini kanıtlamışlardır [24, 25].

Roe ve arkadaşları 1973'te [26] Gay ve Ebert ise 1977'de [27] potasyum içerikli kardiyoplejiyi araştırmış ve kısa zamanda soğuk kardiyoplejinin avantajlarını doğrulamışlardır.

David Hearse ve Mark Braimbridge, ekstraselüler içerikli kristaloid kardiyopleji kullanımını önermişlerdir. 1976'da *Circulation* dergisinde yayımlanan çalışmalarında, farklı içerikteki kardiyopleji solüsyonlarını sıçan kalplerinde denemişlerdir [28]. Daha sonra "St. Thomas Hastanesi Kardiyoplejik Solüsyonunu" geliştirilmiştir. Bu solüsyon,

her bir bileşen için plazma konsantrasyonlarına göre karakterize edilerek optimize edilmiştir ve 20 veya 16 mmol/L'lik potasyum konsantrasyonlarında geliştirilmiştir. St. Thomas Hastanesi kardiyoplejik solüsyonu ilk kez 1975 yılında cerrahide uygulanmıştır ve birkaç yıl içinde kristaloid tampon esaslı kardiyoplejinin kullanımı tüm dünyada yaygın kardiyoprotektif teknik olmuştur [29].

Bleese ve arkadaşları, 1979'da, soğuk prokain-magnezyum kardiyoplejisi ve 150 dakikadan fazla miyokardiyal iskemide tutulan 26 hastanın %12'sinde hastane mortalitesini bildirmişlerdir [30].

Buckberg 1979'da optimal kardiyoplejik araç olarak, kan kullanımını tanımlamıştır [31]. Dünyada yaygın olarak kullanılan kristaloid çözeltisi St. Thomas solüsyonu ile kardiyoplejik çözümlerin daha ileri gelişimi, arestin ve koruyucu etkinin sağlanması için kan ile birlikte kullanımı şeklinde olmuştur [32, 33, 34]. Kan kardiyoplejisi günümüzde yaygın olarak kullanılan hiperkalemik kardiyoplejidir [32, 35].

Çizelge 1'de miyokard koruma yöntemlerinin gelişim basamaklarının bir özetine yer verilmiştir [36].

Çizelge 1. Miyokard koruma yöntemlerinin gelişim basamakları

Referans	Yıl	Çalışma
Bigelow WG	1950	Hipotermi çalışmaları yürütüldü.
Swan H.	1953	Operasyon esnasında insanda hipotermik arest uygulamasıyla kansız ortam sağladı.
Melrose DG, Bentall HH	1955	Geri dönüşümlü kimyasal arest kavramını bildirdi.
Lillehei CW	1956	Koroner arter kanülasyonu ile hipotermik kristaloid kardiyopleji metodunu bildirdi.
Lam CR	1957	İlk kez Kardiyopleji terimi kullanıldı.
Gerbode F, Melrose DG	1958	İnsanda kalbi durdurmak için potasyum kullanıldı.
McFarland JA	1960	Miyokardiyal koruma için Melrose tekniğine karşı aralıklı aort oklüzyon veya koroner arter perfüzyon tekniği uygulandı.

Referans	Yıl	Çalışma
Bretschneider HJ	1964	Kalbi durdurmak için düşük sodyumlu, kalsiyum içermeyen ve prokain içeren kardiyopleji solüsyonu geliştirdi.
Sondergaard KT	1964	Klinik çalışmalarda miyokard koruması için Bretschneider kardiyopleji solüsyonu kullanıldı.
Gay WA, Ebert PA	1973	Potasyumlu kardiyopleji ile köpek kalbi 60 dakika boyunca durdurularak hücrel hasar oluşmadığı gösterildi.
Roe BB	1973	Kardiyopleji yöntemlerinin, hipotermi ve kapiller yıkamanın miyokard korumadaki etkinliği gösterildi.
Tyers WA	1974	Hayvanlarda, soğuk kan infüzyonu ile miyokard dokusunu 4°C'de tutarak 90 dakika iskemide kaldığını gösterdi.
Hearse DJ	1975	Farelerde iskemik hasarı reddetmek için preiskemik infüzyonu vurguladı ve St. Thomas No.1 solüsyonunu buldu.
Braimbridge MV	1975	Klinikte ilk defa St. Thomas solüsyonu kullandı.
Effler DB	1976	Oda sıcaklığında basit aortik klemp önerdi.
Buckberg GD	1979	Koroner arter içine potasyum infüzyonu için kanın araç olarak kullanımını tanımladı.
Akins CW	1984	Koroner revaskülarizasyonu için kardiyoplejisiz hipotermik fibrilatuar arest tekniğinden yararlandı.
Murray CE	1986	Reperfüzyon ve iskeminin kısa süreli periyotlarının kalbin uzun süreli iskemik periyoda dayanmasını mümkün kılacağını bildirdi.
Lichtenstein SV, Salerno TA	1991	Sürekli ılık kan kardiyopleji kullanımının klinik yararlarını rapor etti.

1.2. Miyokardın Yapısı

Miyokardın temel kasılabilir birimi olan miyosit hücrelerinin birbirine bağlanmasını ve hücre dışı ortamlarla iletişimi, miyositlerin dışı ile içi arasında yer alan bir bazal membran tarafından sağlanır [37]. Bazal membranın altında miyositleri kuşatan ve miyofibrilleri içeren sarkolemma zarı yer alır. Miyofibriller, aktin ve miyozin adı verilen miyofilamentlerden oluşmaktadır. Kalp kasını oluşturan liflerin aynı anda kasılmasını ve kalbin pompa görevi yapmasını mümkün kılan bu miyofilamentler, sinsizyal yapıyı oluşturan sarkomer denilen bölümlerden meydana gelmiştir [38]. Difüzyon için uygun bir bariyer görevi gören sarkolemma, miyositin kasılması için gereken reseptör, pompa ve kanallara sahip zar proteinlerini içerir. Sitozolik Ca^{+2} yoğunluğunun düzenlenmesi görevini üstlenen sarkoplazmik retikulum, hücre içi membran ağı görevi görür ve taşıma amaçlı özelleşmiş bir organeldir [37].

Miyokard hücrelerinde, hacmin % 25-35'ini oluşturan çok sayıda büyük mitokondri bulunur [39, 40]. Mitokondrilerin sayıca fazla olması, kardiyak kasılma için aerobik solunumun önemini artırmaktadır [38].

1.3. Miyokard Metabolizması

Kalp kasının kasılması ve hücresel aktiviteler için hammaddelerden glikoliz yoluyla dönüştürülen enerji ATP'den elde edilir. Glikoz ile aerobik yolla 36 ATP elde edilirken, anaerobik glikoliz ile 2 ATP elde edilir. Normal durumda, ATP ve sitrat düzeyi glikolizin hızını ayarlar. Miyokard, hipoksi veya iskemi durumunda ihtiyaç duyduğu enerjiyi glikojenden karşılar. Aerobik metabolizmanın yeterli olmadığı durumlarda ise anaerobik glikoliz ile enerji sağlanmaya çalışılır. Anaerobik mekanizmada adenosin monofosfat (AMP) ve laktat birikimi oluşur. Laktat birikimi, enerji sentezini inhibe eder. Normal şartlarda enerji açığı oluştuğunda aktive olan fosfofruktokinaz enzimi iskemik koşullarda işlev göremez ve glikoliz durur. Hücre içinde yıkım hücreleri birikir ve bu durum hipoksi belirtisidir [41].

1.4. Miyokard Koruması

Miyokard dokusunu koruma yöntemleri kalp cerrahisinin öncelikli konularındandır. Kardiyak operasyon geçirmiş hastaların operasyon sonrası dönemdeki hemodinamik durumları ile morbidite ve mortalite oranları, operasyon sırasında uygulanan koruma yöntemleri ile doğrudan ilişkilidir [42]. Kalp cerrahisinde aortik çapraz klemp aracılığıyla

sağlanan iskemi sırasında miyokardiyal koruma stratejilerini uygulamak gerekir. Özellikle ciddi hastalığı olan hastalar ve yaşlılarda daha uzun süreli bir iskemi gerektiğinden miyokard ve endotelin korunması daha fazla önem kazanmaktadır [43]. Operasyon esnasında ve operasyon sonrası süreçte iskemi kaynaklı miyokard işlev bozukluğunun önlenmesine yönelik tedbirler miyokard korumasının temelini oluşturmaktadır. Kardiyak girişimlerde miyokardiyal hasar gelişiminin azaltılması amacıyla kardiyoplejik solüsyonlar kullanılır [44, 45]. Uygun kardiyoplejik solüsyonun seçimi, iskemi-reperfüzyon hasarının önlenmesi ve zararlı etkilerin ortadan kaldırılmasında önemli bir yere sahiptir [46].

Cerrahlar, kardiyak operasyonu gerçekleştirirken kullandıkları yöntemlere göre bir karar verirler. Cerrahın tercihini etkileyen bazı faktörler; aortik klemp süresini etkileyen cerrahi teknikler, hareketsiz ve kandan yoksun bir kalbe sahip olma isteği, kalp cerrahisinin ek karmaşıklığına rağmen miyokardiyal nekrozun olmaması arzusu, ortam koşulları ve maliyetlerdir [6].

Yapılan çalışmalar neticesinde miyokardiyal yönetim açısından birçok farklı ve bazen çelişen çıkarımlar türetilmiştir. Deneysel bir çalışmada, soğuk kardiyoplejinin olgunlaşmamış kalplerde iskemik yaralanmayı azalttığı bulunmuştur [47]. Kardiyoplejik solüsyonların çok dozlu olarak uygulanmasının olgunlaşmamış kalplerdeki dezavantajları ortaya konulmuştur [48]. Yapılan bir çalışmada geleneksel kan kardiyoplejisinin, bebeklerde ve küçük kalp cerrahisinde 4 °C'deki kristaloid St. Thomas çözeltisine oranla miyokardiyal korumadaki üstünlüğü gösterilmiştir [49]. Bazı deneysel çalışmalar ise kardiyoplejinin sıcak indüksiyonunda glutamat ve aspartatın dâhil edilmesinin ek yarar sağladığını göstermiştir [50-52].

1.4.1. İskemi – Reperfüzyon Hasarı

Myokardiyal stunning, apoptoz ya da miyokardiyal nekroz miyokard hasarının göstergeleridir. Bir iskemi periyodu sonrası kas nekrozu olmaksızın birkaç saatten birkaç güne kadar devam edebilen, sistolik-diastolik fonksiyon bozukluğu ile miyokardiyal hücrelerin geçici fonksiyon kaybına uğrama duruma “miyokardiyal stunning” denir. Stuninge uğrayan hücrelerin yapısal hasara uğramamış olması önemlidir [53, 54]. Bir iskemi periyodunun geri dönüşümsüz hasara yol açması durumuna “miyokardiyal nekroz” denir. Bazı araştırmacılar, normotermik iskeminin 20 dakikasından az bir süre sonra subendokartta nekroz gelişebileceğini bildiren bulgular elde etmişlerdir [55, 56].

İskemi süresinin sınırlandırılması ve iskemi sırasında koşulların modifiye edilmesi reperfüzyon hasarının sınırlandırılmasında esastır [54].

‘Özel bir hücre ölüm şekli’ ifadesiyle ortaya atılan apoptoz kavramı; DNA’nın bütünlüğünü kaybetmesi ve protein yıkımı ile oluşan planlı hücre ölümünü ifade eder. Bu mekanizmanın amacı, mitoz bölünme kaynaklı hücre artışını dengelemektir [57, 58]. 1994’te tavşan kalpleri ile yapılan bir çalışmada iskemi sonrası reperfüze edilmiş örneklerde apoptozun bir göstergesi olan DNA fragmentasyonu gösterilmiş olup reperfüze edilmemiş kalplerde ise apoptoz gelişmediği gösterilmiştir [59].

İskemi süresi uzadıkça nekroz riski artar ve reperfüzyon hasarını gösteren durumlar gözlenebilir. Reperfüzyon hasarında rol oynayan etmenler; hücre içi kalsiyum yükünün artışı, serbest oksijen radikalleri, endotelial ve mikrovasküler fonksiyon bozuklukları ile miyokard metabolizmasındaki değişimler olarak sayılabilir [60].

Kardiyoplejiye bağlı iskemi reperfüzyon hasarını göstermek üzere koroner bypass operasyonu geçiren 30 hasta ile yapılmış olan çalışmada, St. Thomas II solüsyonu, Hamburg solüsyonu ve Bretschneider solüsyonu kullanılmıştır. Sağ atrial doku örnekleri; bypass öncesi, kardiyoplejik arest sonrası ve reperfüzyon sonrası incelenmiş olup kardiyoplejik arest ve reperfüzyonu takiben apoptozun arttığı gösterilmiştir [61].

1.4.2. Hipotermi

1950’li yıllarda Bigelow tarafından tanımlanan hipotermi, miyokardiyal korumanın temeli haline gelmiştir. Metabolik hızın düşürülerek miyokardiyal oksijen ihtiyacının azaltılmasını hedefleyen hipotermi uygulaması ile miyokardiyal oksijen tüketimi %97 oranında azaltılmıştır [62].

Çizelge 2’de [63] hipoterminin pozitif ve negatif etkilerine yer verilmiştir.

Çizelge 2. Hipoterminin pozitif ve negatif etkileri

Pozitif Etkiler	Negatif Etkiler
Metabolik hızı azaltır.	Onarım oranını azaltır.
Oksijen gereksinimini azaltır.	İntrasellular hacmi ve Na ⁺ birikmesini artırır.
Hücre-hücre etkileşimlerini geçici olarak azaltır.	Kasılma oranını azaltır, atım başına enerji isteğini artırır.
Degradatif reaksiyonların hızını azaltır.	Ventriküler fibrilasyonu ve aritmileri indükler.
İskemiye toleransı artırır.	Oksijen ayrışmasını bozar.
Arest için gerekli olan K ⁺ değerini azaltır.	Koroner otoregülasyonu bozar.
Elektriksel aktiviteyi azaltır, kardiyopleji süresini uzatır.	Frenik sinir hasarını tetikleyebilir.
Hücre deformasyonunu azaltır.	Eritrositlerin kümelenmesine neden olabilir.
Hücre içi Ca ⁺² birikmesini engeller.	Membran akışkanlığını, membranlar arası taşınımı ve reseptör transdüksiyonunu azaltır.
Nükleer faktör translokasyon oranını azaltır.	Sarkoplazmik retikulumun Ca ⁺² alımını engeller.

1.4.3. Kardiyopleji

Kardiyoplejik arest miyokard koruma stratejilerinden biri olarak güncelliğini korumakta olup altın standart olarak kabul edilir ve hiperkalemik çözelti kullanımını içerir. Arest sağlayan ve depolarize olarak adlandırılan hiperkalemik prensibi, pozitif değerli yeni bir dinlenme membranı oluşturmaktır [1]. Kardiyoplejik arestin miyokardiyal oksijen ve ATP tüketimini büyük ölçüde azalttığı belirtilmiştir [64]. Kardiyopleji solüsyonu, miyokard koruması için diyastolik aresti hızlı sağlamalı ve böylece miyokard hücrelerinin ATP tüketimini azaltmalıdır. Bunun yanında reperfüzyon hasarını en aza indirerek hasarın geri döndürülebilirliği sağlamalıdır. İçeriğindeki maddelerin toksitesi olmamalıdır. Kristoloid kardiyoplejiler bu kriterleri büyük ölçüde karşılamaktadır [65].

Geleneksel yöntem olarak kullanımı halen yaygın olan kan kardiyoplejisinin en uygun uygulama sıcaklığının belirlenmesi için yapılan araştırmalar sonucu üç farklı alternatif tanımlanmıştır:

i- Soğuk kan kardiyoplejisi: Yaklaşık 20 °C olarak uygulanır. Kristaloit kardiyoplejiye göre üstünlüğü gösterilmemiştir. Klinikte kullanımını yaygın değildir [66].

ii- Sıcak kan kardiyoplejisi (normotermik): 37 °C olarak uygulanmaktadır. İlk kez 1990 yılında kullanılmış, sol ventrikül fonksiyonunu soğuk kardiyoplejiye göre daha iyi koruduğu gösterilmiştir. Buna karşılık, bu yöntemin böbrek, beyin gibi organlarda hasara neden olabildiği iddia edilmiştir [38].

iii- Ilık kan kardiyoplejisi: Yaklaşık 29 °C olarak uygulanır. Klinik çalışmalarda sıcak ve soğuk uygulamalara nazaran kalp korumasında daha etkili olduğu belirtilmiştir [67].

Miyokardiyal korumayı artırabilmek için devam eden çalışmalar, klinik operasyonlarda kullanılan kardiyoplejik solüsyonların içeriklerinde düzenlemeler yapılması ve uygulama yöntemlerinin geliştirilmesi gereğini doğurmuştur. Bu amaçla mevcut kardiyopleji içeriklerine ilaveler yapılarak cerrahi operasyon sırasında gelişebilecek miyokard hasarının azaltılması ve kalbin korunması konusundaki başarının artırılması istenmektedir. Bu yöntemlerle kalbin göreceği hasar azaltılmakla birlikte tamamen yok edilememiştir.

Geliştirilecek bir kardiyopleji solüsyonunda operasyon başarısı ve kardiyak koruma açısından gözetilecek mekanizmalar şu şekilde sıralanmıştır:

- **Arest:** Miyokardı rahatlatmak ve ATP'nin hücrel kullanımını en aza indirmek için diyastolik arestin hızlı ve etkili bir şekilde uyarılması,
- **Miyokardiyal koruma:** Global iskeminin neden olduğu geri dönüşümsüz yaralanmanın başlangıcını geciktirmek ve reperfüzyon hasarının derecesini sınırlamak için koruyucu etkiler,
- **Geridöndürülebilirlik:** Kalp fonksiyonunun hızlı bir şekilde yeniden başlatılması için kolayca geri dönüşümlü kardiyoplejik etkiler,
- **Düşük toksisite:** Kardiyopulmoner bypass'ın kesilmesinden sonra diğer organlarda toksik etkisi olmayan kısa bir yarı ömür [68].

Çizelge 3. Ticari olarak hazırlanmış kan içermeyen kardiyoplejik solüsyonlar

İçerik	Plegisol St. Thomas II	CAPS* Buckberg	Bretschneider	ViaSpan UW	Birim
K ⁺	16	60	10	125	mmol/L
Na ⁺	110	**	15	30	mmol/L
Cl ⁻	128	**	50	41,5	mmol/L
Ca ⁺²	1,2	-	-	-	mmol/L
Mg ⁺²	16	-	4	2,5	mmol/L
PO ₄ ⁻²	-	-	-	25	mmol/L
Histidin	-	-	198	-	mmol/L
Triptofan	-	-	2	-	mmol/L
Ketoglutarat	-	-	1	-	mmol/L
Glikoz	-	4	-	-	g/L
Mannitol	-	-	30	-	mmol/L
THAM (0,3 mol)	-	200	-	-	ml
CPD	-	50	-	-	ml
Rafinoz	-	-	-	30	mmol/L
K-	-	-	-	100	mmol/L
Laktobiyonat					
Allopurinol	-	-	-	1	mmol/L
Adenozin	-	-	-	3	mmol/L
Hisroksietil sarç	-	-	-	50	g/L
Glutasyon	-	-	-	5	mmol/L
pH	7,8	7,65	7,1	7,4	
Ozmolarite	280	-350	310	320	mOsm/L
Katkılar***					
NaHCO ₃ ⁻	10	-	25	-	mmol/L
0.46 mol aspartat glutamat****	-	-	250	-	ml
İnsülin	-	-	-	40	birim/L
Deksametazon	-	-	-	16	mmol/L

*Bu formülasyon, iki veya dört parça kan (perfüzyon) çözeltisiyle seyreltmek için tasarlanmıştır.

**Konsantrasyon seyrelmeye göre değişir.

***Ticari olarak hazırlanan solüsyonlara eklenmiştir.

****Sadece sıcak indüksiyon ve reperfüzyon stratejileri içindir.

Çizelge 3'te [6] görüldüğü üzere ticari olarak hazırlanmış ve kardiyak cerrahide yaygın olarak kullanılan birçok farklı kardiyopleji solüsyonu bulunmaktadır. Bu çalışmada kontrol grubu olarak kullanılacak HTK (*Custodiol, Almanya*) solüsyonuna ait içerik Çizelge 4'te [69] verilmiştir.

Çizelge 4. HTK solüsyonu içeriği

Formülasyon içeriği	Miktarı
Na⁺	15 mmol/L
K⁺	9 mmol/L
Mg⁺²	4 mmol/L
Ca⁺²	0,015 mmol/L
Histidin	198 mmol/L *
Triptofan	2 mmol/L
Ketoglutarat	1 mmol/L
Mannitol	30 mmol/L
pH	7,02-1,20

* 180 mmol/L Histidin + 18 mmol/L Histidin-HCl

Custodiol, kompleks kardiyak cerrahide miyokardiyal koruma ve transplant cerrahisinde organ korunmasında kullanılan, tek doz olarak uygulanabilen ve 2-3 saate kadar miyokardiyal koruma sağladığı iddia edilen hücre içi kristalloid kardiyoplejik solüsyondür [8, 70, 71]. Düşük sodyum ve kalsiyum içeriği nedeniyle hücre içi kristalloid kardiyopleji sınıfındadır. Hücre dışı alanda sodyum tükenmesi, miyosit plazma membranının hiperpolarizasyonuna ve bu da diyastolde kardiyak areste neden olur. Potasyum içeriği yüksek olan geleneksel hücre dışı kardiyoplejik solüsyonlar ise membran depolarizasyonu ile aresti sağlarlar [72].

Yüksek bir histidin içeriği, uzun iskemik dönemde anaerobik metabolitlerin birikmesinden kaynaklanan asidozu tamponlar, anaerobik glikolizin etkinliğini artırır; ketoglutarat, reperfüzyon sırasında enerji (ATP) üretimini artırır; Triptofan hücre zarını dengeler ve mannitol hücre zarını ozmotik olarak düzenler, hücrel ödemi azaltır ve serbest radikal süpürücü olarak hareket eder [8]. Custodiol'ün yaygın kullanımına rağmen konvansiyonel kardiyopleji tekniklerine kıyasla etkinlik ve güvenlik çalışmaları yeterince fazla değildir. Tek doz kardiyoplejinin sağladığı miyokardiyal korumanın yeterliliği

konusunda endişeler vardır. Ayrıca düşük sodyum içeriğinin, kardiyoplejik solüsyonun gerekli yüksek hacminin hızlı uygulanmasını takiben hiponatremiye sebebiyet verebileceği endişesini ortaya çıkarmıştır [73, 74]. Kalp ameliyatı için geleneksel (kristalloid veya kan) kardiyoplejiye karşı Custodiol (HTK) kardiyoplejisi kullanımının, eşdeğer veya üstün miyokardiyal koruma ve güvenlik sağladığını iddia eden birçok çalışma yapılmıştır [71].

Liu ve arkadaşları, tek doz HTK solüsyonu ile geleneksel St. Thomas solüsyonunu karşılaştırmış ve geleneksel kardiyoplejiye nazaran 90 dakikadan uzun süren çapraz klemp sürelerine gereksinim duyulduğu karmaşık kalp ameliyatları için Custodiol kullanımının daha düşük mortaliteye sebebiyet verdiğini ortaya koymuştur [75].

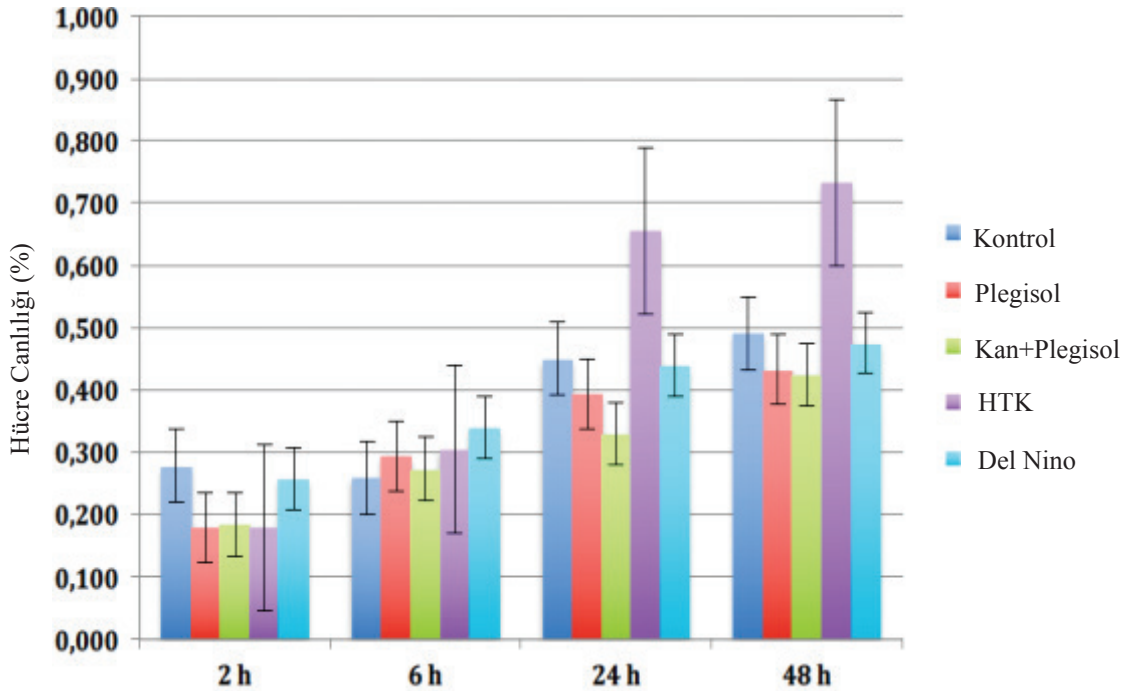
Bir çalışmada, sol ventrikül fonksiyonunun Celsior kardiyoplejisi ile daha iyi korunabileceği ifade edilirken aynı yayında Custodiol tarafından korunan kalplerde daha az miyokardiyal ödem görüldüğü ileri sürülmüştür [76]. Köpek kalplerinde Custodiol ile Celsior'un karşılaştırıldığı başka bir çalışmada 12 saatlik iskemi sonrası; Custodiol ile korunan kalplerin anlamlı olarak daha iyi sol ventrikül fonksiyonuna sahip olduğu, reperfüzyon döneminde sinüs ritminin sağlanması için daha az defibrilasyon gerektiği, sinüs ritmine ulaşıldığında aritmik olaylara daha az eğilimli ve daha iyi miyokardiyal ATP/ADP oranına sahip olduğu gösterilmiştir [77].

Bretschneider HTK solüsyonu ile soğuk kan kardiyoplejisinin karşılaştırıldığı bir çalışmada, gruplar arası anlamlı bir fark gözlenememesine karşın klemp süresinin uzadığı durumda kan kardiyoplejisi grubunda troponin-I düzeyinin daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Miyokard koruması bakımından gözlenen benzer sonuçlara rağmen bu sonuç, uzun süreli operasyonlarda HTK'nın kan kardiyoplejisine üstünlük gösterebileceği yönünde yorumlanmıştır [78].

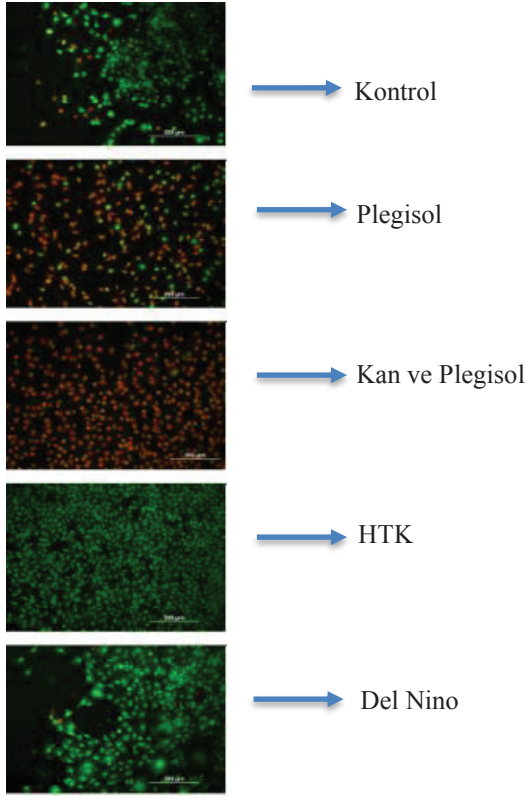
S. Siddiqi ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada, koroner arter bypass operasyonlarında yaygın olarak kullanılan Bretschneider (Custodiol) ve del Nino solüsyonlarının güvenlik yönünden karşılaştırılması yapılmıştır. Çalışma sonundaki mevcut kanıtlar Bretschneider ve del Nino solüsyonlarının rutin operasyonlarda güvenlik ve etkinliği desteklediğini göstermiştir ancak düşük ejeksiyon fraksiyonu, sağ ventrikül disfonksiyonu, akut miyokard infarktüsü, kombine kapak, çok komponentli operasyonlar gibi iskemi veya bypass zamanını uzatabilecek riskli senaryolarda daha yeni

kardiyoprotektif stratejilerin araştırılmasını zorunlu kılmıştır [79]. 2016 yılında Hummel ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, tekrarlayan soğuk kan kardiyoplejisi ile tek doz soğuk Custodiol karşılaştırılmış ve Custodiol alan hastalarda zayıf miyokardiyal korumayı gösteren hiçbir yan etki görülmediği bildirilmiştir. Birçok parametrede maliyet analizi yapılmış olup ortaya konan mali faydalar, Custodiol kardiyoplejik yönetiminin kullanımını destekleyen sonuçlar göstermektedir [71].

