

**ANTİTROMBOJENİK NANOKOMPOZİT KALP KAPAKÇIK
MALZEMELERİNİN GELİŞTİRİLMESİ**

**DEVELOPMENT OF ANTITHROMBOGENIC
NANOCOMPOSITE HEART VALVE LEAFLET MATERIALS**

AHSEN SEYREK

PROF. DR. HALİL MURAT AYDIN

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

Ailem'e...

ÖZET

ANTİTROMBOJENİK NANOKOMPOZİT KALP KAPAKÇIK MALZEMELERİNİN GELİŞTİRİLMESİ

Ahsen SEYREK

Yüksek Lisans, Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Halil Murat AYDIN

Eylül 2021, 90 Sayfa

Tez çalışmasının amacı, hücresizleştirilmiş perikard yüzeyinin karbon nanotüp ile modifikasyonunun gerçekleştirilmesi suretiyle kan uyumluluğu yüksek antitrombojenik özelliğe sahip kompozit malzemelerin geliştirilmesi ve bu yapıların kalp kapakçığı doku mühendisliğine yönelik uygulamalarda kullanımı için karakterize edilmesidir. Bu çalışmada güncel olarak kalp kapakçığı değişimi ameliyatlarında kullanılan mekanik ve biyoprostetik kalp kapakçıklarında meydana gelen trombojenite ve mekanik dayanım problemlerinin önüne geçilmesinde katkı sağlaması, bu sayede kalp kapakçığı ameliyatlarının tekrarlanmasına ve ömür boyu antikoagülan ilaçların kullanılmasına gerek kalmaması hedeflenmektedir.

Bu kapsamda sığır kaynaklı perikard dokular kullanılmış ve bu dokuları hücresizleştirmek için uygun deselülerizasyon protokolü optimize edilmiş, sonrasında deselülerize edilen perikard doku yüzeyleri karboksillenmiş (-COOH) çok duvarlı karbon nanotüpler ile modifiye edilerek kompozit doku iskeleleri hazırlanmıştır.

İlk aşamada deselülerizasyon optimizasyonu için dondurup çözme gibi fiziksel ve sodyum dodesil sülfat (SDS), Triton-X-100 gibi kimyasal yöntemler tek başına ya da

fiziksel yöntem ile kombinasyonu kullanılarak hücresizleştirme çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Ayrıca kimyasal ajanların farklı konsantrasyonlarının deselülerizasyon başarısına etkisi incelenmiştir. Ardından Hematoksilen & Eozin, DAPI, Masson's Trichrome boyamaları ile histoloji analizleri ve PicoGreen, dimetil metilen mavisi (DMMB) ve hidroksipirolin kitleri ile de biyokimyasal karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. Bu çalışmaların sonucunda uygun deselülerizasyon grubu dondurup çözme ve %0,5 SDS (a/h) kombinasyonu olarak belirlenmiştir. İşlem görmemiş ve optimize deselülerize grup olarak seçilen gruplar ayrıca termogravimetrik analiz (TGA), taramalı elektron mikroskobu (SEM), Fourier dönüşümlü kızıl ötesi spektrometre (FTIR), atomik kuvvet mikroskobu (AFM), mekanik analiz ve diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC) ile analiz edilmiş ve morfolojik, termal ve mekanik açıdan karakterize edilmiştir.

Tezin ikinci bölümünde deselülerize edilen sığır perikard dokular farklı konsantrasyonlarda karboksillenmiş karbon nanotüp solüsyonları ile etkileştirilmiş ve kompozit doku iskeleleri elde edilmiştir. Perikard ve karbon nanotüp etkileşiminin ne oranda başarılı olduğu termogravimetrik analiz (TGA), taramalı elektron mikroskobu (SEM), Fourier dönüşümlü kızıl ötesi spektrometre (FTIR) ve atomik kuvvet mikroskobu (AFM) ile karakterize edilmiştir. Etkileşme oranı en yüksek iki karbon nanotüp konsantrasyonu seçilerek kan uyumluluğu ve trombojenite değerlendirmeleri için trombosit adezyon testi, Calcein-AM boyaması, kinetik kan pıhtılaşma, hemoliz ve sitotoksitate analizleri gerçekleştirilmiştir. Bunlar dışında mekanik analiz ile karbon nanotüp modifikasyonunun mekanik dayanıma olan etkisi ve diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC) ile de termal stabiliteleri incelenmiştir. Çalışılan iki kompozit malzeme de kan uyumluluğu ve antitrombojenite değerlendirmelerinde benzer sonuçlar göstermiş ve işlem görmemiş ve deselülerize doku iskelelerine kıyasla başarılı olmuştur.

Anahtar Kelimeler: Kalp Kapakçığı, Perikard, Deselülerizasyon, Karbon Nanotüp, Trombojenite

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF ANTITHROMBOGENIC NANOCOMPOSITE HEART VALVE LEAFLET MATERIALS

Ahsen SEYREK

Master of Science, Nanotechnology and Nanomedicine Division

Supervisor: Prof. Dr. Halil Murat AYDIN

September 2021, 90 Pages

The aim of the thesis is to develop composite scaffolds with antithrombogenic properties and high blood compatibility by modifying decellularized pericardial tissue with carboxylated carbon nanotubes and to characterize these structures for use in heart valve tissue engineering applications. In this study, it is aimed to contribute to the prevention of thrombogenicity and low mechanical strength problems that occur in mechanical and bioprosthetic heart valves currently used in heart valve replacement surgeries, thus avoiding the need for repeat heart valve surgeries and the use of lifelong anticoagulant drugs.

In this context, bovine-derived pericardial tissues were used and the appropriate decellularization protocol was optimized, then composite tissue scaffolds were prepared by modifying the decellularized pericardial tissue surfaces with carboxylated (-COOH) multi-walled carbon nanotubes.

In the first part, decellularization studies were carried out by using physical methods such as freeze-thaw and chemical methods such as sodium dodecyl sulfate (SDS), Triton-X-100 alone or in combination for decellularization optimization. In addition, the effect of different concentrations of chemical agents on decellularization success was investigated. Then, histology analyzes were performed with Hematoxylin & Eosin, DAPI and Masson's Trichrome stainings. Biochemical characterization studies were also performed with PicoGreen, dimethyl methylene blue (DMMB) and hydroxypyrrrole kits. As a result of these studies, the appropriate decellularization group was determined as a combination of freeze-thaw and 0,5% (w/v) SDS agent. The untreated and optimized decellularized groups were analyzed by thermogravimetric analysis (TGA), scanning electron microscopy (SEM), Fourier transform infrared spectrometry (FTIR), atomic force microscopy (AFM), mechanical analysis and differential scanning calorimetry (DSC), thus scaffolds were morphologically, thermally and mechanically characterized.

In the second part of the thesis, decellularized bovine pericardial tissues were treated with different concentrations of carboxylated carbon nanotube solutions and composite tissue scaffolds were obtained. The success of the pericardium and carbon nanotube interaction was characterized by thermogravimetric analysis (TGA), scanning electron microscopy (SEM), Fourier transform infrared spectrometry (FTIR) and atomic force microscopy (AFM). Platelet adhesion test, Calcein-AM staining, kinetic blood coagulation, hemolysis and cytotoxicity analyzes were performed for blood compatibility and thrombogenicity evaluations by choosing the two carbon nanotube concentrations with the highest interaction rate. Apart from these, the effect of carbon nanotube modification on mechanical strength and thermal stability were investigated by mechanical analysis and differential scanning calorimetry (DSC). The two composite scaffolds studied showed similar results in blood compatibility and antithrombogenicity assessments and were successful compared to untreated and decellularized scaffolds.

Keywords: Heart valve, Pericardium, Decellularization, Carbon Nanotube, Thrombogenicity

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bana her konuda destek olan, tez çalışmalarım için bana her türlü fırsat ve imkânı sağlayan ve bu süreçte rehberlik eden, hiçbir konuda anlayışımı esirgemeyen çok değerli danışman hocam Prof. Dr. Halil Murat AYDIN'a;

Tez çalışmalarımı sürdürmek için gerekli imkân ve destekleri sağlayan BMT Grup Ailesine;

FYL-2020-18599 numaralı proje ile sağlanan maddi desteklerinden dolayı Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne;

Tez çalışmalarım boyunca anlayışı ve motivasyonu bana her konuda destek olan Buğrahan KILIÇ'a; Laboratuvarda beraber geçirdiğimiz süre boyunca yardımlarını esirgemeyen, her zaman yanımda olan arkadaşlarım Gizem ZİHNA, Gülçin Günal KARATAŞ, Safa KARARMAZ, Bengisu TOPUZ, Selcan GÜLER ve Zeynep ÇAĞLAR'a;

Uzun yıllardan beri her ânımda yanımda olan, tez çalışmalarım süresince de manevi destekleriyle beni motive eden canım arkadaşlarım İrem, Sıla, Maide, Şeyma, Ceyda, Rabia ve Alev'e;

Her zaman yanımda olan, beni motive eden ve tüm kararlarımı destekleyen canım aileme teşekkür ederim...

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1 Kalp Kapakçığı	4
2.1.1 Kalp Kapakçığının Yapısı ve İşlevi	4
2.1.2 Kalp Kapakçığı Rahatsızlıkları	6
2.1.3 Yapay Kalp Kapakçıkları	8
2.1.3.1 Mekanik Kalp Kapakçıkları	8
2.1.3.2 Biyoprostetik Kalp Kapakçıkları	9
2.2 Biyomalzeme	11
2.2.1 Biyomalzeme – Kan Etkileşimi	12
2.2.1.1 Koagülasyon Yolağı	13
2.2.1.2 Platelet – Biyomalzeme Etkileşimi	14
2.3 Doku Mühendisliği	16
2.3.1 Kalp Kapakçığı Doku Mühendisliğinde Kullanılan Biyomalzemeler ..	17
2.3.1.1 Perikard	19
2.3.1.2 Karbon Nanotüpler	21
2.4 Deselüerizasyon	23
2.4.1 Deselüerizasyonda Kullanılan Yöntemler	24
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	26
3.1. Materyal	26

3.2 Perikard Doku Deselüerizasyonu.....	26
3.2.1. Sığır Kaynaklı Perikard Doku Diseksiyonu	26
3.2.2. Perikard Dokuların Deselüerizasyon Optimizasyonu.....	27
3.2.3 Deselüerize Perikard Dokuların Karakterizasyonu	28
3.2.3.1. Morfolojik Analiz	28
3.2.3.2 Histolojik Analizler	28
3.2.3.2.1 Hematoksilen ve Eozin (H&E) Boyaması	28
3.2.3.2.2 DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) Boyaması	29
3.2.3.2.3 Mason Trichrome Boyaması.....	29
3.2.3.3 Biyokimyasal Analizler.....	29
3.2.3.3.1 Genomik DNA Miktarı Tayini	30
3.2.3.3.2 Sülfatlı Glikozaminoglikan (sGAG) Miktarı Tayini	30
3.2.3.3.3 Kolajen Miktarı Tayini	30
3.2.3.4 Yaş-Kuru Ağırlık Değişimleri.....	31
3.3 Kompozit Doku İskelelerinin Hazırlanması	31
3.3.1 -COOH Fonksiyonelleştirilmiş Çok Duvarlı Karbon Nanotüp Solüsyonu Hazırlanması	31
3.3.2 Kompozit Doku İskelelerin Sentezi.....	32
3.3.3 Kompozit Doku İskelelerinin Karakterizasyonu	32
3.3.3.1 Fourier Transform Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR).....	32
3.3.3.2 Termogravimetrik Analiz (TGA)	33
3.3.3.3 Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM) Analizi.....	33
3.3.3.4 Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) Analizi	33
3.3.3.5 Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi	33
3.3.3.6 Platelet Adezyon Testi.....	34
3.3.3.7 Calcein-AM Boyaması	34
3.3.3.8 Hemoliz Analizi	35
3.3.3.9 Kinetik Kan-Pıhtılaşma Analizi.....	35
3.3.3.10 Mekanik Analiz	36
3.3.3.11 Sitotoksite Analizi.....	36
3.4 İstatistiksel Çalışmalar	37
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	38

4.1 Deselüerize Perikard Dokuların Hazırlanması.....	38
4.1.1 Morfolojik Analiz	38
4.1.2 Histolojik Analizler	38
4.1.2.1 Hematoksilen ve Eozin (H&E) Boyaması	39
4.1.2.2 DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) Boyaması.....	41
4.1.2.3 Mason Trichrome Boyaması	42
4.1.3 Biyokimyasal Analizler	43
4.1.3.1 Genomik DNA Miktarı Tayini.....	44
4.1.3.2 Sülfatlı Glikozaminoglikan (sGAG) Miktarı Tayini.....	45
4.1.3.3 Kolajen Miktarı Tayini.....	46
4.1.3.4 Yaş-Kuru Ağırlık Değişimleri	47
4.2 Kompozit Doku İskelelerinin Sentezi ve Karakterizasyonu.....	49
4.2.1 Kompozit Doku İskelelerinin Karakterizasyonu.....	50
4.2.1.1 FTIR Analizi	51
4.2.1.2 Termogravimetrik Analiz (TGA).....	54
4.2.1.3 Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) Analizi	58
4.2.1.4 Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM) Analizi	60
4.2.1.5 Mekanik Analiz.....	61
4.2.1.6 Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi.....	63
4.2.1.7 Platelet Adezyon Testi	65
4.2.1.8 Calcein-AM Boyaması	67
4.2.1.9 Hemoliz Analizi	69
4.2.1.10 Kinetik Kan Pıhtılaşma Analizi	71
4.2.1.11 Sitotoksisite Analizi	73
5. YORUM	75
6. KAYNAKLAR	79
EKLER.....	87
EK-1 Kalibrasyon Grafikleri	87
EK 6 - Tez Çalışması Orjinallik Raporu.....	89
ÖZGEÇMİŞ	90

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Kalp kapakçıklarının konumunu ve şekillerini gösteren temsili görüntü [15]	5
Şekil 2.2. Kalp kapakçıklarının katmanlarının ve içindeki matriks bileşenlerinin temsili görüntüsü [13]	5
Şekil 2.3. Kalp kapağı darlığı temsili görüntüsü [19]	7
Şekil 2.4. Kalp kapağı yetmezliği temsili görüntüsü [19]	7
Şekil 2.5. Kafesli top, çift yaprakçık ve eğilen disk mekanik kalp kapakçıkları [21].....	9
Şekil 2.6. Biyoprostetik kalp kapakçıkları. a) Stentli perikardiyal sığır aortik kalp kapakçığı, b) Stentli domuz aortik kalp kapakçığı, c) Stentsiz aortik kalp kapakçığı, d) Balon ile genişleyen sığır perikardiyal transkateter kalp kapakçığı, e) Kendiliğinden genişleyen domuz perikardiyal kalp kapakçığı, f) Kendiliğinden genişleyen sığır perikardiyal kalp kapakçığı, g) Kendiliğinden genişleyen domuz yaprakçık transkateter kalp kapakçığı, h) Sığır perikardiyal transkateter kalp kapakçığı ürünleri [22].....	10
Şekil 2.7. Kan koagülasyon kaskadında rol alan yolaklar ve enzimlerin şematik gösterimi [30].	13
Şekil 2.8. Trombus oluşum mekanizması [36]	16
Şekil 2.9 Perikard yapısı [54]	21
Şekil 2.10 Karboksilleştirilmiş karbon nanotüp hazırlanışı [57].	22
Şekil 4.1. A) İşlem görmemiş perikard, B) Deselülerize perikard doku morfolojik görüntüleri.	38
Şekil 4.2. İşlem görmemiş kontrol ve deselülerizasyon gruplarının Hematoksilin & Eozin boyaması mikroskop görüntüleri. A) Kontrol grubu, B) %0,5 (a/h) SDS muamelesi, C) %1 (a/h) SDS muamelesi, D) %1 (h/h) Triton-X-100 muamelesi, E) Fiziksel ön işlem sonrası %0,5 (a/h) SDS muamelesi. (40X büyütme)	40
Şekil 4.3. İşlem görmemiş kontrol ve deselülerizasyon gruplarının DAPI boyaması. A) Kontrol grubu, B) %0,5 (a/h) SDS muamelesi, C) %1 (a/h) SDS muamelesi, D) %1 (h/h) Triton-X-100 muamelesi, E) Fiziksel ön işlem ardından %0,5 (a/h) SDS muamelesi (40X büyütme)	42
Şekil 4.4 İşlem görmemiş kontrol ve deselülerizasyon gruplarının Masson Trichrome kolajen boyaması. A) Kontrol grubu, B) Seçilen deselülerizasyon grubu (Fiziksel ön işlem ardından %0,5 (a/h) SDS muamelesi) (40X büyütme)	43
Şekil 4.5. İşlem görmemiş ve farklı deselülerizasyon protokolleri uygulanmış dokularda kalan genomik DNA miktarını gösteren grafik.....	45
Şekil 4.6. İşlem görmemiş ve farklı deselülerizasyon protokolleri uygulanmış dokularda kalan sGAG miktarını gösteren grafik.....	46
Şekil 4.7. İşlem görmemiş ve optimize edilmiş deselülerize perikard dokularda kalan kolajen miktarını gösteren grafik.....	47
Şekil 4.8. İşlem görmemiş ve deselülerizasyon protokolü uygulanmış grupların yaş ve kuru ağırlık grafikleri.....	48
Şekil 4.9. Sonikasyon işlemi sonrası karbon nanotüp çözeltisi	50

Şekil 4.10. A) %0,05 KNT, B) %0,1 KNT kompozit doku iskelesi morfolojik görüntüleri.....	50
Şekil 4.11. A) %0,01 konsantrasyonunda karbon nanotüp ile santrifüj edilerek, B) %0,01 konsantrasyonunda karbon nanotüp ile santrifüj edilmeden, C) %0,05 konsantrasyonunda karbon nanotüp ile santrifüj edilmeden, D) %0,05 konsantrasyonunda karbon nanotüp ile santrifüj edilerek, E) %0,1 konsantrasyonunda karbon nanotüp ile santrifüj edilmeden, F) %0,1 konsantrasyonunda karbon nanotüp ile santrifüj edilerek hazırlanan doku iskelelerinin FTIR analizi.....	52
Şekil 4.12. G) %0,5 konsantrasyonunda karbon nanotüp ile, H) %1 konsantrasyonunda karbon nanotüp ile, I) %2 konsantrasyonunda karbon nanotüp ile, J) %3 konsantrasyonunda karbon nanotüp ile santrifüj edilmeden hazırlanan kompozit doku iskelelerinin FTIR analizi.....	53
Şekil 4.13. A) İşlem görmemiş kontrol dokusu, B) Deselülerize doku, C) %0,05 santrifüj edilmeden, D) %0,1 santrifüj edilerek hazırlanan kompozit dokuların FTIR analizi.....	54
Şekil 4.14. %0,01, %0,05, %0,1 santrifüjlü ve %0,5 karbon nanotüp ile hazırlanan kompozit doku iskelelerine ait termogravimetrik analiz çakıştırılmış grafiği.....	56
Şekil 4.15. %0,05, %0,1 (santrifüjlü) kompozit, işlem görmemiş ve deselülerize dokulara ait termogravimetrik analiz çakıştırılmış grafiği.....	57
Şekil 4.16. İşlem görmemiş, deselülerize ve kompozit doku iskeleleri DSC grafiği.....	59
Şekil 4.17. A) İşlem görmemiş, B) Deselülerize, C) %0,05 KNT, D) %0,1 KNT kompozit doku iskelelerine ait iki ve üç boyutlu AFM topografi görüntüleri ve yükseklik grafikleri.....	61
Şekil 4.18 İşlem görmemiş, deselülerize ve kompozit doku iskelelerine ait gerilim-gerinim grafiği.....	63
Şekil 4.19. A,B) İşlem görmemiş doğal perikard doku; C,D) Deselülerize perikard doku; E) %0,05 karbon nanotüp (santrifüjsüz) konsantrasyonunda hazırlanmış kompozit perikard doku; F) %0,1 karbon nanotüp (santrifüjlü) konsantrasyonunda hazırlanmış kompozit perikard doku iskeleleri taramalı elektron mikroskobu görüntüleri.....	64
Şekil 4.20. Trombositçe zengin plazma ile etkileştirilen A) İşlem görmemiş, B) Deselülerize, C) %0,05 KNT, D) %0,1 KNT kompozit doku iskelelerinin SEM görüntüleri.....	66
Şekil 4.21. İşlem görmemiş, deselülerize ve kompozit doku iskelelerine ait Calcein-AM boyaması görüntüleri. A, B) İşlem görmemiş, C, D) Deselülerize, E, F) %0,05 KNT, G, H) %0,1 KNT doku iskelesi 10X ve 20X büyütme görüntüleri.....	68
Şekil 4.22. Seyreltilmiş kan ile inkübe edilmiş doku iskeleleri görüntüleri. A) İşlem görmemiş, B) Deselülerize, C) %0,05 KNT kompozit, D) %0,1 KNT kompozit doku iskeleleri.....	70
Şekil 4.23 İşlem görmemiş, deselülerize ve kompozit doku iskelelerine ait 5, 15 ve 35.dakika kan pıhtılaşma kinetiği grafiği.....	72
Şekil 4.24 Sırasıyla, işlem görmemiş, deselülerize, %0,05 KNT ve %0,1 KNT kompozit doku iskelelerine ait 5, 15 ve 35 dakika kan ile etkileşme sonucu yüzeylerde oluşan pıhtı görüntüleri.....	73
Şekil 4.25 Kompozit doku iskelelerine ait hücre canlılığı grafiği.....	74

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Yapay kalp kapakçığı türleri, avantaj ve dezavantajları [16, 23].	11
Çizelge 2.2 Kalp kapakçığı doku mühendisliğine kullanılan biyomalzemeler, avantaj ve dezavantajları	18
Çizelge 2.3 Deselülerizasyonda kullanılan yöntemler [61]	24
Çizelge 3.1. Deselülerizasyon protokolü optimizasyon parametreleri	27
Çizelge 4.1 İşlem görmemiş, deselülerize ve kompozit doku iskelelerine ait TGA değerleri.....	57
Çizelge 4.2. İşlem görmemiş, deselülerize ve kompozit doku iskelelerine ait çekme dayanımı ve elastisite modülü değerleri	62
Çizelge 4.3 Pozitif kontrol, negatif kontrol, işlem görmemiş, deselülerize, %0,05 KNT ve %0,1 KNT doku iskelelerine ait optik yoğunluk ve hemoliz tablosu.....	70

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

μ	Mikro
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat Derece
M	Molar
g	Gram
CO_2	Karbondioksit

Kısaltmalar

KNT	Karbon Nanotüp
ECM	Ekstraselüler Matriks
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
PBS	Fosfat Tamponlu Tuz
HE	Hematoksilen & Eozin
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
FBS	Fetal Sığır Serumu
AA	Antibiyotik-Antimikotik
EDTA	Etilendiamintetraasetikasit
MTT	3-4,5-dimetil-tiyazolil-2,5-difeniltetrazolyum bromür
sGAG	Sülfatlı Glikozaminoglikan
DMMB	Dimetil Metilen Mavisi
FTIR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
TGA	Termogravimetrik Analiz

AFM	Atomik Kuvvet Mikroskobu
DSC	Diferansiyel Taramalı Kalorimetre
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
PRP	Trombositçe Zengin Plazma
CaCl ₂	Kalsiyum Klorür

1. GİRİŞ

Kalpte bulunan mitral, triküspid, aort ve pulmoner kapaklar yaprakçık olarak adlandırılan güçlü, ince doku kanatlarından oluşmaktadır. Bu yaprakçıklar kanın kalp atışının yarısı boyunca kalp içinde ilerlemesini sağlamak için açılır. Kalp atışlarının diğer yarısında kanın geriye akmasını önlemek için kapanırlar. Kalp kapakçıkları düzgün açılmaz veya kapanmaz ise kalp kapakçığı hastalıklarının oluşma riski artar. Kalp kapakçıkları hasar gördüğünde ya da bir hastalık meydana geldiğinde oluşan iki en önemli problem kalp kapağı darlığı ve yetmezliğidir. Kalp kapakçığı kalınlaştığında veya sertleştiğinde kapak daralır ve akışı kısıtlanır. Kalp kapakçığı yetmezliğinde ise kapak tam olarak kapanamaz ve geçen kanın bir miktarı kapaktan geri kaçar.

Çeşitli genetik veya çevresel sebeplerden kaynaklanan bu rahatsızlıkların önüne geçilmesi için her sene dünyada 300.000 kalp kapağı değişimi ameliyatı gerçekleştirilmektedir [1]. Bu yapılan kalp kapağı değişimi ameliyatlarında mekanik ve biyoprostetik kalp kapakçıkları kullanılmaktadır. Fakat mekanik kalp kapakları kanama ve trombojenite problemlerinden kaynaklanan ömür boyu antikoagulant ilaç kullanımı gerektirmektedir. Öte yandan biyoprostetik kalp kapakçıklarında da trombojeniteye ek olarak doku yırtılması ve kalsifikasyon gibi problemler ortaya çıkmaktadır [2, 3].

Ekstraselüler matriks yapısının bozulmasını önlemek ve immunojeniteyi azaltmak için glutaraldehit gibi çapraz bağlayıcı ajanlar ile fiksasyon yapılmaktadır. Fakat bu ajanların kullanılması dokuda kalsifikasyona yol açmakta ve toksik etki oluşturmaktadır. Dokuda oluşan trombojenite sorunu üzerinde ise pozitif etkileri gösterilmemiştir.

Bu problemlerin minimuma indirgenmesi için doku mühendisliği yaklaşımları kullanarak kalp kapakçığı materyallerinin oluşturulması çalışmaları ön plana çıkmıştır. Kalp kapakçığı doku mühendisliği; sentetik/doğal polimerler, deselülerize doku iskeleleri ve hibrit doku iskeleleri kullanılarak kalp kapakçığı yapısının ve fonksiyonlarının en iyi şekilde taklit edilmesini amaçlar. İdeal bir kalp kapakçığı materyali, kan akışını engellememeli, kimyasal tepkimeye girmemeli, mekanik ve hemodinamik açıdan doğal kalp kapaklarının özelliklerini sağlamalı, trombojenite ve immün yanıt oluşturmamalıdır [3, 4].

Kalp kapakçıklarının yapısını ve fonksiyonlarını taklit edebilmek için kolajen, fibrin, kitosan gibi doğal polimerler; poli(gliserol sebakat), poli(etilen glikol), polikaprolakton ve poli-4-hidroksibütrat gibi sentetik polimerler ve sığır perikardiyum ve domuz kalp kapakçığı gibi doğal kaynaklı deselülerize dokular çalışılmaktadır [4, 5]. Fakat kolajen gibi doğal biyomalzemeler trombojeniteye neden olurken sentetik polimerler de tek kullanıldığında ekstraselüler matriks yapısını üç boyutta tam anlamıyla oluşturamamakta ve yumuşak doku yapısını sağlayamamaktadır [6]. Doğal kaynaklı biyomalzemeler ise ekstraselüler matriksin nano ölçekteki üç boyutlu yapısına en fazla benzerlik sağlayan malzemelerdir. Sığır perikardiyum kalp kapakçığı hastalıklarında en çok kullanılan biyomalzemelerden biridir. Hayvan çalışmaları ve klinik deneyler bu malzemenin çok iyi hemodinamik profile sahip olduğunu, dejenerasyon ve yeniden operasyon oranının domuz kalp kapakçığına göre daha düşük olduğunu göstermiştir. Anatomik yapısının ve mekanik dayanımının kapakçık materyali için uygun olması ve düşük maliyetli olması sığır perikard dokusunu çalışmalarda ön plana çıkarmaktadır [7].

Doğal kaynaklı malzemelerde bulunan hücreler ve diğer antijenlerin farklı dokuda immün yanıt oluşturma riskinden dolayı dokulara deselülerizasyon (hücresizleştirme) işlemi uygulanmakta ve ekstraselüler matriksin bütünlüğünü bozmadan dokular hücre ve diğer antijenlerden arındırılmaktadır. Bu işlemler için fiziksel yöntemler (dondurup çözme, karıştırma), kimyasal ajanlar (deterjan, asidik ve alkalik çözeltiler) ve/veya enzimatik ajanlar (nükleaz, kalsiyum şelat ajanı) kullanılmaktadır. Ancak uygulanan deselülerizasyon işlemleri dokunun ekstraselüler matriks yapısına zarar vermekte ve mekanik dayanımını azaltmaktadır [8].

Yabancı maddeler kan ile etkileşime girdiğinde kırmızı kan hücrelerinin yıkımına, platelet aktivasyonuna, agregasyonuna ve sonuç olarak plazma proteinlerinin bağlanmasının aracılık ettiği kaskad reaksiyonları yoluyla tromboz oluşumuna yol açarlar. Kan ile etkileşime giren yapay doku ve organlar için antitrombojenik biyomalzemelerin geliştirilmesi uzun zamandır çalışılmakta olan bir konudur. Antitrombojenitenin önlenmesi için sağlanması gereken en önemli madde, malzeme yüzeyinde trombus oluşumunu engellemektir. Deselülerize perikard dokusunda bulunan kolajenin trombojeniteyi arttırıcı özelliği, dokuya yüzey modifikasyonu veya kaplaması gibi işlemlerin uygulanmasını gerektirmektedir [9].

Ekstraselüler matriksin üç boyutlu doğal yapısının en iyi şekilde taklit edilebilmesi için nano ölçekte yapıların tasarlanması rejeneratif tıp uygulamalarında önem taşımaktadır. Nano kompozit doku iskeleleri, ekstraselüler matrikse yapısal benzerliği, yüzey alanının hacime oranının yüksek olması, yüzey fonksiyonelliğinde esnek olması ve mekanik özelliklerinin ayarlanabilmesi gibi birçok avantaja sahiptir. Bu nanokompozit doku iskeleleri, çeşitli nanopartiküller, sentetik veya doğal biyomalzemeler içerebilmektedir. Deselülerize dokunun nano ölçekteki ekstraselüler matriksine uyum sağlamak ve mekanik dayanımını arttırmak için çeşitli nanomalzemeler ile modifikasyonlar ve kaplamalar yapılabilmektedir [10].

Karbon nanotüpler, nano ölçekte çapları ve mikrometre uzunlukları olan sarılmış grafit tabakalardan oluşur. Nanoyapılı topografya, yüksek dayanıklılık, esneklik ve nano ölçekte yüksek en boy oranı sağlar. Ayrıca literatürde sentetik ve doğal biyomalzemeler karbon nanotüp ile modifiye edildiğinde kan uyumluluğunun arttığı ve trombojenitenin önlenildiği çalışmalar bulunmaktadır [11].

Bu çalışma ile karbon nanotüplerin perikard dokusu ile birleştirilmesiyle üç boyutlu ekstraselüler matriks dokunun stabilitesi artırılmış ve yüksek kan uyumluluğu ve antitrombojenik özellikleri sağlanmış bir şekilde nano ölçekte taklit edilmiştir. Bunun için uygun perikard deselülerizasyon protokolü dondurup çözme ve %0,5 SDS (a/h) yöntemlerinin kombinasyonu olarak belirlenmiş ve yüksek oranda hücresizleştirme ve ekstraselüler matriks stabilitesi sağlanmıştır. Perikard dokular hücresizleştirildikten sonra farklı konsantrasyonlarda karboksillenmiş çok duvarlı karbon nanotüp ile modifiye edilmiş ve yapısal karakterizasyon çalışmaları ile kan uyumluluğu ve trombojenite çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Deneysel çalışmalar ve elde edilen bulgular diğer bölümlerde açıklanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

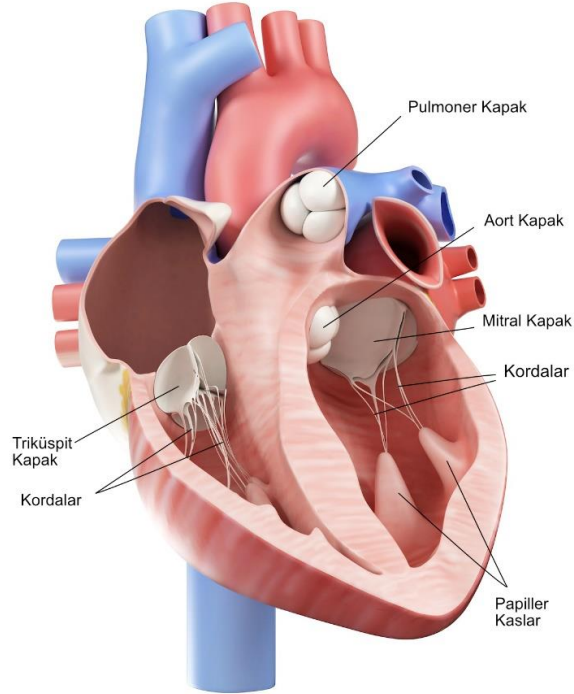
2.1 Kalp Kapakçığı

Kalpte tek yönlü kan akışına izin veren dört adet kapak bulunmaktadır. Bu kapaklar kan akışını kontrol ederek kardiyak döngünün tamamlanmasını sağlarlar. Kapaklar bir insan hayatı boyunca bu döngüyü yaklaşık 3×10^9 kez tekrar etmektedir. Bu döngü özetlenecek olursa; toplardamardan oksijence kirli kan sağ kulakçığa gelir ve triküspit kapak aracılığıyla sağ karıncığa geçer. Daha sonra pulmoner kapak ile akciğer atardamarına aktarılır. Oksijence zenginleşen kan sol kulakçığa geçer ve mitral kapak ile sol karıncığa aktarılır. Son olarak buradaki kan aortik kapaktan geçerek aort atardamarı aracılığı ile vücudun geri kalanına iletilir [12].

