

**DESELÜLERİZE MİYOKARD-ELASTOMER
YAMALARIN HAZIRLANMASI VE IN VITRO
PERFORMANSLARININ İNCELENMESİ**

**PREPARATION OF DECELLULARIZED
MYOCARDIUM-ELASTOMER PATCHES AND
INVESTIGATION OF IN VITRO PERFORMANCE**

GÜLÇİN GÜNAL KARATAŞ

PROF. DR. HALİL MURAT AYDIN

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Biyomühendislik Anabilim Dalı için Öngördüğü

DOKTORA TEZİ olarak hazırlanmıştır.

Geçmişimi ve geleceğimi şekillendiren tüm sevdiklerime...

ÖZET

DESELÜLERİZE MİYOKARD-ELASTOMER YAMALARIN HAZIRLANMASI VE IN VITRO PERFORMANSLARININ İNCELENMESİ

GÜLÇİN GÜNAL KARATAŞ

Doktora, Biyomühendislik Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Halil Murat AYDIN

Aralık 2021, 177 sayfa

Kalp yetmezliği, miyokard enfarktüsü gibi çoğu kardiyovasküler hastalığın son aşamasıdır. Kemik ve deri gibi diğer dokuların aksine, kalp dokusu kendisini yenileme ve onarma yeteneğinden yoksundur. Bu da enfarktüs geçirmiş hastaların kalp kaslarında geri dönüşü olmayan hücre ölümlerine neden olmaktadır. Son yıllarda kardiyak doku mühendisliği, miyokard doku yamalarının oluşturulmasında umut verici bir terapötik tedavi yöntemi sunar. Miyokard doku mühendisliği kapsamında bu tür durumların rejeneratif çözümüne yönelik kök hücreler ve hücre tabakası teknolojileri, deselülerize edilmiş ve sentetik olarak hazırlanmış kardiyak yamalar yaygın olarak çalışılmaktadır. Kardiyak doku yamalarının hücrelendirilmesi (reselülerizasyonu) ve yenilenmesini sağlamak için mekanik dayanımı yüksek ve immünolojik etkisi bulunmayan doku iskelelerin oluşturulması bu tedavi yöntemi için oldukça önemli bir basamaktır.

Deselüerizasyon yöntemi ile hazırlanan doku iskelelerinin immünojenik tepkiyi azaltması nedeniyle, bu yöntemle hazırlanan yamaların nakli ve implantasyonu oldukça umut vericidir. Bu tez çalışması kapsamında kalp kası rejenerasyonu için hibrit ve kompozit yapıda kardiyak yamalar hazırlanmış, karakterize edilmiş ve kardiyomiyositler ile statik ve dinamik hücre kültür performansları incelenmiştir.

Çalışmanın ilk aşamasında sığır kalp dokularından disekte edilen miyokardiyal kesitler kimyasal yöntem ve süperkritik CO₂ akışkan yöntemi ile iki farklı şekilde deselüerize edilmiştir. Yapılan deselüerizasyon çalışmaları histoloji boyamaları, biyokimyasal analizler, yapısal analizler, kimyasal analizler, termal analizler ve makro ve nano mekanik analizler ile karakterize edilmiştir. Kimyasal yöntemle deselüerizasyonu ile elde edilen miyokard doku iskeleleri süperkritik CO₂ akışkan yöntemi ile elde edilen doku iskeleleriyle kıyaslanmış ve süperkritik CO₂ akışkan yönteminin deselüerizasyon etkisinde üstünlüğü ortaya konulmuştur. Tez çalışmasının ikinci aşamasında deselüerize doku iskeleleri poli(gliserol-sebakat) (PGS) polimeri ile katkılanarak hibrit formdaki kardiyak yamalar elde edilmiştir. Elde edilen hibrit kardiyak yamalar kimyasal, termal, morfolojik, mikroskobik ve mekanik olarak analiz edilmiştir. PGS polimerinin deselüerize dokular içerisinde çapraz bağlanabildiği kimyasal, termal ve mikroskobik olarak kanıtlanmıştır. Ayrıca, deselüerizasyon ve liyofilizasyon sonrasında doğal miyokard dokusunun zayıflayan mekanik özellikleri, hibrit formların eldesi ile iyileştirilmiştir. Bir sonraki aşamada deselüerize doku iskeleleri poli(gliserol-sebakat) (PGS) polimeri ve karbon nanotüp geometrileriyle katkılanarak kompozit formdaki kardiyak yamalar elde edilmiştir. Elde edilen kompozit kardiyak yamaların kimyasal ve mekanik analizleri yapılmış, mikroskop ve tomografi görüntüleri alınmış ve iletkenlik ölçümleri gerçekleştirilmiştir. PGS polimerinin karbon nanotüp katkısıyla beraber deselüerize dokular içerisinde çapraz bağlanabildiği kimyasal ve mikroskobik olarak gösterilmiştir. Tomografi analizleri ile karbon nanotüplerin yapı içerisinde homojen bir şekilde dağıldığı gösterilmiştir. Mekanik özelliklerin iyileştirilmesine ek olarak kompozit kardiyak yamaların hibrit kardiyak yamalara kıyasla iletken özellikte olduğu bildirilmiştir.

Son olarak elde edilen tüm kardiyak yamalar insan kardiyomiyosit hücreleri ile tekrar hücrelendirilmiş; statik ve dinamik olarak *in vitro* kültürleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen kardiyak yamaların sitotoksosite analizleri yapılmış, kardiyomiyosit hücrelerinin kardiyak yamalarla etkileşimi sonrasında hücre metabolik aktiviteleri, hücre canlılıkları, hücre davranışları, GAG sekresyonları ve gen ekspresyonları incelenmiştir. Statik olarak incelenen kültür sonuçları, mekanik stimülasyona maruz bırakılan iskelelerin kültür sonuçları ile kıyaslanmıştır. Dinamik kültür koşullarının, statik koşullara göre hücre davranışları üzerindeki olumlu etkileri bildirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Deselülerizasyon, miyokard, biyoreaktör, biyobozunur Elastomer, kardiyak yama.

ABSTRACT

PREPARATION OF DECELLULARIZED MYOCARDIUM- ELASTOMER PATCHES AND INVESTIGATION OF IN VITRO PERFORMANCE

GÜLÇİN GÜNAL KARATAŞ

Doctor of Philosophy, Bioengineering Division

Supervisor: Prof. Dr. Halil Murat AYDIN

December 2021, 177 sayfa

Heart failure is the final stage of most cardiovascular diseases, such as myocardial infarction. Unlike other tissues such as bone and skin, heart tissue does not have the ability to regenerate and repair itself. This causes irreversible cell death in the heart muscles of infarcted patients. In recent years, cardiac tissue engineering offers a promising therapeutic treatment for regeneration of myocardial tissue patches. Within the scope of myocardial tissue engineering, stem cells, cell sheet technologies, decellularized and synthetic cardiac patches are widely investigated. The synthesis of scaffolds within high mechanical strength and have no immune effects is critical for this treatment method to provide recellularization and regeneration of cardiac tissue patches.

Within the scope of this thesis studies, hybrid and composite cardiac patches were prepared and characterized for cardiac muscle regeneration and static and dynamic cell culture performances with human cardiomyocytes were examined.

In the first stage of the study, myocardial sections dissected from bovine heart tissues were decellularized in two different methods by chemically and supercritical CO₂ fluid system. Decellularization process was characterized via histological stainings, biochemical analysis, structural analysis, chemical analysis, thermal analysis and macro and nano mechanical analysis. Myocardial tissue scaffolds obtained by chemical decellularization were compared with the tissue scaffolds obtained by the supercritical CO₂ fluid method, and the advantage of the supercritical CO₂ fluid method in the decellularization effect was demonstrated. In the second stage of the thesis, decellularized tissue scaffolds were reinforced with poly(glycerol-sebacate) (PGS) polymer to obtain cardiac patches in hybrid form. The hybrid cardiac patches were analyzed chemically, thermally, morphologically, microscopically and mechanically. It has been proven that the PGS polymer can be crosslinked within decellularized tissues by chemically, thermally and microscopically. In addition, the weakened mechanical properties of native myocardial tissue after decellularization and lyophilization were improved by hybrid forms. In the next step, cardiac patches in composite form were synthesized by doping with poly(glycerol-sebacate) (PGS) polymer and carbon nanotube geometries in to decellularized scaffolds. Composite cardiac patches were characterized by chemically and mechanically and microscope and tomography images were taken, and conductivity measurements were performed. It has been demonstrated by chemically and microscopically that PGS polymer can be crosslinked within decellularized tissues with the addition of carbon nanotubes. Through tomography analysis, it has been shown that carbon nanotubes are homogeneously dispersed within the structure. In addition to improved mechanical properties, composite cardiac patches have been reported to be conductive compared to hybrid cardiac patches.

Finally, all cardiac patches were recellularized with human cardiomyocyte cells; static and dynamic *in vitro* cultures studies were performed. Cytotoxicity analyzes of the obtained cardiac patches were performed, and after seeding of cardiomyocyte cells on

cardiac patches, cell metabolic activities, cell viability, cell behavior, GAG secretions and gene expressions were examined. The results of static culture conditions were compared with the dynamic culture which scaffolds exposed to mechanical stimulation. The positive effects of dynamic culture conditions on cell behavior compared to static conditions have been reported.

Keywords: Decellularization, Myocardium, Bioreactor, Biodegradable-elastomer, Cardiac Patches.

TEŞEKKÜR

Gerçekleştirdiğim tez çalışması ve diğer tüm çalışmalarım sürecince desteğini üzerimden eksik etmeyen, engin bilgi ve tecrübeleriyle yolumu aydınlatıp bana örnek olan, akademik danışmanlığının ötesinde her şeyden önce bana abilik yapan, vicdan ve sevgi dolu değerli hocam Prof. Dr. Halil Murat Aydın'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

TÜBİTAK Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı'na, 2211-C Öncelikli Alanlara Yönelik Doktora Burs Programı kapsamında çalışmalarına verdiği destek için teşekkürlerimi sunarım. Aynı zamanda gerçekleştirilen tez çalışması TÜBİTAK-1001-Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Projelerini Destekleme Programı (Proje No:118M356) ve Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (Proje No: FHD-2018-17007) tarafından desteklenmiş ve sağlanan bu desteklere istinaden teşekkürlerimi sunarım. Çalışmanın gerçekleştirilmesinde ayrıca desteklerini sunan Sayın Levent Mete Özgürbüz başta olmak üzere BMT Grup ailesine teşekkürlerimi borç bilirim.

Bu yolda beni manevi olarak destekleyen eşim Onur Karataş'a, biricik annem Fatma Çoban'a ve biricik abim Kazım Tuncay Tekle'ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Doktora sürecimin son senesinde hayatıma doğan, beni motive eden, kötü günlerimi aydınlatan, varlığıyla neşe saçan canım oğlum Mete Ateş Karataş'ın varlığına binlerce kez teşekkürlerimi sunarım.

İyi günde kötü günde yanımda duran biricik dostlarım, Altay Koyaş, Sevim Eda Öğüt, Burcu Sarıkaya'ya ayrı ayrı teşekkür ve sevgilerimi sunarım. Aynı zamanda, bu süreçte kendileriyle çalışmaktan çok zevk aldığım, güzel günler geçirdiğim ve çalışmalarına ayrı ayrı katkı sağlayan tüm laboratuvar arkadaşlarım Gizem Zihna'ya, Ahsen Seyrek'e, Bengisu Topuz'a, Selcan Güler'a, Atakan Tevlek'e, Pelin Deniz'e, Safa Kararmaz'a, Pezhman Hosseinian'a ve Zeynep Çağlar'a teşekkür ederim. Kardeş laboratuvar ekibimizden Meltem Okan Aydın'a, Gülgün Aylaz'a ve Melih Yıldırım'a ayrıca teşekkürlerimi borç bilirim.

Son olarak koşulsuz şekilde yardımlarını sunan, üzerimden elleri çekmeyen değerli hocalarım, Prof. Dr. İbrahim Vargel'e, Doç. Dr. Sedat Odabaş'a, Doç. Dr. Çağatay Karaaslan'a, Dr. Öğr. Üyesi Soner Çakmak'a ve Doç. Dr. Dinçer Gökçen'e teşekkürlerimi ayrıca borç bilirim.

Hepiniz ayrı ayrı iyi ki vardınız, iyi ki varsınız...

Gülçin Günal Karataş

Aralık 2021, Ankara

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xxi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xxiii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Kalbin Yapısı ve Özellikleri.....	4
2.2. Kardiyovasküler Hastalıklar.....	5
2.2.1. Dilate Kardiyomiyopati	6
2.2.2. Hipertrofik Kardiyomiyopati	7
2.2.3. Restriktif Kardiyomiyopati	8
2.2.4. Aritmojenik Sağ Ventriküler Kardiyomiyopati	9
2.3. Miyokard Doku Mühendisliği	10
2.4. Miyokard Doku Rejenerasyonu Stratejileri.....	11
2.4.1. Hücre Terapisi.....	11
2.4.2. Ventriküler Kısıtlama.....	12
2.4.3. Doku Mühendisliği Yaklaşımları.....	13
2.4.3.1. Hücre Tabakası Uygulamaları	13
2.4.3.2. Enjekte Edilebilir Jeller.....	15
2.4.3.3. Doku İskelesi Olarak Biyomateryaller.....	19
2.4.3.4. Üretim Teknikleri.....	19
2.4.3.5. Doku İskelesi Olarak Kullanılan Biyomalzemeler	20
2.5. Deselülerizasyon Strateji ve Yöntemleri	26

2.6. Kalp Fonksiyonunu ve Elektriksel Bütünlüğü Sağlama	28
2.6.1. Altın Bazlı Materyaller	29
2.6.2. İletken Polimer Bazlı Materyaller	30
2.6.3. Karbon Bazlı Materyaller	30
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR	32
3.1. Deselülerize Miyokard Yamaların Hazırlanması	32
3.1.1. Materyal	32
3.1.2. Diseksiyon	32
3.1.3. Kimyasal Deselülerizasyon Protokolünün Optimizasyonu	32
3.1.4. Süperkritik CO ₂ Yöntemle Deselülerizasyon Protokolünün Optimizasyonu 34	
3.1.5. Deselülerize Doku İskelelerinin Karakterizasyonu	36
3.1.5.1. Morfolojik Analiz	36
3.1.5.2. Histolojik Analiz	36
3.1.5.2.1. Hematoksilen ve Eozin Boyama	36
3.1.5.2.2. DAPI (4',6-Diamidino-2-Fenilindol) Boyama	37
3.1.5.2.3. Verhoeff-Van Gieson Boyama	37
3.1.5.2.4. Masson's Trichrome Boyama	38
3.1.5.3. Biyokimyasal Analizler	38
3.1.5.3.1. Genomik DNA Miktarının Tayini	39
3.1.5.3.2. Kolajen Miktarının Tayini	39
3.1.5.3.3. Sülfatlanmış Glikozaminoglikan (sGAG) Miktarının Tayini	40
3.1.5.4. Yaş ve Kuru Ağırlık Değişimleri ve Doku Kalınlık Analizleri	40
3.2. Hibrit ve Kompozit Kardiyak Yamaların Hazırlanması	41
3.2.1. Materyal	41
3.2.2. PGS kardiyak Yamaların Sentezi	41
3.2.3. Hibrit Kardiyak Yamaların Hazırlanması	41
3.2.4. Kompozit Kardiyak Yamaların Sentezi	42
3.3. Tüm Kardiyak Yamaların Karakterizasyonları	44
3.3.1. Kimyasal Analizler	44
3.3.2. Hidrojen Nükleer Manyetik Rezonans (¹ H-NMR) Spektroskopisi	44
3.3.3. Fourier Transform Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR)	44

3.3.4.	Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC).....	45
3.3.5.	Yapısal Analizler.....	45
3.3.5.1.	Morfolojik Analiz	45
3.3.5.2.	Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi	45
3.3.5.3.	Bilgisayarlı Mikro Tomografi (μ -CT) Analizi	45
3.3.6.	Mekanik Değerlendirme	46
3.3.7.	Degradasyon Çalışmaları	46
3.3.8.	Nano-Mekanik Davranışların İncelenmesi.....	47
3.3.9.	İletkenlik Analizleri	47
3.4.	Hücre Kültürü Çalışmaları.....	48
3.4.1.	Materyaller	48
3.4.2.	Sterilizasyon.....	48
3.4.3.	Hücrelerin Kültürü ve Pasajlanması.....	49
3.4.4.	Statik Hücre Kültürü Çalışmaları	49
3.4.5.	Dinamik Hücre Kültürü Çalışmaları	50
3.4.6.	Statik ve Dinamik Hücre Kültürü Karakterizasyonları	51
3.4.6.1.	Sitotoksosite analizi	51
3.4.6.2.	Hücre Metabolik Aktivitesinin Değerlendirilmesi	52
3.4.6.3.	Hücre Canlılığının Değerlendirilmesi	52
3.4.6.4.	Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi.....	52
3.4.6.5.	Glikozaminoglikan (GAG) Miktarlarının Belirlenmesi	53
3.4.6.6.	Gen Ekspresyonu Analizleri	53
3.4.6.6.1.	RNA İzolasyonu	54
3.4.6.6.2.	Komplementer DNA (cDNA) Sentezi	54
3.4.6.6.3.	Gerçek Zamanlı PCR (RT-PCR).....	55
3.5.	Statik Ortamda İletkenlik Çalışmaları	56
3.6.	İstatiksel Çalışmalar	58
4.	SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	59
4.1.	Deselülerize Miyokard Yamaların Hazırlanması	59
4.1.1.	Kimyasal Yöntemle Deselülerize Edilmiş Miyokard Yamaların Optimizasyon ve Karakterizasyonları	59
4.1.1.1.	30 mm x 10 mm Miyokard Doku Gruplarının Optimizasyonları	59

4.1.1.2. 10 mm x 10 mm Miyokard Doku Gruplarının Optimizasyonları.....	66
4.1.2. Süperkritik CO ₂ Yöntemle Deselüerize Edilmiş Kardiyak Yamaların Optimizasyon ve Karakterizasyonları	71
4.1.3. Belirlenmiş Deselüerize Miyokard Yamaların Karşılaştırmalı Diğer Karakterizasyonları.....	80
4.1.4. Deselüerize Kardiyak Yamaların Değerlendirmesi.....	84
4.2. PGS Kardiyak Yamaların Karakterizasyonları	86
4.2.1. Fouirer Transform Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) Analizi.....	87
4.2.2. Hidrojen Nükleer Manyetik Rezonans (¹ H-NMR) Spektroskopisi	88
4.2.3. Mekanik Çekme Analizi	89
4.3. Hibrit Kardiyak Yamaların Karakterizasyonları.....	90
4.3.1. Fouirer Transform Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) Analizi	91
4.3.2. Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC)	93
4.3.3. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi	94
4.3.4. Mekanik Çekme Analizi	95
4.4. Kompozit Kardiyak Yamaların Karakterizasyonları.....	98
4.4.1. İletkenlik Ölçümleri.....	99
4.4.2. Fouirer Transform Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) Analizi	102
4.4.3. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi	104
4.4.4. Bilgisayarlı Mikro-Tomografi Analizi (Mikro-CT).....	106
4.4.5. Mekanik Çekme Analizi	109
4.5. Kardiyak Yamaların Nano-Mekanik Davranışları	110
4.6. Degradasyon Analizi	113
4.7. Hibrit ve Kompozit Kardiyak Yamaların Değerlendirmesi.....	116
4.8. Hücre Kültürü Çalışmaları	119
4.8.1. Statik Hücre Kültürü Çalışmaları	119
4.8.1.1. Sitotoksisite Analizi.....	119
4.8.1.2. İnsan Kardiyomiyosit Hücrelerinin Karakterizasyonu	122
4.8.1.3. Hücre Metabolik Aktivitesinin Değerlendirilmesi	123
4.8.1.4. Hücre Canlılığının Değerlendirilmesi	125
4.8.1.5. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi.....	125
4.8.1.6. Sülfatlanmış Glikozaminoglikan (sGAG) Miktar Tayini.....	126
4.8.1.7. Mekanik Çekme Analizleri.....	128

4.8.2. Dinamik Hücre Kültürü Çalışmaları	130
4.8.2.1. Biyoreaktör Çalışmalarının Optimizasyonu	130
4.8.2.2. Hücre Metabolik Aktivitesinin Değerlendirilmesi.....	135
4.8.2.3. Hücre Canlılığının Değerlendirilmesi.....	137
4.8.2.4. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi	138
4.8.2.5. Sülfatlanmış Glikozaminoglikan (sGAG) Miktar Tayini	139
4.8.2.6. Gerçek Zamanlı PCR (RT-PCR) Analizleri	140
4.8.3. İletkenlik Analizleri	142
4.8.4. Kültür Çalışmalarının Değerlendirmesi.....	148
5. YORUM	150
6. KAYNAKLAR.....	152
EKLER	169
EK 1 – Biyokimyasal Analizlerde Kullanılan Standart Grafikleri ve Kalibrasyon Eğrileri.....	169
EK 2 - Tezden Türetilmiş Yayınlar	171
EK 3 - Tezden Türetilmiş Bildiriler	172
EK 4 - Tez Çalışması Orjinallik Raporu	173
ÖZGEÇMİŞ	174

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Kalp duvarını oluşturan tabakaların gösterimi [15].	5
Şekil 2.2. Dilate kardiyomiyopati durumunda kalp yapısı [25].	7
Şekil 2.3. Hipertrofik kardiyomiyopati durumunda kalp yapısı [25]	8
Şekil 2.4. Restriktif kardiyomiyopati durumunda kalp yapısı [25].	9
Şekil 2.5. Aritmojenik sağ ventriküler kardiyomiyopatisi ile ilişkili kalp yapısı [25].	9
Şekil 2.6. Kalpteki klasik hücre terapisi teknikleri [21].	11
Şekil 2.7. Deneysel protokolün şeması. A. Epikardiyal miyokardın ablasyonu, B. Greft hücre tabakası üzerine nakledilmesi, C. Transplantasyondan sonra, aorta kanüle edilip ve numunenin mikroskop üzerine monte edilmiş termo kontrollü bir alana yerleştirilmesi, D. Numunenin nekrotik bölgeye transplantasyonu [39].	14
Şekil 2.8. Tüm sıçan kalbinin perfüzyon deselülerizasyonu görüntüleri [95].	22
Şekil 2.9. PGS temelli kardiyak yamaların doku mühendisliği yaklaşımları [102].	24
Şekil 2.10. Doku iskelesi hazırlama yöntemi, A. Reaktif Akriyatlı-PGS makromerinin kimyasal yapısı, B. Elektro-eğirme işleminin gösterimi, C. Akriyatlı-PGS makromeri, jelatin ve fotobaşlatıcıdan oluşan bir çözelti lifli bir mat oluşturmak için elektro-eğrilir ve iskele çapraz bağlı lifli doku iskeleleri oluşturmak için ultraviyole ışığa maruz bırakılır [112].	25
Şekil 2.11. Fiziksel, kimyasal ve biyolojik deselülerizasyon yöntemleri ve bunların kombinasyonlarını gösteren diyagram [120].	28
Şekil 2.12. Poliüretan bazlı ve nanotüp ve nanotel dolgulu doku iskelelerine hücre ekimini ve uygulanan elektriksel stimülasyonu gösteren özet gösterim [130].	29
Şekil 2.13. Karbon nanotüplerin çeşitli alanlardaki uygulamaları [135].	31
Şekil 3.1. Süperkritik CO ₂ reaktör sistemin genel çalışma prensibi [141].	35
Şekil 3.2. Biyoreaktör sisteminin genel görünümü.	50
Şekil 3.3. Elektriksel ölçümler için kurulmuş düzeneğin görüntüsü.	57
Şekil 3.4. Uygulananan voltaj için prob-malzeme etkileşim sistemi.	58
Şekil 4.1. İşlem görmemiş miyokard dokusu (kontrol) ve deselülerizasyon sonrası grupların (30 mm uzunluk) Hematoksilen&Eozin boyaması (10X). A (%0,5 (a/h) SDS uygulaması, 3 gün), B (%1 SDS (a/h) uygulaması, 3 gün), C (%0,5 SDS (a/h)	

uygulaması, 5 gün), D (%1 (a/h) SDS uygulaması, 5 gün) ve E (%0,5 (a/h) SDS uygulaması, 7 gün).....	60
Şekil 4.2. İşlem görmemiş miyokard dokusu (kontrol) ve deselülerizasyon sonrası grupların (30 mm uzunluk) DAPI boyaması (10X). (A (%0,5 (a/h) SDS uygulaması, 3 gün), B (%1 SDS (a/h) uygulaması, 3 gün), C (%0,5 SDS (a/h) uygulaması, 5 gün), D (%1 (a/h) SDS uygulaması, 5 gün) ve E (%0,5 (a/h) SDS uygulaması, 7 gün). .	61
Şekil 4.3. Kimyasal deselülerizasyon optimizasyonuna ait (30 mm uzunluktaki doku grupları) deselülerize matrislerdeki artık DNA miktarını nanogram cinsinden gösteren histogram grafiği.....	62
Şekil 4.4. Kimyasal deselülerizasyon optimizasyonuna ait (30 mm uzunluktaki doku grupları) deselülerize matrislerdeki sGAG miktarını mikrogram cinsinden gösteren histogram grafiği.	63
Şekil 4.5. (A) İşlem görmemiş miyokard dokunun, (B) %1 SDS (h/h) ile ve 3 gün süreyle deselülerize olan matrisin kolajen boyaması (10X).	64
Şekil 4.6. (A) İşlem görmemiş miyokard dokunun, (B) %1 SDS (h/h) ile ve 3 gün süreyle deselülerize olan matrisin elastin boyaması (10X).....	64
Şekil 4.7. İşlem görmemiş miyokard dokusu ve deselülerize matristeki kolajen miktarını mikrogram cinsinden gösteren histogram grafiği (n=3) (p****).	65
Şekil 4.8. (A) İşlem görmemiş miyokard, %1 (a/h) SDS muamelesi sonrası (B) 24. Saat, (C) 48. Saat, (D) 72. Saat sonlarında dokularının morfolojik görüntüleri.....	66
Şekil 4.9. İşlem görmemiş miyokard dokusu (kontrol) ve deselülerizasyon sonrası grupların (10 mm uzunluktaki) Hematoksilen&Eozin boyaması (10X). (G (%1 SDS (a/h) uygulaması, 36 saat), H (%1 SDS (a/h) uygulaması, 48 saat) ve K (%1 SDS (a/h) uygulaması, 60 saat).	67
Şekil 4.10. İşlem görmemiş miyokard dokusu (kontrol) ve deselülerizasyon sonrası grupların (10 mm uzunluktaki) DAPI boyaması (10X). (G (%1 SDS (a/h) uygulaması, 36 saat), H (%1 SDS (a/h) uygulaması, 48 saat) ve K (%1 SDS (a/h) uygulaması, 60 saat).....	68
Şekil 4.11. Kimyasal deselülerizasyon optimizasyonuna ait (10 mm uzunluktaki doku grupları) deselülerize matrislerdeki DNA miktarını nanogram cinsinden gösteren histogram grafiği.	69

Şekil 4.12. Kimyasal deselülerizasyon optimizasyonuna ait (10 mm uzunluktaki doku grupları) deselülerize matrislerdeki GAG miktarını mikrogram cinsinden gösteren histogram grafiği.....	70
Şekil 4.13. İşlem görmemiş miyokard ve %1 (a/h) SDS muamelesiyle 36, 48 ve 60 saat sonrası dokularının morfolojik görüntüleri.....	70
Şekil 4.14. Süperkritik CO ₂ deselülerizasyon optimizasyonuna ait (30 mm uzunluktaki grupları) deselülerize matrislerdeki DNA miktarını nanogram cinsinden gösteren histogram grafiği.....	71
Şekil 4.15. İşlem görmemiş miyokard dokusu (kontrol) ve sabit basınç altında skCO ₂ deselülerizasyonu sonrası grupların (10 mm uzunluktaki doku grupları) DAPI boyaması (10X, SA:1 saat; SB: 3 saat; SC: 6saat).	73
Şekil 4.16. Sabit basınç altında skCO ₂ deselülerizasyonu sonrası grupların (10 mm uzunluktaki doku grupları) deselülerize matrislerdeki DNA miktarını nanogram cinsinden gösteren histogram grafiği.....	73
Şekil 4.17. İşlem görmemiş miyokard dokusu (kontrol) ve artan basınç değerleriyle skCO ₂ deselülerizasyonu sonrası grupların (10 mm uzunluktaki doku grupları) Hematoksilin&Eozin boyaması (10X, SA:2500 psi; SD: 3500 psi; SC: 4500 psi).	75
Şekil 4.18. İşlem görmemiş miyokard dokusu (kontrol) ve artan basınç değerleriyle skCO ₂ deselülerizasyonu sonrası grupların (10 mm uzunluktaki doku grupları) DAPI boyaması (10X, SA:2500 psi; SD: 3500 psi; SC: 4500 psi).....	76
Şekil 4.19. İşlem görmemiş miyokard dokusu (kontrol) ve ön muamele sonrası DAPI boyaması (10X).....	77
Şekil 4.20. Artan basınç değerlerinde skCO ₂ deselülerizasyonu sonrası grupların deselülerize matrislerdeki DNA miktarını nanogram cinsinden gösteren histogram grafiği (ÖM: Ön muamele sonrası, SA:2500 psi; SD: 3500 psi; SC: 4500 psi).	78
Şekil 4.21. Artan basınç değerlerinde skCO ₂ deselülerizasyonu sonrası grupların deselülerizematislerdeki GAG miktarını mikrogram cinsinden gösteren histogram grafiği (SA:2500 psi; SD: 3500 psi; SC: 4500 psi).	79
Şekil 4.22. İşlem görmemiş miyokard, ön muamele sonrası ve 2500 psi, 3500 psi, 4500 psi basınç muamelesi sonrası dokularının morfolojik görüntüleri.....	79
Şekil 4.23. SDS muamelesi ve scCO ₂ muamelesi sonrasında doku kesitlerinin kolajen ve elastin boyamaları (10X).....	81

Şekil 4.24. Deselüerizasyon sonrası doku kuru ağırlıklarının değişimi: (A) Kontrol grubu, (H) %1 SDS, 48 saat, (SE) 4500 psi, 1 saat.....	82
Şekil 4.25. Deselüerizasyon sonrası doku kalınlıklarının değişimi: (A) Kontrol grubu, (H) %1 SDS, 48 saat, (SE) 4500 psi, 1 saat.	82
Şekil 4.26. İşlem görmemiş miyokard dokusu ve deselüerize matrislerdeki kolajen miktarını mikrogram cinsinden gösteren histogram grafiği (H: %1 SDS, 48 saat; SE: 4500 psi, 1 saat).....	83
Şekil 4.27. Doğal miyokard dokusu (A), %1 SDS, 48 saat deselüerizasyon grupları (B), 4500 psi, 1 saat skCO ₂ deselüerize gruplarına (C) ait yüzey kesitleri ile doğal miyokard dokusu (D), %1 SDS, 48 saat deselüerizasyon grupları (E), 4500 psi, 1 saat skCO ₂ deselüerize gruplarına (F) ait enine kesitlerini gösteren taramalı elektron mikroskopu (SEM) görüntüleri (500 µm).	84
Şekil 4.28. (A) 8 saat, (B) 10 saat (C) 12 saat çapraz bağlanmış PGS polimerine ait görüntüleri.	86
Şekil 4.29. Poli(gliserol-sebakat) elastomerinin reaksiyon şematığı [153].	87
Şekil 4.30. (A) 8 saat, (B) 10 saat (C) 12 saat çapraz bağlanmış PGS polimerinin FTIR spektrumları.....	88
Şekil 4.31. (A) 8 saat, (B) 10 saat, (C) 12 saat süreyle çapraz bağlanmış PGS elastomerlerine ait ¹ H-NMR spektrumu.....	89
Şekil 4.32. 8, 10 ve 12 saat süreyle çapraz bağlanmış PGS elastomerinin çapraz bağ yoğunluklarını gösteren grafik.	90
Şekil 4.33. S-Hibrit (A) ve SK-Hibrit (B) gruplarına ait hibrit yamaların morfolojik görüntüleri.	91
Şekil 4.34. (A) Kimyasal deselüerize miyokard yamanın, (B) Bu yöntemle elde edilmiş hibrit yamanın (S-Hibrit) FTIR spektrumları.....	92
Şekil 4.35. (A) Süperkritik CO ₂ deselüerize miyokard yamanın, (B) Bu yöntemle elde edilmiş hibrit yamanın (SK-Hibrit) FTIR spektrumları.	93
Şekil 4.36. (A) Deselüerize matris, (B) PGS elastomeri, (C) Hibrit kardiyak yamanın termal özelliklerini gösteren DSC diyagramı.....	94
Şekil 4.37. S-Hibrit grubuna ait farklı büyütme oranlarındaki (A) 100X (B) 250X enine kesitleri;SK-Hibrit grubuna ait farklı büyütme oranlarındaki (C) 100X (D) 250X enine kesitlerini gösterentaramalı elektron mikroskopu (SEM) görüntüleri.	95
Şekil 4.38. Tüm grupların çekme testi esnasında elde edilen görüntüleri.	96

Şekil 4.39. %1, %2 ve %3 karbon nanofiber konsantrasyonu ile çapraz bağlanmış kompozitlerin direnç değerlerini Ohm.m cinsinden gösteren çizgi grafiği.	99
Şekil 4.40. %1, %2 ve %3 karbon nanofiber konsantrasyonu ile çapraz bağlanmış kompozitlerin iletkenlik değerlerini S/m cinsinden gösteren çizgi grafiği.....	100
Şekil 4.41. %1, %2 ve %3 karbon nanotüp konsantrasyonu ile çapraz bağlanmış kompozitlerin direnç değerlerini Ohm.m cinsinden gösteren çizgi grafiği.....	100
Şekil 4.42. %1, %2 ve %3 karbon nanotüp konsantrasyonu ile çapraz bağlanmış kompozitlerin iletkenlik değerlerini S/m cinsinden gösteren çizgi grafiği.	101
Şekil 4.43. (A) %1 KNT konsantrasyonu, (B) %2 KNT konsantrasyonu, (C) %3 KNT konsantrasyonu ile çapraz bağlanmış polimerlerin FTIR spektrumları.	103
Şekil 4.44. (A) S-Kompozit, (B) SK-Kompozit kardiyak yamalarına ait FTIR spektrumları.	104
Şekil 4.45. (A) S-Kompozit (B) SK-Kompozit kardiyak yamanın morfolojik görünümü.	105
Şekil 4.46. (A) S-Kompozit, (B) SK-Kompozit grubuna ait 100X büyütme oranındaki yüzey kesitlerini gösteren taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüleri.....	105
Şekil 4.47. (A, B) S-Kompozit grubuna (C, D) SK-Kompozit grubuna ait enine kesitleri sırasıyla 100X ve 500X büyütme oranında gösteren taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüleri.....	106
Şekil 4.48. S-Kompozit kardiyak yama grubuna ait 2 boyutlu (2B) kesit görüntüsü (A) Yüzey kesiti, (B) Renklendirilmiş-yüzey kesiti, (C) Enine kesiti, (D) Renklendirilmiş enine kesiti.	107
Şekil 4.49. SK-Kompozit kardiyak yama grubuna ait 2 boyutlu (2B) kesit görüntüsü. (A) Yüzeykesiti, (B) Renklendirilmiş-yüzey kesiti, (C) Enine kesiti, (D) Renklendirilmiş enine kesiti.	108
Şekil 4.50. (A) S-Kompozit, (B) SK-Kompozit gruplarının çekme testi esnasında elde edilen temsili görüntüleri.	109
Şekil 4.51. Doğal miyokard dokusu, S-Matriks ve SK-Matriks grupları üzerinde alınmış indentasyon eğrileri.....	111
Şekil 4.52. S-Hibrit ve SK-Hibrit gruplarının atomik kuvvet mikroskobu yüzey görüntüleri ve indentasyon eğrileri.	112
Şekil 4.53. S-Kompozit ve SK-Kompozit gruplarının atomik kuvvet mikroskobu yüzey görüntüleri ve indentasyon eğrileri.	112