S. Günaydın ve arkadaşları tarafından 2018 yılında yapılan bir çalışmada, kan kardiyoplejisi, St. Thomas (Plegisol), HTK ve Del Nino solüsyonları karşılaştırılmıştır. Solüsyonlar ile muamele edilen hücre kültürlerinde MTT testi ile hücre canlılıkları değerlendirilmiş, canlılık seviyeleri için kontrole kıyasla daha iyi olan sonuçlar anlamlı kabul edilmiştir. Hücre kültürlerinin 6. saatinde tüm gruplarda, 24 saat üzerindeki kültürlerde ise yalnızca HTK solüsyonunun hücre canlılığı açısından kontrole göre daha iyi olduğu ortaya konulmuştur [80]. Bu çalışmaya ait HUVEC hücre hattında yapılan MTT testi sonuçları Şekil 1’de, Şekil 2’te ise floresan mikroskobu görüntüleri görülmektedir [80].



Şekil 1. HUVEC hücre hattında solüsyonların karşılaştırmalı grafiği



Şekil 2. HUVEC hücre hattında 24 saatteki floresan mikroskobu görüntüleri

Bahsedilen avantajlarından dolayı bu tezde HTK solüsyonu kontrol grubu olarak kullanılmış olup nanomodifiyeli solüsyonun miyokard korumasındaki başarısı değerlendirilmiştir.

1.5. Nanoteknoloji

Nanometre, metrenin milyarda biri olarak ifade edilen ölçü birimidir ve nanoteknoloji, 100 nm altındaki boyutlarda malzemelerin özelliklerini ve etkileşimlerini inceleyen bilim alanıdır. Bu ölçeklerde malzemelerin özellikleri kuantum ölçeği etkilerinden dolayı makro boyutlarında sahip olduklarından farklıdır. Nanoteknoloji sayesinde manipülasyon, düzenleme, üretim ve kontrol etme yoluyla malzemelerin bu farklı özellikleri avantaja dönüştürülür. Uygulama potansiyeli olan özelliklerin geliştirilmesi, farklı yeni özellikler kazandırılması ile arzulanan tüm özellikleri bünyesinde barındıran yeni ürünlerin üretilebilmesini sağlar [81]. Nanomalzemeler, tedavinin terapötik etkinliğini artıran benzersiz fizikokimyasal özelliklere sahiptir [82-84].

1.5.1. Nanoteknolojinin Uygulama Alanları

Nanoteknolojinin biyoteknoloji, ulusal güvenlik, savunma, gıda, tarım, bilgi teknolojisi, havacılık, plastik ve tekstil endüstrisi, enerji ve çevre temizliği, depolama teknikleri, ekran ve optik teknolojiler, kozmetik, sağlık ve tıp gibi birçok uygulama alanı vardır [85, 86]. Nanomalzemeler, özellikle tanı amaçlı ilaç salımlı sistemler, protezler ve implantlar olmak üzere nanobiyoteknolojide geniş bir kullanım olanağı sunar. Biyolojik sistemlerin çoğu nano ölçekte olduğundan nanomateryaller biyomedikal cihazlara iyi entegre olurlar. Nanoteknoloji ürünlerini geliştirmek için yaygın olarak kullanılan malzemeler inorganik ve metal nanopartiküller, karbon nanotüpler, lipozomlar ve metalik yüzeylerdir. Kimyasal veya fiziksel yöntemler kullanarak antikor-antijen etkileşimi, reseptör-ligand etkileşimi ve DNA-DNA hibridizasyonu gibi spesifik biyolojik reaksiyonlardan yararlanılarak biyospesifik molekülleri nanopartiküller ile konjuge etmek mümkündür. Yüzey kimyası, yüzey fiziği, yüzey termodinamiği ve bunların toksikolojik etkileri, nanomalzemelerin spesifik uygulamasını belirler [87].

Kalp hastalıkları ve diyabet gibi hastalıklar için minimal invaziv tedaviler, bilim insanları için arzu edilen bir hedeftir ve nanoteknoloji bunun için umut vaadeder. Nanoteknolojinin kullanım alanlarına; kardiyovasküler gen tedavisi, nanorobotlar, intrakoronar stentlerin biyouyumluluğunun artırılması, tamamlayıcı DNA zincirinin tespiti, kanser teşhis ve tedavisi, akıllı implantların geliştirilmesi örnek gösterilebilir [88].

1.5.2. Nanoteknolojinin Avantajları ve Dezavantajları

İnsan kan hücresi 10^{-6} m'dir. Ortalama ilaç büyüklüğü ise bundan yaklaşık 10 kat daha büyüktür. Bu durum ilacın etkinliğini azaltmakla birlikte etkin maddenin hedef dışı alanlara dağılımına yol açabilir [89]. Tutulan mikropartiküllerin vücudun her yerine yayılabilmesi riski boyutuna ve homojenliğine bağlıdır [90]. Buna karşılık, nanopartiküller küçük boyutlarından dolayı kan damarlarından geçebilmeleri nedeniyle avantajlıdır [91]. Çalışmalar, nanopartikül boyutunun dolaşım süresi ve atılımı etkilediğini göstermiştir [92-94]. Nanopartiküller; partikül boyutu, yüksek stabilite, düşük toksisite, ilaç hedefleme, hidrofilik-hidrofobik denge ve yüzey özelliklerinin kolayca değiştirilebilmesi özellikleri bakımından avantajlıdır [95]. Nanopartiküllerin düzenleyici otoriteler tarafından 'yeni' olarak değerlendirilmesi, üretim ve sonrasındaki sürecin öngörülememesi, insan ve çevresel toksikolojik etkilerinin araştırılmasına eğilimi zorunlu kılmaktadır [96].

1.5.3. Kalp Korumasında Nanoteknoloji

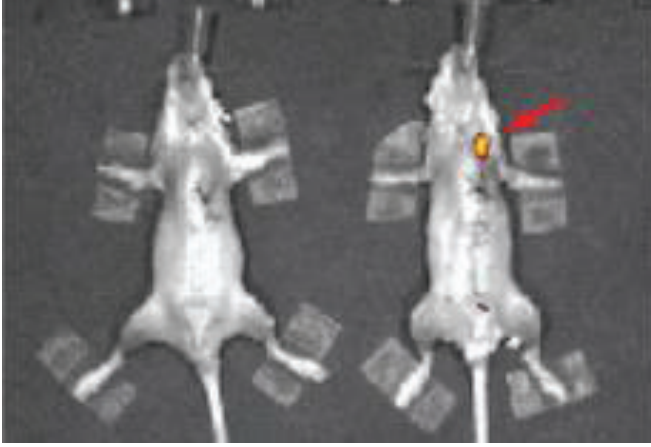
Nanoteknoloji, hem tanı hem de tedavi edici kardiyolojik uygulamalarda kullanım alanına sahiptir. Kardiyovasküler hastalıkların teşhisinde, radyoaktif etiketli nanopolimerler biyospesifik antikörlerle birlikte kullanılabilir. Koroner arter hastalıkları ile ilişkili genler, DNA ile etkileşime girebilen karbon nanotüplerin biyosensör olarak kullanılmasıyla tespit edilebilir. İlaç salımlı stentler, girişimsel kardiyoloji alanında kullanılan ileri teknolojilerden biridir. Bununla birlikte, yapılan yeni çalışmalar bu stentlerin geç dönem trombozu riski ile ilişkili olduğunu göstermiştir. İlaç salımı için nanopartiküllerin kullanımı, daha uzun süreli etki sağlar [97].

Kardiyovasküler hastalıklar tüm dünyada ölüm nedenleri arasında ilk sırada gelir. Miyokard infarktüsü, önemli bir mortalite ve morbidite nedenidir [98]. Enfarktüs tehdidi altında kan ve oksijenin iskemik miyokardiyuma restorasyonu çok önemlidir. Bununla birlikte reperfüzyon, şiddetli iskemik hakaret sırasında ortaya çıkan hücresel hasarı kötüleştiren bir paradokstur [99]. Kalp cerrahisinde uygulanan geleneksel tedaviler, genellikle hastalığı ortadan kaldırmadan sadece semptomatik kontrol sağlamak ve kalp yetmezliğinin ilerlemesini geciktirmek ile sınırlı kalmaktadır. Bu durum, miyokard hasarı için gerçek bir tedavi sunan yeni yöntemler geliştirmeyi zorunlu kılmaktadır [100].

Nanopartiküllerin avantajları kalp damar cerrahisinde de uygulama alanı olarak yerini almaktadır. Yellon ve arkadaşları [98] kalp korumasında çapları 30 ila 100 nm arasında değişen, çift katmanlı, hücre dışı lipit veziküller olan eksozomlara dikkat çekmişlerdir. İdrar ve plazma da dâhil olmak üzere birçok vücut sıvısından izole edilebilen eksozomların; proteinleri, mRNA'yı ve miRNA'yı kan dolaşımına ve diğer vücut sıvılarına salgıladığına ve bazı enzimleri dolaşımları sırasında, immün sistemin radarından koruyabildiğine inanılır [101]. Son veriler, miyokardiyumu iskemi kaynaklı hasardan koruyabildiklerini göstermektedir [99, 102].

Yao ve arkadaşları, insülin benzeri bir büyüme faktörü (IGF-1) ile kompleks poli(D, l-lactide-ko-glikolit) (PLGA) nanopartikülleri (PLGA-IGF-1) sentezlemiş ve miyokard infarktüsü geçirmiş hastalara doğrudan enjekte etmişlerdir. Bu nanopartiküllerin erken kardiyoprotektif etki sağladığı gösterilen çalışmada nanoparçacık tabanlı teknolojinin miyokard infarktüsü tedavisinde yeni bir yaklaşım olmasının yanısıra iskemik kardiyovasküler hastalıklar için bu teknolojinin klinik terapiye dönüştürülmesindeki potansiyelinden bahsetmişlerdir. Bu çalışmada [100] kullanılan nanopartikül boyutunun

100 nm'den küçük olması miyokarda tutulumu sağlayarak kalp korumasını desteklemiştir. Bazı PLGA nanopartiküllerin karaciğere ve dalağa ulaşması beklense de enjeksiyondan 24 saat sonra incelenen farelerde PLGA-QD (Kuantum noktacığı) sinyali tespit edilmediğı ifade edilmiştir (Şekil 3).



Şekil 3. İntramiyokardiyal enjeksiyondan 24 saat sonra kontrol grubu (solda) ve PLGA-QD nanopartiküllerinin (sağda) in vivo görüntüleri

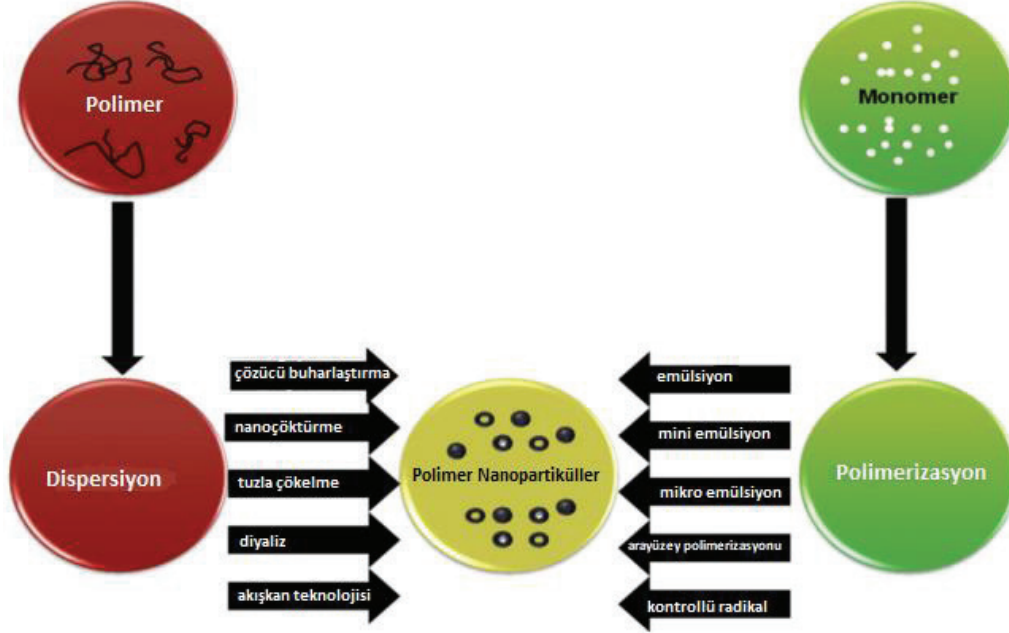
S. Adeli ve arkadaşları, kardiyoplejik bir ajan olan esmolol yüksek dozunun kardiyak mitokondri üzerindeki zararlı etkilerini araştırmak üzere yürüttükleri çalışmada magnezyum manyetik izotop ($^{25}\text{MgPMC16}$) nanopartikülünü kullanmışlardır. Hipoksinin neden olduğu asidotik koşullarda bu parçacık, kardiyomiyositlerde magnezyum içeriğini serbest bırakır ve kardiyak mitokondriyal membran üzerinde spesifik porfirin reseptörleri yoluyla oksijeni tükenmiş hücrelerde ATP üretimini destekler. Çalışma sonucu, $^{25}\text{MgPMC16}$ 'nın mitokondriyal canlılıkta önemli bir artış sağladığını göstermiştir [2].

Nanoteknoloji, kardiyovasküler sistemlerde yüksek biyoyumluluk, biyobozunurluk, kontrol edilebilirlik, özgüllük ve verimlilik gibi özellikleri sebebiyle tedavide özel bir etki sağlayabilir [103].

1.5.4. Polimerler

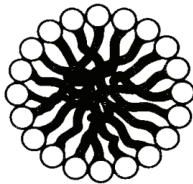
Monomerlerin polimerizasyonu ile hazırlanabilen polimerler [104] boyutları (40-200 nm) ve şekillerinin kontrol edilebilir olması, yüzeylerinin işlevselliğı, görüntüleme, ilaç ve gen dağıtımı, hedefleme yoluyla ilacın terapötik kısımların bağlanması sağlanması gibi birçok avantaja sahiptir [105]. Ön şekillendirilmiş polimerlerden ya da monomerlerin

polimerizasyonu ile direkt olarak hazırlanabilen polimerik nanopartiküller; elektronik, sensör teknolojisi, çevre kirliliği gibi birçok alanda önemli rol almakta ve hızla gelişmektedir [106]. Polimerik nanopartiküllerin sentez yöntemleri Şekil 4'te [106] gösterilmiştir.

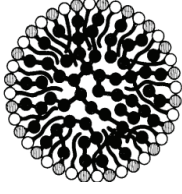


Şekil 4. Polimerik nanopartiküllerin sentez yöntemleri

Çözelti ortamı olarak saf suyun kullanılmasıyla çevre dostu bir kullanım sunan ve ısının iyi bir biçimde dağılmasını sağlayan emülsiyon polimerizasyonu en fazla kullanılan polimerizasyon tekniğidir [107]. Bu yöntemin bileşenleri su, monomer, suda çözünen bir başlatıcı ve surfaktandır. Surfaktanlar, yüzey gerilimini azaltan küresel moleküllerdir. (Şekil 5) [108].



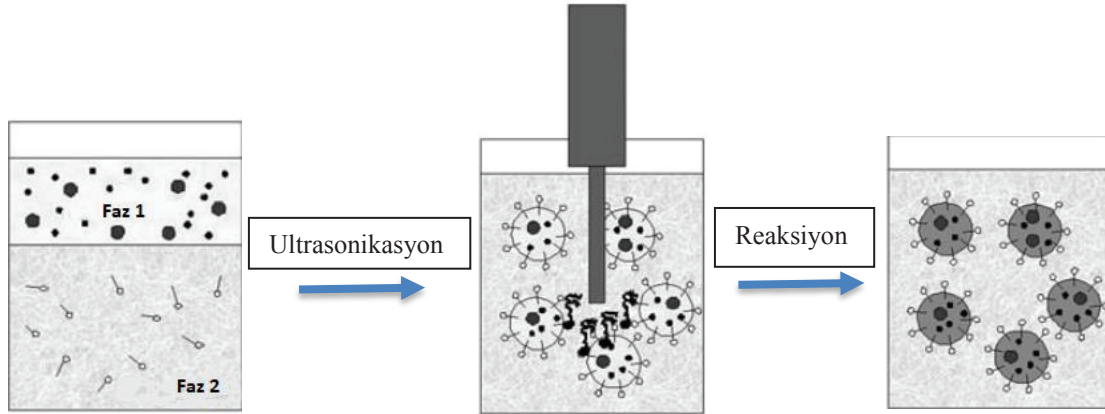
Şekil 5. Surfaktan moleküllerinden oluşan miseller



Şekil 6. Eş boyutlu polimer partikülleri

1.5.4.1. Miniemülsiyon Yöntemi

Nanopartiküllerin sentezi için kullanılan mini emülsiyon yöntemi, arayüzey gerilimi oluşturulan sürekli bir fazda, sabit partiküller oluşturmaya yarayan çok yönlü bir işlemdir. Emülsiyon içinde dağılmış büyük çaplı parçacıklar ultrasonikasyon ya da yüksek basınç altında küçük çaplı (50-500 nm) parçacıklara bölünür. Parçacıkların boyutu parçacığın türüne ve kullanılan emülgatörün miktarına bağlıdır [109]. Miniemülsiyon prensibi Şekil 7’de [109] görülmektedir.

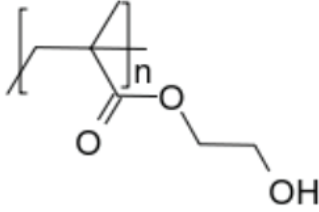


Şekil 7. Miniemülsiyon süreci

1.5.4.2. PHEMA

2-hidroksietil metakrilat (HEMA) iyi bilinen bir vinil monomerdir [110] ve HEMA monomerinin polimerizasyonu ile oluşan PHEMA polimeri; kontakt lens, ilaç salımı, diş ve ortopedik implantlar gibi çeşitli ilaç salım sistemleri ve biyomedikal cihaz bileşenleri olarak kullanılan; biyouyumlu, toksisite göstermeyen, oksijen geçirgenliği yüksek olan, suyun geçişine ve absorpsiyonuna izin veren yapısından dolayı birçok uygulama için ideal bir adsorbent veya taşıyıcı sistem adayıdır. Yüzeyindeki hidroksil fonksiyonel gruplar sayesinde protein biyo-konjügasyonunda kullanılabilir [111]. PHEMA hava ile

temas ettiğinde polar yan grupları yığın yapının içine yönelirken polar olmayan metil grupları yüzeye yönelerek hidrofobik konformasyona sebep olur. Sulu ortamda polar etilen glikol grupları yüzeye yönelirken yüzeydeki metil gruplarıyla bir arada bulunarak hidrofilik konformasyona sebep olur [112]. PHEMA polimerinin kimyasal yapısı Şekil 8’de [113] görülmektedir.



Şekil 8. PHEMA polimerinin kimyasal yapısı

PHEMA'nın polar hidroksil ve karboksil gruplarının varlığı polimeri suyla uyumlu hale getirir. Hidrofobik α -metil grupları hidrolitik stabilite kazandırır ve bu sayede polimer matriksinin mukavemetini artırır [115]. Sitotoksik bir antibiyotik olan dokсорubisinin yan etkilerini azaltmak, daha yüksek bir tedavi etkinliği sağlamak amacıyla yapılan bir çalışmada yüksek su içeriği, düşük toksisite ve doku uyumu sebebiyle PHEMA nanopartikülleri kullanılmış ve dokсорubisin salımı için potansiyel taşıdığı gösterilmiştir [116].

Kardiyovasküler uygulamalarda da PHEMA kullanımını destekleyen çalışmalar yapılmıştır. Kalp dokusu rejenerasyonu için doğal doku ortamını taklit eden biyoaktif, biyoyumlu PHEMA hidrojelinin kullanıldığı *in-vivo* çalışmaların [117] tarihi oldukça eskiye dayanmaktadır. Farklı konsantrasyonlarda rozet nanotüpleri ile PHEMA kompozitlerinde kardiyomiyosit yapışması ve proliferasyonunun incelendiği bir çalışmada [118] nanotüplerin PHEMA kompozitlerine eklendiğinde kardiyomiyositlerin yapışmasını ve çoğalmasını desteklediği gösterilmiştir. Bu tezde PHEMA nanopartikülleri sentezlenmiş ve kardiyovasküler cerrahide kullanılan kardiyopleji solüsyonundan beklenen faydanın artırılması hedeflenmiştir.

2. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

2.1. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Kimyasallar

2-hidroksietil metakrilat (HEMA), poli vinil alkol (PVA, ortalama molekül ağırlığı 30.000-70.000), sodyum bikarbonat, sodyum dodesil sülfat (SDS), amonyum persülfat (APS), sodyum bisülfat, etil alkol (% 96), amonyum molibdat, glasiyel asetik asit ve Potasyum Bromür Merck (IR Grade, Almanya); 3-[4,5-dimetil-2-tiazolil]-2,5-difenil tetrazolyum bromid (MTT) fenil izotiyosiyanat (PITC), Asetonitril, Sodyum Asetat Trihidrat ve Trietilamin Sigma Aldrich firmasından; N-metakriloil-(L)-histidin metil ester (MAH) Nanoreg firmasından; etilen glikol dimetakrilat (EGDMA) Fluka AG, (İsviçre), Histidin Triptofan Ketoglutarat (HTK) kardiyopleji solüsyonu Custodiol (Almanya); Dulbecco'nun modifiye besiyeri (DMEM) Gibco firmasından; İnsan Umbilikal Ven Endotel Hücreleri (HUVEC) ATCC, tripsin EDTA Wisent Bioproducts, Metanol JT Baker firmasından sağlanmış olup deneysel çalışmalar Hacettepe Üniversitesi, Kimya Bölümü, Biyokimya Laboratuvarı ile Biyoloji Bölümü, Genel Biyoloji Anabilim Dalı, Hücre Kültürü Laboratuvarında yürütülmüş olup kullanılan kimyasallar bu laboratuvarlardan temin edilmiştir.

2.2. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar

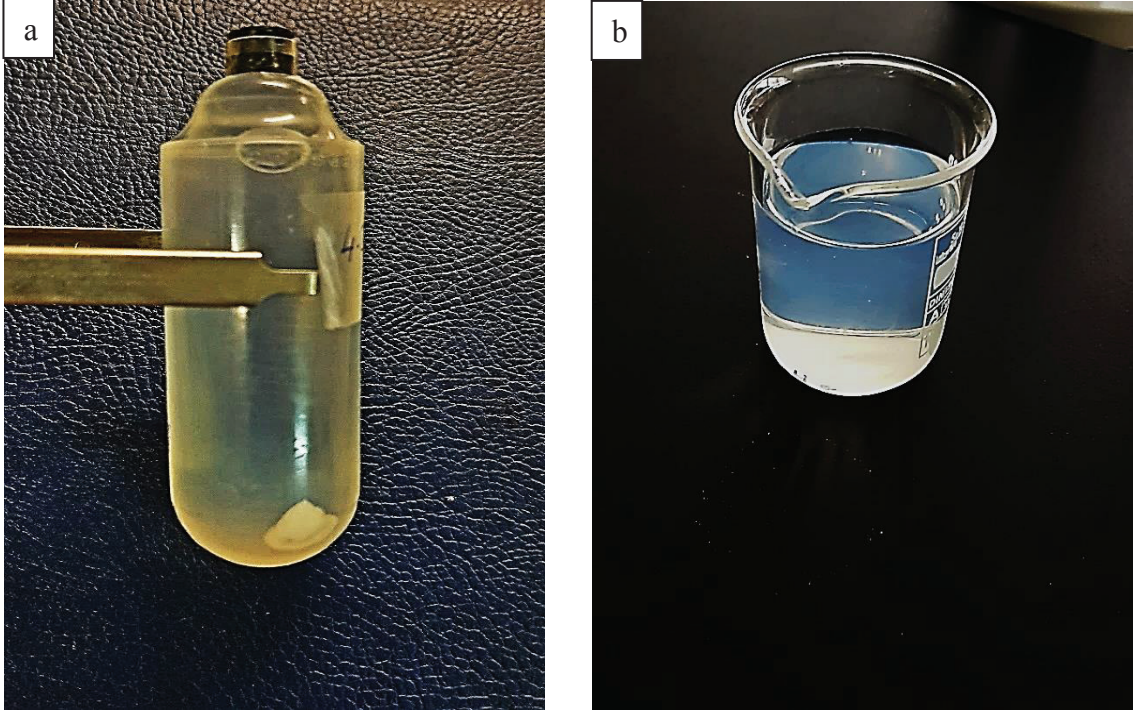
Ultra santrifüj Allegra-64R (Beckman Coulter, ABD), polimerizasyon cihazı Carousel Radleys, boyut analizi cihazı Nano Zetasizer NanoS (Malvern Instruments, Londra, İngiltere), taramalı elektron mikroskobu FIB-SEM (Tescan GAIA 3), ultrasonikatör Branson 220, UV spektrofotometre Shimadzu (Japonya), Fourier transform infrared (FTIR) spektrofotometresi FTIR 8000 Series (Shimadzu, Japonya), elemental analiz cihazı Leco (CHNS-932, ABD), liyofilizatör Christ Alpha (1-2 LD Pus, Almanya), inverted mikroskop Olympus (IX70, Japonya), su banyosu GFL, etüv Edmund Bühler GmbH, eliza okuyucu (μ QuantTM, Biotek[®] Instruments Inc, ABD), Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) Dionex UltiMate 3000, HPLC Analitik Kolonu, Inertsil (ODS4V C-18 5 μ m, 250x4,6 mm) firmasından sağlanmış olup deneysel çalışmalar Hacettepe Üniversitesi, Kimya Bölümü, Biyokimya Laboratuvarı ile Biyoloji Bölümü, Genel Biyoloji Anabilim Dalı, Hücre Kültürü Laboratuvarında yürütülmüş olup kullanılan cihazlar bu laboratuvarlardan temin edilmiştir.

2.3. Nanopartiküllerinin Hazırlanması

PHEMA nanopartikülleri aşağıdaki reçeteye göre hazırlanmıştır [119]. İkili sıvı faz karışımında gerçekleştirilen polimerizasyonda PVA (0,375 g), SDS (57,7 mg) ve sodyum bikarbonat (46,9 mg)'in sulu çözeltisi (20 ml) birinci sıvı fazı oluştururken; PVA (0,2 g) ve SDS (0,2 g)'in sulu çözeltisi (400 ml) , ikinci sıvı fazı oluşturmuştur. Monomer fazı; HEMA (0,8 ml) ve EGDMA (4,2 ml) monomerlerinden oluşmaktadır. Hazırlanan monomer fazı, birinci sıvı faza eklenmiştir. Oluşan çözelti manyetik karıştırıcı ile 24 saat karıştırılmıştır. Daha sonra karışım, cam polimerizasyon reaktörüne aktarılmıştır. Reaktör mekanik olarak karıştırılmış (400 rpm) ve 40°C'de ısıtılmıştır. Son olarak organik başlatıcılar sodyum bisülfid (0,230 g) ve APS (0,252 g) reaktörde yer alan karışıma eklenmiştir. Polimerizasyon 40°C'de 24 saat süreyle devam ettirilmiştir (Şekil 9). Sentezlenen nanopartiküller, 8500 rpm'de 30 dakika santrifüjlenerek boyutu büyük olan partiküllerden uzaklaştırılmıştır. Süpernatant, bir sonraki basamak için 4°C'de muhafaza edilmiştir. Elde edilen nanopartiküller 3 kez etil alkol, 3 kez deiyonize su ile yıkanarak reaksiyona girmeyen kimyasallardan uzaklaştırılmıştır. Her bir yıkama basamağı için nanopartikül çözeltisi 30.000 rpm'de 45 dakika santrifüjlenmiş (Şekil 10a) ve sonikatör yardımıyla partiküllerin homojen olarak dağılması sağlanmıştır. Yıkama işleminden sonra, çözeltide reaksiyona girmeyen kimyasal kalmadığı görülünceye kadar UV Spektrofotometre kullanılarak kontrol edilmiştir. Yıkama işleminden sonra (Şekil 10b) nanopartiküller liyofilizatörde kurutulup tekrar kullanılana kadar +4 °C'de saklanmıştır.