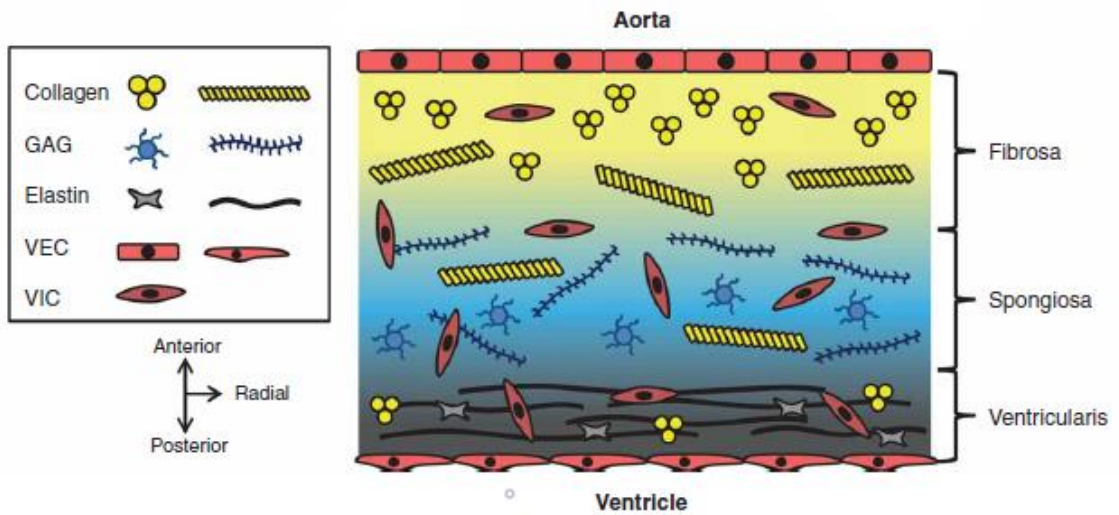
2.1.1 Kalp Kapakçığının Yapısı ve İşlevi

Aort ve mitral kapak kalbin sol tarafında bulunurken, pulmoner ve triküspit kapak kalbin sağ tarafında bulunur. Mitral ve triküspit kapaklar kulakçıkları karıncıklardan ayırırken, aortik ve pulmoner kapaklar karıncıkları sırasıyla aort ve pulmoner arterlerden ayırır. Mitral kapak iki yaprakçıktan oluşurken (ön ve arka yaprakçık), aortik, pulmoner ve triküspit kapak üç yaprakçıktan oluşur (ön, arka, septal yaprakçık). Şekil 2.1’de kalp kapakçıklarının yerleri ve şekillerini temsili olarak gösteren görüntü verilmiştir. Yaprakçık kalınlığı 300-700 μm aralığında değişir ve yapısı, fibrosa, spongiosa ve ventrikularis/atryalis olmak üzere üç katmana bölünmüş ekstraselüler matriksten oluşur. Tüm katmanlarda kolajen (tip 1 ve 3) bulunmaktadır, fakat fibrosa katmanında hizalanmış ve düzenli bir şekilde sıralanmıştır. Bu hizalanma katmana belirli bir gerilme sertliği sağlar. Sistol-diastol esnasında dairesel olarak hizalanmış kolajen fiberler yükü taşır. Doku hareketini (kalp kapakçığının açılıp kapanması) kolaylaştıran elastin, ventrikularis/atryalis katmanlarında dairesel hizalanmış olarak bulunmaktadır. Glikozaminoglikanlar (GAG) ağırlıklı olarak spongiosa katmanında bulunur. Katmanlar arasında doku hidrasyonunu ve düzgün yük geçişini sağlarlar. Fibrosa ve ventrikularis/atryalis katmanlarının kenarları sırasınca endotel hücreler yer alırken, kapak doku içi hücreleri de kapak boyunca dağılmış şekilde yer alır. Kapakların ekstraselüler matriks bileşenleri kapak doku içi hücrelerinin aktivitesine bağlıdır. Bu hücreler kapakların katmanlı ekstraselüler matriksini oluşturan kolajen, elastin ve glikozaminoglikan (GAG) bileşenlerini kodlayan genleri ifade eder [12-14]. Şekil 2.2’de

kalp kapakçıklarının katmanlarındaki hücre ve matriks bileşenlerinin dizilimini gösteren temsili görüntü verilmiştir.



Şekil 2.1. Kalp kapakçıklarının konumunu ve şekillerini gösteren temsili görüntü [15]



Şekil 2.2. Kalp kapakçıklarının katmanlarının ve içindeki matriks bileşenlerinin temsili görüntüsü [13]

2.1.2 Kalp Kapakçığı Rahatsızlıkları

Bir ya da daha fazla kapakçığın işlevini düzgün yerine getirememesi durumunda çeşitli kalp kapakçığı rahatsızlıkları meydana gelebilmektedir. Rahatsızlıklara en yatkın kapaklar sol ventriküldeki mitral ve aortik kapaklardır [16]. Bu rahatsızlıklar doğuştan olabileceği gibi, sonradan birçok sebeple de oluşabilmektedir. Kalp kapakçıklarında sonradan meydana gelen iki ana problem kalp kapağı daralması (stenoz) ve kalp kapağı yetmezliğidir (regurjitasyon). Kalp kapağı daralması, yaprakçıkların kalınlaşması veya sertleşmesi sonucu kapağın tam açılmaması ile ortaya çıkar. Bu durumda kapaktan geçen kan akışı azaldığından dolayı, kalp kanı pompalamak için daha fazla çalışmakta, bu da çeşitli kalp sorunlarını beraberinde getirmektedir. Şekil 2.3'te kalp kapağı daralmasının dereceleri ve daralma nedeniyle geçen kan miktarındaki azalışın temsili görüntüsü verilmiştir. Kalp kapağı yetmezliği ise, kapaklar tam kapanmadığında kanın bir kısmının kapaktan geri kaçmasıyla ortaya çıkar. Bu durum ilerideki kan akışını azaltır ve kalbin daha çok çalışmasına sebebiyet vererek çeşitli kalp rahatsızlıklarını meydana getirir. Şekil 2.4'te kalp kapağı yetmezliği meydana geldiğinde kapağın tam kapanmaması ve kanın bir kısmının geri kaçmasına ait temsili görüntü verilmiştir. Stenoz ve regurjitasyonun meydana gelmesindeki sebepler;

- Doğuştan Kapak Rahatsızlıkları

Kapakçıklarda doğuştan olan yapısal bozukluklardır (yanlış boyut veya şekil gibi). Dünya genelinde yeni doğan bebeklerin %1-2'si kalp kapakçığı rahatsızlıkları ile meydana gelmektedir [16].

Biküsbüt Aortik Kapak Rahatsızlığı: Aortik kapağın üç yaprakçık yerine iki yaprakçığı olmasıdır.

Marfan Sendromu: Vücuttaki bağ dokuları etkileyen genetik bir hastalıktır, mitral kapak prolapsusu veya aortik kapak yetmezliği gelişebilmektedir.

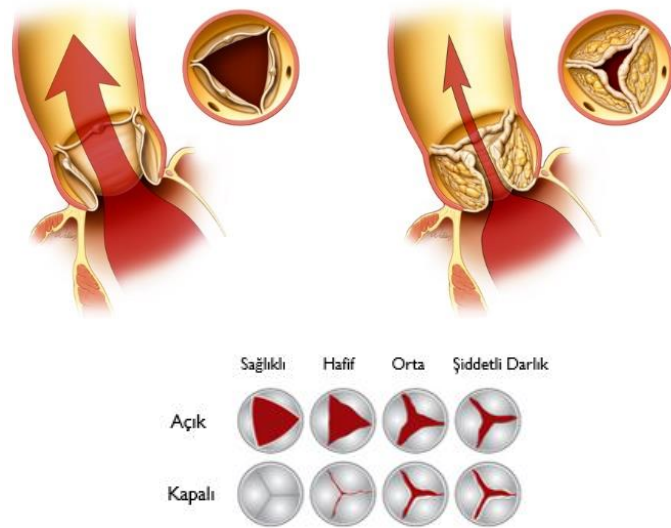
- Sonradan Gelişen Rahatsızlıklar

Ateşli Romatizma: Bakteriyel enfeksiyon gelişmesi kalp kapaklarına zarar verebilmektedir.

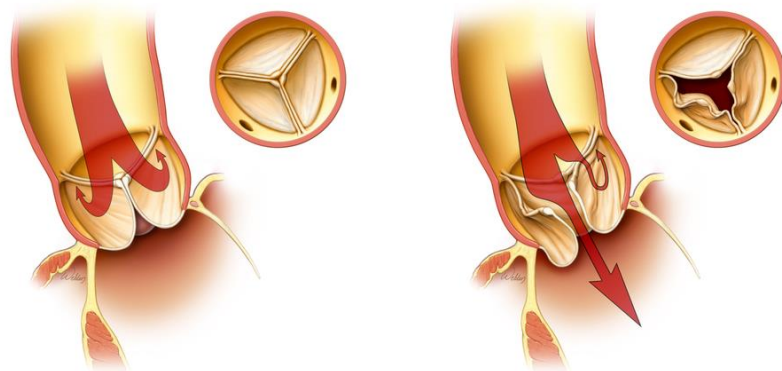
Endokardit: Bakteriler kan akışına karıştığında ve kalbe ulaştığında kapaklara zarar verebilmekte ve kapakların sızdırmasına yol açabilmektedir.

Mitral Kapak Prolapsusu: Mitral kapakçığın bir kısmı veya tamamı, ventriküller kasıldığında atriyuma doğru yukarı şişer. Bu da kanın bir kısmının geri kaçmasına (regurjitasyon) neden olur.

Bunlar dışında, yaşlanma, koroner damar hastalıkları, kalp krizi, kardiyomiyopati, yüksek kolesterol olarak sıralanabilir [17, 18].



Şekil 2.3. Kalp kapağı darlığı temsili görüntüsü [19]



Şekil 2.4. Kalp kapağı yetmezliği temsili görüntüsü [19]

2.1.3 Yapay Kalp Kapakçıkları

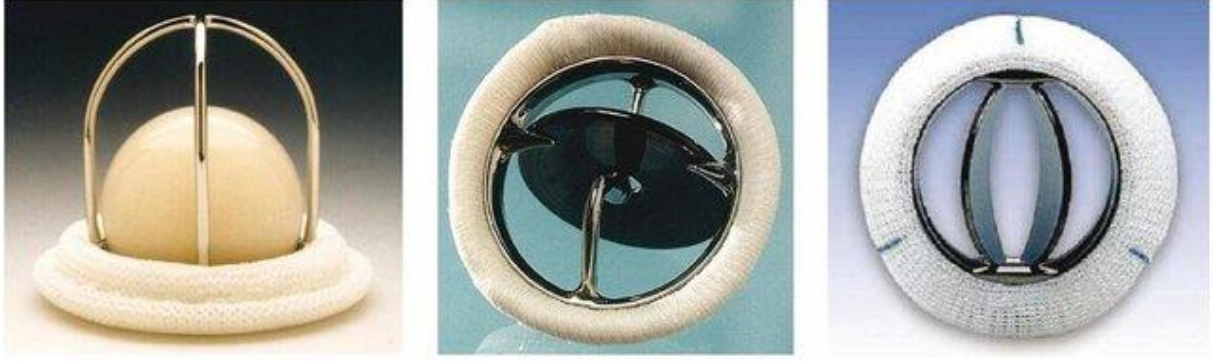
Kalp kapakçığı hastalıklarının tedavisinde düşük ve orta riskli ameliyatlarda her sene 300.000'den fazla uygulanan standart yöntem cerrahi kapak replasmanı yöntemidir. Bu ameliyata ihtiyacı olan hasta sayısının 2050'ye kadar üçe katlanacağı öngörülmektedir [20]. Replasman ameliyatlarının çok büyük kısmı mekanik veya biyoprostetik kapak ile gerçekleştirilmektedir. Yapay kalp kapakçıklarında bulunması gereken temel özellikler aşağıda sıralanmıştır.

- Kan akışını engellememelidir.
- Düzgün açılmalı ve kapanmalıdır.
- Trombojenik olmamalıdır.
- Enfeksiyona karşı dirençli olmalıdır.
- Kimyasal tepkimeye girmemeli ve hücrelere zarar vermemelidir.
- İmplant edilmesi kolay olmalıdır.
- İyileşmeye izin vermelidir.
- Hastayı rahatsız etmemelidir (Ör. gürültü oluşturmamalıdır.)

Çizelge 2.1'de yapay kalp kapakçıkları türleri ile avantaj ve dezavantajları özetlenmiştir.

2.1.3.1 Mekanik Kalp Kapakçıkları

Mekanik kapaklar, diğer yapay kalp kapakları çeşitlerine göre, replasman ameliyatlarından sonra yapı olarak en sağlam ve uzun süre dayanabilen kapak çeşididir. Metal veya sentetik polimerden üretilirler. Uzun yıllar boyunca mekanik kalp kapaklarının farklı tasarımlarla birçok versiyonu ortaya çıkmıştır. Bunlar; kafesli top, çift yaprakçık ve eğilen disk mekanik kalp kapaklarıdır. Kafesli top kapak şeklinde, titanyum bir kafes ve silikon top bulunurken, çift yaprakçık kapak titanyum kafes içinde pirolitik karbon yaprakçık içerir. Eğilen disk kapakta ise delrin polimer kullanılmıştır. Günümüzde de en yaygın kullanılan mekanik kalp kapakçığı çift yaprakçık kapak şeklindedir. Bu kapak iki adet yarım daire biçimli tamamen açılabilen yaprakçıktan oluşur. Kan akışına en az direnci göstermesi sebebiyle diğer mekanik kapakçıklara göre daha çok tercih edilmektedir. Günümüzde St. Jude Medical, OnX ve Sorin gibi üreticiler farklı kompozisyon ve tasarımlarda çift yaprakçıklı mekanik kalp kapakçıkları üretmektedir [16].

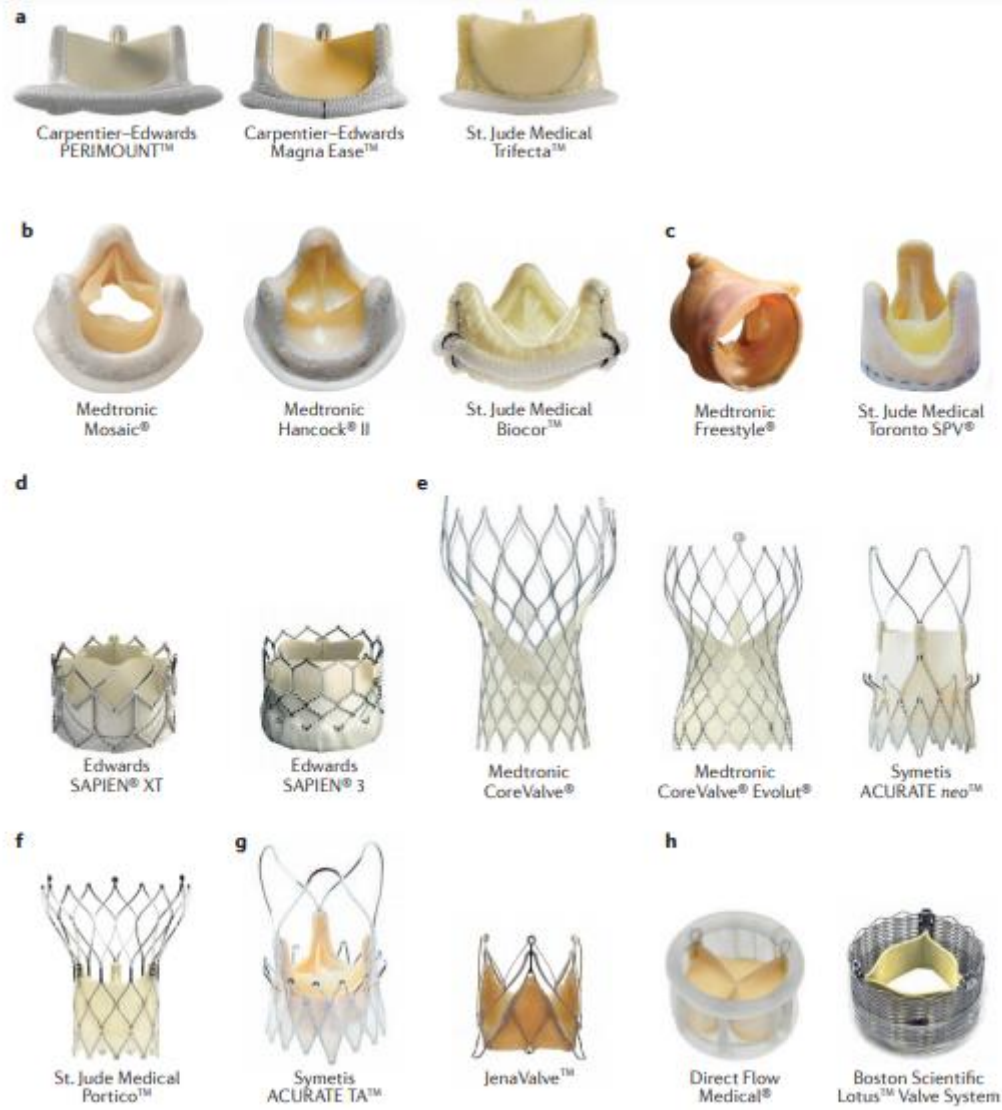


Şekil 2.5. Kafesli top, çift yaprakçık ve eğilen disk mekanik kalp kapakçıkları [21].

2.1.3.2 Biyoprostetik Kalp Kapakçıkları

Biyoprostetik kapaklarda otograft/allograft olarak insan kadavralardan, organ donörlerinden veya kalp transplant hastalarından alınan kapakçıklar kullanılırken, zenograft olarak domuzdan elde edilen kalp kapakçığı veya sığırdan elde edilen perikard dokusu kullanılmaktadır. Zenograftlar da cerrahi olarak implante edilebilir kalp kapakçıkları ve transkateter kalp kapakçıkları olmak üzere iki alt gruba ayrılmaktadır. Cerrahi olarak implante edilebilen kapakçıkların stentli, stentsiz ve dikişsiz gibi farklı dizaynı seçenekleri bulunmaktadır.

Transkateter kalp kapakçıkları yüksek riskli hastalarda kullanılması önerilen, genişletilebilir bir stent üzerine monte edilmiş dokudan oluşan kapakçık modelidir ve vücuda femoral arter, aort gibi yollarla sokulurlar. Günümüzde kullanılan Edwards SAPIEN, Medtronic CoreValve, ve St. Jude Medical Portico gibi modelleri bulunmaktadır. Dokular glutaraldehit gibi fiksasyon ajanları ile fikse edilerek kolajen yapısı stabilize edilmekte ve degradasyona karşı güçlendirilmekte, immunojenite ve mineralizasyon gibi problemlerin de önüne geçilmektedir. Fikse edildikten sonra dokular bir stent yuvasına, stentsiz bir yuvaya veya genişleyen bir stente monte edilmektedir. En yaygın kullanılan zenograft domuz kalp kapakçıkları St. Jude Medical Epic ve Medtronic Hancock iken sığır perikard kapakçıkları da Edwards Perimount and Sorin Mitroflow olarak sayılabilir [16].



Şekil 2.6. Biyoprostetik kalp kapakçıkları. a) Stentli perikardiyal sığır aortik kalp kapakçığı, b) Stentli domuz aortik kalp kapakçığı, c) Stentsiz aortik kalp kapakçığı, d) Balon ile genişleyen sığır perikardiyal transkateter kalp kapakçığı, e) Kendiliğinden genişleyen domuz perikardiyal kalp kapakçığı, f) Kendiliğinden genişleyen sığır perikardiyal kalp kapakçığı, g) Kendiliğinden genişleyen domuz yaprakçık transkateter kalp kapakçığı, h) Sığır perikardiyal transkateter kalp kapakçığı ürünleri [22].

Çizelge 2.1 Yapay kalp kapakçığı türleri, avantaj ve dezavantajları [16, 23].

	Avantajlar	Dezavantajlar
Mekanik	Uzun ömürlü (20-30 sene) Yeniden ameliyat oranı daha düşük	Ömür boyu antikoagulan ilaç kullanımı gerektirmesi Daha yüksek kanama ve trombojenite riski Enfeksiyon riski Doğuştan kapak problemi olan yeni doğanlarda kullanılamama
Biyoprostetik	Antikoagulan ilaç kullanımı gerektirmez Kanama ve trombojenite riski daha düşük Daha iyi hemodinamiğe sahip	Daha kısa ömürlü (10-15 sene) Yapısal kapak dejenerasyonu riski Yeniden ameliyat gerektirme oranı daha yüksek
Transkateter	Yüksek riskli hastalar için tedavi imkânı sunma Daha az invaziv Hızlı iyileşme	Protez – hasta uyumsuzluğu Felç riski yüksek Uzun dönemli takip az

2.2 Biyomalzeme

Biyomalzemeler, vücuttaki herhangi bir bölüm ya da fonksiyonun yerini güvenli ve fizyolojik olarak uygun bir şekilde alan, terapötik veya teşhis amaçlı kullanılan doğal veya sentetik malzemelerdir. En yaygın bilinen örnekleri dikiş, diş dolgusu, iğne, kateter vb. verilebilir [24]. Biyomalzemeler, ilaç ve gen taşıyım sistemleri, doku mühendisliği, implante edilebilir medikal cihazlar gibi birçok farklı uygulama alanında kullanılabilir. Biyomalzemeler, doğal ve sentetik olmak üzere iki ana grupta sınıflandırılır. Doğal biyomalzemelere örnek olarak verilebilecek olan kolajen, jelatin, selüloz, fibrin, kitosan, polisakkaritler doku mühendisliği, ilaç taşıyımını, yara örtüleri, dental ve ortopedik uygulamalarda kullanılırken; polimer, metal, seramik, kompozit malzemeler de insan

yapımı yapay biyomalzemeler olarak geçmekte ve kardiyovasküler, göz, ortopedi, üroloji, dental gibi birçok alanda kullanılmaktadır. Amerika Gıda ve İlaç Dairesi biyomalzemeleri Sınıf I, Sınıf II ve Sınıf III olmak üzere üç gruba ayırmaktadır. Sınıf I'deki cihazlar vücut sıvıları ile direkt olarak etkileşime girmemekte ve düşük güvenlik riskine sahiptir. Sınıf II cihazlar aralıklı olarak dokular ile etkileşime girmektedir ve spesifik kontrollerden geçmek zorundadır. Sınıf III cihazlar ise vücut sıvıları ve dokular ile sürekli olarak etkileşim halindedir ve bilimsel ve klinik birçok çalışmadan geçmektedir [25, 26].

Biyomalzemeler kateter, kalp pili, kalp kapakçığı, stent, hemodiyaliz ünitesi, vasküler greft, ventriküler destek cihazı gibi kardiyovasküler uygulamalarda uzun zamandır kullanılmaktadır. Ancak, bu cihazların performansı önemli ölçüde biyomalzeme kaynaklı trombozdan etkilenmektedir. Bu sorun ile bağlantılı olarak emboli, enfarktüs, hiperplazi gibi komplikasyonlar meydana gelebilmekte, bu nedenle cihazların çalışmasını sınırlamakta veya başarısız olmasına neden olmaktadır.

Trombojenik olmayan biyomalzeme geliştirme çalışmaları uzun yıllardır devam etmektedir. Kan ile biyomalzeme etkileşimi kompleks bir süreçtir; çeşitli faktörlerin başlattığı plazma proteini adsorpsiyonu, trombosit, lökosit ve diğer kan hücrelerinin tutunumu ve daha birçok kimyasal ve mekanik faktörün rol almasıyla gerçekleşir. Küçük çapta kardiyovasküler uygulamalarda uygun greft malzemelerin geliştirilmesinde yaşanan zorluklar tromboz ile ilişkili komplikasyonlardan kaynaklanmaktadır [27-29].

2.2.1 Biyomalzeme – Kan Etkileşimi

Yıllardan beridir kardiyovasküler cihazlar geliştirilirken meydana gelen hemolitik, toksik ve immünolojik reaksiyonlar ele alınmış ve bu konulardaki problemler minimum seviyeye indirilmiş durumdadır. Bununla birlikte, trombotik ve tromboembolik komplikasyonların yanı sıra gerekli antikoagülan tedaviyle ilişkili kanama riskleri, kardiyovasküler cihazlarla ilgili ciddi endişeler olmaya devam etmektedir.

Kardiyovasküler cihazların biyouyumsuzluğunun klinik belirtileri olarak stentlerin haftalar içinde ani ve tam tıkanması; orta boy greftlerde (4-6 mm) akut ve subakut trombotik tıkanıklık; yapay kalpler, kateterler ve protez kapaklarda trombotik komplikasyonlar sayılabilir. Kardiyovasküler cihazlarla ilgili bu trombotik

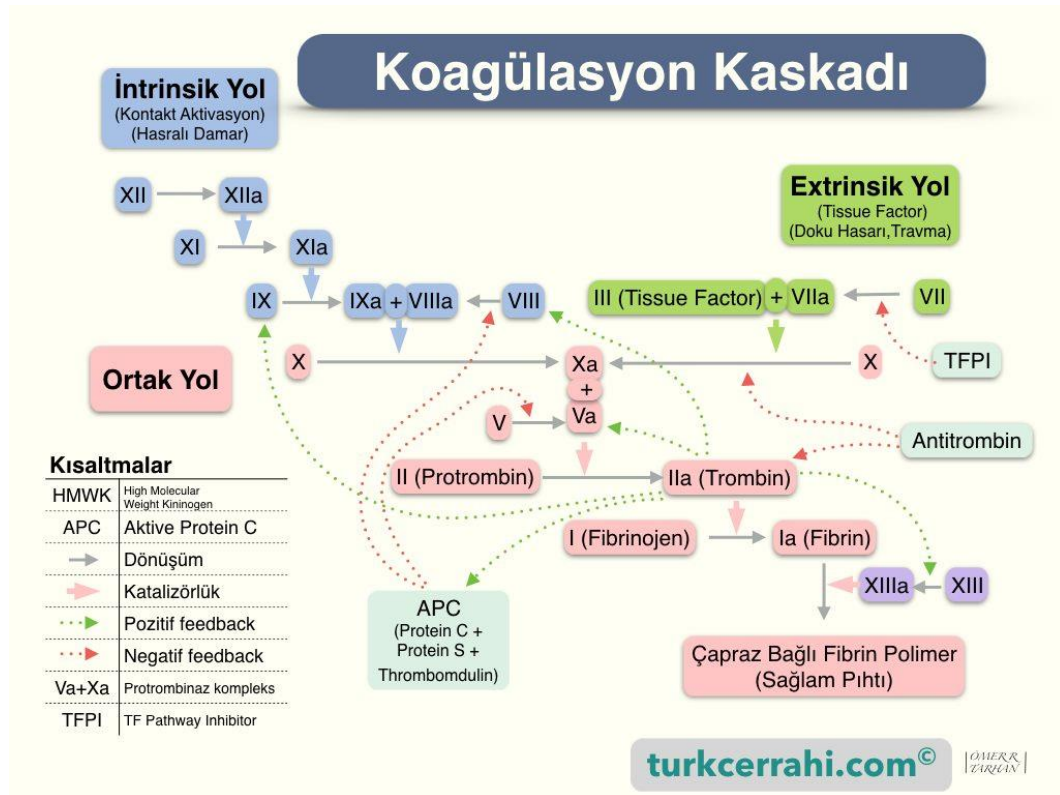
komplifikasyonlar antiplatelet ve antikoagulan tedavilerin kullanımına rağmen meydana gelmektedir.

Kan ile etkileşen biyomalzemelerdeki kan uyumluluğu ve trombojenite problemlerinin önüne geçilmesi için biyomalzemeler ile kandaki plazma proteinleri ve kan hücreleri arasındaki etkileşimler incelenmiş ve çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Biyomalzeme-kan arasında meydana gelen reaksiyonların mekanizması aşağıdaki başlıklarda açıklanmıştır.

Malzeme yüzeyi ile kan etkileşiminde meydana gelen ilk olay albümin, fibrinojen, immunoglobulin, fibronektin ve von Willebrand faktör gibi plazma proteinlerinin hızlı adsorpsiyonudur. Endotel bütünlüğünü bozan herhangi bir olayda açığa çıkan bu maddelerin malzeme yüzeyinde oluşturduğu katman platelet adezyonu ve aktivasyonu, koagülasyon, enflamasyon ve fibrinoliz gibi kompleks bir süreci tetiklemektedir.

2.2.1.1 Koagülasyon Yolağı

Koagülasyon sürecini başlatan iki yol bulunmaktadır. Bunlar intrinsik ve ekstrinsik yollardır. Bu iki yol daha sonra birleşerek ortak yolu oluşturmaktadır.



Şekil 2.7. Kan koagülasyon kaskadında rol alan yollar ve enzimlerin şematik gösterimi [30].

İntrinsik yol, Faktör XII'nin (Hageman faktör) yüzey tarafından tetiklenen aktivasyonu ile aktive olurken, ekstrinsik yol, hasarlı doku tarafından Doku faktörünün ekspresyonu ile başlatılır. İki yol, sırayla inaktif fibrinojenin fibrine dönüşümüne aracılık eden trombin üretimi ile birleşir. Trombin fibrinojeni fibrine dönüştürür. FXIII (fibrin stabilize edici faktör), fibrin monomerlerini birbirine bağlar ve stabil pıhtı oluşmuş olur. Pıhtılaşmanın yayılmasında içsel yolun rol oynadığını gösteren bulgulara karşılık dışsal yol da pıhtılaşmanın başlangıcından sorumludur.

2.2.1.2 Platelet – Biyomalzeme Etkileşimi

Platelet hücreleri (Trombositler), 3-4 mm çapında, çekirdeksiz, disk şeklinde hücrelerdir. Kemik iliğindeki megakaryositlerden türetilirler ve 150 ila 400 x 10⁶ hücre/ml arasında değişen ortalama 200 x 10⁶ hücre/mL konsantrasyonda bulunurlar. Trombositlerin hemostazdaki ana rolü, trombosit tıkaçı oluşturarak damar duvarının bütünlüğünü korumaktır. Damar yaralanmasında, etkili hemostatik tıkaçların oluşmasında ve yara iyileşmesinde kritik rol oynarlar. Trombositler stimülasyona yanıt verir ve hasarlı endotel, subendotelyum ve yapay yüzeyler gibi herhangi bir trombojenik yüzeyle temas ettiklerinde aktive olurlar. Trombosit aktivasyonu, hücre dışı bir uyarının trombosit yüzeyi ile etkileşimi ile başlar. Bu etkileşim, agonistin trombosit plazma zarı üzerindeki spesifik reseptörlere bağlanmasını içerir. Trombin ve fibrinojen gibi plazma proteinleri; kolajen gibi vasküler doku proteinleri, enflamatuar hücrelerden (lökositler) veya trombosit aktive edici faktör (PAF) veya katepsin G gibi trombositlerden türetilen moleküllerin tümü güçlü trombosit aktivatörleridir.

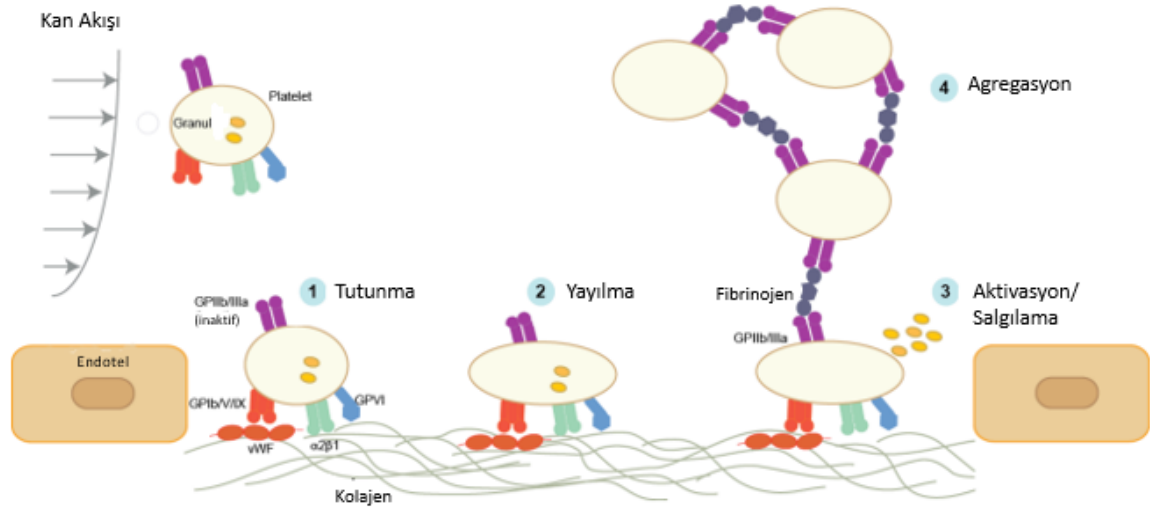
Aktivasyon sonucu birçok fizyolojik yanıt meydana gelmektedir. Bunlardan ilki hücre içi trombosit granüllerinde depolanan trombosit faktörü 4, trombospondin, b-tromboglobulin, ADP ve serotonin gibi biyolojik olarak aktif bileşiklerin mikro-ortama salgılandığı bir trombosit salım reaksiyonudur. İkinci olarak α granül salgılanmasından sonra P-selektin trombosit zarında salınır ve ifade edilir. P-selektin (CD62P), selektin ailesine ait bir hücre yüzeyi glikoproteinidir. Pasif plateletlerde P-selektin granül membranlarda bulunur ve sadece aktivasyon durumunda plazmaya salınır. Bu nedenle P-selektin yaygın olarak platelet aktivasyon belirteci olarak kullanılmaktadır.

Platelet aktivasyonu sonucu yüzeyindeki GPIIb/IIIa reseptör, yüksek afiniteli fibrinojen bağlanma bölgesini ortaya çıkaran aktif formuna dönüşür. GPIIb/IIIa (CD41/CD61) bir integrin reseptörüdür ve trombositlerde yapısal olarak eksprese edilmektedir. GPIIb/IIIa, pasif bir trombositin yüzeyinde bulunan 40-80.000 reseptöre sahip baskın trombosit reseptörüdür. Pasif trombositlerde, GPIIb/IIIa inaktif formdadır ve adsorbe edilen fibrinojen için düşük afiniteli bir bağlanma bölgesine sahiptir. Trombosit aktive olduğunda, fibrinojen için yüksek afiniteli bağlanma bölgesinin açığa çıkmasına yol açan bir konformasyonel değişiklik meydana gelir. Fibrinojenin GPIIb/IIIa'ya bağlanması, daha çok trombositin o bölgeye yönelmesini ve trombosit agregasyonunu tetikler.

Kardiyopulmoner baypas, hemodiyaliz ve ayrıca vasküler greft ve kateter gibi malzemelerle etkileşme olduğunda trombosit adezyonu ve aktivasyonunun meydana geldiği bilinmektedir. Kardiyovasküler cihazlar ve malzemelerle ilişkili trombotik komplikasyonlar, trombositleri aktive edip etmemeleri ile bağlantılıdır [28].