Şekil 4.54. S-Hibrit, SK-Hibrit, S-Kompozit ve SK-Kompozit gruplarının Hertz Modeline göre kPa cinsinden hesaplanmış elastisite modül değerleri.	113
Şekil 4.55. S-Matriks, S-Hibrit, S-Kompozit ve PGS elastomerinin 1., 7., 14., 21. ve 28. günlerde PBS içerisinde degradasyon profilini gösteren histogram grafiği (n=3).	114
Şekil 4.56. SK-Matriks, SK-Hibrit, SK-Kompozit ve PGS elastomerinin 1., 7., 14., 21. ve 28. günlerde PBS içerisinde degradasyon profilini gösteren histogram grafiği (n=3).	115
Şekil 4.57. S-Hibrit kardiyak yamalarının (A) alkol yıkaması öncesi (B) alkol yıkaması sonrası sitotoksosite analizleri.....	120
Şekil 4.58. %1, %2 ve %3 karbon nanotüp katkılı kompozitlerin (PGS-KNT) sitotoksosite analizleri. (Pozitif Kontrol, %100 canlılık olarak belirlenmiştir.)	121
Şekil 4.59. S-Hibrit, SK-Hibrit, S-Kompozit ve SK-Kompozit kardiyak yama gruplarının sitotoksosite analizleri (ISO 10993). (Pozitif Kontrol %100 canlılık olarak belirlenmiştir.).....	122
Şekil 4.60. İnsan kardiyomiyosit hücrelerinin (A-C) kardiyomiyosit besi ortamında, (D-F) düşük glikozlu besi ortamında mikroskop altındaki morfolojik görüntüleri. (A,D) 1. Gün, (B,E) 4. Gün, (C,F) 7. Gün kültürleri.	123
Şekil 4.61. S-Hibrit, SK-Hibrit, S-Kompozit ve SK-Kompozit kardiyak yamalarının 1., 4., 7., 14. ve 21. günlerde hücre metabolik aktivitelerini gösteren grafik.....	124
Şekil 4.62. S-Hibrit, SK-Hibrit, S-Kompozit ve SK-Kompozit kardiyak yamaların 7, 14 ve 21 gün statik kültür sonrasındaki florasan mikroskobu görüntüleri (10X Büyütme).....	125
Şekil 4.63. S-Hibrit, SK-Hibrit, S-Kompozit ve SK-Kompozit gruplarının 7., 14. ve 21. kültür günü sonrasında taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile elde edilen yüzey görüntüleri (1000X).....	126
Şekil 4.64. S-Hibrit, SK-Hibrit, S-Kompozit ve SK-Kompozit kardiyak yamalarının statik kültür koşullarında 7. ve 14.günlerde GAG miktarının artışını mikrogram cinsinden gösteren grafik.....	128
Şekil 4.65. S-Hibrit kardiyak yamaların %10 mekanik etki uygulanan dinamik kültürü esnasında alınmış görüntüleri.....	131
Şekil 4.66. SK-Hibrit kardiyak yamaların %10 mekanik etki uygulanan dinamik kültürü esnasında alınmış görüntüleri.....	132

Şekil 4.67. S-Kompozit kardiyak yamaların %10 mekanik etki uygulanan dinamik kültürü esnasında alınmış görüntüleri.	132
Şekil 4.68. SK-Kompozit kardiyak yamaların %10 mekanik etki uygulanan dinamik kültürü esnasında alınmış görüntüleri.....	133
Şekil 4.69. SK-Hibrit kardiyak yamaların %5 mekanik etki uygulanan dinamik kültürü esnasında alınmış görüntüleri.	134
Şekil 4.70. SK-Kompozit kardiyak yamaların %5 mekanik etki uygulanan dinamik kültürü esnasında alınmış görüntüleri.....	134
Şekil 4.71. S-Hibrit ve S-Kompozit kardiyak yamalarının dinamik kültürde 1., 4., 7. ve 14.günlerde hücre metabolik aktivitelerini gösteren grafik.	136
Şekil 4.72. S-Hibrit ve S-Kompozit kardiyak yamaların statik ve dinamik kültür karşılaştırmalı 1., 4., 7. ve 14. günlerde hücre metabolik aktivitelerini gösteren grafik.....	137
Şekil 4.73. S-Hibrit ve S-Kompozit kardiyak yamaların 7 ve 14 gün dinamik kültür sonrasındaki florasan mikroskobu görüntüleri (10X Büyütme).	138
Şekil 4.74. S-Hibrit ve S-Kompozit gruplarının 7. ve 14. dinamik kültür günü sonrasında taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile elde edilen yüzey görüntüleri (1000X).139	
Şekil 4.75. S-Hibrit ve S-Kompozit kardiyak yamaların statik ve dinamik kültür karşılaştırmalı 7. ve 14. günlerde GAG miktarının artışını mikrogram cinsinden gösteren grafik.	140
Şekil 4.76. Statik ve dinamik koşullar altında ACTN1 gen ekspresyonunu gösteren grafik.	141
Şekil 4.77. Statik ve dinamik koşullar altında GJAI gen ekspresyonunu gösteren grafik.	142
Şekil 4.78. Örneklerin transwell sistem ile yerleştirilmesini gösteren temsili fotoğraf.	143
Şekil 4.79. S-Hibrit, S-Kompozit ve kontrol grubunun 4. ve 14. günler sonunda elde edilen direnç farklılıklarını ohm cinsinden gösteren grafik.....	144
Şekil 4.80. 0,15 V elektriksel uyarımın besi ortamı, S-Hibrit ve S-Kompozit kardiyak yama gruplarındaki akım cevabını gösteren elektrodyagramlar.....	145
Şekil 4.81. Kontrol grubu, S-Hibrit ve S-Kompozit kardiyak yamaların kültürün 4. gün sonundaki uyarıma verdiği tepkiyi gösteren elektrik stimülasyonu.	146

Şekil 4.82. Kontrol grubu, S-Hibrit ve S-Kompozit kardiyak yamaların kültürün 14. gün sonundaki uyarıma verdiği tepkiyi gösteren elektrik stimülasyonu.....	146
Şekil 4.83. Kültür ortamında S-Hibrit ve S-Kompozit kardiyak yamaların hücre iletkenliği üzerindeki etkisini gösteren tablo.	147

ÇİZELGELER DİZİNİ

Tablo 2.1. Hücre terapisi yönteminde kullanılan hücre kaynakları.....	12
Tablo 3.1. 30 mm x 10 mm miyokard doku gruplarına uygulanan SDS konsantrasyonu ve muamele süresi parametrelerini gösteren adlandırma sistemi.	33
Tablo 3.2. 10 mm x 10 mm miyokard doku gruplarına uygulanan SDS konsantrasyonunun farklı muamele sürelerini gösteren adlandırma sistemi.	34
Tablo 3.3. 10 mm x 10 mm doku kesitlerine uygulanan skCO ₂ muamele parametrelerini gösteren adlandırma sistemi.....	35
Tablo 3.4. Mason's Trichrome Boya Kiti protokolü ve solüsyonların doku kesitleri ile muamelesüresi.	38
Tablo 3.5. Kalınlık optimizasyonu amacıyla kullanılan prepolimer/karbon/THF miktarlarını gösteren tablo.	43
Tablo 3.6. İletkenlik optimizasyonu amacıyla kullanılan prepolimer/karbon/THF miktarlarını gösteren tablo.	43
Tablo 3.7. Dinamik kültür çalışma koşulları.	51
Tablo 3.8. Gerçek Zamanlı PZR için kullanılacak primerlerin dizileri.	56
Tablo 3.9. Gerçek Zamanlı PZR koşulları.	56
Tablo 4.1. Tüm grupların mukavemet değerleri (kPa), uzama davranışları (%) ve elastisite modüllerini (kPa) gösteren tablo (n=4).....	96
Tablo 4.2. Farklı prepolimer miktarlarının kompozit kalınlıklarına etkisi.	99
Tablo 4.3. %1, %2 ve %3 karbon nanofiber ve karbon nanotüp katkısı ile çapraz bağlanmış kompozitlerin direnç (Ohm.m) ve iletkenlik (S/m) değerleri.....	101
Tablo 4.4. Hibrit ve kompozit kardiyak yamaların (%1 KNT Katkılı) direnç ve iletkenlik değerlerini gösteren tablo.....	102
Tablo 4.5. S-Kompozit ve SK-Kompozit gruplarının S-Hibrit ve SK-Hibrit gruplarıyla kıyaslamalı mukavemet değerlerini (kPa), uzama davranışlarını (%) ve elastisite modüllerini (kPa) gösteren tablo (n=4).....	110
Tablo 4.6. S-Hibrit kardiyak yama grubunun 21 gün statik kültür sonrasında mukavemet değerlerini (kPa), uzama davranışlarını (%) ve elastisite modüllerini (kPa) gösteren tablo (n=3).....	128

Tablo 4.7. SK-Hibrit kardiyak yama grubunun 21 gün statik kültür sonrasında mukavemet değerlerini (kPa), uzama davranışlarını (%) ve elastisite modüllerini (kPa) gösteren tablo (n=3).....	129
Tablo 4.8. S-Kompozit kardiyak yama grubunun 21 gün statik kültür sonrasında mukavemet değerlerini (kPa), uzama davranışlarını (%) ve elastisite modüllerini (kPa) gösteren tablo (n=3).....	129
Tablo 4.9. SK-Kompozit kardiyak yama grubunun 21 gün statik kültür sonrasında mukavemet değerlerini (kPa), uzama davranışlarını (%) ve elastisite modüllerini (kPa) gösteren tablo (n=3).....	129
Tablo 4.10. Dinamik kültür çalışma koşullarını gösteren tablo.	130
Tablo 4.11. Besi ortamı ve besi ortamı içerisindeki S-Hibrit ve S-Kompozit kardiyak yama gruplarının direnç (ohm) ve iletkenlik değerlerini gösteren tablo (ohm). ...	145

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

E	Elastik modülüs
F	Kuvvet (N)
n	Molar çapraz bağlanma yoğunluğu (mol/m ³)
R	Gaz sabiti (Nm/mol.K)
ν	Poisson oranı
T	Sıcaklık
T _g	Camsı geçiş sıcaklığı
T _m	Erime sıcaklığı
W	Ağırlık

Kısaltmalar

ACTN1	Aktinin Alfa 1
CDH1	Kaderin 1
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DMMB	Dimetilmetilen Mavisi (Dimethylmethylen Blue)
DNA	Deoksiribonükleik asit
DSC	Diferansiyel Taramalı Kalorimetre
ESM	Ekstraselüler Matriks
FTIR	Fourier Transform Kızılötesi Spektroskopisi
GAPDH	Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase
GJAI	Gap Junction Protein Alfa 1

H&E	Hematoksilen&Eozin
HEXB	Hexosaminidase Subunit Beta
HCl	Hidroklorik asit
¹ H-NMR	Hidrojen Nükleer Manyetik Rezonans
MTT	3-(4,5-dimetiltriazol-2-il)-2,5, difeniltetrazolyum
NaCl	Sodyum klorür
PBS	Fosfat Tamponu (Phosphate Buffer Saline)
PGS	Poli(gliserol-sebakat)
skCO ₂	Süperkritik Karbondioksit
SDS	Sodyum dodesil sülfat (Sodium dodecyl sulphate)
SEM	Taramalı elektron mikroskobu (Scanning Electron Microscope)
SNAI1	Snail Ailesi Transkripsiyonel Reseptör 1
D-PBS	Dulbecco's PBS
KNF	Karbon Nanofiber
KNT	Karbon Nanotüp
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)
TBX5	T-Box Transkripsiyon Faktör 5
TNNT2	Kardiyak Tip Troponin T2
V	Volt

1. GİRİŞ

Kardiyovasküler hastalıklar (KVH), dünyadaki ölümlerin önde gelen nedenidir ve dünya genelinde ölümlerin neredeyse üçte birini oluşturmaktadır [1]. Kalp yetmezliği, kalbin vücudun ihtiyacını sağlayacak kadar kanı pompalayamaması sonucu gelişen ciddi bir klinik rahatsızlıktır ve koroner arter hastalığı, miyokard infarktüsü ve değişik nedenlere bağlı olarak gelişen kardiyomiyopati gibi çeşitli hastalıklardan kaynaklanmaktadır. Miyokard infarktüsü olarak bilinen kalp krizleri koroner arterlerin aniden tıkanması sebebiyle meydana gelmektedir. Bu tıkanıklığın dokuya giden besin ve oksijeni engellemesi, kalp kasında geri dönüşü olmayan hücre ölümüne neden olmaktadır. Yetişkin kalp dokusu kardiyomiyositlerin bölünme yetenekleri olmaması sebebiyle hasar görmüş dokuyu onaramaz. Bunun sonucu olarak kontraktıl, mekanik ve elektriksel özelliklerini yitirmiş miyokard doku oluşur [2]. Rejeneratif tıp ve doku mühendisliği uygulamaları ile kardiyak dokunun onarımı ve yenilenmesi için deselülerize kalp, hücre terapisi ve kardiyak yamalar gibi stratejileri sunar. Kemik ve deri gibi diğer dokuların aksine, kalp dokusu kendisini yenileme ve onarma yeteneğinden yoksundur [3]. Miyokard doku mühendisliğinin en önemli amacı fonksiyonel kardiyomiyositlerin kalp kası dokusunda yeniden oluşturulması veya rejenerasyonunun sağlanması olarak tanımlanabilir. Bu amaçla miyokard doku mühendisliği, hasarlı kalp kasının onarımı için fonksiyonel kardiyomiyosit hücreleri ile biyobozunur veya bozunmayan biyomateryallerin entegrasyonunu ve bu bütünlüğün hasarlı kas dokuda korunmasını hedefleyen doku yamalarının üretilmesini amaçlamaktadır [4]. Buna göre ideal bir miyokard doku yamasının doğal dokuyu eşsiz bir şekilde taklit edebilmesinin yanında çevresindeki canlı doku ile mekanik, elektriksel ve fonksiyonel bütünlüğü sağlayabilir dokuları oluşturabilmesi gerekmektedir [5-7]. İdeal doku implantasyonlarında ise, transplante edilecek yamanın trombojenik etki göstermemesi, enfeksiyonlara karşı dayanıklı olması, kararlı olması, konak doku ile hızlı ve etkili bir bütünleşme sağlaması gerekmektedir [8].

Kardiyomiyositlerin biyouyumlu, biyobozunur ve mekanik olarak dayanımlı bir matriks materyalinde kültüre edilmesi gerekmektedir. Bu sebeple doğal ve sentetik polimerler kardiyak yama uygulamaları için uygun biyomalzemelerin üretilmesinde

araştırılmaktadır [4]. Kardiyak yama uygulamaları için geliştirilecek olan biyomalzemenin uzun süreli esneklik göstermesi gerekmektedir. Gliserol ve sebasik asidin esterifikasyon tepkimesi ile çapraz bağlanmış ve elastomerik yapıdaki PGS biyobozunur özelliğinden ötürü 2002 yılında yapılan bir çalışmada, yumuşak doku mühendisliği alanında uygulanabilir olduğu vurgulanmıştır [9]. Diğer sentetik biyobozunur polimerlerle karşılaştırıldığında PGS, elastik uzama kabiliyeti ile biyolojik dokuların mekanik özelliğine benzer bir davranış ve *in-vivo*'da yüzey erozyon mekanizması ile doğrusal bir bozunma sergiler. Daha da önemlisi gliserol ve sebasik asit polikondenzasyonu ve bunu takiben ısı işleme tabi tutulması ile elde edilen çapraz bağlı PGS elastomeri, 3 boyutlu doku iskelelerinin fabrikasyonu ve modifikasyonu için kolay prosese imkan tanıyan bir prepolimer olarak hazırlanabilir [10].

Doğal kaynaklı biyomalzemeler yüzey reseptör etkileşimleri gibi mekanizmalarla hücrelere sinyal sağlaması açısından doku rejenerasyonunda ayrıca önemli bir materyaldir. Dokunun mimikrisinin sağlanması açısından 3 boyutlu yapılarıyla önemli bir yer kaplayan doğal kaynaklı malzemelerin yabancı antijen kaynakları transplantasyon sonrasında immunojenik problemlerle doku reddine sebep olmaktadır. Günümüzde bu immunojenik etkiyi ortadan kaldırmak üzere deselülerizasyon tekniği kullanılmaktadır. Deselülerizasyon tekniğinin en önemli avantajı dokunun 3 boyutlu yapısını taklit edebilmesidir. Bu teknik kimyasal, fiziksel ve biyolojik ajanların ve bunların kombinasyonlarıyla dokuların hücresizleştirilmesini hedefler.

Miyokard doku mühendisliğinde önemli bir diğer konu ise dokudaki elektrik sinyallerinin iletimidir. Pek çok güncel çalışma, metal partikülleri, polipirol, polianilin ve karbon nanofiberler gibi iletken yapıların, kardiyak hücre adezyonu, migrasyonu ve protein sekresyonunu düzenlemek için doku iskelelerine eklenmesini içerir. Aynı zamanda iletken doku iskelelerinin kardiyak dokularda hücre-hücre iletişimine izin vermesi ve bu sebeple senkronize kontraktıl aktivitelerinin oluşmasına zemin hazırlaması sebebiyle performansını arttırması bakımından önem teşkil etmektedir.

Bu tez çalışması kapsamında ilk aşamada iki farklı deselüerizasyon tekniğinin detaylı uygulaması gerçekleştirilmiştir. Deselüerizasyon tekniğinin en önemli dezavantajlarından biri dokunun mekanik olarak zayıflamasıdır. Bu amaçla çalışmanın ikinci aşamasında, yapısal bütünlüğün bozulmasına ve spesifik protein bağlanma bölgelerinin zayıflatılmasına bağlı olarak yapıya elastomer ilavesi ile doku iskelesindeki hasarın onarılması hedeflenmiştir. Bu kapsamda biyolojik olarak uyumlu, yüke ve basınca dayanıklı elastomer olan poli(gliserol-sebakat) (PGS) polimeri kullanılarak doku iskelesi temelli elastomerik kardiyak yamalar geliştirilmiştir. Kardiyak doku onarımında diğer temel kriterlerden biri olan dokudaki elektrik sinyallerinin iletimi için ise temelli nano malzemelerin elde edilen elastomer-iskele yapısına katılması sağlanmış böylece iletken kardiyak yamaların oluşturulması hedeflenmiştir.

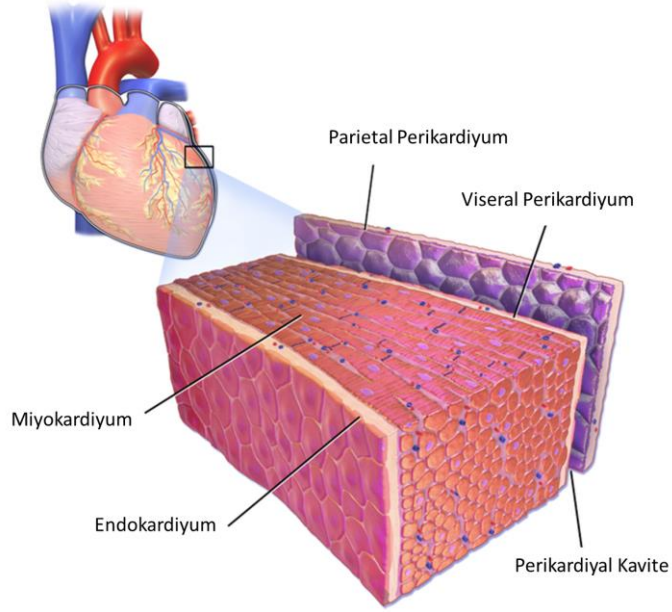
Böylece kalp kası onarımına yönelik olarak yenilikçi sentetik/deselüerize hibrit ve kompozit yamalar hazırlanmış; kimyasal, yapısal ve nano-/makro- mekanik açılardan karakterize edilmiş ve elektriksel/mechanik olarak kardiyomyositler varlığında statik ve dinamik kültürlerde *in vitro* performansları incelenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kalbin Yapısı ve Özellikleri

Kalp organı, görevi dokulardan toplanan kirli kanı temizlenmek üzere akciğere ve akciğerden gelen temiz kanı ise dokulara iletmek olan bir pompa sistemidir. İnsan kalbi göğüs kafesinde, sternum ve kostal kıkırdakların arkasında eğik pozisyonda bulunur [11].

Fibröz iskelet, kalp kası ve impuls iletim sistemi kalbin temel yapısını oluşturur. Kalbin taban kısmı, fibröz veya kalp iskeleti olarak bilinen oldukça yoğun bir yapı içerir. Fibröz iskelet kardiyomiyositler için güçlü bir çerçeve oluşturur, kalp kapakçıklarını destekler ve kalbin kulakçık ve karıncık arasındaki elektrik yalıtımını sağlar [12]. Kalbin kas yapısının enine kesiti epikard tabaka, miyokard tabaka ve endokard tabaka olmak üzere 3 katmana ayrılır. Kalbin etrafını saran çift katmanlı, sıvı dolu kese ise perikard olarak adlandırılır. Tek bir epitel dokusu tabakasından oluşan epikardiyum, fibroelastik bağ dokusunun ve yağ dokusunun altında kalan viseral perikardı oluşturur. Koroner arterler ve damarlar, lenfatik damarlar ve sinirler epikard tabakanın altından geçer. Endokardiyum en içteki epitel doku tabakasıdır ve endotel ve subendotelyal bağ dokusu tabakasından oluşur. Subendokardiyum, endokard ve miyokard arasında bulunur ve impuls ileten sistemi içerir [13]. Miyokard doku ise, kalp duvarının büyük bir kısmını oluşturan iç kas tabakasıdır. Kalp kası hücreleri, kardiyomiyositler, ventriküler duvar hacminin yaklaşık %70'ini kaplayan miyokardın ana yapısal bileşenidir ve iskelet kası hücrelerine kıyasla çok daha küçüktür (10-20 µm çapında, 50-100 µm uzunluğunda). Kalp kasına özgün bir özellik olan interkalar diskleri içerir. Bu diskler, hücreler arasında sıkı mekanik bağlantıları sağlayan dezmozomları ve aksiyon potansiyelinin hücreler arasında yayılmasına izin veren geçit bölgelerini içerir. Hücrelerin ve geçit bölgelerinin dallı ağısı sayesinde aksiyon potansiyeli tüm miyokard doku boyunca hızlı bir şekilde yayılır ve böylece kalp tek bir birim şeklinde kasılıp gevşer [14]. Kalbin duvarına ait detaylı gösterim Şekil 2.1'de verilmiştir.



Şekil 2.1. Kalp duvarını oluşturan tabakaların gösterimi [15].

Miyokard doku ekstraselüler matriksi (ESM), kalbin normal işlevinde kritik bir öneme sahiptir. ESM, yapısal bütünlüğü sağlar, miyositleri birbirine bağlar, kasılma elemanlarını hizalar, kuvvetin iletilmesinde rol alır ve yırtılmayı önlemek için gerilme mukavemeti sağlar [16, 17]. ESM içerisinde kolajen içeriğinin yaklaşık %80'ini tip I fibriler kolajenler, yaklaşık %12'sini ise tip III fibriler kolajenler oluşturur. Aynı zamanda ESM, hücre büyümesini, yapışmasını, göçünü ve yara onarımını sağlamak için hücreler ve kollajen ağı arasında bir köprü görevi gören fibronektin de içermektedir [18]. Kolajen tip I, kas yapısının çekme mukavemetinin sağlanmasında görevlidir. Aşırı kolajen birikimi kardiyak dokunun sertliğini arttırarak diyastolik ve sistolik ventriküler disfonksiyonu, miyokard enfarktüsü, kalp yetmezliği ve aritmiler gibi olumsuz kardiyovasküler hastalıklara neden olur [16, 19, 20].

2.2. Kardiyovasküler Hastalıklar

Kardiyovasküler hastalıklar hem sanayileşmiş ülkeler için hem de gelişmekte olan dünya için tüm insan ölümlerinin yaklaşık %40'ını oluşturmaktadır. Buna bağlı olarak bu hastalığın getirdiği ekonomik yük tüm dünya ülkeleri için oldukça fazladır. Kalp yetmezliği, kalbin pompalama etkinliğindeki bozulma ile ortaya çıkar ve en yaygın nedeni akut miyokard enfarktüsüdür. Akut miyokard enfarktüsü bir koroner arterin tıkanmasıyla oluşur. Bu tıkanıklık sonunda kanın akış bölgesinden mahrum kalan bölgede

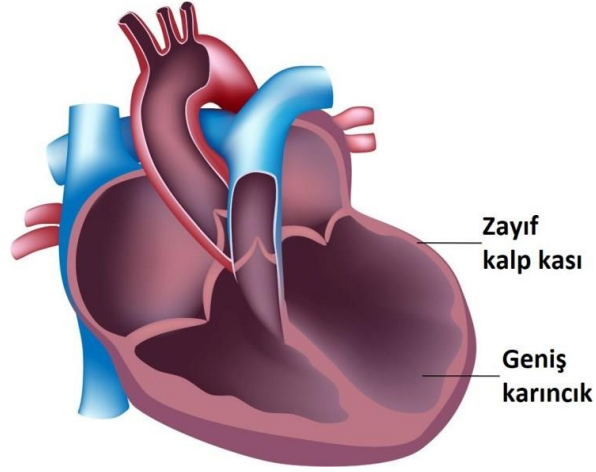
oksijen, besin ve metabolit eksikliği oluşur. Bu noktada aerobik metabolizma anaerobik glikoza dönüşür ve pH'da düşüşe neden olur. Bu durum kontraktıl kasılma fonksiyonunda azalmaya neden olur [21]. 20 ile 40 dakika içinde kan hücreleri ölmeye başlar ve bu durum miyokard dokunun fonksiyon kaybında tehlikelere yol açar. Klinik uygulamalar temel olarak kan akışını hızla eski haline getirerek enfarktüsün şiddetini ve yayılımını sınırlamayı hedefler. Bu uygulama farklı tedaviler ve bunların kombinasyonlarıyla yapılabilir (Antikoagülant tedavileri, trombolitik ilaçlar, nitrat gibi vazodilatörler, morfin uygulaması, peruktan koroner tedavisi, anjiyoplasti vb.). Bu tür tedaviler enfarkte bölgede kan akışını eski haline getirir ve akut hasarı sınırlar, ancak hasarlı dokuyu yeniden oluşturamaz. Bununla beraber, miyokard doku hücreleri rejeneratif kapasitelerinden yoksun olmaları nedeniyle doku kendini yenileyemez ve böylece enfarktüse bağlı olarak miyokard dokudaki hasar kalıcı olarak kalır [22].

Miyokard dokuda kalbin kas ve elektriksel olarak fonksiyonlarını yitirmesi ile ilişkili diğer bir anatomik ve patolojik tanı kardiyomiyopati olarak adlandırılır. Kardiyomiyopatiler genetik, toksik veya inflamatuvar nedenlerle oluşabilir. Başlıca türleri arasında dilate kardiyomiyopati, hipertrofik kardiyomiyopati, restriktif kardiyomiyopati ve aritmojenik sağ ventriküler kardiyomiyopati bulunur [23, 24].

2.2.1. Dilate Kardiyomiyopati

Dilate kardiyomiyopati ventrikül duvarlarının genişlemesine bağlı olarak kalp odacıkları büyümesi ve kasılma yeteneğini kaybetmesi olarak tanımlanır. İleriki safhalarda sağ ventriküle ve kulakçıklara yayılır. Odacıklar genişledikçe kalp zayıflar ve verimli kasılamaz. Buna bağlı olarak kan yeteri miktarda pompalanmaz ve kanın akciğerde yedeklenip vücutta birikmesine neden olur [24]. Kalp yapısının dilate kardiyomiyopati durumundaki gösterimi Şekil 2.2'de verilmiştir [25].

Dilate kardiyomiopati

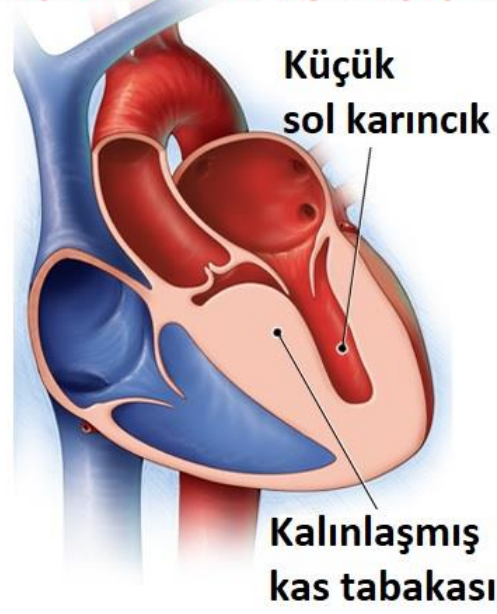


Şekil 2.2. Dilate kardiyomiopati durumunda kalp yapısı [25].

2.2.2. Hipertrofik Kardiyomiopati

Hipertrofik kardiyomiopati kalp kasının kalınlaşmasına neden olan hastalıktır. Kardiyomiyositler olması gerekenden fazla büyümesi durumunda kalp kası kalınlaşarak şişer. Sağ ve sol ventriküler arasındaki septumun duvarları anormal şekilde kalınlaşır. Kalınlaşmış septum sol ventriküle doğru şişip vücuda giden kan akışını kısmi olarak bloke edebilir. Sağ ventriküle doğru genişleme, sol ventrikülü hacimce küçültür ve bu nedenle sol ventrikül normalden daha az kan tutar. Hipertrofik kardiyomiopati basıncı arttırarak mitral kapaklara da zarar verebilir, akciğerlerde sıvı birikimine neden olabilir ve anormal kalp ritimlerini tetikleyebilir [24]. Kalp yapısının hipertrofik kardiyomiopati durumundaki gösterimi Şekil 2.3'te verilmiştir [25].

Hipertrofik kardiyomiyopati

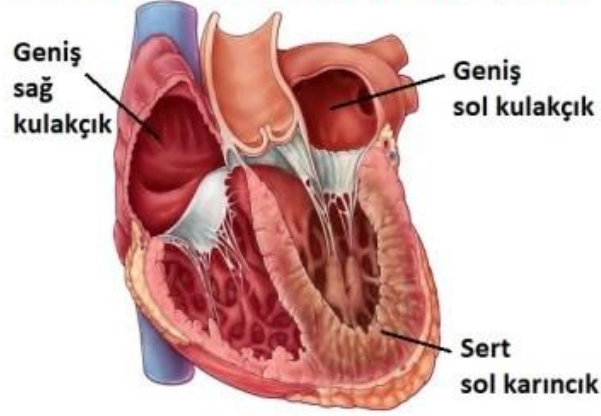


Şekil 2.3. Hipertrofik kardiyomiyopati durumunda kalp yapısı [25]

2.2.3. Restriktif Kardiyomiyopati

Restriktif kardiyomiyopati, ventriküler duvarların zamanla aşırı sertleşmesine bağlı olarak oluşur. Kalp verimli bir şekilde sıkışma durumunda kalabilmesine rağmen, gevşeme durumunda rahatlayamaz. Bu durum kalbin kan ile dolmasını zorlaştırır. Kan dolaşım sisteminde yedeklenir ve bu da akciğerler ve vücutta sıvı birikmesine yol açar. Ayrıca ventriküller basıncı artırır ve kulakçıklar buna bağlı olarak genişler. Kalp ritminde bozukluklara ve vücuda normalden az kan pompalanmasına neden olur [24]. Kalp yapısının restriktif kardiyomiyopati durumundaki gösterimi Şekil 2.4'te verilmiştir [25].

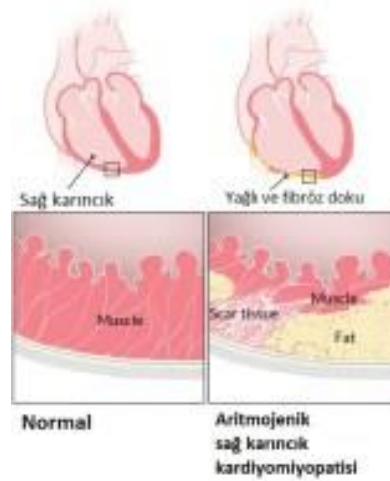
Restriktif kardiyomyopati



Şekil 2.4. Restriktif kardiyomyopati durumunda kalp yapısı [25].

2.2.4. Aritmojenik Sağ Ventriküler Kardiyomyopati

Bu hastalıkta normal kalp kasının yerini yağlı fibröz doku alır. Sağ ventrikülün küçük bir bölümünde başlar ve zamanla sağ ventrikülün büyük bir bölümü etkiler. Bu durum kalpteki elektrik iletimine keser ve potansiyel olarak kalp ritim bozukluklarına neden olur. Bu duruma bağlı olarak kalp normalde olduğu kadar kanı pompalayamaz ve kan dolaşım sisteminde birikerek vücutta sıvı birikmesine neden olur [24]. Kalp yapısının aritmojenik sağ ventriküler kardiyomyopati durumundaki gösterimi Şekil 2.5'te verilmiştir [25].



Şekil 2.5. Aritmojenik sağ ventriküler kardiyomyopatisi ile ilişkili kalp yapısı [25].

2.3. Miyokard Doku Mühendisliği

Doku mühendisliği, son on yılda önemli bir potansiyele sahip disiplinler arası bir alan olarak ortaya çıkmıştır. Biyopolimerler, hücre-materyal etkileşimleri ve biyomimetik kültür cihazları alanlarında önemli ilerlemeler kaydetmiştir. Bu teknoloji ile kırık kemik, mesane, kan damarları vb. birçok fonksiyonel dokunun *in vivo* olarak geliştirilmesi ve implante edilmesi sağlanmıştır [26]. Kardiyak doku mühendisliğinin bir alt dalı olan miyokard doku mühendisliği, kalp kası hastalıkları için *in vitro* 3 boyutlu doku benzeri yapıların terapötik uygulamalar için oluşturulmasını hedefler. Başarılı bir doku mühendisliğinin 3 ana anahtarını hücreler, hücreler arası matriks (ESM) ve biyomimetik sinyaller oluşturur. Miyokard doku mühendisliğinde, fabrikasyon olarak bir doku iskelesinin taşınması gereken özellikler şu şekilde sıralanır:

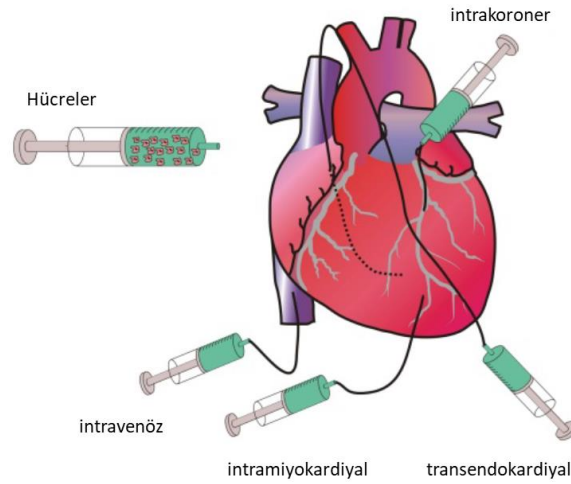
- i. Birbirlerine bağlı, büyük gözeneklere sahip ve yüksek oranda gözenekli özellik taşıması (Kütle aktarımını sağlamak için),
- ii. Hidrofilik yapı (Hücre yapışmasını arttırmak için),
- iii. Yapısal olarak kararlı (Biyoreaktör uygulamalarında çekme kuvvetlerine dayanabilecek yapı),
- iv. Biyobozunur yapı,
- v. Biyouyumlu yapı,
- vi. Elastik yapı (Kasılma kuvvetlerinin iletilmesini sağlaması),
- vii. Elektrik iletimini desteklemesi (Kontraktıl kasılmayı desteklemesi).

Bu amaçla miyokard doku mühendisliğinde hedeflenen biyomateryallerin hücrelerin oluşumunu, çoğalmasını desteklemesi, immün reaksiyon göstermemesi, fonksiyonel/olgun kardiyomiyositlere farklılaşabilmesini sağlaması gerekir. Doku iskelesinin 3 boyutlu yapısı besinlerin, metabolitlerin ve düzenleyici moleküllerin hücrelere taşınabilme kabiliyetini belirlerken; iskele kimyası hücrelerin bağlanması ve farklılaşmasında önemli bir rol oynar. İskelenin mekanik stabilitesi, ideal olarak doğal dokuyu taklit edebilmeli ve mekanik bütünlük sağlanabilmelidir [27]. Miyokard doku mühendisliği uygulamaları miyokard doku rejenerasyonu için mevcut doku yamalarının iskele sentezinde kullanılan malzemeye ve hücre tiplerine göre sınıflandırılabilir.