Şekil 9. Polimerizasyon sistemi



Şekil 10. a) 30.000 rpm santrifüj sonrası çöken PHEMA nanopartiküller, **b)** Yıkama işlemi sonrası PHEMA nanopartikül çözeltisi

Poli(2-hidroksietil metakrilat)-N-metakriloil-(L)-histidin metil ester (PHEMAH) nanopartiküllerinin sentezi için monomer fazında HEMA ve EGDMA'ya ek olarak fonksiyonel bir monomer olan N-metakriloil-(L)-histidin metil ester (MAH) eklenmiş ve elde edilen nanopartikül koloidal çözeltisi kullanılmaya kadar +4 °C'de saklanmıştır.

2.4. Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

2.4.1. Zeta Boyut Analizi

Sentezlenen nanopartiküllerin boyutları, Nano Zetasizer ile analiz edilmiştir. Zeta boyut analizi, ışık saçılması tekniği kullanılarak hidrodinamik boyut, zeta potansiyeli ve molekül ağırlığı tayinine imkân sağlayan bir sistemdir. Zeta boyut analizi için (25 °C'de, ışık saçılması geliş açısı 90°, deiyonize suyun yoğunluğu 0.88 46 mPas ve kırılma indeksi 1.33) 3 ml nanopartikül çözeltisi örnek yuvasına yerleştirilmiştir. Ölçümler 3 kez tekrarlanmış ve zeta boyut analizörünün yazılımından elde edilen veriler kaydedilmiştir.

2.4.2. Yüzey Morfolojisi

Hazırlanan polimerik nanopartiküllerin yüzey özelliklerinin incelenmesi amacıyla taramalı elektron mikroskobu (FIB-SEM Tescan GAIA 3) kullanılmıştır. Örnekler, liyofilizatörde (25 °C) kurutulduktan sonra, örnek haznesi içine yerleştirilmiş ve vakum altında altın tabaka ile kaplanarak taramalı elektron mikroskobunda görüntüleri alınmıştır.

2.4.3. Şişme Deneyi

Belirli bir miktarda tartılan liyofilize haldeki partiküller tek tarafı kapalı kapiller bir boru içine konulmuş ve üzerine bilinen bir hacimde deiyonize su eklenmiştir. 2 mm iç çapa sahip kapiller borunun ilk yüksekliği kaydedilmiştir. Oda sıcaklığında şişmesi için bekletilen partiküller belirli zaman aralıklarında kontrol edilmiş ve denge oranına ulaştığında final yükseklik kaydedilmiştir. Partiküllerin şişme oranı yüzdesi Eşitlik 2.1 aracılığıyla hesaplanmıştır [115]:

$$\text{Şişme Oranı Yüzdesi} = [(W_s - W_o) / W_o] \times 100 \quad (2.1)$$

Bu eşitlikte W_o : partiküllerin kuru ağırlığını (g) W_s : partiküllerin şiştikten sonra hesaplanan ağırlığını (g) ifade etmektedir.

2.4.4. Yüzey Alanı Ölçümleri

Nanopartiküller geniş yüzey/hacim oranı sebebiyle yüksek adsorpsiyon kapasitesine sahiptir. Sentezlenen nanopartiküllerin geniş yüzey alanına sahip olması taşıyıcı olarak kullanımlarındaki potansiyelini artırmaktadır [123]. PHEMA nanopartiküllerine ait yüzey alanı Eşitlik 2.2 kullanılarak hesaplanmıştır:

$$N = \frac{6.10^{10} \cdot S}{\pi \cdot p_x \cdot d^3} \quad (2.2)$$

Bu formülde;

N: ml başına düşen partikül sayısını, S: katı yüzdesini, p_x : bulk polimer yoğunluğunu (g/ml) ve d: nanopartikül çapını (μm) ifade etmektedir.

2.4.5. FT-IR Çalışmaları

PHEMA ve PHEMAH polimerik nanopartiküllerinin FTIR spektrumu verileri, FTIR spektrofotometresi yardımıyla sağlanmıştır. Hazırlık aşamasında 0,01 g örnek ve 0,09 g potasyum bromür (KBr) örnekleri pellet haline getirilmiş ve FTIR spektrumları alınmıştır.

2.4.6. Elementel Analiz

PHEMAH nanopartiküller (0,5 mg) MAH içeriğinin analizi için elementel analiz cihazının alüminyum hücreesine yerleştirilerek tartılmıştır (± 0.0001 g duyarlılık). Cihaza yerleştirilen örneğin yakma işlemi sonucunda karbon, hidrojen ve azot miktarları bulunmuştur. Oksijen miktarı ise kütle farkından hesaplanmıştır.

2.5. Sulu Çözeltiden Adsorpsiyon Çalışmaları

Bu çalışmada PHEMAH polimerik nanopartiküllerinden L-histidin adsorpsiyonu için Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) yöntemi kullanılmış olup farklı tampon çözeltilerin etkisi, başlangıç L-histidin derişimi, adsorpsiyon süresi ve sıcaklığın adsorpsiyon üzerindeki etkisi parametrelerinde değerlendirmeler yapılmıştır. Histidin derişiminin hesaplanması için valide edilmiş bir HPLC metodu (kolon: Inertsil ODS 4V, akış hızı: 0,9 ml/dak, dalga boyu: 254 nm, kolon sıcaklığı 40 °C, örnek uygulama hacmi 20 µl, elüsyon süresi: 45 dak) kullanılmıştır.

İki farklı hareketli faz hazırlanmıştır. Hareketli faz A için; 19 g sodyum asetat trihidrat hassas olarak 1000 ml'lik balon jojeye tartılıp 500 ml ultra saf su ile çözülmüştür. Üzerine 0,5 ml glasiyel asetik asit ilave edilip birkaç dakika karıştırıldıktan sonra 0,5 ml trietilamin ilave edilmiştir. Çözelti karıştırılmaya devam edilirken 500 ml ultra saf su ilave edilmiş ve bu çözeltinin pH'sı glasiyel asetik asit ile 6,40'a ayarlanmıştır. Vakum pompası yardımıyla 0,22 µm'lik filtreden süzölmüş ve ultrasonik banyoda gazlarından arındırılmıştır. Hareketli faz B için; Ultra saf su:asetonitril (400:600) (h/h) karışımı hazırlanarak vakum pompası yardımıyla 0,22 µm'lik filtreden süzölmüş ve ultrasonik banyoda gazlarından arındırılmıştır.

Stok standart histidin çözeltisi hazırlamak için 100 mg L-histidin referans maddesi balon jojeye alınarak 100 ml saf su eklenmiştir (final derişim: 1000 µg/ml). Çözünme işlemini hızlandırmak için ultrasonik banyo ve mekanik karıştırma işlemi uygulanmıştır.

Stok standart çözeltilerden ultra saf su kullanılarak aşağıda verilen Çizelge 5'teki seyreltmeler yapılarak sırası ile 10, 25, 50, 75 ve 100 µg/ml'lik kalibrasyon çözeltileri hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltiler 0,22 µm enjektör filtresinden süzülerek türevlendirmeye hazır hale getirilmiştir.

Çizelge 5. Kalibrasyon örneklerinin hazırlanması

NO	Stok Standart Çözeltilerden Alınan Hacim (ml)	Dilüsyon Hacmi (ml)	Final Derişim (µg/ml)
1	1	100	10
2	5	200	25
3	1	20	50
4	7,5	100	75
5	2	20	100

Türevlendirme işlemi için standart ve numune solüsyonlarından 1'er ml deney tüplerine alınmıştır. Üzerine sırasıyla 4 ml metanol, 0,5 ml trietilamin, 0,5 ml distile su ve 25 µl fenil izotiyosiyanat (PITC) eklenip vortex yardımı ile karıştırıldıktan sonra 15 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Oluşan türev çözeltileri HPLC vialine aktarılmıştır.

Numune çözeltileri her bir numune üç tekrar olacak şekilde hazırlanmış olup her birine 5 mg partikül eklenmiştir (n=3). Fosfat, MES (2-(N-morfolin)etan sülfonik asit) ve Tris (Tris(hidroksimetil)aminometan) tamponları ile hazırlanan örneklerin başlangıç L-histidin konsantrasyonu 1 mg/ml'dir (25 °C'de). Ayrıca sıcaklığın adsorpsiyon üzerindeki etkisinin gözlenmesi amacıyla Tris tamponu ile hazırlanan örnekler 4, 25, 32 ve 37,5 °C'lerde 1 saat boyunca inkübe edildikten sonra ultasantrifüj ile 30.000 rpm'de nanopartiküllerin çöktürülmesi sağlanmıştır. Süpernatanttan alınan numuneler 200 kat seyreltikten sonra HPLC analizi için hazır hale getirilmiştir.

2.6. Mitokondriyal Aktivitenin MTT Testi ile Ölçülmesi

Miyokard korumasında farklı solüsyonların başarı oranlarının yorumlanması amacıyla MTT Testi ile hücre canlılığı değerlendirilmiştir. Bu kapsamda, klinik uygulamalarda yaygın olarak kullanılan Custodiol (HTK) solüsyonu, PHEMA ve PHEMAH içeren HTK solüsyonları kullanılmış ve karşılaştırmalı olarak başarı durumları değerlendirilmiştir. Her bir örnekten n=6 olacak şekilde 3 (üç) set olarak çalışma yapılmıştır. Solüsyonlar, İnsan Umbilikal Ven Endotel Hücreleri (HUVEC) ile hazırlanan hücre kültürü ile in vitro ortamda denenmiştir.

Suda çözünür ve sarı renkte olan MTT, canlı hücrelerde metabolik olarak mavi-mor renkte suda çözünmeyen formazana indirgenir. Formazanın alkolde çözüldükten sonra spektrofotometrik ölçümlerle tayin edilen renk yoğunluğu, canlı hücre sayısı ile doğru orantılıdır. MTT test protokolü [120, 121] hücrelerin hazırlanışı, özütlerin hazırlanması ve hücreler üzerine uygulanması ile absorbans ölçümü olmak üzere 3 aşamada gerçekleştirilmiştir.

1. Aşama: Hücreler kültür kaplarından enzimatik (tripsin/EDTA) yolla kaldırılarak hücre süspansiyonu santrifüj edilmiştir (800 g, 5 dakika). Daha sonra hücreler kültür vasatı içinde hücre yoğunluğu 2×10^4 hücre/ml olacak şekilde süspansiyon edilmiştir. Çok kanallı bir pipet kullanılarak, 96 kuyucuklu hücre kaplarına, hazırlanan hücre süspansiyonundan 100 µl ekim yapıldı. Hücreler %70-90 konflue bir katman oluşturana kadar 24 saat boyunca inkübe edilmiştir (%5-7 CO₂, 37±1 °C, > %80-90 nem). Bu inkübasyon periyodu; hücrelerin toparlanmasını, yapışmasını ve üssel çoğalma fazına doğru gelişmesini sağlar. Hücre çoğalmasının plakada nispeten eşit yayıldığını kontrol etmek için hücre kültür kabının tüm kuyucukları inverted mikroskobunda incelenmiştir.

2. Aşama: 24 saatlik inkübasyondan sonra, uygulanan deney protokolünden önce, tüm hücre tipleri PBS ile yıkanarak ekimi yapılacak numuneler şu şekilde hazırlanmıştır: Nanopartikülleri içeren kardiyopleji solüsyonunda hücre canlılığını korumanın yanı sıra hacimsel olarak azalma sağlanıp sağlanamayacağını gözlemek amacıyla her bir hacim için (100, 200 ve 300 µl) üç farklı derişimde (10 µg/ml, 30 µg/ml ve 60 µg/ml [122]) nanopartikül içeren örnekler karşılaştırılmıştır. MTT plaka düzeni Çizelge 6a ve 6b'de gösterilmiştir.

Çizelge 6a. MTT plaka düzeni – 1*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	NK (200 µl)	50 µl HTK	100 µl HTK	150 µl HTK	200 µl HTK	300 µl HTK	10 µg /100µl	30 µg /100µl	60 µg /100µl	10 µg /200µl	30 µg /200µl	60 µg /200µl
B	NK (200 µl)	50 µl HTK	100 µl HTK	150 µl HTK	200 µl HTK	300 µl HTK	10 µg /100µl	30 µg /100µl	60 µg /100µl	10 µg /200µl	30 µg /200µl	60 µg /200µl
C	NK (200 µl)	50 µl HTK	100 µl HTK	150 µl HTK	200 µl HTK	300 µl HTK	10 µg /100µl	30 µg /100µl	60 µg /100µl	10 µg /200µl	30 µg /200µl	60 µg /200µl
D	NK (200 µl)	50 µl HTK	100 µl kp	150 µl HTK	200 µl HTK	300 µl HTK	10 µg /100µl	30 µg /100µl	60 µg /100µl	10 µg /200µl	30 µg /200µl	60 µg /200µl
E	NK (200 µl)	50 µl HTK	100 µl kp	150 µl HTK	200 µl HTK	300 µl HTK	10 µg /100µl	30 µg /100µl	60 µg /100µl	10 µg /200µl	30 µg /200µl	60 µg /200µl
F	NK (200 µl)	50 µl HTK	100 µl kp	150 µl HTK	200 µl HTK	300 µl HTK	10 µg /100µl	30 µg /100µl	60 µg /100µl	10 µg /200µl	30 µg /200µl	60 µg /200µl
G	10 µg /300µl	10 µg /300µl	10 µg /300µl	10 µg /300µl	10 µg /300µl	10 µg /300µl	60 µg /300µl	60 µg /300µl	60 µg /300µl	60 µg /300µl	60 µg /300µl	60 µg /300µl
H	30 µg /300µl	30 µg /300µl	30 µg /300µl	30 µg /300µl	30 µg /300µl	30 µg /300µl	PK	PK	PK	PK	PK	PK

*PHEMA ve PHEMAH numunelerinin ayrı plakalarda aynı düzen ve miktarlarda ekimleri yapılmıştır.

Çizelge 6b. MTT plaka düzeni – 2*

	1	2	3	4	5	6	7	12
A	NK (200 µl)	Phema (10 µg) + 200 µl dmem	Phema (30 µg) + 200 µl dmem	Phema (60 µg) + 200 µl dmem	-	-	-	PK
B	NK (200 µl)	Phema (10 µg) + 200 µl dmem	Phema (30 µg) + 200 µl dmem	Phema (60 µg) + 200 µl dmem	-	-	-	PK
C	NK (200 µl)	Phema (10 µg) + 200 µl dmem	Phema (30 µg) + 200 µl dmem	Phema (60 µg) + 200 µl dmem	-	-	-	PK
D	NK (200 µl)	Phema (10 µg) + 200 µl dmem	Phema (30 µg) + 200 µl dmem	Phema (60 µg) + 200 µl dmem	-	-	-	PK
E	NK (200 µl)	Phema (10 µg) + 200 µl dmem	Phema (30 µg) + 200 µl dmem	Phema (60 µg) + 200 µl dmem	-	-	-	PK
F	NK (200 µl)	Phema (10 µg) + 200 µl dmem	Phema (30 µg) + 200 µl dmem	Phema (60 µg) + 200 µl dmem	-	-	-	PK
G	-	-	-	-	-	-	-	-
H	-	-	-	-	-	-	-	-

*NK: Negatif kontrol (DMEM besiyeri)

PK: Pozitif kontrol (amonyum molibdat, 10 mmol/L + % 10 DMEM içinde)

HTK: Kardiyopleji solüsyonu

µg: Solüsyondaki mililitredeki nanopartikül derişimini ifade etmektedir.

µl: Solüsyondaki HTK hacmini ifade etmektedir.

3. Aşama: Kontrol kültürü ortamı, PHEMA+HTK, PHEMAH+HTK ve PHEMA+DMEM çözeltileri ile hazırlanan plakalar 34 °C sıcaklıktaki su banyosunda 2 saat inkübe edilmiştir. Kalp ameliyatlarında yaklaşık 34 °C'de 2 saat boyunca kardiyopleji solüsyonu verilmesi nedeniyle 2 saat inkübasyonun sonunda kardiyopleji solüsyonu çekilerek tüm gruplar, PBS ile yıkanmış ve DMEM F12 besiyeri ile 2 ve 24 saat inkübe edilmiştir (37 °C, % 5 CO₂). Hücre canlılığını 0. saatte, 2. ve 24. saatlerde gözlemek üzere standart MTT prosedürü uygulanmıştır. İnkübasyondan sonra kültür kaplarındaki hücreler mikroskopla incelendikten sonra her kuyucuktaki kültür vasatı dikkatli bir şekilde çekilmiştir. Her kuyucuğa 100 µl MTT çözeltisi (%10 DMEM içinde) çözeltisi eklenerek kaplar 37 °C'de yaklaşık 4 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra MTT çözeltisi çekilerek her kuyucuğa 100 µl izopropanol eklenmiş ve 570 nm filtreye sahip bir mikropilaka okuyucuya (µQuant™, Biotek® Instruments Inc, ABD) yerleştirilerek absorbans değerleri (O.D.) okunmuştur.

2.6.1. İstatistiksel Değerlendirme

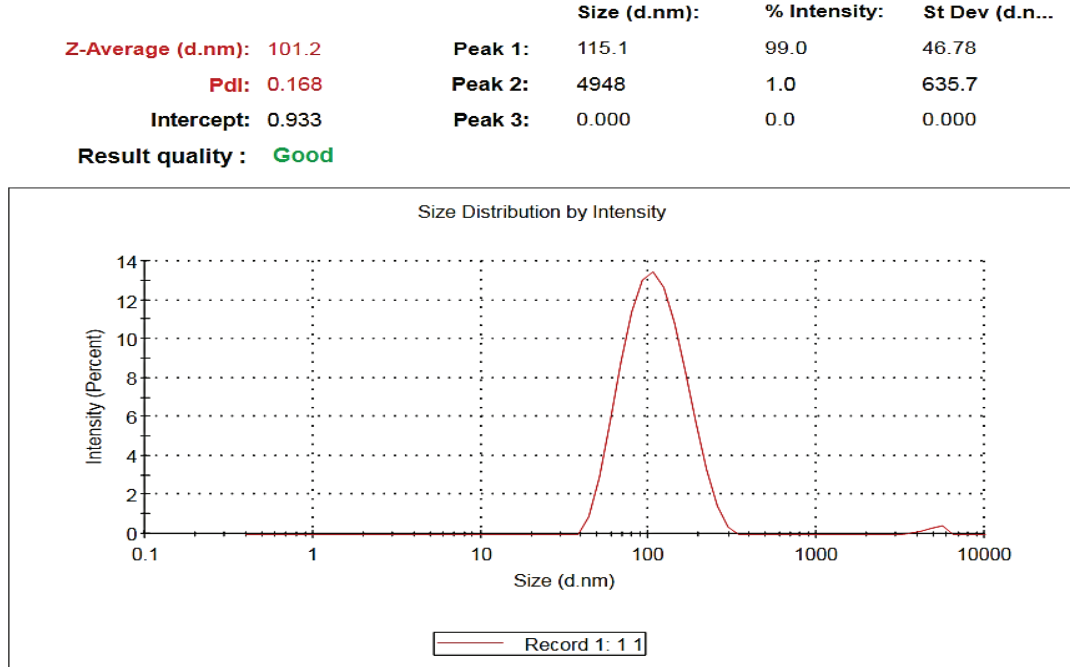
Gruplar arası ortalamalar İki Yönlü Varyans Analizi (Two-Way Anova) kullanılarak karşılaştırılmıştır. P değerinin 0,05'in altında olması istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Tüm veri analizleri Graphpad Prism 8 istatistik yazılımı kullanılarak hesaplanmıştır.

3. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

3.1. Nanopartiküllerinin Sentezi ve Karakterizasyonu

3.1.1. Zeta Boyut Analizi

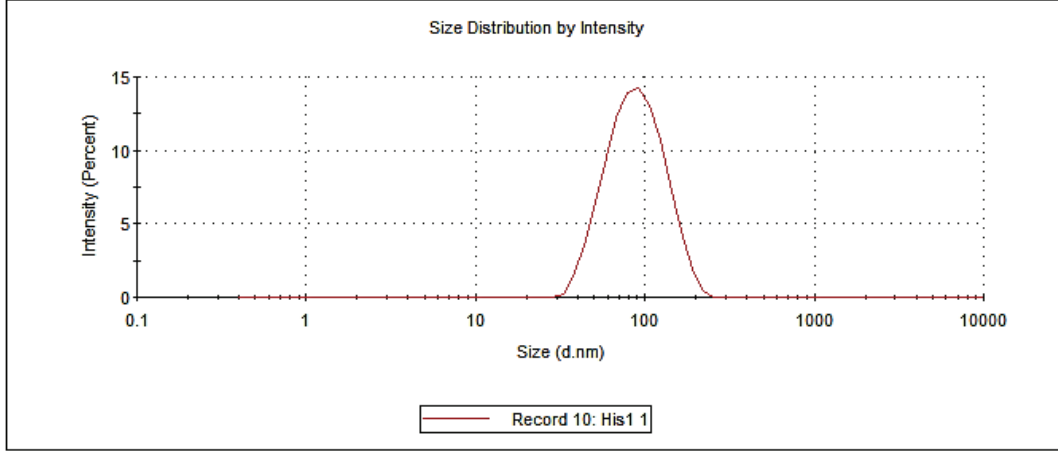
Sentezlenen nanopartikül boyutları, Nano Zetasizer ile belirlenmiş ve boyut ölçümü yapılan örnekler için analiz cihazı yazılımından alınan bulgular Şekil 11 ve 12’de gösterilmiştir. PHEMA nanopartiküllerinin boyut analizi için üç ölçüm yapılmış ve ortalama partikül boyutu 101 nm, polidispersite endeksi 0,168 olarak tespit edilmiştir (Şekil 11). PHEMAH nanopartiküllerinin sentezi sonrasında aynı şekilde üç ölçüm yapılarak nanopartikül boyutu ortalama 81 nm, polidispersite endeksi 0,113 olarak gözlemlenmiştir (Şekil 12). Polidispersite endeksi nanopartiküllerin agregasyon göstergesidir ve ne kadar düşükse agregasyon potansiyeli o kadar düşük olur. Hidroksil grupların varlığı sulu çözeltide ultrasonik dağılım özelliğini artırır [123]. Her iki örneğe ait boyut ölçümünün alınması için kardiyopleji (HTK) solüsyonu içinde dağıtılmış partikül çözeltileri kullanılmıştır.



Şekil 11. PHEMA nanopartiküllerine ait boyut analizi

	Size (d.nm):	% Intensity:	St Dev (d.nm):
Z-Average (d.nm): 81.58	Peak 1: 93.34	100.0	35.36
PdI: 0.113	Peak 2: 0.000	0.0	0.000
Intercept: 0.936	Peak 3: 0.000	0.0	0.000

Result quality : Good

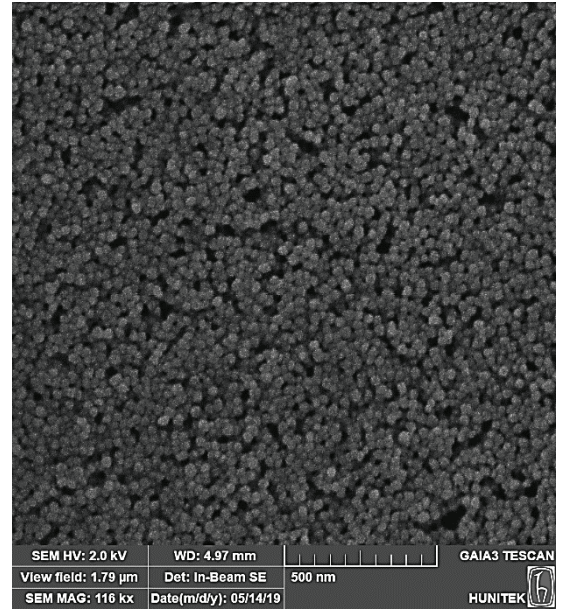
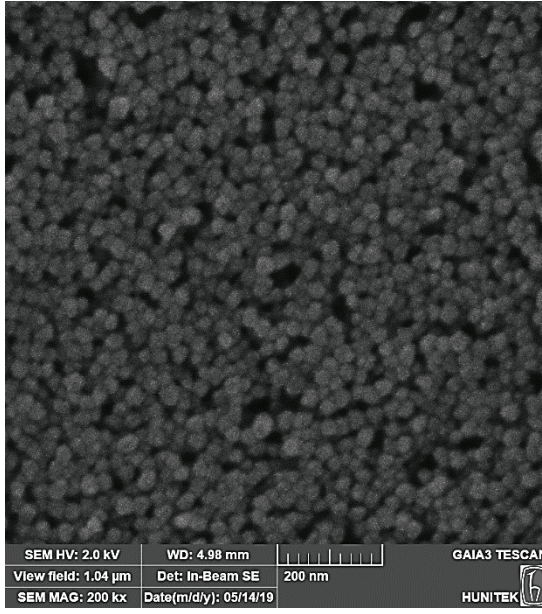


Şekil 12. PHEMAH nanopartiküllerine ait boyut analizi

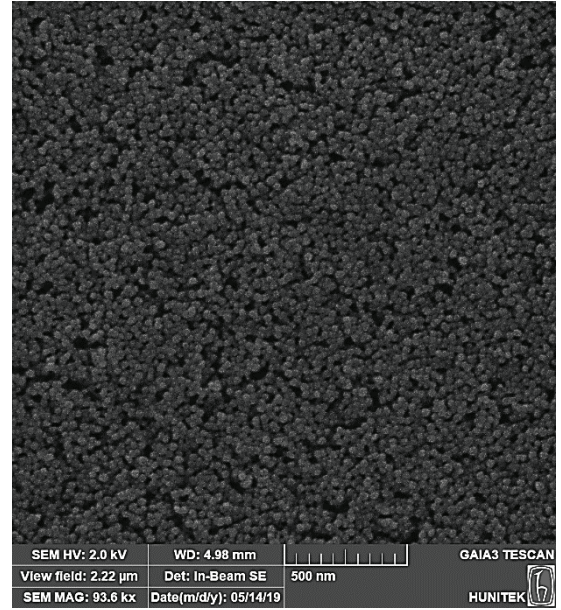
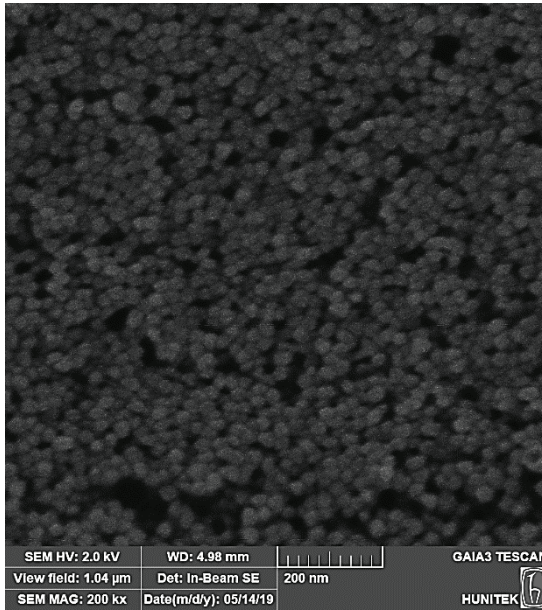
Nanopartiküllerin erken kardiyoprotektif etkisinin gözlemlendiği bir çalışmada [100] kullanılan nanopartikül boyutunun 100 nm'den küçük olmasının miyokarda tutulumu sağlayarak kalp korumasını desteklediği ifade edilmiştir. Bu kapsamda sentezlenen nanopartikül boyutlarının bu tez çalışmasına ait deneylerde kullanıma uygun olduğu yönünde değerlendirilmektedir.

3.1.2. Yüzey Morfolojisi

PHEMA ve PHEMAH partiküllerinin yüzey morfolojileri SEM aracılığıyla incelenmiştir. Emülsiyon polimerizasyonu ile sentezlenen polimerik yapıdaki nanopartiküllerin eş boyutlu, küresel ve düzgün bir yüzeye sahip olduğu gösterilmiştir (Şekil 13, 14). Partiküllerin geniş yüzey alanı ve eşit boyutta olması adsorpsiyon kinetiğini hızlandıran bir faktördür [123].