Morfolojik değişiklikler, trombosit aktivasyonunu gösteren bir başka ayırt edici işarettir. Aktive trombositler pasif hallerine göre yayılan bir morfoloji gösterir, yüzeyle temas alanları artar, trombosit-trombosit etkileşimleri ve agregasyonu teşvik eder. Hücre iskeletlerindeki bu değişimler, fibrinojen reseptörlerinin dağılımını ve hücre içi granüllerin içeriğinin salgılanmasını etkilemektedir. Trombosit plazma zarındaki bu değişim, aynı zamanda, zar fosfolipidleri ve pıhtılaşma sürecinde yer alan kompleksler arasında iletişim için bir alan sağlamada da rol oynar. Trombosit mikropartikülleri (PMP'ler), aktive trombositlerin ekzositotik membran tomurcuklanması ile oluşur. PMP'ler, kanın biyomalzeme ile temasından sonra oluşur ve belirli prokoagülan faktörlerden zengin olduklarına inanılmaktadır. Fibrinojen ve fibrine tutunarak ve diğer trombositlerle agregate olarak trombotik yanıtın yayılmasına yardımcı olurlar [31-35].

Şekil 2.8'de trombus oluşumuna dair genel mekanizma verilmektedir.



Şekil 2.8. Trombus oluşum mekanizması [36]

2.3 Doku Mühendisliği

Doku mühendisliği, fizik, kimya ve biyoloji alanlarındaki temel bilgiler ile çeşitli materyaller veya cihazlar geliştirerek dokuları veya organları onarmayı, değiştirmeyi veya yenilemeyi amaçlayan hızla gelişen bir disiplindir [37]. Doku mühendisliği, önceki dokunun yerini alabilecek dokular geliştirmeyi ve/veya içeriden rejenerasyonu desteklemek için malzeme ve hücre transplantasyonu ilkelerini birleştirmeyi amaçlar. Bu yaklaşım ilk olarak, sınırlı sayıda organ nakli bağıışı olması ve organ nakli için bekleme listesindeki hasta sayısının artması ile ortaya çıkmıştır [38].

Doku mühendisliği ile yeni dokular geliştirmek için kullanılan üç yöntem bulunmaktadır. Bunlardan ilki, izole hücrelerdir. Bu yaklaşım ameliyat komplikasyonlarını önler, sadece gerekli işlevi sağlayan hücrelerin değiştirilmesine ve infüzyondan önce hücrelerin manipülasyonuna izin verir. Olabilecek sınırlamalar, infüze edilen hücrelerin alıcıda işlevlerini sürdürememesi ve immünolojik reddidir. İkinci doku mühendisliği yöntemi doku indükleyici maddelerin kullanılmasıdır. Bu yaklaşımın başarısı, büyüme faktörleri gibi uygun sinyal moleküllerinin saflaştırılmasına, büyük ölçekli üretimine ve birçok durumda bu molekülleri hedeflerine ulaştırmak için yöntemlerin geliştirilmesine bağlıdır. Üçüncü yöntem ise matrislerin üzerine veya içine hücre yerleştirilen sistemlerdir. Kapalı sistemlerde hücreler, besinlerin ve atıkların geçişine izin verir ancak antikor veya bağışıklık hücreleri gibi büyük varlıkların geçmesini önleyerek naklin başarısız olmasının

önüne geçer. Bu sistemler implante edilebilir veya dışarıdan kullanılabilir. Açık sistemlerde, matrislere yerleştirilen hücreler vücuda implante edilir. Bu matrisler, kolajen gibi doğal malzemelerden veya sentetik polimerlerden yapılır. Bu oluşturulan sistemler doku mühendisliği terimlerinde iskele olarak geçmektedir. Doku mühendisliği hücrelerin ve/veya büyüme faktörlerinin hasar bölgesine iletilmesi ve yeni doku oluşumu için uygun bir yapı sağlamaktadır [39]. Bir hücre tipinin ve iskelenin birleştirildiği yapıların uyum sağlaması ve birbirleriyle örtüşmesi büyük önem taşımaktadır. Çünkü yapı, topografya ve yapı iskelelerinin mimarisinin etkileşimde önemli olduğu ve hücre davranışını etkileyebildiği gösterilmiştir [40]. In vitro tasarlanan hücre-iskele yapısının amacı doğal dokuya benzeyen ve taklit eden bir matriks elde etmektir. Bunun için de en başarılı yöntem hastadan alınan primer hücrelerle doku iskelelerinin birleştirilmesi ve implantasyon için doku üretimidir. Ancak bu yöntemde hücre toplanmasının zorluğu ve bu hücrelerin hasarlı bölgeden alınma durumu gibi sınırlamalar bulunmaktadır. Bu nedenle çalışmalar daha çok embriyonik kök hücreler, kemik iliği veya göbek kordonu mezenkimal kök hücreler gibi kök hücrelerin kullanılması alanına kaymıştır [40].

2.3.1 Kalp Kapakçığı Doku Mühendisliğinde Kullanılan Biyomalzemeler

Doku mühendisliği yöntemi ile geliştirilen kalp kapakçıklarında biyomalzemeler ile otolog hücreler bir araya getirilerek gerekli büyüme ve integrasyonun sağlanması hedeflenmektedir. Büyüyen ve gelişen kapakçık değişimi özellikle pediatrik hastalar için çok büyük önem taşımaktadır. Bu amaç için kullanılan biyomalzemeler ve iskele üretim yöntemlerinde diğer yapay kalp kapakçıklarında olduğu gibi immunojenik reaksiyon göstermeyen, trombojenik olmayan, yıkıcı özellik göstermeyen ve benzer mekanik dayanıklılık sağlayan özellikler hedeflenirken, mikro ölçekte uygun hücresel infiltrasyonu, farklılaşmasını, heterojen hücre fenotipini ve ekstraselüler matriks bileşenlerini düzenleyerek hücresel bütünleşmeyi desteklemesi (yeniden modelleme), hastanın büyümesi ile beraber gelişebilmesi, biyobozunur olması, değişen fizyolojik şartlara uyum sağlayabilmesi, üretimin kolay ve daha az maliyetli olması hedefleri ile geleneksel kalp kapakçıklarından ayrılmaktadır. Bu amaçların gerçekleştirilebilmesi için, sadece uygun biyomalzeme seçimi değil, üretim süreci de büyük önem taşımaktadır. Günümüzde halen tüm bu gereklilikleri sağlayan ticari bir ürün ise bulunmamaktadır [13].

Doku mühendisliği yöntemleri ile kalp kapakçıkları tasarlarırken biyomalzeme seçiminde bazı kriterler göz önünde tutulmalıdır. Bunlar hücrel etkileşim ve iskeleye karşı verdiği cevap, üretim süreci ve onun iskele mikro yapısına olan etkisi, mekanik özellikler ve fizyolojik ortamdaki davranışı olarak özetlenebilir.

Doku mühendisliği ile geliştirilen kalp kapakçıklarında kullanılan ve çalışılmaya devam edilen farklı biyomalzemeler bulunmaktadır. Bunlar; deselülerize ekstraselüler matriksler (homograft veya zenograft), doğal polimerler ve sentetik polimerler olarak üç sınıfa ayrılmaktadır [16].

Sentetik polimerler olarak poliglukolik asit (PGA), polilaktik asit (PLA), kopolimer polilaktik-koglikolik asit (PLGA), poli-L-laktik asit (PLLA), polietilen glikol (PEG), polikaprolakton (PCL), poliüretan (PU), poliorthoesterler, polianhidridler ve polikarbonatlar sıralanabilirken, doğal polimerlere örnek olarak kolajen, hyaluronik asit, kondrotin, kitosan; deselülerize malzemelere de sığır veya domuz perikard, domuz kalp kapakçığı verilebilir. Bu biyomalzemelerin avantajları ve dezavantajları Çizelge 2.2’de verilmiştir [3, 41].

Çizelge 2.2 Kalp kapakçığı doku mühendisliğine kullanılan biyomalzemeler, avantaj ve dezavantajları

Malzeme	Avantajlar	Dezavantajlar
Sentetik Polimerler (PGA, PLA, PLLA, PLGA, PEG...)	-Yapıyı kolay kontrol edebilme -Sınırsız tekrarlanabilirlik -Uzun süre dayanım	-Degredasyon ürünlerinin toksik olması -Düşük biyoyumluluk
Doğal Polimerler (Kolajen, Kitosan, Hyaluronik Asit...)	-Daha biyomimetik yüzey -İmmunojenik yanıt oluşturacak hücre olmaması -Doğal hücrel tutunma bölgeleri	-Mekanik özelliklerin yeterli olmaması -Yapısal olarak benzer kapakçıkların üretimi ve tekrarlanabilirliğinin zorluğu
Deselülerize Sığır veya Domuz Perikard Zenograft,	-Uygun anatomik yapı	-Deselülerizasyon işleminde matriks bütünlüğünün bozulması

Deselülerize Aort Kapakçığı Zenogrefti	-Biyomimetik yüzey ve uygun biyolojik özellikler	-Kalsifikasyon -Yetersiz deselülerizasyona bağlı immunojenik yanıt -Trombojenite
---	---	---

2.3.1.1 Perikard

Perikard, kalbi ve ana kalp damarlarının köklerini çevreleyen bir bağ dokusu tabakasıdır. Fibröz ve seröz perikard olmak üzere iki katmandan oluşur. Dış tarafta olan fibröz perikard kalın fibröz bağ dokudan oluşmaktadır. Bu sert yapı kalbin kan ile hızlı dolmasını engeller. Seröz perikard kalbe daha yakın taraftadır ve paryetal ve viseral (epikardiyum) adında iki katmandan oluşmaktadır. Her katman mezotelyum da denilen tek bir epitel hücre tabakasından oluşur. Bu katmanlar, perikardiyal boşlukla ayrılır. Bu boşlukta katmanlar arasında kayganlık sağlayan ve kalp kasılması sırasında sürtünmeyi önleyerek mekanik koruma sağlayan yaklaşık 15-50 mL arasında seröz perikard sıvısı bulunmaktadır. Perikard dokusunun kalınlığı canlının türüne göre ve alınan bölgeye göre değişebilmekle birlikte 0,3-1,5 mm arasında değişmektedir [7, 42].

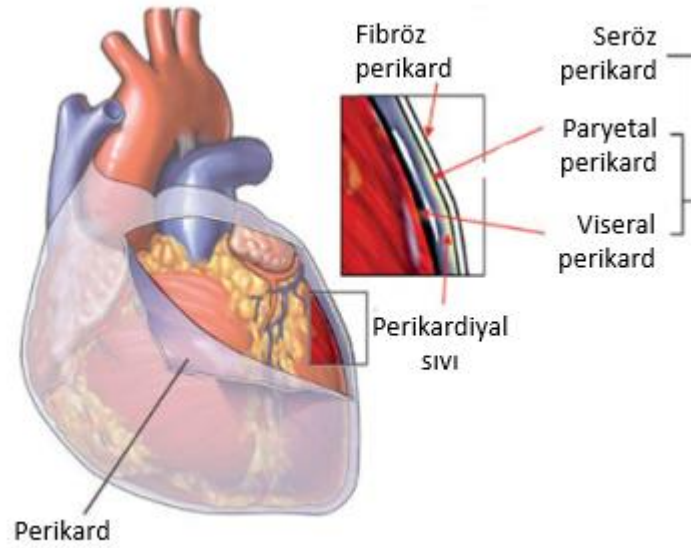
Perikard anizotropik, çok katmanlı, kompozit bir materyaldir ve kolajen, elastin, glikozaminoglikan ve diğer bazı bileşenlerin bulunduğu bir ekstraselüler matriksten oluşur. Perikardın birçok fizyolojik rolü bulunmaktadır. Kalbin hareketlerini kontrol eder, aşırı dolmasını engeller ve böylece kalbin potansiyel boyutuna bir sınır koyar. Fibröz perikard kalbin kas gövdesi ile akciğer gibi enfeksiyona yatkın komşu organlar arasında fiziksel bir bariyer görevi görür.

Çeşitli kimyasal ajanlarla fikse edilen insan ve hayvan kaynaklı (sığır, domuz, at) perikard dokuların kalp, genel cerrahi, ortopedi, nöroloji, dişçilik gibi birçok alanda kullanımı bulunmaktadır. Güncel olarak klinikte uygulanan zenograft perikard ürünler olan Tutopatch™, Cova™, Jason®, Integra®, ve Osteokor, sindirim dokusu rekonstrüksiyonları, kemik ve diş ameliyatları, kalp dokusundaki hasarlar veya yüz ve meme estetiği gibi çeşitli yumuşak dokulardaki kusurlarda tedavi amaçlı uygulanmaktadır. Fakat en yaygın olarak biyoprostetik kalp kapakçıklarında ve kalp kapakçığı doku mühendisliği yaklaşımlarıyla hazırlanan biyomalzemelerde kullanılmaktadır.

Sığır perikardı, işlevi ve performansı yaprakçık dokusunun mekanik ve hemodinamik özelliklerine bağlı olan biyoprostetik kalp kapaklarının üretiminde biyomateryal olarak yaygın bir şekilde kullanılmıştır. Sığır kaynaklı perikardiyal malzemelerin, sentetik prostetik malzemelere göre [örn. Politetrafloroetilen, polietilen tereftalat (Polyester) (Dacron®) gibi], donör dokusunun sınırsız temini, daha düşük maliyet, esneklik, fonksiyonel konak doku entegrasyonu, daha fazla biyouyumluluk, daha düşük tromboembolizm ve enfeksiyon oranı gibi avantajları bulunmaktadır [43]. Yaprakçıkların mekanik özelliklerinin uyumlu olmaması, kapakçıkların asenkron kapanmasına neden olur ve bu durum da kapağın yetersiz çalışması ve nihayetinde bozulması ile sonuçlanır. Bu nedenle ideal perikard materyali, düzgün kalınlığa, uygun fiber yön varyasyonuna, ihmal edilebilir miktarda yağa ve bir valf yaprağı oluşturacak kadar geniş bir alanda homojen fiberlere sahip olmalıdır [42].

İlk defa prostetik kalp kapakçığında kullanılmak üzere Marian Ionescu tarafından 1971'de glutaraldehit ile fikse edilmiş sığır perikardı kullanılmıştır. Perikard enfeksiyon ve komplikasyon riskinin az olması, düşük maliyetli ve kolay erişilebilir olması ve iyi hemodinamik özelliklere sahip olmasıyla birlikte, glutaraldehit ile fiksasyonunun sitotoksikite ve kalsifikasyon gibi problemlere neden olduğu bilinmektedir. Kalsifikasyonu ortaya çıkaran risk faktörleri, aldehit kalıntılarının kalması, elastin ve glikozaminoglikan degradasyonu, mekanik stres hasarı ve yüksek kalsiyum fosfor metabolizması olarak sayılabilir. Bu da malzemenin uzun dönemli performansının kısıtlanmasına ve sonrasında yeniden müdahale gerekliliğine yol açmaktadır. Glutaraldehit veya benzeri kimyasal ajanlar ile fikse edilen biyoprostetik kalp kapakçıkları genelde 10 sene içerisinde işlevini kaybetmekte ve yeniden replasman ameliyatına ihtiyaç duyulmaktadır [23, 44-52].

Güncel olarak üretilen, klinikte kullanılan veya bilimsel çalışmaları devam eden perikard, kolajenden oluşan aselüler (hücresiz) bir materyaldir. Bu durum, hücre migrasyonu ve çoğalması ve onunla birlikte doku rejenerasyonu için avantaj sağlasa da kan hücrelerinin yüksek tutunumuyla ortaya çıkan trombojenite problemini ortaya çıkarmaktadır [29, 53]. Özellikle perikardın kalp kapakçığı materyali olarak kullanımında trombojenite riski göz ardı edilmemeli ve dizayn edilen materyal bu riski minimuma düşürecek şekilde planlanmalıdır.



Şekil 2.9 Perikard yapısı [54]

2.3.1.2 Karbon Nanotüpler

Karbon nanotüpler (KNT), nano ölçekli çap ve uzunluktaki silindirik tüplere sarılmış grafit levhalardır. Grafit levhaların eşmerkezli silindirlerinin sayısına bağlı olarak, KNT'ler tek veya çok duvarlı olarak sınıflandırılır. KNT'ler bazı benzersiz kimyasal, elektriksel ve mekanik özelliklere sahiptir. Örneğin, nano ölçekte çapları nedeniyle çok yüksek bir yüzey alanı/hacim oranına sahiptir. Bu özellik sayesinde, nanotüplere daha fazla biyomolekül yüklenebildiği ve hücreler ve dokularla etkileşime girebildiği için biyomedikal uygulamalar için tercih edilmektedir. KNT'ler ayrıca mikrodalga soğurucuları olarak da hareket edebilir ve mikrodalga bazlı termal ilaç salınımına izin verebilir. Ek olarak, KNT'ler şimdiye kadar bildirilen en güçlü malzemelerden biridir ve ayrıca çok yüksek bir termal iletkenliğe sahiptir [55].

KNT'ler temel olarak üç yöntemle sentezlenir: ark deşarjı, lazerle ablasyon ve kimyasal buhar biriktirme (CVD). İlk iki yöntem, karbon kaynağı olarak grafit çubukları kullanırken, CVD'de metan ve etilen gibi hidrokarbonlar kullanılır. CNT'ler oldukça hidrofobik olduklarından dolayı, fizyolojik çözeltilerde az çözünmesi, onları biyolojik sistemlere entegre etmedeki ana zorluklardan biridir. Karbon nanotüplerin çözünme, dağılma, işleyebilme özelliklerinin geliştirilmesi için yüzey modifikasyonu yoluyla bazı yöntemler geliştirilmiştir. Bu yöntemlerden biri de karboksil (-COOH) ile yüzey

modifikasyonudur. Karbon nanotüp – ekstraselüler matriks etkileşiminin sağlanması için matriks yüzeyindeki kolajenlerin amin gruplarıyla etkileşecek şekilde karbon nanotüpler -COOH grupları ile etkileştirilmektedir [56].



Şekil 2.10 Karboksilleştirilmiş karbon nanotüp hazırlanışı [57].

1991'deki keşfinden bu yana hem tek hem de çok duvarlı KNT'ler (TDKNT ve ÇDKNT) çeşitli uygulamalar için kullanılmıştır. Bu nanotüplerin kimyasal, elektriksel ve mekanik özelliklerinden dolayı sağlık alanında tedavi amaçlı uygulamak büyük ilgi görmüştür. Şu anda, KNT'nin biyolojik uygulamaları üzerine yapılan çalışmaların çoğu, KNT'lerin proteinler, nükleik asitler veya karbohidratlar gibi biyomoleküllerle entegre olduğu ve hastalık teşhisi için bir sensör olarak kullanıldığı biyosensör gelişimi etrafında gelişmektedir. Bununla birlikte, son zamanlarda, KNT'leri doku rejenerasyonu ve in vivo gen ve ilaç dağıtımı için biyoyumlu taşıyıcılar veya biyomateryaller olarak kullanmak için çalışmalar yapılmaktadır. KNT'lerin ekstraselüler matriks üzerindeki etkileriyle ilgili yapılan çalışmalarda, KNT ve kolajen malzemelerinin birlikte kullanımıyla daha iyi mekanik ve elektriksel özelliklere sahip malzemeler elde edilebileceği sonucuna varılmıştır. Bu özellikler sayesinde özellikle kardiyak ve sinir doku mühendisliğinde giderek daha da fazla tercih edilmektedir. Karbon nanotüp toksisitesi ile ilgili günümüze kadar çok sayıda çalışma yapılmıştır. Donald ve arkadaşları %0,2 ile %2 aralığında karbon nanotüp konsantrasyonlarında hazırlanan karbon nanotüp-kolajen matriks ile

yaptığı çalışmalarda kolajen matrikslerin yapısının değişmediğini ve hücre canlılığı ve morfolojilerinin korunduğunu belirtmiştir [56].

Günümüzde kan ile etkileşen birçok biyomalzemenin kan uyumluluğu yeterli düzeyde değildir. Plazma proteinlerinin biyomalzeme yüzeyine bağlanması tromboz ve pıhtılaşma sürecini başlatır. Bu nedenle kan ile etkileşen biyomalzeme kimyasal olarak inert olmalı ve pıhtılaşma sürecini tetiklememelidir. Karbon nanotüpler, inert ve mekanik olarak güçlü yapıları ile bu amaç için uygun potansiyelde bir malzemedir. Karbon nanotüp ile yapılan kan uyumluluğu ve trombojenite çalışmalarında da karbon nanotüplerin tromboz riskini önemli ölçüde azalttığı bulunmuştur. Meng ve arkadaşları, karbon nanotüp ve poliüretan ile hazırlanan kompozit malzemelerde, sadece poliüretan malzemesine göre yüzeye çok daha düşük oranda trombosit tutunduğunu gözlemlemiştir. Ayrıca hemoliz indeksinin çok düşük olması da kan uyumluluğunun iyi olduğunu göstermektedir [10]. Guo ve arkadaşları NH^+_2 ile modifiye edilen karbon nanotüpler ile yaptığı çalışmada trombosit adezyonu, hemoliz ve kinetik pıhtılaşma testleri gerçekleştirmiş ve yüksek trombozistans ve kan uyumluluğu sonuçları elde etmiştir [58]. Başka yapılan bir çalışmada, karbon nanotüp ile mısır fibröz nanokompozit doku iskeleleri elektroçirme yöntemi ile elde edilmiş ve kan uyumluluğu ile trombojenite testleri gerçekleştirilmiştir. Sonuç olarak karbon nanotüp içeren kompozit malzemelerin düşük trombosit tutunması ve hemolitik indeks gösterdiği, bu nedenle antitrombojenik malzemeler için umut verici bir malzeme olduğu ifade edilmiştir [11].

2.4 Deselülerizasyon

Kalp kapakçığı doku mühendisliğinde kullanılan üretim teknikleri genel olarak deselülerizasyon, kalıplama, elektroçirme ve üç boyutlu biyoyazıcı olarak sıralanabilir. Fakat deselülerizasyon yöntemi, kalp kapakçığı ile benzer ekstraselüler matriks özellikleri gösteren dokuların kullanılabilmesine ve bu sayede en iyi şekilde taklit edilmesine olanak sağlayarak diğer yöntemlere kıyasla önemli avantajlara sahiptir.

Deselülerizasyon, ekstraselüler matriks yapısı ve proteinleri korunurken, doku veya organdan hücresel içeriğin uzaklaştırılması işlemidir. Bu işlemden sonra elde edilen ürün, implantasyondan sonra dokuların restorasyonunu teşvik etmek veya organları oluşturmak için bir şablon olarak hizmet edebilen ekstraselüler matriksin 3 boyutlu bir yapısıdır. Aselüler iskele mimari bir destek sağlar ve en önemlisi hücre yüzeyi molekül etkileşimi

ve büyüme faktörlerinin depolanması yoluyla homeostaz, rejenerasyon, doku ve organ gelişiminde önemli fonksiyonlara sahiptir. Ayrıca, ekstraselüler matriksin doğuştan gelen damar yapısını koruyarak yapı iskelesinin fizyolojik kan basıncına dayanmasını sağlamakta ve bu teknolojiyi transplantasyon için biyomühendislik çalışmaları konusunda en uygun hale getirmektedir. 2008'den bu yana, ilk fonksiyonel kalp biyomühendislik ile tasarlandığında, yüz, el, solunum yolu, böbrek, karaciğer, menisküs, idrar yolu dahil olmak üzere herhangi bir memeli organından hücresiz ekstraselüler matriks iskeleleri elde etme çalışmaları gerçekleştirilmiştir [59]. Kalp kapakçıkları için insan donörden doku kullanılabilirken, büyük çoğunluk kolay ulaşılabilirlik açısından hayvan kaynaklı dokulardan oluşmaktadır. Deselülerize sığır ve domuz perikard dokuları da bu amaçla uzun süredir kalp kapakçığı çalışmalarında kullanılmaktadır.

2.4.1 Deselülerizasyonda Kullanılan Yöntemler

Dokuları hücresiz hale getirmek için genel olarak fiziksel, kimyasal ve enzimatik yöntemler olmak üzere birçok yöntem bulunmaktadır. Bu yöntemler Çizelge 2.3'te verilmiştir. Hücresizleştirme yöntemleri, dokunun kökenine göre geniş bir çeşitlilik gösterir. Hücresizleştirme ajanlarının seçimi çok önemlidir, çünkü bunlar dokunun mikro yapısına ve bileşimine zarar verebilir ve dolayısıyla nihai ürünün mekanik özelliklerini etkileyebilir [60].

Çizelge 2.3 Deselülerizasyonda kullanılan yöntemler [61]

Kimyasal	Biyolojik	Mekanik
<ul style="list-style-type: none"> • İyonik Deterjanlar (Sodyum Dodesil Sülfat) • İyonik Olmayan Deterjanlar (Triton-X-100) • Zwitteriyonik Deterjanlar (CHAPS) • Asit ve Bazlar 	<ul style="list-style-type: none"> • Enzimler (Nükleazlar, Tripsin, Dispaz, vb.) • Şelat Ajanları (EDTA) • Antibiyotikler 	<ul style="list-style-type: none"> • Sıcaklık (Dondurma ve Çözme) • Mekanik kuvvet • Basınç • Elektroporasyon • Sonikasyon

<ul style="list-style-type: none">• Hipotonik ve Hipertonik Çözeltiler• Alkoller		
---	--	--

Kimyasal deselülerizasyon yöntemlerinde çeşitli deterjanlar kullanılarak hücre ve çekirdek membranlarının çözünmesi, yağ ve protein etkileşimlerinin bozulması ve denatüre olması sağlanmaktadır. Biyolojik deselülerizasyon yöntemlerinde nükleazlar deoksiribonükleotit ve ribonükleotit zincirlerinin hidrolizini kataliz ederken tripsin ve dispaz da çeşitli peptitlerin bağlarını yıkmak için kullanılmaktadır. Mekanik deselülerizasyon yöntemlerinden biri olan dondurup çözme metodunda hücre membranını bozan buz kristalleri oluşturularak hücrelerin parçalanması hedeflenmektedir. Elektroporasyon yönteminde ise hücre membranını bozmak için elektriksel alan uygulanır. Bu yöntemler tek başlarına kullanılabileceği gibi birbirlerinin çeşitli kombinasyonları ile de kullanılabilir [61].

Deselülerizasyon işleminin başarılı kabul edilmesi için dokuda kalan maksimum DNA miktarı 50 ng'nin altında olmalıdır. Dokulardan hücre materyalinin uzaklaştırılması miktarının belirlenmesi için birçok yöntem bulunmaktadır. Histoloji çalışmalarında Hematoksilin & Eozin, Mason Trichrome, DAPI boyamaları ile hücre yapıları boyama yolu ile görüntülenebilirken, immunohistokimya çalışmalarında aktin ve vimentin gibi hücre içi proteinler sayesinde hücre analizi yapılabilmektedir. Kantitatif DNA miktarı ise propidyum iyodür ve PicoGreen analizleriyle gerçekleştirilebilir [62, 63].

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1. Materyal

Deselüerizasyon optimizasyonu ve karakterizasyonu çalışmaları için Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) (Merck, Almanya), Triton-X-100, Tris-HCl, fosfat tamponlu tuz (PBS) (Sigma-Aldrich, ABD), Hematoksilen (Merck, ABD), Eozin (Sigma, ABD), Masson Trichrome (Scytek, ABD), DAPI (Biotium, ABD), Deoksiribonükleaz (Invitrogen, ABD), Proteinaz K (Sigma, ABD), Kondroitin sülfat (Sigma, ABD), Quant-iT™ PicoGreen test kiti (Invitrogen, ABD) kullanılmıştır. Kompozit doku iskelelerinin üretiminde karboksillenmiş çok duvarlı karbon nanotüp (Nanografi, Türkiye) kullanılmıştır. Kan uyumluluğu analizlerinin gerçekleştirilmesinde mezbahadan temin edilen koyun kanı kullanılmıştır. Sodyum sitrat içeren kan tüpleri laboratuvara hızla ulaştırılmış ve kullanılacakları zamana kadar +4°C'de saklanmıştır. Sitotoksisite çalışmaları için L929 Fare Fibroblast hücre hattı (ATCC, ABD), düşük glikozlu Dulbecco besi ortamı (L-DMEM), antibiyotik-antimiyotik solüsyonu, fetal sığır serumu (FBS), L-glutamin, Tripsin-EDTA (%0.25-w/PhenolRed) (Capricorn, Almanya) temin edilmiştir. MTT kiti Biovision (ABD) firmasından alınmıştır.

3.2 Perikard Doku Deselüerizasyonu

Bu tez çalışması kapsamında mezbahadan temin edilen sığır kalplerinden perikard dokular disekte edilmiş, uygun deselüerizasyon protokolünün belirlenmesi için farklı yöntemlerle optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiş ve uygulanan bu yöntemlerin morfolojik, histolojik ve biyokimyasal olarak karakterizasyonları yapılmıştır.

3.2.1. Sığır Kaynaklı Perikard Doku Diseksiyonu

Bu tez çalışmasında kullanılmak üzere sığır perikard dokusu uygun model olarak belirlenmiştir. Mezbahadan temin edilen sığır kalpleri laboratuvara en kısa sürede ulaştırılmıştır. Bistüri kullanılarak perikard tabakası sığır kalplerinin en dış yüzeyinden disekte edilmiş ve dokuların yüzeyindeki yağ tabakası bistüri yardımıyla ayrılmıştır. Elde edilen perikard dokular kan ve diğer fizyolojik sıvılarından arındırılmaları amacıyla fosfat tamponu (PBS) ile 2 saat yıkanmış

ve deselüerizasyon işlemi öncesinde 2 x 2 cm boyutunda kesitleri alınmıştır. Dokular kullanılacakları zamana kadar -80°C’de saklanmıştır.

3.2.2. Perikard Dokuların Deselüerizasyon Optimizasyonu

Disekte edilen perikard dokuların deselüerizasyon işlemi için Sodyum Dodesil Sülfat (SDS), Triton-X-100 ve dondurup çözme yöntemleri, tek başına ya da kombinasyonları ile, farklı konsantrasyonlarda kullanılarak optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Deterjan konsantrasyonları %0,5 ve %1 olarak belirlenirken, muamele süreleri 24 saat olarak sabit tutulmuştur. Sadece kimyasal deselüerizasyon uygulanan örnekler 100 mL’lik beherlere konulmuş ve üzerlerine 50 mL SDS ve Triton-X-100 çözeltileri eklendikten sonra ve orbital çalkalayıcıda 100 rpm’de 24 saat muamele edilmiştir. Fiziksel ön işlem uygulanan grup ise 10 mM hipotonik Tris-HCl tamponu (pH=7.4) içinde dondurup çözme işlemi uygulandıktan sonra yine 100 mL’lik beher içerisinde 50 mL %0,5 SDS çözeltisi ile muamele edilmiştir. Daha sonra deterjanların dokudan uzaklaştırılması için 48 saat PBS ile muamele edilmesi suretiyle dokuların yıkanması işlemi gerçekleştirilmiştir. Yıkama işleminden sonra dokular 50 U/mL deoksiribonükleaz (DNaz) ile 37°C’de 3 saat muamele edilmiş ve PBS ile yıkanmıştır. Bu işlemlerin ardından dokular karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilene kadar -80°C’de bekletilmiştir. Deselüerizasyon optimizasyonu için çalışılan gruplar Çizelge 3.1’de belirtilmiştir.

Çizelge 3.1. Deselüerizasyon protokolü optimizasyon parametreleri

Grup	Deselüerizasyon Metodu
1	%0,5 SDS ile muamele
2	%1 SDS ile muamele
3	%1 Triton-X-100 ile muamele
4	Dondurup çözme ön işlemi sonrası %0,5 SDS ile muamele

3.2.3 Deselülerize Perikard Dokuların Karakterizasyonu

İşlem görmemiş kontrol grubu ve deselülerizasyon optimizasyonu çalışılan 1, 2, 3 ve 4 numaralı gruplar morfolojik, histolojik ve biyokimyasal karakterizasyon için analiz edilmiştir. Histoloji analizlerinde Hematoksilen & Eozin, Mason's Trichrome ve DAPI boyamaları gerçekleştirilmiştir. Biyokimyasal analizlerde ise kantitatif olarak genomik DNA, kolajen ve glikozaminoglikan (GAG) tayini yapılmıştır. Yaş-kuru ağırlık ölçümleri ile de gruplardaki ağırlık değişimleri belirlenmiştir.

3.2.3.1. Morfolojik Analiz

Diseksiyon işlemi sonrası işlem görmemiş doğal perikard doku ve deselülerizasyon işlemi uygulanmış perikard dokular morfolojik olarak görüntülenmiştir.

3.2.3.2 Histolojik Analizler

Histolojik analizler için işlem görmüş ve görmemiş örnekler %10 formalin ile 5 gün muamele edilerek fikse edilmiştir. Bu işlem sonrasında fiksatif ajanın dokudan uzaklaştırılması amacıyla 48 saat yıkama işlemi yapılmıştır. Dokular daha sonra %80, %90, %96, %100 (h/h) oranında alkol ile muamele edilme suretiyle alkol serisinden geçirilmiş ve ardından ksilen ile muamele edilmiştir. Belli bir sertliğe ulaşan dokular ısıtılan parafin bloklara gömülmüş ve donması için bekletilmiştir. Donduktan sonra çıkarılan parafin bloklardan mikrotom cihazı ile 5 µm kalınlığında kesitler alınmış ve sonrasında histoloji boyamaları gerçekleştirilmiştir.

3.2.3.2.1 Hematoksilen ve Eozin (H&E) Boyaması

H&E boyamasında hematoksilen hücre çekirdeklerinin boyanması için kullanılırken, eozin sitoplazmayı boyayarak ekstraselüler matriks yapısının ve bütünlüğünün incelenmesine olanak verir. Hücre çekirdekleri mavi-mor renge boyanırken, sitoplazma pembe renkte görüntülenir. Doku kesitlerindeki parafini eritmek için ksilen ile muamele işleminden sonra dokular, içindeki suyun atılması amacıyla alkol serisinden geçirilmiş ve farklı süre optimizasyonlarından sonra 2,5 dk olarak belirlenen hematoksilen boyaması ile muamele edilmişlerdir. Hematoksilen ile fazla boyanmasının önüne geçilmesi için örneklere asit alkol uygulanmıştır. Eozin ile 30 dk muameleden sonra alkol serisinden

geçirilmiş ve lamel kullanılarak kesitler entellan ile kapatılmıştır. Örnekler mikroskopta görüntülenmiştir.