2.4. Miyokard Doku Rejenerasyonu Stratejileri

2.4.1. Hücre Terapisi

Kalp, doğum sonrasında rejenerasyon yeteneği olmayan tamamen farklılaşmış bir organdır. Kardiyomiyositlerin yine de sınırlı bir rejeneratif kapasiteye sahip olduğu, 20'li yaşlarda bu kapasitenin yaklaşık %1 olduğu ve 75 yaşında %0.3'e düştüğü gösterilmiştir [28]. Bu rejeneratif kapasite, kardiyak kök hücre popülasyonu ile elde edilir. Bu rejeneratif yetenek, her durumda enfarktüsün neden olduğu ciddi hasarı onarabilecek kabiliyette değildir. Hücre terapisi yöntemi, doğal dokunun bu rejeneratif potansiyelini arttırmayı hedefler. Kardiyak hücre terapisinin temel amacı, hücrelerin patolojik miyokard dokusu içine farklı tekniklerle implantasyonu ile hasar görmüş enfarktüs dokusunu iyileştirmektir. Bu hücre terapisi tekniği intravenöz, intramiyokardiyal, intrakoronar ve transendokardiyal olmak üzere 4 farklı teknik ile uygulanabilir [21] (Şekil 2.6)



Şekil 2.6. Kalpteki klasik hücre terapisi teknikleri [21].

İskemik kalp hastalıkları ve kalp yetmezliği için kök hücre tedavisinde klinik olarak kullanılan çeşitli hücre kaynakları Tablo 2.1'de özetlenmiştir [29].

Tablo 2.1. Hücre terapisi yönteminde kullanılan hücre kaynakları.

1. Otolog Kardiyosfer Kökenli Hücreler
2. Otolog Kemik İliği Kökenli Hücreler
3. Otolog Mezenkimal Kök Hücreler
4. Otolog CD133 ⁺ Hücreleri
5. Otolog İskelet Kök Hücre Tabakaları
6. Allojenik Mezenkimal Kök Hücreler

İnsan pluripotent kök hücreleri ve indüklenmiş kardiyak progenitör hücreleri fonksiyonel olarak verimli bir şekilde kardiyomiyositlere, endotel hücreler ve düz kas hücrelerine farklılaşabilmeleri nedeniyle özellikle kardiyak doku mühendisliği tedavisinde umut verici hücre tipleridir. Kardiyak onarım için potansiyel kullanıma yönelik diğer hücre kaynakları arasında mezenkimal kök hücreler, kardiyak kök hücreler, endokardiyal biyopsilerden izole edilen, heterojen bir hücre popülasyonundan oluşan ancak istisnai olarak çoğalan kardiyosferler yer alır. Çeşitli hücre tiplerinin transplantasyonunun enfarktüs sonrasında sol ventrikül fonksiyonunu ve yapısını iyileştirdiği bildirilmiş olsa da transfer edilen hücrelerin konakçı miyokardiyumu uzun vadeli aşılama gerektirmektedir [21]. Aynı zamanda, aynı hücre kaynağını kullanan farklı klinik deneylerin sonuçlarındaki farklılıklar, araştırmaları hücre tedavisinin başarısını belirleyen temel hususları araştırmaya yöneltmiştir. Ayrıca hücre tipi, kaynağı ve dozu, teslimat yolu ve zamanı miyokard enfarktüsünde hücre tedavisinin güvenliğini ve etkinliğini doğrulamak için daha fazla analize tabi tutulması gereken birçok klinik çalışmayı gerektirmektedir. Özetle, şimdiye kadar gerçekleştirilen klinik çalışmaların sonuçları umut verici olsa da kök hücre tedavilerinin genel faydaları tam olarak tanımlanamamıştır [30].

2.4.2. Ventriküler Kısıtlama

Bu yaklaşımda amaç dokuyu yenilemek değil miyokard enfarktüsünü takiben dokunun olumsuz yönde yeniden şekillenmesini önlemektir. Bu yöntemde çeşitli sentetik ağlarla ventrikül genişlemesini engellenir. Yapılan bir çalışma örneğinde ventrikül dilatasyonu engellemek için polipropilen yapıda, diğer yandan perikardiyal adezyonları sınırlamak

için politetrafloroetilen içeren iki katmanlı bir membran sentezlenmiş ve domuzda kronik enfarktüs modelinde çalışılmıştır [31]. Ventriküler kısıtlamanın mekanik olarak kısıtlanmasının ne ölçüde faydalı olduğunu belirlemek için koyunlarda iki tür kısıtlamanın karşılaştırmalı bir çalışması yapılmıştır. Bu amaçla enfarktüs üzerinde bozunmayan Marlex ağı ile Merseline ağı karşılaştırılmıştır. Bu çalışmada ventrikülü saran ağ kullanımı yeniden şekillenmeyi azaltırken, enfarktüs üzerine uygulanan yama, kontrollerle karşılaştırıldığında önemli gelişmeler göstermemiştir [32].

Dilate kardiyomyopati hastalarda klinik çalışmalarda Paracor kalp ağı ventriküler kısıtlama cihazı olarak önerilen bir ağ çeşididir. Yapılan bir çalışmada implantasyondan 6 ay sonra ventriküler genişlemeyi önlediği ve güvenilir bir şekilde implante edilebileceği önerilmiştir [33]. Önerilen diğer bir sol ventrikül kısıtlaması, hayvan deneylerinde olumlu sonuçlar gösteren ve bir poliester ağ olan Acorn Corcap'tır [34]. İmplantasyonunun ardından 5 yıl sonra sol ventrikül diyastol sonu hacminde önemli bir azalma göstermiştir ancak ekokardiyografik çalışmalarda kalp debisinde iyileşme sağlanamamıştır [35].

Ventriküler kısıtlama tedavisi ile elde edilen sonuçlarda doku rejenerasyonunu sağlanamadığı gösterilmiştir. Doku mühendisliği uygulamaları, ventriküler kısıtlama tedavisini hücrelendirilmiş kardiyak yamalar gibi rejeneratif stratejilerle birleştirir. Örneğin, Acorn Corcap ve mezenkimal kök hücre yüklü bir kolajen matriksi koyunlara implante edilmiştir ve bu kombinasyonun yabancı cisme karşı üretilen fibröz sınırladığı ve sistolik/diyastolik fonksiyonların iyileştirildiği bulunmuştur [36].

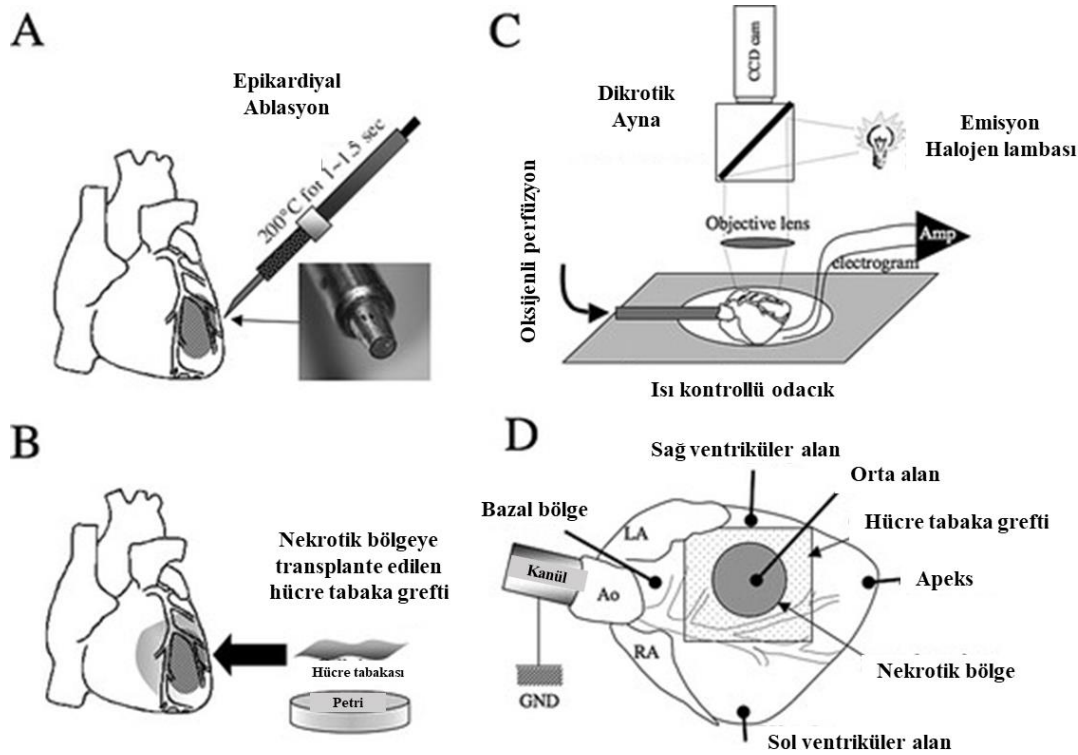
2.4.3. Doku Mühendisliği Yaklaşımları

2.4.3.1. Hücre Tabakası Uygulamaları

Hücre tabakalarının temeli, hücrelerin flasklarda proliferasyonunun ardından adeziv proteinlerin ve membran reseptörlerinin enzimatik olarak parçalanmasıyla hücrelerin tabaka şeklinde yüzeyden kaldırılmasına yöntemine dayanır [37]. Alternatif olarak, hücre tabakalarının proliferasyonu ile hücreler arasındaki elektromekanik bağlantılar korunarak hücrelerin ESM'leri tarafından bir arada tutunması kaydıyla flask yüzeyinden ayrılması

temeline dayanır. Bu yöntemle hücreler ESM'nin sağladığı üreme ve olgunlaşma için gerekli çevresel faktörleri korumuş olur [38]. Bu yöntemle elde edilen hücre tabakalarının nekrotik bölgeye implantıyla, miyokardiyum onarımına yardımcı olması hedeflenir.

Hücre tabaka uygulamalarında örnek olarak hücreler sıcaklığa duyarlı ve 37 °C sıcaklıkta hidrofobik olan poli(N-izopropilakrilamid) kaplı plakalar üzerinde çoğaltılır. Sıcaklığın düşürülmesiyle plaka yüzeyi hidrofilik duruma geçer ve böyle hücreler yüzeyden tabaka şeklinde ayrılır [38]. Isıya duyarlı metilselüloz hidrojel gibi malzemeler, insan amniyotik sıvı kök hücrelerinin hücre tabakası şeklinde elde edilmesinde başarılı bir şekilde kullanılmıştır. Ayrıca, sıçan miyokard enfarktüsü modelinde kardiyomiyosit tabakalarının konak doku ile fonksiyonel şekilde bütünleştiği gösterilmiştir [39]. Yapılan bu çalışmaya ait genel prosedür Şekil 2.7'de gösterilmiştir.



Şekil 2.7. Deneysel protokolün şeması. A. Epikardiyal miyokardın ablasyonu, B. Graft hücre tabakası üzerine nakledilmesi, C. Transplantasyondan sonra, aorta kanüle edilip ve numunenin mikroskop üzerine monte edilmiş termo kontrollü bir alana yerleştirilmesi, D. Numunenin nekrotik bölgeye transplantasyonu [39].

Miyokard enfarktüsü sonrasında kas kütle kaybı 50 grama kadar önem taşır [40]. Hücre tabakası uygulamaları bu kas kütle kaybının tek bir hücre tabakasının implantı ile onarabilecek kabiliyete sahip değildir. Bu nedenle yapılan bir çalışmada tek katmanlı kardiyomyosit tabakasının üst üste bindirilerek birden fazla katman şeklinde kalın greftlerin elde edilmesi hedeflenmiştir [41]. Ancak bu yaklaşım, hücre tabakalarının vaskülarizasyondan yoksun olması nedeniyle elde edilebilecek maksimum tabaka sayısını 3 tabaka olacak şekilde kısıtlamıştır (oksijen ve besin difüzyonunun gerçekleşebileceği maksimum derinlik esas alınmıştır). Bu sorunun üstesinden gelmek için ise 1, 2 ve 3 gün aralıklarla 3 katmanlı kalın kardiyomyosit tabakaları implante edilmiştir [42]. Bu yaklaşım ile 1 mm kalınlıkta tabakalar başarıyla elde edilmiştir ancak bu seçenek çok invaziftir ve hastalarda uygulamasını kısıtlayabilir.

2.4.3.2. Enjekte Edilebilir Jeller

Enjekte edilebilir jeller, doğal ve sentetik malzemelerin tek başlarına veya hücrelerle beraber kullanılması yoluyla implantasyon sonrasında gerek hücre yapışmasını kolaylaştırmak gerekse dokunun onarımını sağlamak üzere araştırılmaktadır. Enjekte edilebilir materyaller ilgili alana transplante edildikten sonra hızla kürlenebilmeli ve enfarkte alanın şeklini alabilmelidir [43]. Yapılan bazı çalışmalar uygun mekanik özellikteki kontraktıl olmayan malzemelerin enjeksiyonunun ventriküler duvarın dayandığı stresi sınırlamaya katkıda bulunabileceğini göstermiştir [44].

Enjekte edilebilen jeller hücrelerin tutunmasına yardımcı olabilir, yapışma motifleri ile hücre bağlanmasına aktif olarak katkı sağlayabilir, hücrelerin entegrasyonunu iyileştirmek için gerekli ilaç ve büyüme faktörlerini kontrollü olarak salabilen bir ortam oluşturabilir [45, 46]. İdeal bir jelin, biyobozunur olması, düşük immünojenite göstermesi, sitotoksik olmaması, adeziv olmaması, antitrombojenik özelliğe sahip olması, yeterli mekanik mukavemeti göstermesi ve elektriksel iletimi sağlaması gerekir [21].

Buna göre yapılan çalışmalarda enjekte edilebilir jeller doğal ve sentetik kaynaklı olmak üzere 2 ayrı grupta incelenir.

Doğal Materyaller

Fibrin, FDA onaylı, ticari olarak temin edilebilen, biyoyumlu ve yara iyileşmesi için doğal geçici bir matriks oluşturan doğal bir polimerdir [21]. Hücre yapışma motifleri olarak bilinen arjinin-glisin-asparajin (RGD) dizilerini içerir [47]. Kardiyak doku mühendisliği için perkutan katater yoluyla enjekte edilmeye uygun fibrin konsantrasyonları çalışılmış ve bu uygulamada fibrin uygulamasının fizibilitesini gösterilmiştir [48]. Aynı zamanda çeşitli hücre kombinasyonlarıyla implantasyonunun uygulanabilirliği gösterilmiştir [49, 50].

Kitosan, asidik sulu çözeltilerde çözünebilir, nötralizasyonu sonrasında jel benzeri yapıları oluşturan ve yumuşakçaların, kabukluların ve böceklerin kabuklarından deasetilasyon yoluyla elde edilen doğal bir katyonik polisakkarittir [51]. Biyoyumlu özelliği, immün reaksiyon göstermemesi, ana kimyasal zincirinde içerdiği amino grupları sayesinde çeşitli moleküllerle konjuge edilip biyomalzeme olarak kullanılabilir [52]. Kardiyak doku rejenerasyonunda, farelerin enfarktüslü miyokardiyumuna enjekte edildiğinde hücrelerin mikro ortamını iyileştirebildiği, hayatta kalmalarını ve entegrasyonunu sağladığı gösterilmiştir [53].

Matrijel, fare sarkoma hücrelerinin ESM'sinden üretilen ticari bir protein karışımıdır [54]. Klinik uygulamaları elde edildiği kaynak ile sınırlıdır. Kardiyak doku rejenerasyonunda tek başına fare ESM'si [55] ile ve neonatal kardiyomiyositler ile kombinasyon halinde uygulanmıştır [56].

Otolog kaynaktan elde edilebilen keratin liyofilize edilip su ile etkileştirildiğinde kendiliğinden bir araya gelir ve jel oluşturur. Yapılan bir çalışmada sıçan kalbine enjekte edilen keratin doğal kardiyomiyositlerin ve endotel hücrelerin keratin içerisine geçişi gözlenmiş ve anjiyogenezi teşvik ettiği gösterilmiştir [57].

Aljinat deniz yosunlarından elde edilen bir blok kopolimeridir. Kalsiyum iyonları ile jel forma geçer. Aljinatın mekanik özellikleri çözelti konsantrasyonlarının kombinasyonları ve molekül ağırlığının kontrolü ile değiştirilebilir. Yapılan bir çalışmada, yeni ve eski

zamanda enfarkte olmuş sıçanlarda aljinat jel yapıları enjekte edilmiş ancak sonuçlar kalbin sistolik ve diyastolik fonksiyonlarını sınırladığını göstermiştir. Kardiyak doku rejenerasyonunda aljinatın RGD konjugasyonu [58], polipirol [59] gibi kombinasyonları ile uygulamaları bulunmaktadır.

Hyaluronik asit, dokuların ESM'sinde yaygın olarak bulunan bir sülfatlanmamış glikozaminoglikandır. Biyouyumlu özelliği, immünojenik etki göstermemesi, biyobozunur olması ve bozunma ürünlerinin anjiyogenezi ve endotelial hücrelerin proliferasyonu ve göçünü uyarması gibi bir çok avantaja sahiptir [21]. Tek başlarına hücre yapışmasını desteklemez ancak kolajen içeren kombinasyonlarıyla miyokard doku rejenerasyonu için uygulanabilirliği gösterilmiştir [60].

ESM'nin temel ana bileşenlerinden biri olan kolajen, kardiyomiyositlerin *in vitro* büyümesini ve hayatta kalmasını destekler. Kardiyak doku rejenerasyonunda tek başına kullanılan ticari kolajenin ventriküler kardiyak fonksiyonunda iyileşmeler gösteren hayvan modellerine implante edilebildiği gösterilmiştir [61]. Farklı hücre tipleriyle kombine uygulamalarında, domuz modelinde katater yoluyla enjekte edilebildiği ve uygulanabildiği gösterilmiştir [62]. Başka bir çalışmada, kondroitin sülfat ile birleştirilmiş kolajen, *in vitro* uygulamadan sonra CD-133+ progenitor hücrelerini iletmek için kullanılmıştır [63].

Kolajenin kısmen bozunmuş bir ürünü olan aljinat, bir çalışmada enfarktüsle sıçan kalplerine tek başına ve fibroblast büyüme faktörleri ile hidrojel olarak enjekte edilmiştir ve eklenen büyüme faktörü arteriyogenezi, ventriküler yapılanma ve işlevi iyileştirmiştir [64]. Benzer bir çalışmada ise fibroblast büyüme faktörü aynı zamanda jelatin mikro küreler ile birlikte enjekte edilmiş ve böylece anjiyogenezi ve kardiyak fonksiyonun iyileştirildiği gösterilmiştir [65].

Farklı bir yaklaşım dokuların hücreleştirilmesine, enzimatik olarak degradasyonuna ve enjeksiyonuna dayanmaktadır. Bu tip yapıların avantajları, dokunun doğal bileşenlerini ve hücre matriks etkileşimlerini sağlayan yapıları korumasıdır. Bu tip materyaller

miyokardiyal onarım için diğer tüm materyaller arasında en iyi adaydır. Bu amaçla yapılan bir çalışmada, deselülerize miyokard dokusu nanolifli yapı halinde *in vivo* olarak sıçanlarda test edilmiş ve enjeksiyondan 11 gün sonra arteriyol oluşumunu arttıran endotel hücrelerinin ve düz kas hücrelerinin göçü indüklenmiştir [66].

Yoğun bir hücre dışı tabakası olan ince bağırsak submukozası (SIS) klinikte yara iyileşmesini hızlandırmak için kullanılmaktadır. SIS, çeşitli hücre tiplerinin çoğalmasını, bağlanmasını ve göçünü destekler ve büyüme faktörleri ve bağlanma motifleri sayesinde anjiyogenezi uyarır [21]. Kardiyak doku onarımı için piyasada bulunan iki farklı SIS'ten üretilmiş jel türü murin modelinde incelenmiştir [67]. Başka bir çalışmada, SIS'ten üretilmiş ECM emülsiyonu enfarktüs geçirmiş sıçan kalplerine enjekte edilmiş ve enjeksiyonun kalp fonksiyonunu iyileştirdiği ve neo-vaskülarizasyonu desteklediği gösterilmiştir [68].

Sentetik Materyaller

Vücut sıcaklığında jelleşebilen sentetik malzemeler (sıcaklık-duyarlı hidrojeller), enjeksiyon sonrasında kolaylıkla manipüle edilebilir. Bu grubun bazı materyalleri N-izopropilakrilamid (NiPAAm) bazlıdır. Bu yapı biyobozunur özellikte değildir ancak biyobozunur polimerlerle kopolimerize edilerek biyobozunur hale getirilebilir. Bununla ilgili yapılan bir çalışmada NiPAAm akrilik asit ve hidroksietil metakrilat-poli(trimetilen karbonat) kopolimerizasyonu ile 37 °C'de bir hidrojel elde etmek için tasarlanmış ve sıçanlara *in vivo* olarak enjekte edilmiştir [69]. Isıya duyarlı sentetik hidrojel ailesinin diğer üyelerini poli(kaprolakton), N-izopropilakrilamid, 2-hidroksietil metakrilat ve dimetil-g-bütürolakton akrilat oluşturur [70].

Miyokard doku rejenerasyonu için sentetik hidrojellerin son sınıfı olarak poli(etilenglikol) (PEG) kimyasalına dayalı biyobozunmayan ve yerinde çapraz bağlanabilen (*in situ*) hidrojeller çalışılmıştır. Ancak bu tür uygulamaların *in vivo*'da bir kısım immün reaksiyon gösterdiği ve anjiyogenezi tek başına indüklediği görülmüştür [71, 72].

2.4.3.3. Doku İskelesi Olarak Biyomateryaller

Miyokard doku mühendisliği alanında bir diğer yaklaşım ex vivo yamalar üreterek bu yamaları epikardiyak olarak enfarkte olmuş dokunun üzerine uygun bir şekilde implante etmektir. Bu yamalar hücreler, büyüme faktörleri ve ilaç ile önceden beslenmiş olabilir veya enfarkte alanın ventriküler genişlemesini önlemek amacıyla bir mekanik destek olarak kullanılabilir. Kullanılan iskelenin sitotoksik olmaması, hücre yapışması ve çoğalmasını teşvik etmesi ve immün reaksiyon göstermemesi gerekmektedir. Doku iskelesi kardiyomiyosit oryantasyonuna rehberlik etmeli, gözenekli bir yapıda 3 boyutlu ortam sağlamalı ve implante edilen hücrelerin konak doku ile elektromekanik eşleşmesini sağlamalıdır [2]. İskelenin mekanik mukavemet özelliği kardiyak doku mühendisliği uygulamaları için yeterli olmalıdır. Bu, kasılmalara uyumlu, doğrusal olmayan elastikiyet ve kalp atımının tüm evrelerinde kalbin şekline uyum sağlaması gerektiği anlamına gelir. Doğal miyokard dokunun yönsel olarak elektriksel ve mekanik özelliğini taklit edebilmesi için anizotropi de önemlidir [73].

Uygulanan stratejiye göre, biyomateryaller biyolojik olarak türetilmiş, sentetik malzemeler ve hücreleştirilmiş dokular olarak 3 grup altında incelenebilir. Biyobozunabilir doku iskelelerinin kullanılmasında çevre dokunun yenilenirken matriksin bozunması ve yerini yeni dokunun alması beklenir. Hücreleştirilmiş dokudan türetilen yapıların temel yaklaşımı, hücrelerinden uzaklaştırılan ESM'nin doğal doku mimari ve mekanik özelliğini kısmen de olsa taklit edebilmesidir. İstenilen tüm özelliklere uygun bir doku iskelesinin eldesi birçok farklı ihtiyaç gerektirdiğinden, tüm bu kaynakların kombinasyonları ile kompozit dokuların eldesi günümüzde daha yaygın olarak başvurulan yöntemlerden biridir. Doku iskelelerin temel avantajları, malzemelerinin hazırlanma sürecinde herhangi bir kısıtlama olmadığından istenilen mimariye, kimyaya ve mekaniğe sahip iskelelerin sentezinde bir sınırlama olmamasıdır. Ancak, bu tip yamaların enfarkte bölgeye katater ile verilen bir sisteme göre cerrahi bir prosedür gerektirmesi önemli dezavantajlarından biri olarak kabul edilir.

2.4.3.4. Üretim Teknikleri

Miyokard doku rejenerasyonunda farklı topografya ve gözeneklere sahip 3 boyutlu gözenekli yapılar elde etmek için birçok farklı teknik kullanılmaktadır. Bunlardan biri

olan elektro-eğirme tekniği ile polimer çözeltisinin yüksek voltaj uygulamasına bağlı olarak kolektör üzerinde ağ şeklinde lifli yapıların toplanmasına dayanmaktadır. Bu yapılar üst üste biriktirilerek gözenekli polimer iskelesi elde edilir [74]. Partikül uzaklaştırma tekniği, polimer çözeltisi içerisinde bir porojenin kullanımına dayanmaktadır. Bu porojen, çözücü elimine edildikten sonra porojen şablonunun boyutu ve şekli ile gözenekli alanlar yaratır. Bu yöntem ile gözeneklilik, porojen-polimer oranı değiştirilerek ayarlanabilir [75]. Gaz köpürtme yönteminde gözenekler, yüksek basınçlı bir gaza maruz bırakılarak elde edilir ve böylece çözücülerin ve yüksek sıcaklıkların kullanılması önlenir [76]. Dondurarak-kurutma yöntemi, çözeltinin dondurulmasını ve sonrasında donmuş çözücünün düşük sıcaklık düşük basınçta uzaklaştırılmasını temel alır. Böylece katı formda, gözenekli yapılar elde edilir [77]. Seçici lazer sinterleme ile, 3 boyutlu bir nesnenin her katmanını oluşturmak için malzemeyi seçici olarak sinterlemek için bir CO₂ lazeri kullanımına dayanır [78]. Son olarak mikrokontakt baskı tekniğinde hücreler tarafından izlenecek desenle bir damga kullanılır. Damga, hücre yapışmasını destekleyici solüsyon ile etkileştirilir ve ardından solüsyon substrata bastırılır [79].

2.4.3.5. Doku İskelesi Olarak Kullanılan Biyomalzemeler

Doğal Materyaller

Klinikte yaygın olarak uygulanan kolajenin epikardiyal onarım için uygulamış bir dizi ticari yaması bulunur [80]. Farklı hücre tipleri ve moleküller ile birleştirilmiş olsa da sulu ortamdaki şişme kapasitesi ve zayıf mekanik dayanımı bu yapının en önemli dezavantajını oluşturur. Kolajen doku iskeleleri, kolajen çözeltisinin liyofilize edilmesiyle hazırlanır. Neovaskülarizasyonu desteklediği birkaç çalışma ile gösterilmiştir [81, 82]. Enjekte edilebilir formlarıyla beraber uygulaması bulunmaktadır [83]. Ayrıca biyolojik davranışını iyileştirmek amacıyla iskeleler RGD dizileri ile modifiye edilmiştir [84].

Kolajenin denatüre hali olan jelatin, mekanik olarak zayıf özelliktedir ve bozunma hızı yüksektir [54]. Bozunması inflamatuvar yanıtı tetiklemiştir ancak bu durum anjiyogenez üzerinde olumlu bir etki olarak kabul edilebilir [85]. Yapılan bir çalışmada ticari bir jelatin süngeri sıçan kalp hücreleri ile implante edilmiş ancak 4 hafta sonra büyük bir

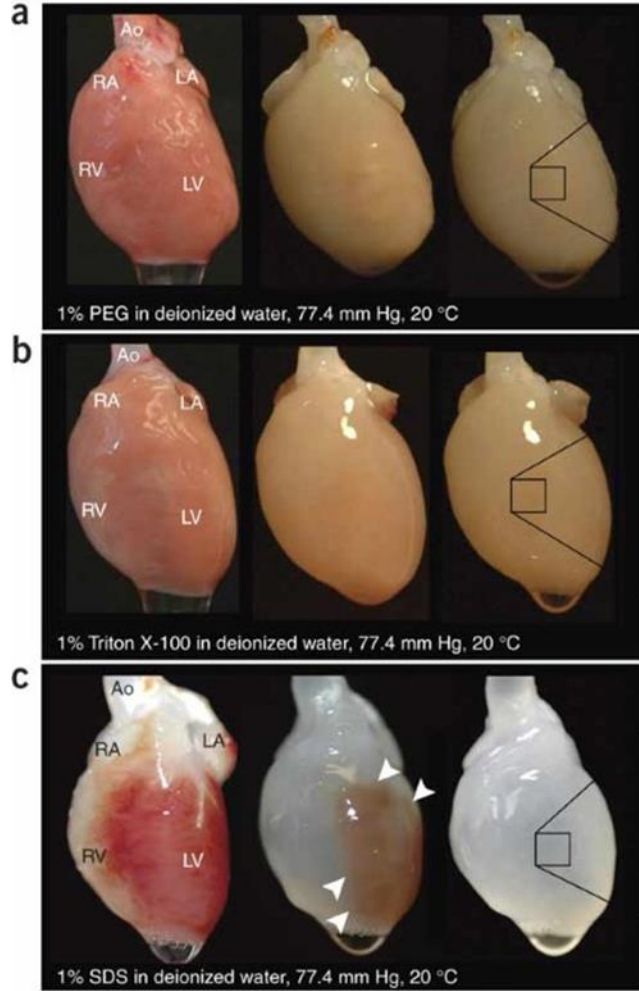
iltihaplanma gözlenmiştir. Bu nedenle araştırmacılar daha az inflamatuvar yanıt veren materyallerin kullanılması gerektiği kanısına varmışlardır [86].

Dondurarak kurutma tekniği ile elde edilen aljinat doku iskeleleri, miyokardiyal rejenerasyonda kapsamlı bir şekilde araştırılmıştır. Yapılan bir çalışmada aljinat doku iskeleleri enfarkte sıçanlara fetal kalp hücreleri ile implante edilmiş ve sonuç olarak ventrikül genişlemesi kısıtlanmıştır [87]. Ancak kardiyomiyositlerle statik olarak hücrelendirildiğinde hücrelerin yapışmasındaki sorunlar nedeniyle hücre kümeleri oluşmuş [88], bu durumu iyileştirmek için RDG sekansı ile kombine edilmiştir [89].

İpek fibroin, örümcekler veya bazı ipekböcekleri gibi böcekler tarafından üretilir ve FDA tarafından biyobozunur olmayan malzeme olarak kabul edilir. Mekanik özellikleri, biyolojik performansı ve farklı morfolojilere kolaylıkla işlenebilmesi nedeniyle doku mühendisliği alanında yaygın olarak kullanılır [90]. Kardiyak yamaların eldesi için yapılan bir çalışmada kitosan ve hyaluronik asitin kombinasyonu ile birleştirilmiş ve ipek yamalar ile kıyaslandığında hücre çoğalmasında artış ve kardiyomiyojenik farklılaşma gözlenmiştir [91].

Deselülerizasyon yöntemi (hücresizleştirme) ile elde edilen doku iskeleleri, birçok çalışmada ve ayrıca klinik öncesi ve insan klinik uygulamalarında kullanılmıştır [92]. Deselülerize dokular bir çalışmada fibrin, TGF-Beta ve mezenkimal kök hücre kombinasyonu ile sıçan enfarktüsü modelinde test edilmiştir ve pozitif sonuçlar bildirilmiştir [93]. Başka bir çalışmada enfarktüs sonrası sol ventrikül duvarı replasmanı olarak domuzlara, mesaneden türetilen deselülerize matriksin bir yaması implante edilerek ve politetrafloroetilen ile karşılaştırılmıştır. 3 ay sonunda deselülerize yama kolajen açısından zengin, hücresel ve vaskülerize bir doku oluşturmuştur [92]. Deselülerize sığır perikardından elde edilen gözenekli yapı kemik iliği kök hücrelerinden elde edilen hücre tabakaları ile birleştirilip; sıçanlarda enfarktüslü miyokardın yerine uygulanmıştır [94]. Elde edilen sonuçlarda yama gözenekleri hücreler, yeni damarlar ve kas lifleri tarafından doldurulmuş ve böylece kardiyak yapının düzelindiği ve son ventrikülün onarıldığı gösterilmiştir. Yapılan önemli başka bir çalışmada tüm sıçan kalpleri deselülerize edilmiş ve ardından yenidoğan kalp hücreleri ile yeniden

hücrelendirilmiştir [95]. Kardiyomiyositler 8 gün sonunda kalp atışlarını uyarabilecek ve kanı pompalayabilecek ölçüde gelişim göstermiştir.



Şekil 2.8. Tüm sıçan kalbinin perfüzyon deselülerizasyonu görüntüleri [95].

Sentetik Materyaller

Poli(laktik asit) (PLA) biyouyumlu, biyobozunur ve FDA onaylı bir polimerdir. Bozunma ürünleri laktik aside dönüşür mikro çevrede hafif derecede ve istenmeyen bir asitleşmeye neden olabilir [96]. Poli(glikolik asit) (PGA) ise bir termoplastiktir ve toksik özellik göstermeyen ürünlere bozunur. Ancak gerek PLA gerekse PGA kalp dokusunu taklit edebilecek esnekliğe sahip değildir. Birçok çalışmada bu özellikleri değiştirebilmek için poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) ve diğer poliesterlerle kombinasyonları çalışılmıştır. Bununla ilgili elektro-eğirme yöntemiyle elde edilmiş PLGA fibröz membranların kardiyomiyositleri nanolifler yönünde hizaladığı gösterilmiştir [27]. Bir sıçan enfarktüs

modelinde PLGA, insan amniyotik sıvı kök hücreleri ile enjekte edilmiş ve ilgili bölgede hücrelerin iyi bir şekilde yapıştığı gösterilmiştir [97]. Başka bir çalışmada sitouyumluluğu arttırmak amacıyla karbon nanofiber ile birleştirilmiştir [98].

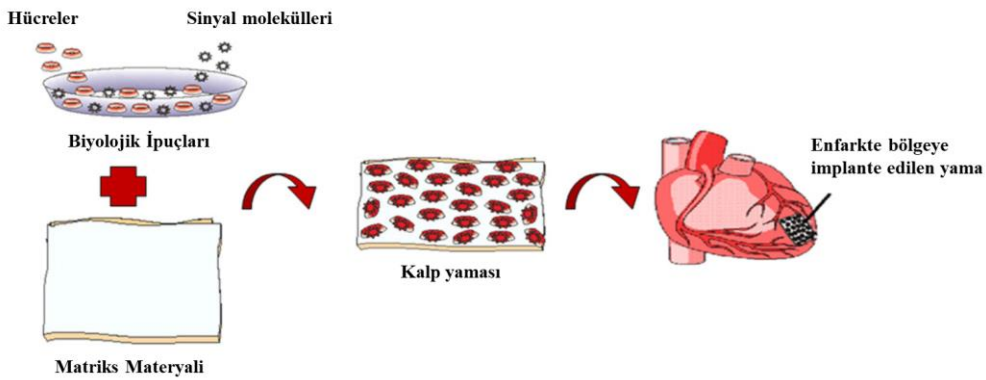
Poli(kaprolakton) (PCL), FDA onaylı, PLA ve PGA'ya göre düşük camsı geçiş sıcaklığından dolayı daha elastik yapıda bir poliesterdir. Bozunma hızının yavaş olması nedeniyle asit üretmez. Miyokard doku rejenerasyonu için yapılan bir çalışmada elektro-eğrilmiş PCL nanofibröz katmanların neonatal kardiyomyositlerle birleştirildiği 3 boyutlu yapılar önerilmiştir [99]. Başka bir çalışmada PLA, PGA ve onun kopolimeri ile birleştirilmiş ve elde edilen biyobozunur gözenekli doku iskeleleri, sıçan enfarktüs modeli için kemik iliği kökenli mononükleer hücreler ile incelenmiştir [100].

Biyomedikal alanda yaygın olarak kullanılan sentetik ve biyouyumlu yapıdaki poliüretan, üretim prosesi değiştirilerek mekanik özellikleri ve degradasyon hızları ayarlanabilir. Yapılan bir çalışmada poliestere üretan üre (PEUU) bazlı elastik gözenekli doku iskeleleri, sıçanlarda akut enfarktüslerde implante edilmiş ve düz kas demetlerinin oluşumunu teşvik ettiği, ventrikül kalınlığını arttırdığı ve kasılma fonksiyonunu iyileştirdiği gösterilmiştir [101].