Şekil 13. PHEMA nanopartikülleri yüzey morfolojisi

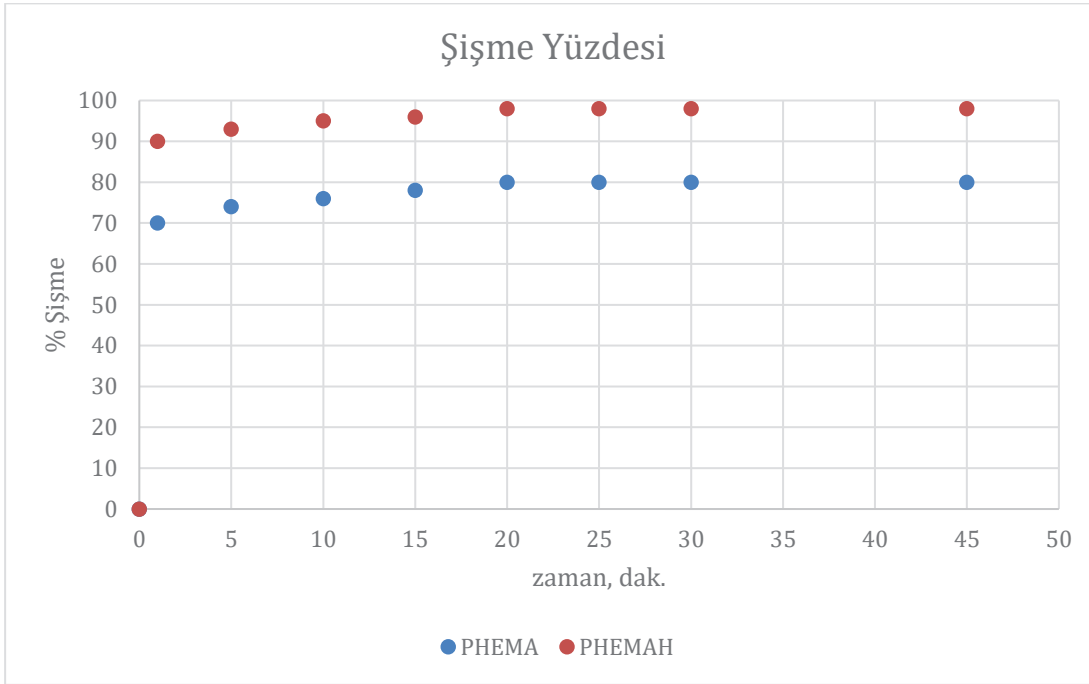


Şekil 14. PHEMAH nanopartikülleri yüzey morfolojisi

PHEMA ve PHEMAH partiküllerinin ortalama çapının yaklaşık 50 nm olduğu görülmektedir. Sentezlenen nanopartikül boyutlarının 100 nm'den küçük olmasının kardiyovasküler cerrahide kullanımda avantaj sağlayacağı düşünülmektedir.

3.1.3. Şişme Özellikleri

PHEMA'nın hidrofobik α -metil gruplarının varlığı polimere hidrolitik stabilite kazandırırken, polar hidroksil ve karboksil grupları, suyla uyumlu hale getirir. Polimer sentezinde kullanılan çapraz bağlayıcı, şişme oranı üzerinde belirgin bir etkiye sahiptir [115]. Sentezlenen polimerik nanopartiküllerde hidrofobik çapraz bağlayıcı olarak EGDMA kullanılmıştır. EGDMA'nın farklı konsantrasyonlarda kullanımıyla şişme oranları arasında yapılan çalışmalarda [115, 124] EGDMA konsantrasyonunun artmasıyla gelişen hidrofobik etkileşimlerin şişme oranını azalttığından söz edilmiştir. PHEMA ve PHEMAH nanopartiküllerinin denge şişme çalışması oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Nanopartiküllerin su alımının büyük kısmı ilk 5 dakika içinde gerçekleşmiş olup 20 dakika sonra dengeye ulaşmıştır (Şekil 15).



Şekil 15. PHEMA ve PHEMAH nanopartiküllerinin denge şişme yüzdeleri

Çapraz bağ derecesine göre matriks içine su alarak şişme potansiyeline sahip polimerik nanopartikül PHEMA'nın denge şişme oranı %80, PHEMAH partiküllerinin denge şişme oranı ise %98 olarak bulunmuştur (Şekil 15). MAH içeren polimerik partiküllerin içermeyen partiküllere göre şişme oranının fazla olması; MAH ilavesi ile polimerik yapıdaki fonksiyonel hidrofil gruplarının artması ve MAH'ın HEMA ile reaksiyonunun, polimerin molekül ağırlığını ve kristalliğini azaltması sebepleriyle matrikse erişen su moleküllerinin artması olarak gerekçelendirilebilir [125].

Nanopartiküllere ait şişme kinetiği Eşitlik 3.1 ile hesaplanmıştır (*Korsmeyer–Peppas* modeli):

$$\text{Şişme kinetiği} = (m_t - m_d) / (m_{eq} - m_d) = kt^n \quad (3.1)$$

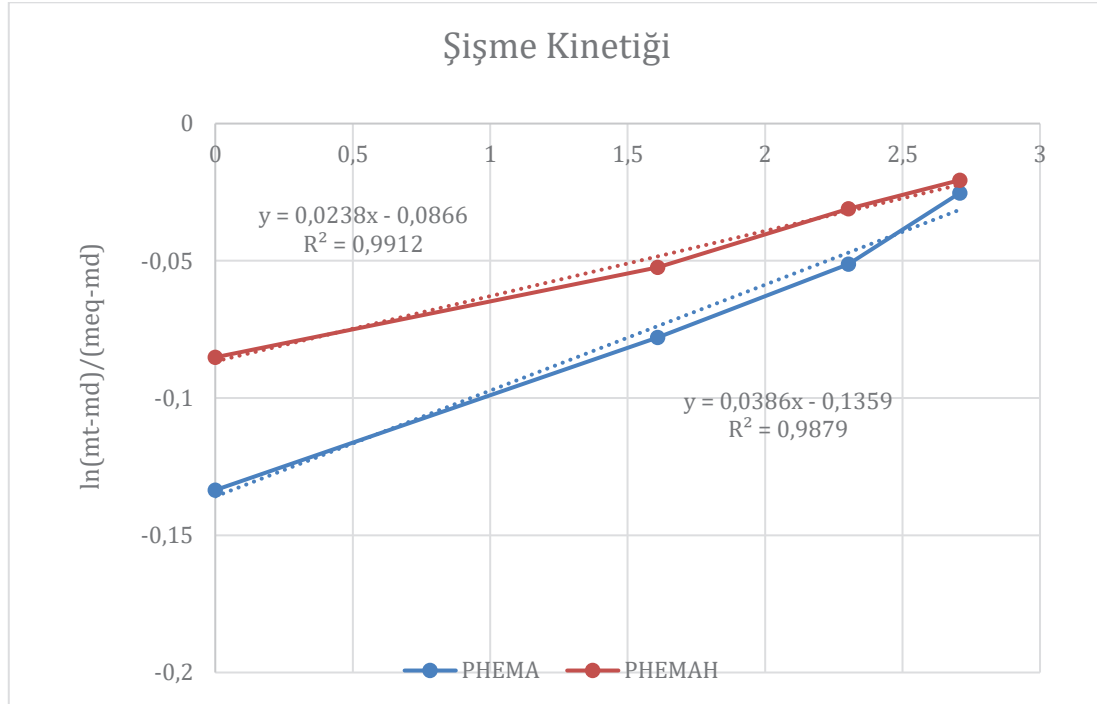
Eşitlikte yer alan k , Fick Sabiti; n , nanopartikülde suyun taşınma modelini karakterize eden difüzyon üstelidir.

m_t : t anında şişmiş nanopartikül kütleini (g),

m_d : kuru nanopartikül ağırlığını (g),

m_{eq} : denge anında şişmiş nanopartikül ağırlığını (g) ifade eder.

Şişme kinetiğinin n ve k parametreleri Şekil 16'daki doğrunun eğiminden ve kesişiminden rapor edilmiştir. Kinetik parametrelere ilişkin verilere Çizelge 7'de yer verilmiştir.



Şekil 16. PHEMA ve PHEMAH nanopartiküllerine ait şişme kinetiği

Çizelge 7. Şişme kinetiğine ait parametreler

Örnek	% Şişme	k	n	R ²
PHEMA	80	1,039	0,065	0,9879
PHEMAH	98	1,024	0,039	0,9912

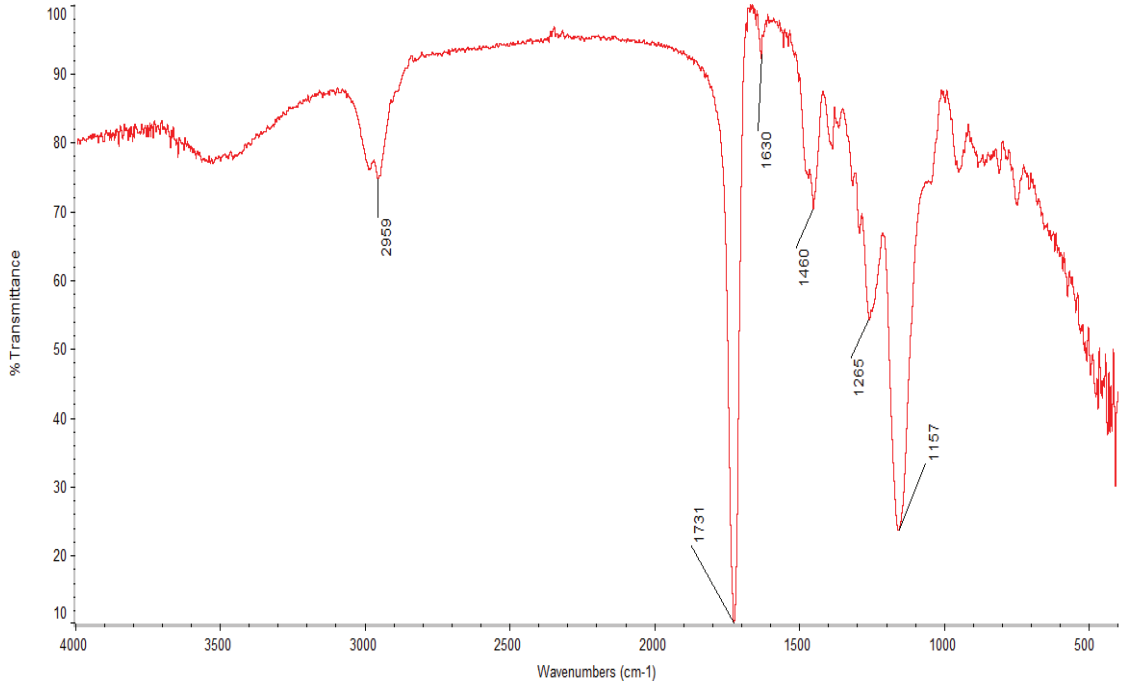
Çizelge 7’de yer alan n değerinin 0,5’e eşit veya küçük olması Fickian difüzyonunun baskın olduğu, yani suyun polimere difüzyon hızının polimer zincirinin gevşeme hızından yavaş olduğu anlamına gelir. Burada şişme hızını difüzyon hızı belirler. 0,5’ten büyük olması ise Fickian olmayan difüzyonun gerçekleştiği, yani suyun polimere difüzyon hızının polimer zincirinin gevşeme hızından fazla olduğu anlamına gelir. Burada ise şişme hızını gevşeme hızı belirler. Bu nedenle, PHEMA ve PHEMAH nanopartikülleri Fickian difüzyon tipi göstermiştir [126].

3.1.4. Yüzey Alanı Ölçümleri

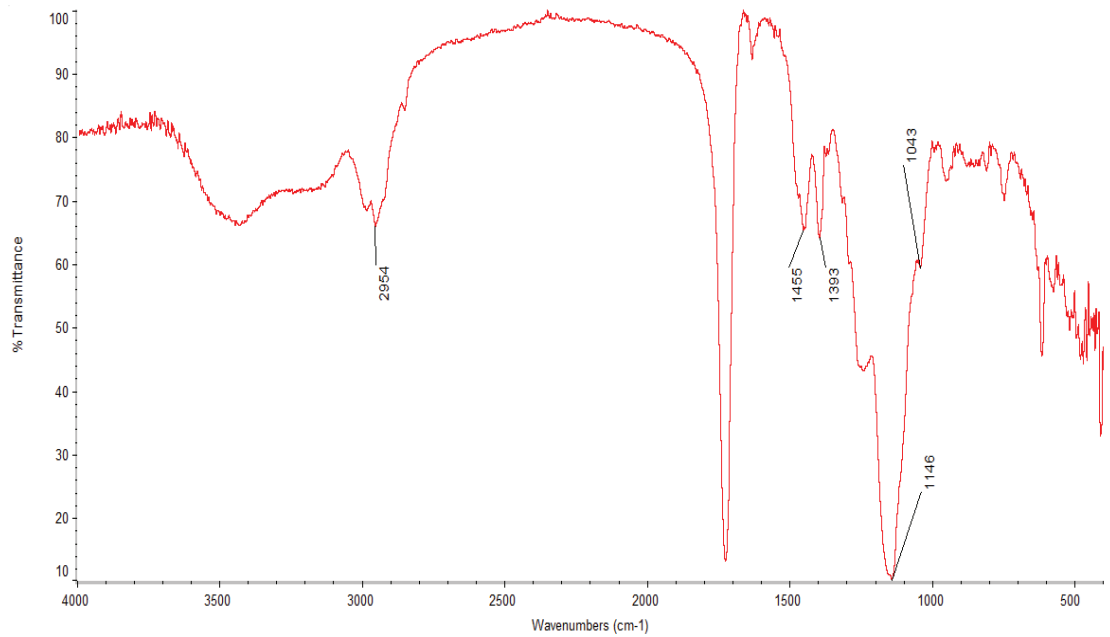
Nanopartiküller geniş yüzey/hacim oranı sayesinde yüksek adsorpsiyon ve iyi bir taşıyıcı olma avantajına sahiptir [123]. Sentezlenen nanopartiküllerin yüzey alanı Eşitlik 2.2 kullanılarak 781.2 m²/g polimer olarak hesaplanmıştır.

3.1.5. FT-IR Çalışmaları

L-histidin metil ester ile metakroil klorür arasındaki tepkime ile oluşan N-metakroil-L-histidin (MAH) monomeri ticari olarak temin edilmiştir. PHEMA (Şekil 17) ve PHEMAH (Şekil 18) partiküllerinin kimyasal yapısının karakterize edilmesi için FT-IR spektrumu alınmıştır.



Şekil 17. PHEMA nanopartiküllerine ait FT-IR Spektrumu



Şekil 18. PHEMAH nanopartiküllerine ait FT-IR Spektrumu

PHEMA nanopartiküllerinin FT-IR spektrumunda, 3250-3500 cm⁻¹ arasındaki geniş adsorpsiyon bandı, $\nu(\text{O-H})$ gerilme titreşimi, 1262 cm⁻¹ $\nu(\text{C-O})$ gerilme titreşimi, 1731 cm⁻¹'deki $\nu(\text{C=O})$ ester bandı ve 2959 cm⁻¹'deki metil grubuna ait $\nu(\text{C-H})$ gerilmesi

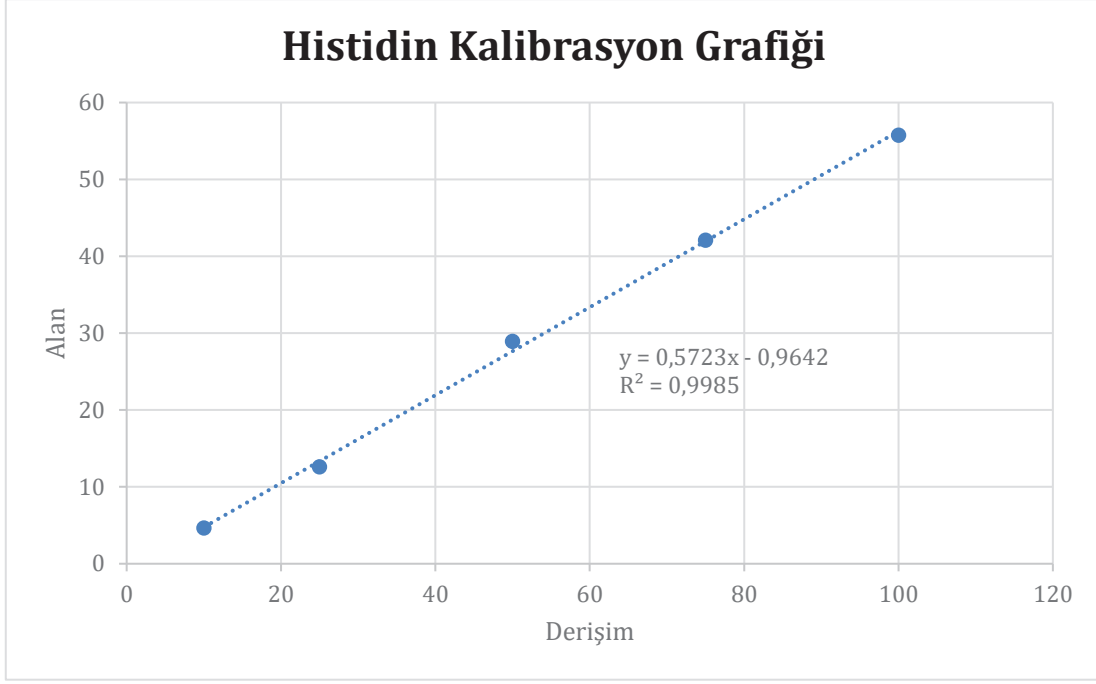
görülmektedir. PHEMAH nanopartiküllerin FTIR spektrumunda ise, 3500 cm^{-1} civarında geniş hidroksil bandı, MAH monomerine ait karakteristik 1636 cm^{-1} ve 1548 cm^{-1} amid gerilme titreşim bantları, 1728 cm^{-1} 'de $\nu(\text{C}=\text{O})$ karbonil bandı görülmektedir. Ayrıca, 1043 cm^{-1} 'de MAH monomerinden kaynaklanan imidazol halka titreşimi ve 2954 cm^{-1} 'de alifatik C-H titreşimleri görülmektedir. Bu sonuçlar polimerik yapıya MAH monomerin girdiğini kanıtlamaktadır.

3.1.6. Elementel Analiz

Eşboyutlu PHEMAH nanopartiküllerinin yapısına ilave edilen MAH miktarının belirlenmesi için azot sitokiyometrisinden faydalanılarak elementel ölçümler yapılmıştır. Çapraz bağlayıcı olarak kullanılan EGDMA'nın yapısında azot bulunmadığından polimerik yapıya ilave edilen azotun kaynağı sadece MAH yapısında bulunan azottan ileri gelmektedir. PHEMAH nanopartiküllerin MAH içeriği 65.4 $\mu\text{mol/g}$ olarak bulunmuştur.

3.2. Sulu Çözeltiden Adsorpsiyon Çalışmaları

Standart histidin örneklerine ait sonuçlardan elde edilen histidin alanları grafiğe geçirilerek kalibrasyon grafiği oluşturulmuştur. Elde edilen doğru denkleminde ($y=0,5732x-0,9642$) faydalanılarak numune konsantrasyonları hesaplanmış ve kalibrasyon grafiğinin doğrusallığı kontrol edilerek R^2 değerinin 0,99'dan büyük olduğu görülmüştür (Şekil 19).



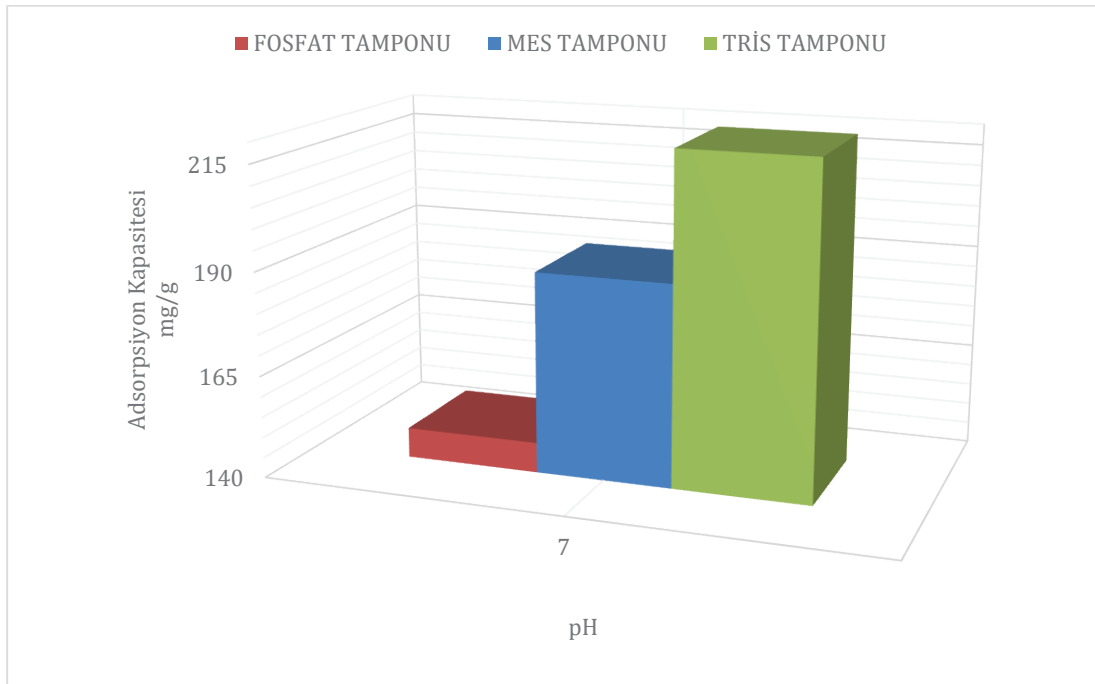
Şekil 19. L-histidin kalibrasyon grafiği

Veri çözümlenme yardımı ile sistemin tanı alt limiti (LOD) ve tayin alt limiti (LOQ) değerleri hesaplanır. Burada eğimin standart sapmasının 3,3 katı ile LOD, 10 katı ile LOQ değeri bulunur (LOD=3,04 µg/ml; LOQ=9,23 µg/ml) [127].

Aminoasitlerin belirlenmesi amacıyla aminoasit analizörleri, kapiler elektroforez ve yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) gibi çeşitli yöntemler kullanılmaktadır [128]. Aminoasit türevlendirmesinde, kolon öncesi türevlendirme işlemi tercih edilir. Bu işlem için seçilen türevlerin; ortam sıcaklığında, sulu çözeltilerde hazırlanmasının hızlı olması; hassas, seçici ve uygun maliyetli olması tercih sebebidir [129]. Aminoasit türevlendirilmesinde O-fitalaldehit (OPA), 2,4-dinitroflorobenzen (DNFB), 2,4-dinitroflorobenzen (DNFB), fenil izotiyosiyani (PITC) ve florenilmetiloksikarbonil (FMOC) sıklıkla kullanılan reaktiflerdir. PITC, bir polipeptid zincirinde amino asitlerin sıralı olarak bozulmasını sağlar ve birincil yapı hakkında bilgi verir [130]. OPA ile türevlendirme reaksiyon hızı daha yüksek olmasına rağmen, türev ürünü PITC'ninki kadar kararlı değildir. FMOC ise floresans tespiti için uygundur. PITC'nin amino asit ile reaksiyonu, kararlı bir kükürt amino karbonil türevi oluşturur [128]. Bu tezde bu sebeple türev reaktif olarak PITC seçilmiştir.

3.2.1. Farklı Tampon Çözeltilerin Adsorpsiyon Kapasitesine Etkisi

Farklı tamponların adsorpsiyon kapasitesi üzerine etkisi araştırılmıştır. Ameliyat koşulları fizyolojik pH (6,8-7,4)'da sağlandığından pH'sı 7,0 olan fosfat, MES ve Tris tamponları hazırlanmış, PHEMA ve PHEMAH nanopartiküllerin bu tamponlarda L-histidin adsorpsiyonları incelenmiştir. Belirli miktarda nanopartikül tartıldıktan sonra oda sıcaklığında 2 ml'lik ependorf tüplerde farklı tamponlarda hazırlanan 1,0 mg/ml derişimdeki L-histidin çözeltisiyle 1 saat boyunca 20 rpm hızla karıştırılmıştır. Farklı tamponların adsorpsiyon kapasitesi üzerindeki etkisi Şekil 20'de verilmiştir.



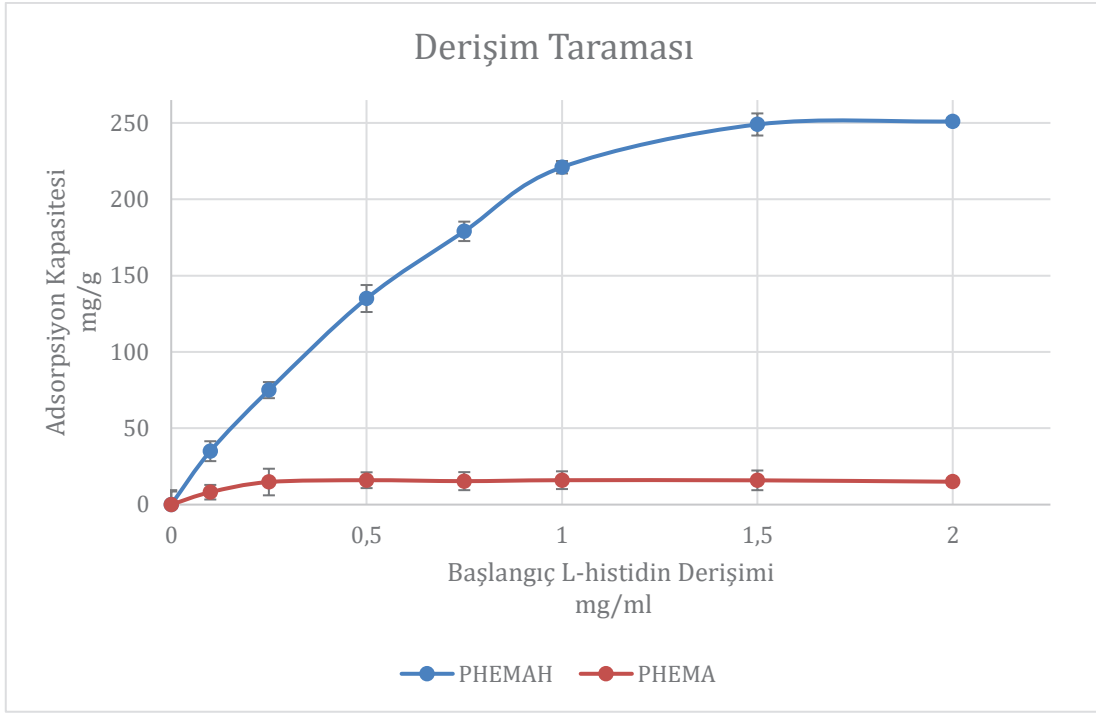
Şekil 20. Farklı tamponların adsorpsiyon kapasitesine etkisi

PHEMAH nanopartiküller için fosfat tamponunda 147,4 mg/g; MES tamponunda 189,1 mg/g; TRİS tamponunda ise 220,1 mg/g adsorpsiyon kapasitesine ulaşılmıştır. Maksimum adsorpsiyon kapasitesi pH 7,0 Tris tamponunda gözlenmiştir.

3.2.2. Başlangıç L-histidin Derişiminin Adsorpsiyon Kapasitesine Etkisi

Şekil 21'de L-histidin adsorpsiyonuna başlangıç L-histidin derişiminin etkisi görülmektedir. L-histidin derişiminin adsorpsiyon kapasitesine etkisini belirlemek amacıyla, hem PHEMA hem de PHEMAH nanopartiküller kullanılmıştır. Şekilde görüldüğü gibi, L-histidin derişimi arttıkça birim nanopartikül kütlesi başına PHEMAH nanopartiküllerine adsorplanan L-histidin miktarı artmakta ve yaklaşık 1,5 mg/ml L-

histidin derişiminden sonra dengeye ulaşmaktadır. L-histidin derişiminin 1,5 mg/ml'den daha yüksek olduğu derişimde ise yüzeydeki MAH gruplarının L-histidin molekülleri ile doyması nedeniyle adsorpsiyon kapasitesi sabit kalmaktadır. Maksimum adsorpsiyon miktarları PHEMA nanopartiküller için 15,9 mg/g; PHEMAH nanopartiküller için ise 251,2 mg/g olarak belirlenmiştir. PHEMAH nanopartiküllerde fonksiyonel MAH monomerinin histidin afinitesi nedeniyle daha yüksek adsorpsiyon kapasitesi değerlerine ulaşmıştır.



Şekil 21. Başlangıç L-histidin derişiminin adsorpsiyon kapasitesine etkisi

Çizelge 8'de PHEMAH nanopartiküllerin adsorpsiyon kapasitesi, literatürde yer alan farklı adsorbentlerin aminoasit adsorpsiyon kapasiteleri ile karşılaştırılmıştır.