3.2.3.2.2 DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) Boyaması

4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) boyaması ile floresan ışık altında maviye boyanan hücre çekirdeklerinin görüntülenmesi gerçekleştirilmiştir. Doku kesitlerindeki parafin ksilen ile eritildikten sonra alkol serisinden geçirilmiş ve çeşme suyuna konulmuştur. Daha sonra DAPI boyası dokular ile etkileştirilmiş ve örnekler lamel ile kapatılmıştır. Boya ışığa karşı hassas olduğundan ışıktan korunan örnekler karanlık ortamda mikroskopta görüntülenmiştir.

3.2.3.2.3 Mason Trichrome Boyaması

Mason Trichrome, dokulardaki kolajen fiberler, hücre çekirdekleri ve sitoplazmanın görüntülenmesini sağlar. Bu boyamada kolajen fiberler maviye boyanırken, çekirdekler siyah, sitoplazma ise kırmızı renge boyanır. Doku kesitleri ksilende bekletildikten sonra %100 ve %96 (h/h) alkol serisi ve çeşme suyundan geçirilmiştir. Ardından kesitler sırasıyla 5 dk Weigert's Hematoksilen, 15 dk Bieberich Scarlet/Acid Fusion, 10-15 dk Phosphomolybdic – Phosphotungstic Acid, 8-10 dk Anilin Mavisi ve 5 dk Asetik Asit boyaları ile muamele edilmiş ve aralarda su ile yıkamaları gerçekleştirilmiştir. Alkol serisi ile dehidrasyonun ardından lamel ile entellan kapatılma işlemi yapıp mikroskopta görüntülenmiştir.

3.2.3.3 Biyokimyasal Analizler

Kontrol ve deselülerizasyon gruplarındaki DNA, kolajen ve GAG miktarlarının sayısal analizi, deselülerizasyon çalışmalarının sonuçlarını değerlendirmede histoloji çalışmalarıyla beraber kesin bir ölçüttür. Bu analizlerde, dokularda kalan DNA miktarının belirlenmesi için Quant-iT™ PicoGreen test kiti, kolajen miktarının belirlenmesi için Hidroksiprolin test kiti ve son olarak glikozaminoglikan (GAG) miktarının belirlenmesi için Dimetil Metilen Mavisi (DMMB) test kiti kullanılmıştır. Analizler öncesinde dokular

liyofilize edilmiş, alkol ile sterilizasyon işleminden sonra tekrar kurutulmuş ve proteinaz K ile etkileştirilip parçalanma işlemine maruz bırakılmıştır.

3.2.3.3.1 Genomik DNA Miktarı Tayini

Artık genomik DNA miktarı analizi için Quant- iT PicoGreen ® (ThermoFisher, ABD) kiti protokolüne göre gerçekleştirilen çalışmada işlem görmemiş grup ve farklı deselüerizasyon grupları olmak üzere beş ayrı gruptan n=3 örnek analiz edilmiştir. Dokular liyofilize edilerek kurutulduktan sonra 100 mM amonyum asetat ile hazırlanan 1 mg/mL proteinaz K solüsyonu ile gece boyunca etkileştirilmiş ve örneklerin enzimatik olarak parçalanması sağlanmıştır. DNA stok solüsyonunun artan konsantrasyonlarından standart eğri oluşturulmuş ve mikropilaka okuyucuda (Biotek Synergy 2, ABD) 485-520 nm'de örneklerin absorbansları ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlar kuru ağırlıklara göre normalize edilmiştir.

3.2.3.3.2 Sülfatlı Glikozaminoglikan (sGAG) Miktarı Tayini

Dimetil Metilen Mavisi (DMMB) kiti kullanılarak gerçekleştirilen analizde işlem görmemiş grup ve farklı deselüerizasyon grupları olmak üzere beş gruptan n=3 örnek ile çalışılmıştır. Dokular liyofilize edilerek kurutulduktan sonra 100 mM amonyum asetat ile hazırlanan 1 mg/mL proteinaz K solüsyonu ile gece boyunca etkileştirilmiş ve örneklerin enzimatik olarak parçalanması sağlanmıştır. Kondroitin sülfatın 100 mM amonyum asetat solüsyonunda çözülmesiyle artan konsantrasyonlarından hazırlanan çözeltiler ile standart eğri oluşturulmuştur. Örnekler ve standartlardan alınan 40 µL solüsyon, 200 µL DMMB kit solüsyonu ile etkileştirilmiş, ardından 96 kuyucuklu kaptan 525 nm'de absorbans ölçümleri yapılmıştır. Sonuçlar kuru ağırlıklarına göre normalize edilmiştir.

3.2.3.3.3 Kolajen Miktarı Tayini

İşlem görmemiş grup ve deselüerizasyon gruplarındaki kolajen miktarı, hidroksiprolin kiti kullanılarak tayin edilmiştir. Beş gruptan n=3 örnek ile çalışılmıştır. Bu amaçla, liyofilize edilerek kurutulmuş dokuların üzerine distile su ve hidroklorik asit (HCl) eklenmiş ve 120°C'de 3 saat bekletilerek parçalanma işlemi gerçekleştirilmiştir. Daha

sonra her birinden alınan 10'ar μL solüsyon 96 kuyucuklu kaba aktarılmış ve gece boyu kurumaya bırakılmıştır. Daha sonra örneklerin üzerlerine hidrokisprolin test kiti protokolünde bulunan 100 μL Chloramine T ve DMAB reagent eklenmesi ve inkübasyonlarını takriben 560 nm'de örneklerin absorbansları ölçülmüştür. Sonuçlar kuru ağırlıklarına göre normalize edilmiştir.

3.2.3.4 Yaş-Kuru Ağırlık Değişimleri

Kontrol grubu ve deselülerizasyon gruplarının yaş ve kuru ağırlık değişimlerinin hesaplanması için, dokulara deselülerizasyon protokolleri uygulandıktan sonra fazla su emdirme yoluyla uzaklaştırılıp ıslak ağırlıklarının tartımları yapılmıştır. Kuru dokulardaki ağırlık değişimlerinin hesaplanması için de ıslak kontrol ve deselülerizasyon grupları liyofilize edilip kurutulduktan sonra ağırlık ölçümleri gerçekleştirilmiştir.

3.3 Kompozit Doku İskelelerinin Hazırlanması

Deselülerizasyon çalışmaları sonucu optimize edilen yöntemle hücresizleştirilen doku iskeleleri ve -COOH fonksiyonelleştirilmiş çok duvarlı karbon nanotüpler kullanılarak kompozit doku iskeleleri hazırlanması çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda, deselülerize doku iskelelerinin yüzeylerinin modifiye edilmesi için farklı konsantrasyonlarda karbon nanotüp solüsyonları hazırlanmış ve doku iskeleleriyle etkileştirilmiştir.

3.3.1 -COOH Fonksiyonelleştirilmiş Çok Duvarlı Karbon Nanotüp Solüsyonu Hazırlanması

Deselülerize doku iskelelerinin -COOH fonksiyonelleştirilmiş karbon nanotüp ile modifikasyonun gerçekleştirilmesi için %0,01, %0,05, %0,1, %0,5, %1, %2, %3 konsantrasyonunda deiyonize su ile çözelti hazırlanmış ve bu çözeltilere 1-3 saat arası sonikasyon uygulanmıştır. Her konsantrasyon oranından iki adet çözelti hazırlanmış, bir grup direk olarak deselülerize dokular ile inkübe edilirken, diğer gruba ise 10000 rpm'de 5 dk santrifüj işlemi uygulanmıştır. Bu işlemin ardından süpernatant (%80'lik kısmı) alınarak dokular ile etkileştirilmiştir.

3.3.2 Kompozit Doku İskelelerin Sentezi

Karbon nanotüp solüsyonlarının hazırlanmasından sonra doku iskeleleri solüsyonlar ile etkileştirilmiş ve orbital çalkalayıcıda 37°C, 120 rpm'de 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. Bu sürenin sonunda doku iskeleleri solüsyonlardan alınmış ve etkileşmeyen karbon nanotüplerin uzaklaştırılması için PBS yıkamasına konulmuştur. 24 saat yıkama işleminin sonunda karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilene kadar -80°C'de saklanmıştır. Kuru doku ile gerçekleştirilecek analizler için belli sayıda doku liyofilize edilerek kurutulmuştur.

3.3.3 Kompozit Doku İskelelerinin Karakterizasyonu

Kompozit doku iskelelerindeki karbon nanotüp – perikard etkileşiminin analiz edilmesi ve karbon nanotüp miktarının belirlenmesi için FTIR, TGA, AFM analizleri gerçekleştirilmiştir. Malzemelerin termal özelliklerinin belirlenmesi için DSC, morfolojik analizleri için de taramalı elektron mikroskobu kullanılmıştır. Karbon nanotüplerin perikard üzerindeki mekanik dayanım etkisinin anlaşılması için çekme-uzama mekanik testi yapılmış ve mukavemet değerleri incelenmiştir. Doku iskelelerinin kan uyumluluğu ve trombojenite analizleri için koyun kanı ve koyun kanından elde edilen trombositçe zengin plazma kullanılarak platelet adezyon testi, hemoliz testi, tüm kan pıhtılaşma testi ve Calcein-AM boyaması gerçekleştirilmiştir. Hücre canlılığına ve çoğalmasına olan etkilerinin incelenmesi için de in vitro sitotoksitesite analizi yapılmıştır.

3.3.3.1 Fourier Transform Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR)

Doğal, deselülerize ve kompozit doku iskelelerinin kimyasal bileşenlerini incelemek ve karakterize etmek için FTIR analizi gerçekleştirilmiştir. Farklı konsantrasyonlarda karbon nanotüp içeren kompozit malzemeler analiz edilerek, konsantrasyonun malzemenin kimyasal yapısına etkisi incelenmiştir. Bu analiz için dokular liyofilize edilerek kurutulmuş ve 2 x 2 cm büyüklüğünde hazırlanmıştır.

3.3.3.2 Termogravimetrik Analiz (TGA)

Kompozit doku iskelelerindeki karbon nanotüp oranının belirlenmesi amacıyla TGA (TA Instruments, SDT Q600, ABD) analizi gerçekleştirilmiştir. Bu analiz için örnekler liyofilize edilerek kurutulmuş ve minimum 10 mg ağırlığında olacak şekilde hazırlanmıştır. Analiz 10°C sabit ısıtma hızında, 0-900 °C aralığında hava atmosferinde gerçekleştirilmiştir.

3.3.3.3 Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM) Analizi

Perikard doku yüzeyi ile etkileşen karbon nanotüp miktarının ve dağılımının homojenitesinin incelenmesi amacıyla işlem görmemiş, deselülerize ve kompozit doku iskeleleri AFM ile analiz edilmiştir. Bu analiz Asylum Research MFP3D-SA (Oxford Instruments, İngiltere) cihazı ile 48 N/m yay sabiti ve 190 kHz frekans parametreleri ile gerçekleştirilmiştir. Çalışmada kullanılan uç piramit şeklinde olup 15 nm çapındadır. Analiz sonucunda yüzeylerin iki ve üç boyutlu görüntüleri ile grafikleri elde edilmiştir.

3.3.3.4 Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) Analizi

İşlem görmemiş, deselülerize ve iki farklı KNT konsantrasyonuna sahip kompozit doku iskelelerinin termal özelliklerinin belirlenmesi için DSC analizi (TA Instruments, SDT Q600, ABD) gerçekleştirilmiştir. Bu analiz için liyofilize edilerek kurutulan örnekler eşit ağırlıklarda tartılmıştır. Analiz hava ortamında, 25°C- 500°C aralığında, tek ısıtma, 10°C/dakika ısıtma hızıyla gerçekleştirilmiştir. Analiz sonucunda malzemelerin denaturasyon sıcaklıkları belirlenmiştir.

3.3.3.5 Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi

İşlem görmemiş, deselülerize ve kompozit doku iskelelerinin morfolojik yapıları SEM (Tescan, Çekya) ile incelenmiştir. Bu analiz için liyofilize edilerek kurutulan dokular 1 x 1 cm olarak kesilmiş ve altın kaplama yapıldıktan sonra çeşitli büyütmelelerde görüntülenmiştir.

3.3.3.6 Platelet Adezyon Testi

Malzemelerin trombojenite ve kan uyumluluğu değerlendirmesinde en temel testlerden biri olan platelet adezyon testi, ISO 10993-4 standartlarına göre gerçekleştirilmiştir. Bu test kapsamında trombosit hücrelerinin işlem görmemiş, deselülerize ve kompozit doku iskelelerine gösterdiği adezyon, agregasyon ve aktivasyon cevabı incelenmiştir. Bu test trombositçe zengin plazma kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Mezbahadan temin edilen antikoagulan koyun kanı, 1700 rpm'de 10 dk santrifüj edilerek trombositçe zengin plazma elde edilmiştir. 24 kuyucuklu kap içine yerleştirilen doku iskelelerinin üzerine 500'er μL trombositçe zengin plazma eklenmiş ve 1 saat boyunca orbital çalkalayıcıda 100 rpm'de 37°C 'de inkübasyona bırakılmıştır. 1 saatin sonunda, tutunmayan trombositlerin uzaklaştırılması için PBS ile iki kere yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Ardından, rnekler PBS ile hazırlanan %2,5 (h/h) glutaraldehit solüsyonu ile $+4^\circ\text{C}$ 'de fikse edilmiştir. Tekrar PBS ile iki defa yıkama işleminden sonra %0, 25, 50, 75 ve 100 (h/h) alkol çözeltisinde 10'ar dakika bekletilerek alkol serisinden geçirilmiştir. Son olarak örnekler liyofilize edilerek kurutulmuş, altın (Au) kaplama yapıldıktan sonra çeşitli büyütmelerde SEM ile incelenerek trombositlerin yüzeylerdeki tutunma davranışları karakterize edilmiştir.

3.3.3.7 Calcein-AM Boyaması

Trombositçe zengin plazma ile etkileşen işlem görmemiş, deselülerize ve kompozit doku iskelelerinin yüzeylerindeki hücre tutunma miktarının ve hücre canlılığının daha iyi karakterize edilebilmesi için bu gruplara Calcein-AM boyaması yapılmıştır. Bu boyamada canlı hücreler hücre içi esteraz aktivitesine bağlı olarak yeşil boyanır ve florasan ışıma yapar. 24 kuyucuklu kaptan hazırlanan 1x1 cm doku iskeleleri zerine 500 μL trombositçe zengin plazma eklenmiş ve 37°C 'de orbital çalkalayıcıda 100 rpm'de 1 saat boyunca inkübe edilmiştir. Inkübasyon sonunda tutunmayan trombositlerin uzaklaştırılması için iki kez PBS ile yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Örnekler, 2 μM hazırlanan 500 μL Calcein-AM boyası ile etkileştirilmiş ve 30 dk inkübe edilmiştir. Sonrasında rnekler iki kez PBS ile yıkanmış ve yeşil filtre altında mikroskopta incelenmiştir.

3.3.3.8 Hemoliz Analizi

Malzeme yüzeyine tutunan kırmızı kan hücrelerinden salınan hemoglobin miktarının belirlenmesi için yapılan hemoliz analizi, işlem görmemiş doğal, deselülerize ve kompozit doku iskelelerinin kırmızı kan hücreleri ile etkileşimlerinin incelenmesi, kan uyumluluğu ve trombojenite değerlendirmesinde temel testlerden biridir. Bu çalışmada doğal, deselülerize ve iki farklı karbon nanotüp konsantrasyonu ile hazırlanan kompozit doku iskeleleri ile çalışılmıştır. Antikoagulan kan, PBS ile 4:5 oranında karıştırılarak seyreltilmiştir. 1 x 1 cm hazırlanan doku iskeleleri santrifüj tüpüne konulmuş, 10 mL PBS ile 37°C’de 30 dk boyunca inkübe edilmiştir. Daha sonra örneklerin üzerine 200 µL seyreltilmiş kan eklenmiş ve 37 °C’de 1 saat daha inkübasyona bırakılmıştır. 1 saatin sonunda tüplerin içindeki solüsyonlar 1500 rpm’de 10 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatantlardan alınan 100 µL örnekler 96 kuyucuklu kaba aktarılmış ve 540 nm’de absorbansları okunmuştur. PBS ile etkileştirilen seyreltilmiş kan negatif kontrol iken, distile su ile etkileştirilen seyreltilmiş kan pozitif kontroldür. Elde edilen absorbans değerlerinden sonra, hemoliz oranı aşağıdaki formül ile hesaplanabilir:

$$\text{Hemoliz oranı} = \frac{(\text{Örnek absorbansı} - \text{Negatif kontrol absorbansı})}{(\text{Pozitif kontrol absorbansı} - \text{Negatif kontrol absorbansı})} \times 100 \quad \text{Eşitlik 1.}$$

3.3.3.9 Kinetik Kan-Pıhtılaşma Analizi

Doku iskelelerinin kan ile etkileştiğinde meydana gelen pıhtılaşma reaksiyonunun incelenmesi için kinetik kan-pıhtılaşma deneyleri gerçekleştirilmiş ve doku iskelelerinin kan ile etkileştiği 5, 15 ve 35. dakikalarda kanın yüzeylerdeki pıhtılaşma miktarı araştırılmıştır. Bu çalışmalar için doğal, deselülerize ve iki farklı karbon nanotüp konsantrasyonunda kompozit doku iskeleleri 1 x 1 cm hazırlanmış ve 12 kuyucuklu kaba yerleştirilmiştir. Her gruptan üçer örnekle çalışılan bu deneyde, öncelikle 3 ml antikoagulan kan ile 300 µL 0.1 M CaCl₂ ‘nin etkileştirilmesiyle aktive edilen kan hazırlanmıştır. 100 µL aktive kan doku iskelelerinin üzerine eklendikten sonra oda sıcaklığında 5, 15 ve 35 dk inkübe edilmiştir. Her zaman diliminin sonunda, örnekler 2 mL distile su ile 5 dk boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyonun sonunda her örnekten 200 µL alınarak 96 kuyucuklu kaba transfer edilmiş ve 540 nm’de absorbans ölçümü yapılmıştır. Trombusda hapsolmayan kırmızı kan hücreleri, distile su eklenmesiyle lize

uğrar ve suya hemoglobinin salınır. Solüsyondaki hemoglobinin konsantrasyonu 540 nm’de ölçülür. Dolayısıyla pıhtının büyüklüğü absorbanın değeri ile ters orantılıdır. Pozitif kontrol olarak boş kuyucuğa eklenmiş kan kullanılmıştır.

3.3.3.10 Mekanik Analiz

İşlem görmemiş, deselülerize ve %0,05 ve %0,1 KNT kompozit doku iskelelerinin mekanik dayanımlarının incelenmesi amacıyla malzemelerin mekanik analizleri gerçekleştirilmiştir. Bu analizler CellScale Univert Biomaterial Tester (CellScale, Kanada) cihazı kullanılarak 50 N yükleme hücresi ve 10 mm/dk çekme hızı ile gerçekleştirilmiştir. Analiz için 1 cm x 1 cm doku iskeleleri kullanılmıştır. Analiz sonucunda çekme dayanımları ve elastisite modülleri belirlenmiştir. Elastisite modülü, gerilim-gerinim grafiğinde %10- %40 deformasyon alanından hesaplanmıştır.

3.3.3.11 Sitotoksitesite Analizi

Farklı karbon nanotüp konsantrasyonları ile hazırlanan kompozit doku iskelelerinin hücre tutunmasına, büyümesine ve proliferasyonuna olan etkilerinin incelenmesi amacıyla in vitro sitotoksitesite testi gerçekleştirilmiştir. 1 x 1 cm hazırlanan kuru kompozit doku iskeleleri, sterilizasyon için 20 dk boyunca %70 (h/h) etanolde bekletilmiş, ardından %3 AA’de (PBS ile çözülmüş Antibiyotik-Antimikotik solüsyonu) 45 dk muamele edilmiştir. PBS yıkamasından sonra hava ile kurutulmuş ve UV sterilizasyonu yapılmıştır. Hücre çalışmaları için L929 hücre hattı kullanılmıştır. Besiyeri olarak düşük glikoz DMEM ortamına %1 L-Glutamin, %1 Antibiyotik-Antimikotik ve %10 fetal sığır serumu (FBS) eklenmiştir. Sterilize edilen doku iskeleleri 24 kuyucuklu kaplara aktarılmış ve üzerlerine 45×10^3 hücre ekilmiştir. Kontrol grubu olarak boş kuyucuğa hücre ekimi yapılmıştır. Malzemeler 3 saat boyunca inkübatörde bekletilmiş ve daha sonra üzerlerine 1 mL besiyeri eklenmiştir.

24 saat inkübasyondan sonra sitotoksitesite analizlerinin gerçekleştirilmesi amacıyla 2,5 mg/mL MTT solüsyonu PBS içerisinde hazırlanmıştır. Malzemelerin üzerindeki besiyeri çekilmiş ve üzerlerine 600 µL DMEM ve 60 µL MTT solüsyonu konulmuştur. Malzemeler 3 saat CO₂ inkübatörde bekletildikten sonra üzerlerindeki solüsyon alınmış ve yerine 400 µL DMSO eklenerek oluşan formazan kristallerin çözülmesi sağlanmıştır. Her bir kuyucuktan 200 µL solüsyon alınarak 96 kuyucuklu kültür kabına konulmuş ve

570 nm'de mikropilaka okuyucuda absorbanans değerleri 690 nm referans absorbanans değeri olarak alınmıştır.

3.4 İstatistiksel alışmalar

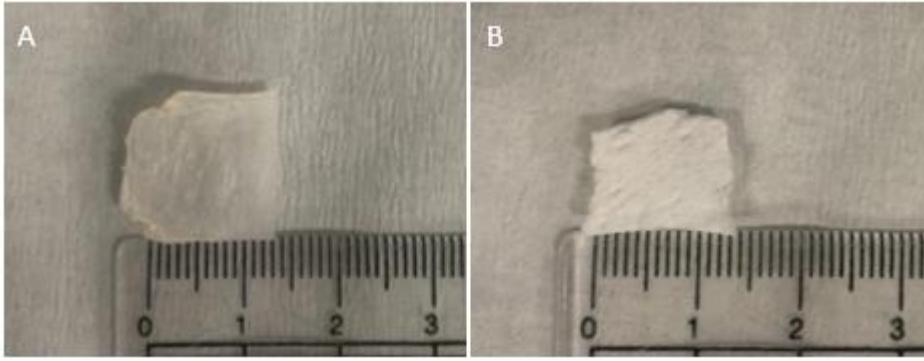
Analizler sonucu elde edilen veriler standart sapma (\pm) ile verilmiştir. İstatistiksel hesaplamalar için Graphpad Prism 7.0 programı kullanılarak tek y6nl6 ANOVA analiz y6ntemi ve tukey karşılaştırma y6ntemi ile çalışılmış ve sonuçlar anlamlı farklılık seviyeleri ile karşılaştırılmıştır. Anlamlı farklılık seviyesi %95 kabul edilmiştir ($p < 0.05$).

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

4.1 Deselüerize Perikard Dokuların Hazırlanması

4.1.1 Morfolojik Analiz

İşlem görmemiş ve farklı deselüerizasyon protokolleri uygulanmış perikard dokuların morfolojik görüntüleri Şekil 4.1’de verilmiştir. A) İşlem görmemiş perikard dokusu, B) %0,5 SDS + dondurup çözme muamelesi ile optimize edilen deselüerize perikard doku morfolojilerini göstermektedir. Deselüerizasyon işlemleri sonrasında perikard dokuların daha mat ve beyaz bir yapıya sahip olduğu ve işlem görmemiş dokuya göre sertleşme olduğu gözlenmiştir. Bu da deselüerizasyon işlemlerinin hücre ve ekstraselüler matriks bileşenleri üzerinde etkisi olduğunu göstermektedir.



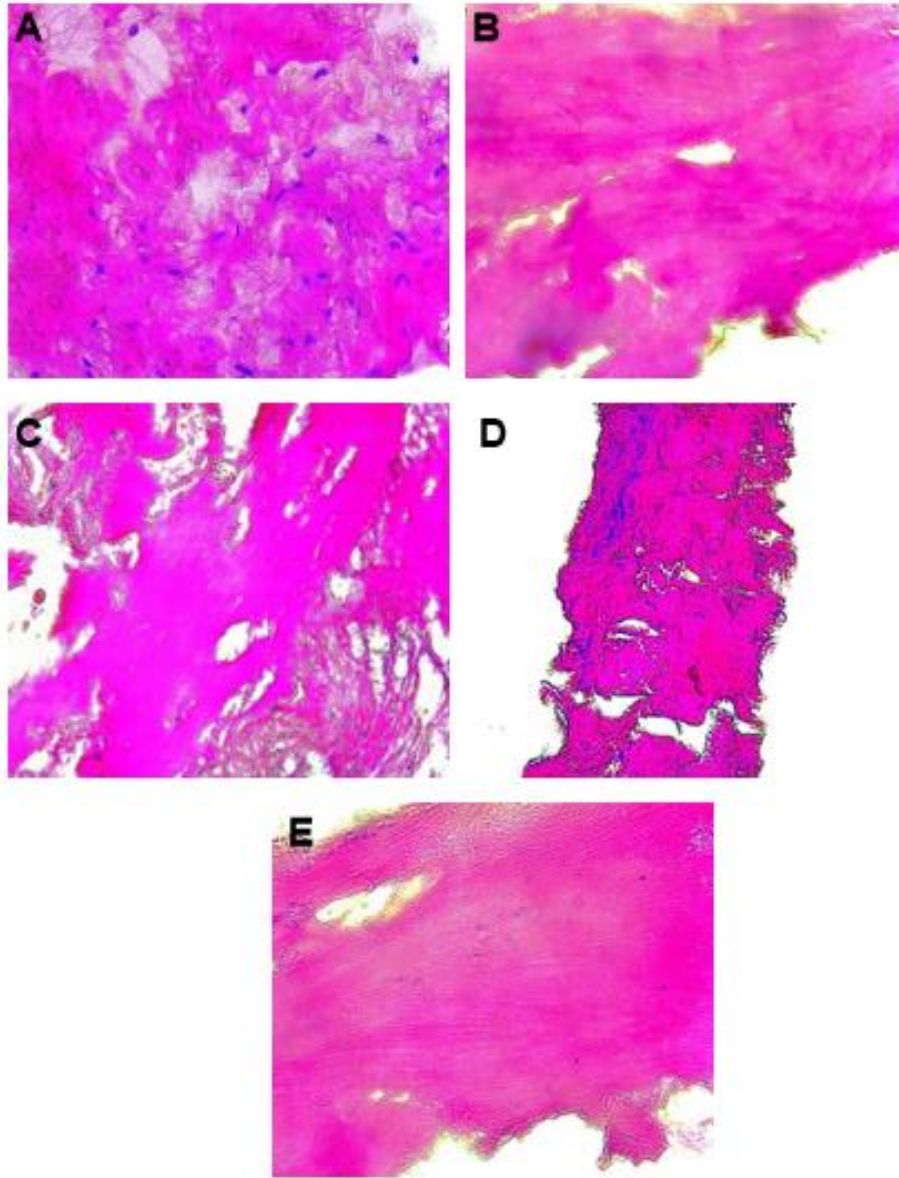
Şekil 4.1. A) İşlem görmemiş perikard, B) Deselüerize perikard doku morfolojik görüntüleri.

4.1.2 Histolojik Analizler

Farklı deselüerizasyon protokollerinin uygulandığı gruplar arasında en etkili deselüerizasyon metodunun belirlenebilmesi için Bölüm 3.1.3.2’de açıklanan histoloji çalışmaları gerçekleştirilmiştir. İlk olarak Hematoksilen & Eozin ve DAPI boyaması ile hücre çekirdekleri ve ekstraselüler matriks bütünlüğü incelenirken, sonra Mason’s Trichrome boyaması ile ekstraselüler matriksteki kolajen miktarında meydana gelen değişiklikler karakterize edilmiştir.

4.1.2.1 Hematoksilen ve Eozin (H&E) Boyaması

Deselüerizasyon işleminin amacı, hücre dışı matriks yapısının bütünlüğünü bozmadan hücre çekirdeklerinin dokudan uzaklaştırılmasını sağlamaktır. Şekil 4.2'deki Hematoksilen & Eozin boyaması mikroskop görüntüleri değerlendirildiğinde, %0,5 (a/h) SDS, %1 (a/h) SDS ve dondurup çözme sonrası %0,5 (a/h) SDS gruplarında uygulanan deselüerizasyon işlemlerinin hücre çekirdeklerini başarılı bir şekilde uzaklaştırdığı görülmüştür. Fakat %0,5 (a/h) SDS ve dondurup çözme sonrası %0,5 (a/h) SDS gruplarında hücre dışı matriks bütünlüğünün korunduğu görülürken, %1 (a/h) SDS grubunun deselüerizasyon protokolünün hücre dışı matriks bütünlüğünü bozarak yapıya zarar verdiği sonuçlarına ulaşılmıştır. Bu sonuçlardan dolayı, deselüerizasyon protokollerindeki gruplar arasından deterjan konsantrasyonunun %0,5 SDS olanların uygun olacağına karar verilmiştir. %1 (h/h) Triton-X-100 grubunda ise hücre dışı matriks bütünlüğü korunsa da hücre çekirdeklerinin uzaklaştırılmasının sağlanamadığı ve işlem görmemiş doku ile benzer hücre çekirdeği oranına sahip olduğu görülmüştür.

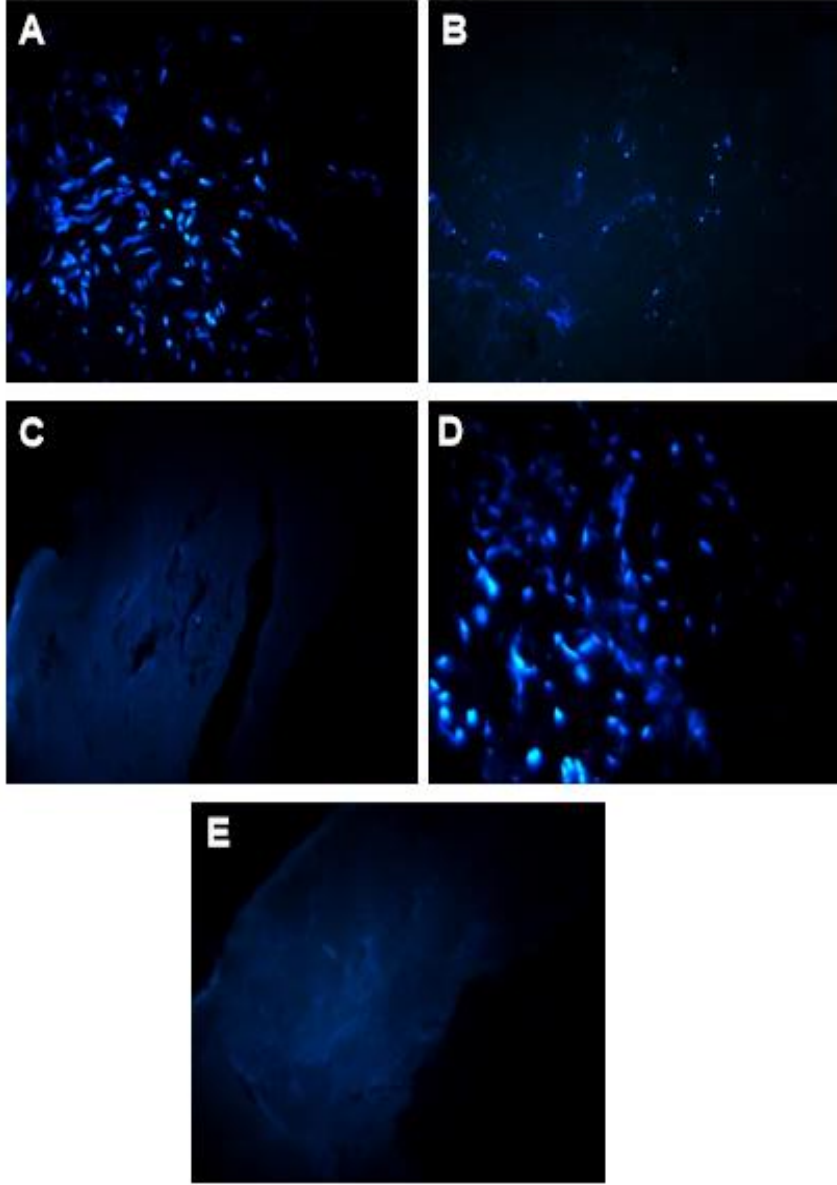


Şekil 4.2. İşlem görmemiş kontrol ve deselülerizasyon gruplarının Hematoksilen & Eozin boyaması mikroskop görüntüleri. A) Kontrol grubu, B) %0,5 (a/h) SDS muamelesi, C) %1 (a/h) SDS muamelesi, D) %1 (h/h) Triton-X-100 muamelesi, E) Fiziksel ön işlem sonrası %0,5 (a/h) SDS muamelesi. (40X büyütme)

4.1.2.2 DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) Boyaması

İşlem görmemiş ve deselülerizasyon protokolleri uygulanmış doku iskelelerindeki çekirdeklerin görüntülenmesi için DAPI boyaması yapılmıştır. Boyama sonrası örneklerin mikroskop görüntüleri incelendiğinde, %0,5 (a/h) SDS grubunda işlem görmemiş gruba kıyasla hücre çekirdeğinin büyük oranda azaldığı, fakat yine de belli miktarda hücre çekirdek ve kalıntılarının bulunduğu görülmüştür. Şekil 4.3'C-E'de %1 (a/h) SDS ve dondurma çözme sonrası %0,5 (a/h) SDS gruplarında hücre çekirdeklerinin etkin bir şekilde uzaklaştırıldığı gözlemlenirken, %1 (a/h) SDS grubunda deselülerizasyon protokolünün ekstraselüler matriks yapısına zarar verdiğine, hematoksilin & eozin boyamasının sonuçlarıyla da birleştirilerek ulaşılmıştır. Şekil 4.3 D'de %1 (h/h) Triton-X-100 grubunda ise hücre çekirdeklerin uzaklaştırılma oranının çok düşük seviyede kaldığı görülmüştür.

DAPI boyaması sonuçları, Hematoksilin & Eozin boyaması ve Quant-iT™ PicoGreen analizi sonuçlarıyla birleştirildiğinde, hücre çekirdeklerinin uzaklaştırılması ve ekstraselüler matriksin korunması açısından en ideal grubun 4. grup olduğunu göstermektedir. Seçilen Grup 4 ile kontrol grubunun histoloji çalışmaları Mason Trichrome boyaması ile de daha ayrıntılı şekilde analiz edilmiştir.