Elastik deformasyondan geri kazanılabilen, biyouyumlu ve biyobozunur bir elastomer olan poli(gliserol-sebakat) (PGS), gliserol ve sebasik asitin polikondenzasyonu ile elde edilir. Sentezi polikondenzasyon aşaması ve çapraz bağlanması olmak üzere 2 aşamadan oluşur. Sentez sıcaklığı, çapraz bağlanma süresi değiştirilerek elde edilecek kardiyak yama hedeflenen mekanik özelliğe sahip olacak şekilde sentezlenebilir [102]. PGS'nin çekme mukavemeti testleri, malzemenin yumuşak elastomerik malzemeler için tipik olan doğrusal olmayan gerilme-gerinim davranışı sergilediğini göstermiştir [9]. Polimerin bu elastomerik özelliği yapısal omurgaya bağlı hidroksil grupları ile kovalent olarak çapraz bağlı üç boyutlu rastgele ağdan kaynaklanır. Hidroksil grupları arasındaki gerek çapraz bağlanma gerekse hidrojen bağ etkileşimleri yapının elastomerik özelliklerine katkıda bulunur. Genel olarak PGS malzemelerinin ortalama Young modülü 0,0250–1,2 MPa aralığında, çekme mukavemeti 0,5 MPa üzerinde ve kopmaya kadar gerinim yüzdesi ise %330'dan fazladır. PGS'nin young modulus değeri 0,02 ile 0,5 MPa arasında değişen,

miyokard dokunun young modulus değerleri arasındadır ve %260 değerindeki maksimum çekme uzaması atar damarlar ve toplar damarlar ile benzerdir [103]. Buna göre, PGS'nin bozunma hızı da ayarlanabilir [102]. PGS, ester bağlarının ayrılmasıyla yüzey erozyonuna uğrar. Bu bozunma türü doku rejenerasyonunu destekleyen doku geometrisinin daha uzun süre korunmasını sağlar [104]. Bozunma ürünleri vücutta doğal metabolik yollarla elimine edilebilir [105].

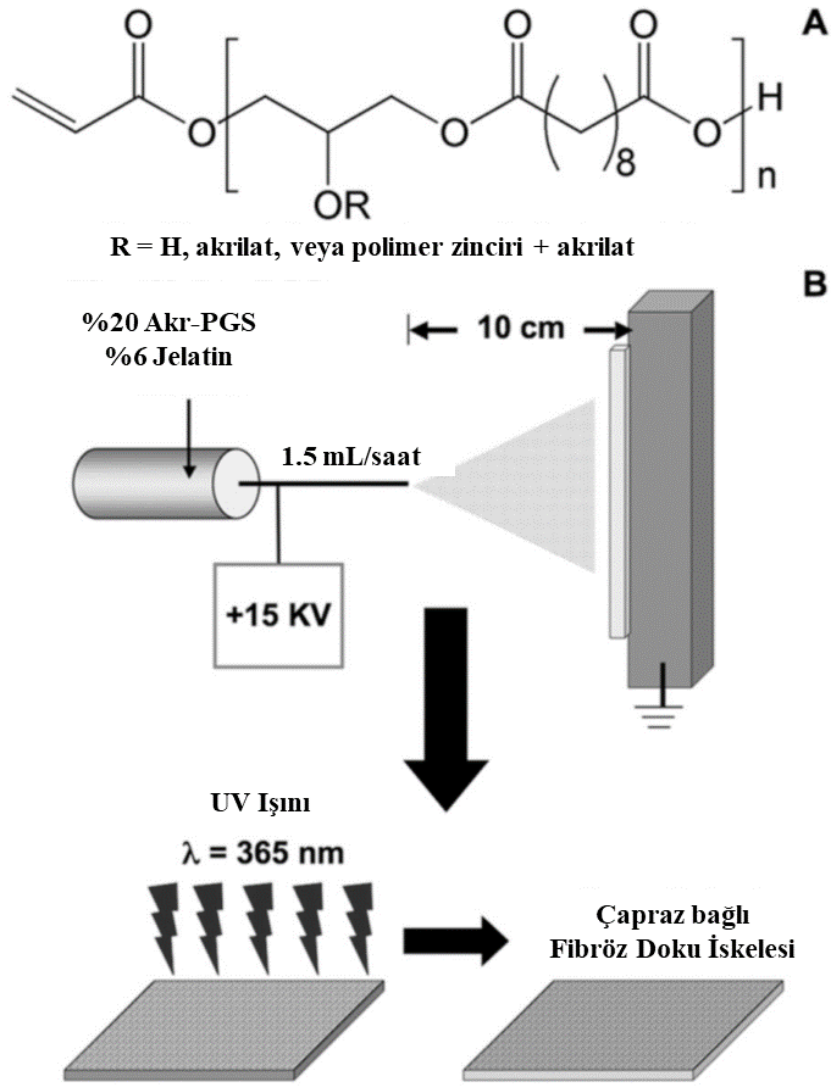
Miyokardiyal doku mühendisliği çalışmaları için araştırmacılar PGS tabanlı kardiyak yamaların geliştirilmesine odaklanmıştır (Şekil 2.9) [73, 106-110]. Başka çalışmalarda PGS filmlerinin hücreler ve sinyal molekülleri gibi biyolojik moleküller ile başarılı bir şekilde entegre edilip edilemeyeceğini değerlendirmek için hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak PGS'nin kardiyomiyositler ile hücrelendirildiği çalışmalar yapılmıştır [107, 109, 110].



Şekil 2.9. PGS temelli kardiyak yamaların doku mühendisliği yaklaşımları [102].

Yapılan bir çalışmada anizotropik yapıda ve uygun mekanik özelliklere sahip 3 boyutlu PGS gözenekli iskeleleri elde edilmiştir [111]. Bu doku iskelelerinin hücrelerin hizalanmasını desteklediği ve ventrikülün mekanik özelliğiyle eşleştiği ortaya konulmuştur. Ayrıca elektriksel uyarım altında kontraktıl özelliğe izin verdiği gösterilmiştir. Önemli mekanik özellikle sebebiyle PGS, yapılan bir çalışmada mekanik özellikleri ve biyobozunma davranışını değiştirmek için kullanılmıştır. Buna göre PGS polimeri farklı sayılarda akrilik grupları içerecek şekilde hücre yapışmasını ve

çoğalmasını arttırmak için jelatin ile birleştirilmiş ve elektro-eğirme yöntemi jelatin kabuk içeren nanolifli matların sentezi gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmaya ait şematik görünüm Şekil 2.10'da verilmiştir.



Şekil 2.10. Doku iskelesi hazırlama yöntemi, A. Reaktif Akrilatlı-PGS makromerinin kimyasal yapısı, B. Elektro-eğirme işleminin gösterimi, C. Akrilatlı-PGS makromeri, jelatin ve fotobaşlatıcıdan oluşan bir çözelti lifli bir mat oluşturmak için elektro-eğrilir ve iskele çapraz bağlı lifli doku iskeleleri oluşturmak için ultraviyole ışığa maruz bırakılır [112].

2.5. Deselülerizasyon Strateji ve Yöntemleri

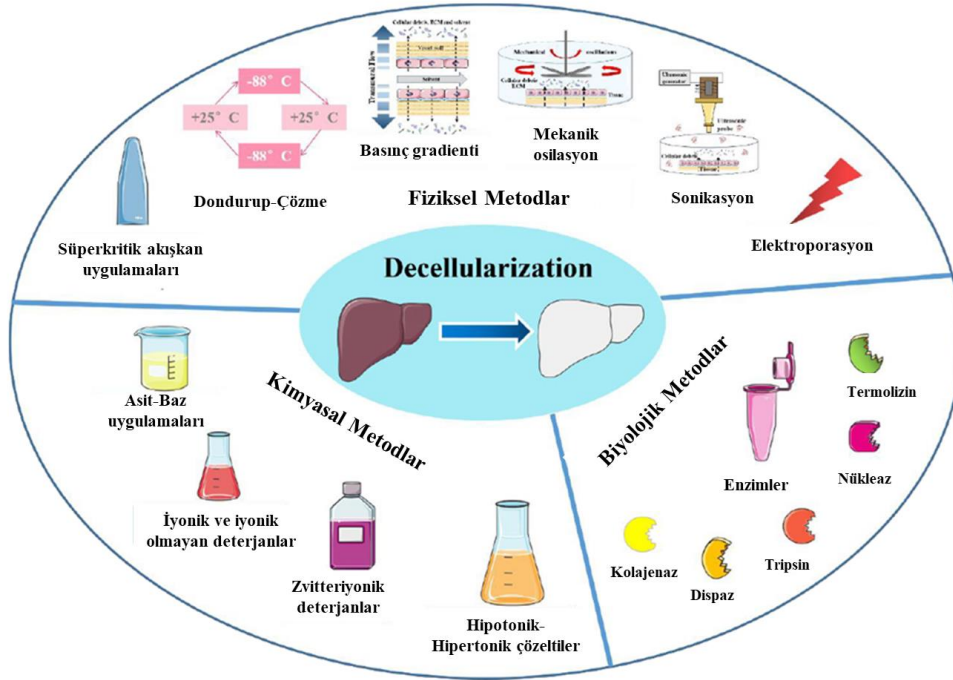
Hücreleştirilmiş doku ve organlardan türetilen biyolojik doku iskeleleri gerek klinik öncesi hayvan çalışmalarında gerekse klinik uygulamalarda başarıyla kullanılmıştır [1-8]. Bu yöntem hücrelerin doku veya organlardan uzaklaştırılıp ESM'yi oluşturan yapısal ve fonksiyonel proteinleri doku içerisinde korumayı hedefler. Temel amaç işlem sonrası dokuda kalan ESM'nin bileşimi, biyolojik aktivitesi ve mekanik bütünlüğü üzerindeki herhangi bir olumsuz etkiyi en aza indirirken, tüm hücrel materyali verimli bir şekilde dokudan uzaklaştırmaktır. Ksenojenik ve allojenik hücrel antijenler konakçı tarafından yabancı olarak tanımlanır ve dokunun inflamatuvar tepkisini indükler. Ancak ESM'nin bileşenleri türler arasında korunur ve buna bağlı olarak alıcı ksenojenik kaynaktan bile immün etkiyi tolere edebilir. Deselülerizasyon yöntemi rejeneratif tıp uygulamaları için birçok alanda araştırılmaktadır (Kalp kapakçıkları, kan damarları, deri, sinirler, iskelet kası, tendon, ince bağırsak submukozası (SIS), mesane ve karaciğer gibi birçok doku grubunda) [113].

Bugüne kadar yaygın olarak kullanılan deselülerizasyon yöntemleri fiziksel, kimyasal, biyolojik ve kombine yöntemler dahil olmak üzere farklı mekanizmalara göre 4 türe ayrılır (Şekil 2.11). Fiziksel yöntemler sıcaklık, basınç farkı, sonikasyon, dondurup-çözdürme ve süperkritik akışkan uygulamalarını içerir. Bu yöntemlerle hücre zarı lizise uğrar ve hücreler ortamdaki uzaklaşır. Bu yöntemin avantajları kolay uygulaması, immün reaksiyonu azaltmak için kimyasal reaktiflerin kullanılmaması sayılabilir. Dezavantajları arasında ise ESM mikro yapısına zarar vermesi ve buna bağlı olarak dokunun mekanik özelliklerini etkilemesidir [114]. Bu yöntemler arasında süperkritik akışkan uygulamaları ESM'nin mekanik özelliğine minimum zarar veren bir yöntem olarak bildirilmiştir [115]. Süperkritik CO₂ uygulaması ile gerçekleştirilen deselülerizasyon yöntemleri literatürde aort [116], kornea [116], miyokard [114], optik sinir [117], adipöz doku [118] ve kıkırdak [119] için bir düzine çalışma ile sınırlıdır.

Kimyasal yöntemler doku ve organlardaki hücreleri, lipidleri, antijenleri, çözümlü proteinleri ve diğer maddeleri uzaklaştırmak için kimyasal reaktifleri kullanırken; kolajen, elastin, proteoglikanlar ve glikozaminoglikanlar gibi çözünmeyen matris bileşenlerinin yapıda korunmasını sağlar. Yaygın olarak kullanılan reaktifler arasında

asit, alkali, hipotonik ve hipertonic solüsyonlar, iyonik, iyonik olmayan ve zwitteriyonik deterjanlar ve etanol gibi diğer kimyasallar bulunur. Asitler; asetik asit, perasetik asit, hidroklorik asit ve sülfürik asitleri içerir. Alkali ajanlar arasında amonyum hidroksit, kalsiyum hidroksit, sodyum sülfür, sodyum hidroksit vb. kimyasallar bulunur. İyonik non-iyonik ve zwitteriyonik deterjanlar deselülerizasyon işleminde daha başarılı ajanlardır [120]. Ancak bu tür reaktiflerin bazı dezavantajları bulunur: deterjan kalıntılarını immün reaksiyon riskini artırır, kolajen lifleri parçalanabilir, bazı büyüme faktörlerini ortadan kaldıracaktır ve ESM'nin mekanik özelliklerini olumsuz yönde etkileyebilir [121-124].

Biyolojik yöntemler belirli enzim reaktiflerini kullanarak doku ve organların hücreleştirilmesi için kullanılır. Genellikle kullanılan enzimler arasında nükleaz, kolajenaz, tripsin, lipaz, termolizin, alfa-galaktosidaz vb. bulunur [125, 126]. Biyolojik yöntemler, fiziksel ve kimyasal yöntemlere kıyasla istenmeyen hücrelere spesifik olarak etki edebilmesi amacıyla diğer doku bileşenlerine daha az zarar verebilir. Ancak bununla beraber, enzimler, proteinin mikro yapısını olumsuz etkileyerek bağışıklık tepkileri yaratabilir.



Şekil 2.11. Fiziksel, kimyasal ve biyolojik deselülerizasyon yöntemleri ve bunların kombinasyonlarını gösteren diyagram [120].

2.6. Kalp Fonksiyonunu ve Elektriksel Bütünlüğü Sağlama

Kardiyak doku onarımında hücre entegrasyonunun ve *in vivo* transplantasyonların sonuçları umut verici olsa da bazı sınırlamalar hala tartışılmaktadır. Örneğin, kardiyak doku yapıları pluripotent kök hücre uygulamalarıyla spontane kasılmaları sergilese de aritmik kasılmalar gibi etkiler görülebilir. Bu sorunun temel çözümü kardiyak doku onarımında doğal dokuyu taklit edebilen biyokimyasal, mekanik ve elektriksel ipuçlarını taşıyan kültür koşullarını sağlayabilmektir [127]. Bu amaçla elektriksel stimülasyonun etkisi kardiyomiyositler üzerinde *in vitro* olarak test edilmiştir [128].

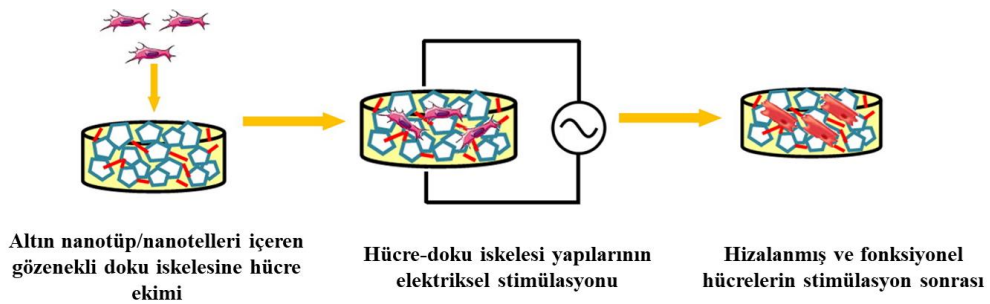
İletken özellik gösteren miyokard doku yamaları, miyokardiyal ortamı taklit eden, fonksiyonel kalp hücrelerini hatta transplantasyon sırasında elektromekanik entegrasyonunu destekleyen ve doğrudan doğal kardiyomiyosit üzerinde etki ederek kalbin elektriksel bütünlüğünü destekleyen yapılar oluşturmak için araştırılmıştır. Bu amaçla araştırılan malzemeler 3 alt başlık altında toplanır:

- (i) Altın nanoteller ve altın nanoparçacıklar gibi biyouyumluluk, düşük toksisite ve daha da önemlisi yüksek elektriksel iletkenlik sergileyen altın bazlı malzemeler;

- (ii) İletken polimerler;
- (iii) Geniş yüzey alanları, yüksek kimyasal kararlılıkları, yüksek mekanik mukavemetleri ve iletkenlikleri nedeniyle başta karbon nanotüpler olmak üzere karbon bazlı malzemeler.

2.6.1. Altın Bazlı Materyaller

Yapılan bir çalışmada, altın nanoteller makrogözenekli aljinat iskelelerin duvarlarına entegre edilmiş ve elektriksel stimülasyona maruz bırakılmıştır. Yalnızca aljinat doku iskeleleri gözenekler içinde küçük hücre kümelerinin oluşmasına neden olurken, altın nanotel yüklenmiş doku iskeleleri, kalın ve hizalı kardiyak hücre yapıları oluşturmuştur [129]. Bir kardiyak yama hücrelerin doğru hizalanmasını ve elektriksel iletimi sağlamalı ve mekanik olarak miyokard doku ile uyumlu olmalıdır. İnsanlarda miyokard dokunun sertliği, diyastolün başında ve sonunda sırasıyla yaklaşık 10 kPa ve 500 kPa'dır [106]. Buna göre altın bazlı materyallerle yapılan çalışmaların çoğu, iskele sertliğinin bu aralığın dışında olduğunu göstermiştir [127]. Bu sorun bir çalışmada 200 kPa ile 240 kPa elastikiyete sahip biyobozunur poliüretan gözenekli iskelelere altın nanotellerin ve altın nanotüplerin dahil edilmesiyle ele alınmıştır [130]. Bu çalışmaya ait şematik gösterim Şekil 2.12'de verilmiştir. Bu tür çalışmalarda temel amaç dokuyu taklit edebilecek altın bazlı iletken doku yamaları tasarlamak olsa da bu yaklaşımların *in vivo* terapötik değerlendirmeleri henüz yapılmamıştır.



Şekil 2.12. Poliüretan bazlı ve nanotüp ve nanotel dolgulu doku iskelelerine hücre ekimini ve uygulanan elektriksel stimülasyonu gösteren özet gösterim [130].

2.6.2. İletken Polimer Bazlı Materyaller

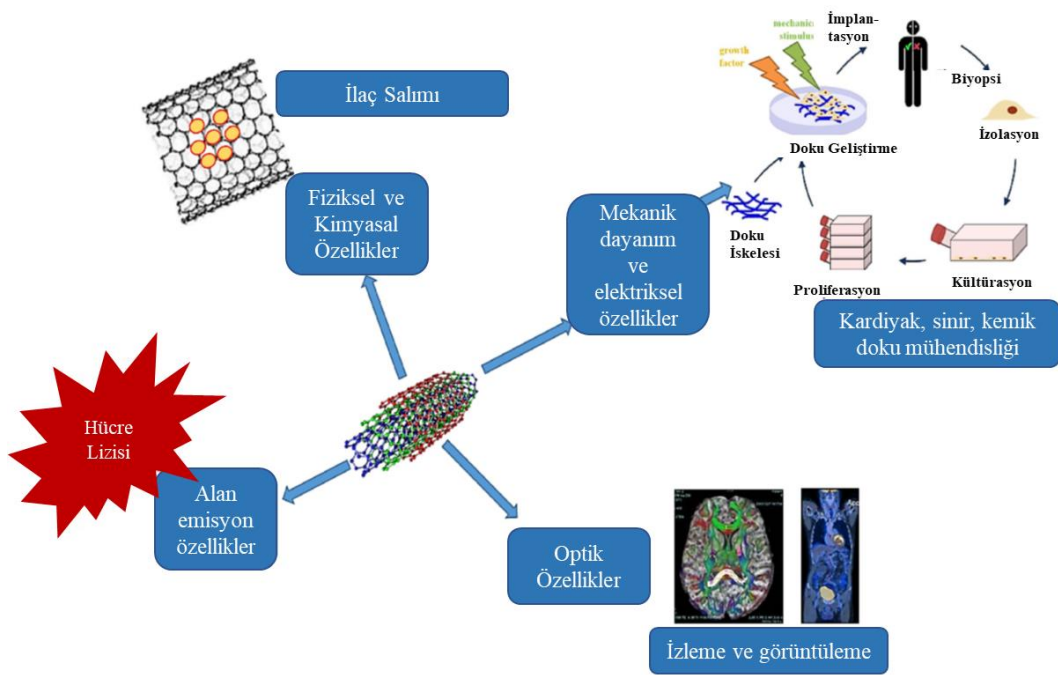
İletken polimer kategorisinde polianilin (PANI) ve polipirol (PPy) olmak üzere iki ana polimer incelenir. Birkaç çalışmada PANI tabanlı malzemelerin kardiyomiyositlerin işlevsel yeterliliğini ve elektriksel eşleşmesini *in vitro* olarak teşvik etme yeteneği araştırılmıştır [131, 132]. Baheiraei ve arkadaşları PCL ve PANI pentamerleri içeren poliüretan bazlı gözenekli doku iskelelerinin özelliklerini araştırdı [132]. Bu strateji, PANI'nin düşük biyobozunur özelliği ve zayıf mekanik özelliğini iyileştirmeyi ve aynı zamanda anilin pentameri ile iskelenin iletken özelliğinden faydalanmayı hedeflemiştir.

PPy bazlı malzemelerle ilgili olarak bir çalışmada kardiyomiyositler, PPy PCL ve jelatin karışımından oluşan elektrospan lifler üzerinde *in vitro* olarak hücrelendirilmiştir. Genel olarak, PPy konsantrasyonu malzemenin mekanik özelliklerinde, iletkenlik özelliklerinde iyileşme ve biyobozunurlukta artış sağlamıştır. Ayrıca kardiyomiyositlerin etkileşiminde olumlu sonuçlar elde edilmiştir [133].

İletken polimer uygulamalarında kardiyak doku rejenerasyonu için *in vivo* çalışmalar sınırlıdır. Bir çalışmada PPy bazlı hidrojelin, sıçan enfarktüs modelindeki etkisi incelenmiştir [134]. Enjeksiyondan 8 hafta sonra tedavi edilen grupta olumlu sonuçlar elde edilmiştir. Ancak bu çalışma sadece polimerin enjeksiyonu ile kısıtlıdır.

2.6.3. Karbon Bazlı Materyaller

Karbon nanotüpler keşfinden bu yana araştırmacılar tarafından oldukça ilgi görmüştür. Küçük çapları (birkaç nanometre) ve uzunlukları (birkaç mikrometre) ile karbon silindirik tüplerin allotroplarındır ve bu da büyük bir en-boy oranı sağlar. Çeşitli uzunluk, genişlik ve sayıda grafit katmanları ile farklı şekil ve tipler sergiler. Geometrilerine göre tek duvarlı ve çok duvarlı olarak sınıflandırılabilir. Tek duvarlı karbon nanotüpler 0,8-2 nm aralığı çapında simetrik tek boyutlu grafit tabakası ile sarılırken; çok duvarlı karbon nanotüpler 2-200 nm aralığı çapında bitişik birkaç grafit tabakasından oluşur [135]. Karbon nanotüpler biyomedikal alanda önemli ve umut verici sonuçları vaat eder [136-138]. Karbon nanotüplerin çeşitli alanlardaki uygulamaları Şekil 2.13'te verilmiştir.



Şekil 2.13. Karbon nanotüplerin çeşitli alanlardaki uygulamaları [135].

Karbon bazlı materyallerin 3 boyutlu *in vitro* yaklaşımında karbon nanotüp içeren jelatin elektro-eğrilmiş nanofiber membranlar kardiyomiyositlerle hücrelendirilmiş ve elde edilen sonuçlarda hücrelerin metabolik aktivitesinde ve gen ifadesinde artış gözlenmiştir [139]. Karbon nanotüp bazlı kompozit kardiyak yamalar ilk kez 2014 yılında *in vivo* olarak test edilmiştir. Neonatal kardiyomiyositlerle katkılanmış jelatin doku iskeleleri enfarkte sıçan kalplerine intramiyokardiyal olarak verilmiştir. Bu çalışmada, kardiyomistlerin skar dokuya göç ettiği görülmüştür. Doku iskelesi aynı zamanda düz kas hücreleri ve makrofajlar gibi konakçı hücreleri içerdiği gösterilmiştir. Bu durum iskelenin konakçı kalp dokusu ile başarılı bir şekilde entegre olduğunu göstermiştir [140].

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1. Deselüerize Miyokard Yamaların Hazırlanması

3.1.1. Materyal

Tez çalışması kapsamında sodyum dodesil sülfat (Serva, Almanya), fosfat tamponu (Sigma-Aldrich, ABD), Deoksiribonükleaz (Serva, Almanya), Ribonükleaz (Serva, Almanya), etanol (Sigma, ABD) kimyasalları deselüerizasyon işlemi amacıyla; Hematoksilen Gill-III (Merck, ABD), Eozin (Merck, ABD), DAPI (Life Tech, ABD), Verrhoff Von Gieson elastin boyası (Sigma, ABD), Mason's Trichrome boya kiti (Scytek, ABD), entellan (Merck, ABD), ksilen (Merck, ABD) boya ve sarfları histolojik boyamalar amacıyla; proteinaz K (Sigma, ABD), kondroitin sülfat (Sigma, ABD), 1,9-dimethyl-methylene (DMMB) (Sigma, ABD), sodyum klorür (NaCl) (Sigma, ABD), glisin (Fluka) ve HCl (BDH AnalaR, İngiltere) kimyasalları biyokimyasal analizler için kullanılmıştır.

3.1.2. Diseksiyon

Miyokard doku kesitlerinin hazırlanması amacıyla ilk olarak diseksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu aşamada mezbahadan temin edilen taze sığır kalpleri hızlıca laboratuvara ulaştırılmıştır. Kalp dokusunun epikardiyum ve endokardiyum tabakaları miyokard tabakadan diseksiyon ile ayrıştırılmış ve sol ventriküler duvardan epikardiyuma paralel olarak (radyal kesit) bistüri yardımıyla iki farklı uzunlukta kesitler elde edilmiştir: (i) 30 mm uzunluk, 10 mm en ve 3 mm kalınlık, (ii) 10 mm uzunluk, 10 mm en ve 3 mm kalınlık. Disekte edilen dokular fosfat tamponunda (PBS) 2 saat süreyle çalkalayıcı yardımıyla oda sıcaklığında yıkanmış ve böylece kesitler kan ve vücut sıvılarından uzaklaştırılmış ve deselüerizasyon işlemine hazır hale getirilmiştir.

3.1.3. Kimyasal Deselüerizasyon Protokolünün Optimizasyonu

Deselüerizasyon işlemi amacıyla iyonik bir deterjan olan ve yaygın olarak uygulanan SDS kullanılmıştır. Deselüerizasyon protokolü 30 mm uzunluktaki doku gruplarında ve 10 mm uzunluktaki doku gruplarında olmak üzere 2 ayrı parametre olarak incelenmiştir.

İlk aşamada 30 mm uzunluktaki doku gruplarında en etkili hücresizleştirme protokolünün belirlenmesi amacıyla muamele süresinin (saat) ve SDS konsantrasyonunun (a/h) koşulları optimize edilmiştir. SDS konsantrasyonu %0,5 ve 1 olarak; muamele süresi ise 3, 5 ve 7 gün olarak uygulanmış ve bu çalışmaya yönelik araştırılan gruplar Tablo 3.1’de özetlenmiştir. Buna göre PBS tamponu ile 2 saat süre ile yıkanan gruplar SDS uygun konsantrasyondaki SDS çözeltilerine aktarılmıştır. Deselülerizasyon işlemi çalkalayıcı içerisinde, 100 rpm hızında ve oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir ve çözelti her 24 saatte 1 kez olmak üzere tazelenmiştir. Belirlenen gün sonunda SDS içerisinden alınan dokular PBS tamponuna aktarılmış ve muamele sürelerine eş olarak 3, 5 ve 7 gün süreyle yıkanmıştır. SDS artıklarından uzaklaştırılan dokular 60 U/mL DNaz ve 40 U/mL RNaz ile 3 saat boyunca 37 °C sıcaklıkta muamele edilmiş ve ardından 3 saat süreyle PBS tamponu ile tekrar yıkanmıştır. Deselülerizasyon işlemi sonunda elde edilen doku grupları analiz süresine kadar -80 °C sıcaklıkta bekletilmiştir.

Tablo 3.1. 30 mm x 10 mm miyokard doku gruplarına uygulanan SDS konsantrasyonu ve muamele süresi parametrelerini gösteren adlandırma sistemi.

		SDS Konsantrasyonu (a/h)	
		% 0.5	% 1
Muamele Süresi (gün)	3	A	B
	5	C	D
	7	E	F

Benzer şekilde 10 mm uzunluktaki doku gruplarında etkili hücresizleştirme protokolünün belirlenmesi amacıyla ise %1 (a/h) SDS konsantrasyonunun farklı muamele süreleri uygulanmıştır. Buna göre belirlenmiş grupların adlandırılması ise Tablo 3.2’de verilmiştir. 30 mm uzunluktaki doku gruplarına uygulanan protokole benzer şekilde dokular PBS tamponu ile diseksiyon ardından yıkanmıştır. %1 (a/h) SDS çözeltisi içerisine aktarılmış ve çalkalayıcı ile oda sıcaklığında 36, 48 ve 60 saat süreyle muamele edilmiştir. Çözelti 24 saat sonlarında tazelenmiş ve tüm gruplar belirlenen süre sonlarında

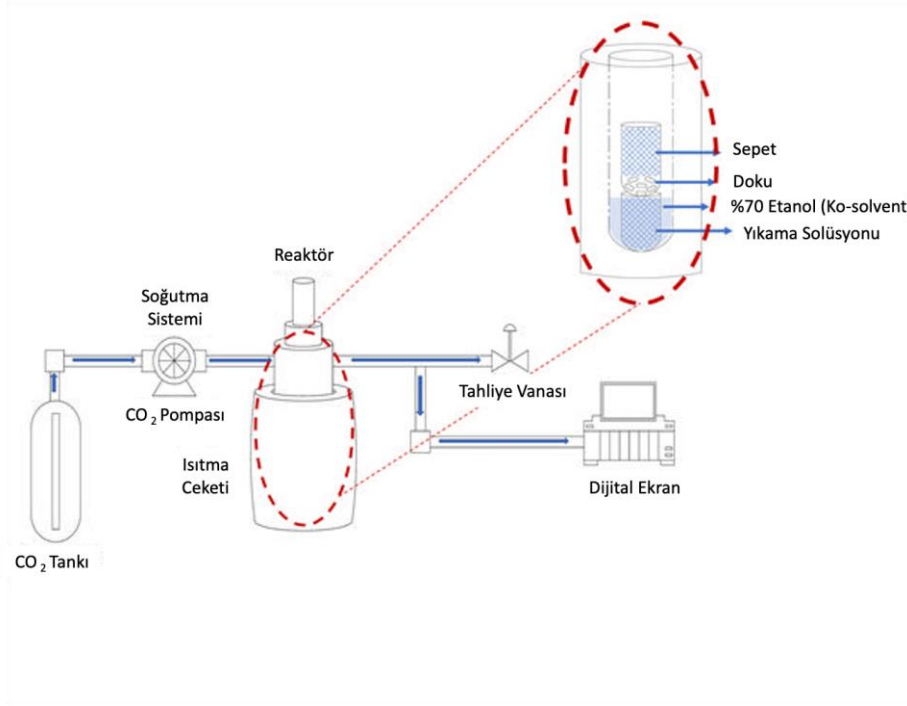
sırasıyla 36, 48 ve 60 saat süreyle PBS tamponunda yıkanmıştır. Ardından 37 °C sıcaklıkta, 3 saat süreyle, 60 U/mL DNaz ve 40 U/mL RNaz ile etkileştirilmiş ve tekrar PBS tamponu ile yıkanmıştır. Deselülerizasyon işlemi sonunda elde edilen doku grupları analiz süresine kadar -80 °C sıcaklıkta bekletilmiştir.

Tablo 3.2. 10 mm x 10 mm miyokard doku gruplarına uygulanan SDS konsantrasyonunun farklı muamele sürelerini gösteren adlandırma sistemi.

	Muamele süresi (saat)		
	36	48	60
Gruplar	G	H	K

3.1.4. Süperkritik CO₂ Yöntemle Deselülerizasyon Protokolünün Optimizasyonu

Süperkritik CO₂ akışkanı yöntemiyle (skCO₂) deselülerizasyon işlemi disekte edilen dokuların dondurma-çözme ve hipotonik-hipertonik solüsyonlarla muamele edilmesi adımlarından oluşmaktadır. Öncelikle dokular -20 °C sıcaklıkta 10 mM tris-HCl, pH 7'deki hipotonik çözelti içerisinde 1 saat dondurulmuş, ardından oda sıcaklığında 1 saat bekletilerek çözdürülmüştür. Bu adımlar toplam 5 kez tekrarlandıktan sonra gruplar, tekrar hipotonik çözelti içerisinde 12 saat süreyle mekanik olarak karıştırılmış ve ardından 1.5 M NaCl, 0.05 M tris-HCl, pH 7.6'daki hipertonic çözeltiye alınarak 12 saat etkileştirilmiştir. SkCO₂ deselülerizasyonu amacıyla ana solvente ek olarak (CO₂), reaktör 150 mL %70 (h/h) etanol ile doldurulmuştur. Örnekler n=5 olacak şekilde gözenekli sepet içerisine yerleştirilmiştir. Reaktörün kapakları gaz kaçırmayacak şekilde sıkıca kapatılmış ve reaktör içerisine 24 mL/dk'lık sabit hızda CO₂ gaz girişi sağlanmıştır. Deselülerizasyon işlemleri 37 °C sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir. Proses sonunda reaktör içindeki gaz 48 mL/dk hızıyla boşaltılmıştır. Reaktörün şematik görüntüsü Şekil 3.1'de verilmiştir.



Şekil 3.1. Süperkritik CO₂ reaktör sistemin genel çalışma prensibi [141].

İlk olarak 30 mm uzunluktaki doku gruplarına 1, 3, 6 saat süreyle 2500 psi basınç altında skCO₂ deselüerizasyonu uygulanmıştır. Ardından 10 mm uzunluktaki doku grupları da 1, 3, 6 saat süreyle 2500 psi basınç altında muamele edilmiştir. İlk önce sabit basınç değerinde süre optimizasyonu yapılmış ardından sabit sürede farklı basınç değerlerinde (3500 ve 4500 psi) çalışılmıştır. Nihai grup olarak belirlenen 10 mm uzunluktaki doku kesitlerine uygulanan skCO₂ deselüerizasyon parametreleri Tablo 3.3'te verilmiştir.

Tablo 3.3. 10 mm x 10 mm doku kesitlerine uygulanan skCO₂ muamele parametrelerini gösteren adlandırma sistemi.

	Muamele süresi (saat)		
	1	3	6
2500	SA	SB	SC
3500	SD	-	-
4500	SE	-	-

3.1.5. Deselüerize Doku İskelelerinin Karakterizasyonu

Deselüerize edilen matrislerin karakterizasyon çalışmalarına en uygun deselüerizasyon protokollerinin belirlenmesi amacıyla histolojik analizler gerçekleştirilmiştir. Ayrıca histolojik analizlere ek olarak artık DNA miktarı tayini, kolajen miktar tayini ve glikozaminoglikan tayini yapılmıştır. Histolojik analizlerde tüm grupların hematoksilin&eoizin ve DAPI boyamaları gerçekleştirilmiştir. İdeal deselüerizasyon protokolü belirlenen gruplara ayrıca Verhoeff Van Gieson ve Mason's Trichrome boyamaları ile kapsamlı histolojik analizler gerçekleştirilmiştir. Diğer yandan matrislerin kuru ağırlık değişim analizleri ile doku kalınlık analizleri gerçekleştirilmiş ve taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile mikroskobik analizleri gerçekleştirilmiştir.

3.1.5.1. Morfolojik Analiz

Deselüerize edilen kardiyak yamaların deselüerizasyon işlemi öncesi ve sonrası kamera görüntüleri kaydedilmiştir.