Çizelge 8. Farklı adsorbentlerin amino asit adsorpsiyon kapasitelerinin karşılaştırılması

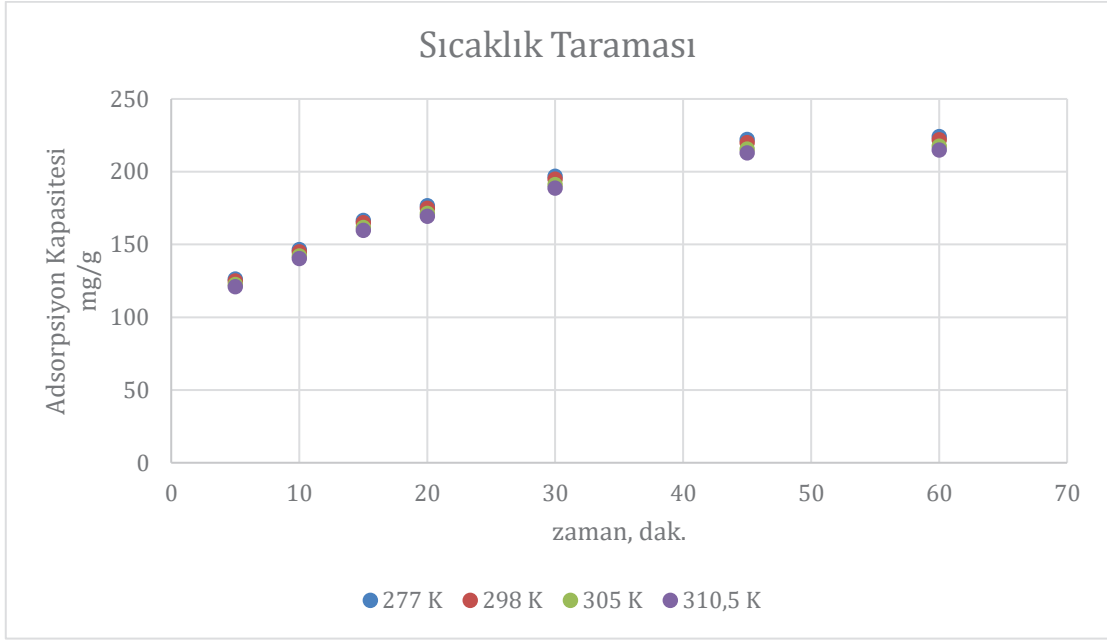
Aminoasit	Yüzey	Adsorpsiyon kapasitesi	Başlangıç konsantrasyonu
L-triptofan	β siklodekstrin polimeri [131]	0,25 mmol/g	40 mM
L-fenilalanin		0,27 mmol/g	40 mM
L-tirozin		0,02 mmol/g	2 mM
L-fenilalanin	Paslanmaz çelik [132]	0,04 lmmol/g	1 mM
L-triptofan	Silika kaplı manyetik nanopartikül [123]	0,41 mmol/g	40 mM
L-fenilalanin		0,39 mmol/g	40 mM
L-tirozin		0,03 mmol/g	2 mM
L-asparjin	β siklodekstrin kaplı silika partikül [133]	1,4 mmol/g	10-15 mM
L-metionin		1,2 mmol/g	
D-sistin		0,5 mmol/g	
Glutamik asit	Paslanmaz çelik [132]	0,37 μ mol/m ²	10 mM
Arjinin		1,21 μ mol/m ²	
L-Aspartik asit		2,56 μ mol/m ²	
Oligo L-glutamik asit		1,14 μ mol/m ²	
Poli L-glutamik asit		1,23 μ mol/m ²	
L-histidin	PHEMAH nanopartiküller*	251,2 mg/g	1,5 mg/ml

*Bu tez çalışmasına ait veriyi ifade etmektedir.

3.2.3. Sıcaklığın Adsorpsiyon Kapasitesine Etkisi

PHEMAH nanopartiküllere L-histidin adsorpsiyonunun sıcaklığın etkisiyle değişip değişmediğini anlamak için farklı sıcaklıklarda (4, 25, 32 ve 37,5 °C) adsorpsiyon deneyleri yapılmıştır. Sıcaklığın PHEMAH nanopartiküllerin L-histidin adsorpsiyonuna etkisi Şekil 25'te verilmiştir. Artan sıcaklıkla beraber PHEMAH nanopartiküllerin L-histidin adsorpsiyon kapasiteleri azalmaktadır. Sıcaklık ile adsorpsiyon kapasitesi arasındaki ilişki, adsorpsiyonu etkileyen etkileşimlerin anlaşılabilmesi açısından önemlidir. Hidrojen bağları ve iyonik etkileşimlerin baskın olması durumunda adsorpsiyon kapasitesi sıcaklıkla ters orantılıdır [134, 135]. Van Der Waals ve hidrofobik etkileşimlerin baskın olması durumunda ise adsorpsiyon kapasitesi sıcaklıkla doğru orantılıdır [136]. MAH yapısındaki histidin amino asidinin imidazol grupları L-histidin molekülleriyle etkileşime girmektedir [137]. Sıcaklığın artması ile adsorpsiyon kapasitesinde azalma gözlenmesi, hidrojen bağları ve elektrostatik (iyonik) etkileşimlerin

varlığını göstermektedir. PHEMA nanopartiküllerde bu etkileşim olmadığından adsorpsiyon spesifik değildir.



Şekil 22. Sıcaklığın adsorpsiyon kapasitesine etkisi

3.2.4. Adsorpsiyon İzotermi

Bir protein molekülünün adsorbentle etkileşimini göstermede kullanılan adsorpsiyon izotermi, katı fazda adsorplanan protein miktarı ile çözeltideki protein derişimi arasında bir ilişki sağlar. Sıklıkla tercih edilen iki model Langmuir ve Freundlich modelidir. Her biri yalnızca bir molekül bağlayabilecek kapasitede olan belli sayıda tanımlanmış bölgeye adsorpsiyon olduğu kabul edilen Langmuir modelinde adsorplanmış moleküllerin etkileşemeyecek kadar birbirinden uzak olduğu varsayılır. Langmuir adsorpsiyon modeli Eşitlik 3.2 ile tanımlanır:

$$Q=Q_{\text{mak}} \cdot b \cdot C_{\text{eq}} / (1+bC_{\text{eq}}) \quad (3.2)$$

Bu eşitlikte;

Q: uzaklaştırılan protein miktarı (mg/g),

C_{eq} : denge protein derişimi (mg/L),

b: Langmuir sabiti (ml/mg),

Q_{mak} : Maksimum protein adsorpsiyon kapasitesi (mg/g)'dir.

Freundlich adsorpsiyon modeli ise yüzey adsorpsiyonu sonrasında kuvvetli çözünen-çözünen etkileşimini göstermektedir. Freundlich adsorpsiyon modeli Eşitlik 3.3 ile tanımlanır:

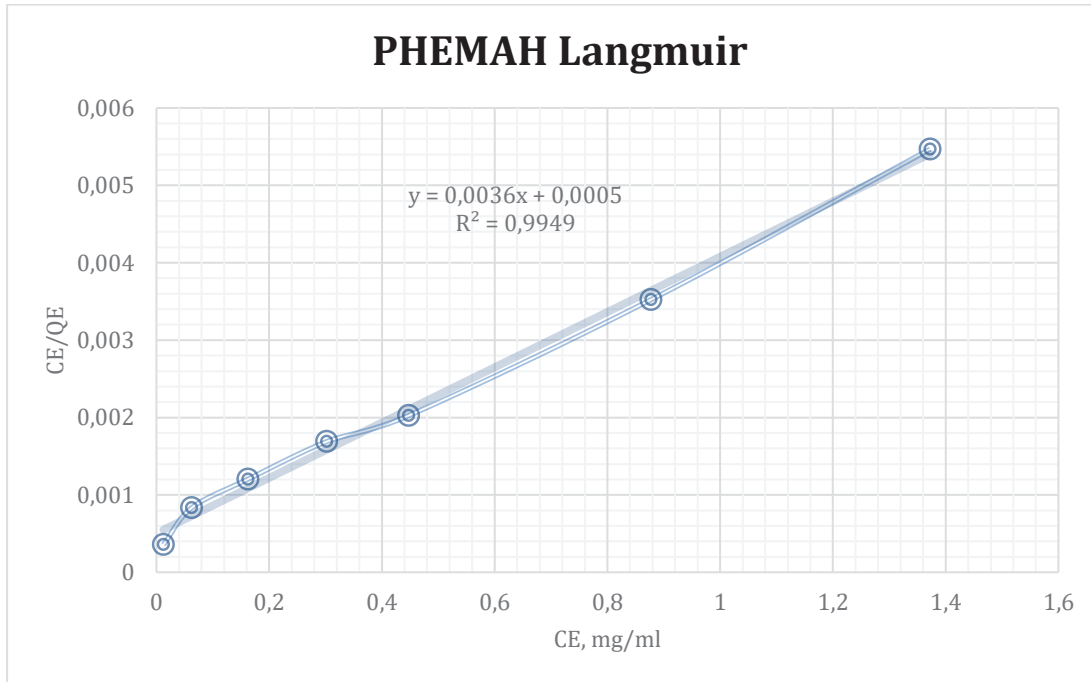
$$Q = K_F \cdot C_{eq}^{(1/n)} \quad (3.3)$$

Bu eşitlikte;

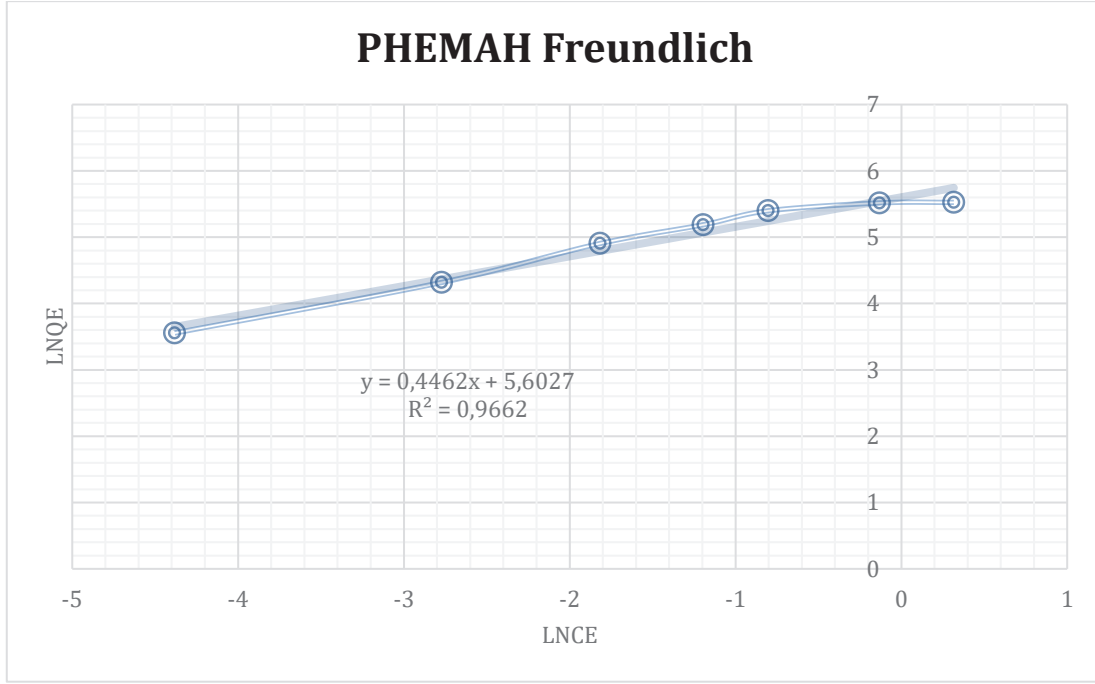
K_F ve n : Freundlich sabitleridir.

$1/n$ sayısı yüzey heterojenliğini gösterir.

Şekil 22’de PHEMAH nanopartiküllerine ait Langmuir adsorpsiyon modeline, Şekil 23’te ise Freundlich adsorpsiyon modeli eğrilerine yer verilmiştir.



Şekil 23. Langmuir adsorpsiyon modeli



Şekil 24. Freundlich adsorpsiyon modeli

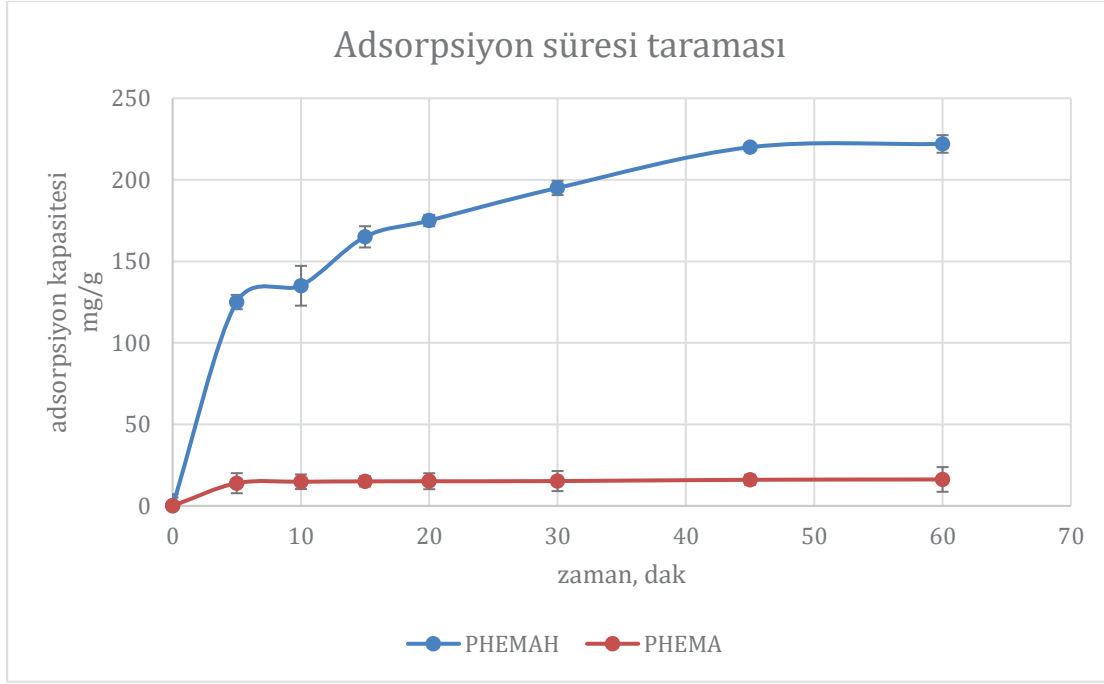
Grafiklerden elde edilen sonuçlar, PHEMAH nanopartiküllerine ait adsorpsiyon özelliklerinin Langmuir modeline daha fazla uyduğunu göstermektedir. Her iki model için PHEMAH nanopartiküllerine ait bazı parametreler Çizelge 9’da verilmiştir.

Çizelge 9. Adsorpsiyon modellerine ait veriler

Adsorpsiyon Modeli	<i>Langmuir</i>			<i>Freundlich</i>		
	Q_{mak} (mg/g)	b (L/mg)	R^2	$1/n$	K_F	R^2
PHEMAH	277,7	7,2	0,9949	0,44	271,1	0,9662

3.2.5. Adsorpsiyon Süresinin Adsorpsiyon Kapasitesine Etkisi

Adsorpsiyonda süre etkisini incelemek için L-histidin sulu çözeltisi (1 mg/ml) ile etkileştirilen PHEMA ve PHEMAH nanopartikül karışımından farklı zaman aralıklarında (5-60 dakika) örnek alınmış ve adsorpsiyon miktarları hesaplanmıştır. PHEMA nanopartiküllerin adsorpsiyon kapasitesi PHEMAH nanopartiküllere göre oldukça düşüktür. Şekil 24’te, PHEMA ve PHEMAH nanopartiküllerin adsorpsiyon kapasitesinin zamanla değişimi görülmektedir. Adsorpsiyon işleminin başlangıcında nispeten hızlı adsorpsiyon gözlenmiş ve yaklaşık 45 dakikada dengeye ulaşılmıştır.



Şekil 25. Adsorpsiyon süresinin adsorpsiyon kapasitesine etkisi

3.2.6. Termodinamik Hesaplamalar

Adsorpsiyon işlemi esnasındaki enerji değişimleri termodinamik parametreler ile anlaşılabilir.

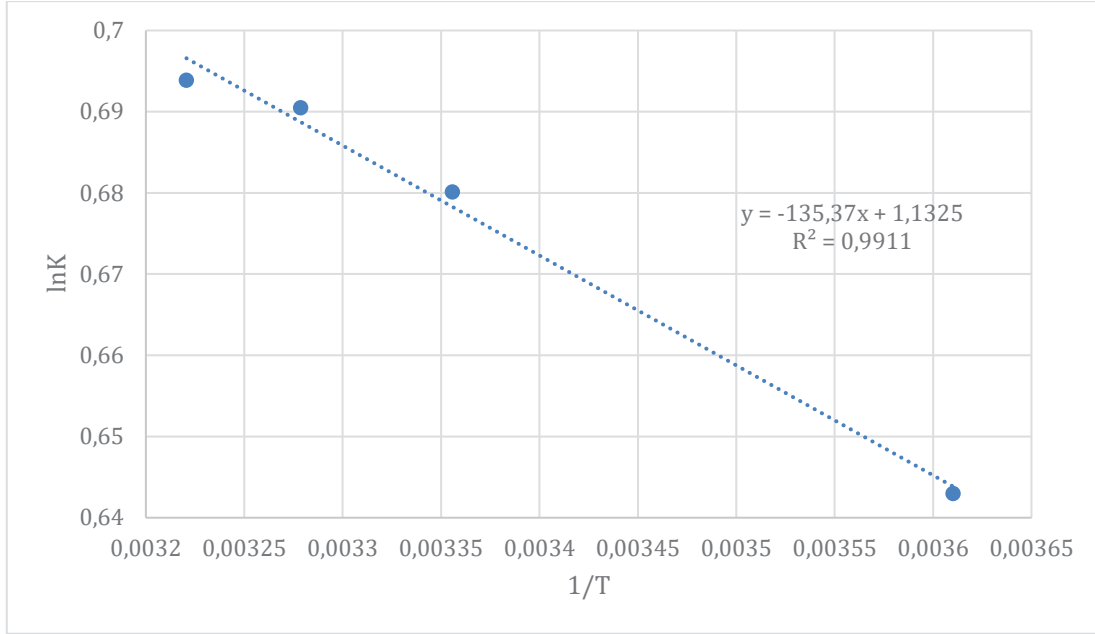
$$\Delta G^\circ = -RT \ln K \quad (3.4)$$

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T \Delta S^\circ \quad (3.5)$$

$$\ln K_L = (\Delta H^\circ)/RT + (\Delta S^\circ)/R \quad (3.6)$$

Yukarıdaki eşitliklerde;

ΔG° (Gibbs serbest enerji değişimi) adsorpsiyonun kendiliğinden gerçekleşme seviyesini, ΔH° entalpi değişimini, ΔS° entropi değişimini, K Langmuir adsorpsiyon katsayısını, R gaz katsayısını (8.314 J/mol.K), T sıcaklığı ifade etmektedir. Termodinamik parametrelere ait veriler Şekil 26 ve Çizelge 10'da görülmektedir.



Şekil 26. 1/T'ye karşı lnK grafiği

Çizelge 10. Termodinamik parametrelere ait veriler

Sıcaklık (Kelvin)	ΔG (°kj/mol)	ΔH° (kj/mol)	ΔS° (J/mol)
277	-1,480	-1,125	9,411
298	-1,685		
305	-1,750		
310,5	-1,791		

ΔS° 'nin pozitif değer göstermesi katı-sıvı faz arasında L-histidin adsorpsiyonunun entropide artışa neden olduğunu ve adsorpsiyonun tercih edildiğini göstermektedir. Negatif ΔH° değeri ise L-histidin adsorpsiyonunun ekzotermik olduğunu, böylece adsorpsiyon için sisteme dışarıdan herhangi bir enerji verilmesi gerekmediğini gösterir.

3.2.7. Kinetik Analiz

Adsorpsiyonu kontrol eden mekanizmayı belirlemek için kinetik modeller (yalancı-birinci derece kinetik ve yalancı-ikinci derece kinetik denklemler) test edilmiştir. Bu modellerde, örneğe ait ölçülen derişim değerlerinin adsorbentin yüzey derişimine eşit olduğu kabul edilir. Yalancı-birinci derece hız denklemi Eşitlik 3.7 ile tanımlanır:

$$Q_t/dt = k_1(Q_{eq}-Q_t) \quad (3.7)$$

Bu eşitlikte;

k_1 : yalancı-birinci derece adsorpsiyon hız sabitini (1/dak),

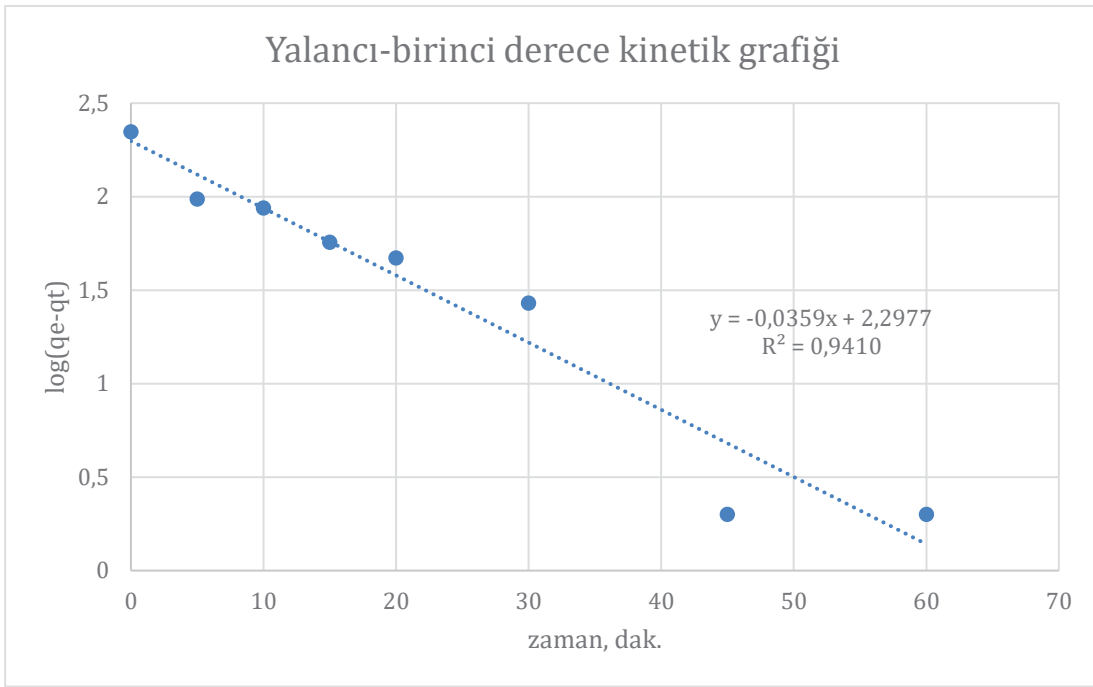
q_{eq} ve q_t : denge durumunda, t anında adsorplanan protein miktarını (mg/g) ifade eder.

Yalancı-ikinci derece denklem, denge adsorpsiyonunu temel alır ve Eşitlik 3.8 ile tanımlanır:

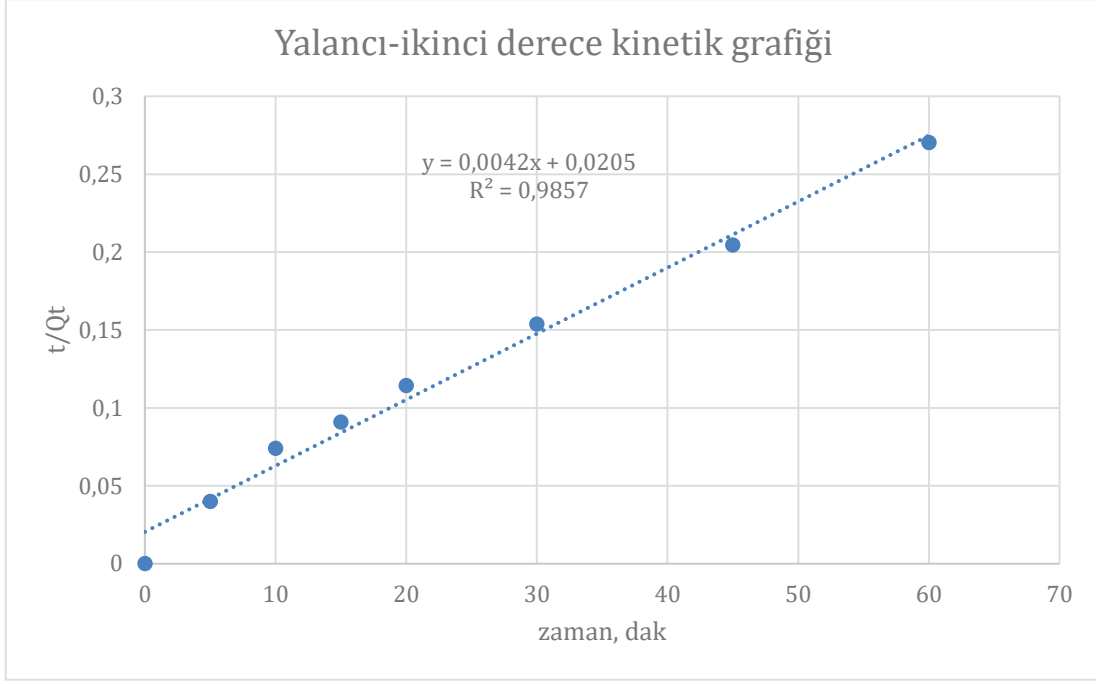
$$Q_t/dt = k_2(Q_{eq}-Q_t)^2 \quad (3.8)$$

Bu eşitlikte; k_2 yalancı-ikinci derece hız sabitini (g/mg.dak) ifade etmektedir.

Kinetik analiz grafiklerine Şekil 27 ve 28'de, kinetik parametrelerine ait sonuçlara Çizelge 11'de yer verilmiştir.