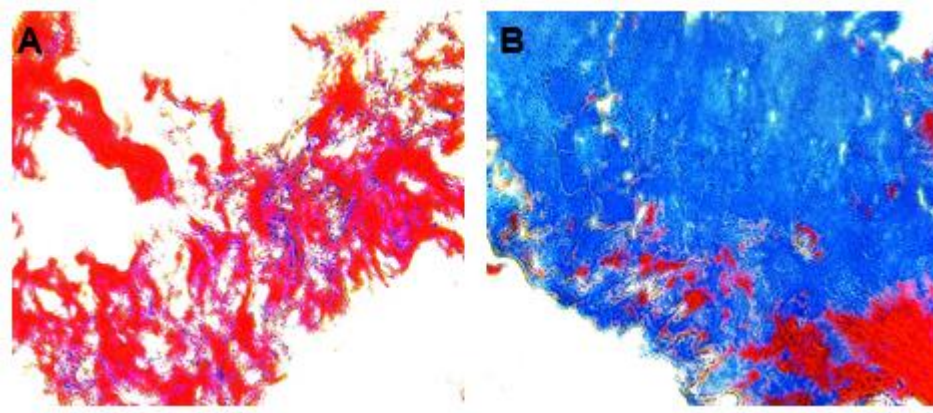
Şekil 4.3. İşlem görmemiş kontrol ve deselülerizasyon gruplarının DAPI boyaması. A) Kontrol grubu, B) %0,5 (a/h) SDS muamelesi, C) %1 (a/h) SDS muamelesi, D) %1 (h/h) Triton-X-100 muamelesi, E) Fiziksel ön işlem ardından %0,5 (a/h) SDS muamelesi (40X büyütme)

4.1.2.3 Mason Trichrome Boyaması

İşlem görmemiş doğal perikard doku ve optimize edilmiş deselülerize perikard dokuların hücre dışı matriksindeki kolajen yapının incelenmesi ve deselülerizasyon sonrası kolajen dokudaki değişimin anlaşılabilmesi için Mason Trichrome boyaması yapılmıştır. Bu

çalışmada kas dokusu kırmızı boyanırken, kolajen doku mavi renge boyanmaktadır. Boyanan dokuların mikroskop görüntüleri Şekil 4.4'te verilmiştir.

İki grup incelendiğinde, kontrol grubunda boyanan kolajen fiberlerin deselüerizasyon grubuna göre daha az miktarda olduğu görülmüştür. Bunun nedeni, deselüerizasyon işlemlerinin dokudaki kolajen fiberleri açığa çıkarması ve bu nedenle kolajen fiberlerin daha kolay boyanması olarak açıklanabilir. Bu sonuçlar, deselüerizasyon işleminin dokudaki kolajen fiberleri uzaklaştırmadığı ve miktarında önemli bir değişikliğe yol açmadığını göstermektedir.



Şekil 4.4 İşlem görmemiş kontrol ve deselüerizasyon gruplarının Masson Trichrome kolajen boyaması. A) Kontrol grubu, B) Seçilen deselüerizasyon grubu (Fiziksel ön işlem ardından %0,5 (a/h) SDS muamelesi) (40X büyütme)

4.1.3 Biyokimyasal Analizler

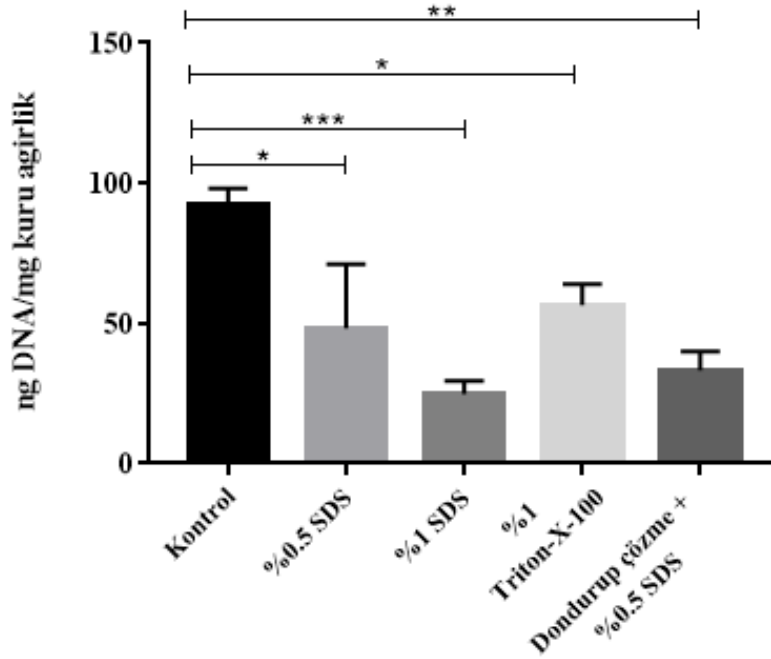
Uygulanan deselüerizasyon protokollerinin başarısını kantitatif olarak değerlendirebilmek için işlem görmemiş ve deselüerize edilmiş perikard dokularında kalan genomik DNA miktarı Quant- iT PicoGreen kiti ile, sülfatlı glikozaminoglikan (sGAG) miktarı DMMB kiti ile ve kolajen miktarı hidroksiprolin analizi ile belirlenmiştir. Ayrıca dokuların yaş ve kuru ağırlıkları ölçülmüştür.

4.1.3.1 Genomik DNA Miktarı Tayini

İşlem görmemiş doğal doku ile farklı deselüerizasyon protokolleri uygulanmış dokularda kalan DNA miktarının kantitatif olarak analizi Quant- iT PicoGreen kiti ile yapılmıştır. Bu analiz deselüerizasyon işleminin başarısının değerlendirilmesi açısından en önemli karakterizasyon yöntemlerinden biridir.

İşlem görmemiş doğal perikard ve deselüerizasyon protokolleri uygulanmış perikard dokulara ait genomik DNA miktarı analizi grafiği Şekil 4.5'te verilmiştir. Deselüerizasyon gruplarındaki artık DNA miktarları, ng DNA / mg kuru ağırlık cinsinden ifade edilmiştir. Bu sonuçlara göre, işlem görmemiş perikard grubunda 92,417 ng DNA/mg kuru ağırlık bulunurken, en düşük DNA miktarı 24,773 ng DNA/mg kuru ağırlık ile %1 (a/h) SDS grubunda bulunmuştur. 56,588 ng DNA/mg kuru ağırlık olarak bulunan %1 (h/h) Triton-X-100 grubu, deselüerize dokularda bulunması gereken en yüksek DNA miktarı olan 50 ng'nin üstünde çıkarken, %0,5 (a/h) SDS grubunda 48,357 ng DNA/mg kuru ağırlık ile sınıra yakın seviyededir. İki farklı kimyasal ajanın DNA'yı uzaklaştırma başarısı kıyaslandığında SDS'in %0,5 konsantrasyonunun bile %1 Triton-X-100'e göre daha etkili olduğu görülmüştür. Bu nedenle optimizasyon çalışmalarında daha düşük konsantrasyonda Triton-X-100 kullanılmamıştır. Bu analiz sonucunda, 24,773 ng DNA/mg kuru ağırlık olarak bulunan %1 (a/h) SDS ve 33,148 ng DNA/mg kuru ağırlık olarak bulunan dondurup çözme + %0,5 (a/h) SDS grubunda DNA'nın uzaklaştırılması işleminin başarılı olduğu sonucuna ulaşılmaktadır.

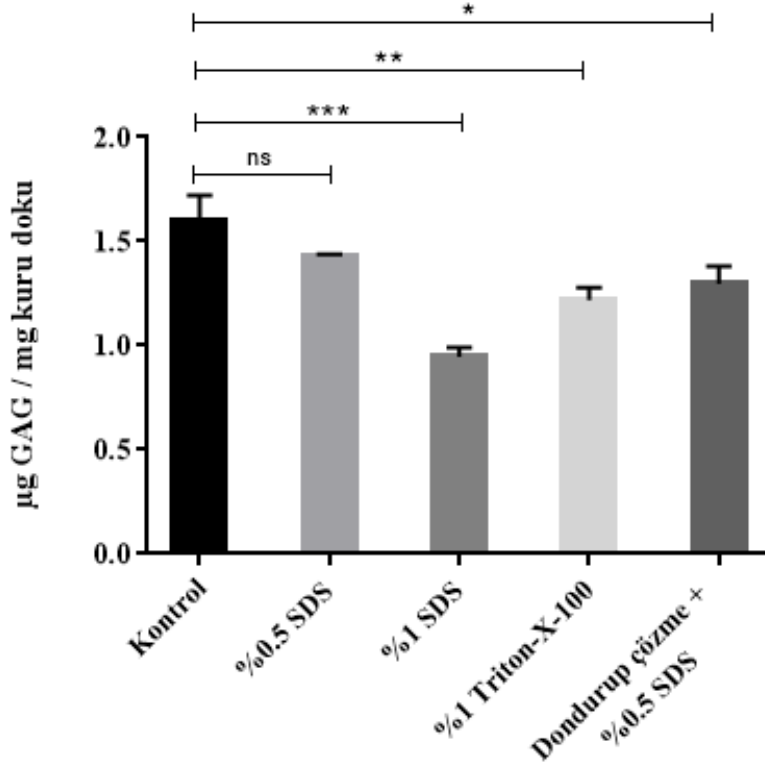
Final deselüerizasyon protokolüne ise histoloji boyamaları ve diğer biyokimyasal analizler sonucu karar verilmiştir. DNA standardına ait kalibrasyon grafiği Ek 1'de verilmiştir.



Şekil 4.5. İşlem görmemiş ve farklı deselülerizasyon protokolleri uygulanmış dokularda kalan genomik DNA miktarını gösteren grafik (*p<0,05) (**p<0,01) (***)p<0,001).

4.1.3.2 Sülfathı Glikozaminoglikan (sGAG) Miktarı Tayini

İşlem görmemiş doğal doku ve farklı deselülerizasyon protokolleri uygulanan dokularda hücre dışı matriksin önemli bileşenlerinden olan sGAG miktarının kantitatif ölçülmesi ve bu sayede uygulanan yöntemlerin matriks yapısına etkisinin incelenmesi adına DMMB analizi yapılmıştır. Bu analiz sonucunda elde edilen veriler Şekil 4.6'da gösterilmiştir. İşlem görmemiş doku grubunda sGAG miktarı 1,597 µg sGAG/mg kuru ağırlık olarak bulunurken, sGAG miktarının en çok azaldığı grup 0,945 µg sGAG/mg kuru ağırlık ile %1 SDS grubu olarak belirlenmiştir. Diğer gruplardaki sGAG miktarları kontrol grubuna yakın seviyelerde bulunmuştur. Bu sonuçlardan yola çıkılarak, SDS konsantrasyonunun arttırıldığı deselülerizasyon protokolünün hücre dışı matriksin önemli bir bileşeni olan GAG'ı önemli ölçüde uzaklaştırdığı ve dolayısıyla matriks yapısına zarar verdiğini göstermektedir. Diğer gruplardaki sGAG azalma oranlarının ihmal edilebilir seviyelerde olup hücre dışı matriks yapısında ciddi bir değişime yol açmadıkları gözlemlenmiştir.



Şekil 4.6. İşlem görmemiş ve farklı deselülerizasyon protokolleri uygulanmış dokularda kalan sGAG miktarını gösteren grafik (*p<0,05) (**p<0,01) (**p<0,001).

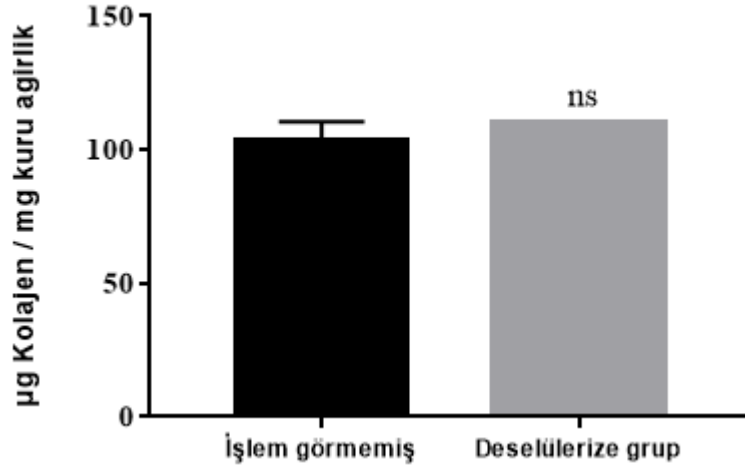
4.1.3.3 Kolajen Miktarı Tayini

Kolajen ekstraselüler matriksin en önemli bileşenlerinden biridir. Deselülerizasyon işlemi sonucunda hücrelerin uzaklaştırılması kadar ekstraselüler matriks yapısının ve bileşenlerinin korunması da çok önemlidir. Deselülerizasyon sonucu kolajen yapıdaki değişikliklerin belirlenmesi için, optimize edilen deselülerizasyon grubu ve işlem görmemiş grupta bulunan kolajen miktarının kantitatif tayini hidroksipirolin analizi ile yapılmıştır. Çalışma sonucunda işlem görmemiş grupta kolajen miktarı $103,4 \pm 4,098$ µg kolajen/mg kuru ağırlık olarak bulunurken, deselülerizasyon grubunda kolajen miktarı $110,4 \pm 0,0093$ µg kolajen /mg kuru ağırlık olarak bulunmuştur.

Deselülerizasyon grubundaki kolajen miktarının işlem görmemiş gruptaki kolajen miktarına göre az farkla da olsa yüksek çıkmış olması, deselülerizasyon işleminin kolajen dokuyu daha iyi ortaya çıkarması ile açıklanabilir.

Bu veriler, histoloji çalışmalarında gerçekleştirilen Masson Trichrome kolajen boyaması sonuçlarıyla uyumlu olup, deselülerizasyon işleminin dokudaki kolajen fiberleri

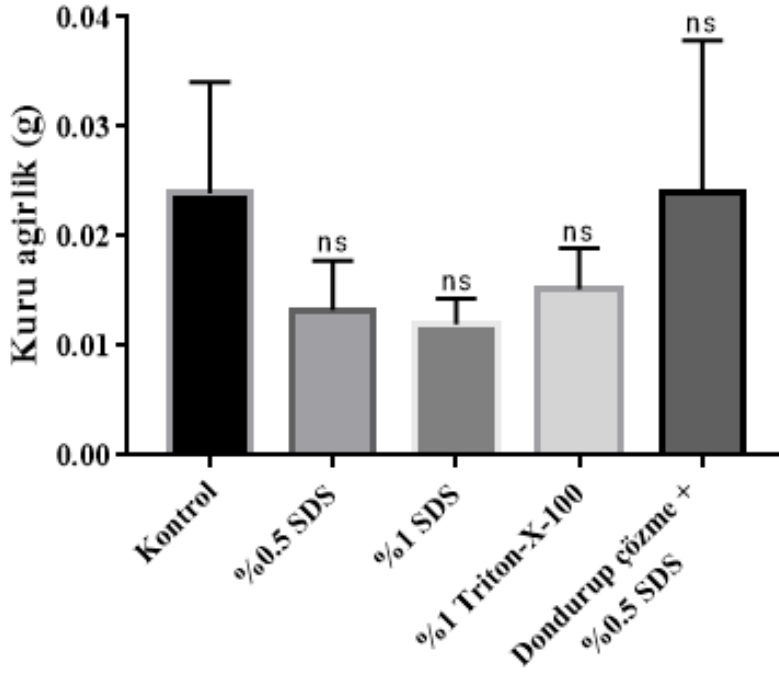
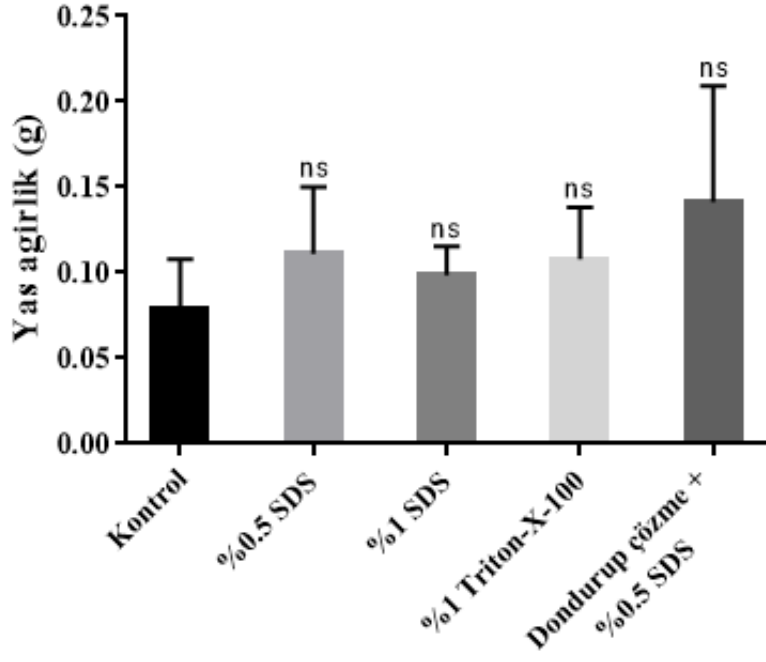
uzaklaştırmadığını ve korumuş olduğunu göstermektedir. Standarda ait kalibrasyon grafiği Ek-1’de verilmiştir.



Şekil 4.7. İşlem görmemiş ve optimize edilmiş deselüerize perikard dokularında kalan kolajen miktarını gösteren grafik.

4.1.3.4 Yaş-Kuru Ağırlık Değişimleri

İşlem görmemiş ve farklı deselüerizasyon protokolü uygulanmış perikard dokuların yaş ve kuru ağırlıkları ölçülmüş ve kuru ağırlıkları üzerinden deselüerizasyon sonrası matriks bileşenlerindeki ağırlık kayıpları belirlenmiştir. Bu ağırlık değişimlerine ait grafikler Şekil 4.8’de verilmiştir. En düşük ağırlık %1 (a/h) SDS deselüerizasyon grubunda gerçekleşmiştir. Bu veri, %1 (a/h) SDS protokolünün ekstraselüler matriks bileşenlerini yüksek ölçüde uzaklaştırdığı ve bütünlüğünü bozduğu bulgularını gösteren histolojik ve biyokimyasal analiz sonuçları ile uyumludur. Bu sonuçlar dondurup çözme sonrası %0,5 (a/h) SDS uygulanan deselüerizasyon protokolünün ekstraselüler matriks yapısına etkisinin minimum düzeyde olduğunu ve herhangi bir matriks bileşeni ya da su kaybına yol açmadığını göstermektedir.

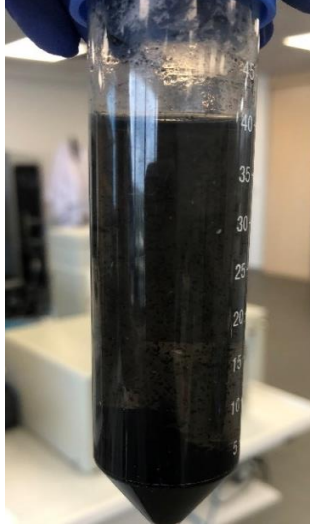


Şekil 4.8. İşlem görmemiş ve deselülerizasyon protokolü uygulanmış grupların yağ ve kuru ağırlık grafikleri.

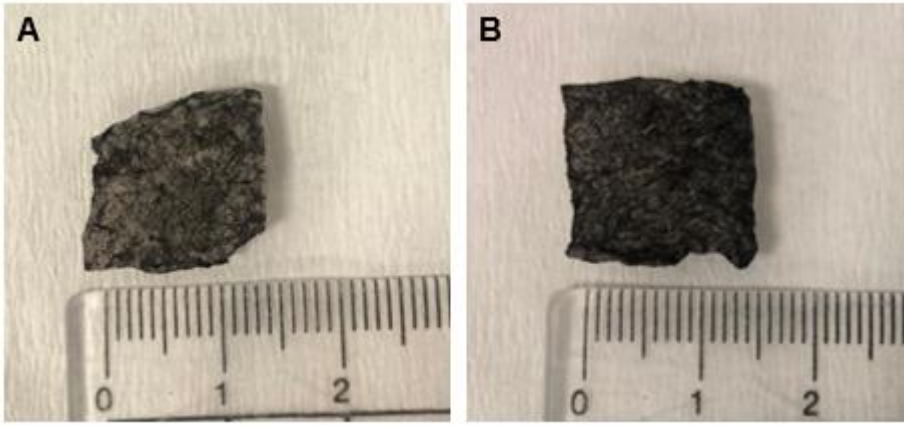
4.2 Kompozit Doku İskelelerinin Sentezi ve Karakterizasyonu

İşlem görmemiş, deselülerize doku iskeleleri ve -COOH fonksiyonelleştirilmiş çok duvarlı karbon nanotüpler kullanılarak %0,01, %0,05, %0,1, %0,5, %1, %2, %3 konsantrasyonlarında kompozit doku iskeleleri hazırlanmış ve FTIR analizi gerçekleştirilmiştir. Karbon nanotüp çözeltileri deiyonize su ile hazırlanmış ve bu çözeltilere 1-3 saat arası sonikasyon uygulanmıştır. Şekil 4.9'da sonikasyon uygulanan karbon nanotüp çözeltisi örneği verilmiştir. n=2 sayıda hazırlanan bu çözeltilerden bir grup direk olarak deselülerize dokular ile inkübe edilirken, diğer gruba ise 10000 rpm'de 5 dk santrifüj işlemi uygulanmış ve ardından süpernatant (%80'lik kısmı) alınarak dokular ile etkileştirilmiştir. Yüksek konsantrasyonlu (>%0,1) karbon nanotüp solüsyonlarında, karbon nanotüplerin yeterli oranda dağılmadığı ve çöktüğü görsel olarak gözlemlenirken, FTIR analizi sonuçlarında da karbon nanotüplerin dokuya belli bir bağlanma oranlarının olduğu ve yüksek karbon nanotüp konsantrasyonlu (>%0,1) gruplarda, daha düşük konsantrasyonlu gruplara göre bağlanma miktarında bir artış olmadığı bulunmuştur. Bu sonuçlar birleştirildiğinde yüksek karbon nanotüp konsantrasyonlu (>%0,1) gruplar karbon nanotüp optimizasyon protokolünden çıkarılmıştır.

%0,01, %0,05, %0,1 karbon nanotüp konsantrasyonu ile santrifüj edilerek ve santrifüj edilmeden hazırlanan doku iskelelerinin FTIR ve TGA karakterizasyon çalışmaları analiz edildiğinde, %0,05 konsantrasyonda santrifüj edilmeden ve %0,1 konsantrasyonda santrifüj edilerek hazırlanan doku iskeleleri gruplarında karbon nanotüp bağlanma oranının daha fazla olduğu görülmüştür. Bu nedenle kompozit doku iskelesinde kullanılacak karbon nanotüp oranının optimizasyonu ve trombojenite analizleri için yapılacak çalışmalar bu iki konsantrasyon grubu ile gerçekleştirilmiştir. Bu iki kompozit doku iskelesine ait morfolojik görüntüler Şekil 4.10'da verilmiştir.



Şekil 4.9. Sonikasyon işlemi sonrası karbon nanotüp çözeltisi



Şekil 4.10. A) %0,05 KNT, B) %0,1 KNT kompozit doku iskelesi morfolojik görüntüleri

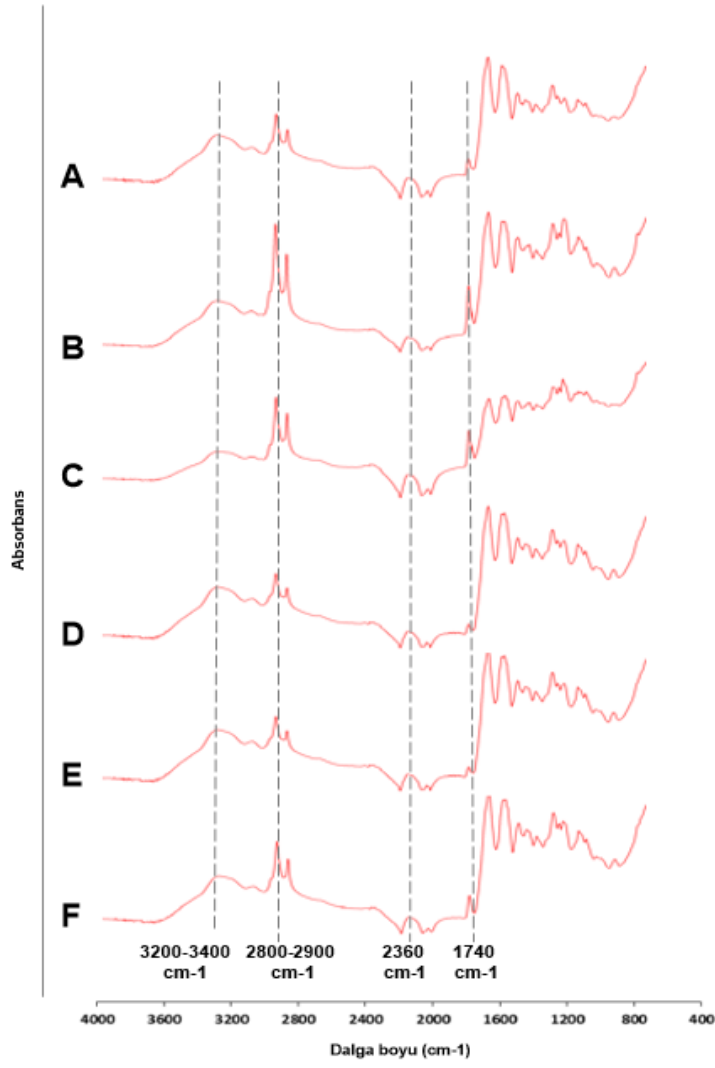
4.2.1 Kompozit Doku İskelelerinin Karakterizasyonu

Elde edilen kompozit doku iskelelerinin morfolojik, termal ve mekanik karakterizasyon çalışmaları FTIR, TGA, DSC, AFM, SEM, mekanik analiz ile gerçekleştirilirken; kan uyumluluğu ve trombojenite karakterizasyonları için platelet adezyon testi, kinetik-kan koagülasyon analizi, hemoliz analizi, Calcein-AM boyaması ve sitotoksisite testi yapılmıştır.

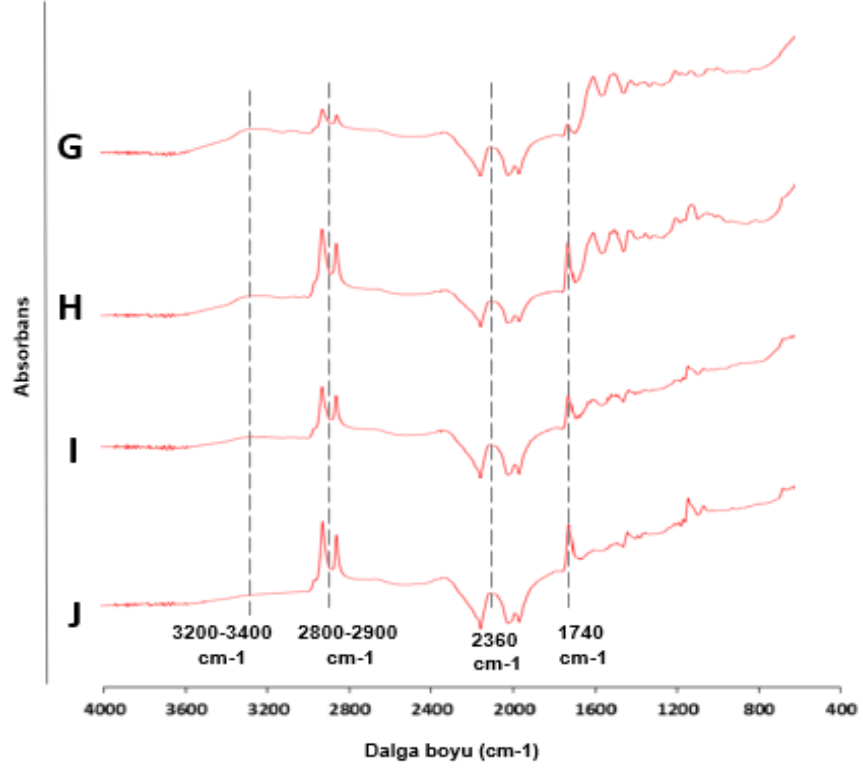
4.2.1.1 FTIR Analizi

İşlem görmemiş perikard doku, deselülerize perikard doku ve %0,01, %0,05, %0,1, %0,5, %1, %2 ve %3 -COOH ile fonksiyonelleştirilmiş karbon nanotüp konsantrasyonlarında hazırlanmış kompozit perikard doku iskelelerinin FTIR analizleri gerçekleştirilmiştir. Yüksek konsantrasyonlu ($> \%0,1$) karbon nanotüp solüsyonlarında, karbon nanotüplerin yeterli oranda dağılmadığı ve çöktüğü görsel olarak gözlemlenirken, FTIR ve TGA analizlerinde de bu grupların $\leq \%0,1$ konsantrasyonlu gruplardan daha yüksek karbon nanotüp bağlanma miktarına sahip olmadığı ve tutunmadığı bulunmuştur. Bu nedenle kompozit doku iskelelerinin hazırlanması ve karakterizasyonu çalışmaları daha düşük konsantrasyonlu ($\leq \%0,1$) karbon nanotüp çözeltileri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. %0,01, %0,05, %0,1, %0,5, %1, %2 ve %3 -COOH ile fonksiyonelleştirilmiş karbon nanotüp doku iskelelerine ait FTIR analizleri Şekil 4.11 ve Şekil 4.12’de verilmiştir.

Şekil 4.11 ve Şekil 4.12’deki FTIR grafiklerinde farklı konsantrasyonlarda -COOH ile fonksiyonelleştirilmiş karbon nanotüp doku iskelelerine ait pikler analiz edildiğinde; 3200-3400 cm^{-1} arasındaki pikler karbon nanotüplerdeki karboksil gruplarının hidroksil gruplarına ait -OH bağlarını, 2800-2900 cm^{-1} arasındaki pikler ise karbonil grupta H-C=O’daki C-H gruplarını temsil etmektedir. 1740 cm^{-1} bandındaki pikler karbon nanotüplerin -COOH gruplarındaki C=O gruplarını göstermektedir. 2360 cm^{-1} bandındaki pikler ise güçlü hidrojen bağlı -COOH gruplarındaki O-H gruplarına aittir [64-66].

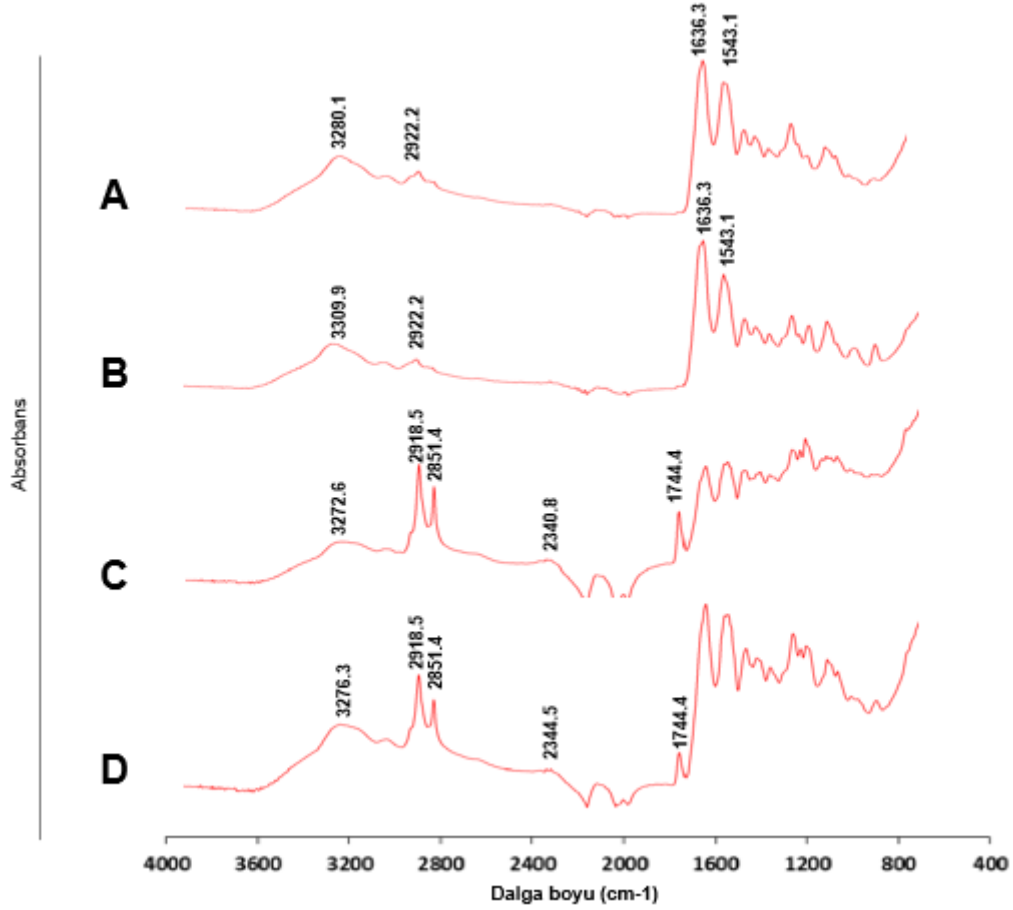


Şekil 4.11. A) %0,01 konsantrasyonunda karbon nanotüp ile santrifüj edilerek, B) %0,01 konsantrasyonunda karbon nanotüp ile santrifüj edilmeden, C) %0,05 konsantrasyonunda karbon nanotüp ile santrifüj edilmeden, D) %0,05 konsantrasyonunda karbon nanotüp ile santrifüj edilerek, E) %0,1 konsantrasyonunda karbon nanotüp ile santrifüj edilmeden, F) %0,1 konsantrasyonunda karbon nanotüp ile santrifüj edilerek hazırlanan doku iskelelerinin FTIR analizi.



Şekil 4.12. G) %0,5 konsantrasyonunda karbon nanotüp ile, H) %1 konsantrasyonunda karbon nanotüp ile, I) %2 konsantrasyonunda karbon nanotüp ile, J) %3 konsantrasyonunda karbon nanotüp ile santrifüj edilmeden hazırlanan kompozit doku iskelelerinin FTIR analizi.