3.1.5.2. Histolojik Analiz

Deselüerize dokulardaki hücre çekirdekleri ve sitoplazma bütünlüğünün incelenmesi için histolojik boyama analizleri yapılmaktadır. Bunun için ilk olarak işlem görmemiş miyokard doku grupları (kontrol) ve deselüerize doku grupları %4 (a/h) paraformaldehit çözeltisi içerisinde 36 saat süreyle fikse edilmişlerdir. Fiksasyonun ardından dokular 24 saat süreyle çeşme suyu ile yıkanmış ve doku takibi başlatılmıştır. Bu amaçla dokular sırayla %70, 80, 90, 95, 100 saflıktaki kademeli alkol serisinden geçirilerek dokulardaki suyun tamamen uzaklaştırılması sağlanmış ve dokular ksilen ile sertleştirilmiştir. Sertleşen dokular, ilk olarak 60 °C'de ısıtılmış parafin bloklara gömülmüş ve ardından 4 °C'de soğumaya bırakılmıştır. Soğuyan parafine gömülü dokular tıraşlanıp mikrotom yardımıyla 5 µm'lik kesitler alınmış ve boyamaya hazır hale getirilmişlerdir.

3.1.5.2.1. Hematoksilin ve Eozin Boyama

Deselüerizasyon yönteminin belirlenmesi amacıyla sıklıkla kullanılan Hematoksilin&Eozin (H&E) histoloji boyaması işleminde, boya hücre çekirdeklerini mor-mavi renge boyarken sitoplazmayı pembe renge boyamaktadır. Histolojik analize hazırlık aşamasında parafine gömülü halde kesitler alınmış dokular H&E boyamasına

hazır hale getirilmesi amacıyla, 60 °C etüvde bekletilerek parafinin uzaklaştırılması sağlanmıştır. Ksilen ile tekrar muamele edilen kesitler alkol serisi ile rehidre edilmiş ardından 2 dk süreyle hematoksilen çözeltisinde bekletilmiş böylece çekirdeklerin mavi-mor renge boyanması sağlanmıştır. İstenenden fazla boyanan doku kesitlerine asit-alkol uygulanmıştır. Ardından kesitler 30 dk süre ile eozin ile muamele edilmiştir. İşlem sonunda ekstraselüler matris pembe renge boyanmıştır. Son olarak preparatlar çeşme suyunda yıkanmış, alkol serisi ile dehidre edilmiş ve lameller aracılığıyla entellan kapama işlemi gerçekleştirilmiştir. Kurutulduktan sonra örnekler ışık mikroskop (Leica, Almanya) altında incelenmiştir.

3.1.5.2.2. DAPI (4',6-Diamidino-2-Fenilindol) Boyama

Dokulardaki hücre çekirdekleri florasan ışık altında 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) ile mavi renge boyanmaktadır. DAPI florasan boyaması nükleik asit boyama çeşitlerinden biridir. Boyama işleminden önce doku preparatları üzerindeki parafin 60 °C'de eritilmiş ve ilk olarak alkol serisi ile rehidre edilmiştir. Boya ışığa karşı hassas olduğu için preparatların üzerine pastör pipeti ile damlatılıp hemen ardından lameller aracılığıyla kapatılmıştır. Daha sonra kuruyan doku preparatları florasan ataçmanlı mikroskop (Leica, Almanya) ile karanlıkta görüntülenmiştir.

3.1.5.2.3. Verhoeff-Van Gieson Boyama

Bir diğer boyama protokolü olan Verhoeff-Van Gieson elastin boyaması ile hücre çekirdekleri ve elastin fiberleri siyah renge, kolajen kırmızı/turuncu renge ve diğer doku elementleri sarı renge boyanmaktadır. Dokudaki kolajen, elastik fiberler ve hücre çekirdeklerinin morfolojik tespiti bu boyama uygulaması ile tespit edilmiştir. DAPI boyamasında olduğu gibi ilk olarak doku preparatları 60 °C sıcaklıkta üzerlerindeki parafinin uzaklaştırılmış ve preparatların alkol serisi ile rehidrasyonu sağlanmıştır. Daha sonra doku kesitleri Weigert's Iron Hematoxylin's karışımında dokular siyahlaşana kadar bekletilmiştir. Renk değişiminden sonra çeşme suyu ile 10 dk süreyle yıkanmış ve Van Gieson solüsyonu ile 5 dk muamele edilmiştir. Son olarak boyanan doku preparatları tekrar dehidre edilmiş ve lameller yardımıyla entellan ile kapatılmıştır. Kuruyan doku preparatları mikroskop altında incelenmiştir.

3.1.5.2.4. Masson's Trichrome Boyama

Kas dokudan kolajen gibi yapıları ayırt etmek için kullanılan üç renk boyalı bir histoloji protokolü olan Mason's Trichrome doku preparatlarımıza uygulanmıştır. Bu prosedürle sitoplazma (kas dokusu) kırmızı/pembe, bağ doku (kolajen) maviye ve hücre çekirdekleri ise koyu kırmızı olarak boyanmaktadır. Diğer boyama işlemlerinde olduğu gibi ilk olarak parafin bloklardan kesit alınan doku preparatları 60 °C sıcaklıkta bekletilmiş ve parafin, kesitlerden uzaklaştırılmıştır. Ardından preparatların alkol serisi ile rehidrasyonu yapılmış ve distile su ile yıkaması yapılmıştır. Doku preparatları 56-64 °C'ye ısıtılmış Bouin's fiksatif içerisinde 60 dk süre ile fikse edilmiş ve ardından 10 dk soğutulmuşlardır. Boyaların dokulara nüfus etmesi için uygulanan boyama prosedürü Tablo 3.4'te verilmiştir.

Tablo 3.4. Mason's Trichrome Boya Kiti protokolü ve solüsyonların doku kesitleri ile muamelesüresi.

Solüsyon	Muamele Süresi (dk)
Weigert's Iron Hematoxylin	5
Biebrich Scarlet-Acid Fuchsin	15
Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid	10-15
Aniline Blue	5-10
Acetic Acid	3-5

Boyama işleminden sonra doku preparatları alkol serisi ile dehidre edilmiş, entellan ile kapatılmış ve kurutulmuştur. Kuruyan kesitler mikroskop altında incelenmiştir.

3.1.5.3. Biyokimyasal Analizler

Histolojik analizlerin yanı sıra biyokimyasal testlerin yapılması doğal dokuların hücreleştirilmesi amacıyla kullanılan deselülerizasyon protokolü başarısının kontrolünde oldukça önemlidir. Deselülerizasyon protokolünün nicel olarak kontrolü biyokimyasal testler sayesinde yapılmaktadır. İşlem görmemiş miyokard dokularında ve deselülerize dokuların ekstraselüler matrisinde kalan artık DNA'ların biyokimyasal olarak test edilmesi ile nicel karşılaştırmaları uygulanan hücreleştirme yönteminin güvenilirliğini göstermektedir [142]. Bu amaçla dokulardaki DNA miktarının sayısal

analizi için Quant-iT™ PicoGreen® (ThermoFisher, ABD) kullanılmıştır. Diğer yandan miyokard dokularında ESM'in yapısal bütünlüğünün ne kadarının korunduğunu test etmek için kolajen miktarının tayini uygulanmaktadır. Bu doğrultuda kolajen miktar tayini için Kolorimetrik Hidroksiprolin Test kiti (Biovision, ABD) kullanılmıştır. Diğer yöntemlere ek olarak, hücre yapışması için büyük öneme sahip proteoglikan ailesinden glikozaminoglikan (GAG) miktarının işlem görmemiş miyokard ve deselülerize matrislerdeki sayısal analizi için Dimetil Metilen Mavisi (DMMB) testi kullanılmıştır.

Yukarıda bahsedilen tüm biyokimyasal analizlerin normalize edilmesi sırasında işlem görmemiş miyokard dokuları ve deselülerize matrisler -80 °C sıcaklıkta dondurulmuş ve ardından liyofilize edilmişlerdir. Bu sayede, tüm testler kuru ağırlıklar referans alınarak normalize edilmiş ve boya kalibrasyonları için standart eğriler oluşturulmuştur.

3.1.5.3.1. Genomik DNA Miktarının Tayini

İşlem görmemiş miyokard dokularında ve deselülerize dokuların ekstraselüler matrisinde kalan artık DNA'ların miktarının sayısal olarak tespit edilmesi amacıyla ilk olarak 16 saat süreyle liyofilize edilen dokular alkol ve PBS muamelesi ile sterilize edilerek tekrar kurutulmuşlardır. Ardından tüm doku grupları 24 saat boyunca, 60 °C sıcaklıkta, 1 mg/mL derişimdeki 500 µL proteinaz K ile enzimatik parçalanmışlardır. Quant-iT™ PicoGreen® (ThermoFisher, ABD) test talimatlarına göre gerçekleştirilen protokolde grupların tekrar sayısı üçtür (n=3). DNA stok solüsyonu ile artan konsantrasyonlara karşı absorbans değerleri grafik edilerek standart eğri çizilmiştir. Absorbans ölçümleri 5 tekrarlı olacak şekilde 96 kuyucuklu kültür kaplarında 485/528 nm'de mikropilaka okuyucuda (Agilent Cary Eclipse, ABD) yapılmıştır. Tüm sonuçlar dokuların kuru ağırlıkları (mg) üzerinden normalize edilmiştir.

3.1.5.3.2. Kolajen Miktarının Tayini

Kolorimetrik hidroksiprolin test kiti (Biovision, ABD) kullanılarak deselülerizasyon sonunda dokudaki kolajen miktarının tayini yapılmıştır. Analize başlarken ilk olarak işlem görmemiş miyokard (kontrol) dokuları ile deselülerize matrisler 16 saat süreyle liyofilize edilmişlerdir. Ardından 10 mg liyofilize doku örnekleri 6 N Hidroklorik asit (HCl) ile 120 °C sıcaklıkta, 3 saat süreyle parçalanmışlardır. Parçalanmış örnekler 96 kuyucuklu kültür

kaplarına 10'ar μL olacak şekilde aktararak Hidroksiprolin test kiti protokolü uygulanarak 560 nm'de mikropilaka okuyucuda (Biotek, ABD) absorbans değerleri kaydedilmiştir. Tüm doku grupları 3 tekrarlı olarak analiz edilmiştir (n=3). Test kiti içerisindeki standart czeltiler kullanılarak standart eğrisi oluşturulmuştur. Tüm sonuçların normalizasyonu dokuların mg kuru ağırlığı üzerinden yapılmıştır.

3.1.5.3.3. Sülfatlanmış Glikozaminoglikan (sGAG) Miktarının Tayini

Dimetil Metilen Mavisi (DMMB) protokolü uygulanarak işlem görmemiş miyokard (kontrol) dokusunda ve deselülerize matrisde ESM'deki sGAG miktarı ile sayısal olarak belirlenmiştir. Bu protokol için ilk olarak kontrol grubu ve deselülerize matrisler 16 saat liyofilize edilmiş ve eşit ağırlıklarla tartılarak (n=3) 24 saat süreyle, 60 °C sıcaklıkta, 1 mg/mL derişimdeki 500 μL proteinaz K ile enzimatik olarak parçalanmışlardır. DMMB test solüsyonu ise 40 mM sodyum klorür (NaCl) ve 40 mM Glisinin distile su içerisinde cznp daha sonra zerine 0.1 M HCl eklenmesi ve son olarak 4 mg 1,9-dimethyl-methylene mavisi çinko klorür ikili tuzu eklenerek tüm czeltinin 0.45 mikron filtre (Merck Milipore) ile szlmesi ile hazırlanmıştır. Bir sonraki kullanıma kadar czelti karanlık ortamda muhafaza edilmiştir. 100 mM Amonyum asetat içerisinde cznmş 2 mg/mL kondroitin sülfat ve artan konsantrasyonlarda hazırlanan czeltilerin 525 nm dalga boyunda mikropilaka okuyucu yardımıyla ölçülmüş absorbans değerleri grafik edilerek standart eğri oluşturulmuştur. Absorbans lmleri kontrol grubu, deselülerize gruplar ve hazırlanan standartlar için 40 μL hacimlerde 96 kuyucuklu kültür kaplarına aktarılmış ve 200 μL DMMB test solüsyonu eklenerek yapılmıştır. Bütün sonuçlar dokuların mg kuru ağırlığı üzerinden normalize edilmiştir.

3.1.5.4. Yaş ve Kuru Ağırlık Değişimleri ve Doku Kalınlık Analizleri

İşlem görmemiş miyokard (kontrol) dokusunda ve deselülerize matrisde kuru ağırlık değişimlerinin ve doku kalınlık değişimlerinin belirlenebilmesi amacıyla (n=5) dokular 16 saat liyofilize edilmiştir. Liyofilizasyon ncesi ve sonrası son ağırlıkları kaydedilerek, ağırlık kayıpları hesaplanmıştır. Diğer yandan tüm matrislerdeki doku kalınlığındaki değişimlerin hesaplanabilmesi için hazırlanan matrisler mikrometre aracığıyla ölçülerek karşılaştırılmıştır. Örnekleme sayısı 5 olarak belirlenmiştir.

3.2. Hibrit ve Kompozit Kardiyak Yamaların Hazırlanması

3.2.1. Materyal

PGS ve Hibrit kardiyak yamalarının sentezinde kullanılan gliserol ve sebasik asit monomerleri sırasıyla Merck (ABD) ve Sigma-Aldrich (ABD) firmalarından ithal edilmiştir. Yine yama sentezinde kullanılan etanol Sigma-Aldrich firmasından temin edilmiştir. Kompozit kardiyak yaması olarak kullanılan hibrit yamaların sentezinde kullanılan karbon nanofiber (100 nm × 20-200 µm) ve tetrahidrofur kimyasalları Sigma-Aldrich (ABD) firmasından; karbon nanotüp (8-18 nm) ise Nanografi (Türkiye) firmasında temin edilmiştir.

3.2.2. PGS kardiyak Yamaların Sentezi

Gliserol ve sebasik asit cam petri kaplarına eş molar oranda (1:1) karıştırılan monomerlerin polimerleşmesi, prepolimerizasyon ve kürleşme olarak iki basamaklı sentez yöntemiyle PGS elastomerlerinin sentezi yapılmıştır. Sentez için ilk olarak prepolimerizasyon aşaması için cam petri kaplarına tartılan monomerler, mikrodalga fırın (Midea, Çin) içerisinde 650 W gücüyle her bir dakikada 10 sn aralıklarla toplamda 5 dk boyunca radyo dalgalarına maruz bırakılarak gerçekleştirilmiştir. İkinci basamak olan kürleşme aşamasında, hazırlanan prepolimer yapı vakumlu etüvde (Mommert, Almanya), 8 mbar vakum altında ve 150 °C sıcaklıkta tutularak çapraz bağlanma gerçekleştirilmiştir. Bu aşamada prepolimerler ile 8, 10, 12 saat süreyle dehidrotermal yöntemle farklı çapraz bağlanma oranlarına sahip 3 farklı polimer elde edilmiştir. Bu polimerik yapılar oluşurken çapraz bağlanmaya katılmayan monomerlerin uzaklaştırılması amacıyla 24 saat etanol (%100) ile muamele edilmiş ve ardından etanol kalıntıları 12 saat distile su yardımıyla yıkanarak uzaklaştırılmıştır. Farklı sürelerde çapraz bağlanmış polimerler bir sonraki analize kadar oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

3.2.3. Hibrit Kardiyak Yamaların Hazırlanması

Tez çalışmasının bu aşamasında kimyasal ve süperkritik CO₂ akışkan yöntemleri elde edilen deselülerize kardiyak yamalar kullanılarak hibrit kardiyak yamalar sentezlenmiş ve tümüyle karakterize edilmiştir. Bunun için seçilen gruplar -80 °C sıcaklıkta dondurulmuş ve ardından 16 saat liyofilize edilmiştir. Liyofilize-aselüler miyokard

greftleri PGS prepolimerine 6 cm cam petriler içinde gömülmüş ve ardından 150 °C sıcaklıkta 8 mbar vakum altında dehidrotermal yöntemle çapraz bağlanmıştır. Çapraz bağlanma süresi dehidrotermal yöntemle belirlenen süre optimizasyonuna göre yapılmıştır. Süre sonunda hibritleşmiş matris soğutulmaya bırakılarak bisturi ile petrilere çıkarılmışlardır. Sentezlenen hibrit yamalardan çapraz bağlanmaya katılmayan monomerlerin uzaklaştırılması için 24 saat alkol ile muamele edilmiş ve ardından alkolün uzaklaştırılması amacıyla 12 saat süreyle distile su ile yıkanmıştır.

3.2.4. Kompozit Kardiyak Yamaların Sentezi

Hem iletkenlik özellikleri geliştirilmiş hem de sitotoksik etkileri en aza indirilerek hazırlanan optimum kompozit kardiyak yamalar hazırlanırken karbon nanofiber (KNF) ve karbon nanotüp (KNT) katkılanması yapılmıştır. Bu doğrultuda ilk olarak yama kalınlığı optimizasyonu çalışmaları yapılmıştır. Bunun için farklı prepolimer oranlarında sabit karbon yüzdesi (%1) kompozit yamalar hazırlanmış ve hibrit kardiyak yamalara paralel olarak ideal kompozit yama kalınlığı incelenmiştir. İkinci aşamada ise, prepolimer miktarı sabit tutularak %1, %2 ve %3 (a/a) oranlarında KNF ve KNT katkılanmış kompozit yapılar hazırlanıp ideal iletkenlik değerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu özelliklerin iyileştirilmesi için kompozit yamalar kimyasal olarak deselülerize edilerek liyofilize edilen miyokard greftleri kullanılmıştır.

Kompozit kardiyak yamalar hazırlanırken ilk önce prepolimer sentezi gerçekleştirilmiştir. Bunun için 6 cm cam petri kaplarına eş molar oranda (1:1) gliserol ve sebasik asit karışımı, mikrodalga fırın (Midea, Çin) içerisinde 650 W gücüyle her bir dakikada 10 sn aralık molalarla 5 dk boyunca radyo dalgalarına maruz bırakılmıştır. Süre sonunda elde edilen prepolimer soğumaya bırakılmıştır. Ardından prepolimer, KNF ve KNT belirlenen oranlarda (1 gram prepolimer için 5.5 mL tetrahidrofur (THF)) içerisinde 6 saat süreyle sonikatörde dağıtılmıştır. THF prepolimeri homojen hale getirerek KNF ve KNT'lerin prepolimer çözeltisi içerisinde eş dağılmasını sağlamıştır. 6 saat süre sonunda elde edilen çözeltiler 6 cm cam petrilere dökülmüş ve THF'in polimer çözeltilerden uzaklaştırılması için 48 saat süreyle kabin içerisinde bekletilmiştir. Prepolimer çözeltileri ilk olarak vakumlu etüvde (Mettler, Almanya), 8 mbar vakum altında ve 150 °C sıcaklıkta 1 saat süreyle tutulup prepolimerin sıvı forma geçmesi sağlanmıştır. Öncesinde elde edilmiş

deselüerize-liyofilize miyokard grefleri sıvı formdaki PGS-KNF/KNT prepolimer çözeltisi içine emdirilerek gömülmüş ve ardından 150 °C sıcaklıkta 8 mbar vakum altında dehidrotermal yöntemle toplamda 10 saat çapraz bağlanması sağlanmıştır.

Kullanılan prepolimer ve karbon oranlarına bağlı kalınlık optimizasyonu ve karbon oranı optimizasyonuna ilişkin ayrıntılı açıklamalar Tablo 3.5 ve Tablo 3.6’da verilmiştir.

Tablo 3.5. Kalınlık optimizasyonu amacıyla kullanılan prepolimer/karbon/THF miktarlarını gösteren tablo.

GRUPLAR	A	B	C	D	E
Prepolimer Miktarı (g)	1.85	2.5	3.5	4.5	5.5
%1 Karbon Nanofiber/ %1 Karbon Nanotüp (g)	0.0185	0.025	0.035	0.045	0.055
THF Miktarı (ml)	10.175	13.75	19.25	24.75	30.25

Tablo 3.6. İletkenlik optimizasyonu amacıyla kullanılan prepolimer/karbon/THF miktarlarını gösteren tablo.

GRUPLAR	X	Y	Z
Prepolimer Miktarı (g)	4.5	4.5	4.5
Karbon Nanofiber/ Karbon Nanotüp %	1	2	3
Karbon Nanofiber/ Karbon Nanotüp (g)	0.045	0.09	0.135
THF Miktarı (ml)	24.75	24.75	24.75

3.3. Tüm Kardiyak Yamaların Karakterizasyonları

3.3.1. Kimyasal Analizler

Hidrojen Nükleer Manyetik Rezonans ($^1\text{H-NMR}$) spektroskopisi ile PGS kardiyak yamaların analizleri, tüm kardiyak yamaların ise Fouirer Transform Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) ile yapı analizleri ve Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) ile termal analizleri gerçekleştirilmiştir.

3.3.2. Hidrojen Nükleer Manyetik Rezonans ($^1\text{H-NMR}$) Spektroskopisi

Çapraz bağlanma oranları farklı PGS polimerinin yapıdaki H atomları belirlenmiş ve polimer iskeleti hakkında bilgi edinmek amacıyla Hidrojen Nükleer Manyetik Rezonans ($^1\text{H-NMR}$) spektroskopisi ile karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. Bu amaçla 8, 10, 12 saat süreyle çapraz bağlanmış PGS elastomerinin analizleri her gruptan 1 g örnek alınarak Katı Hal Yüksek Güçlü 300 MHz NMR Spektrometresi (Bruker Superconducting FT.NMR Spectrometer Avance) ile gerçekleştirilmiştir.

3.3.3. Fouirer Transform Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR)

Fouirer Transform Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) kullanılarak organik ve inorganik maddelerin kimyasal yapılarının belirlenmesi, kızılötesi ışınların molekülü oluşturan atomların arasındaki bağların titreşimiyle meydana gelen frekanslarına karşılık gelen absorpsiyon değerlerinin okumasına temeline dayanmaktadır. FTIR analizinde farklı moleküler arasındaki bağlar farklı frekans bölgelerinde titreşim yaparak her molekül kendine ait bir absorpsiyon profili göstermektedir. Tez kapsamında hazırlanan tüm kardiyak yamaların kimyasal yapı analizleri ATR- FTIR (Agilent Cary 630, ABD) ile yapılmıştır. Analiz için örnekler ZnSe ATR kristali üzerine yerleştirilerek $650\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$ dalga boyundaki kızılötesi ışınları ile taranarak her bir dalga boyuna karşı gelen % transmittans pikleri kaydedilmiştir.

3.3.4. Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC)

Tez kapsamında hazırlanan deselülerize, PGS ve hibrit kardiyak yamaların termal özellikleri Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) ile gerçekleştirilmiştir (Perkin Elmer Diamond, ABD).

3.3.5. Yapısal Analizler

3.3.5.1. Morfolojik Analiz

Tez kapsamında hazırlanan kardiyak yamaların morfolojik olarak gözlemlenmesi ve görüntüleri kamera ile kaydedilerek yamaların makro yapıları karakterize edilmiştir.

3.3.5.2. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi

Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) kullanılarak hazırlanan tüm kardiyak yamaların mikro boyuttaki yapısal analizleri gerçekleştirilmiştir. Bu doğrultuda SEM analizi için hazırlanan numuneler (işlem görmemiş miyokard (kontrol) dokusu ve deselülerize doku iskeleleri) ilk olarak %2,5 (h/h) gluteraldehit ile 2,5 saat süreyle fikse edilerek kademeli alkol serisinde 20'şer dakika bekletilmiştir. Hemen ardından son olarak mutlak alkolden alınan örnekler -80°C'de dondurularak 16 saat süreyle liyofilize edilmiştir. Diğer yandan hibrit ve kompozit doku iskeleleri ise sentez sonrasında herhangi bir ön işleme maruz bırakılmadan direkt olarak SEM analizleri gerçekleştirilmiştir. Tüm kuru SEM analiz örnekleri plazma ortamında fiziksel buhar biriktirme (physical vapor deposition) yöntemiyle yaklaşık 10 nm kalınlığında altın (Au)-paladyum (Pd) ile kaplanarak taramalı elektron mikroskobu (Carl Zeiss Evo, Almanya; Tescan GAIA 3, Çek Cumhuriyeti) kullanılarak detaylıca görüntülenmiştir.

3.3.5.3. Bilgisayarlı Mikro Tomografi (μ -CT) Analizi

Tez kapsamında yapılan bilgisayarlı mikro tomografi analizleri sayesinde hazırlanan kompozit kardiyak yamaların 3 boyutlu yapıları incelenmiştir. μ -CT analizleri için 1 cm x 1 cm boyutlarında hazırlanan kompozit örnekler SkyScan 1275 cihazı ile 10 μ m kesit aralığında, 40 kilovoltta 250 mili amperde görüntülenmiştir. (Rotasyon basamağı 0.2, 360° çekim).

3.3.6. Mekanik Değerlendirme

Hazırlanan tüm kardiyak yamaların mekanik davranışları çekme testi ile belirlenmiştir. Çekme testleri için, 1 cm x 1 cm boyutlarındaki kardiyak yamalarına radyal kesitlere CellScale Biomaterial Tester (CellScale Univert, Kanada) mekanik cihazı ile 50 N yükleme hücresi ve 30 mm/dk çekme hızı ile çekme kuvveti uygulanmıştır (n=4). Analiz sonucunda numunelerin elastisite modülleri (kPa), uzama kabiliyetleri (%) ve mukavemet değerleri (kPa) karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir. Gerinim-deformasyon eğrisi üzerinden %20-%40 deformasyon alanı aralığında elastisite modülü hesaplanmıştır. Ayrıca tez kapsamında hazırlanan farklı sürelerde çapraz bağlanmış PGS elastomerinin molar çapraz bağlanma yoğunluklarını belirlemek amacıyla örneklere aynı koşullar altında mekanik çekme analizleri yapılmıştır. Yine bu numunelerde de gerinim-deformasyon eğrisi üzerinden %20-%40 deformasyon alanı aralığında malzemelerin elastisite modülleri belirlenmiştir. Elastisite değerleri kullanılarak, Flory Teorisi [143, 144] denklemine göre (i) örneklerin molar çapraz bağ yoğunlukları hesaplanmıştır:

$$(i) \quad n = E/3RT$$

Buna göre: n molar çapraz bağlanma yoğunluğunu (mol/m^3); E elastisite değerini (N/mm^2); R gaz sabitini (Nm/mol.K) ve T ise sıcaklığı (K) ifade etmektedir.

3.3.7. Degradasyon Çalışmaları

Tez kapsamında hazırlanan tüm kardiyak yamaların fizyolojik ortamdaki biyobozunma davranışlarının incelenmesi amacıyla tüm kardiyak yamalar eşit ağırlıkta tartılarak (n=3) 10 mL PBS (100 mM, pH=7.4) içerisinde 1., 7., 14., 21. ve 28. günler boyunca 37 °C sıcaklıkta çalkalayıcı içerisinde bekletilmiştir. Doku iskelelerinin başlangıç ve belirlenen günler sonunda ağırlıkları kaydedilmiştir. Süre sonunda doku iskeleleri 37 °C sıcaklıkta 24 saat süreyle kurutulmuş ve son ağırlıkları belirlenmiştir. Doku iskelelerinin degradasyon yüzdeleri (ii) formülüne göre hesaplanmıştır:

$$(ii) \quad \text{Degradasyon yüzdesi (\%)} = (W_o - W_s) / W_o \times 100$$

3.3.8. Nano-Mekanik Davranışların İncelenmesi

Atomik Kuvvet Mikroskobu (AKM) kullanılarak kardiyak yamaların nanoindentasyon çalışmaları ekstraselüler matriks yapılarının nano ölçekte mekanik olarak analizi amacıyla gerçekleştirilmiştir. Optik bir mikroskop olan AKM yardımıyla yamalar üzerinde uygun analiz bölgeleri seçilmiş ve AKM tipinin bu bölge üzerine getirilmesi ile tarama yapılmıştır. AKM kontakt modda görüntüleme tipinde kullanılmış ve tüm örnekler (1 cm x 1 cm) n=2 olacak şekilde fizyolojik ortamda bekletilmiştir. AKM’de kullanılan tip piramit şeklinde ve en uç noktasındaki çap değeri 20 nm’dir. Yüzey penetrasyon derinliği (h) 300 nm, yay sabiti ise 1 N/m’dir. Elde edilen AKM görüntüsü üzerinde uygun fiber belirlenerek yazılım yardımıyla işaretlenmiş noktalardan indentasyon işlemi yapılmıştır. Elastisite modülü AKM ile elde edilen kuvvet-indentasyon eğrilerine göre Hertz kontakt model formülüne dayanarak hesaplanmış ve sonuçlar mekanik analiz sonuçları ile kıyaslanmıştır (iii).

$$(iii) \quad F = \frac{4 \cdot E_m \cdot R^{\frac{1}{2}}}{3 \cdot (1-\nu^2)} \delta^{1/2}$$

Buna göre; gerçek elastik modülü E_m , kantilever çapı R , uygulanan kuvvet F , indentasyon derinliği ve ν ise Poisson oranıdır. Buna göre kardiyak yamalar için elastisite modül değerleri hesaplanmış ve bu sonuçlar mekanik analiz sonuçları ile kıyaslanmıştır.

3.3.9. İletkenlik Analizleri

Keithley 2450 cihazı kullanılarak hazırlanan kompozit kardiyak yamaların iletkenlik ölçümleri gerçekleştirilmiştir. İletkenlik özelliği malzemeden geçen akımın akış yeteneğine dayandığı gibi direnç ile ters orantılıdır. Ölçümler sırasında kompozit yapıların iletkenlik ve direnç özellikleri 4 nokta prob ölçüm tekniği ile belirlenmiştir. İletkenlik sonuçları (σ) aşağıdaki denkleme (iv) göre yorumlanmıştır:

$$(iv) \quad \sigma = \frac{1}{\rho}, \quad \rho = \frac{VA}{l l}$$

Buna göre ρ öz direnç, V ölçülen voltaj, I malzemeden akan akım, A temas eden alan ve l isemalzemenin uzunluğu olarak tanımlanır. Elde edilen sonuçların birimlerinde iletkenlik değerleri Siemens/metre (S/m); direnç değerleri ise Ohm.metre (Ohm.m) olarak ifade edilmiştir.

3.4. Hücre Kültürü Çalışmaları

Tez kapsamında hazırlanan kardiyak yamaların *in vitro* performanslarının değerlendirilmesi yapılmıştır. Bu amaçla hem kimyasal yöntemle deselülerize edilmiş greftlerle elde edilen hibrit ve kompozit yamalar hem de süperkritik yöntemle deselülerize edilmiş greftlerle elde edilen hibrit ve kompozit kardiyak yamaları insan kardiyomiyosit hücreleri ile tekrar hücrelendirilmiştir. Statik kültür koşullarında gerçekleştirilen analizler aşağıda detaylıca açıklanmıştır.

3.4.1. Materyaller

Hücre kaynağı olarak insan kardiyomiyosit hücreleri (Promocell, Almanya) ve kardiyomiyosit besi ortamı (Promocell, Almanya) kullanılmıştır. Hücre kültürü çalışmaları boyunca besi ortamı için antibiyotik (Life Tech, ABD), fetal sıgır serumu (Life Tech, ABD), tripsin (Biological Industries, ABD), Dulbecco's PBS (D-PBS) (Capricorn, ABD) kimyasalları kullanılmıştır. Metabolik aktivitenin değerlendirilmesi amacıyla alamar mavisi çözeltisi (Invitrogen, ABD); canlı/ölü analizi amacıyla canlı ölü boyama kiti (Sigma, ABD) ve sitotoksitenin değerlendirilmesi amacıyla ise 3-(4,5-dimetiltriazol-2-il)-2,5, difeniltetrazolyum (Biotium, ABD), DMEM (Capricorn), L929 fare fibroblast hücreleri (NCTC klonu 929, ATTC), L-glutamin (Sigma, ABD), Dimetilsülfoksit (DMSO)'dan yararlanılmıştır. SEM ile karakterizasyon için etanol (Merck, ABD) ve hekzametildisilazan (HDMS) (Sigma, ABD) kimyasalları kullanılmıştır. Gerçek zamanlı PCR analizleri için Purelink RNA izolasyon ve Power SYBR Green PCR kitleri (Thermo fisher scientific, ABD) ile Trizol (Qiagen, Almanya) kullanılmıştır.

3.4.2. Sterilizasyon

Hücre ekimine başlamadan önce ilk olarak malzeme sterilizasyonu için, hibrit ve kompozit doku iskeleleri %70 (h/h) alkol içerisine alınarak hücre kültür laboratuvarına

aktarılmışlardır. Malzeme sterilizasyonunda doku iskeleleri %70 alkol içerisinde steril ortamda 2 saat bekletilip süre sonunda 3 kez PBS tamponu ile yıkanmışlardır. Yıkanan doku iskeleleri her yüzeyi 20'şer dakika olmak üzere toplamda 40 dk UV ışık altında sterilize edilmiştir.

3.4.3. Hücrelerin Kültürü ve Pasajlanması

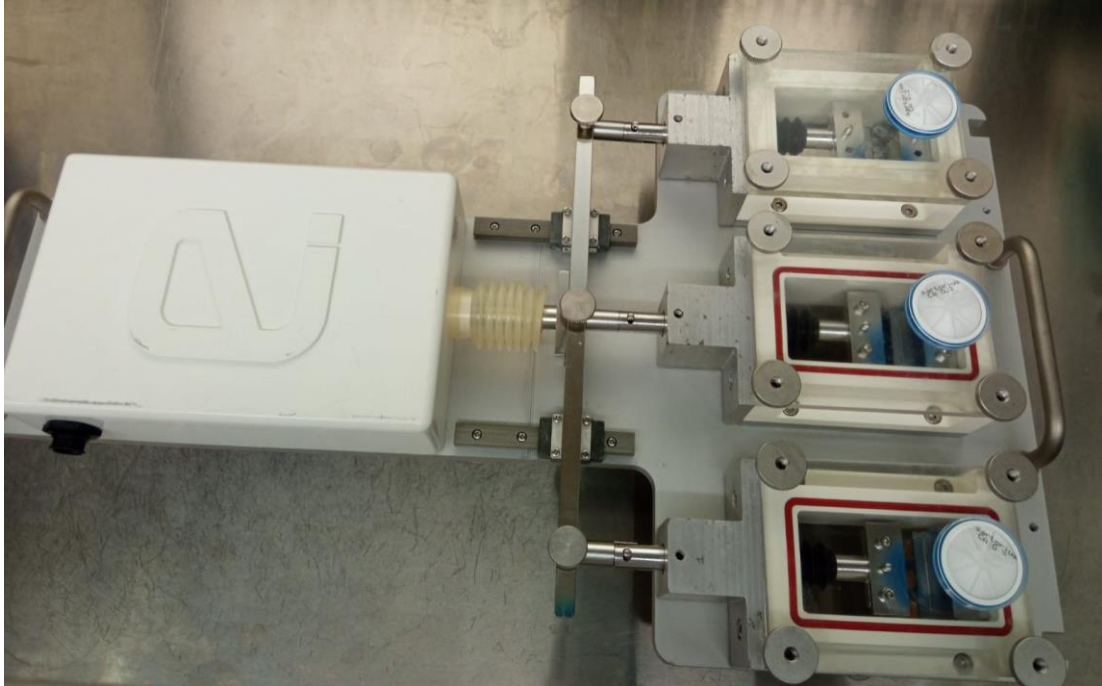
İnsan kardiyomyosit hücreleri (P1) pasajlanmak üzere azot devarından sıcak su banyosuna taşınmış, 2 dk süreyle 37 °C'de bekletilmiş ve 25 cm²'lik hücre kültür kabına ekim yapılmıştır. Daha sonra kültür kabına kardiyomyosit besi ortamı eklenmiştir. 37 °C sıcaklıkta, %5 CO₂ ve %95 nem içeren inkübatör içerisinde (Mettler, Almanya) kültür flaskı 7 gün süreyle proliferasyona bırakılmıştır. 2-3 günde bir besi ortamı tazelenerek toplamda 7 gün süren proliferasyonun ışık mikroskop görüntüleri kaydedilmiştir. Hücre yoğunluk oranına %80-90 ulaşan hücrelerin üzerinden besiyerleri uzaklaştırılarak yerine 2,5 mL hacimde 1X Trypsin (%0.05 Trypsin-EDTA / %0.01 EDTA) eklenip 5 dk süreyle oda sıcaklığında hücrelerin yüzeyden kalkması sağlanmıştır. %5 fetal sıgır serum (FBS) içeren (1X Dulbecco's PBS) çözelti ile yüzeyden kalkan hücreler muamele edilerek trypsin aktiviteleri durdurulmuş ve hücreler santrifüj (Hettich, Almanya) yardımıyla çöktürülmüştür. Hücreler toplamda 5. Pasaj (P5)'a kadar aynı prosedürle proliferasyon edilmişlerdir. 5. pasaj hücreleri son olarak antibiyotik-antimikotik ilaveli kardiyomyosit besi ortamına aktarılmış, antibiyotik-antimikotik ilaveli besi ortamındaki davranışları ışık mikroskopu yardımıyla değerlendirilmiştir.