Şekil 27. Yalancı-birinci derece kinetik grafiği



Şekil 28. Yalancı-ikinci derece kinetik grafiği

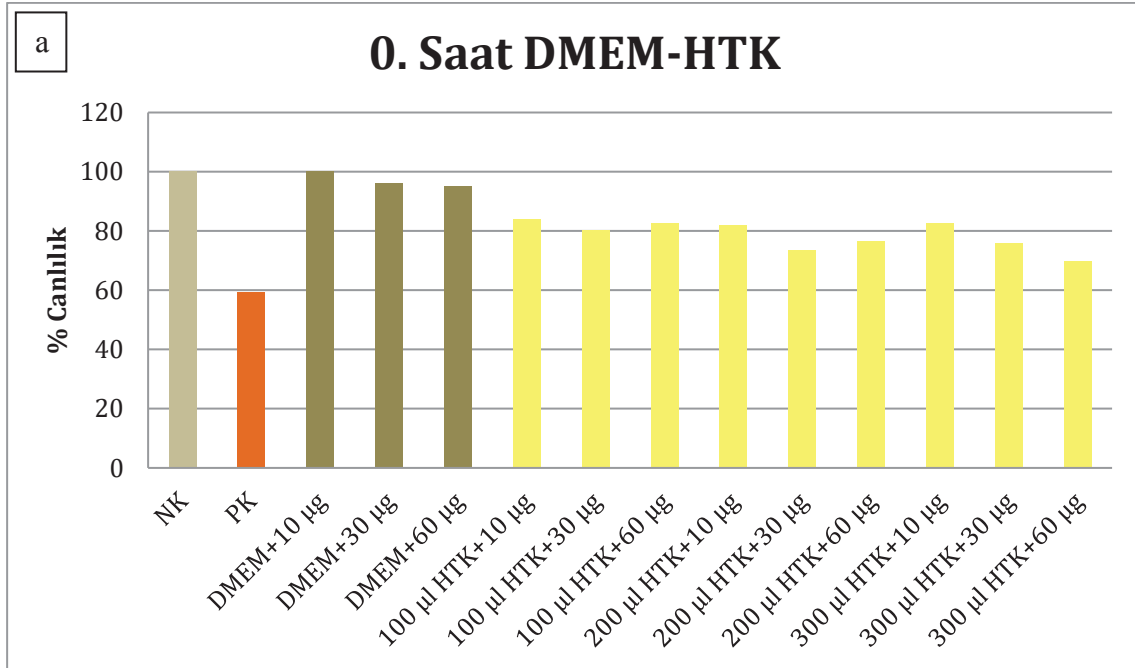
Çizelge 11. Kinetik parametrelere ait veriler

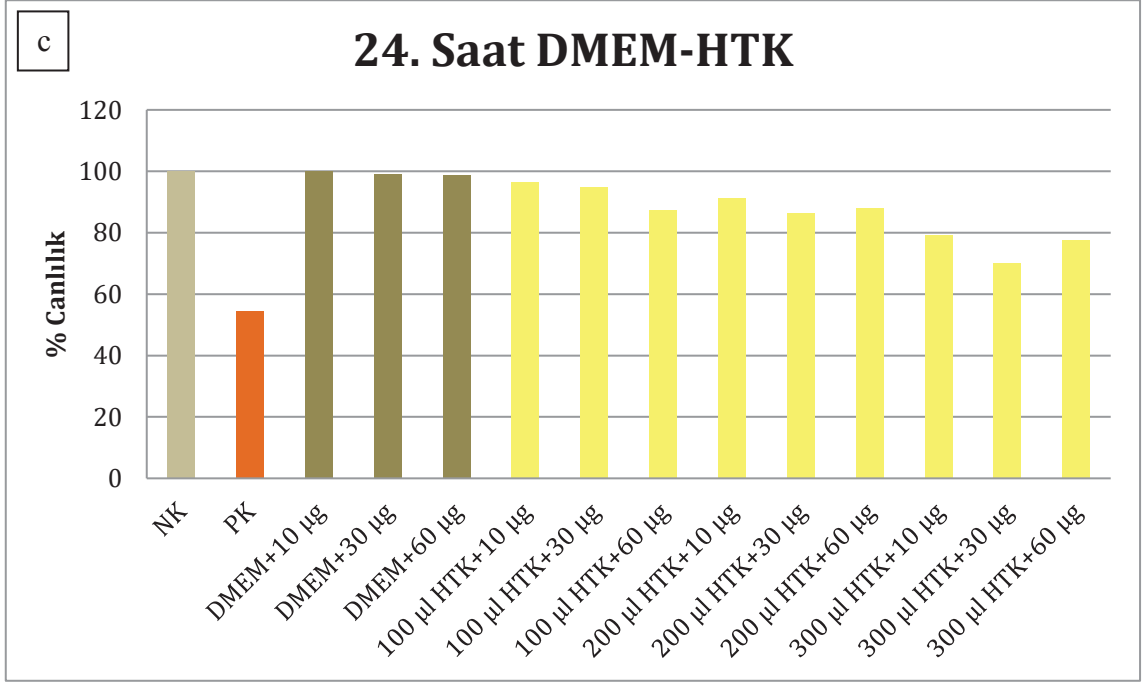
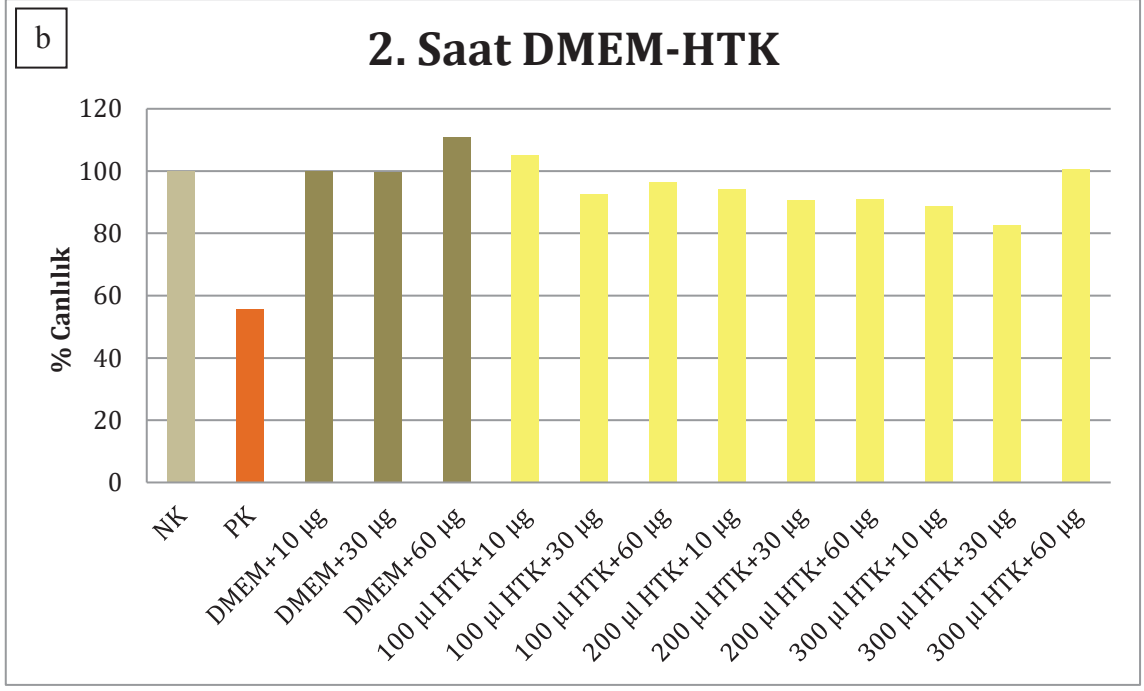
Kinetik model	Yalancı-birinci derece kinetik model			Yalancı-ikinci derece kinetik model		
	Qeq (mg/g)	k ₁ (1/dak)	R ²	Qeq (g/mg)	k ₂ (g/mg.dak)	R ²
PHEMAH	198,47	0,08	0,9410	238,10	1,79	0,9857

3.3. MTT Testi Çalışmaları

Kalp ameliyatlarında yaygın olarak kullanılan kardiyopleji solüsyonu Custodiol (HTK) ile PHEMA ve PHEMAH içeren HTK solüsyonları kullanılmış ve negatif kontrol olarak kullanılan DMEM besiyeri ortamına ve birbirlerine kıyasla karşılaştırmalı olarak başarı durumları HUVEC hücre hattında MTT testi ile değerlendirilerek yorumlanmıştır. Hazırlanan plakalar 2 saat boyunca HTK ile muamele edildikten sonra HTK ortamdan uzaklaştırılarak, hücreler yıkanmış 0. Saat, 2. saat ve 24. saat sonuçlarını gözlemlemek üzere DMEM ile standart MTT prosedürüne devam edilmiştir.

Öncelikle üç farklı konsantrasyonda (10 µg/ml, 30 µg/ml ve 60 µg/ml) PHEMA nanopartiküllerini içeren, negatif kontrol olarak kullanılan DMEM besiyeri ortamı ile HTK, hücre üzerinde sitotoksik bir etkisinin olup olmadığı durumunu gözlemlemek amacıyla karşılaştırılmış ve bu sonuçlara ait istatistikler Şekil 29 (a, b ve c)'da verilmiştir.





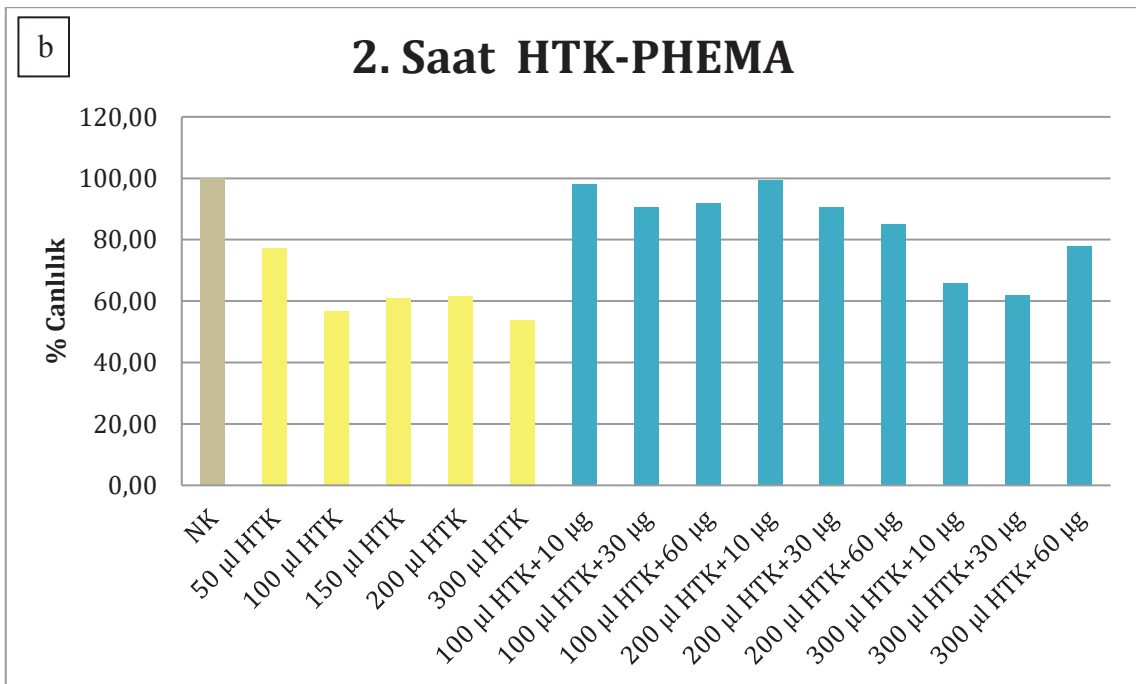
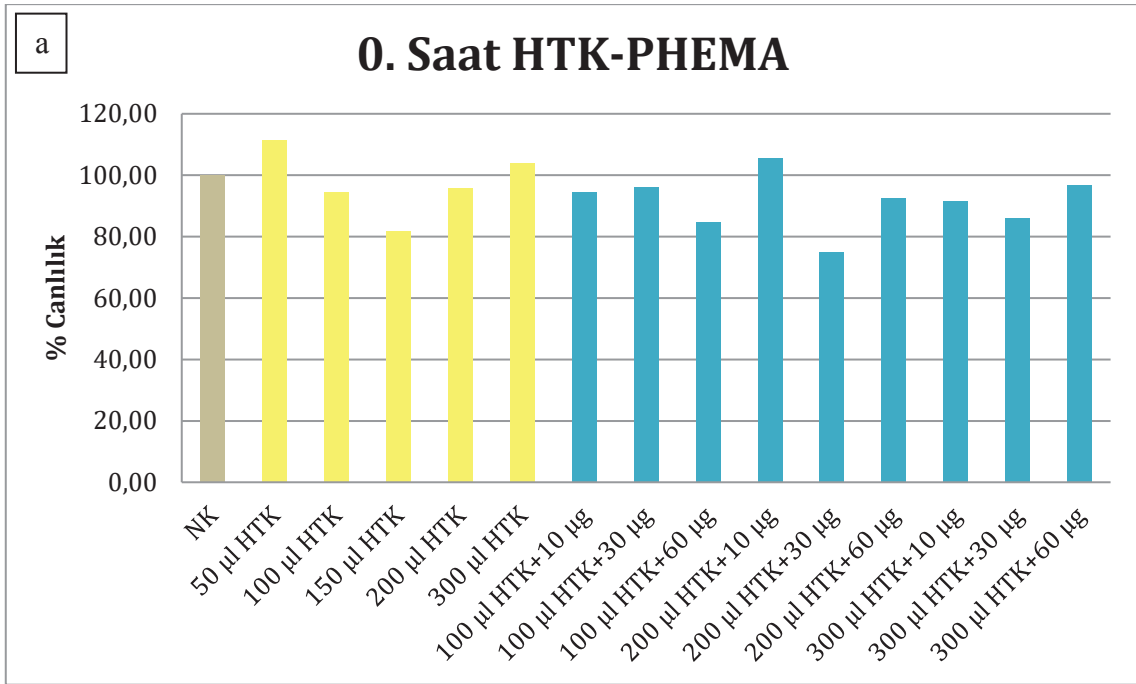
Şekil 29. Farklı derişimlerde PHEMA içeren DMEM ile HTK'nın karşılaştırılması

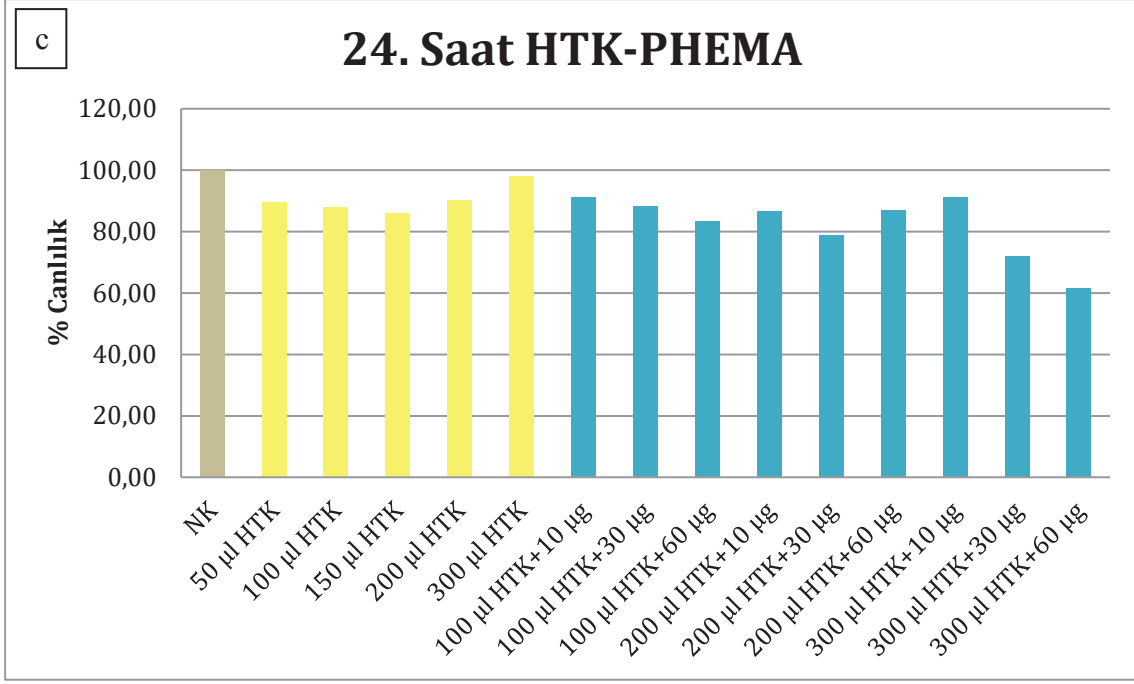
a) 0. Saat b) 2. Saat c) 24. saat

DMEM kullanılan ve NK ile gösterilen kontrol grubunun hücre canlılığı %100 olarak kabul edilmiş ve gruplara ait örnekler NK ile karşılaştırılmıştır. PK ile gösterilen sütunda canlılık yüzdesinin düşmüş olması amonyum molibdatın sitotoksik etkisini göstermiştir.

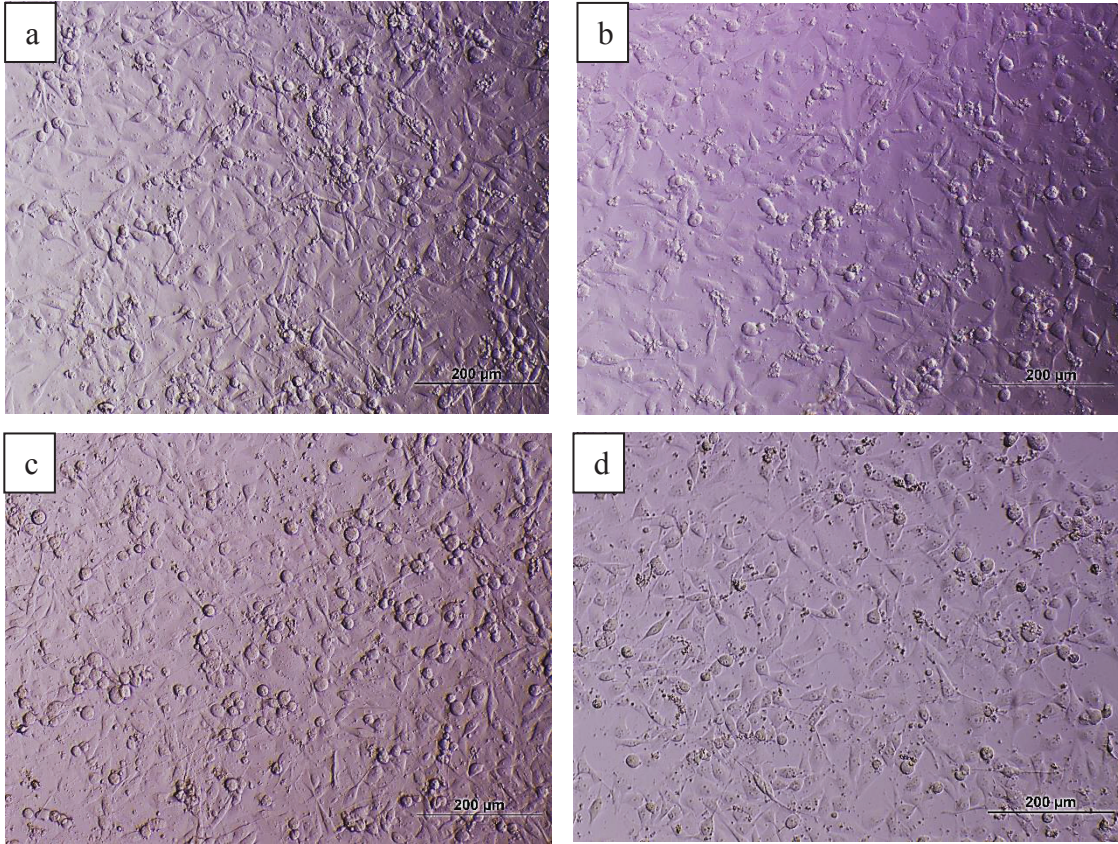
Bu bağlamda diğer örneklere ait canlılık yüzdeleri PK ile karşılaştırıldığında sitotoksik etkilerinin olmadığı anlaşılmaktadır. Şekil 29 ile gösterilen çalışma DMEM ile HTK arasında karşılaştırma yapmak ve PHEMA kaynaklı bir sitotoksitenin var olup olmadığını göstermek amacıyla yapılmıştır. 0. Saatte kıyaslandığında 2. Saatte HTK örneklerinde gözlenen hücre canlılığındaki artış, beklenen bir sonuçtur. 0. Saat ile belirtilen veriler; iki saat boyunca HTK ile muamele edildikten sonra yıkanan hücrelerin canlılık durumunu ifade eder ve bu verilerde hücre canlılığının düşük olması HTK solüsyonu ile metabolik faaliyetlerin düşürülmesi amacı ile uyumludur. 2. ve 24. saatlerde PHEMA içeren DMEM ve HTK örneklerine ait verilerde negatif kontrole kıyasla hücre canlılığında anlamlı bir düşüş olmaması bu bileşenlerin hücre için sitotoksik olmadığını açıklar.

Kalp ameliyatlarında kardiyoplejik ajan olarak tek dozda ve yüksek hacimde uygulanan (ortalama 1-2 L) HTK solüsyonu hücrel ödeme sebebiyet verebilmektedir. PHEMA polimerik nanopartiküllerini içeren HTK solüsyonunun hücre canlılığı üzerinde negatif bir etki göstermemesi amacı ile birlikte daha düşük hacimlerde solüsyondan beklenen etkiyi karşılayabilmesi hedeflenmiştir. Bu sayede hem hücrel ödemin önlenmesi amacına hizmet edecek hem de operasyon sırasında kullanılan kardiyopleji solüsyonu miktarının azaltılmasıyla maliyette düşüş sağlayacaktır. Bu amaçla; farklı hacimlerde HTK (50, 100, 150, 200 ve 300 µl) ile farklı derişimlerde PHEMA içeren HTK solüsyonları karşılaştırılmış (Şekil 30), hacimsel azalma ve hücre canlılığı parametreleri değerlendirilmiştir.





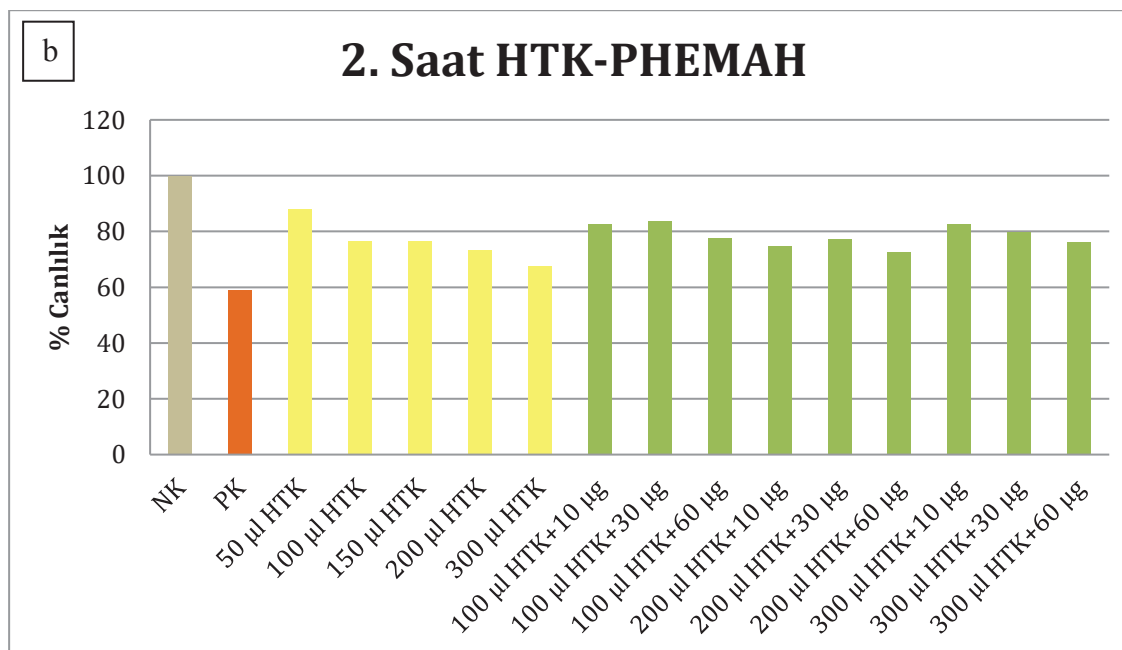
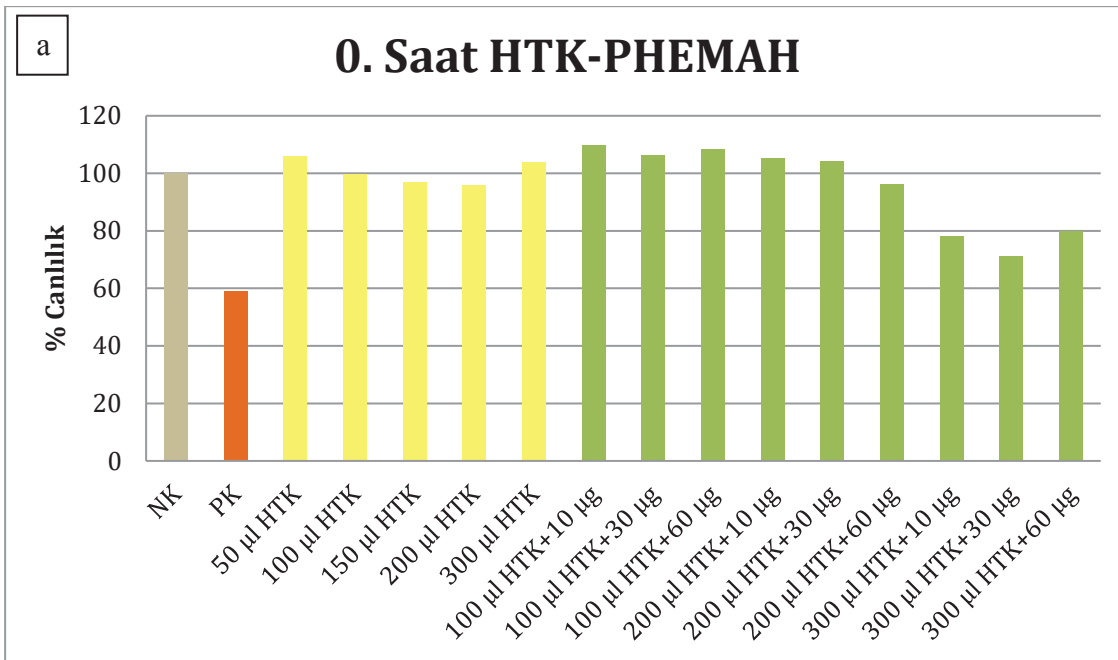
Şekil 30. HTK'nın farklı hacimleri ile farklı derişimlerde PHEMA içeren HTK'nın karşılaştırılması, a) 0. Saat b) 2. Saat c) 24. saat

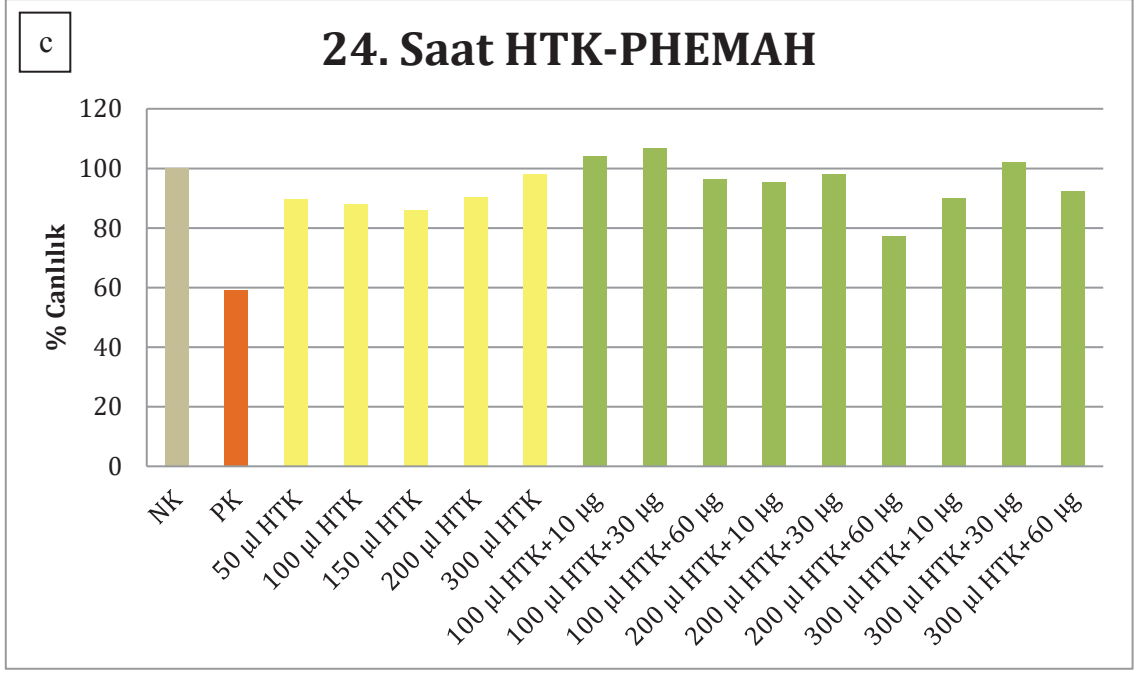


Şekil 31. PHEMA örneklerine ait mikroskop görüntüleri (24. Saatte), a) NK, b) 200 µl HTK, c) 100 µl HTK+10 µg PHEMA, d) 100 µl HTK+30 µg PHEMA

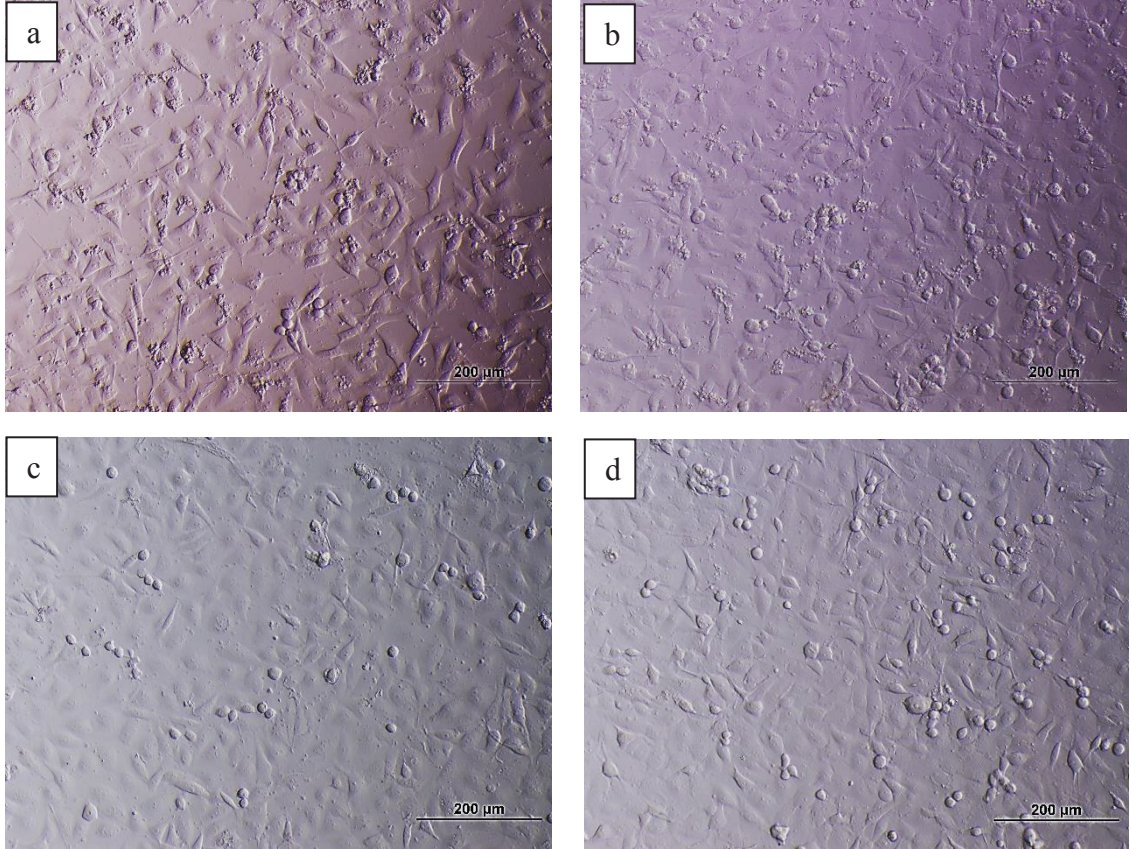
Şekil 30a ile gösterilen 0. Saat sonuçlarında HTK eklenen kuyucuklarda hacim arttıkça canlılığın daha az olduğunun görülmesi, bir kardiyoplejik ajandan beklenen metabolik aktiviteyi azaltması amacı ile uyumludur. Şekil 30b ile gösterilen MTT 2. Saat sonuçlarında PHEMA içeren 100 µl ve 200 µl hacimlerdeki HTK örneklerinin tüm konsantrasyonlarında, yalnızca HTK uygulanan hücre örneklerine göre hücre canlılığı bakımından anlamlı sonuçlar elde edildiği görülmektedir. Bu sonuçlar, kullanılacak HTK hacminin PHEMA katkısıyla azaltılabileceği ve hücre canlılığı yönünden daha iyi sonuçlar elde edilebileceği yönünde yorumlanmaktadır. 0. Saatteki yalnızca HTK eklenen kuyucuklara ait yüzde değerlerin, 2. Saate kıyasla yüksek olması MTT'nin ölmeye başlayan hücreleri canlı olarak gösterebilmesiyle açıklanabilir [138]. 2. Saatte yalnızca HTK içeren kuyucuklardaki canlılık yüzdesinin düşük olması bu yorumu doğrulamaktadır ve hücre ölümlerinin tamamlandığı şeklinde yorumlanabilir. MTT Testinin 24. saat sonuçlarında beklenti, hücre canlılığının %70'in üzerinde olmasıdır [121]. Bu durum, uygulanan örneğin sitotoksik potansiyelinin olmadığı yönünde değerlendirilir. Şekil 30c ile gösterilen verilerde tüm gruplarda hücre canlılığı seviyesinin beklentiyi karşıladığı görülmektedir. Ayrıca, HTK eklenen kuyucuklara kıyasla PHEMA katkılı HTK'larda canlılığın beklentiyi karşıladığı görülmektedir.