Şekil 4.13’de işlem görmemiş perikard doku, deselülerize perikard doku ve %0,05 ile %0,1 konsantrasyonda karbon nanotüp konsantrasyonuna sahip kompozit doku iskelelerine ait FTIR spektrumları bir arada verilmiştir. İşlem görmemiş ve deselülerize edilmiş doku iskelelerinde 1636 cm^{-1} dalgaboyundaki pikler C-O gruplarındaki amid I’i, 1543 cm^{-1} dalgaboyundaki pikler ise amid II’yi temsil etmektedir. 2922 cm^{-1} dalgaboyundaki pik glikozaminoglikanlarda bulunan C-H gruplarını belirtirken, 3280 ve 3309 cm^{-1} arasındaki pikler amid A varlığını göstermektedir. Kompozit doku iskelelerinde karbon nanotüpten gelen -OH ve C-H gruplarının eklenmesiyle $2800-3300\text{ cm}^{-1}$ bandındaki yoğunluk artışı karbon nanotüp bağlanma sürecinin gerçekleştiğini göstermektedir [64-71].



Şekil 4.13. A) İşlem görmemiş kontrol dokusu, B) Deselülerize doku, C) %0,05 santrifüj edilmeden, D) %0,1 santrifüj edilerek hazırlanan kompozit dokuların FTIR analizi.

4.2.1.2 Termogravimetrik Analiz (TGA)

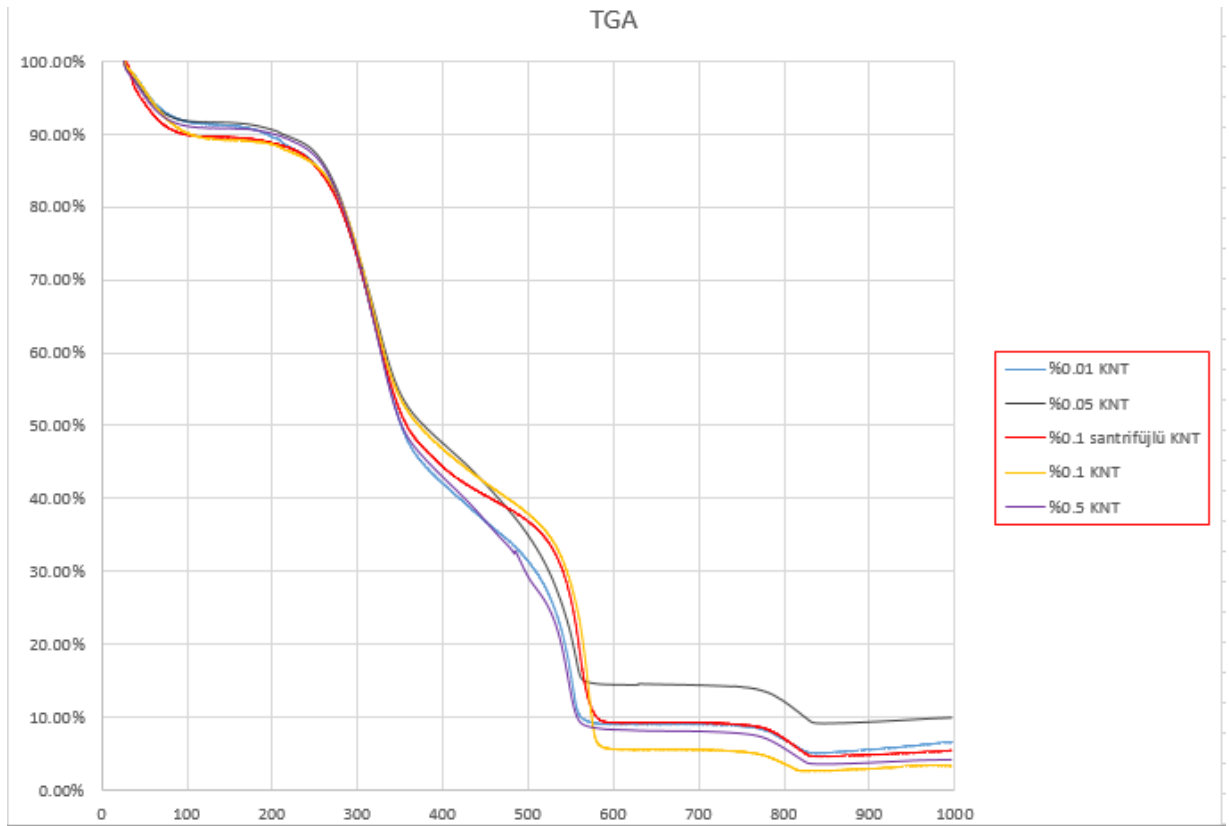
Farklı konsantrasyonlarda karboksilleştirilmiş çok duvarlı karbon nanotüp ile modifiye edilen kompozit doku iskelelerindeki etkileşen karbon nanotüp miktarlarının ve bunun sonucunda optimal karbon nanotüp konsantrasyonunun belirlenmesi amacıyla termogravimetrik analiz gerçekleştirilmiştir. Analiz edilen farklı konsantrasyonlardaki kompozit doku iskelelerine ait termogravimetrik analiz grafiği Şekil 4.14’te verilirken, bu analiz sonucu seçilen iki farklı karbon nanotüp konsantrasyonunda kompozit doku iskelesi, işlem görmemiş ve deselülerize doku iskelelerine ait karşılaştırılmış termogravimetrik analiz grafiği Şekil 4.15’te sunulmuştur.

Şekil 4.15’te gösterilen kompozit doku iskelelerine ait karşılaştırılmış grafiğinde ilk iki aralıkta malzemelerdeki ağırlık değişiminin neredeyse aynı olduğu görülmüştür.

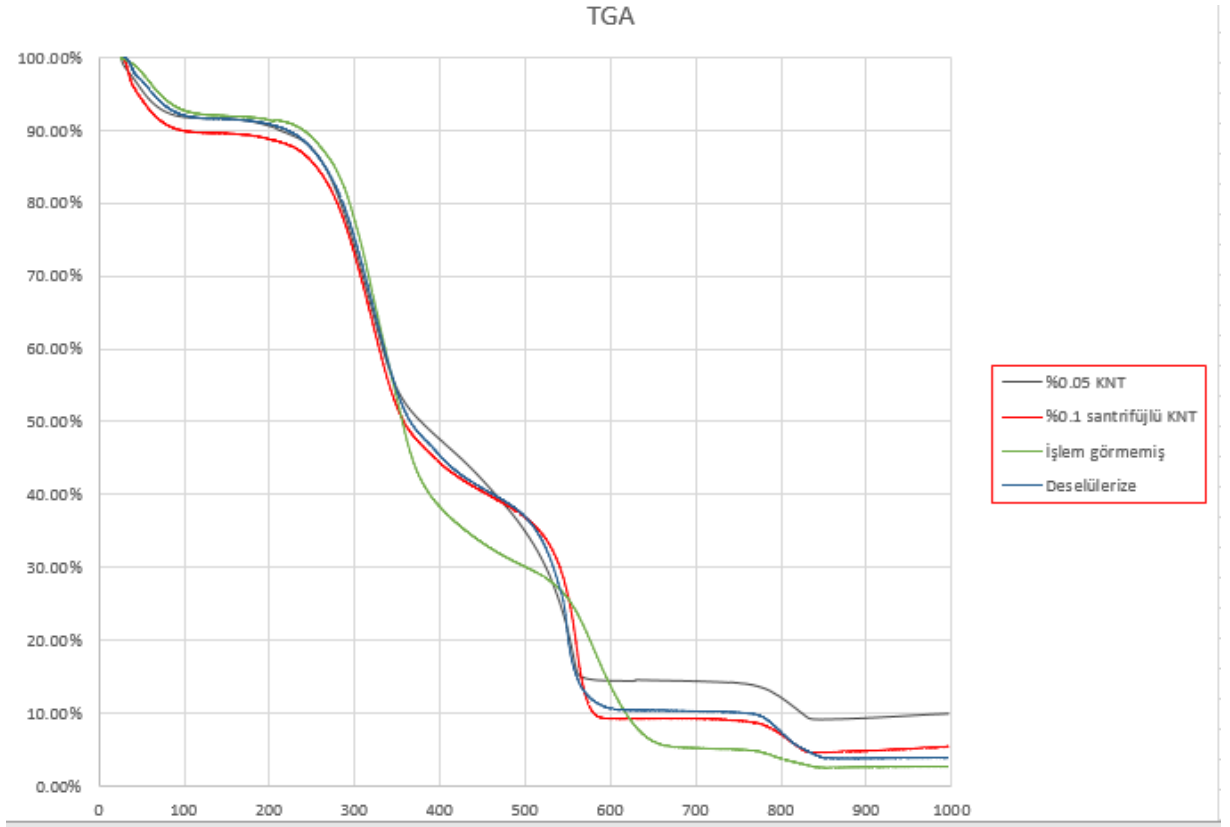
Yaklaşık 200°C'ye kadar meydana gelen ağırlık değişimleri dokudaki adsorbe su ve nemi işaret ederken, grafiğin ikinci aralığı ekstraselüler matriks kaybını göstermektedir [66]. Grafikteki ağırlık kayıplarına bakıldığında dokulardaki su miktarının dokunun %10'u civarlarında olduğu anlaşılmaktadır. Ekstraselüler matriksin de 200-400°C aralığında yanmış olup dokunun yaklaşık %50'sini oluşturduğu görülmektedir. 500°C- 600°C arasındaki 2. keskin ağırlık kaybının olduğu bölge inorganik bileşenlerin dekompoze olduğu bölgedir. Grafiklere bakıldığında, 400°C'den sonra karbon nanotüplerin termal stabilitelerinin azalmaya başladığı sonucuna ulaşılabilir. Karbon nanotüp bulunan gruplar ve diğer (işlem görmemiş, deselülerize) gruplar kıyaslandığı zaman, işlem görmemiş ve deselülerize gruplarda 600°C sonrasında inorganik bileşen miktarı çok düşük seviyede iken, kompozit doku gruplarında daha yüksek seviyelerde inorganik bileşen bulunmuştur. Malzemelerin başlangıç bozunma sıcaklıkları, maksimum bozunma sıcaklıkları, %50 ayrışma sıcaklıkları ve kalan yüzde miktarları Çizelge 4.1'de verilmiştir. Başlangıç bozunma sıcaklığı (T_{onset}), malzemenin bozunmaya ve ayrışmaya başladığı sıcaklığı belirtirken, maksimum bozunma sıcaklığı (T_{max}), maksimum bozunmanın gerçekleştiği sıcaklık değerlerini ifade etmektedir. Kompozit malzemeler, organik ve inorganik olmak üzere birden fazla bileşen içerdiğinden dolayı birden fazla maksimum bozunma sıcaklığı değerine sahip olabilmektedirler. Bu değerler, kompozit malzemedeki farklı yapıdaki bileşenler arasındaki termal stabilite farkının belirlenmesini ve içindeki malzeme miktarlarının öğrenilmesini sağlamaktadır. Bu değerler termogravimetrik analiz sonucu ağırlık kaybı ve sıcaklık değişimini gösteren grafiğin derivatif eğrisinin oluşturulmasıyla elde edilmektedir. Başlangıç bozunma sıcaklığı tüm malzemelerde yakın seviyededir ve dokulardan uzaklaşan su miktarının da tüm gruplarda çok yakın oranlarda olduğu gözlenmiştir. 1. maksimum bozunma sıcaklığı değerleri kıyaslandığında işlem görmemiş doku grubunda diğer gruplara göre daha yüksek olduğu bulunmuştur. Bu aralık su ve ekstraselüler matriks bileşenlerini işaret etmektedir ve tek deselülerize ve deselülerize doku ile hazırlanmış kompozit malzemelerde işlem görmemiş dokuya göre daha az oranda ekstraselüler matriks bileşeni ve su bulunduğu bilindiği için bu sonuç diğer karakterizasyon sonuçlarıyla örtüşmektedir.

İkinci maksimum bozunma sıcaklığı değeri, malzemelerin organik (ekstraselüler matriks) kısımlarının tamamen ayrılmış ve uzaklaşmış olduğu değerdir. Yine işlem görmemiş doğal doku iskelesi yapısındaki daha yüksek orandaki ekstraselüler matriks bileşeni ile en yüksek bozunma sıcaklığı değerine sahiptir. Kompozit malzemeler arasında henüz

önemli bir fark ortaya çıkmamıştır. Bu aralıktan itibaren inorganik bileşenlerin stabiliteyi azalmaya ve bozulmaya başlamıştır. İşlem görmemiş ve deselüerize gruplardaki neredeyse tüm bileşenler uzaklaştığından ve inorganik madde miktarı düşük olduğundan dolayı, 3.maksimum bozunma sıcaklıkları diğer kompozit malzemelere göre düşük bulunmuştur. Kompozit malzemelerin ise, içeriğindeki farklı konsantrasyonlarda bulunan karbon nanotüplere bağlı olarak daha yüksek bozunma sıcaklıklarına ulaşmış olduğu görülmüştür. Bu gruplar kendi aralarında incelendiğinde en yüksek bozunma değeri 834,41 °C ile %0,05 KNT kompozit grubuna ait iken onu takip eden ikinci en yüksek bozunma değeri 829,32 °C ile %0,1 santrifüjlü KNT kompozit grubuna aittir. 1000 °C’de kalan malzeme miktarlarına bakıldığında en düşük oran %3,22 ile %0,1 KNT grubunda bulunurken, onu sırayla %4,14 ile %0,5 KNT grubu, %5,4 ile %0,1 santrifüjlü KNT grubu ve %6,46 ile %0,01 KNT grubu takip etmektedir. En yüksek kalan malzeme miktarı ise %9,74 oranla %0,05 KNT kompozit grubunda elde edilmiştir. İşlem görmemiş doku iskelesinde bu oran %2,64 iken, deselüerize doku iskelesinde %3,85’dir [66, 72, 73].



Şekil 4.14. %0,01, %0,05, %0,1 santrifüjlü ve %0,5 karbon nanotüp ile hazırlanan kompozit doku iskelelerine ait termogravimetrik analiz çakıştırılmış grafiği.



Şekil 4.15. %0,05, %0,1 (santrifüjlü) kompozit, işlem görmemiş ve deselülerize dokulara ait termogravimetrik analiz çakıştırılmış grafiği.

Çizelge 4.1 İşlem görmemiş, deselülerize ve kompozit doku iskelelerine ait TGA değerleri

Örnek	Başlangıç Bozunma Sıcaklığı (°C)	Maksimum Bozunma Sıcaklığı (°C)	%50 Ayrışma Sıcaklığı (°C)	Kalan Kütle (%)
İşlem görmemiş	25,54	1. 287,19	355,97	2,64
		2. 628,94		
		3. 773,03		
Deselülerize	31,09	1. 271,71	365,44	3,85
		2. 559,61		
		3. 778,52		

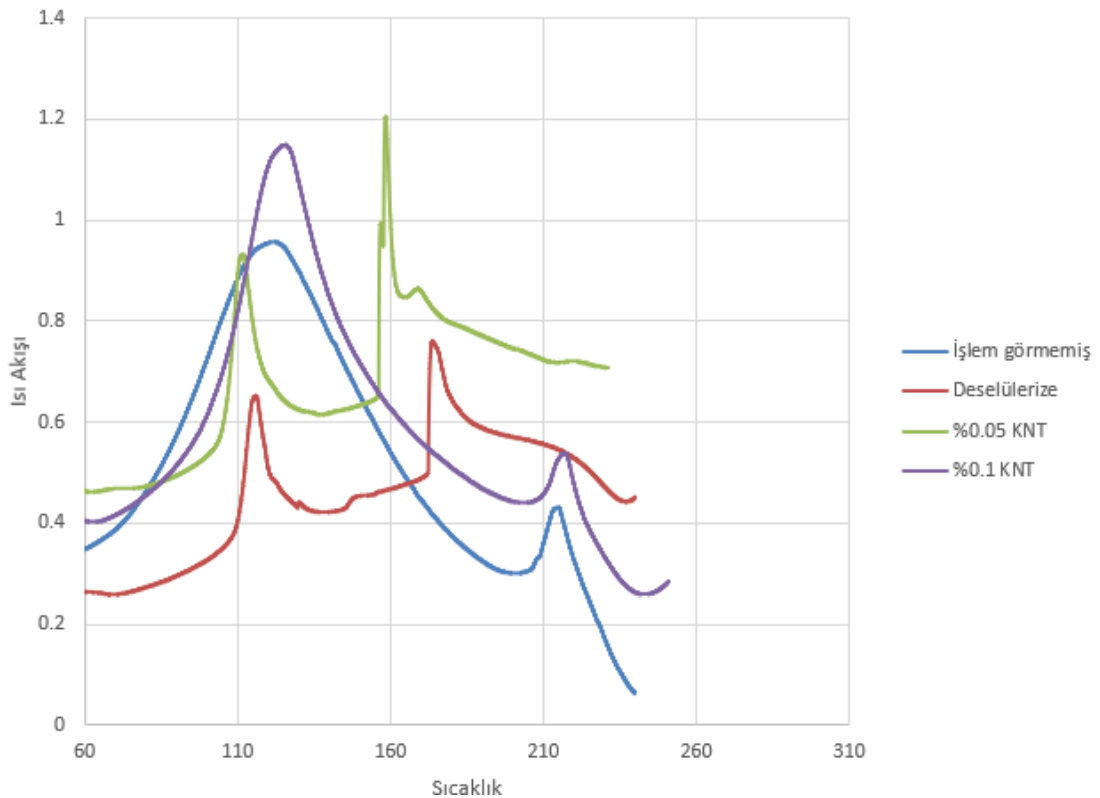
%0,01 KNT	26,20	1. 277,07 2. 559,54 3. 828,55	351,15	6,46
%0,05 KNT	26,16	1. 272,73 2. 561,31 3. 834,41	377,98	9,74
%0,1 santrifüjlü KNT	27,68	1. 270,75 2. 572,23 3. 829,32	357,72	5,4
%0,1 KNT	26,23	1. 279,42 2. 578,55 3. 817,0	371,93	3,22
%0,5 KNT	26,09	1. 270,29 2. 557,49 3. 828,87	351,76	4,14

4.2.1.3 Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) Analizi

İşlem görmemiş, deselüerize ve kompozit doku iskelelerinin termal stabiliteleri, denaturasyon sıcaklıklarının DSC analizi ile belirlenmesiyle karakterize edilmiştir. Doku iskelelerindeki kolajen moleküllerinin termal denatürasyonu, hidrojen bağlarının kopmasını ve doğal üçlü sarmal yapının sarılmamış yapılara geri dönüşü olmayan bir şekilde dönüşümüdür. Kolajen moleküllerinin denaturasyonu, hidrasyon seviyesi, dokunun büzüşmesi, mekanik özelliklerin değişmesi gibi parametrelerden etkilenmektedir. Literatürde su içeren sığır perikard dokudaki kolajen fiberlerin denaturasyon sıcaklığı 60°C-70°C arasında iken, su miktarının azaldığı veya hava yoluyla kurutulan kolajen fiberlerin denaturasyon sıcaklığı 110°C-130°C arasında, dondurulup kurutulan kolajen fiberlerin denaturasyon sıcaklığı 200°C-230°C olarak belirtilmektedir. Dondurulup kurutulan kolajen fiberler sadece yapısal su tutan kollajen kristal fraksiyonlarıdır [74]. Dokulardaki su miktarının termal denaturasyonu etkilemesinin

sebebi olarak da üçlü sarmalın stabilitesinden sorumlu olan güçlü hidrojen bağlı suyun buharlaşması, dondurup kurutulmuş kolajen fiberlerin dehidrasyon sebebiyle birbirlerine yaklaşp bir araya gelmesi ve böylece kolajen-kolajen etkileşimlerinin artmasıyla fibrillerin stabilitesinin artması ile açıklanmaktadır [75].

Şekil 4.16.'dan görüldüğü üzere, işlem görmemiş doğal dokudaki kolajenin ilk denaturasyon sıcaklığı 121,80°C, deselülerize doku 116,2°C, %0,05 KNT kompozit doku 113,6°C ve %0,1 KNT kompozit doku iskelesi 125,6°C'dir. Yukarıda da belirtildiği gibi bu denaturasyon değerleri dokuda kalan düşük miktarda su içeren kısımları işaret etmektedir. Kristalin hale geçen kolajenin termal denaturasyon sıcaklıkları kıyaslandığında, işlem görmemiş doku 215,7°C, deselülerize doku 173,6°C, %0,05 KNT 165,8°C ve %0,1 KNT 217,5°C olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar, perikard dokunun aselüler hale gelmesi ve ekstraselüler matrikste değişimler meydana gelmesi ile termal stabilitesinde azalma olduğunu göstermektedir. %0,05 KNT kompozit grubun termal stabilite olarak deselülerize grup ile benzer seviyede olduğu bulunurken, %0,1 KNT kompozit grupta deselülerize dokuya göre termal kararlılığında artış olduğu ve işlem görmemiş dokuya kıyasla bile stabiliteye katkı sağladığını göstermiştir.

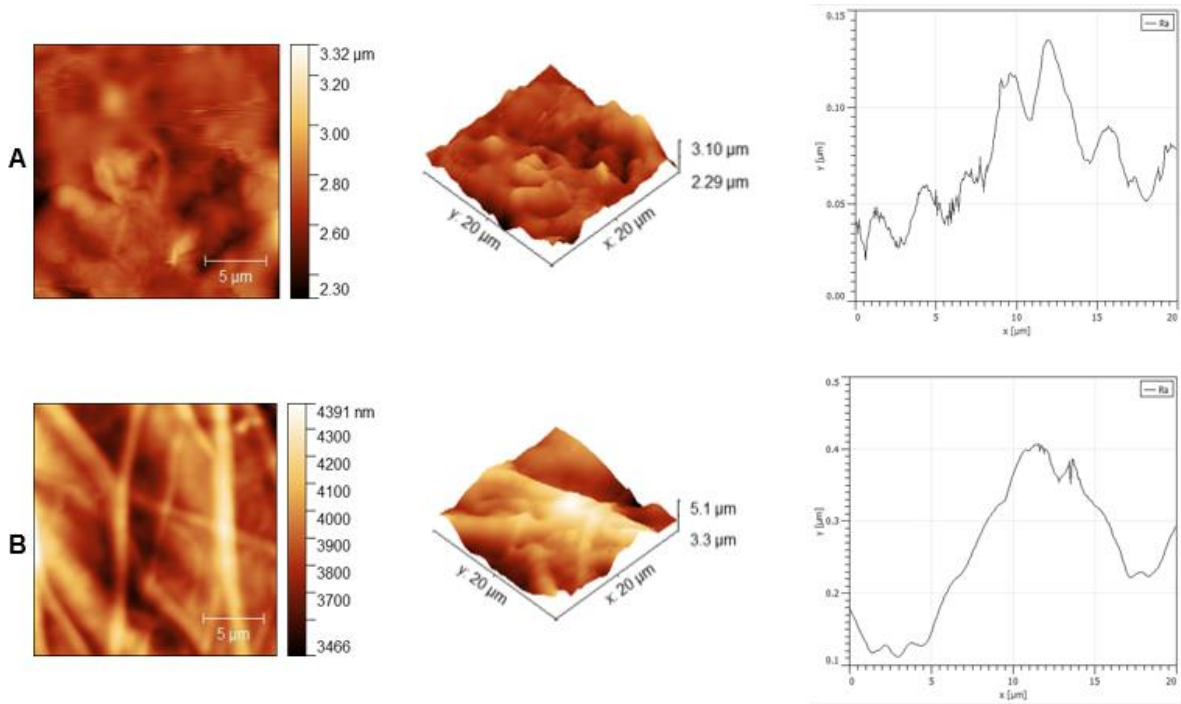


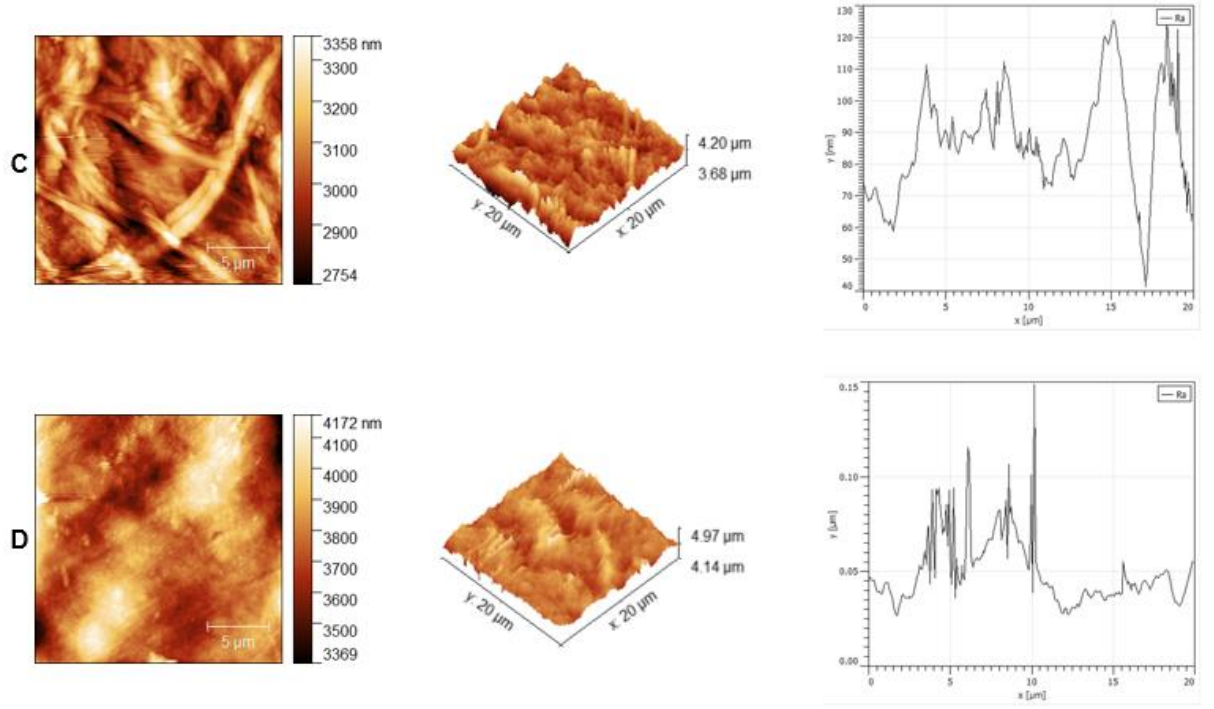
Şekil 4.16. İşlem görmemiş, deselülerize ve kompozit doku iskeleleri DSC grafiği.

4.2.1.4 Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM) Analizi

Perikard dokular ile karbon nanotüplerin etkileşme düzeyinin ve yüzeydeki dağılımın nano seviyede incelenmesi amacıyla işlem görmemiş, deselülerize ve iki farklı karbon nanotüp konsantrasyonunda hazırlanmış kompozit doku iskeleleri AFM ile karakterize edilmiştir. Doku iskelelerinin yüzeyleri $20 \times 20 \mu\text{m}^2$ alanda taranmıştır. Yüzey topografya görüntüleri iki boyutlu ve üç boyutlu olarak Şekil 4.17’de verilmiştir.

Şekil 4.17 A’da işlem görmemiş doğal doku yüzeyinde yağ ve çeşitli yüzey pürüzlülükleri görülürken, deselülerize doku iskelesinde pürüzlülüklerin azaldığı ve daha düz bir yüzey meydana geldiği görülmüştür. Grafikler arasındaki yükselti farkları da bu sonucu desteklemektedir. Ayrıca kolajen fiberlerin çoğunlukla birbirine paralel uzandığı ya da belli bir boşluk ve örtüşme fazında hizalandıkları görülmüştür. Bu sonuçlar literatürdeki AFM analizleri ile uyumludur [76, 77]. Karbon nanotüp ile modifiye edilen kompozit doku iskelelerinde hem iki boyutlu hem de üç boyutlu AFM görüntülerinde yüzey ile etkileşen karbon nanotüpler gözlenirken, grafiklerdeki pürüzlülük oranındaki yüksek artış da bu bulguyu göstermektedir.





Şekil 4.17. A) İşlem görmemiş, B) Deselülerize, C) %0,05 KNT, D) %0,1 KNT kompozit doku iskelelerine ait iki ve üç boyutlu AFM topografi görüntüleri ve yükseklik grafikleri

4.2.1.5 Mekanik Analiz

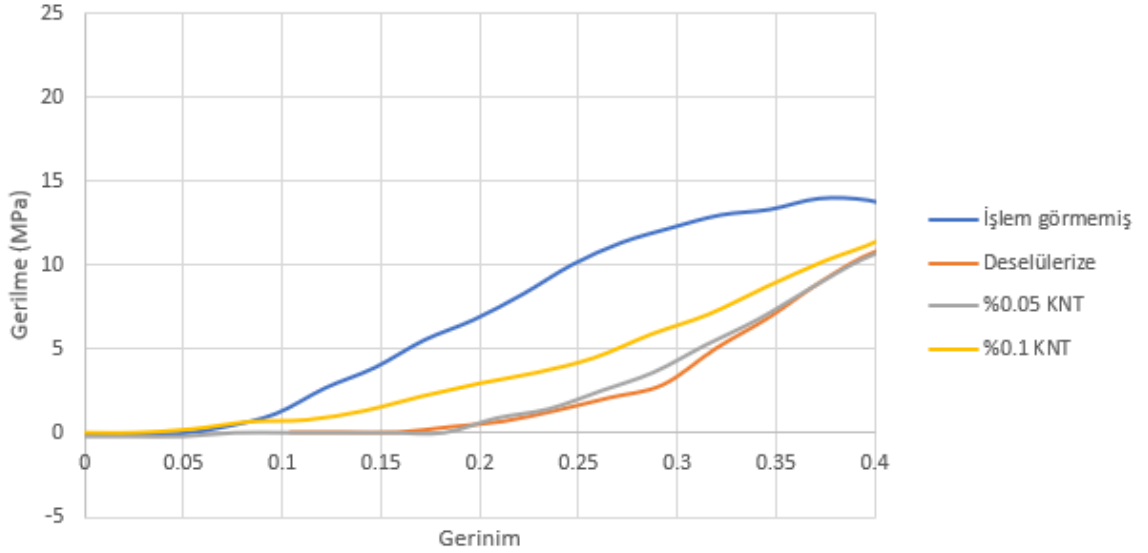
Karbon nanotüp ile perikard doku yüzeyi modifikasyonu işleminin ve karbon nanotüp konsantrasyonunun malzemelerin mekanik dayanımlarına etkisinin incelenmesi için işlem görmemiş, deselülerize ve kompozit doku iskelelerinin CellScale Univert Biomaterial Tester cihazı ile mekanik analizleri gerçekleştirilmiştir. Çizelge 4.2’de verilen çekme dayanımı değerleri kıyaslandığında deselülerizasyon işlemi sonrası çekme dayanımında işlem görmemiş dokuya göre az da olsa azalma olduğu gözlenmiştir. %0,05 KNT ile yüzey modifikasyonunun deselülerize dokunun çekme dayanımına katkı sağlamadığı görülürken, %0,1 KNT grubunda deselülerize ve işlem görmemiş gruba kıyasla çekme dayanımında artış olduğu tespit edilmiştir. Bu veriler artan karbon nanotüp konsantrasyonu ile mekanik dayanımın arttırıldığını, bu sayede deselülerizasyon işlemi ile yapısal bütünlüğü dolayısıyla mekanik dayanımı azalan deselülerize dokuların dezavantajının ortadan kaldırılabilirdiğini göstermektedir.

Şekil 4.18’deki gerilme – gerinim grafiğinde %10- %40 deformasyon alanı üzerinden eğim alınarak hesaplanan elastisite modülleri incelendiğinde en yüksek eğim değerine sahip grubun $54,13 \pm 0,42$ MPa ile işlem görmemiş grup olduğu bulunmuştur.

Deselülerizasyon işlemi sonrası elastisite modülünde düşüş görülürken ($34,82 \pm 3,53$ MPa), karbon nanotüp ile yüzey modifikasyonu işleminin deselülerize grup üzerinde fark yaratmadığı anlaşılmıştır. Elastik modülüs değerinin azalması malzemenin esnekliğinin, yani kalıcı şekil değişimine uğramadan dayanabileceği kuvvetin arttığını göstermektedir. Buradan yola çıkarak, doğal perikard dokunun deselülerizasyon işlemi sonrası esnekliğinin arttığı, karbon nanotüp ile yüzey modifikasyonunun da deselülerize dokunun elastikiyetini ciddi bir şekilde etkilemediği sonucuna ulaşılmaktadır. Bu sonuç, deselülerizasyon işlemi sonrası dokuların morfolojik olarak elastikiyetlerinin incelemelerinde tespit edilen bulguları da kanıtlar niteliktedir [78, 79].

Çizelge 4.2. İşlem görmemiş, deselülerize ve kompozit doku iskelelerine ait çekme dayanımı ve elastisite modülü değerleri.