3.4.4. Statik Hücre Kültürü Çalışmaları

Kimyasal olarak ve süperkritik yöntemle deselülerize elde edilmiş hibrit ve kompozit (tüm kardiyak yamalar) yamalar 1 cm x 1 cm boyutlarında hazırlanıp tekrardan hücrelendirilme aşamasına geçmeden önce sterilizasyon işlemine tabi tutulmuşlardır. Reselüerizasyon adımı ise insan kardiyomyosit hücreleri (P5) 3x10⁴ hücre/doku iskelesi yoğunluğunda dokular üzerine ekilmiş ve 21 gün boyunca statik olarak kültürü yapılmıştır.

3.4.5. Dinamik Hücre Kültürü Çalışmaları

Dinamik kültür ile elde edilen kardiyak yamaların mekanik stres uygulamaları Ebers TC-3 (İspanya) biyoreaktörü ile gerçekleştirilmiştir. Biyoreaktörün görüntüsü Şekil 3.2’de verilmiştir. Biyoreaktörün ana gövdesi hariç tüm parçaları sırasıyla sabunlu su ve virkon ile yıkanarak temizlenmiş ve ardından %70 (h/h) etanol ile silinerek 121 °C’de 21 dk süreyle otoklavlanmıştır (Nüve, Türkiye). Ana gövde ise %70 (h/h) etanol ile silinerek 4 saat UV ışınlarına maruz bırakılarak temizlenmiştir. Steril edilen tüm kısımlar steril pens ve alyanlarla yeniden bir araya getirilerek monte edilmiştir. 10 mmx10 mm boyutundaki sterilize edilen kardiyak yama örnekleri biyoreaktör kuyucuklarına yerleştirildikten sonra kuyucukların kapakları vidalanarak kapatılmıştır. Biyoreaktörün sıvı yükleme kısımlarına steril 0,22 mikron şırınga filtreleri (Sartorius, Minisart) yerleştirilmiştir.



Şekil 3.2. Biyoreaktör sisteminin genel görünümü.

Biyoreaktör deneylerinde kullanılan tüm kardiyak yamaların çalışma koşulları Tablo 3.7’de özetlenmiştir. Tablo 3.7’de görüldüğü gibi tüm kardiyak yamalar 1. ve 2. gün statik olarak (durağan) kültüre edildikten sonra kalan 12 gün süresince günde 4 saat boyunca %5 ile %10 çekme yüzdesi ile 1 Hz frekansta mekanik etkiye maruz bırakılmıştır.

Tablo 3.7. Dinamik kültür çalışma koşulları.

Çekme Yüzdesi	%5 - %10
Çekme Frekansı	1 Hz
Mekanik Etki Uygulama Süresi	4 saat/gün

Belirtilen çalışma koşullarında tüm kardiyak yamalar sırasıyla %5 ve %10 çekme kuvvetine maruz bırakılmışlardır. Steril haldeki kardiyak yamalar, biyoreaktör kuyucuklarına steril pens ile yerleştirilerek her doku iskelesi için 3×10^4 kardiyomiyosit hücre ekimi yapılmıştır. Hücrelerin ekiminden sonra her kuyucuk içerisine 8 mL hacimde kardiyomiyosit besi ortamı ilave edilip 2 gün boyunca statik olarak kültürü yapılmıştır. Kardiyomiyosit besi ortamları gün aşırı olmak üzere yenilenerek 12 gün boyunca günde 4 saat belirtilen yüzdelerde dinamik olarak çekme kuvvetine maruz bırakılmışlardır.

3.4.6. Statik ve Dinamik Hücre Kültürü Karakterizasyonları

3.4.6.1. Sitotoksisite analizi

Kantitatif bir tayin yöntemi olan MTT (3-(4,5-dimetiltriazol-2-il)-2,5, difeniltetrazolyum) elüsyon analizi sayesinde doku iskelelerinin sitotoksik etkileri belirlenmiştir. MTT analizi için ilk olarak doku iskelelerinin ekstraksiyonları hazırlanmıştır. ISO-10993 standardına göre 0.2 g/mL miktarında hazırlanan iskeleleri (doku iskelesi/DMEM) 24 saat süreyle 37 °C sıcaklıkta inkübe edilmiştir (n=3). Süre sonunda ekstraksiyon besiyeri 0,45 mikron filtrelerden geçirilerek süzölmüş ve analiz başlayana kadar +4 °C'de bekletilmiştir. MTT testi için 24 kuyucuklu kültür kaplarında (2×10^4 hücre/kuyucuk) L929 fare fibroblast hücrelerinin 24 saat boyunca proliferasyonu yapılmış, ardından 24 saat boyunca hücreler ekstraksiyon besi ortamları (%1 antibiyotik, %1 L-glutamin, %10 FBS) ile %100, %75, %50, %25 ve kontrol grubu (h/h, ekstraksiyon/DMEM) konsantrasyonlarında inkübatörde etkileştirilmişlerdir. Süre sonunda MTT analizi için ekstraksiyon besi ortamı uzaklaştırılmış ve yerine 60 µL MTT (2,5 mg/mL) çözeltisi içeren 660 µL DMEM ilave edilerek 3 saat süreyle karanlık ortamda inkübe edilmiştir. Süre sonunda kuyucuklardan DMEM uzaklaştırılıp DMSO ile formazan kristallerinin çözünmesi sağlanmıştır. Kuyucuklardaki ekstraksiyonların 570 nm dalga boyunda absorbans değerleri 96 kuyucuklu kültür kabında mikropilaka okuyucuda elde edilmiştir.

3.4.6.2. Hücre Metabolik Aktivitesinin Değerlendirilmesi

İnsan kardiyomiyositlerle hücrelendirilen doku iskelelerine statik kültür koşullarında 1., 4., 7., 14. ve 21. günlerde; dinamik kültür koşullarında ise 4., 7. ve 14. günlerde Alamar Mavisi analizleri yapılarak hücre metabolik aktiviteleri değerlendirilmiştir. Bu amaçla ilk olarak kardiyomiyosit besi ortamı içerisine hacimce 1/10'u kadar (%10) Alamar solüsyonu eklenerek alamar çözeltisi hazırlanmıştır. Ardından doku iskeleleri üzerindeki besi ortamı uzaklaştırılarak (n=3) alamar çözeltisi ilave edilmiş ve 4 saat boyunca 37°C sıcaklıkta, %5 CO₂ ve %95 nem içeren inkübatörde etkileştirilme yapılmıştır. Süre sonunda çözelti 200'er µL hacimlerde 96 kuyucuklu kültür kaplarına aktarılarak (n=4) 570/600 nm'de mikropilaka okuyucu (Biotek, ABD) yardımıyla absorbans değerleri okunmuştur. Ayrıca, hücre ekilmemiş doku iskelesi (negatif kontrol) hücre ekilmiş iskeleler ile aynı şartlar altında alamar çözeltisi ile 4 saat boyunca 37 °C sıcaklıkta, %5 CO₂ ve %95 nem içeren inkübatörde etkileştirilmiş ve yine aynı koşullarda 570/600 nm dalga boyundaki absorbans değerleri kaydedilmiştir.

3.4.6.3. Hücre Canlılığının Değerlendirilmesi

Plazma membran bütünlüğünün kaybolmasıyla kırmızıya boyanan (propidyum iyodür) ölü hücreler ve hücre içi esteraz aktivitesinin varlığı ile yeşile boyanarak (Calcein AM) yoğun florasan ışımaya yapan canlı hücreler incelemeleri ile canlı/ölü hücre canlılık ve sitotoksiste testi yapılmaktadır. Hücre canlılığı test edilirken insan kardiyomiyositleri ile hücrelendirilen doku iskelelerine statik kültür koşullarında 7., 14. ve 21. günlerde; dinamik kültür koşullarında 7. ve 14. günlerde canlı/ölü analizi yapılmıştır. Analiz için doku iskeleleri üzerinden besiyerleri uzaklaştırılıp (n=2) iskeleler Dulbecco's PBS ile yıkanmışlardır. Ardından 1 mL PBS içerisinde hazırlanan 2 µL Calcein AM, 1 µL propidyum iyodür içeren test solüsyonu doku iskeleleri üzerine eklenerek inkübatör içerisinde 20 dk süreyle 37 °C sıcaklıkta etkileştirilmiştir. 20 dakika sonunda doku iskeleleri D-PBS ile yıkanarak florasan ataçmanlı mikroskop (Leica, DM IL LED, Almanya) ile görüntülenmiştir.

3.4.6.4. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi

İnsan kardiyomiyosit hücreleri doku iskeleleri üzerinde statik kültürün 7. 14. ve 21. günlerinde; dinamik kültürün ise 7. ve 14. günlerinde fikse edilerek hazırlanan iskelelerin

taramalı elektron mikroskop görüntüleri alınmıştır. Numuneri hazırlamak için ilk olarak doku iskeleleri üzerindeki besiyerleri uzaklaştırılarak D-PBS yıkaması yapılmıştır. Hücreler 30 dk süreyle %4 paraformaldehit ile fikse edilmiş ve ardından fiksatif ajanı uzaklaştırılması amacıyla D-PBS yıkaması yapılmıştır. Yıkanan doku iskeleleri sırasıyla %30, %50, %70, %80, %90 ve %100 etanol serisinden geçirilerek üzerine şırınga yardımıyla HDMS damlatılarak kurutulmaya bırakılmışlardır. En son adımda ise tüm doku iskeleleri plazma ortamında fiziksel buhar biriktirme (physical vapor deposition) yöntemiyle yaklaşık 10 nm kalınlığında altın (Au)-paladyum (Pd) ile kaplanarak taramalı elektron mikroskobu (Tescan, Çek Cumhuriyeti) görüntüleri alınmıştır.

3.4.6.5. Glikozaminoglikan (GAG) Miktarlarının Belirlenmesi

Statik ve dinamik kültürün ardından doku iskeleleri üzerinde hücrelerin proliferasyonu ile artan GAG miktarının belirlenmesi için DMMB (dimethyl methylene blue) analizi yapılmıştır. DMMB analizi için ilk olarak statik ve dinamik kültürün 7. ve 14. günlerinin sonunda doku iskeleleri (n=3) üzerindeki besiyerleri uzaklaştırılmış ve iskeleler 15 mL falcon içerisine aktarılarak üzerlerine 500 µL hacimde 1 mg/mL derişimdeki proteinaz K (100 mM amonyum asetat içerisinde) eklenmiştir. Tüm iskeleler 16 saat süreyle 60 °C sıcaklıkta bekletilmişlerdir. Süre sonunda doku iskeleleri sıvıdan uzaklaştırılmış ve 5 dk süre boyunca 5000 rpm'de santrifüj edilmişlerdir. Geriye kalan sıvı örnekler 40 µL hacimde olacak şekilde 96 kuyucuklu kültür kaplarına aktarılmış ve üzerine 200 µL kadar DMMB (dimethyl methylene blue) çözeltisi eklenmiştir. Tüm grupların 520 nm dalga boyunda UV absorbans değerleri mikropilaka okuyucu yardımıyla okunmuştur. Eş boyuttaki doku iskeleleri eş sürelerde proteinaz K ile etkileştirildikten sonra elde edilen çözeltinin aynı yöntemle absorbans değerleri okunarak sonuçları normalize edilmiştir. Bu absorbans değerleri statik ve dinamik kültür UV absorbans değerlerinden çıkarılarak aradaki fark elimine edilmiştir.

3.4.6.6. Gen Ekspresyonu Analizleri

Tez kapsamında hazırlanan kardiyak yamaların statik ve dinamik kültür koşulları sırasında hücre ekiminin 1. gün, 4. gün ve 14. gün sonlarında hücrelerin ifade ettikleri gen düzeyleri araştırılmıştır. 1, 4 ve 14. gün sonlarında yamaların üzerindeki besiyerleri uzaklaştırılarak yamalar analiz zamanına kadar -80 °C sıcaklıkta muhafaza edilmişlerdir.

Gen düzeyi analizi öncesinde yamaların oda sıcaklığına ulaşması beklenmiştir. Daha sonra yamaların sırasıyla RNA izolasyonları, komplementer DNA (cDNA) sentezleri gerçekleştirilmiş ve cDNA'ye çevrilen örneklerin RT-PCR ile gen ifade düzeyleri belirlenmiştir. Bu amaçla uygulanan metod aşağıdaki başlıklar altında sırasıyla ve detaylıca anlatılmıştır.

3.4.6.6.1. RNA İzolasyonu

Doku iskelerindeki hücrelerin RNA izole etmek için doku iskeleleri ependorf tüplere geçirilmiş ve her bir ependorfa 500 µL TRIzol eklenerek oda sıcaklığında 15 dk bekletilmiştir. 15 dk sonunda örnekler 10 s vorteklenip üzerlerine 100'er µL kloroform eklenerek 20 kere dikkatlice alt üst edilmiştir. Oda sıcaklığında 3 dakika inkübasyona bırakılmışlardır. Bu aşamadan sonra izolasyona Purelink RNA izolasyon kiti kullanılarak devam edilmiştir. Daha sonra 4 °C'de 10 dk 13000 rpm'de santrifüj edilmişlerdir. Santrifüjle ayrılan fazlardan üstte kalan kısım dikkatli bir şekilde temiz ependorf tüplere aktarılmıştır. Alttaki kalan faz ise uzaklaştırılan sıvı faz kadar %70 soğuk alkol eklenerek, homojen bir yapı elde edilene kadar vortekslenmiştir. Daha sonra homojen karışım kolon içerisine aktararak, 10.000 G'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda filtrenin altında kalan sıvı uzaklaştırılırken filtrenin üzerine 500 µL yıkama tamponu 1 (wash buffer 1) eklenerek 10.000 G'de 30 saniye santrifüj yapılmıştır. Daha sonra yine filtrenin altında kalan sıvı uzaklaştırılırken filtrenin üzerine 500 µL yıkama tamponu 2 (wash buffer 2) eklenerek 10.000 G'de 1 dakika santrifüj yapılmıştır. Daha sonra alttaki sıvı uzaklaştırılarak bu aşama 2 kez tekrar edilmiştir. 2 tekrarlı yıkama aşamasından sonra alttaki sıvı uzaklaştırılmış ve kolon boş tüp içerisinde üzerine bir ekleme yapmaksızın maksimum hızda 2 dakika santrifüj edilmiştir. Son olarak kolon temiz bir ependorfa taşınarak üzerine filtrenin tam orta kısmına 50 µL elüsyon tamponu (nükleaz içermeyen su) eklenerek, 13.000 G'de 2 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüjden sonra kolon atılmış, ependorfun alt kısmına çöken RNA örneklerinin konsantrasyonu UV spektrofotometre (Nanodrop) (Quawell, ABD) ile belirlenmiştir.

3.4.6.6.2. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi

RNA'ları izole edilen örneklerin konsantrasyonları 250 ng'a ayarlanmıştır. RNA örnekleri toplamda 11 µL olacak şekilde reaksiyona hazırlanmışlardır. 11 µL RNA

örneğin üzerine, kitin içerisinde bulunan Oligo dT solüsyonundan 1 µL ilave edilerek karışım 65 °C'de 5 dakika boyunca ısı döngüleyicide (PZR cihazı) inkübe edilmiştir. Diğer bir yandan her bir örnek için 4 µL reaksiyon tamponu, 2 µL dNTP, 1 µL Reverse Transcriptase ve 1 µL Ribolock RI içeren reaksiyon karışımı buz banyosunda hazırlanmıştır. İnkübasyon bitince reaksiyon karışımından örnek başına 8 µL eklenerek PZR tüplerine aktarılmışlardır. Hazırlanan PZR tüpleri ısı döngüleyiciye yerleştirilip 42 °C'de 60 dakika ve 70 °C'de 5 dakika reaksiyona bırakılmışlardır. Reaksiyon sonunda cDNA'ya çevrilmiş olan örneklerin konsantrasyonu UV spektrofotometre (Nanodrop) ile ölçülmüştür.

3.4.6.6.3. Gerçek Zamanlı PCR (RT-PCR)

cDNA'ya çevrilen örnekler ile gen ifadelerinin belirlenmesi amacıyla, Power SYBR Green PCR kiti ve ABI 7500 fast cihazı kullanılarak gerçek zamanlı PZR gerçekleştirilmiştir. *T-Box Transcription Factor 5 (TBX5)*, *Actinin Alpha 1 (ACTN1)*, *Troponin T2, Cardiac Type (TNNT2)*, *Gap Junction Protein Alpha 1 (GJA)*, *Cadherin 1 (CDH1)* and *Snail Family Transcriptional Repressor 1 (SNAI1)* gen ifadelerine gerçek-zamanlı PZR ile bakılmış ve normalizasyon için *Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase (GAPDH)* ve *Hexosaminidase Subunit Beta (HEXB)* genleri kullanılmıştır. Nanodrop kullanılarak konsantrasyonları ölçülen cDNA örnekleri, en yüksek değere oranlanarak hesaplanmıştır. Hesaplanan cDNA örnekleri DNase ve RNase free steril su distile su kullanılarak uygun oranlarda seyreltilmiştir. Bir örnek için gerekli reaksiyon karışımı; 5 µL 2X SYBR Green, 0,1 µL ileri primer, 0,1 µL geri primer ve 1,8 µL distile su ile hazırlanmıştır. Primer dizileri Tablo 3.8'de belirtilmiştir. Örnekler belirlenen 96-kuyucuklu plakada kuyucuk başına 3 µL olacak şekilde konulmuştur. Örneklerin üzerine her kuyucuk için 7 µL hazırlanan reaksiyon karışımı eklenmiştir. Belirtilen koşullara göre gerçek zamanlı PZR gerçekleştirilmiştir (Tablo 3.9).

Tablo 3.8. Gerçek Zamanlı PZR için kullanılacak primerlerin dizileri.

Genler	İleri Primer (5'-3')	Geri Primer (5'-3')	Ürün boyutu (bp)
GAPDH	AGAACGGGAAGCTTGTCATC	CATCGCCCCACTTGATTTTG	81
HEXB	GATCCATTGTCTGGCAGGAGGT	GGAAGCCAGATGCTGTGACTCT	123
TBX5	GACTTCCTACCAGAACCACAAG	GGGACCACGGGATATTCTTTAC	135
ACTN1	GGCAATGTGAAAATGACCCTG	TTCCTCTGACACCAAAGCAG	119
TNNT2	AAGAGGCAGACTGAGCGGGAAA	AGATGCTCTGCCACAGCTCCTT	124
GJAI	AGGAGTTCAATCACTTGGCG	AGTTGAGTAGGCTTGAACCTTG	119
CDH1	CCCAATACATCTCCCTTCACAG	CACCTCTAAGGCCATCTTTGG	120
SNAI1	CGAGCTGCAGGACTCTAATC	CAGAGTCCCAGATGAGCATTG	131

Tablo 3.9. Gerçek Zamanlı PZR koşulları.

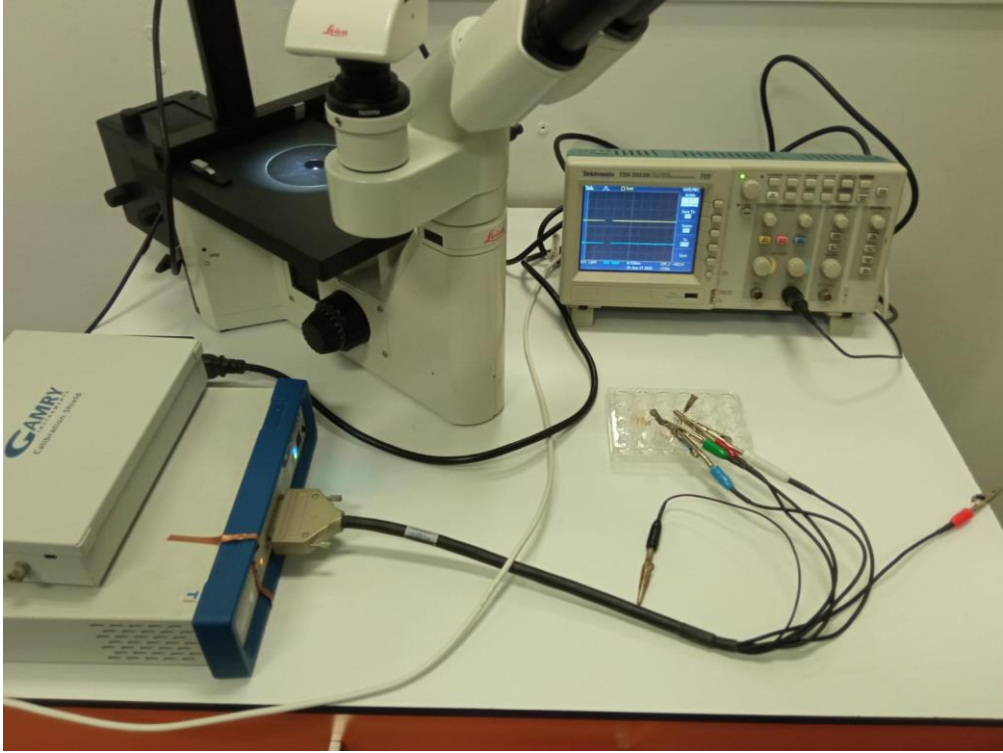
Reaksiyon	Sıcaklık, Süre
Isıyla Aktivasyon	95 °C, 10 dakika
Denaürasyon*	95 °C, 15 saniye
Primer bağlanması/uzama*	60 °C, 1 dakika

*40 döngü sayısını ifade eder.

3.5. Statik Ortamda İletkenlik Çalışmaları

Tez çalışması kapsamında, karbon nanotüp kullanımı sayesinde kazandırılacak elektriksel iletkenliğe sahip kompozit yapıların hücreler üzerindeki etkisi incelenmiştir. Bu amaçla ilk olarak kardiyak yamalar punch yardımcıyla 6 mm çaplı daireler şeklinde kesilmişlerdir. Elde edilen kesitlere kültür aşamasında uygulanan sterilizasyon adımları uygulanmıştır (Başlık 3.4.2) ve statik koşullar altında hücre ekimi yapılmıştır (Başlık 3.4.4). Hücre ekimi yapılan doku iskeleleri 24 kuyucuklu transwell (Corning Costar, ABD) içerisindeki membranlara yerleştirilmiştir. Transwell membranın üst kısmına 200 µl, alt kısmına 500 µl olacak şekilde besiyeri eklenmiş ve 14 gün boyunca takibi yapılmıştır. Ekimin 4. ve 14. gün sonunda alt kısım ile üst kısım arasındaki direnç farkı ölçümleri Merck Milicell ERS-2 ile gerçekleştirilmiş ve sonuçlar kaydedilmiştir.

İkinci aşamada ise 10 mm x 10 mm boyutundaki kardiyak yamalara aynı prosedürde hücre ekimi yapılmış kültürün 14 gün boyunca takibi gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın 4. ve 14. gün sonunda Gamry 1010 cihazı ile kardiyak yamalara sabit voltajda 0,15 V değerinde 0,5 s süreyle 1. voltaj uygulaması, 0 V değerinde 0,5 s süreyle 2. voltaj uygulaması olacak şekilde toplam 10 s süreyle maksimum akım 0,1 mA olması sağlanarak elektriksel uyarı yapılmıştır. Elektriksel uyarı için probların ucuna bağlanan şırınga iğneleri malzemenin 2 ayrı yönüne gelecek şekilde daldırılmışlardır. Verilen elektriksel uyarı osiloskop (Tektronix TDS2022B, ABD) cihazı ile takip edilerek Gamry 1010 yazılımı aracılığıyla kaydedilmiştir. Malzeme içinden geçen akım değerleri kaydedilerek hücreli ve hücresiz kardiyak yamaların direnç değerleri ohm cinsinden hesaplanmıştır. İletkenlik testi için gerekli ekipmanlar ve malzeme etkileşiminin görüntüleri sırasıyla Şekil 3.4 ve Şekil 3.5'te verilmiştir.



Şekil 3.3. Elektriksel ölçümler için kurulmuş düzeneğin görüntüsü.



Şekil 3.4. Uygulananan voltaj için prob-malzeme etkileşim sistemi.

3.6. İstatiksel Çalışmalar

Tez kapsamında elde edilen tüm sonuçlar standart sapma değerleri ile birlikte ifade edilmişlerdir ($\pm SS$). Tüm analizler örneklem sayısı 3 ($n=3$) olacak şekilde yapılmıştır. Kıyaslamalı grup analizlerinde grup sayısının 2'ye eşit olduğu durumlarda ($a=2$) t-test analizi (Welch's t-test) ile yapılırken grup sayısının 2'den büyük olduğu durumlarda ($a>2$) ise 2 yönlü ANOVA analizi uygulanmıştır. Gruplar arası farklılıkların $p > 0.05$ 'den büyük olduğu durumlarda farklılık yok (ns); $p \leq 0.05$ olduğu durumlarda p^* ; $p \leq 0.01$ olduğu durumlarda p^{**} ; $p \leq 0.001$ olduğu durumlarda p^{***} ve $p \leq 0.0001$ olduğu durumlarda ise p^{****} ile ifade edilmiştir.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

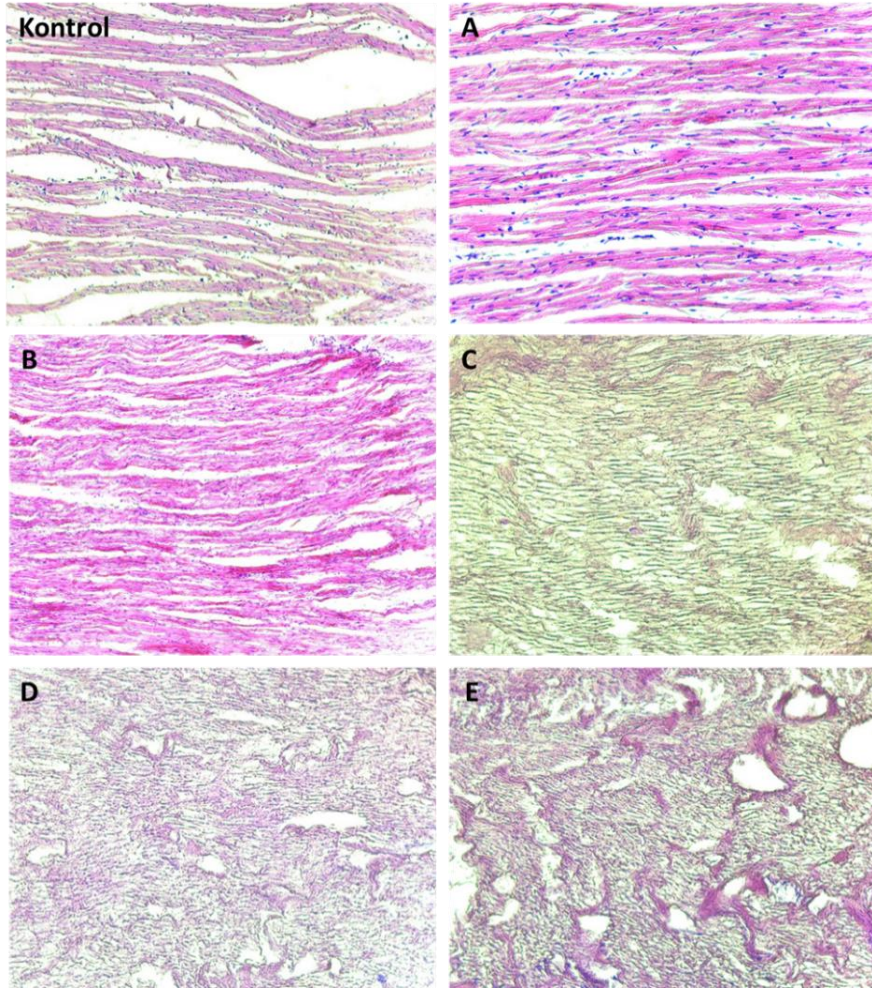
4.1. Deselüerize Miyokard Yamaların Hazırlanması

4.1.1. Kimyasal Yöntemle Deselüerize Edilmiş Miyokard Yamaların Optimizasyon ve Karakterizasyonları

4.1.1.1. 30 mm x 10 mm Miyokard Doku Gruplarının Optimizasyonları

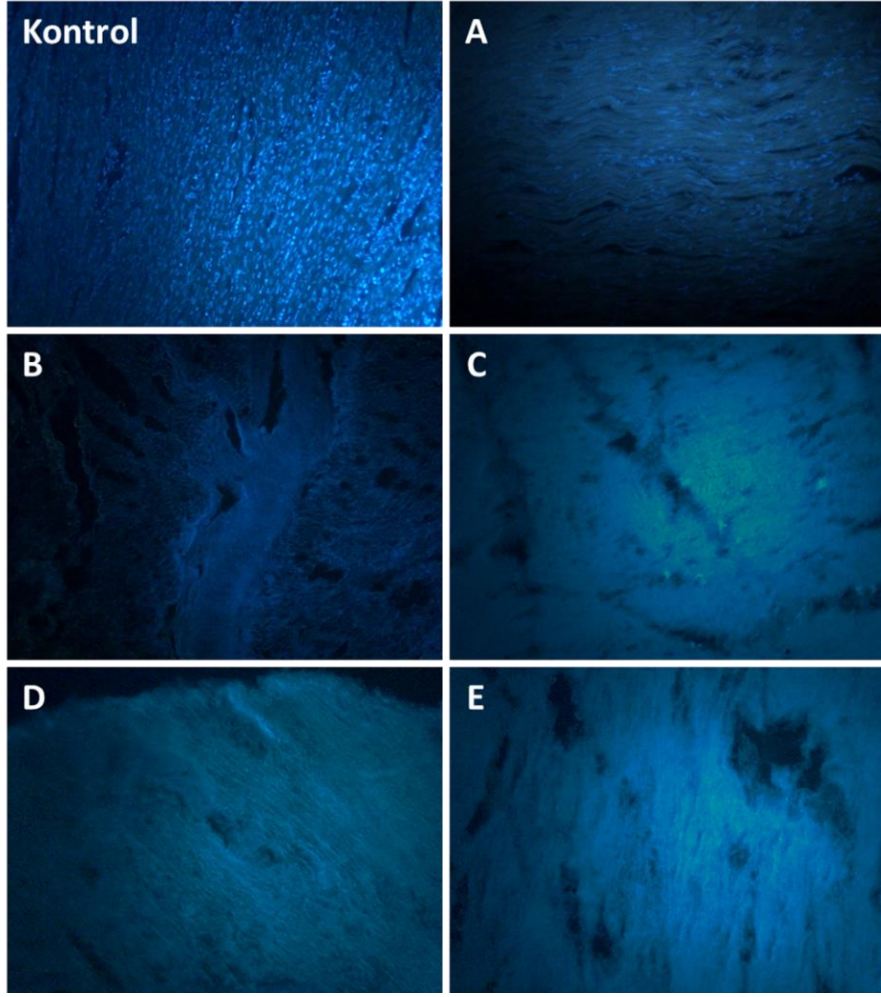
SDS ajanı ile kimyasal deselüerizasyon proseslerinin 30 mm uzunluktaki doku iskelelerindeki optimizasyonu için protokoller Tablo 3.1’de verilmiştir. Buradaki SDS konsantrasyonu ve muamele süreleri gibi parametreler H&E ve DAPI boyamaları ile değerlendirilmiştir. Şekil 4.1 ve 4.2’de işlem görmemiş miyokard ve deselüerize miyokard dokularının sırasıyla H&E ve DAPI boyamalarına yer verilmiştir.

Şekil 4.1, A (%0,5 (a/h) SDS uygulaması, 3 gün), B (%1 SDS (a/h) uygulaması, 3 gün), C (%0,5 SDS (a/h) uygulaması, 5 gün), D (%1 (a/h) SDS uygulaması, 5 gün) ve E (%0,5 (a/h) SDS uygulaması, 7 gün) deselüerize grupların hematoksilin&eoziin boyamalarını göstermektedir. F grubu (%1 (a/h) SDS uygulaması, 7 gün) deselüerizasyon işlemi sonunda ESM doku bütünlüğünü tamamıyla kaybetmesi sebebiyle değerlendirmeye alınmamıştır.



Şekil 4.1. İşlem görmemiş miyokard dokusu (kontrol) ve deselülerizasyon sonrası grupların (30 mm uzunluk) Hematoksilen&Eozin boyaması (10X). A (%0,5 (a/h) SDS uygulaması, 3 gün), B (%1 SDS (a/h) uygulaması, 3 gün), C (%0,5 SDS (a/h) uygulaması, 5 gün), D (%1 (a/h) SDS uygulaması, 5 gün) ve E (%0,5 (a/h) SDS uygulaması, 7 gün).

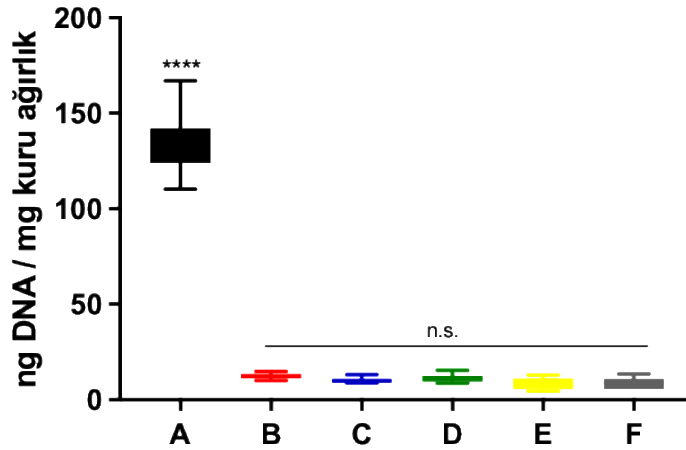
Deselülerizasyon prosesinin başarısı DAPI çekirdek boyaması ile de değerlendirilmiş ve Şekil 4.2.de A (%0,5 (a/h) SDS uygulaması, 3 gün), B (%1 SDS (a/h) uygulaması, 3 gün), C (%0,5 SDS (a/h) uygulaması, 5 gün), D (%1 (a/h) SDS uygulaması, 5 gün) ve E (%0,5 (a/h) SDS uygulaması, 7 gün) deselülerize gruplarına ait boyamaları verilmiştir. A grubunda diğer gruplara göre hücreler yeteri kadar uzaklaştırılmamış ve ayrıca ESM yapısının bütünlüğünün korunamadığı görülmüştür. DAPI boyamaları ele alındığında B, C, D, E gruplarının hücrelerinden başarılı bir şekilde arındırıldığı gösterilmiştir.



Şekil 4.2. İşlem görmemiş miyokard dokusu (kontrol) ve deselülerizasyon sonrası grupların (30 mm uzunluk) DAPI boyaması (10X). (A (%0,5 (a/h) SDS uygulaması, 3 gün), B (%1 SDS (a/h) uygulaması, 3 gün), C (%0,5 SDS (a/h) uygulaması, 5 gün), D (%1 (a/h) SDS uygulaması, 5 gün) ve E (%0,5 (a/h) SDS uygulaması, 7 gün).