HTK solüsyonu formülasyonunda bulunan 198 mmol/L derişimindeki yüksek histidin içeriği nedeniyle PHEMA sentez aşamasında yapıya eklenen MAH monomeri ile PHEMAH nanopartikülleri hazırlanmıştır. PHEMA'ya dâhil edilen L-histidin ile biyouyumluluk artırılabilir ve doğal bir mikro-ortam sağlanabilir. Tekli amino asit molekülleri, sahte afinite ligandları olarak bazı avantajlar sağlayabilirler [139]. Solüsyon içindeki histidin ile polimerik nanopartiküllerin yapısında bulunan MAH monomerinin birbirlerine olan afinitesinden yararlanmak ve bu sayede HTK içindeki histidin etkisinin artırılması amaçlanmıştır. Farklı hacimlerde HTK (50, 100, 150, 200 ve 300 µl) ile farklı derişimlerde PHEMAH içeren HTK solüsyonları karşılaştırılmış (Şekil 32), hacimsel azalma ve hücre canlılığı parametreleri değerlendirilmiştir.





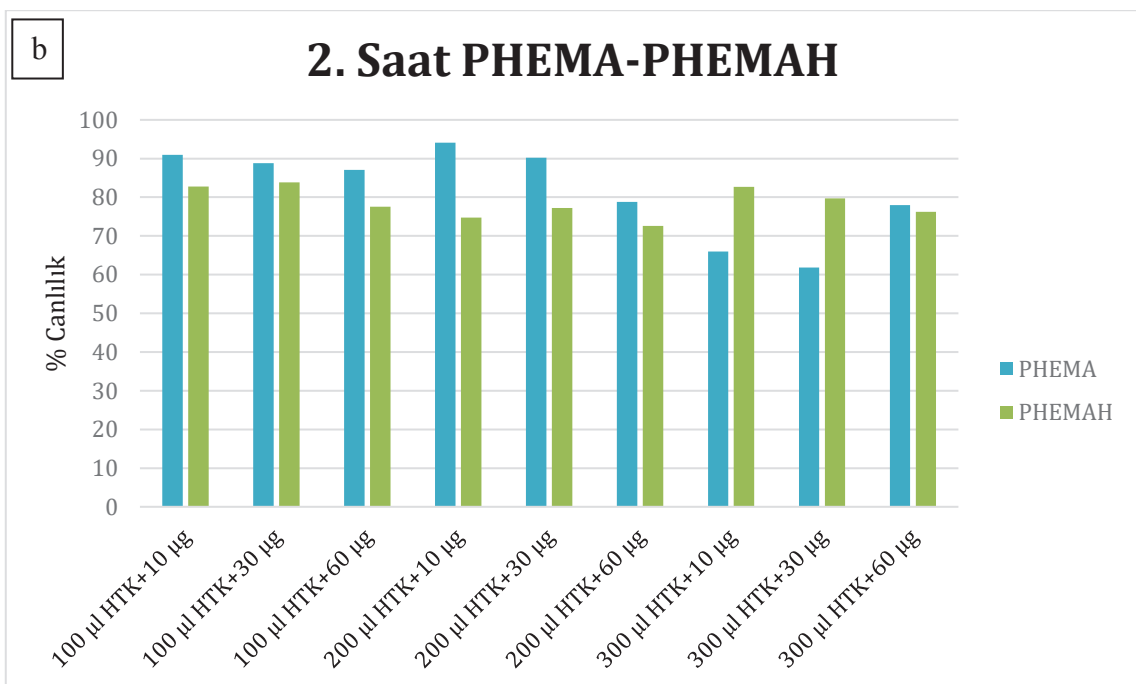
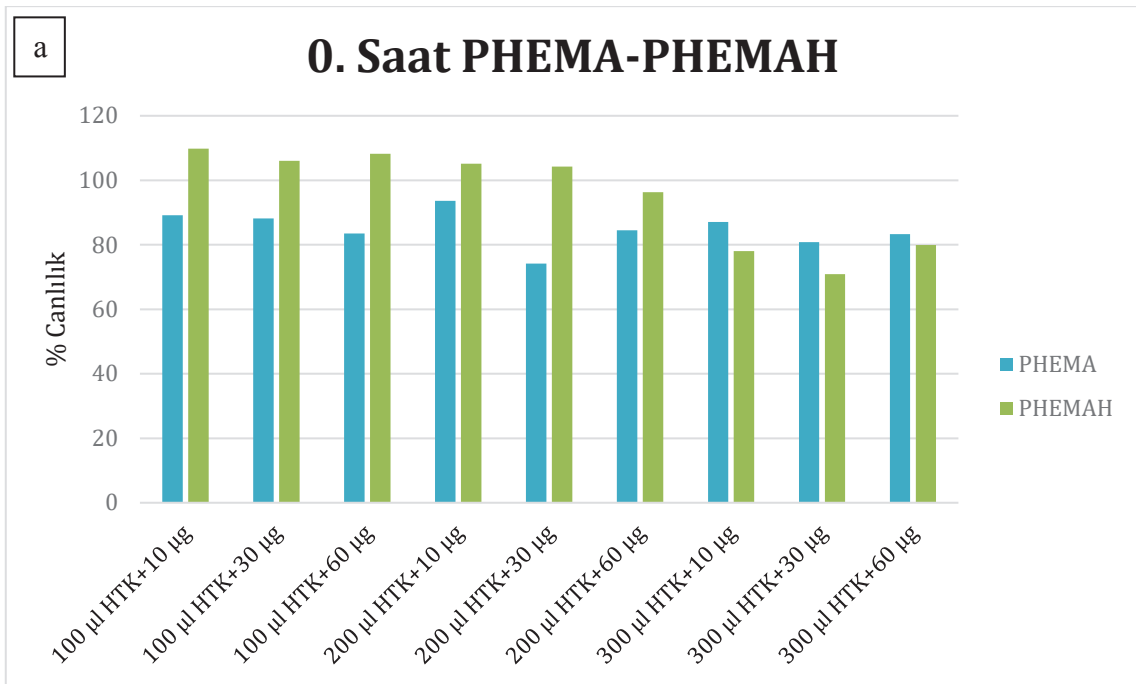
Şekil 32. HTK'nın farklı hacimleri ile farklı derişimlerde PHEMAH içeren HTK'nın karşılaştırılması, a) 0. Saat, b) 2. Saat, c) 24. Saat

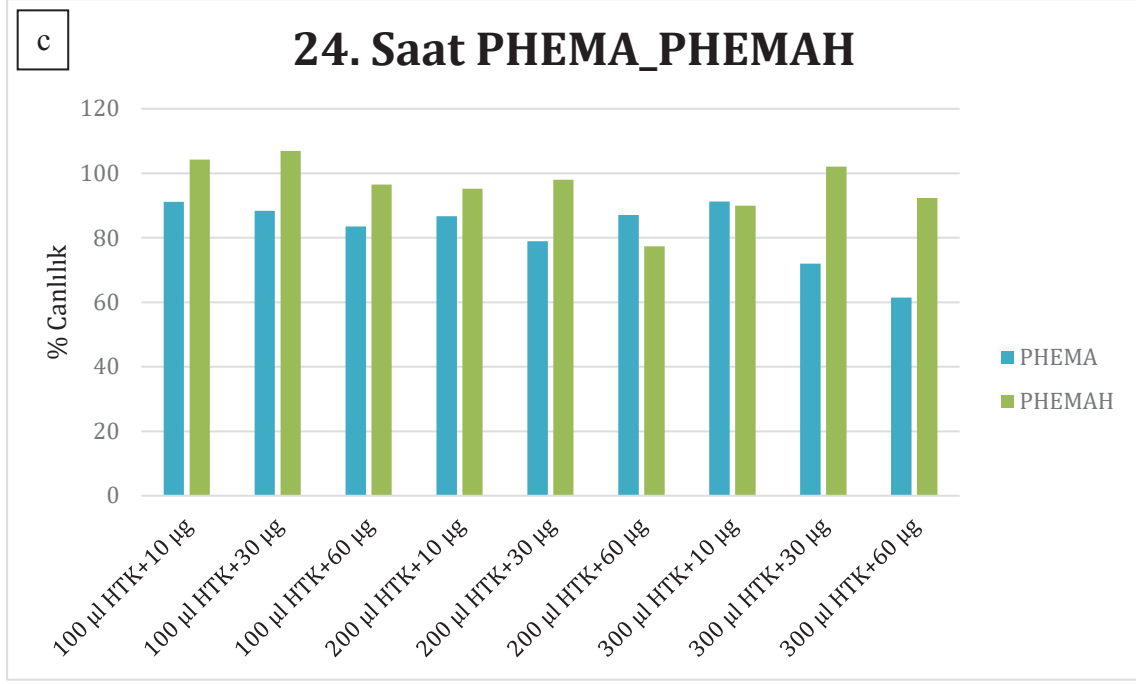


Şekil 33. PHEMAH örneklerine ait mikroskop görüntüleri (24. Saatte), a) NK, b) 200 µl HTK, c) 100 µl HTK+10 µg PHEMAH, d) 100 µl HTK+30 µg PHEMAH

Şekil 32a ile gösterilen 0. Saatteki yalnızca HTK eklenen kuyucuklara ait yüzde değerlerin, 2. Saate kıyasla yüksek olması MTT'nin ölmeye başlayan hücreleri canlı olarak gösterebilmesiyle açıklanabilir. 2. Saatte (Şekil 32b) yalnızca HTK içeren kuyucuklardaki canlılık yüzdesinin düşük olması bu yorumu doğrulamaktadır ve hücre ölümlerinin tamamlandığı şeklinde yorumlanabilir. Bu sonuçlar, kardiyoplejik bir ajandan beklenen metabolizmayı azaltma beklentisi ile uyumludur. HTK eklenen kuyucuklarda hacim arttıkça canlılığın daha az olduğunun görülmesi, bir kardiyoplejik ajandan beklenen metabolik aktiviteyi azaltması amacı ile uyumludur. Şekil 32b ile gösterilen MTT 2. Saat sonuçlarında PHEMAH içeren HTK örneklerinin tüm konsantrasyonlarında, yalnızca HTK uygulanan hücre örneklerine göre hücre canlılığı bakımından benzer sonuçlar elde edildiği görülmektedir. Kontrol besiyeri ortamına göre 30 µg/ml derişiminde PHEMAH içeren ve 100 µl olarak ekimi yapılan HTK örneğine ait sonuçların 2. ve 24. Saatlerde istatistiki olarak anlamlı olması nedeniyle en uygun konsantrasyon olduğundan söz edilebilir. Bu sonuçlar, kullanılacak HTK hacminin PHEMAH katkısıyla azaltılabileceği ve hücre canlılığı yönünden daha iyi sonuçlar elde edilebileceği yönünde yorumlanmaktadır. MTT Testinin 24. Saat sonuçlarında beklenti, hücre canlılığının %70'in üzerinde olmasıdır [121]. Bu durum, uygulanan örneğin sitotoksik potansiyelinin olmadığı yönünde değerlendirilir. Şekil 32c ile gösterilen verilerde tüm gruplarda hücre canlılığı seviyesinin beklentiyi karşıladığı görülmektedir. Ayrıca, HTK eklenen kuyucuklara kıyasla PHEMAH katkılı HTK'larda canlılığın anlamlı ölçüde iyi olması, PHEMAH katkısının HTK hacminde azalma amacına hizmet edebileceği potansiyelini doğrulamaktadır.

PHEMA ve PHEMAH polimerik nanopartiküllerinin HTK'ya kıyasla bir kardiyoplejik solüsyondan beklenen etkiyi artırabilme ve solüsyon hacminin azaltılabilmesi potansiyelinin olduğu fikrinin yanında sentez sırasında yapıya dâhil edilen MAH monomeri ile hazırlanan PHEMAH partiküllerinin hücre canlılığı parametresinde PHEMA'ya kıyaslanmasıyla elde edilen istatistiki veriler Şekil 34'de verilmiştir.





Şekil 34. PHEMA ve PHEMAH içeren HTK solüsyonlarının karşılaştırılması,
a) 0. Saat, b) 2. Saat, c) 24. Saat

PHEMA ve PHEMAH nanopartiküllerinin her ikisinin de bu nanopartikülleri içermeyen HTK solüsyonuna göre avantajlı olmasının yanı sıra birbirlerine göre uzun süreli etkileri kıyaslandığında 24. Saat MTT sonuçlarını gösterir verilerde (Şekil 34c) PHEMAH katkılı HTK örneklerinde MAH monomeri içermeyen PHEMA örneklerine nazaran anlamlı olarak daha iyi sonuçlar ölçülmüştür. Bu sonuç, PHEMAH içeriğindeki histidin afinitesi sağlayan MAH sayesinde adsorpsiyon kapasitesinin ve birlikte hareket edebilme potansiyelinin artışına bağlanabilir.

Kardiyak operasyonlarda kullanılan farklı özellikteki solüsyonlar arasında yapılan karşılaştırmalı çalışmalar, geleneksel yöntemlere nazaran kardiyopleji solüsyonlarının miyokard korumasındaki başarısını ortaya koymaktadır. Kalp kası hücrelerinde yapılan MTT çalışmalarında hiperkalemik kardiyoplejinin hücre sağkalımını desteklediği ve hücre koruyucu etkisinin bulunduğu ortaya konulmuştur [140]. Farklı kardiyopleji solüsyonlarının birbirlerine olan üstünlüğüyle ilgili tartışmalar güncelliğini korumakla birlikte polimerik nanopartikül katkılı bir solüsyon katkılı kardiyopleji tekniği literatürde yer almamaktadır.

Hazırlanan nanopartikül katkılı solüsyondan beklenen faydalar:

- 1- Mevcut klinik uygulamalarda hasta için tek dozda 1-2 litre olarak uygulanan kardiyopleji solüsyon miktarının düşürülebilmesi ile hemodilüsyon kaynaklı hemoglobin miktarında azalmanın ve operasyonel bir komplikasyon olan hücrel ödemin önüne geçilebilmesi,
- 2- Hücre canlılığını daha uzun süre koruyarak uzayan operasyonlarda yeniden dozlama gereksinimi ile operasyonun durdurulması zorunluluğunu gidermek, hücrel hasarı minimize edebilmek,
- 3- Daha az kardiyopleji kullanımı ile klinik kullanım maliyetlerinde düşüş sağlayabilmek tir.

Kalp cerrahisinde uygulanan geleneksel tedaviler, genellikle semptomatik kontrol sağlamak ile sınırlı kalmaktadır. Bu durum, miyokard hasarı için gerçek bir tedavi sunan yeni yöntemler geliştirmeyi zorunlu kılmaktadır [100]. Bu ihtiyaca cevap vermede yüksek biyouyumluluk, biyobozunurluk, kontrol edilebilirlik, özgüllük ve verimlilik gibi özellikleri sebebiyle potansiyel taşıyan nanoteknolojinin [103] çeşitli avantajlarından faydalanmayı amaçlayan çalışmalar yapılmaktadır. 30-100 nm boyutlarındaki hücre dışı lipit veziküller olan eksozomların miyokardiyumu iskemi kaynaklı hasardan koruyabildiklerini gösteren çalışmalar mevcuttur [99, 102].

Yao ve arkadaşları insülin benzeri bir büyüme faktörü (IGF-1) ile sentezledikleri poli(D, l-lactide-ko-glikolit) (PLGA) nanopartiküllerinin (PLGA-IGF-1) erken kardiyoprotektif etki sağladığını göstermişlerdir. Çalışmada nanoparçacık tabanlı teknolojinin miyokard infarktüsü tedavisinde yeni bir yaklaşım olmasının yanısıra iskemik kardiyovasküler hastalıklar için bu teknolojinin klinik terapiye dönüştürülmesindeki potansiyelinden bahsetmişlerdir. Bu çalışmada [100] kullanılan nanopartikül boyutunun 100 nm'den küçük olması miyokarda tutulumu sağlayarak kalp korumasını desteklemiştir. Kardiyoplejik bir ajan olan esmolol yüksek dozunun kardiyak mitokondri üzerindeki zararlı etkilerini araştırmak üzere yürütülen bir çalışmada magnezyum manyetik izotop (²⁵MgPMC16) nanopartikülü kullanılmış ve bu parçacığın hipoksinin neden olduğu asidotik koşullarda kardiyomiyositlerde magnezyum içeriğini serbest bırakarak kardiyak mitokondriyal membran üzerinde spesifik porfirin reseptörleri yoluyla oksijeni tükenmiş hücrelerde ATP üretimini desteklediğini göstermişlerdir [2].

4. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez kapsamında yürütülen çalışmalarda miniemülsiyon yöntemi ile PHEMA ve PHEMAH nanopartikülleri sentezlenmiştir. Sentezlenen partiküllerin karakterizasyonu için zeta boyut analizi, taramalı elektron mikroskobu (SEM), Fourier Transform İnfrared Spektroskopisi (FTIR), şişme deneyi ve yüzey alanı ölçümleri yapılmıştır. Ayrıca PHEMAH nanopartiküllerin L-histidin adsorpsiyon davranışı incelenmiştir. Farklı tampon çözeltilerin, başlangıç L-histidin derişiminin, adsorpsiyon süresinin ve sıcaklığın L-histidin adsorpsiyon kapasitesi üzerindeki etkisi gözlenmiştir.

Farklı derişimlerde nanopartikül içeren, farklı hacimlerdeki Histidin, Triptofan, Ketoglutarat (HTK) solüsyonuna ait örneklerin, 3-[4,5-dimetil-2-tiazolil]-2,5-difenil tetrazolyum bromid (MTT) Testi ile *in-vitro* etkileri, hücre canlılığı yüzdesi parametresinde karşılaştırılmıştır. Sentezlenen PHEMA ve PHEMAH katkılı kardiyopleji solüsyonlarının, HTK solüsyonuna kıyasla hücre canlılığı parametresinde üstünlüğü ortaya konulmuştur. 100, 200 ve 300 µl hacimleri denenen nanomodifiyeli solüsyonların yalnızca HTK ile muamele edilen hücrelere nazaran aynı ve daha az hacimlerde daha iyi hücre canlılığı sağlaması operasyon sırasında kullanılacak kardiyopleji miktarının azaltılması ve miyokard korunmasını desteklemesi hedefine yönelik umut vadetmektedir. Uygun nanopartikül derişiminin belirlenmesi için 10, 30 ve 60 µg/ml derişimlerine sahip polimerik nanopartiküller tüm hacimlerde ayrı ayrı denenmiştir. Tüm gruplar kıyaslandığında optimum derişimden söz etmek mümkün olmamaktadır. MTT testi hücre canlılığını tahmin etmede yararlı bir araçtır. Çünkü hücreler metabolik aktivitelerini sürdürmek ve hücre sel bütünlüğü desteklemek için sürekli bir enerji kaynağına ihtiyaç duyarlar [141]. Ancak MTT, hücre hasarının aşamaları arasında tam bir ayırım sağlamayabilir [138].

İleri çalışmalar için bazı öneriler sunulacak olursa:

- MTT testi biyolojik bir test olduğundan stabilite sağlamanın güç olması gerekçesiyle en uygun hacim ve derişim oranının belirlenmesi için çok sayıda tekrar yapılmalıdır.
- MTT sonuçlarını desteklemek üzere kalp korumasında önemli olan glikokaliks bütünlüğünün bir biyobelirteci olan sindekan-1 plazma seviyesinin gözlenmesi, kantitatif

olarak doğrulanması yerinde olacaktır.

- Bu tez çalışması kapsamında HUVEC hücre hattı ile gerçekleştirilen MTT deneylerinin miyokardiyal hücreler ile de yapılacak *in-vitro* deneylerle desteklenmesi faydalı olacaktır.

- Miyokard korumasının, uygulama hacminde sağlanabilecek azalma miktarının ve iskemi-reperfüzyon hasarının daha iyi bir değerlendirmesi için ve klinik uygulamada yer bulabilmesi amacıyla PHEMA/PHEMAH katkılı HTK solüsyonunun *in-vivo* alışmalarla desteklenmesi gerekmektedir.

- Pilot alışma sayılabilecek bu tezde kullanılan HTK solüsyonunun yanı sıra sonraki çalışmalarda farklı kardiyoleji solüsyonları ile karşılaştırmalı çalışmalar yapılması nanopartiküllerin kardiyopleji solüsyonlarında kullanımları konusunda geniş bir perspektif sunacaktır.

5. KAYNAKLAR

- [1] D.J. Chambers, H.B. Fallouh, Cardioplegia and cardiac surgery: Pharmacological arrest and cardioprotection during global ischemia and reperfusion, *Pharmacology & Therapeutics*, 127 (2010) 41–52.
- [2] S. Adeli, M.R. Zarrindast, H. Niknahad, S. Sarkar, S.A. Bidgoli, M. Korani, Ghasemzadeh, S.M. Rezayat, Protective effects of a magnesium magnetic isotope (Mg25)-exchanging nanoparticle (25MgPMC16) on mitochondrial functional disorders in esmolol-induced cardiac arrest in rats, *Autonomic & Autacoid Pharmacology*, 32 (2012) 1–7.
- [3] J. Babin-Ebell, K. Gimpel-Henning, H.H. Sirvers & M. Scharfschwerdt, Influence of clamp duration and pressure on endothelial damage in aortic cross-clamping, *Interactive Cardiovascular and Thoracic Surgery*, 10 (2010) 168–71.
- [4] S. Talwar, A. Bhoje, V. Sreenivas, N. Makhija, S. Aarav, S.K. Choudhary, B. Airan, Comparison of del nido and st thomas cardioplegia solutions in pediatric patients: a prospective randomized clinical trial, *Seminars in Thoracic Cardiovascular Surgery*, 29 (2017) 366–74.
- [5] J. Ramani, A. Malhotra, V. Wadhwa, P. Sharma, P. Garg, M. Tarsaria, H. Pandya, Single dose lidocaine based blood cardioplegia in single valve replacement patients, *Brazilian Journal of Cardiovascular Surgery*, 32 (2017) 90–5.
- [6] N.T. Kouchoukos, E.H. Blackstone, D.B. Doty, F.L. Hanley, R.B. Karp, Myocardial management during cardiac surgery with cardiopulmonary bypass, *Kirklin/Barratt Boyes Cardiac Surgery*, Third Edition, Philadelphia, Churchill Livingstone, 1 (2003) 131-62.
- [7] K. Bonhoeffer, K. Standfuss, P.G. Spieckerman, Der sauerstoffverbrauch des hunderherzens nach kardioplegie durch extrazellularen natriument-zug und novocain applikation, *Pflugers Arch Ges Physiol*, 281 (1964) 19.
- [8] H.J. Bretschneider, Myocardial protection, *The Thoracic and Cardiovascular Surgeon*, 28 (1980) 295-302.
- [9] H.J. Bretschneider, G. Hubner, D. Knoll, B. Lohr, H. Nordbeck, P.G. Spieckermann, Myocardial resistance and tolerance to ischemia, Physiological and biochemical basis, *The Journal of Cardiovascular Surgery*, 16 (1975) 241-60.
- [10] F.J. Lewis & M. Taufic, Closure of atrial septal defects with the aid of hypothermia; experimental accomplishments and the report of one successful case, *Surgery*, 33 (1953) 52–9.

- [11] Jr. J.H. Gibbon, Application of a mechanical heart and lung apparatus to cardiac surgery, *Minnesota Medicine*, 37 (1954) 171–85.
- [12] A.M. Katz, & M. Tada, The “stone heart”: A challenge to the biochemist, *American Journal of Cardiology*, 29 (1972) 578–80.
- [13] D.G. Melrose, B. Dreyer, H.H. Bentall, J.B. Baker, Elective cardiac arrest, *Lancet*, 269 (1955) 21-2.
- [14] C.W. Lillehei, R.A. Dewall, V.L. Gott, R.L. Varco, The direct vision correction of calcific aortic stenosis by means of a pump-oxygenator and retrograde coronary sinus perfusion, *Diseases of the Chest*, 30 (1956) 123-32.
- [15] C.A. Hufnagel, P.W. Conrad, J. Schanno, J. Pifarre, Profound cardiac hypothermia, *Annals of Surgery*, 153 (1961) 790-6.
- [16] C.J. Preusse, Cardioplegia with an intracellular formulation. In H.M. Piper, & C.J. Preusse (Eds.), *Ischemia–reperfusion in cardiac surgery*, Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 107–134, 1993.
- [17] D.J. Chambers & D. J. Hearse, Cardioplegia and surgical ischemia. In N. Sperelakis, Y. Kurachi, A. Terzic & M. V. Cohen (Eds.), *Heart physiology and pathophysiology*, Fourth ed. San Diego: Academic Press, 887–925, 2001.
- [18] T. Sondergaard, A. Senn, Klinische Erfahrungen in der Kardioplegie nach Bretschneider, *Langenbeck’s Archiv für klinische Chirurgie*, 319 (1967) 661-5.
- [19] U. Kirsch, Untersuchungen zum eintritt der totenstarre an ischaemischen meerschweinchenherzen in normothermie, Der einfluss von procain, kalium, und magnesium, *Arzneimforsch*, 20 (1970) 1071-4.
- [20] W.G. Nayler, R. Ferrari, A. Williams, Protective effect of pretreatment with verapamil, nifedipine and propranolol on mitochondrial function in the ischemic and reperfused myocardium, *American Journal of Cardiology*, 46 (1980) 242-8.
- [21] D.J. Hearse, K. O'Brien & M.V. Braimbridge, Protection of the myocardium during ischemic arrest. Dose–response curves for procaine and lignocaine in cardioplegic solutions. *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 81 (1981) 873–9.
- [22] D.J. Chambers & M.V. Braimbridge, Cardioplegia with an extracellular formulation. In H. M. Piper, & C. J. Preusse (Eds.), *Ischemia–reperfusion in cardiac surgery*, AA Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 135–79, 1993.
- [23] G.F. Tyers, G.J. Todd, I.M. Niebauer, N.J. Manley & J.A. Waldhausen, The mechanism of myocardial damage following potassium citrate (Melrose) cardioplegia, *Surgery* 78 (1975) 45–53.
- [24] R.E. Clark, I.Y. Christlieb, T.B. Ferguson, C.S. Weldon, J.P. Marbarger, D.R. Biello, R. Roberts, P. Ludbrook, B.E. Sobel, The first American clinical trial of

- nifedipine in cardioplegia. A report of the first 12-month experience, *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 82 (1981) 848-59.
- [25] R.E. Clark, T.B. Ferguson, P.N. West, R.C. Shuchleib, P.D. Henry. Pharmacological preservation of the ischemic heart, *The Annals of Thoracic Surgery*, 24 (1977) 307-14.
- [26] B.B. Roe, J.C. Hutchinson, N.H. Fishman, D.J. Ulliyot, D.L. Smith, Myocardial protection with cold, ischemic, potassium-induced cardioplegia, *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 73 (1977) 366-74.
- [27] Jr. W.A. Gay, P.A. Ebert, Functional, metabolic, and morphologic effects of potassium-induced cardioplegia, *Surgery*, 74 (1973) 284-90.
- [28] D.J. Hearse, D.A. Stewart, M.V. Braimbridge, Cellular protection during myocardial ischemia: the development and characterization of a procedure for the induction of reversible ischemic arrest, *Circulation*, 54 (1976) 193-202.
- [29] M.V. Braimbridge, J. Chayen, L. Bitensky, D.J. Hearse, P. Jynge & Cankovic-Darracott, S. Cold cardioplegia or continuous coronary perfusion? Report on preliminary clinical experience as assessed cytochemically. *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 74 (1977) 900-6.
- [30] N. Bleese, V. Doring, P. Kalmar, H.J. Krebber, H. Pokar, G. Rodewald, Clinical application of cardioplegia in aortic cross-clamping periods longer than 150 minutes. *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 27 (1979) 390-2.
- [31] G.D. Buckberg, A proposed "solution" to the cardioplegic controversy. *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 77 (1979) 803-15.
- [32] A. Robinson, G.D. Schwarz, D.B. Goddard, W.H. Fleming & T.A. Galbraith, Myocardial protection for acquired heart disease surgery: Results of a national survey. *The Annals of Thoracic Surgery*, 59 (1995) 361-72.
- [33] D.M. Follette, D.G. Mulder, J.V. Maloney & G.D. Buckberg, Advantages of blood cardioplegia over continuous coronary perfusion or intermittent ischemia: Experimental and clinical study, *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 76 (1978) 604-19.
- [34] G.D. Buckberg, B.S. Allen & F. Beyersdorf, Blood cardioplegic strategies during adult cardiac operations. In H. M. Piper & C.J. Preusse (Eds.), *Ischemia-reperfusion in cardiac surgery*, AA Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 181-227, 1993.
- [35] S. Karthik, A.D. Grayson, A.Y. Oo & B.M. Fabri, A survey of current myocardial protection practices during coronary artery bypass grafting, *Annals of the Royal College of Surgeons of England*, 86 (2004) 413-15.
- [36] H.C. Lawrence, M.M. Robert, J. Salik, D.L. Robert, *Cardiac surgery in the adult*, Third Edition, Mc Graw Hill, 444-63, 2008.