	Çekme Dayanımı (MPa)	Elastisite Modülü (MPa)
İşlem görmemiş	$14,37 \pm 1,38$	$54,13 \pm 0,42$
Deselülerize	$11,94 \pm 0,44$	$34,82 \pm 3,53$
%0,05 KNT Kompozit	$12,88 \pm 1,96$	$31,57 \pm 10,98$
%0,1 KNT Kompozit	$18,98 \pm 2,10$	$35,84 \pm 1,69$



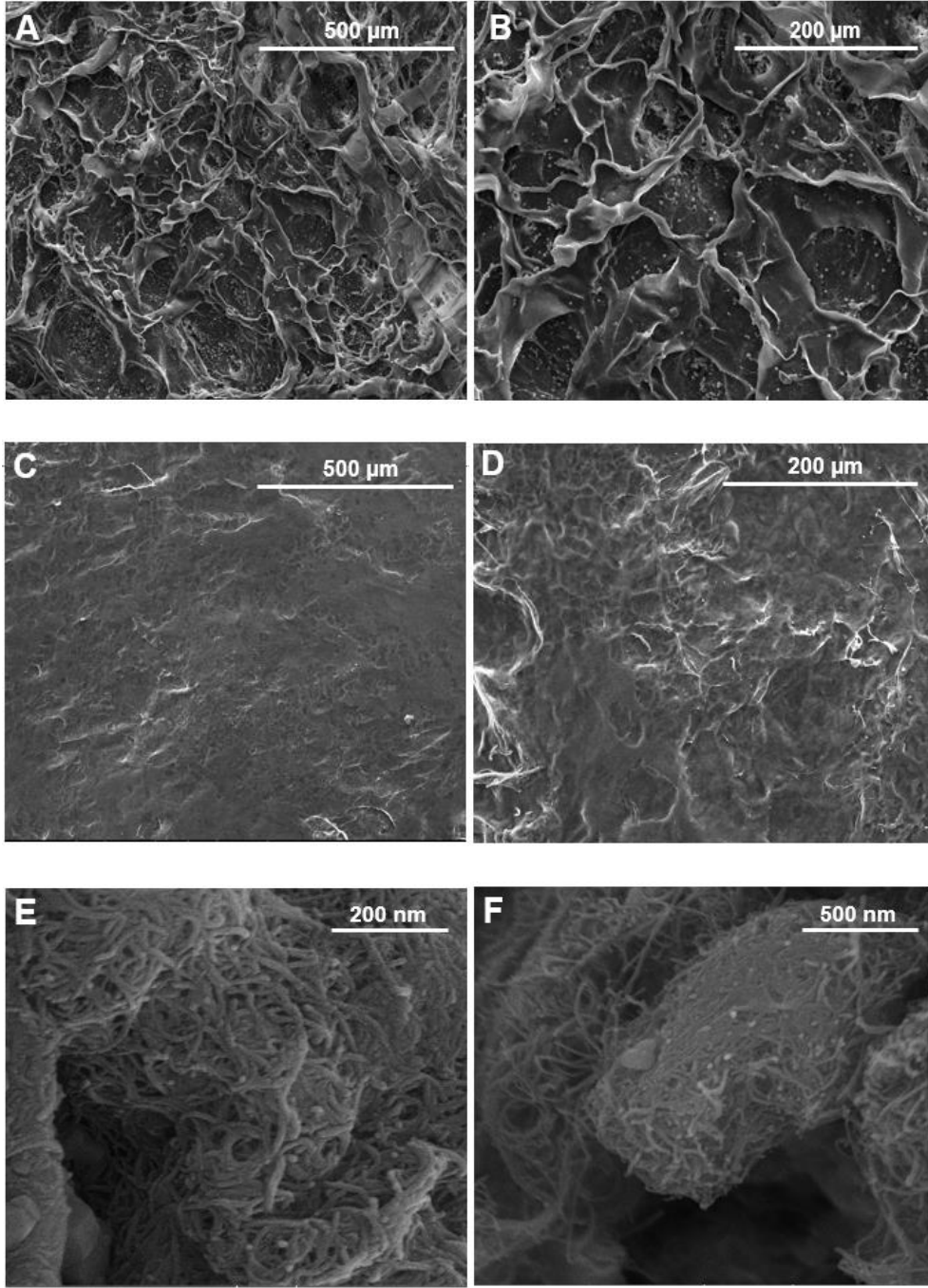
Şekil 4.18 İşlem görmemiş, deselülerize ve kompozit doku iskelelerine ait gerilim-gerinim grafiği.

4.2.1.6 Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi

İşlem görmemiş, deselülerize ve iki farklı karbon nanotüp konsantrasyonunda hazırlanmış kompozit doku iskelelerinin morfolojik yapıları SEM ile incelenmiştir. Bu doku iskelelerine ait farklı büyütmelelerdeki SEM görüntüleri Şekil 4.19’da verilmektedir. Bu görüntüler incelendiğinde işlem görmemiş perikard dokuda (A,B) yüksek miktarda hücre görülürken, deselülerize perikard doku görüntülerinde (C,D) ihmal edilecek seviyede az hücreye rastlanmıştır.

İşlem görmemiş doku daha kompakt ve heterojen bir morfolojiye sahipken, deselülerize dokularda bu yapının daha düz ve pürüzsüz bir hale geldiği gözlemlenmiştir. Hücrelerin başarılı bir şekilde uzaklaştırılması ve hücre dışı matrikste oluşan değişikliklerin düşük seviyede olması, deselülerizasyon işleminin başarılı olduğunun kanıtıdır.

Kompozit doku iskeleleri görüntülerinde (E,F) her iki grupta da karbon nanotüp-doku etkileşiminin başarılı bir şekilde gerçekleştiği görülmüştür. Yüzeyi etkileştirilen dokuların her tarafı incelendiğinde, karbon nanotüp dağılımının homojen olarak gerçekleştiği ve doku yüzeyinin çok yüksek ölçüde karbon nanotüp ile kaplandığı tespit edilmiştir. Doku ile etkileşen karbon nanotüp miktarı kıyaslamasında, iki kompozit doku iskelesi grubu arasında önemli bir farklılık gözlenmemiştir.



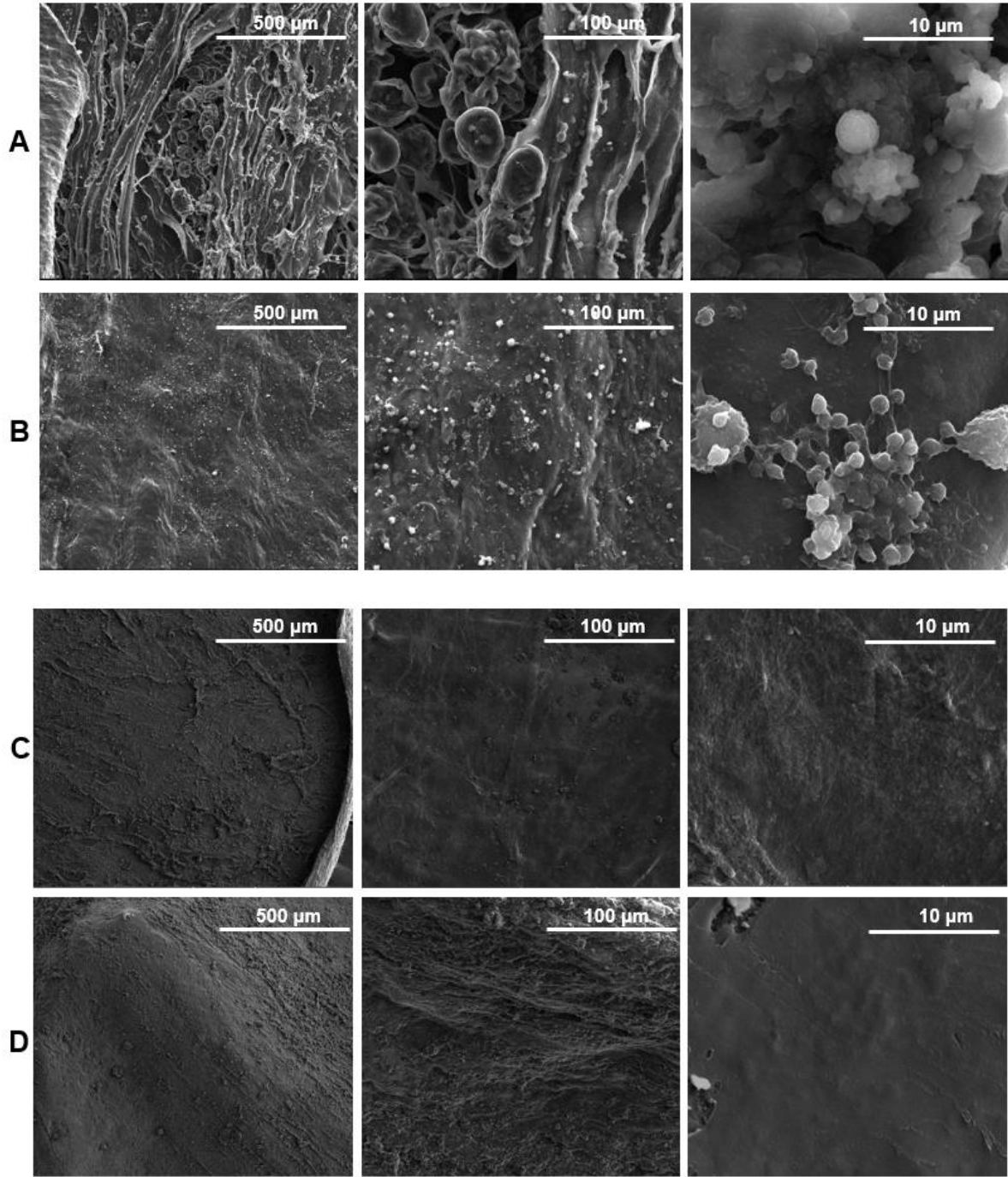
Şekil 4.19. A,B) İşlem görmemiş doğal perikard doku; C,D) Deselülerize perikard doku; E) %0,05 karbon nanotüp (santrifüjsüz) konsantrasyonunda hazırlanmış kompozit perikard doku; F) %0,1 karbon nanotüp (santrifüjlü) konsantrasyonunda hazırlanmış kompozit perikard doku iskeleleri taramalı elektron mikroskobu görüntüleri

4.2.1.7 Platelet Adezyon Testi

İşlem görmemiş, deselülerize ve iki farklı karbon nanotüp konsantrasyonu ile hazırlanmış kompozit doku iskelelerinin kan uyumluluğu ve trombojenite özelliklerinin değerlendirilmesinde en önemli karakterizasyon yöntemlerinden biri olan platelet adezyon testi, ISO 10993-4 standardına göre gerçekleştirilmiştir.

Platelet hücreleri ile etkileşen yüzeylerin SEM görüntüleri Şekil 4.20’de verilmiştir. İşlem görmemiş doku ve deselülerize dokularda oldukça yüksek miktarda platelet adezyonu gerçekleştiği görülmüştür. 500 ve 100 µm büyütme görüntülerinde hücrelerin yüzeyin neredeyse tamamını kapladığı, ayrıca yüzeylerin büyük bir bölümünde platelet agregasyonu meydana geldiği ve tek bulunan hücre sayısının çok az olduğu gözlenmiştir. Elde edilen trombositçe zengin plazmada trombosit hücreleriyle beraber az sayıda bulunan kırmızı ve beyaz kan hücrelerinin de yüzeylere tutunduğu belirlenmiştir. 10 µm büyütme görüntülerinde hücre agregalarının diğer agrega hücre topluluklarıyla aralarında bağlantı oluştuğu, dolayısıyla hücre tutunmasından sonra trombojenitenin ikinci adımı olan fibrin doku oluşumunun başladığı görülmüştür. Bu da platelet hücrelerinin sadece tutunmadığı, aynı zamanda aktivasyonunun da gerçekleştiğini göstermiştir.

Kompozit doku iskelelerinin SEM görüntüleri incelendiğinde (Şekil 4.20 C, D) iki grupta da platelet tutunmasında %100’e yakın başarı elde edildiği anlaşılmıştır. 500 ve 100 µm görüntülerde tek veya agrega halde hücre topluluklarına rastlanmazken, 10 µm büyütmede birkaç adet tek platelet hücresi gözlemlenmiştir. Bu hücrelerin yuvarlak morfolojide olması pasif durumda olduklarını göstermektedir. Platelet aktivitesi olmadığından dolayı, fibrin doku oluşumu ve sonraki trombojenez aşamalarının gerçekleşme riski minimuma indirilmiştir. Karakterizasyon çalışmasının doğru şekilde analiz edilmesi ve yorumlanması için her büyütmede dokuların farklı yerlerinden (n=3) görüntü elde edilmiş ve değerlendirirken bu görüntülerin ortalaması dikkate alınmıştır [80].

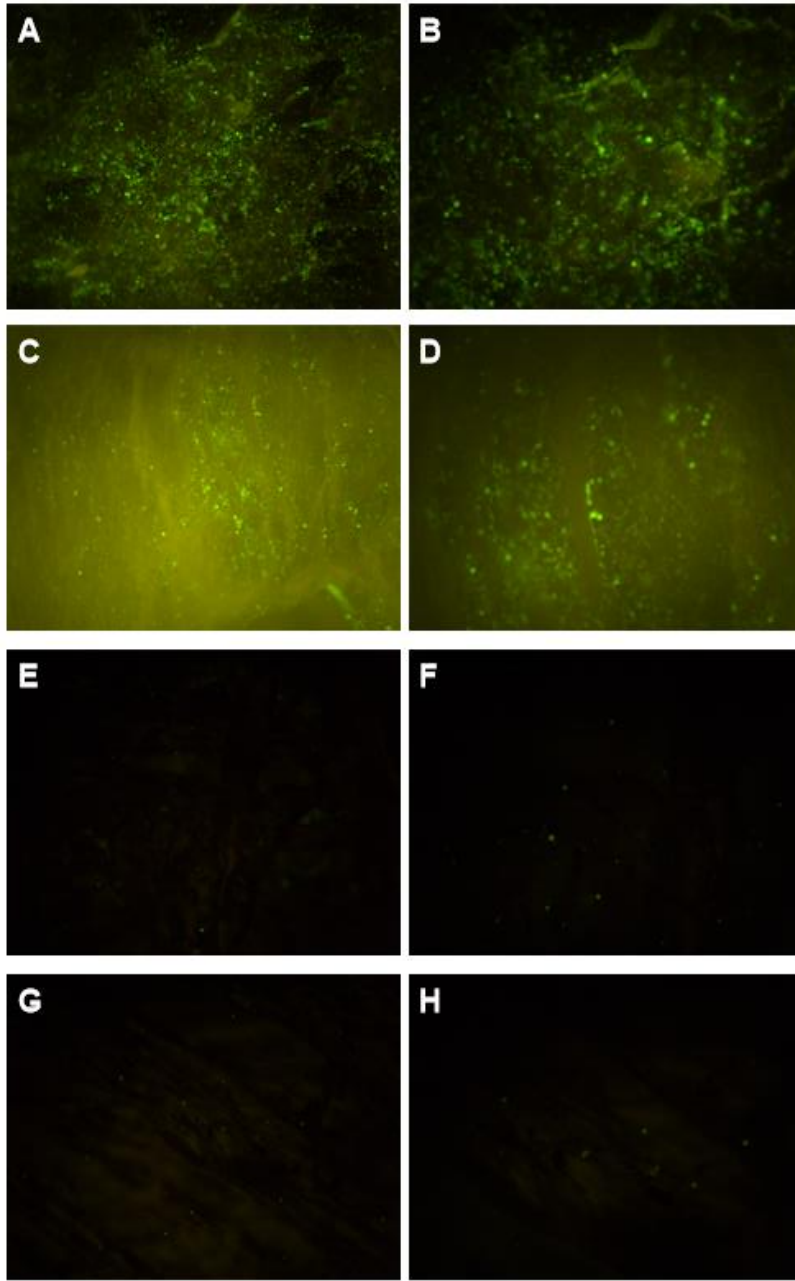


Şekil 4.20. Trombositçe zengin plazma ile etkileştirilen A) İşlem görmemiş, B) Deselülerize, C) %0,05 KNT, D) %0,1 KNT kompozit doku iskelelerinin SEM görüntüleri

4.2.1.8 Calcein-AM Boyaması

İşlem görmemiş, deselüerize ve kompozit doku iskelelerinin yüzeyleriyle etkileşen hücre miktarının ve canlılığının SEM ile birlikte daha iyi karakterize edilebilmesi için Calcein-AM boyaması da gerçekleştirilmiştir. Boyama sonucu yeşil filtre ile floresan mikroskopta incelenen malzemelerin görüntüleri 10X ve 20X büyütmede Şekil 4.21’de verilmiştir. İşlem görmemiş doğal ve deselüerize perikard doku görüntülerinde yüksek miktarda canlı hücre bulunduğu gözlenirken, kompozit doku iskeleleri mikroskop görüntülerinde yüzeye tutunan canlı hücre miktarının çok düşük seviyede olduğu belirlenmiştir. Ancak iki kompozit doku iskelesi grubu arasında belirgin bir fark gözlenmemiş olup, yüzeydeki canlı hücre sayısı hemen hemen aynı bulunmuştur.

Bu sonuçlar SEM analizi sonuçlarıyla örtüşmekte olup, doğal ve deselüerize dokulardaki kolajen yapıların hücre tutunmasını teşvik ettiği ve arttırdığı, karbon nanotüp ile modifikasyonun ise platelet tutunmasını minimum seviyeye indirmede etkili olduğunu kanıtlamıştır.

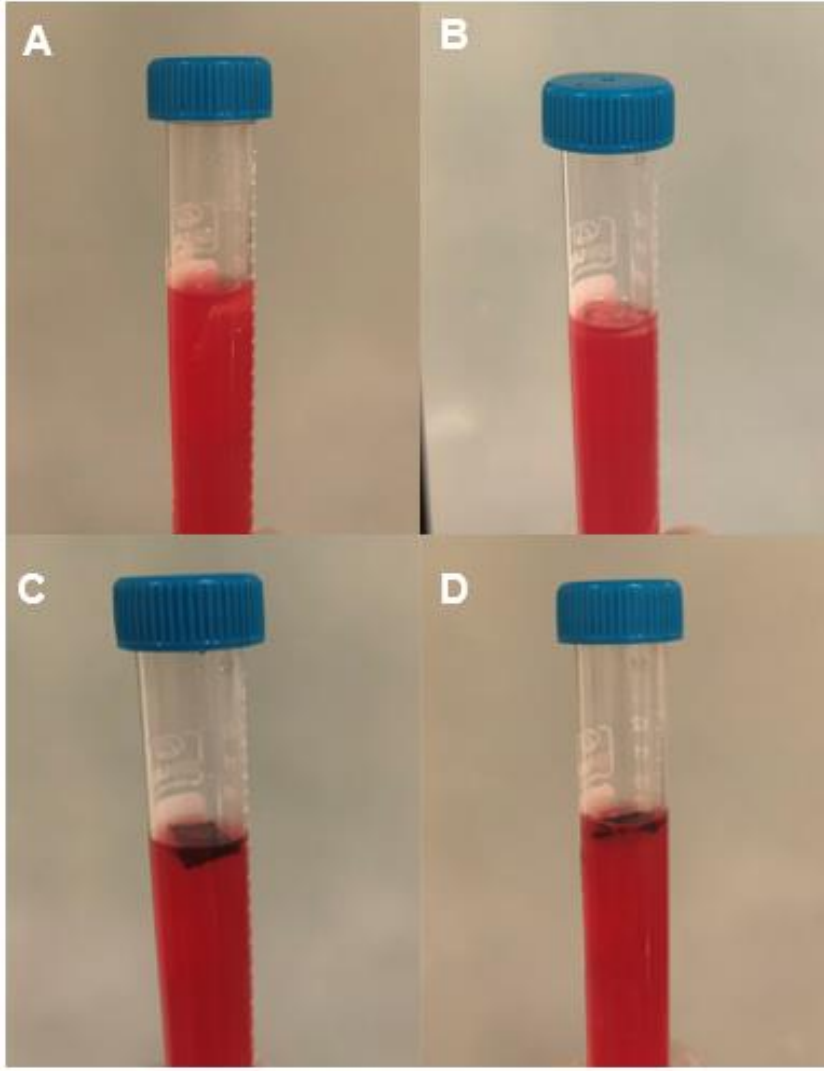


Şekil 4.21. İşlem görmemiş, deselülerize ve kompozit doku iskelelerine ait Calcein-AM boyaması görüntüleri. A, B) İşlem görmemiş, C, D) Deselülerize, E, F) %0,05 KNT, G, H) %0,1 KNT doku iskelesi 10X ve 20X büyütme görüntüleri.

4.2.1.9 Hemoliz Analizi

Hemoliz, kırmızı kan hücrelerinin membran bütünlüklerini kaybetmesi ve bunun sonucunda hemoglobinlerin plazmaya salınması durumudur. Bu analiz ile yüzeydeki yapıların kırmızı kan hücreleriyle etkileşimleri değerlendirilebilir.

Yapılan çalışmada işlem görmemiş doğal perikard dokusu ve deselülerize perikard dokusu yüzeyindeki kolajen ve diğer hücre dışı matriks bileşenlerinin kırmızı kan hücreleriyle olan etkileşimi ve kompozit doku yüzeyindeki karbon nanotüplerin kırmızı kan hücreleri ile etkileşimi ve hücrelerin membran bütünlüğüne olan etkileri incelenmiş ve hemolitik oran hesaplanarak kıyaslanmıştır. Su, pozitif kontrol olarak alınırken, PBS negatif kontrol olarak alınmıştır. Her grup için n=3 doku iskelesi kullanılmış olup her biri için üçer absorban okuması gerçekleştirilmiştir. Literatürde biyomalzemeler için izin verilen hemoliz oranı %5 olarak belirtilmektedir [41, 81]. Gruplara ait 540 nm'deki optik yoğunluk ve hemoliz oranları Çizelge 4.3'te verilmiştir. Grafikten görüldüğü üzere tüm gruplarda hemoliz oranı %5'in altında bulunmuştur. İki kompozit doku iskelesi grubu kıyaslandığında, elde edilen değerler işlem görmemiş ve deselülerize doku iskelelerinin hemoliz oranlarıyla yakın seviyededir. %0,05 karbon nanotüp konsantrasyonunda hazırlanan örnekte hemoliz oranı %1,07 iken, %0,1 santrifüj edilerek hazırlanan örnekte hemoliz oranı %3,38 olarak bulunmuştur. Bu verilerden yola çıkarak artan karbon nanotüp miktarının kırmızı kan hücrelerinin membran bütünlüğünü etkilediği ve hemoliz oranını arttırdığı yorumu yapılabilir. Fakat yüksek karbon nanotüp konsantrasyonunda bile hemoliz oranının izin verilen sınır %5'in altında olması, karbon nanotüplerin kan uyumluluğu için kullanılabilir özellikte bir malzeme olduğunu ispatlamıştır. Ayrıca %0,1 KNT grubunun hemoliz oranı ile deselülerize grubun hemoliz oranının neredeyse aynı olması, kompozit malzemelerin de günümüzde klinikte kullanılan deselülerize perikard malzemeler yerine kullanılabilirliğini göstermiştir.



Şekil 4.22. Seyreltilmiş kan ile inkübe edilmiş doku iskeleleri görüntüleri. A) İşlem görmemiş, B) Deselülerize, C) %0,05 KNT kompozit, D) %0,1 KNT kompozit doku iskeleleri

Çizelge 4.3 Pozitif kontrol, negatif kontrol, işlem görmemiş, deselülerize, %0,05 KNT ve %0,1 KNT doku iskelelerine ait optik yoğunluk ve hemoliz tablosu

Örnek	540 nm'de ölçülen optik yoğunluk (Ortalama)	Hemoliz (%)
Su (Pozitif kontrol)	0,24	-
PBS (Negatif kontrol)	0,04	-

İşlem görmemiş perikard doku iskelesi	0,047	1,42
Deselülerize perikard doku iskelesi	0,050	3,14 ± 0,006
%0,05 KNT Kompozit perikard doku iskelesi	0,046	1,07 ± 0,001
%0,1 KNT Kompozit perikard doku iskelesi	0,050	3,38 ± 0,004

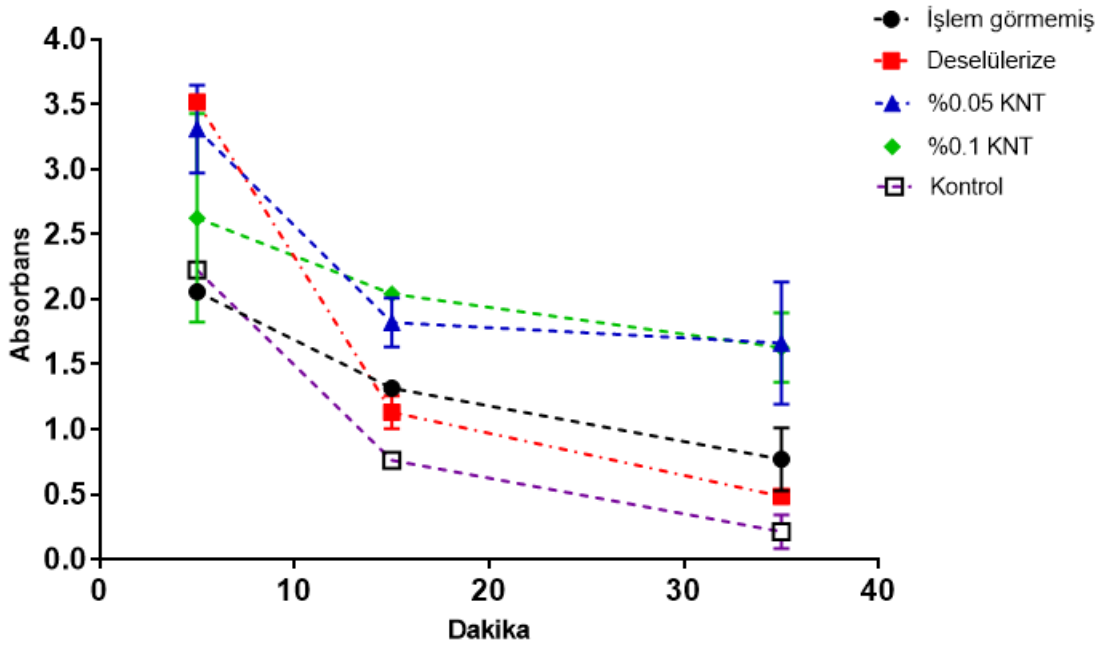
4.2.1.10 Kinetik Kan Pıhtılaşma Analizi

Biyomalzemelerin kan uyumluluğu ve trombojenite değerlendirmelerinde diğer önemli yöntemlerden biri olan pıhtılaşma (koagulasyon) analizi, kan malzeme yüzeyiyle etkileştikten sonra pıhtılaşmamış kandan salınan hemoglobinin seviyesinin spektrofotometre yardımıyla absorbans değerlerinin ölçülmesi ile gerçekleştirilmektedir. Dolayısı ile daha yüksek absorbans değeri daha yüksek hemoglobin salınma seviyesini temsil ettiğinden, pıhtılaşma derecesinin daha düşük olduğunu göstermektedir [82-84].

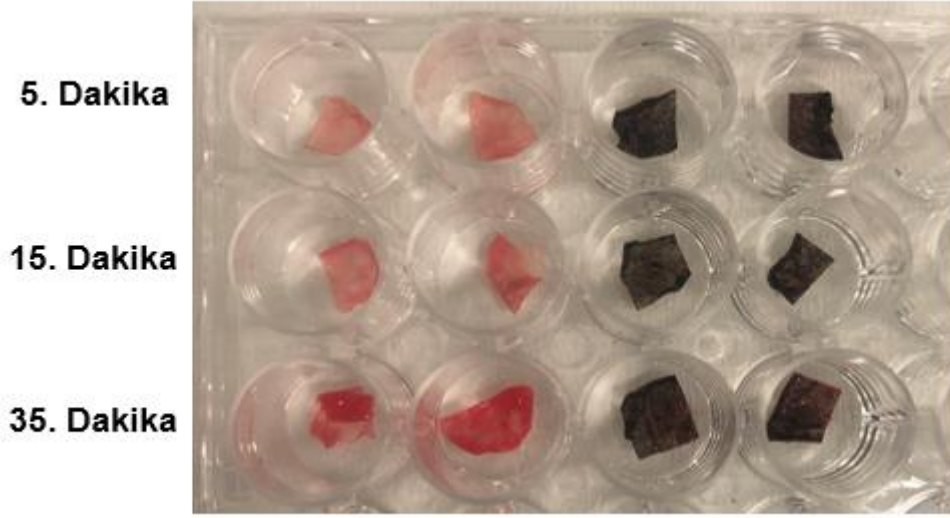
Yapılan çalışmada işlem görmemiş, deselülerize ve kompozit doku iskelesi gruplarının kan ile 5, 15 ve 35. Dakikalardaki etkileşimlerindeki pıhtılaşma seviyeleri 540 nm’de spektrofotometre ile ölçülmüştür. Her gruptan n=3 sayıda absorbans okuması yapılmıştır. Kinetik kan-pıhtılaşma grafiği Şekil 4.23’te verilmiştir. 5, 15 ve 35 dakika boyunca kan ile etkileşen malzemelerin yüzeylerinde oluşan pıhtı görüntüleri ise Şekil 4.24’te verilmiştir.

Sonuçlara göre ilk 5 dakikada deselülerize ve %0,05 KNT doku iskelelerinin absorbans değerlerinin çok yakın olduğu, yani yüzeyle etkileşen kandan salınan hemoglobin miktarının benzer olduğu görülmüştür. Fakat 15.dk’da yapılan ölçümlere göre deselülerize doku iskelesinde hızlı bir pıhtılaşma süreci gerçekleştiği ve salınan hemoglobin seviyesinin hızla düştüğü bulunmuştur. %0,05 KNT doku iskelesi grubunda ise salınan hemoglobin seviyesi deselülerize gruba göre daha yüksek seviyededir. 35.dakikaya gelindiğinde ise deselülerize doku iskelesi ile etkileşen kanın neredeyse tamamı pıhtılaşmış şekildedir. İşlem görmemiş doku iskelesi ile etkileşen kandan salınan hemoglobin miktarı, daha 5.dakikada bile kompozit dokulardan 35.dakikada salınan

hemoglobin miktarından düşük seviyededir. 15. Dakikadan sonra deselülerize doku grubuyla aynı pıhtılaşma kinetiğini izlemiş ve 35.dakika ölçümlerinde deselülerize dokunun pıhtılaşma kinetiği ile yakın bir seviyede olduğu görülmüştür. Bu da işlem görmemiş dokuda pıhtılaşma kinetiğinin çok hızlı gerçekleştiğini göstermektedir. İki kompozit grubun absorban ölçümleri kendi aralarında kıyaslandığında 5. ve 15.dakika aralıklarında yakın seviyede olup, 15.dakikadan sonra daha da yakın bir pıhtılaşma kinetiği izlemiştir. 35.dakikaya doğru iki grubun ölçülen hemoglobin miktarı aynı seviyededir. Bu veriler ışığında iki kompozit grubun da pıhtılaşma kinetiğinin çok benzer olduğu ve işlem görmemiş ve deselülerize doku iskelelerine göre pıhtılaşmayı önlemede daha etkili olduğu sonucu çıkarılabilir.



Şekil 4.23 İşlem görmemiş, deselülerize ve kompozit doku iskelelerine ait 5, 15 ve 35.dakika kan-pıhtılaşma kinetiği grafiği

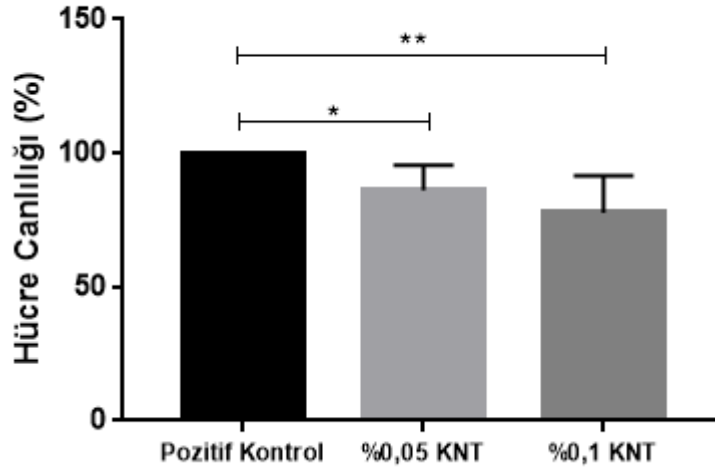


Şekil 4.24 Sırasıyla, işlem görmemiş, deselülerize, %0,05 KNT ve %0,1 KNT kompozit doku iskelelerine ait 5, 15 ve 35 dakika kan ile etkileşme sonucu yüzeylerde oluşan pıhtı görüntüleri.

4.2.1.11 Sitotoksosite Analizi

Karbon nanotüplerin hücre canlılığına etkilerinin dolayısıyla biyouyumluluklarının belirlenmesi için %0,05 ve %0,1 KNT kompozit doku iskeleleri kullanılarak sitotoksosite analizi gerçekleştirilmiştir. Yapılan MTT analizi sonucu elde edilen absorbans değerleri Şekil 4.25'te verilmiştir (n=3). Bu değerler ile hücre canlılığı yüzdeleri hesaplandığında, %0,05 KNT kompozit grubunda hücre canlılığının $86,21 \pm 7,51$, %0,1 KNT kompozit grubunun hücre canlılığının da $83,76 \pm 9,78$ olduğu bulunmuştur. Pozitif kontrol %100 olarak kabul edilmiştir. Bu sonuçlar, artan karbon nanotüp konsantrasyonu ile hücre canlılığında hafif bir düşüş olsa da iki kompozit doku iskelesi grubu arasında ciddi bir fark olmadığını ve iki grubun da sitotoksik etkisi bulunmadığını göstermiştir. Literatürde yapılan çalışmalardan karbon nanotüplerin artan konsantrasyonlarda toksik etki gösterdiği bilinmektedir. Bu nedenle karbon nanotüplerin kullanılması gereken konsantrasyon miktarına gerekli toksisite çalışmaları yapıldıktan sonra karar verilmelidir. Bu çalışmada elde edilen veriler istatistiksel sapma ile beraber değerlendirildiğinde, sonuçların literatür ile uyumlu olup, artan karbon nanotüp konsantrasyonunda bile literatürde kabul edilen minimum hücre canlılığı oranının (%70) üzerinde hücre canlılık

oranına sahip olduğunu göstermiş ve iki kompozit grubunun da in vitro ve in vivo çalışmalarda kullanılabileceğini ispatlamıştır [85-88].



Şekil 4.25 Kompozit doku iskelelerine ait hücre canlılığı grafiği (* $p < 0,05$) (** $p < 0,01$).