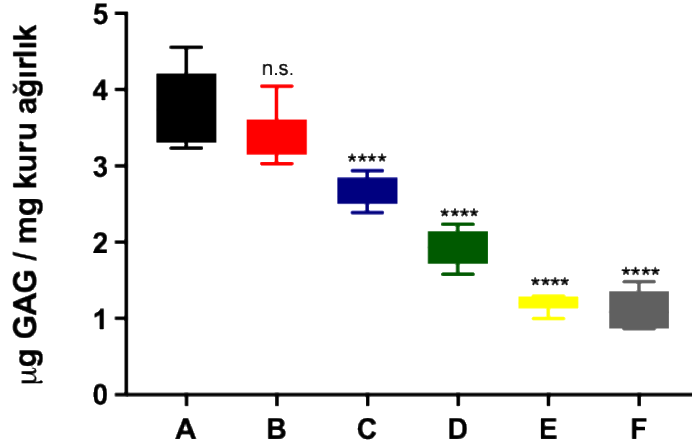
Histolojik (nitel) değerlendirmelerin yanı sıra deselülerizasyon çalışmalarının en önemli bulgularından biri olarak kabul edilen deselülerize matrislerdeki artık DNA miktar tayini optimize edilen tüm gruplar için (Tablo 3.1) sayısal olarak belirlenmiştir. 30 mm uzunluk boyutlarına sahip doğal ve deselülerize miyokard dokulardaki DNA miktarı mg kuru doku başına ng DNA (ng DNA/ mg kuru doku) olacak şekilde hesaplanmıştır. Şekil 4.3'te tüm grupların DNA miktarı histogram grafiği ile sunulmuş olup, analiz için kalibrasyon grafiği de ek 1.1'de verilmiştir. Buna göre, A grubuna ait tüm çalışma gruplarında DNA miktarı mg doku iskelesinde 50 ng değerinde üstünde tespit edilmiştir ($134,3 \pm 16,57$ ng). B, C, D, E ve F gruplarına ait DNA miktarları ise sırasıyla $12,16 \pm 1,49$ ng, $10,14 \pm 1,39$

ng, $11,23 \pm 2,12$ ng, $8,72 \pm 3,02$ ng ve $8,82 \pm 2,87$ ng olarak belirlenmiştir. Literatürde deselüerize matrisin 1 mg kuru ağırlıktaki dokuda bulunması gereken DNA miktarı maksimum 50 ng olarak kabul görmektedir [142].



Şekil 4.3. Kimyasal deselüerizasyon optimizasyonuna ait (30 mm uzunluktaki doku grupları) deselüerize matrislerdeki artık DNA miktarını nanogram cinsinden gösteren histogram grafiği.

Deselüerize matrislerdeki GAG miktarı tüm gruplar için (Tablo 3.1) kantitatif olarak belirlenmiştir. Buna göre DMMB test solüsyonu ile yapılan μg sGAG/mg kuru ağırlık cinsinden verilen sonuçlar Şekil 4.4'te histogram grafiği ile verilmiştir. A grubuna ait deselüerizasyon grubunda sGAG miktarı daha yüksek oranda korunurken ($3,78 \pm 0,54$ μg), bu değer B grubunda $3,38 \pm 0,35$ μg 'a düşmüş ancak bu iki grup arasında anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. C, D, E ve F gruplarına ait sGAG miktarları sırasıyla $2,64 \pm 0,20$ μg , $1,93 \pm 0,25$ μg , $1,19 \pm 0,10$ μg ve $1,11 \pm 0,26$ μg olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre, dokunun SDS ajanı ile muamele süresi ve uygulanan SDS'in konsantrasyonu arttıkça glikozaminoglikan miktarı seviyesinin %80'lere kadar düştüğü gözlemlenmiştir.

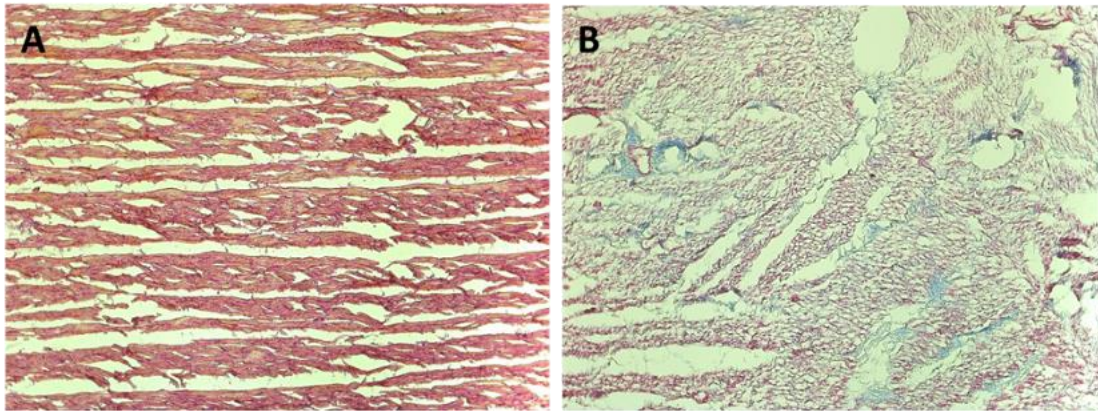


Şekil 4.4. Kimyasal deselülerizasyon optimizasyonuna ait (30 mm uzunluktaki doku grupları) deselülerize matrislerdeki sGAG miktarını mikrogram cinsinden gösteren histogram grafiği.

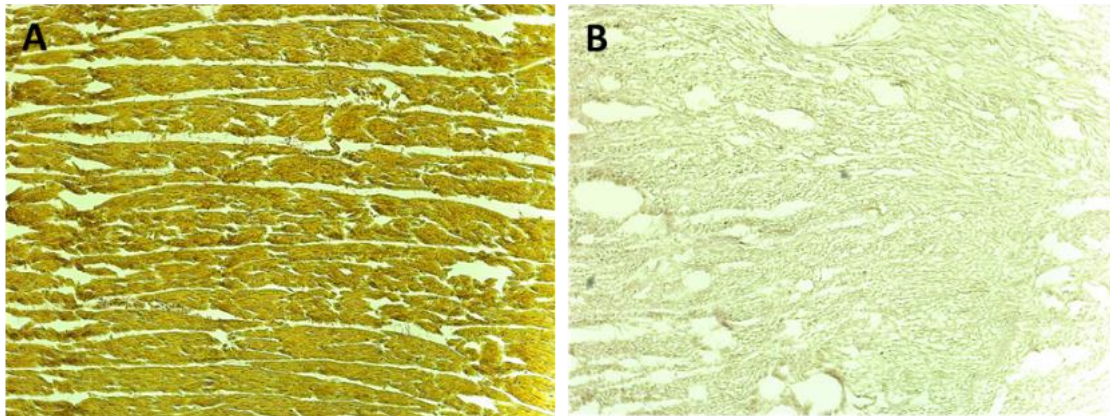
30 mm uzunluktaki doku gruplarına uygulanan H&E ve DAPI boyamaları sonuçlarına göre A gruplarında hücre çekirdeklerine rastlanmıştır. Bu sonuçlar aynı zamanda sayısal olarak tayin edilen DNA analizleri ile de doğrulanmış ve %1 SDS konsantrasyonu ile 3 gün sonrasında artık DNA miktarı en az seviyede belirlenmiştir. Sayısal sGAG miktarı sonuçları ise düşük SDS konsantrasyonun ve uzun muamele süresinin(C grubu) GAG miktarında anlamlı bir azalmaya neden olduğunu göstermiştir. Bu sonuçlar gerek SDS muamelesinin minimum sürede tutulması gerekse matriks bütünlüğünün korunabilmesi için hibrit kardiyak yama sentezi için en ideal grubun B grubu olduğuna karar verilmiştir (%1 SDS (a/h), 3 gün). Buna göre bu gruba ait kapsamlı karakterizasyon çalışması gerçekleştirilmiştir.

Bu amaçla %1 SDS (a/h) konsantrasyonu ile 3 gün süreyle deselülerize edilen miyokard dokularının elastin ve kolajen boyamaları gerçekleştirilmiştir ve elastin ve kolajen boyamalara ait görüntüler sırasıyla Şekil 4.5 ve Şekil 4.6'da verilmiştir. Mason's Trichrome kolajen boya kiti ile dokuda çekirdekler siyah renge, sitoplazma ve kas fiberleri kırmızı renge ve kolajen ise mavi renge boyanır. Buna göre kontrol gruplarında çekirdekler fiber kenarlarında siyah renkte matris ve kas fiberleri kırmızı renkte ve kolajen ise mavi renkte boyanmış ve Şekil 4.5A'da verilmiştir. Kolajen ve fiberlerin iç içe görülmeleri dokunun herhangi bir işleme maruz kalmamasından kaynaklanır. Kas

fiberleri ile sitoplazma ve kolajen yoğunluğunun deselülerizasyon sonrasında azaldığı gözlenmiştir (Şekil 4.5B). Ayrıca çekirdek bulgusuna rastlanmamıştır. Elasin boyamada ise (Şekil 4.6) kontrol grubunda (Şekil 4.6A) bağlantı bölgelerinde az miktarda elastin fiberlere rastlanmıştır ve dokunun geri kalanı (sitoplazma ve diğer elemanlar) sarı ile boyanmıştır. Verhoeff Van Gieson elastin boyamanın özelliği sitoplazma elemanlarının sarı, elastinin mavi-siyah ve kolajenin ise pembe-kırmızı renge boyanmasıdır. Deselülerizasyon sonrasında ise (Şekil 4.6B) gerek elastin fiberlerinin gerekse sitoplazma komponentlerinin önemli miktarda azaldığı görülmüştür.

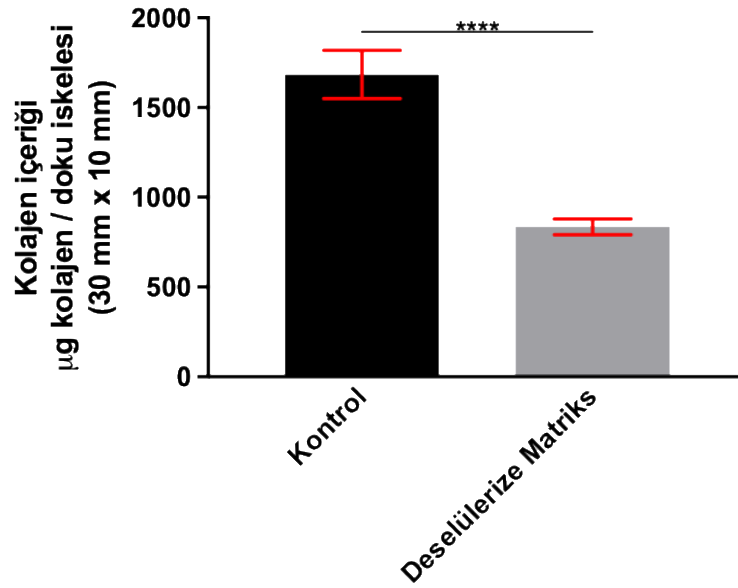


Şekil 4.5. (A) İşlem görmemiş miyokard dokunun, (B) %1 SDS (h/h) ile ve 3 gün süreyle deselülerize olan matrisin kolajen boyaması (10X).



Şekil 4.6. (A) İşlem görmemiş miyokard dokunun, (B) %1 SDS (h/h) ile ve 3 gün süreyle deselülerize olan matrisin elastin boyaması (10X).

Histolojik boyamalarına ek olarak hidroksiprolin test kiti aracılığıyla kolajen miktarının sayısal analizi gerçekleştirilmiştir. Kolajen peptit zincirlerinde bulunan, α zincirlerinin üretimine yardımcı olan 4-Hidroksiprolin, kolajenin asit-hidrolizi ile açığa çıkan serbest bir amino asittir. Test kiti aracılığıyla, dokudaki kolajen asitle hidrolize edilir ve 4-hidroksiprolin ortaya çıkar. Bu grupların Kloramin-T ile oksidasyonu sonucu piroller oluşur ve oluşan pirollere Ehrlich's reaktifi (Dimetilaminobenzaldehit/Perklorik asit-Izopropanol) eklenerek kromoforlar elde edilir. Bu kromoforların kolorimetrik absorbansları ölçülür. Böylece dokudaki kolajen miktarının dolaylı yoldan ölçümü sağlanır. Buna göre 100 mg kolajenin 12,5 mg'ı yani %12,5'i hidroksiprolin miktarını ifade eder [145, 146]. Şekil 4.7'de buna göre hesaplanmış kolajen içerikleri histogram grafiği ile verilmiştir. Bu hesaplamalarda yararlanılan kalibrasyon eğrisi ek 1.3'te verilmiştir.

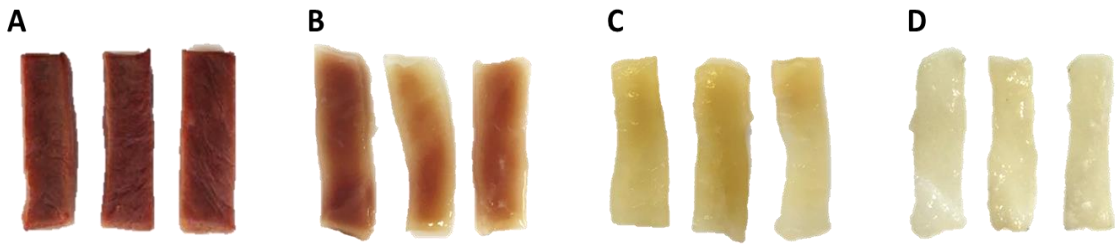


Şekil 4.7. İşlem görmemiş miyokard dokusu ve deselülerize matristeki kolajen miktarını mikrogram cinsinden gösteren histogram grafiği (n=3) (p****).

Öncelikle işlem görmemiş miyokard (kontrol) ve deselülerizasyon sonrası matristeki kolajen miktarı kıyaslanırken, bu dokuların ortalama kuru ağırlıkları esas alınmıştır. Buna göre işlem görmemiş-liyofilize miyokard dokusunun ortalama ağırlığı 225,1 mg ve deselülerize matrisin kuru ağırlığı ortalama değeri 10-12 mg olarak hesaplanmıştır (n=6). Sonuçlar bir doku iskelesinin kuru ağırlığındaki (30 mm x 10 mm) µg kolajen miktarı

olarak ifade edilmiştir. Kontrol grubu ve deselülerize doku iskelesinde kolajen miktarı sırasıyla $1683 \pm 44,86 \mu\text{g}$ ve $835 \pm 14,97 \mu\text{g}$ kolajen olarak hesaplanmıştır. Bu sonuca göre deselülerizasyon sonrasında kolajen miktarının %48,3 oranında korunduğu tespit edilmiştir.

Son olarak belirlenen grubun morfolojik analizleri gerçekleştirilmiş ve görüntüleri Şekil 4.8’de verilmiştir. %1 SDS (a/h) konsantrasyonu ile 3 gün süreyle deselülerize edilen miyokard dokunun gün bazında elde edilen görüntüleri (A) işlem görmemiş miyokard (kontrol) grubu, (B) SDS muamelesinin 24 saat (C) 48 saat ve (D) 72 saat sonundaki görüntüleri şeklinde verilmiştir. Deselülerizasyon sonrasında ESM komponentlerinin kaybına bağlı olarak dokunun beyazlaştığı gözlenmiştir.



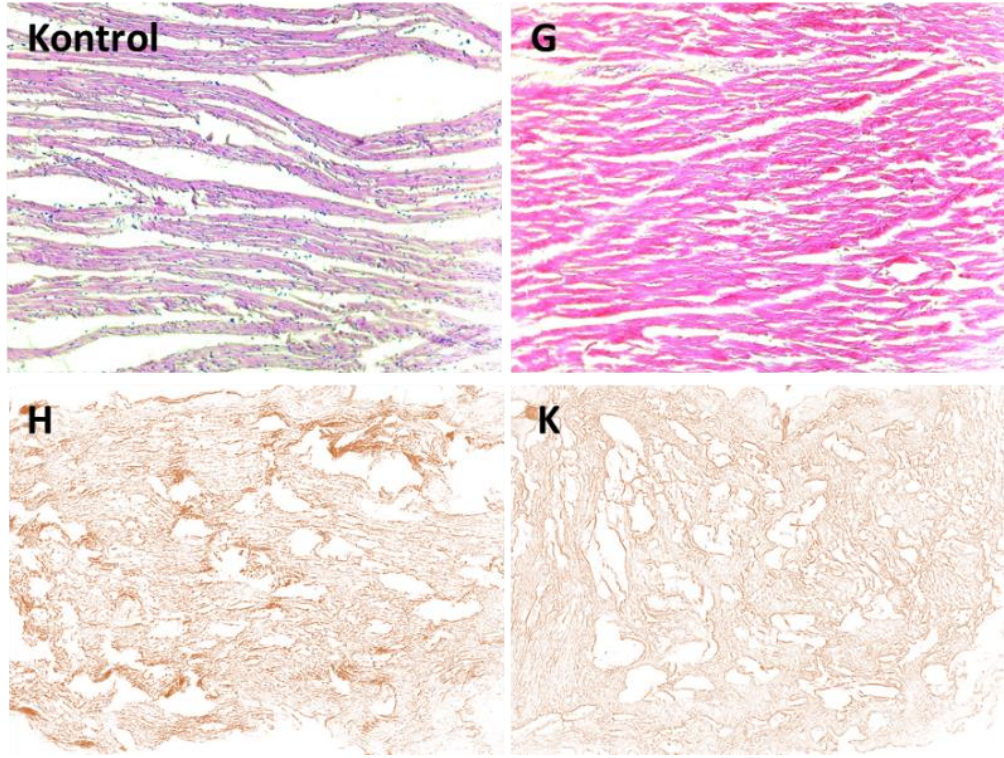
Şekil 4.8. (A) İşlem görmemiş miyokard, %1 (a/h) SDS muamelesi sonrası (B) 24. Saat, (C) 48. Saat, (D) 72. Saat sonlarında dokularının morfolojik görüntüleri.

4.1.1.2. 10 mm x 10 mm Miyokard Doku Gruplarının Optimizasyonları

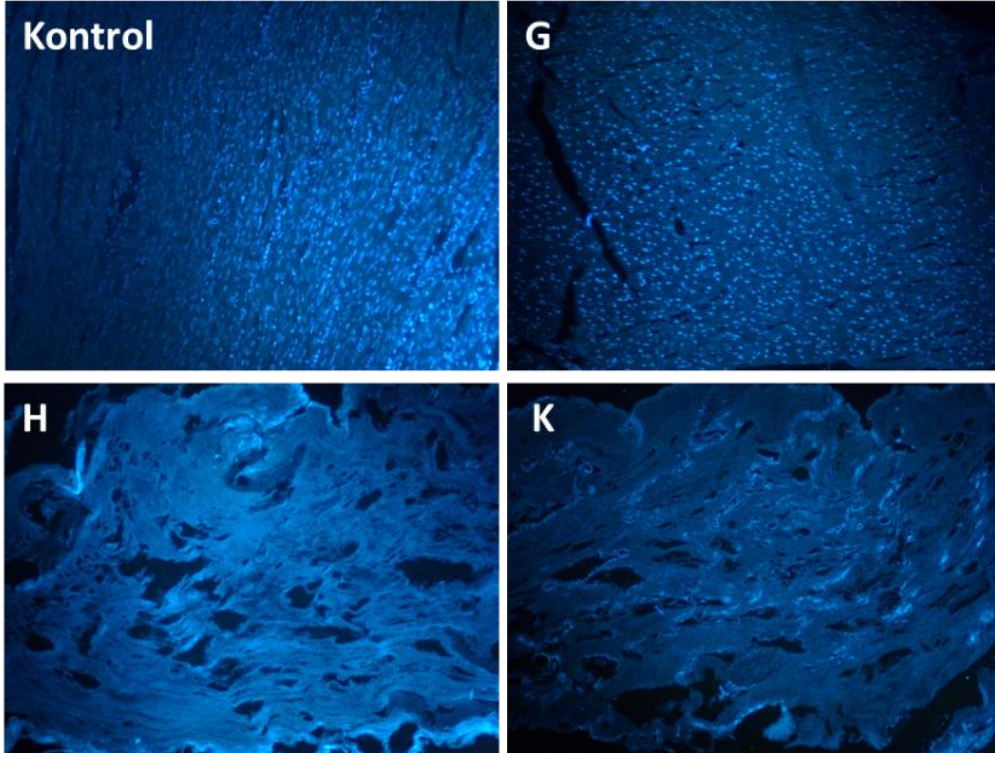
30 mm x 10 mm miyokard dokularına uygulanan skCO₂ muamelesinin ön muamelelere rağmen başarısız olması nedeniyle (dokunun boyutuna bağlı olarak kompakt yapının ayrıştırılamaması), çalışma miyokard dokunun 10 mm x 10 mm boyutlarında tekrardan disekte edilerek tüm protokollerin tekrar edilmesine karar verilmiştir. SkCO₂ uygulamasının 30 mm uzunluktaki doku gruplarındaki başarısız sonuçları 4.1.2 başlığı içerisinde tartışılmıştır.

Buna göre 10 mm uzunluktaki doku kesitlerinde etkili olacak deselülerizasyon yönteminin belirlenmesi amacıyla %1 SDS konsantrasyonu (a/h) uygulanmış ve buna

göre SDS'nin muamele süresi optimize edilmiştir (Tablo 3.2). Bu doku gruplarının H&E ve DAPI boyamaları sırasıyla Şekil 4.9 ve Şekil 4.10'da verilmiştir. Burada, G grubu %1 SDS (a/h), 36saat uygulamasını; H grubu %1 SDS (a/h), 48 saat uygulamasını ve K grubu ise %1 SDS (a/h), 60 saat uygulamasını ifade eder.



Şekil 4.9. İşlem görmemiş miyokard dokusu (kontrol) ve deselülerizasyon sonrası grupların (10 mm uzunluktaki) Hematoksilen&Eozin boyaması (10X). (G (%1 SDS (a/h) uygulaması, 36 saat), H (%1 SDS (a/h) uygulaması, 48 saat) ve K (%1 SDS (a/h) uygulaması, 60 saat).

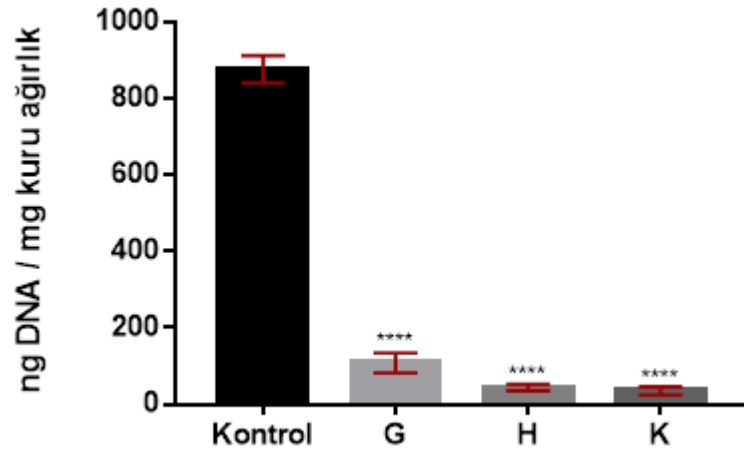


Şekil 4.10. İşlem görmemiş miyokard dokusu (kontrol) ve deselülerizasyon sonrası grupların (10 mm uzunluktaki) DAPI boyaması (10X). (G (%1 SDS (a/h) uygulaması, 36 saat), H (%1 SDS (a/h) uygulaması, 48 saat) ve K (%1 SDS (a/h) uygulaması, 60 saat).

Şekil 4.9 ve Şekil 4.10’da verilen sonuçlara göre 36 saat süre SDS muamelesinin (G grubu) hücre çekirdeklerini uzaklaştırmada yeterli derecede etkili olmadığı görülmüştür. 48 saat süre SDS muamelesi (H grubu) ile hücrelerin dokudan önemli derece uzaklaştığı görülmektedir. Yapılan çalışmada H&E boyamasında deselülerizasyon sonrasında ESM’nin pembe rengini almadığı görülmektedir. Bu durumun temel nedeni gerek kontrol gerekse deselülerize grupların ESM yapılarındaki farklılıklardır. Bu çalışma ESM’ye pembe rengini veren eozin boyaması her iki grubun kesitleri için eş sürelerde olacak şekilde muamele edilmiştir. Son olarak DAPI boyamaları 36 saat süre (H grubu) ve 48 saat süre (K grubu) SDS ile muamele edilen grupların hücrelerinden etkin bir şekilde arındırıldığını göstermiştir.

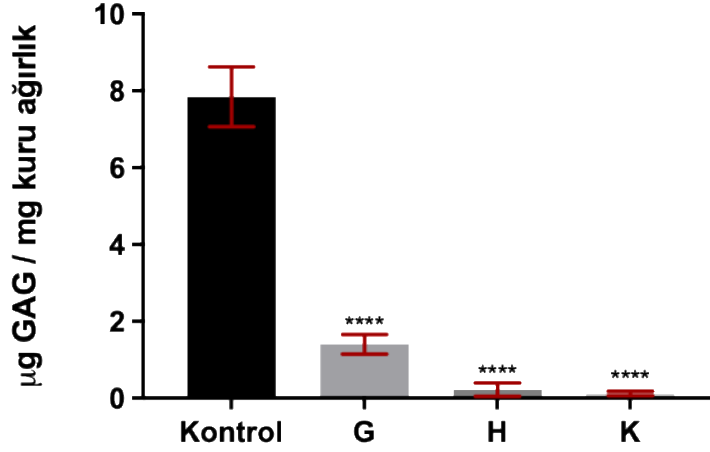
Gerçekleştirilen histolojik boyamalara ek olarak, deselülerizasyon sonrasında dokudaki artık DNA miktarı sayısal olarak belirlenmiş ve sonuçlar Şekil 4.11’de ng DNA/mg kuru ağırlık cinsinden ifade edilmiştir. Buna göre DNA miktarları kontrol, G grubu (%1 SDS

(a/h) uygulaması, 36 saat), H grubu (%1 SDS (a/h) uygulaması, 48 saat) ve K grubu (%1 SDS (a/h) uygulaması, 60 saat) için sırasıyla $875,9 \pm 35,9$ ng, $108,6 \pm 26,2$ ng, $44,14 \pm 8,8$ ng ve $35,32 \pm 10,8$ ng olarak belirlenmiştir. Histoloji sonuçları ile, 36 saat SDS muamelesinin dokunun deselülerizasyonunda etkili olmadığı doğrulanmıştır. Buna göre, 10 mm uzunluktaki doku gruplarına uygulanması gereken minimum SDS süresi 48 saat olarak belirlenmiştir.



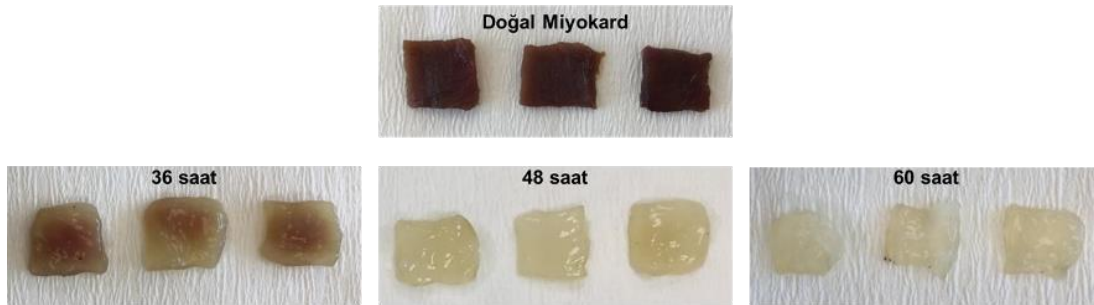
Şekil 4.11. Kimyasal deselülerizasyon optimizasyonuna ait (10 mm uzunluktaki doku grupları) deselülerize matrislerdeki DNA miktarını nanogram cinsinden gösteren histogram grafiği.

DNA miktar analizine ek olarak kontrol grubu ve deselülerize gruplar için GAG miktarı sayısal olarak DMMB test solüsyonu ile belirlenmiştir. Buna göre sonuçlar $\mu\text{g sGAG/mg}$ kuru ağırlık cinsinden Şekil 4.12’de histogram grafiği cinsinden verilmiştir. Buna göre, GAG miktarları kontrol, G grubu (%1 SDS (a/h) uygulaması, 36 saat), H grubu (%1 SDS (a/h) uygulaması, 48 saat) ve K grubu (%1 SDS (a/h) uygulaması, 60 saat) için sırasıyla $7,84 \pm 0,78$ μg , $1,39 \pm 0,25$ μg , $0,22 \pm 0,17$ μg ve $0,12 \pm 0,05$ μg değerlerinde hesaplanmıştır. 36 saat uygulanan SDS muamelesinde (G grubu) GAG miktarı %82,3 oranında; 48 saat uygulanan SDS muamelesinde (H grubu) GAG miktarı ise yaklaşık %97 oranında azalmıştır.



Şekil 4.12. Kimyasal deselülerizasyon optimizasyonuna ait (10 mm uzunluktaki doku grupları) deselülerize matrislerdeki GAG miktarını mikrogram cinsinden gösteren histogram grafiği.

Son olarak %1 SDS (a/h) konsantrasyonu ile 36 saat, 48 saat ve 60 saat süreyle deselülerize edilen miyokard dokunun saat bazında elde edilen görüntüleri Şekil 4.14'te verilmiştir. SDS uygulamasına bağlı olarak ESM komponentlerinin kaybıyla 48 saat sonunda dokunun tamamen beyazlaştığı gözlenmiştir.



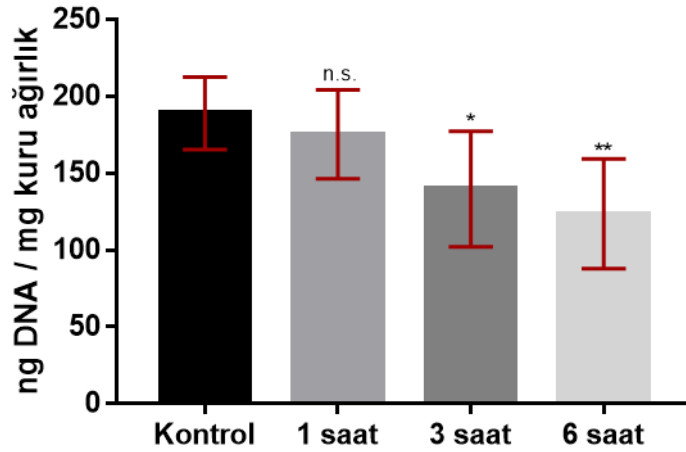
Şekil 4.13. İşlem görmemiş miyokard ve %1 (a/h) SDS muamelesiyle 36, 48 ve 60 saat sonrası dokularının morfolojik görüntüleri.

Tüm bu analizler sonucunda 10 mm uzunluktaki doku grupları için en etkin deselülerizasyon protokolünün %1 SDS konsantrasyonunda 48 saat sürenin olduğuna karar verilmiştir. Bu grubun detaylı karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiş ve sonuçlar skCO₂ deselülerizasyonunun sonuçları ile “Belirlenmiş Deselülerize Miyokard

Yamaların Karşılaştırmalı Diğer Karakterizasyonları” başlığı altında (4.1.3) karşılaştırılmalı olarak incelenmiştir.

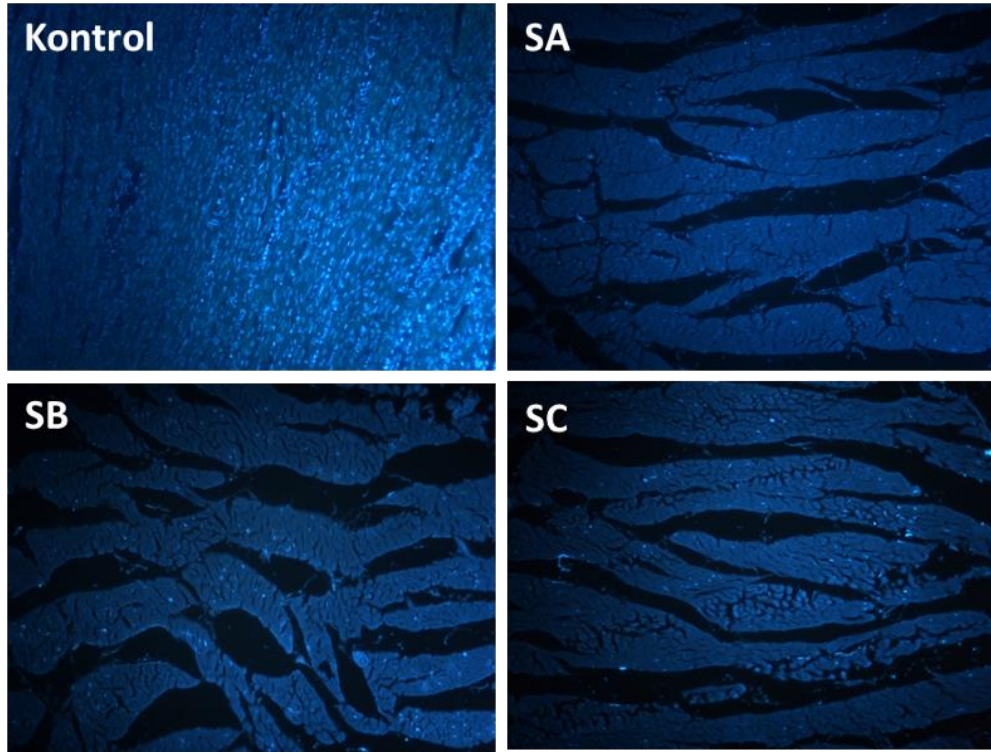
4.1.2. Süperkritik CO₂ Yöntemle Deselülerize Edilmiş Kardiyak Yamaların Optimizasyon ve Karakterizasyonları

Önceki bölümlerde bahsedildiği gibi, Süperkritik CO₂ yöntemiyle gerçekleştirilmiş deselülerizasyon protokolleri ilk olarak 30 mm uzunluktaki doku gruplarında, ön muameleler sonrasında, 1, 3 ve 6 saat süren 2500 psi basınç altında uygulanmıştır. Bu boyutların deselülerizasyon başarısı dokudaki artık DNA miktarının tayini ile değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlar ng DNA / mg kuru ağırlık cinsinden değerlendirilmiş ve Şekil 4.14’te histogram grafiği cinsinden verilmiştir. Bu grafiğe göre 2500 psi basınca 1 saat, 3 saat ve 6 saat süre maruz kalan doku gruplarının DNA miktarları sırasıyla $175,5 \pm 29,9$ ng, $139,9 \pm 37,7$ ng ve $123,8 \pm 35,8$ ng olarak belirlenmiştir. Kontrol grubuna kıyasla ($189,2 \pm 23,6$ ng), bu grupların yeterli ölçüde deselülerize olmadığı yani dokuda kalan DNA miktarının 50 ng değerinin üzerinde olduğu gösterilmiştir. 30 mm uzunluktaki doku gruplarının başarısızlığı nedeniyle, bu deselülerizasyon yöntemi 10 mm uzunluktaki doku grupları ile tekrar edilmiş ve sonuçlar SDS bazlı deselülerizasyon protokolü ile karşılaştırmalı olarak tartışılmıştır.

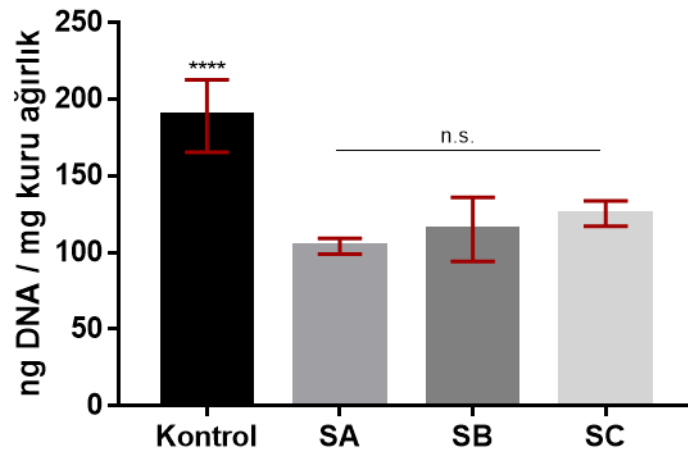


Şekil 4.14. Süperkritik CO₂ deselülerizasyon optimizasyonuna ait (30 mm uzunluktaki grupları) deselülerize matrislerdeki DNA miktarını nanogram cinsinden gösteren histogram grafiği.