- [37] C. Walker, F. Spinale, The structure and function of the cardiac myocyte: A review of fundamental concepts, *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 118 (1999) 375–82.
- [38] J.M. Craver, B.L. Bufkin, W.S. Weintraub, R.A. Guyton, Neurologic events after coronary bypass grafting: further observations with warm cardioplegia. *The Annals of Thoracic Surgery*, 59 (1995) 1429-33.
- [39] E.N. Marieb, K. Hoehn, Cardiac Muscle Fibers, In: S. Beauparlant (Ed), *Human Anatomy & Physiology*, Ninth Edition Pearson, Boston, 671-74, 2013.
- [40] K. Barret, H. Brooks, S. Boitano, S. Barman, Excitable Tissue: Muscle. In: *Ganong's Review of Medical Physiology*, Twenty-Third Edition, McGraw-Hill, LANGE, New York, 93-113, 2010.
- [41] S. Barlas, E. Tireli, E. Dayıoğlu, C. Barlas, Miyokard korunması-II: Miyokard metabolizması ve harabiyeti, *GKD Cerrahisi Dergisi*, 2 (1994) 313-7.
- [42] P.G. Gravlee, R.F. Davis, A.H. Stammers, *Cardiopulmonary bypass: principles and practice*, Third Edition, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 172-89, 2008.
- [43] G. Veres, T. Radovits, B. Merkely, M. Karck and G. Szabó, Custodiol-N, the novel cardioplegic solution reduces ischemia/reperfusion injury after cardiopulmonary bypass, *Journal of Cardiothoracic Surgery*, 10 (2015) 27.
- [44] R.M. Mentzer, M.S. Jahania, R.D. Lasley, *Myocardial protection, Cardiac Surgery In the Adult (Cohn LH)*, Third Edition, New York, McGraw-Hill Medical, Vol 1, 443-464, 2008.
- [45] J. Vinten-Johansen, Whole blood cardioplegia: do we still need to dilute? *The Journal of Extracorporeal Technology*, 48 (2016) 9–14.
- [46] K. Kuna, B. Clifford, G. Patrick, S. Mick. Use of del nido cardioplegia for adult cardiac surgery at the cleveland clinic: perfusion implications. *The Journal of Extracorporeal Technology*, 46 (2014) 317–23.
- [47] M. Avkiran, D.J. Hearse, Protection of the myocardium during global ischemia. Is crystalloid cardioplegia effective in the immature myocardium? *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 97 (1989) 220-8.
- [48] R.D. Kempford, D.J. Hearse, Protection of the immature heart. Temperature-dependent beneficial or detrimental effects of multidose crystalloid cardioplegia in the neonatal rabbit heart, *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 99 (1990) 269-79.
- [49] K. Amark, H. Berggren, K. Bjork, A. Ekroth, R. Ekroth, K. Nilsson, J. Sunnegårdh, Blood cardioplegia provides superior protection in infant cardiac surgery, *The Annals of Thoracic Surgery*, 80 (2005) 989-94.

- [50] T. Fujiwara, T. Kurtts, W. Anderson, J. Heinle, Jr. J.E. Mayer, Myocardial protection in cyanotic neonatal lambs, *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 96 (1988) 700-10.
- [51] P. Julia, H.H. Young, G.D. Buckberg, E.R. Kofsky, H.I. Bugyi, Studies of myocardial protection in the immature heart. IV. Improved tolerance of immature myocardium to hypoxia and ischemia by intravenous metabolic support, *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 101 (1991) 23-32.
- [52] E. Kofsky, P. Julia, G.D. Buckberg, H. Young, D. Tixier, Studies of myocardial protection in the immature heart, V. Safety of prolonged aortic clamping with hypocalcemic glutamate/aspartate blood cardioplegia, *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 101 (1991) 33-43.
- [53] E. Braunwald, The stunned myocardium: Newer insights into mechanisms and clinical implications (letter to the editor), *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 100 (1990) 310-1.
- [54] E. Braunwald, R.A. Kloner, The stunned myocardium: prolonged, postischemic ventricular dysfunction, *Circulation*, 66 (1982) 1146-9.
- [55] R.B. Jennings, H.M. Sommers, P.B. Herdson, J.P. Kaltenbach, Ischemic injury of myocardium, *Annals of the New York Academy Sciences*, 156 (1969) 61-78.
- [56] R.B. Jennings, H.M. Sommers, G.A. Smyth, H.A. Flack, H. Linn, Myocardial necrosis induced by temporary occlusion of a coronary artery in the dog, *Archives of Pathology*, 70 (1960) 68-78.
- [57] J.F. Kerr, A.H. Wyllie, A.R. Currie, Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics, *British Journal of Cancer*, 26 (1972) 239-57.
- [58] A. Haunstetter, S. Izumo, Apoptosis: basic mechanisms and implications for cardiovascular disease, *Circulation Research*, 82 (1998) 1111-29.
- [59] R.A. Gottlieb, K.O. Burleson, R.A. Kloner, B.M. Babior, R.L. Engler, Reperfusion injury induces apoptosis in rabbit cardiomyocytes, *The Journal of Clinical Investigation*, 94 (1994) 1621-8.
- [60] S. Verma, P.W. Fedak, R.D. Weisel, J. Butany, V. Rao, A. Maitland, R.K. Li, B. Dhillon, T.M. Yau, Fundamentals of reperfusion injury for the clinical cardiologist, *Circulation*, 105 (2002) 2332-6.
- [61] H. Aebert, T. Cornelius, D.E. Birnbaum, A.V. Siegel, G.A. Riegger, H. Schunkert, Induction of early immediate genes and programmed cell death following cardioplegic arrest in human hearts, *European Journal of Cardiothoracic Surgery*, 12 (1997) 261-7.

- [62] F.L. Rosenfeldt, The relationship between myocardial temperature and recovery after experimental cardioplegic arrest, *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 84 (1982) 656–66.
- [63] M. Johnson, T. Haddix, T. Pohlman, E.D. Verrier, Hypothermia reversibly inhibits endothelial cell expression of E-selectin and tissue factor, *Journal of Cardiac Surgery*, 10 (1995) 428-35.
- [64] G.D. Buckberg, J.R. Brazier, R.L. Nelson, S.M. Goldstein, D.H. McConnell, N. Cooper, Studies of the effects of hypothermia on regional myocardial blood flow and metabolism during cardiopulmonary bypass, I. The adequately perfused beating, fibrillating and arrested heart, *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 73 (1977) 87-94.
- [65] Y.D. Durandy, Is there a rationale for short cardioplegia re-dosing intervals? *World Journal of Cardiology*, 7 (2015) 658-64.
- [66] E. Ovrum, G. Tangen, S. Tollofsrud, R. Oystese, M.A. Ringdal, R. Istad, Cold blood cardioplegia versus cold crystalloid cardioplegia: a prospective randomized study of 1440 patients undergoing coronary artery bypass grafting, *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 128 (2004) 860-5.
- [67] N. Hayashida, H. Tomoeda, T. Oda, E. Tayama, S. Chihara, K. Akasu, T. Kosuga, E. Kai, S. Aoyagi, Effects of supplemental L-arginine during warm blood cardioplegia, *Annals of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 6 (2000) 27-33.
- [68] H.B. Fallouh, J.C. Kentish, D.J. Chambers, Targeting for cardioplegia: arresting agents and their safety, *Current Opinion in Pharmacology*, 9 (2009) 220-6.
- [69] F.F. Viana, W.Y. Shi, P.A. Hayward, M.E. Laobina, F. Liskaser, G. Matalanis, Custodiol versus blood cardioplegia in complex cardiac operations: an Australian experience. *European Journal of Cardiothoracic Surgery*, 43 (2013) 526-31.
- [70] M.M. Gebhard, C.J. Preusse, P.A. Schnabel, H.J. Bretschneider, Different effects of cardioplegic solution HTK during single or intermittent administration. *The Thoracic and Cardiovascular Surgeon*, 32 (1984) 271-6.
- [71] B.W. Hummel, R.W. Buss, P.L. DiGiorgi, N.A. Yaeger, M. L. Lucas, G.M. Comas, Myocardial Protection and Financial Considerations of Custodiol Cardioplegia in Minimally Invasive and Open Valve Surgery, *Innovations*, 11 (2016) 420–4.
- [72] D.J. Chambers, Mechanisms and alternative methods of achieving cardiac arrest, *The Annals of Thoracic Surgery*, 75 (2003) 661-6.
- [73] B. Ji, J. Liu, C. Long, K. Yang, Z. Zheng, Potential risk of hyponatremia using histidine-tryptophan-ketoglutarate solution during pediatric cardiopulmonary bypass, *The Annals of Thoracic Surgery*, 93 (2012) 2120-1.

- [74] J.T. Kim, Y.H. Park, Y.E. Chang, et al. The effect of cardioplegic solution-induced sodium concentration fluctuation on postoperative seizure in pediatric cardiac patients, *The Annals of Thoracic Surgery*, 91 (2011) 1943-8.
- [75] J. Liu, Z. Feng, J. Zhao, B. Li, C. Long, The myocardial protection of HTK cardioplegic solution on the long-term ischemic period in pediatric heart surgery, *ASAIO Journal*, 54 (2008) 470-3.
- [76] M.L. Lima, A.I. Fiorelli, D.V. Vassallo, B.B. Pinheiro, N.A. Stolf, O.M. Gomes, Comparative experimental study of myocardial protection with crystalloid solutions for heart transplantation, *Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular*, 27 (2012) 110-6.
- [77] J. Ackemann, W. Gross, M. Mory, M. Schaefer, M.M. Gebhard, Celsior versus custodiol: early postischemic recovery after cardioplegia and ischemia at 5 degrees C, *The Annals of Thoracic Surgery*, 74 (2002) 522-9.
- [78] G. Scrascia, P. Guida, C. Rotunno, M. De Palo, F. Mastro, A. Pignatelli, L. de Luca Tupputi Schinosa, D. Paparella, Myocardial protection during aortic surgery: comparison between Bretschneider-HTK and cold blood cardioplegia, *Perfusion*, 26 (2011) 427-33.
- [79] S. Siddiqi, E.H. Blackstone, F.G. Bakaeen, Bretschneider and del Nido solutions: Are they safe for coronary artery bypass grafting? If so, how should we use them? *Journal of Cardiac Surgery*, 33 (2018) 229–34.
- [80] S. Gunaydin, K. McCusker, Long Term Protective Effects of Single/Multi-Dose Cardioplegic Solutions in Cell Culture Models, *Cardiology*, 140:33-34, Proceedings of Heart Valve Society Meeting, NY, 2018.
- [81] S. Logothetidis, Nanotechnology in Medicine: The Medicine of Tomorrow and Nanomedicine, *Hippokratia*, 10 (2006) 7-21.
- [82] V. Wagner, A. Dullaart, A.K. Bock, A. Zweck, The emerging nanomedicine landscape, *Nature Biotechnology*, 24 (2006) 1211–17.
- [83] A.E. Nel, L. Madler, D. Velegol, T. Xia, E.M.V. Hoek, P. Somasundaran, F. Klaessig, V. Castranova, M. Thompson, Understanding biophysicochemical interactions at the nano–bio interface, *Nature Materials*, 8 (2009) 543–57.
- [84] J. Shi, A.R. Votruba, O.C. Farokhzad, R. Langer, Nanotechnology in drug delivery and tissue engineering: from discovery to applications, *Nano Letters*, 10 (2010) 3223–30.
- [85] S. Patel, R. Nanda, S. Sahoo, Nanotechnology in Healthcare: Applications and Challenges, *Medicinal Chemistry*, 5 (2015) 528-33.
- [86] B. Karn, T. Kuiken, M. Otto, Nanotechnology and in Situ Remediation: A Review of the Benefits and Potential Risks, *Environ Health Perspect*, 117 (2009) 1823–31.

- [87] A.P. Ramos, M.A.E Cruz, C.B. Tovani, P. Ciancaglini, Biomedical applications of nanotechnology, *Biophysical Reviews*, 9 (2017) 79–89.
- [88] S. Logothetidis, Nanotechnology in Medicine: The Medicine of Tomorrow and Nanomedicine, *Hippokratia*, 10 (2006) 7-21.
- [89] S. Mishra, Nanotechnology in medicine, *Indian Heart Journal*, 68 (2016) 437–39.
- [90] D.S. Kohane, Microparticles and nanoparticles for drug delivery, *Biotechnology and Bioengineering*, 96 (2007) 203–9.
- [91] S. Mitragotri, J. Lahann, Physical approaches to biomaterial design, *Nature Materials*, 8 (2009) 15–23.
- [92] P. Decuzzi, B. Godin, T. Tanaka, S.Y. Lee, C. Chiappini, X. Liu, M. Ferrari, Size and shape effects in the biodistribution of intravascularly injected particles, *Journal of Controlled Release*, 141 (2010) 320–7.
- [93] R.A. Petros, J.M. DeSimone, Strategies in the design of nanoparticles for therapeutic applications, *Nature Reviews. Drug Discovery*, 9 (2010) 615–27.
- [94] M.L. Schipper, G. Iyer, A.L. Koh, Z. Cheng, Y. Ebenstein, A. Aharoni, S. Keren, L.A. Bentolila, J. Li, J. Rao, X. Chen, U. Banin, A.M. Wu, R. Sinclair, S. Weiss, S.S. Gambhir, Particle size, surface coating, and PEGylation influence the biodistribution of quantum dots in living mice, *Small*, 5 (2009) 126–34.
- [95] A.K. Bajpai, J. Choubey, Design of gelatin nanoparticles as swelling controlled delivery system for chloroquine phosphate, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 17 (2006) 345–58.
- [96] D.M. Bowman & G.A. Hodge, A Small Matter of Regulation: An International Review of Nanotechnology Regulation, *The Columbia Science and Technology Law Review*, Vol. VIII, 2007.
- [97] W. Muhammad, M. Haroon, M. Shah, M.A. Ullah, I. Haleem, Potential Application of Nanotechnology in Health Care: An Insight, *Nanoscale Reports*, 1 (2018) 1-8.
- [98] D.M. Yellon, S.M. Davidson, Exosomes: Nanoparticles Involved in Cardioprotection? *Circulation Research*, 114 (2014) 325-32.
- [99] D.M. Yellon, D.J. Hausenloy, Myocardial reperfusion injury, *The New England Journal of Medicine*, 357 (2007) 1121–35.
- [100] M.Y. Chang, Y.J. Yang, C.H. Chang, A.C.L. Tang, W.Y. Liao, F.Y. Cheng, C.S. Yeh, J.J. Lai, P.S. Stayton, P.C.H. Hsieh, Functionalized nanoparticles provide early cardioprotection after acute myocardial infarction, *Journal of Controlled Release*, 170 (2013) 287–294.

- [101] S.J. Gould, A.M. Booth, J.E. Hildreth, The Trojan exosome hypothesis, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U S A*, 100 (2003) 10592–97.
- [102] L. Chen, Y. Wang, Y. Pan, L. Zhang, C. Shen, G. Qin, M. Ashraf, N. Weintraub, G. Ma, Y. Tang, Cardiac progenitor-derived exosomes protect ischemic myocardium from acute ischemia/reperfusion injury, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 431 (2013) 566–71.
- [103] P. Keyhanvar, N. Bohlouli, S. Bahrami, A. Yousefzadeh, S. Madadi, Application of Nanotechnology in Device Promotion in Cardiology: A Promising Horizon for Nanocardiology toward Personalized Medicine, *Iranian Heart Journal*, 16 (2015) 45-53.
- [104] K.E. Geckeler, J. Stirn, Polyreaktionen – Mechanismen, Systematik, Relevanz, *Naturwissenschaften*, 80 (1993) 487–500.
- [105] S.A. Wickline, A.M. Neubauer, P. Winter, S. Caruthers, G. Lanza, Applications of Nanotechnology to Atherosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology, *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 26 (2006) 435-41.
- [106] J.P. Rao, K.E. Geckeler, Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters, *Progress in Polymer Science*, 36 (2011) 887–913.
- [107] J. Kreuter, On the mechanism of termination in heterogeneous polymerization, *Journal of Polymer Science Polymer Letters Edition*, 20 (1982) 543–5.
- [108] L.B. Bangs, *Uniform Latex Particles*, Indianapolis: Seragen Diagnostics Inc, ABD, 1987.
- [109] K. Lendfester, Miniemulsion Polymerization and the Structure of Polymer and Hybrid Nanoparticles, *Angewandte Chemie*, 48 (2009) 4488–507.
- [110] I. Tranoudis, N. Efron, Water properties of soft contact lens materials, *Contact Lens Anterior Eye*, 27 (2004) 193-208.
- [111] L.G. Bach, M.R. Islam, Y.T. Jeong, Y.S. Gal, K.T. Lim, Synthesis and characterization of chemically anchored adenosine with PHEMA grafted gold nanoparticles, *Applied Surface Science*, 258 (2012) 2816–22.
- [112] L. Zhang, G.J. Zheng, Y.T. Guo, L. Zhou, J. Du, H. He, Preparation of novel biodegradable pHEMA hydrogel for a tissue engineering scaffold by microwave-assisted polymerization, *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 7 (2014) 136-40.
- [113] Z. Li, J. Guan, Hydrogels for Cardiac Tissue Engineering, *Polymers*, 3 (2011) 740-61.

- [114] M. Gümüşderelioğlu, S. Çakmak, H.Ö. Timuçin & A.S. Çakmak, Thermosensitive PHEMA microcarriers: ATRP synthesis, characterization, and usabilities in cell cultures. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 24 (2013) 2110-25.
- [115] K.F. Chou, C.C. Han, S. Lee, Water transport in crosslinked 2- hydroxyethyl methacrylate, *Polymer Engineering Science*, 40 (2000) 1004-14.
- [116] R. Chouhan, A. Bajpai, Real time in vitro studies of doxorubicin release from PHEMA nanoparticles, *Journal of Nanobiotechnology*, 7 (2009) 5.
- [117] A.S. Walker, M.A. Blue, T.A. Brandon, J. Emmanuel, E.J. Guilbeau, Performance of a hydrogel composite pericardial substitute after long-term implant studies, *ASAIO Journal*, 38 (1992) 550-4.
- [118] X. Meng, D.A. Stout, L. Sun, R.L. Beingessner, H. Fenniri, T.J. Webster, Novel injectable biomimetic hydrogels with carbon nanofibers and self assembled rosette nanotubes for myocardial applications, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 101 (2013) 1095-102.
- [119] D. Horák, J. Kroupová, M. Šlouf, P. Dvorák, Poly(2-hydroxyethyl methacrylate)-based slabs as a mouse embryonic stem cell support, *Biomaterials*, 25 (2004) 5249–60.
- [120] J. Carmichael, W.G. DeGraff, A.F. Gazdar, J.D. Minna, J.B. Mitchell, Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing, *Cancer Research*, 47 (1987) 936–42.
- [121] TS EN ISO 10993-5 Tıbbi Cihazların Biyolojik Değerlendirmesi Bölüm 5: İn Vitro Sitotoksitate Deneyleri, 2010.
- [122] I. Göktürk, V. Karakoç, M.A. Onur & A. Denizli, Characterization and cellular interaction of fluorescent-labeled PHEMA nanoparticles, *Artificial Cells Nanomedicine and Biotechnology*, 41 (2013) 78–84.
- [123] E.T. Özer, A. Göçenoğlu Sarıkaya & B. Osman, Adsorption and removal of diethyl phthalate from aqueous media with poly(hydroxyethyl methacrylate) nanobeads, *Desalination and Water Treatment*, 57 (2016) 1-11.
- [124] R. Chouhan, A.K. Bajpai, An in vitro release study of 5-fluoro-uracil (5-FU) from swellable poly-(2-hydroxyethyl methacrylate) (PHEMA) nanoparticles, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 20 (2009) 1103–14.
- [125] E. Yilmaz, L. Uzun, A. Yousefi Rad, U. Kalyoncu, S. Ünal & A. Denizli, Specific adsorption of the autoantibodies from rheumatoid arthritis patient plasma using histidine-containing affinity beads, *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 19 (2008) 875-92.

- [126] A. Bal, B. Özkahraman, M.K. Gök, I. Acar, Sodyum Akrilat Esaslı Hidrojel ve Kriyojellerin Şişme, Adsorpsiyon ve Mekanik Özelliklerinin İncelenmesi, Pamukkale University Journal of Engineering Sciences 20 (2014) 258-65.
- [127] ICH Harmonised Tripartite Guideline Validation of Analytical Procedures: Text And Methodology Q2(R1), 2005.
- [128] Z. Shi, H. Li, Z. Li, J. Hu, H. Zhang, Pre-column Derivatization RP-HPLC Determination of Amino Acids in Asparagi Radix before and after Heating Process, IERI Procedia 5 (2013) 351-56.
- [129] A. Jámbor, I. Molnár-Perl, Amino acid analysis by high-performance liquid chromatography after derivatization with 9-fluorenylmethyloxycarbonyl chloride Literature overview and further study, Journal of Chromatography A, 1216 (2009) 3064-77.
- [130] P. Edman, G. Begg, A protein sequenator, European Journal of Biochemistry, 1 (1967) 80-91.
- [131] S. Tang, L. Kong, J. Ou, Y. Liu, X. Li, H. Zou, Application of cross-linked β -cyclodextrin polymer for adsorption of aromatic amino acids, Journal of Molecular Recognition, 19 (2006) 39-48.
- [132] K. Imamura, T. Mimura, M. Okamoto, T. Sakiyama, K. Nakanishi, Adsorption Behavior of Amino Acids on a Stainless Steel Surface, Journal of Colloid and Interface Science, 229 (2000) 237-46.
- [133] M. D. Saikia, Studies on adsorption of amino acids on β -cyclodextrin bonded to silica particles, Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 329 (2008) 177-83.
- [134] L. Uzun, R. Say, A. Denizli, Porous poly(hydroxyethyl methacrylate) based monolith as a new adsorbent for affinity chromatography, Reactive & Functional Polymers, 64 (2005) 93-102.
- [135] N. Bereli, L. Uzun, H. Yavuz, A. Elkak, A. Denizli, Antibody Purification Using Porous Metal-Chelated Monolithic Columns, Journal of Applied Polymer Science, 101 (2006) 395-404.
- [136] Ş. Öncel, L. Uzun, B. Garipcan & A. Denizli, Synthesis of Phenylalanine-Containing Hydrophobic Beads for Lysozyme Adsorption, Industrial & Engineering Chemistry Research, 44 (2005) 7049-56.
- [137] A. Elkak & S. Ismail, L. Uzun, A. Denizli, Adsorption Study of Immunoglobulin G Subclasses from Different Species by Pseudobioaffinity Separation on Histidyl-Bisoxirane-Sepharose, Chromatographia, 69 (2009) 11-12.

- [138] M.G. Stevens, S.C. Olsen, Comparative analysis of using MTT and XTT in colorimetric assays for quantitating bovine neutrophil bactericidal activity, *Journal of Immunological Methods*, 157 (1993) 225–31.
- [139] S. Akgöl, Y. Kaçar, S. Özkara, H. Yavuz, A. Denizli, M. Y. Arica, Immobilization of catalase via adsorption onto l-histidine grafted functional pHEMA based membrane, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 15 (2001) 197–206.
- [140] L.A. Gomez, A.E. Alekseev, L.A. Aleksandrova, P.A. Brady, A. Terzic, Use of the MTT Assay in Adult Ventricular Cardiomyocytes to Assess Viability: Effects of Adenosine and Potassium on Cellular Survival, *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 29 (1997) 1255–66.
- [141] H.M. Piper, P. Schwartz, S. Berthold, Energy Metabolism and hypoxic injury of cardiomyocytes, In: H.M. Piper and G. Isenberg (eds), *Isolated Adult Cardiomyocytes Structure and Metabolism Vol 1*, CRC, Florida, 259–85, 1989.



HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS/~~DOKTORA~~ TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
NANOTEKNOLOJİ VE NANOTIP ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI'NA

Tarih: 14.06.2019

Tez Başlığı / Konusu: Nanomodifiyeledi Kardiyopleji Solüsyonunun Miyokard
Korunmasındaki Etkisinin Gözetilmesi

Yukarıda başlığı/konusu gösterilen tez çalışmamın a) Kapak sayfası, b) Giriş, c) Ana bölümler d) Sonuç kısımlarından oluşan toplam 71 sayfalık kısmına ilişkin, 13/06/2019 tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 9'dur.

Uygulanan filtrelemeler:

- 1- Kaynakça hariç
- 2- Alıntılar hariç/~~dâhil~~
- 3- 5 kelimedenden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Çalışması Orijinallik Raporu Alınması ve Kullanılması Uygulama Esasları'nı inceledim ve bu Uygulama Esasları'nda belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini saygılarımla arz ederim.

14.06.2019
Tarih ve İmza

Adı Soyadı: Zuleyha YAVUZ
Öğrenci No: N13222055
Anabilim Dalı: Nanoteknoloji ve Nanotip
Programı: Yüksek Lisans Öğrencisi
Statüsü: Y.Lisans Doktora Bütünleşik Dr.

DANIŞMAN ONAYI

UYGUNDUR.

Prof. Dr. İbrahim VARGEL

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Züleyha YAVUZ
Doğum yeri : Ankara
Doğum tarihi : 06.10.1986
Medeni hali : Bekâr
Yazışma adresi : Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu, Analiz ve Kontrol
Laboratuvarları Dairesi Başkanlığı, Sağlık Mah. Adnan
Saygun Cad. No:55 Çankaya/ANKARA
Telefon : +90 507 873 00 60
Elektronik posta adresi : zulehayavuz@yandex.com
Yabancı dili : İngilizce

EĞİTİM DURUMU

Lisans : 2004-2008 Selçuk Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji
Bölümü, Konya
Yüksek Lisans : 2014-2019 Hacettepe Üniversitesi, Nanoteknoloji ve Nanotıp
Anabilim Dalı, Ankara

İŞ DENEYİMİ

2013 Ocak – Temmuz : T.C. Sağlık Bakanlığı, Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, Burdur.
2013 Temmuz – --- : T.C. Sağlık Bakanlığı, Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu,
Ankara.