5. YORUM

- Kimyasal ve fiziksel deselüerizasyon yöntemlerinin tek başına ya da kombinasyonlarıyla hazırlanan deselüerizasyon protokollerinde, kimyasal ajan olarak SDS ve Triton-X-100 deterjanlarının farklı konsantrasyonları, fiziksel yöntem olarak da dondurup çözme metodu uygulanmıştır.
- Deselüerizasyon protokolü uygulanan dokular histolojik ve biyokimyasal olarak analiz edilmiştir. Hematoksilen & Eozin, DAPI boyamaları ve Quant- iT PicoGreen kantitatif DNA analizinin sonuçları en yüksek hücre uzaklaştırma oranının %1 SDS grubuna ait olduğunu, fakat bu yöntemin ekstraselüler matrikse zarar verdiğini ve yapısını bozduğunu göstermiştir. Öte yandan dondurup çözme ön muamelesi sonrası %0,5 SDS yönteminin hem hücre uzaklaştırma hem de ekstraselüler matriksin korunması açısından ideal bir grup olduğu görülmüştür. Buradan yola çıkarak SDS konsantrasyonunun artması hücresizleştirme için daha iyi olsa da matriks bütünlüğünün korunması için daha düşük SDS konsantrasyonu kullanılarak başka yöntemler ile kombine edilmesi gerektiği sonucuna ulaşılmıştır.
- Başka bir kimyasal deterjan olan Triton-X-100'ün kullanıldığı deselüerizasyon grubu ile SDS grubu kıyaslandığında, %1 Triton-X-100 grubunun %0,5 SDS grubundan bile daha az hücre uzaklaştırdığı bulunmuştur. %1 Triton-X-100 grubu, deselüerize olduğu kabul edilen 50 ng sınırının üstünde kalarak başarısız kabul edilmiştir. Bu nedenle kimyasal deselüerizasyon çalışmalarına SDS ile devam edilmesi gerektiğine karar verilmiştir.
- Hücresizleştirme karakterizasyonlarının ardından dokulardaki kolajen, elastin gibi ekstraselüler matriks bileşenlerinin ne oranda korunduğunun ve matriks yapısının deselüerizasyondan ne kadar etkilendiğinin incelenmesi için Masson's Trichrome boyaması ile DMMB ve hidrokspirolin analizi yapılmıştır. İşlem görmemiş dokuya en yakın GAG miktarı bulunan grupların tek başına ve dondurup çözme ön muamelesi ile uygulanan %0,5 SDS grupları olduğu görülmüştür. Hücresizleştirme sonuçları ile de beraber optimize grubun dondurup

çözme ön muamelesi sonrası %0,5 SDS olması gerektiğine karar verilmiştir. Deselülerizasyondan sonra dokudaki kolajen miktarı da etkilenmemiş ve optimize deselülerizasyon grubu ile aynı miktarda bulunmuştur.

- Tezin ikinci aşamasında optimize deselüerizasyon yöntemi ile deselüerize edilen perikard dokular farklı konsantrasyonlarda karboksillenmiş çok duvarlı karbon nanotüpler ile modifiye edilmiştir. Perikard – karbon nanotüp etkileşiminin ne oranda başarılı olduğunun incelenmesi için ilk aşamada FTIR ve TGA analizleri yapılmıştır. Bunların sonucunda >%0,1 karbon nanotüp konsantrasyonlarında nanotüplerin solüsyonda dağılmadığı ve homojen bir çözelti oluşturamadığı, ayrıca analizlerde de daha düşük konsantrasyonlu kompozit dokulara kıyasla karbon nanotüp miktarında herhangi bir artış olmadığı gözlenmiştir. Bu nedenle sonraki karakterizasyon çalışmaları için >%0,1 karbon nanotüp konsantrasyonları kullanılmamış, ayrıca <%0,1 gruplarda da bağlanma miktarı en yüksek iki grup olan %0,05 ve %0,1 (santrifüjlü) karbon nanotüp kompozit doku grupları seçilerek devam edilmiştir.
- İki kompozit doku iskelesinin seçilmesi ardından işlem görmemiş ve deselüerize doku iskeleleri ile beraber morfolojik, termal, mekanik ve trombojenite analizleri gerçekleştirilmiştir. SEM ve AFM analizleri ile doku iskelelerinin morfolojik yapıları iki ve üç boyutlu olarak incelenmiş, karbon nanotüplerin doku ile etkileşimi görsel olarak da ispatlanmıştır. DSC analizi ile doku iskelelerinin termal stabiliteyi kıyaslandığında, %0,1 KNT kompozit grubunun deselüerize gruba göre termal stabiliteyi arttırdığı anlaşılmıştır. Aynı şekilde yapılan mekanik analiz de %0,1 KNT kompozit grubunun diğer gruplara göre çekme dayanımını arttırdığı ve daha mekanik dayanımı yüksek bir malzeme sunduğu görülmüştür.
- Karbon nanotüplerin kan uyumluluğu ve trombojeniteye olan etkilerinin araştırılması için platelet adezyon testi, Calcein-AM boyaması, kinetik-kan pıhtılaşma analizi ve hemoliz analizi çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Trombositçe zengin plazma ile etkileştirilen doku iskeleleri SEM ile incelendiğinde iki kompozit grubun da trombosit adezyonu ve aktivasyonunu engellemede başarılı olduğu anlaşılmıştır. %0,05 KNT kompozit grubunda yüzeylerde sadece birkaç tane pasif trombosit varlığına rastlanırken, %0,1 KNT kompozit grubunda

trombosit varlığına rastlanmamıştır. Kompozit iskelelerde tutunan çok az sayıdaki trombosit hücrelerinin de morfolojilerinden pasif halde oldukları, malzeme yüzeyine tutunduktan sonra aktifleşmedikleri görülmüştür. Hücrelerin tutunmasının önlenmesinin yanısıra, tutunduklarında aktive hale geçmelerinin de önlenmesi trombojenite değerlendirmelerinde en önemli iki parametredir.

- Trombositlerin doku iskeleleri ile etkileşimleri görsel olarak Calcein-AM boyaması ile de incelenerek SEM görüntüleri desteklenmiştir. Boyama görüntüleri incelendiğinde işlem görmemiş ve deselülerize doku iskelelerine kıyasla kompozit doku iskelelerinde trombosit tutunmasının ve aktivasyonun benzer ve çok düşük seviyede olduğu gözlenmiştir. Ayrıca tromboz oluşumu hücrelerden salınan sinyal molekülleri ile hücrelerin agrega olması ile başlatıldığı için, bu çalışmadaki sonuçlarda trombositlerin agrega halde değil de tek hücreler olarak farklı yerlerde bulunmaları trombojenite değerlendirmesinde önemli bir noktadır.
- Trombojenitenin önemli belirteçlerinden biri olan kan uyumluluğu, kinetik-kan pıhtılaşma analizi ile değerlendirildiğinde, işlem görmemiş ve deselülerize doku iskelelerinin çok hızlı bir pıhtılaşma kinetiği gösterdiği, kompozit doku iskelelerinin pıhtılaşma hızı ve oranının ise düşük olduğu ve birbirleriyle benzer bir kinetik gösterdikleri görülmüştür. Buradan karbon nanotüplerin pıhtılaşmayı önlemede, dolayısı ile yüksek kan uyumluluğu performansı göstermede etkili bir biyomalzeme olarak kullanılabilceği sonucuna varılmıştır.
- Kan uyumluluğunu gösteren başka bir analiz olan hemoliz analizi ile kompozit malzemelerin kan hücreleri üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Hemoliz oranları hesaplandığında karbon nanotüp konsantrasyonunun artmasıyla hemoliz oranının da arttığı, yani daha fazla kırmızı kan hücrelerinin hemoliz olduğu görülmüştür. Fakat yüksek KNT konsantrasyonunda bile hemoliz oranı literatürdeki %5 hemoliz sınırının altında bulunmuştur. Bu da iki kompozit grubun da kan uyumluluğu özelliklerinin iyi olduğunu ve bu çalışmalarda kullanılabilcek malzemeler olduğunu göstermiştir.

- Perikard dokuların karbon nanotüp ile modifikasyonunun sitotoksositeye olan etkilerinin incelenmesi için MTT analizi gerçekleştirilmiştir. Hücre canlılığı oranları hesaplandığında iki kompozit grubun da literatürde belirlenen miktar olan %70 canlılık sınırının üstünde canlılık yüzdesine sahip olduğu ve sitotoksik özellik göstermedikleri bulunmuştur. %86,21 ± 7,51 canlılık yüzdesi ile %0.05 KNT kompozit grubu, %83,76 ± 9.78 hücre canlılığına sahip %0,1 KNT kompozit gruba göre az farkla da olsa daha yüksek hücre canlılığı göstermiştir. Bu sonuç, artan karbon nanotüp konsantrasyonunun sitotoksosite ile doğru orantılı olduğunu, hücre ile etkileşen karbon nanotüp miktarının artmasının hücre üzerinde toksik etkilere neden olduğunu kanıtlamaktadır. Ancak bu tez çalışmasında kullanılan iki kompozit malzeme de in vitro-in vivo çalışmalarda ve klinik ön çalışmalarda kullanılabilecek düşük sitotoksik özelliğe sahiptir.
- %0,05 ve %0,1 KNT konsantrasyonuna sahip kompozit malzemeler kan uyumluluğu ve trombojenite analizlerinde önemli bir fark ortaya koymamış ve benzer hemodinamik özellikler göstermiştir. Mekanik ve termal stabilite analizlerinde ise %0,1 KNT kompozit %0,05 KNT kompozit grubuna göre avantaj sağlamış ve deselülerizasyon işleminden sonra meydana gelen düşük doku stabilitesini arttırarak işlem görmemiş perikard doku ile tekrar aynı seviyeye getirmiştir.
- Bu tez çalışmasında yapay kalp kapakçıklarında meydana gelebilecek trombojenite problemlerinin önüne geçilmesini amaçlayan nanokompozit bir yaprakçık materyali geliştirilmiştir. Klinikte sıklıkla kullanılan deselülerize perikard, ekstraselüler matsiksin nano yapısının korunması ve nano düzeyde etkileşim sağlanması için antitrombojenik özelliği bilinen karbon nanotüp ile modifiye edilmiştir. Karbon nanotüpler ayrıca nano çapları ve mikro uzunlukları ile yüksek en-boy oranı sağlayarak kalp için gerekli esnekliği sağlayarak yaprakçık için gerekli mekanik özellikleri de sağlamıştır. Bu çalışma, perikard dokunun karbon nanotüp ile yüzey modifikasyonun yapılması ve trombojenite özelliğinin değerlendirilmesi açısından literatürde bir ilk olup yenilikçi bir yaklaşım sunmuştur.

6. KAYNAKLAR

- [1] D.M. Ibrahim, A. Kakarougkas, N.K. Allam, Recent advances on electrospun scaffolds as matrices for tissue-engineered heart valves, *Materials Today Chemistry*, 5 (2017) 11-23.
- [2] M. Yang, C.Z. Chen, X.N. Wang, Y.B. Zhu, Y.J. Gu, Favorable effects of the detergent and enzyme extraction method for preparing decellularized bovine pericardium scaffold for tissue engineered heart valves, *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 91 (2009) 354-361.
- [3] S. Boroumand, S. Asadpour, A. Akbarzadeh, R. Faridi-Majidi, H. Ghanbari, Heart valve tissue engineering: an overview of heart valve decellularization processes, *Regenerative medicine*, 13 (2018) 41-54.
- [4] Y. Xue, V. Sant, J. Phillippi, S. Sant, Biodegradable and biomimetic elastomeric scaffolds for tissue-engineered heart valves, *Acta biomaterialia*, 48 (2017) 2-19.
- [5] Z. Zhu, J. Zhou, J. Ding, J. Xu, H. Zhong, S. Lei, A novel approach to prepare a tissue engineering decellularized valve scaffold with poly (ethylene glycol)–poly (ϵ -caprolactone), *RSC advances*, 6 (2016) 14427-14438.
- [6] M. Kasimir, E. Rieder, G. Seebacher, A. Nigisch, B. Dekan, E. Wolner, G. Weigel, P. Simon, Decellularization does not eliminate thrombogenicity and inflammatory stimulation in tissue-engineered porcine heart valves, *Journal of Heart Valve Disease*, 15 (2006) 278.
- [7] Y. Athar, S.L.A. Zainuddin, Z. Berahim, A. Hassan, A. Sagheer, M.K. Alam, Bovine pericardium: A highly versatile graft material, *International Medical Journal*, 21 (2014) 321-324.
- [8] N. Li, Y. Li, D. Gong, C. Xia, X. Liu, Z. Xu, Efficient decellularization for bovine pericardium with extracellular matrix preservation and good biocompatibility, *Interactive cardiovascular and thoracic surgery*, 26 (2018) 768-776.
- [9] G.D. Dargas, J.I. Weitz, G. Giustino, R. Makkar, R. Mehran, Prosthetic heart valve thrombosis, *Journal of the American College of Cardiology*, 68 (2016) 2670-2689.
- [10] J. Meng, H. Kong, H. Xu, L. Song, C. Wang, S. Xie, Improving the blood compatibility of polyurethane using carbon nanotubes as fillers and its implications to cardiovascular surgery, *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official*

Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials, 74 (2005) 208-214.

[11] B. Dhandayuthapani, S.H. Varghese, R.G. Aswathy, Y. Yoshida, T. Maekawa, D. Sakthikumar, Evaluation of antithrombogenicity and hydrophilicity on zein-SWCNT electrospun fibrous nanocomposite scaffolds, *International journal of biomaterials*, 2012 (2012).

[12] R.B. Hinton, K.E. Yutzey, Heart valve structure and function in development and disease, *Annual review of physiology*, 73 (2011) 29-46.

[13] D.Y. Cheung, B. Duan, J.T. Butcher, Current progress in tissue engineering of heart valves: multiscale problems, multiscale solutions, *Expert opinion on biological therapy*, 15 (2015) 1155-1172.

[14] R. Nazir, Collagen–hyaluronic acid based interpenetrating polymer networks as tissue engineered heart valve, *Materials Science and Technology*, 32 (2016) 871-882.

[15] Anonim, Prof. Dr. Hakan Gerçekoğlu, <https://drhakangercekoglu.com/tedaviler/kalp-kapak-ameliyatlari> (Erişim tarihi: 10 Mayıs 2020).

[16] A.L. Nachlas, S. Li, M.E. Davis, Developing a clinically relevant tissue engineered heart valve—a review of current approaches, *Advanced healthcare materials*, 6 (2017) 1700918.

[17] Anonim, Mayo Clinic, <https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/heart-valve-disease/symptoms-causes/syc-20353727> (Erişim tarihi: 10 Mayıs 2020).

[18] Anonim, Hopkins Medicine, <https://www.hopkinsmedicine.org/health/conditions-and-diseases/heart-valve-diseases> (Erişim tarihi: 10 Mayıs 2020).

[19] Anonim, <https://www.houstonheartvalvesurgeon.com/aortic-valve-stenosis> (Erişim tarihi: 10 Mayıs 2020).

[20] D. Bezuidenhout, D.F. Williams, P. Zilla, Polymeric heart valves for surgical implantation, catheter-based technologies and heart assist devices, *Biomaterials*, 36 (2015) 6-25.

[21] M. Gudarzi, H. Zamanian, A. Oveisi, A steady flow analysis of blood flow properties through some defective bileaflet mechanical heart valves, *Technical Journal of Engineering and Applied Sciences*, 3 (2013) 898-903.

[22] M. Arsalan, T. Walther, Durability of prostheses for transcatheter aortic valve implantation, *Nature Reviews Cardiology*, 13 (2016) 360-367.

- [23] R.A. Manji, B. Ekser, A.H. Menkis, D.K. Cooper, Bioprosthetic heart valves of the future, *Xenotransplantation*, 21 (2014) 1-10.
- [24] J. Park, R.S. Lakes, *Biomaterials: an introduction*, Springer Science & Business Media 2007.
- [25] C.F. Van Eck, A.F. Chen, B.A. Klatt, J. D'Antonio, F. Fu, The classification of implants: class I, II, III, *Journal of long-term effects of medical implants*, 19 (2009).
- [26] M. Ramalingam, S. Ramakrishna, S. Best, *Biomaterials and stem cells in regenerative medicine*, CRC Press 2012.
- [27] C. Sperling, M. Fischer, M.F. Maitz, C. Werner, Blood coagulation on biomaterials requires the combination of distinct activation processes, *Biomaterials*, 30 (2009) 4447-4456.
- [28] M.B. Gorbet, M.V. Sefton, Biomaterial-associated thrombosis: roles of coagulation factors, complement, platelets and leukocytes, *Biomaterials*, 25 (2004) 5681-5703.
- [29] S. Guhathakurta, V. Balasubramanian, B. Ananthkrishnan, S. Veerappan, R. Balasundari, B. Tata, K. Cherian, Thrombogenicity studies of three different variants of processed bovine pericardium, *IRBM*, 29 (2008) 223-230.
- [30] Anonim, *turkcerrahi.com*, <https://www.turkcerrahi.com/makaleler/hemostaz-kanurunleri-transfuzyonu/hemostaz/> (Erişim tarihi: 25 Mayıs 2020).
- [31] G. Rao, T. Chandy, Role of platelets in blood-biomaterial interactions, *Bulletin of Materials Science*, 22 (1999) 633-639.
- [32] S. Kamath, A. Blann, G. Lip, Platelet activation: assessment and quantification, *European heart journal*, 22 (2001) 1561-1571.
- [33] P. Siljander, O. Carpen, R. Lassila, Platelet-derived microparticles associate with fibrin during thrombosis, (1996).
- [34] S. Braune, R.A. Latour, M. Reinthaler, U. Landmesser, A. Lendlein, F. Jung, In vitro thrombogenicity testing of biomaterials, *Advanced healthcare materials*, 8 (2019) 1900527.
- [35] M. Weber, H. Steinle, S. Golombek, L. Hann, C. Schlensak, H.P. Wendel, M. Avci-Adali, Blood-contacting biomaterials: in vitro evaluation of the hemocompatibility, *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 6 (2018) 99.
- [36] E.M. Srokowski, *Evaluation of a Family of Elastin-Like Polypeptide Coatings for Blood Contacting Devices*, Institute of Biomaterials and Biomedical Engineering University of Toronto, Toronto, 2012.

- [37] A.R. Boccaccini, P.X. Ma, Tissue engineering using ceramics and polymers, Elsevier 2014.
- [38] M.E. Furth, A. Atala, Tissue engineering: future perspectives, Principles of Tissue Engineering, Elsevier 2014, pp. 83-123.
- [39] R.S. Langer, J.P. Vacanti, Tissue engineering: the challenges ahead, Scientific American, 280 (1999) 86-89.
- [40] D. Howard, L.D. Buttery, K.M. Shakesheff, S.J. Roberts, Tissue engineering: strategies, stem cells and scaffolds, Journal of anatomy, 213 (2008) 66-72.
- [41] A.G. Kidane, G. Burriesci, M. Edirisinghe, H. Ghanbari, P. Bonhoeffer, A.M. Seifalian, A novel nanocomposite polymer for development of synthetic heart valve leaflets, Acta biomaterialia, 5 (2009) 2409-2417.
- [42] E.D. Hiester, M.S. Sacks, Optimal bovine pericardial tissue selection sites. I. Fiber architecture and tissue thickness measurements, Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and the Australian Society for Biomaterials, 39 (1998) 207-214.
- [43] S. Mathapati, D.K. Bishi, S. Guhathakurta, K.M. Cherian, J.R. Venugopal, S. Ramakrishna, R.S. Verma, Biomimetic acellular detoxified glutaraldehyde cross-linked bovine pericardium for tissue engineering, Materials Science and Engineering: C, 33 (2013) 1561-1572.
- [44] Y. Hu, X. Su, Y. Lei, Y. Wang, A novel anti-calcification method for bioprosthetic heart valves using dopamine-modified alginate, Polymer Bulletin, 76 (2019) 1423-1434.
- [45] S. Zouhair, E. Dal Sasso, S.R. Tuladhar, C. Fidalgo, L. Vedovelli, A. Filippi, G. Borile, A. Bagno, M. Marchesan, G. De Rossi, A comprehensive comparison of bovine and porcine decellularized pericardia: new insights for surgical applications, Biomolecules, 10 (2020) 371.
- [46] S. Mirsadraee, H.E. Wilcox, S.A. Korossis, J.N. Kearney, K.G. Watterson, J. Fisher, E. Ingham, Development and characterization of an acellular human pericardial matrix for tissue engineering, Tissue engineering, 12 (2006) 763-773.
- [47] M.A. Heuschkel, A. Leitolis, J.G. Roderjan, P.H. Suss, C.A.O. Luzia, F.D.A. da Costa, A. Correa, M.A. Stimamiglio, In vitro evaluation of bovine pericardium after a soft decellularization approach for use in tissue engineering, Xenotransplantation, 26 (2019) e12464.

- [48] Z.Z. Liu, M.L. Wong, L.G. Griffiths, Effect of bovine pericardial extracellular matrix scaffold niche on seeded human mesenchymal stem cell function, *Scientific reports*, 6 (2016) 1-12.
- [49] B. Mendoza-Novelo, E.E. Avila, J.V. Cauch-Rodríguez, E. Jorge-Herrero, F.J. Rojo, G.V. Guinea, J.L. Mata-Mata, Decellularization of pericardial tissue and its impact on tensile viscoelasticity and glycosaminoglycan content, *Acta biomaterialia*, 7 (2011) 1241-1248.
- [50] A. Bielli, R. Bernardini, D. Varvaras, P. Rossi, G. Di Blasi, G. Petrella, O.C. Buonomo, M. Mattei, A. Orlandi, Characterization of a new decellularized bovine pericardial biological mesh: Structural and mechanical properties, *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*, 78 (2018) 420-426.
- [51] K. Vogiatzidis, S.G. Zarogiannis, I. Aidonidis, E.I. Solenov, P.-A. Molyvdas, K.I. Gourgoulianis, C. Hatzoglou, Physiology of pericardial fluid production and drainage, *Frontiers in physiology*, 6 (2015) 62.
- [52] J. Hülsmann, K. Grün, S. El Amouri, M. Barth, K. Hornung, C. Holzfuß, A. Lichtenberg, P. Akhyari, Transplantation material bovine pericardium: biomechanical and immunogenic characteristics after decellularization vs. glutaraldehyde-fixing, *Xenotransplantation*, 19 (2012) 286-297.
- [53] X. Li, Y. Guo, K.R. Ziegler, L.S. Model, S.D. Eghbalieh, R.A. Brenes, S.T. Kim, C. Shu, A. Dardik, Current usage and future directions for the bovine pericardial patch, *Annals of vascular surgery*, 25 (2011) 561-568.
- [54] Anonim, Cleveland Clinic, www.clevelandclinicmeded.com (Erişim tarihi: 24 Haziran 2020).
- [55] J.V. Veetil, K. Ye, Tailored carbon nanotubes for tissue engineering applications, *Biotechnology progress*, 25 (2009) 709-721.
- [56] R.A. MacDonald, B.F. Laurenzi, G. Viswanathan, P.M. Ajayan, J.P. Stegemann, Collagen-carbon nanotube composite materials as scaffolds in tissue engineering, *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, 74 (2005) 489-496.
- [57] M. Abbasian, S.Y. Fathi, A convenient method for preparation of polystyrene-single-walled carbon nanotubes by metal-catalyzed living radical polymerization method, *Journal of Polymer Engineering*, 33 (2013) 463-469.

- [58] M. Guo, D. Li, M. Zhao, Y. Zhang, X. Deng, D. Geng, R. Li, X. Sun, H. Gu, R. Wan, NH²⁺ implantations induced superior hemocompatibility of carbon nanotubes, *Nanoscale research letters*, 8 (2013) 1-6.
- [59] G. Orlando, S. Keshavjee, *Organ Repair and Regeneration: Preserving Organs in the Regenerative Medicine Era*, Academic Press 2021.
- [60] R. Narayan, *Encyclopedia of biomedical engineering*, Elsevier 2018.
- [61] P.M. Crapo, T.W. Gilbert, S.F. Badylak, An overview of tissue and whole organ decellularization processes, *Biomaterials*, 32 (2011) 3233-3243.
- [62] T.W. Gilbert, T.L. Sellaro, S.F. Badylak, Decellularization of tissues and organs, *Biomaterials*, 27 (2006) 3675-3683.
- [63] S. Galla, S. Mathapati, V.M. Nayak, K.M. Cherian, S. Guhathakurta, Analytical study to evaluate the extracellular matrix in processed acellular xenografts, *Indian Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 26 (2010) 132-138.
- [64] M.A. Atieh, O.Y. Bakather, B. Al-Tawbini, A.A. Bukhari, F.A. Abuilaiwi, M.B. Fettouhi, Effect of carboxylic functional group functionalized on carbon nanotubes surface on the removal of lead from water, *Bioinorganic chemistry and applications*, 2010 (2010).
- [65] A.A. Moosa, A.M. Ridha, I.N. Abdullha, Chromium ions removal from wastewater using carbon nanotubes, *International Journal for Innovative Research in Science & Technology*, 4 (2015) 275-282.
- [66] T. Ghassemi, N. Saghatolslami, M.M. Matin, R. Gheshlaghi, A. Moradi, CNT-decellularized cartilage hybrids for tissue engineering applications, *Biomedical Materials*, 12 (2017) 065008.
- [67] J. Liu, H. Jing, Y. Qin, B. Li, Z. Sun, D. Kong, X. Leng, Z. Wang, Nongluteraldehyde fixation for off the shelf decellularized bovine pericardium in anticalcification cardiac valve applications, *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 5 (2019) 1452-1461.
- [68] J. Liu, B. Li, H. Jing, Y. Qin, Y. Wu, D. Kong, X. Leng, Z. Wang, Curcumin-crosslinked acellular bovine pericardium for the application of calcification inhibition heart valves, *Biomedical Materials*, 15 (2020) 045002.
- [69] J. Mudigonda, D. Xu, V. Wang, M. Padala, In vitro and In vivo Assessment of an Electrospun Nanofiber Coated Decellularized Bovine Pericardium as a Regenerative Valve Substitute vs. Glutaraldehyde Fixed Pericardium, *Structural Heart*, 3 (2019) 130-130.

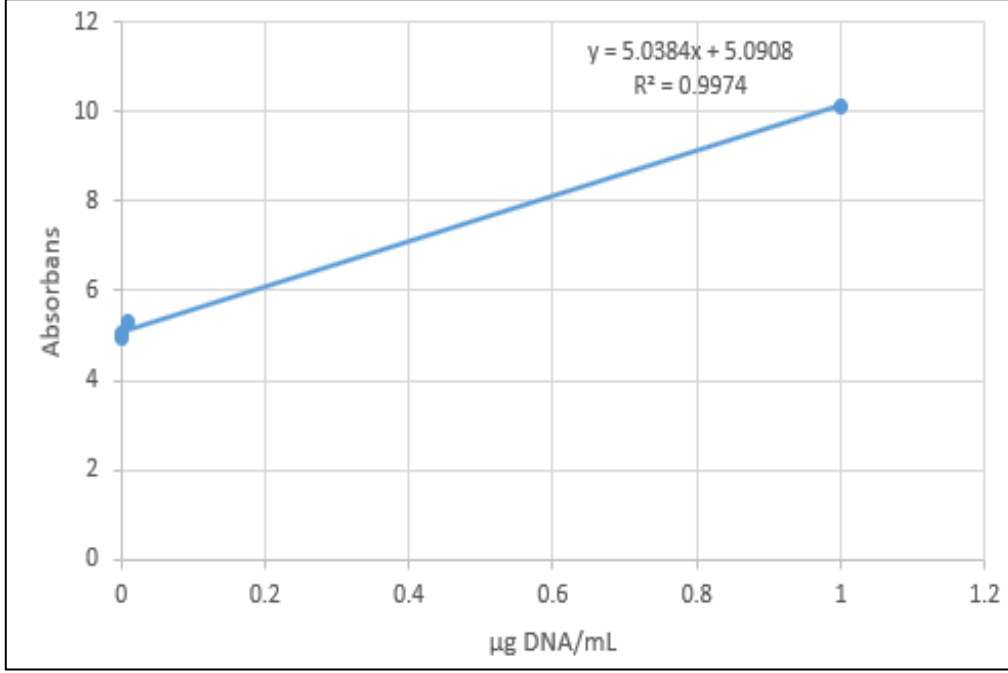
- [70] F.A. Azri, R. Sukor, R. Hajian, N.A. Yusof, F.A. Bakar, J. Selamat, Modification strategy of screen-printed carbon electrode with functionalized multi-walled carbon nanotube and chitosan matrix for biosensor development, *Asian Journal of Chemistry*, 29 (2017) 31.
- [71] S. Goyanes, G. Rubiolo, A. Salazar, A. Jimeno, M. Corcuera, I. Mondragon, Carboxylation treatment of multiwalled carbon nanotubes monitored by infrared and ultraviolet spectroscopies and scanning probe microscopy, *Diamond and related materials*, 16 (2007) 412-417.
- [72] G. Vuković, A. Marinković, M. Obradović, V. Radmilović, M. Čolić, R. Aleksić, P.S. Uskoković, Synthesis, characterization and cytotoxicity of surface amino-functionalized water-dispersible multi-walled carbon nanotubes, *Applied Surface Science*, 255 (2009) 8067-8075.
- [73] B. Massoumi, M. Ramezani, M. Jaymand, M. Ahmadinejad, Multi-walled carbon nanotubes-g-[poly (ethylene glycol)-b-poly (ϵ -caprolactone)]: synthesis, characterization, and properties, *Journal of Polymer Research*, 22 (2015) 1-10.
- [74] E. Badea, T. Usacheva, G. Della Gatta, The use of differential scanning calorimetry to characterise collagen deterioration in parchment, *Российский химический журнал*, 59 (2015) 28-41.
- [75] L. Bozec, M. Odlyha, Thermal denaturation studies of collagen by microthermal analysis and atomic force microscopy, *Biophysical journal*, 101 (2011) 228-236.
- [76] M. Jastrzebska, B. Barwinski, I. Mroz, A. Turek, J. Zalewska-Rejdek, B. Cwalina, Atomic force microscopy investigation of chemically stabilized pericardium tissue, *The European Physical Journal E*, 16 (2005) 381-388.
- [77] V.C. Karagkiozaki, S.D. Logothetidis, S.N. Kassavetis, G.D. Giannoglou, Nanomedicine for the reduction of the thrombogenicity of stent coatings, *International journal of nanomedicine*, 5 (2010) 239.
- [78] B. Arash, Q. Wang, V. Varadan, Mechanical properties of carbon nanotube/polymer composites, *Scientific reports*, 4 (2014) 1-8.
- [79] J.N. Coleman, U. Khan, W.J. Blau, Y.K. Gun'ko, Small but strong: a review of the mechanical properties of carbon nanotube-polymer composites, *Carbon*, 44 (2006) 1624-1652.
- [80] F. Jung, S. Braune, A. Lendlein, Haemocompatibility testing of biomaterials using human platelets, *Clinical hemorheology and microcirculation*, 53 (2013) 97-115.

- [81] S. Henkelman, G. Rakhorst, J. Blanton, W. van Oeveren, Standardization of incubation conditions for hemolysis testing of biomaterials, *Materials Science and Engineering: C*, 29 (2009) 1650-1654.
- [82] R.M. Sabino, K.C. Papat, Evaluating Whole Blood Clotting in vitro on Biomaterial Surfaces, *Bio-protocol*, 10 (2020) e3505-e3505.
- [83] V.B. Damodaran, V. Leszczak, K.A. Wold, S.M. Lantvit, K.C. Papat, M.M. Reynolds, Antithrombogenic properties of a nitric oxide-releasing dextran derivative: evaluation of platelet activation and whole blood clotting kinetics, *RSC advances*, 3 (2013) 24406-24414.
- [84] D. Motlagh, J. Yang, K.Y. Lui, A.R. Webb, G.A. Ameer, Hemocompatibility evaluation of poly (glycerol-sebacate) in vitro for vascular tissue engineering, *Biomaterials*, 27 (2006) 4315-4324.
- [85] G. Jia, H. Wang, L. Yan, X. Wang, R. Pei, T. Yan, Y. Zhao, X. Guo, Cytotoxicity of carbon nanomaterials: single-wall nanotube, multi-wall nanotube, and fullerene, *Environmental science & technology*, 39 (2005) 1378-1383.
- [86] C.P. Firme III, P.R. Bandaru, Toxicity issues in the application of carbon nanotubes to biological systems, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 6 (2010) 245-256.
- [87] E.L. Hopley, S. Salmasi, D.M. Kalaskar, A.M. Seifalian, Carbon nanotubes leading the way forward in new generation 3D tissue engineering, *Biotechnology advances*, 32 (2014) 1000-1014.
- [88] D. Mohanta, S. Patnaik, S. Sood, N. Das, Carbon nanotubes: Evaluation of toxicity at biointerfaces, *Journal of pharmaceutical analysis*, 9 (2019) 293-300.

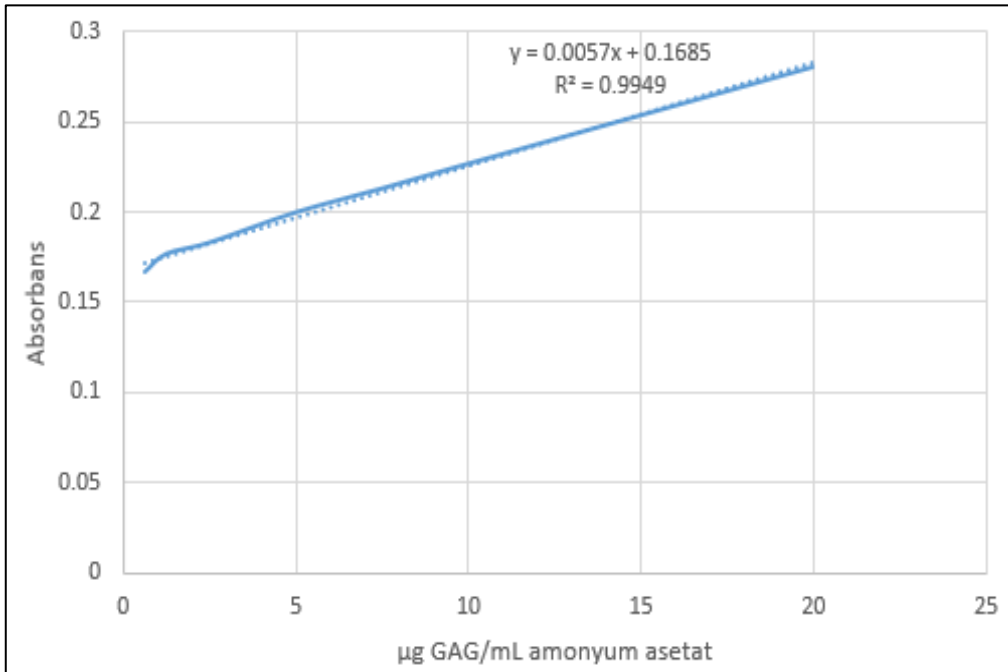
EKLER

EK-1 Kalibrasyon Grafikleri

DNA KALİBRASYON GRAFİĞİ



GAG- KONDROİTİN SÜLFAT KALİBRASYON GRAFİĞİ



KOLAJEN – HİDROKSİPROLİN KALİBRASYON GRAFİĞİ