Bu amaçla 10 mm uzunluktaki doku gruplarında skCO₂ yöntemiyle gerçekleştirilen deselüerizasyon işleminin (Tablo 3.3) ilk aşamasında dokular sabit basınç altında tutulmuş ve buna göre etki süresinin deselüerizasyon verimi üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Buna göre gruplar 2500 psi basınç değerinde 1 saat (SA), 3 saat (SB) ve 6 saat (SC) süreyle süperkritik akışkan muamelesine maruz bırakılmıştır. Bu çalışmanın ilk değerlendirilmesi DAPI-çekirdek boyaması ile yapılmıştır ve sonuçlar Şekil 4.15'te verilmiştir. Bu süre sonlarında dokudaki çekirdeklerin yüksek oranda uzaklaştığı görülmüş ancak yine de DNA kalıntılarına rastlanmıştır. Kısacası, muamele süresinin deselüerizasyon üzerinde bir etkisi olmadığı ortaya konmuştur. DAPI boyamasına ek olarak sonuçlar artık DNA miktarının sayısal olarak analiz edilmesi ile ayrıca karşılaştırılmıştır. Buna göre gruplara ait artık DNA miktarı ng cinsinden Şekil 4.16'da verilmiştir. Dokudaki artık DNA miktarları kontrol grubu, 1 saat muamele süresi (SA grubu), 3 saat muamele süresi (SB grubu) ve 6 saat muamele süresi (SC grubu) grupları için sırasıyla $189,2 \pm 23,6$ ng, $104,1 \pm 5,1$ ng, $115,2 \pm 20,9$ ng ve $125,5 \pm 8,32$ ng olarak tespit edilmiştir. İstatiksel analiz sonucunda ise gruplar arasında anlamlı bir fark görülmemiştir. Böylece, 2500 psi muamele süresi dokudaki DNA'nın yaklaşık %60 oranında uzaklaştırılmasına yardımcı olmuş ancak farklı muamele sürelerinin uzaklaştırılmış DNA miktarının oranında bir etkisi olmadığı gösterilmiştir.



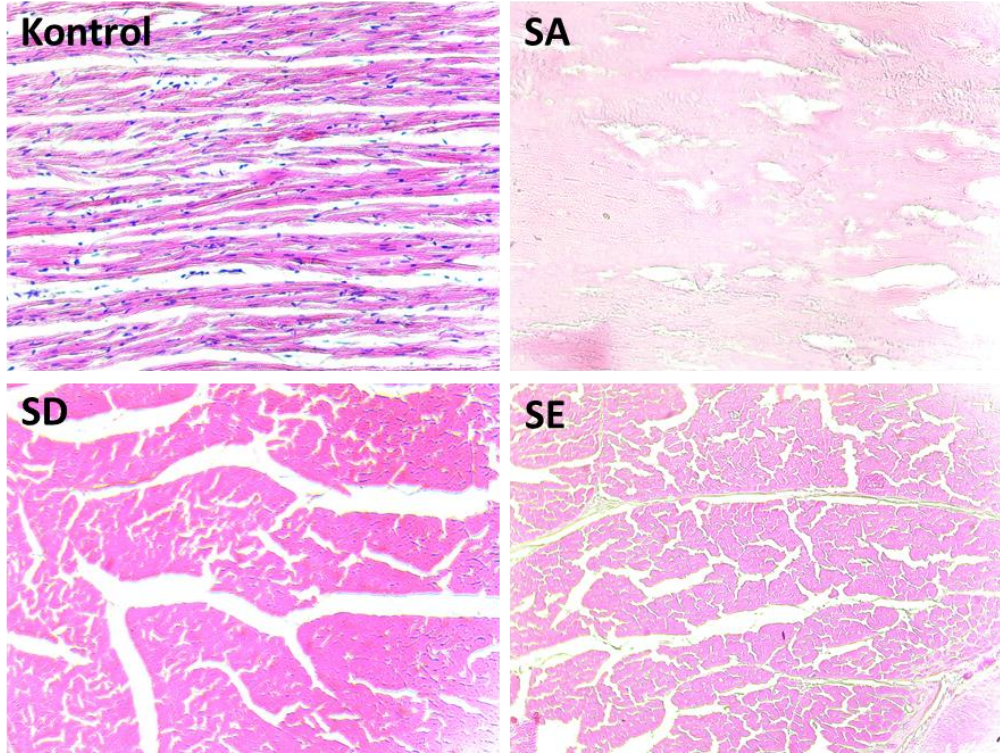
Şekil 4.15. İşlem görmemiş miyokard dokusu (kontrol) ve sabit basınç altında skCO₂ deselülerizasyonu sonrası grupların (10 mm uzunluktaki doku grupları) DAPI boyaması (10X, SA:1 saat; SB: 3 saat; SC: 6saat).



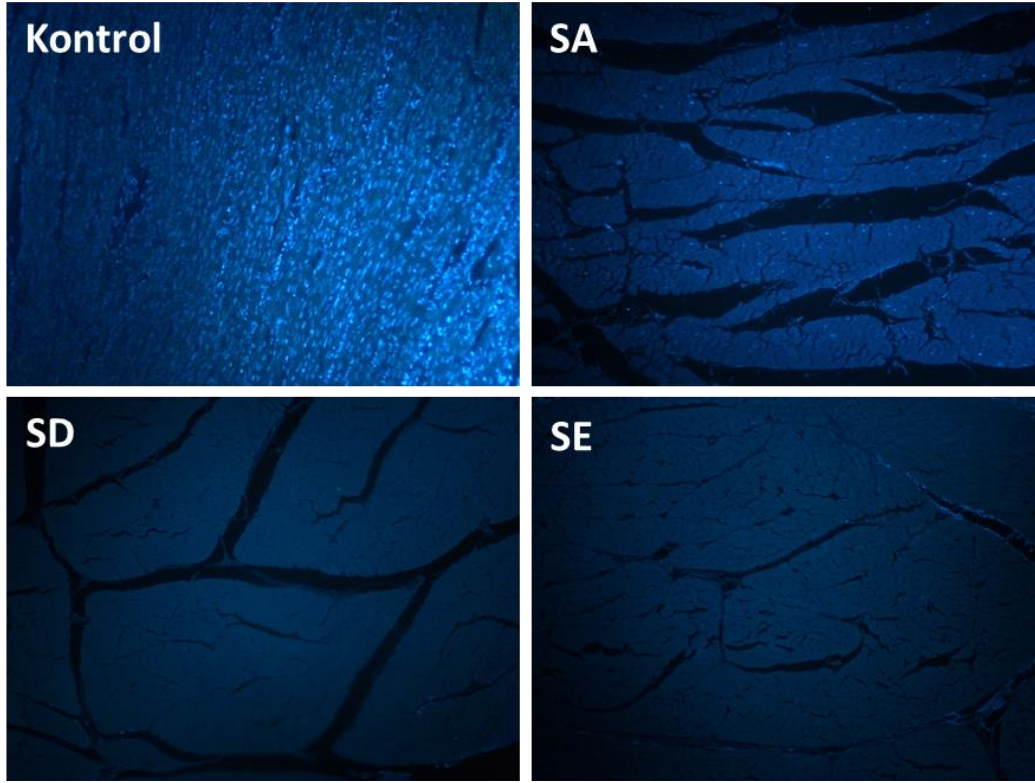
Şekil 4.16. Sabit basınç altında skCO₂ deselülerizasyonu sonrası grupların (10 mm uzunluktaki doku grupları) deselülerize matrislerdeki DNA miktarını nanogram cinsinden gösteren histogram grafiği.

En kısa sürede etkin bir deselüerizasyon yönteminin uygulanması amacıyla yapılan analizler sonucunda 1 saat etki süresinin esas alınmasına karar verilmiştir. 1 saat etki süresinin sabit tutulmasıyla artan basınç değerlerinin deselüerizasyon üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Buna göre Tablo 3.3'te özetlenmiş gruplar da 3500 psi (SD) ve 4500 psi (SE) değerlendirilmeye alınmış ve 2500 psi (SA) grubuyla kıyaslanmıştır. İlk olarak bu grupların H&E ve DAPI boyamalarıyla histolojik analizleri gerçekleştirilmiş ve bu sonuçlar sırasıyla Şekil 4.17 ve Şekil 4.18'de verilmiştir.

H&E boyaması sonuçlarına göre, ESM'de genel olarak çekirdek veya çekirdek kalıntısına rastlanmamıştır. Buradaki en önemli sonuç, bu yöntemin artan basınç değerlerine rağmen ESM bütünlüğünü çok fazla tahrip etmemiş olmasıdır. ESM'nin yapısal olarak korunması ayrıca ESM komponentlerinin sayısal olarak değerlendirilmesiyle de ortaya konmuştur. DAPI boyamalarının sonuçlarında ise 2500 psi basınç değerlerinde çekirdek bulgularına rastlanmıştır. Ancak artan basınç değerlerinde çekirdek ve çekirdek kalıntılarının ESM içerisinden uzaklaştırıldığı gözlenmiştir. Bu sonuçlar sayısal olarak dokudaki artık DNA miktarı analizi ile ayrıca tartışılmıştır.

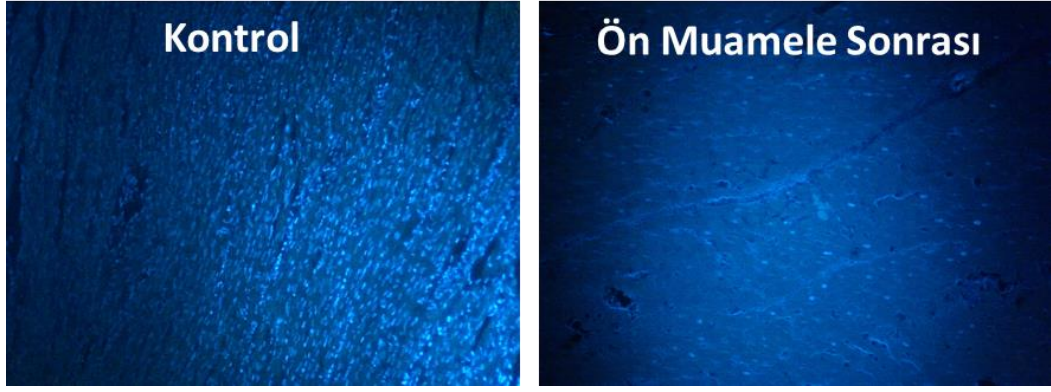


Şekil 4.17. İşlem görmemiş miyokard dokusu (kontrol) ve artan basınç değerleriyle skCO₂ deselülerizasyonu sonrası grupların (10 mm uzunluktaki doku grupları) Hematoksilen&Eozin boyaması (10X, SA:2500 psi; SD: 3500 psi; SC: 4500 psi).



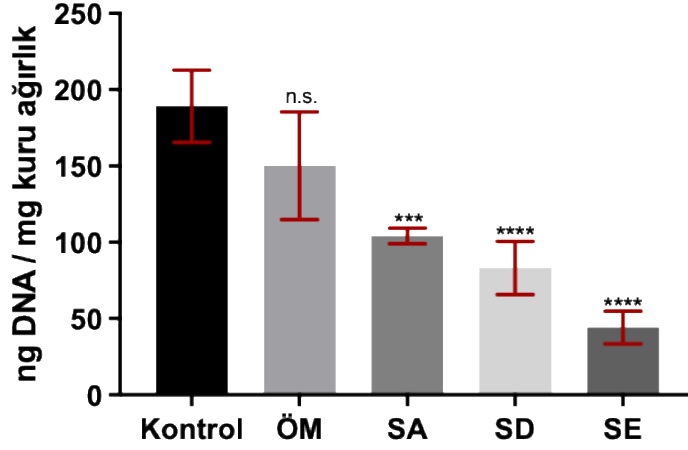
Şekil 4.18. İşlem görmemiş miyokard dokusu (kontrol) ve artan basın değerleriyle skCO₂ deselülerizasyonu sonrası grupların (10 mm uzunluktaki doku grupları) DAPI boyaması (10X, SA:2500 psi; SD: 3500 psi; SC: 4500 psi).

Dondurup-çözme, hipotonik-hipertonik şok şeklinde uygulanmış olan ön muamele sürecinin skCO₂ deselülerizasyonu protokolü üzerindeki etkisini ortaya çıkarmak için, işlem görmemiş kontrol grubu ve ön muamele işlemleri sonrasında histolojik kesitler DAPI-çekirdek boyaması ile boyanmış ve sayısal olarak dokudaki artık DNA miktarı analiz edilmiştir. Buna göre, elde edilen DAPI histolojik boyamaları Şekil 4.19’da verilmiştir. Elde edilen görüntülere göre ön muamele sonrasında ESM içerisindeki çekirdek ve çekirdek kalıntılarının dokudan yeterli ölçüde uzaklaştırılmadığı ortaya konmuştur.



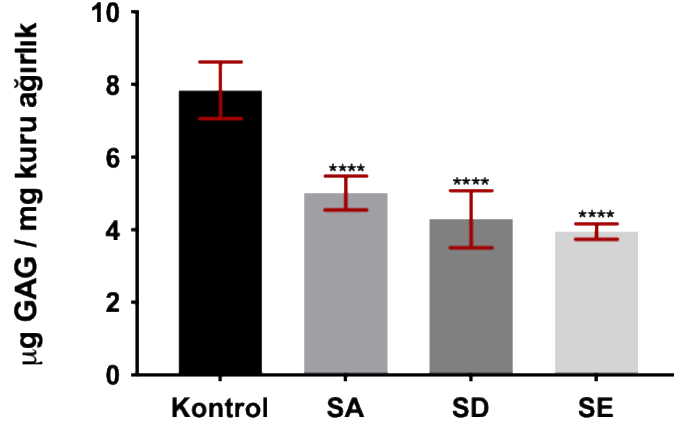
Şekil 4.19. İşlem görmemiş miyokard dokusu (kontrol) ve ön muamele sonrası DAPI boyaması (10X).

Ön muamele etkisinin ve uygulanan artan basınç değerlerinin dokudaki artık DNA miktarına etkisini gösteren sayısal DNA analizi Şekil 4.20’de verilmiştir. Dokudaki artık DNA miktarı kontrol grubu, ön muamele sonrası (ÖM), 2500 psi basınç muamelesi sonrası (SA), 3500 psi basınç muamelesi sonrası (SB) ve 4500 psi basınç muamelesi sonrası (SC) olmak üzere sırasıyla $189,2 \pm 23,6$ ng, $150,2 \pm 35,3$ ng, $104,1 \pm 5,1$ ng, $83,24 \pm 17,5$ ng ve $44,23 \pm 10,74$ ng olarak hesaplanmıştır. Gruplar arası istatistiksel analiz sonucunda, kontrol grubu ve ön muamele sonrası grubu arasında anlamlı bir fark elde edilmemiştir. Bu durum Şekil 4.20’de verilen DAPI boyamaları ile benzer şekilde yorumlanır. Kısacası, skCO₂ deselülerizasyonunda uygulanan ön muamelenin DNA’nın ESM’den uzaklaştırılmasında efektif bir etkisi yoktur. Ön muamele işlemi dokunun gevşetilmesine ve hücrelerin ESM içerisinden uzaklaştırılması için kompakt yapının kısmen de olsa zarar görmesini sağlamıştır. Diğer yandan, kontrol grubu, SA, SB ve SC grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmuştur. 3500 psi basınç DNA miktarı 2500 psi basınç muamelesine kıyasla bir miktar azalmış ancak bu değer de 50 ng’ın üzerinde tespit edilmiştir. Ancak, 4500 psi basınç muamelesi sonunda DNA miktarı 50 ng değerinin altına düşmüştür. Böylece, 4500 psi basınç değeri dokudaki DNA oranını yaklaşık %76 verilmeye uzaklaştırmıştır.



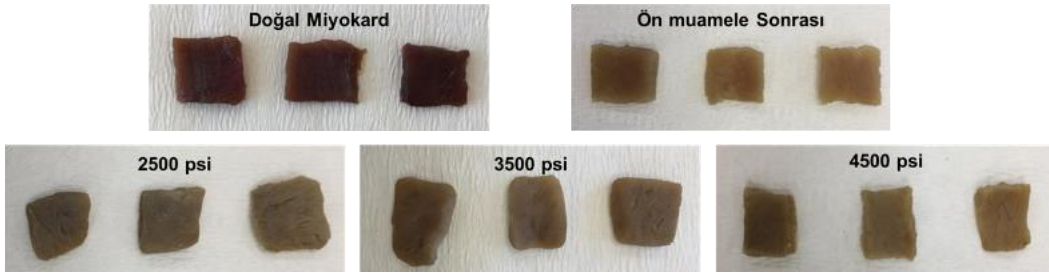
Şekil 4.20. Artan basınç değerlerinde skCO₂ deselülerizasyonu sonrası grupların deselülerize matrislerdeki DNA miktarını nanogram cinsinden gösteren histogram grafiği (ÖM: Ön muamele sonrası, SA:2500 psi; SD: 3500 psi; SC: 4500 psi).

Uygulanan artan basınç değerlerinin dokudaki GAG miktarına etkisini gösteren sayısal analiz ise Şekil 4.21’de verilmiştir. Buna göre GAG miktarı kontrol grubu, ön muamele sonrası (ÖM), 2500 psi basınç muamelesi sonrası (SA), 3500 psi basınç muamelesi sonrası (SB) ve 4500 psi basınç muamelesi sonrası (SC) olmak üzere sırasıyla $7,84 \pm 0,78 \mu\text{g}$, $5,01 \pm 0,46\mu\text{g}$, $4,29 \pm 0,78 \mu\text{g}$ ve $3,94 \pm 0,21 \mu\text{g}$ olarak hesaplanmıştır. İstatiksel olarak tüm gruplar arasında anlamlı farklılık elde edilmiştir. ESM’deki GAG oranı 2500 psi basınç muamelesi sonrasında yaklaşık %64 oranında, 3500 psi basınç muamelesi sonrasında yaklaşık %45 oranında ve 4500 psi basınç muamelesi sonrasında ise yaklaşık %49 oranında korunmuştur. Bu sonuç kimyasal yöntem olarak SDS muamelesi ile kıyaslandığında (yaklaşık %97 oranında GAG kaybı) skCO₂ muamelesinin başarısı önemli ölçüde göze çarpmaktadır.



Şekil 4.21. Artan basınç değerlerinde skCO₂ deselüerizasyonu sonrası grupların deselüerize matrislerdeki GAG miktarını mikrogram cinsinden gösteren histogram grafiği (SA:2500 psi; SD: 3500 psi; SC: 4500 psi).

Son olarak 2500 psi, 3500 psi ve 4500 psi basınç değerlerinde uygulanan skCO₂ deselüerizasyon yönteminin morfoloji üzerine etkisi değerlendirilmiş ve buna göre doku gruplarının görüntüleri Şekil 4.22’de verilmiştir. Ön muamele sonrasında dokunun renginde bir miktar açılma olmuş ancak basınç uygulamaları sonucunda dokuların morfolojik görüntüleri arasında belirgin bir farklılık görülmemiştir. Bu durum SDS ajanının etkisine kıyasla ESM’nin başarılı bir şekilde korunmasıyla ilişkilendirilmiştir.

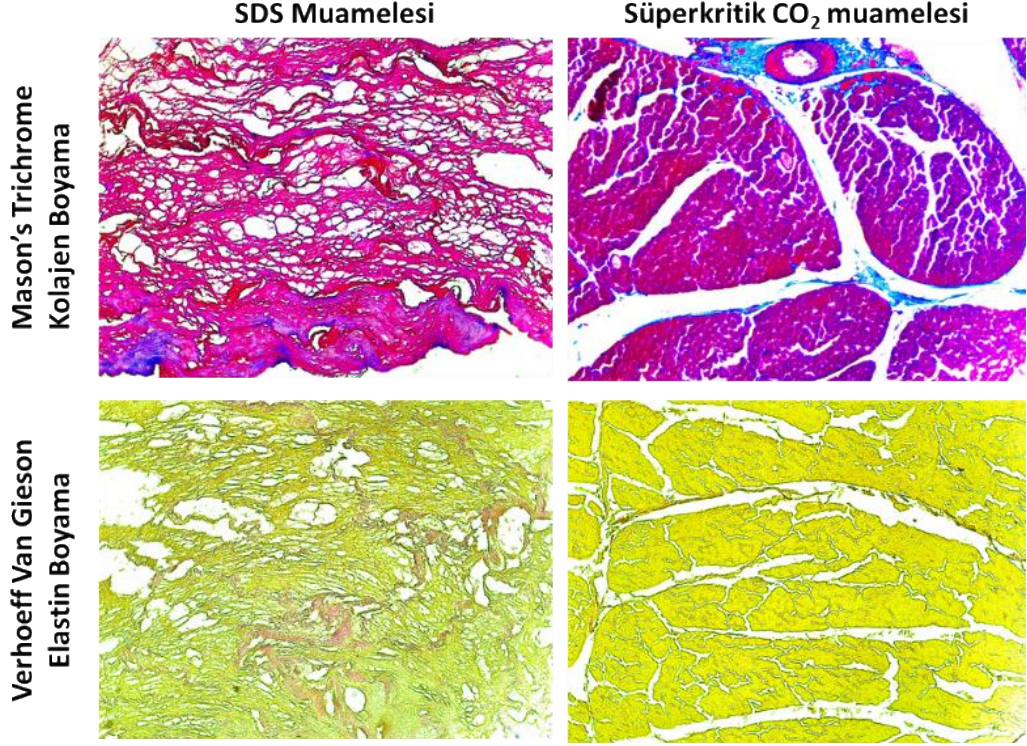


Şekil 4.22. İşlem görmemiş miyokard, ön muamele sonrası ve 2500 psi, 3500 psi, 4500 psi basınç muamelesi sonrası dokularının morfolojik görüntüleri.

4.1.3. Belirlenmiş Deselüerize Miyokard Yamaların Karşılaştırmalı Diğer Karakterizasyonları

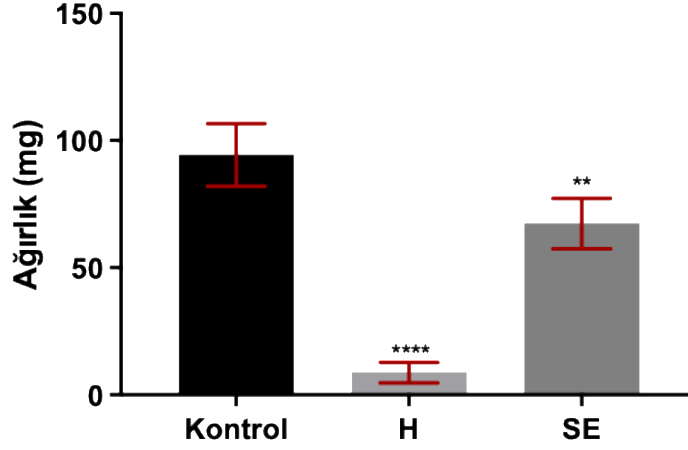
Uygulanan iki farklı deselüerizasyon protokolü sonucunda, hibrit ve kardiyak yamaların sentezinde kullanılacak gruplara %1 SDS konsantrasyonu (a/h), 48 saat (H) grubu ve 4500 psi skCO₂ muamelesi, 1 saat uygulaması (SE) olarak karar verilmiştir. Bu grupların bir önceki bölümde artık DNA miktarı analizleri, histolojik boyamaları ve GAG miktarları analizleri gerçekleştirilmiştir. Buna göre, bu iki deselüerizasyon yönteminin karşılaştırmalı kolajen ve elastin boyamaları, sayısal olarak kolajen miktar analizleri, yaş-kuru doğu ağırlık değişimleri ve SEM analizleri gerçekleştirilmiştir.

İlk olarak bu grupların karşılaştırmalı kolajen ve elastin boyamaları gerçekleştirilmiş ve bu karşılaştırmaya ilişkin boyamalar Şekil 4.23'te verilmiştir. SDS muamesinin dokudaki ESM yapısı üzerindeki yıkıcı etkisi göz önüne alınarak kolajen boyamasında kas fiberleri yoğunluğunda (kırmızı-pembe) azalma gözlenmiştir. Özellikle skCO₂ uygulamasının ESM'deki kas fiberleri ve kolajen (mavi) yoğunluğu üzerindeki etkisi esas alındığında yapıya daha az zarar verdiği ortaya konulmuştur. Elastin boyama sonuçlarında ise SDS muamesinin elastin üzerindeki yıkıcı etkisi açıkça görülmektedir (mavi-siyah). Bu durumun aksine ise skCO₂ muamelesi sonunda elastin fiberler yapıda kısmen de olsa korunmuştur.



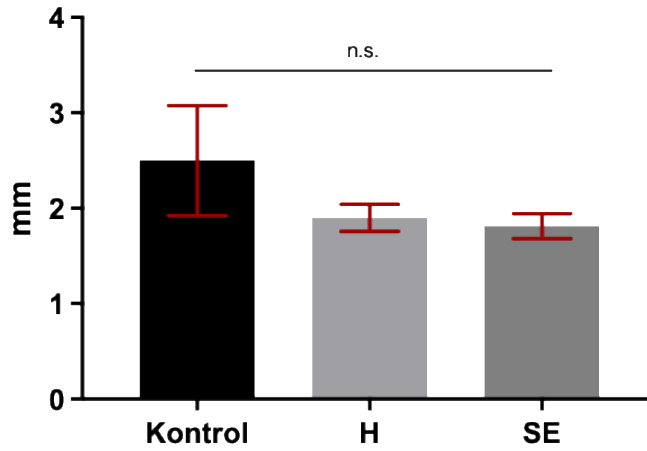
Şekil 4.23. SDS muamelesi ve scCO₂ muamelesi sonrasında doku kesitlerinin kolajen ve elastin boyamaları (10X).

Deselülerizasyon uygulamaları sonrasında, dokulardaki kuru ağırlık ve kalınlık değişimleri belirlenmiştir. Bu amaçla ilk olarak, işlem görmemiş miyokard dokusunun ve deselülerizasyon uygulaması sonrasında elde edilen deselülerize yamaların liyofilize formları tartılmıştır. Buna göre 16 saat liyofilizasyon sonrası elde edilen kuru matrislerin tartımları yapılmış ve buna göre ortalama ağırlıklar standart sapmalarıyla Şekil 4.24'te verilmiştir. Elde edilen sonuçlarda kontrol grubu, SDS muamelesi sonrası deselülerize yamaların (H) ve skCO₂ muamelesi sonrası deselülerize yamaların (SE) kuru ağırlıkları sırasıyla $94,38 \pm 12,27$ mg, $8,77 \pm 4,04$ mg ve $67,4 \pm 9,97$ mg olarak hesaplanmıştır. Elde edilen tüm farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Bu sonuçlara göre SDS muamelesi sonunda dokunun ağırlıkça yaklaşık %90 kadarını; skCO₂ muamelesi sonunda ise dokunun ağırlıkça yaklaşık %28 kadarını kaybettiği görülmüştür. Bu durum yapılan histolojik ve biyokimyasal analizleri doğrulamış ve skCO₂ muamelesinin dokudaki ESM yapısını daha başarılı şekilde koruduğunu göstermiştir.



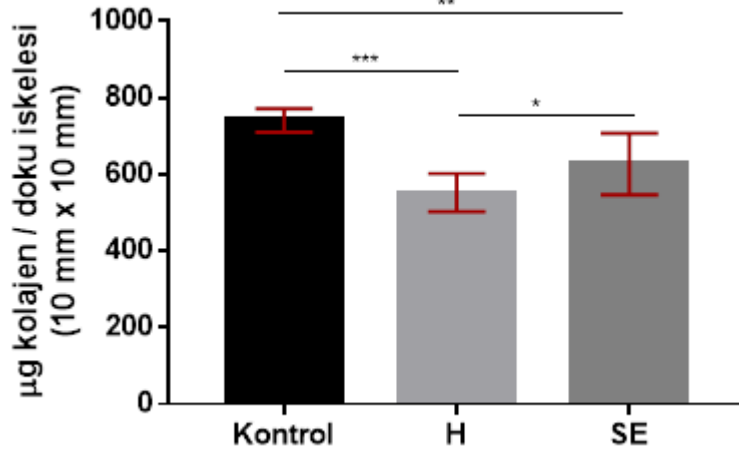
Şekil 4.24. Deselülerizasyon sonrası doku kuru ağırlıklarının değişimi: (A) Kontrol grubu, (H) %1 SDS, 48 saat, (SE) 4500 psi, 1 saat.

Diğer aşamada, kontrol grubu, SDS muamelesi sonrası deselülerize yama grubu (H) ve skCO₂ muamelesi sonrası deselülerize yama gruplarına ait kalınlık değişimlerini gösteren grafik ise Şekil 4.25'te verilmiştir. Buna göre kontrol grubu, SDS muamelesi sonrası deselülerize yama grubu (H) ve skCO₂ muamelesi sonrası deselülerize yama gruplarının kalınlıkları sırasıyla $2,5 \pm 0,57$ mm, $1,9 \pm 0,14$ mm ve $1,8 \pm 0,13$ mm olarak belirlenmiştir. İstatiksel analiz sonuçları gruplar arasında anlamlı bir fark olmadığını orta koymuştur. Buna göre, sonraki aşamalarda elde edilecek hibrit ve kompozit kardiyak yamaların doğal miyokard kesitlerine eş kalınlıkta sentezlenebilmesi mümkün kılınmıştır.



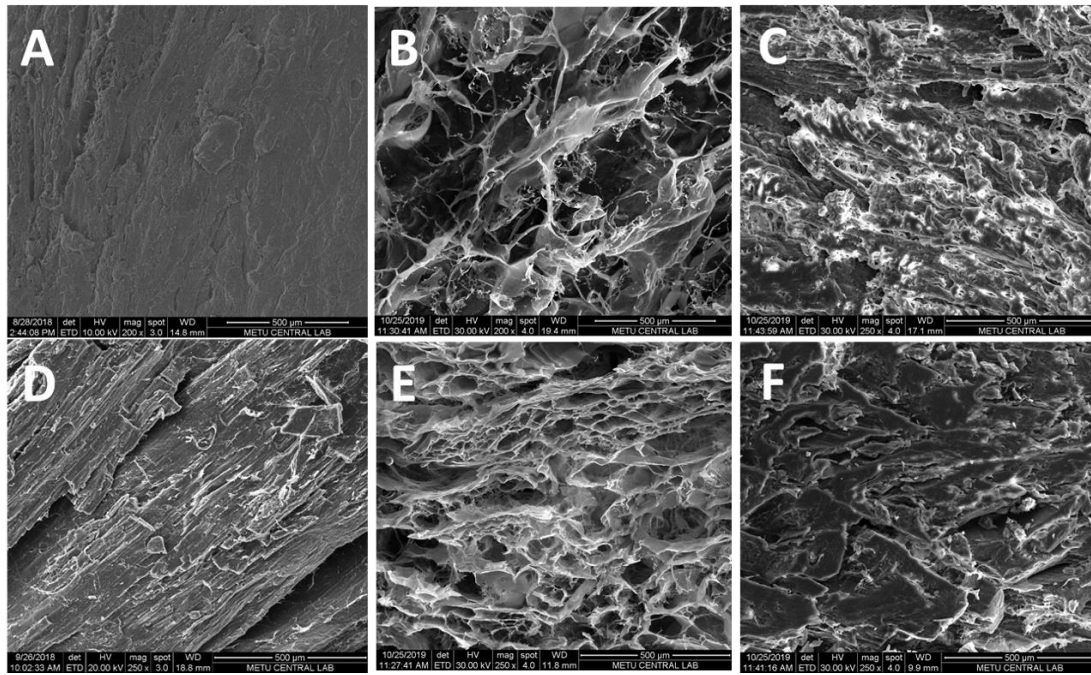
Şekil 4.25. Deselülerizasyon sonrası doku kalınlıklarının değişimi: (A) Kontrol grubu, (H) %1 SDS, 48 saat, (SE) 4500 psi, 1 saat.

Deselülerizasyon işlemleri sonrasında ESM'deki kolajen miktarının sayısal analizi dokunun kuru ağırlıklarındaki kayıplar baz alınarak hesaplanmıştır. Buna göre kontrol grubu, SDS muamelesi sonrası deselülerize yama grubu (H) ve ve skCO₂ muamelesi sonrası deselülerize yama gruplarındaki kolajen miktarını gösteren histogram grafiği Şekil 4.26'da bir doku iskelesinin kuru ağırlığındaki (10 mm x 10 mm) µg kolajen miktarı olarak verilmiştir. Buna göre kontrol grubu, SDS muamelesi sonrası deselülerize yama grubu (H) ve skCO₂ muamelesi sonrası deselülerize yama grubunun (SE) kolajen miktarları sırasıyla 741 ± 30,38 µg, 552 ± 49, 78 µg ve 627 ± 80,61 µg kolajen olarak hesaplanmıştır. SDS uygulaması sonrası dokuda yaklaşık %25 kadar, skCO₂ muamelesi sonrasında ise yaklaşık %15 kolajen kaybı tespit edilmiştir. Literatür bilgisi ile kıyaslandığında, yapılan bir çalışmada bu matrikslerin 1/10 kalınlığında (0,3 mm) dokulara 9 saat süreyle SDS uygulaması sonucu matrislerdeki kolajen miktarının yaklaşık %33 oranında korunduğu gösterilmiştir [147]. Bu referans çalışmanın insan miyokard dokusunun deselülerizasyonu olması ve doku örneğindeki kolajen miktarının yaş, hastalık durumu vb. etkenlerle değişmesi sebebiyle bire bir örtüşmediği görülmektedir [148]. Elde edilen %15 kolajen miktar kaybı literatür kıyaslamalarında kabul edilebilir bir değerdir.



Şekil 4.26. İşlem görmemiş miyokard dokusu ve deselülerize matrislerdeki kolajen miktarını mikrogram cinsinden gösteren histogram grafiği (H: %1 SDS, 48 saat; SE: 4500 psi, 1 saat).

Son olarak, taramalı elektron mikroskobu ile elde edilen greftlerin yüzey ve enine kesitleri kontrol grubu kıyaslamaları ile Şekil 4.27’de verilmiştir. Buna göre yüzey kesitleri kıyaslandığında doğal dokunun yüzeyinin (Şekil 4.27A) SDS muamelesin sonrasında (Şekil 4.27B) zarar gördüğü tespit edilmiştir. Bu zarar skCO₂ muamelesi sonrasında elde edilen greftlerin yüzeyine gösterdiği etki ile benzer değildir. Benzer şekilde enine kesitlerde SDS muamelesi ESM kaybına bağlı olarak yapıda boşluklar oluşmuş (Şekil 4.27E) ancak bu durum yine skCO₂ muamelesi ile (Şekil 4.27F) aynı etkiyi yaratmamıştır.



Şekil 4.27. Doğal miyokard dokusu (A), %1 SDS, 48 saat deselülerizasyon grupları (B), 4500psi, 1 saat skCO₂ deselülerize gruplarına (C) ait yüzey kesitleri ile doğal miyokard dokusu (D), %1 SDS, 48 saat deselülerizasyon grupları (E), 4500 psi, 1 saat skCO₂ deselülerize gruplarına (F) ait enine kesitlerini gösteren taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüleri (500 µm).

4.1.4. Deselülerize Kardiyak Yamaların Değerlendirmesi

Tez çalışmasının bu aşamasına kadar miyokard dokunun sol ventriküler duvarından radyal kesitler alınmış ve bu kesitlere iki farklı deselülerizasyon yöntemi uygulanmıştır. Uygulanan deselülerizasyon yöntemlerinin kullanılabilirliği miyokard doku

rejenerasyonu için literatür çalışmalarıyla desteklenmektedir [93, 147, 149-152]. Ancak bu uygulamalar genel olarak iyonik ve iyonik olmayan deterjanlarla gerçekleştirilen kimyasal deselülerizasyon ajanlarının kullanılmasına ve bunların enzimsel uygulamaları ve hipotonik/hipertonik ajanlar gibi fiziksel uygulamalarının kombinasyonlarıyla ile sınırlıdır. Tez çalışmasında özgün olarak kullanılmış süperkritik CO₂ yöntemiyle gerçekleştirilen deselülerizasyon çalışması, miyokard doku rejenerasyonu için literatürde sınırlı sayıda uygulamayı barındırmaktadır [114].

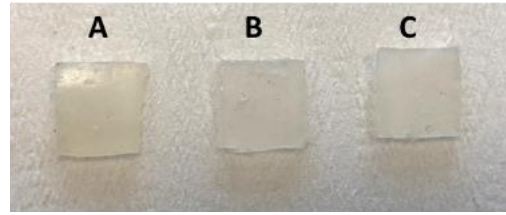
Bu yöntemlere göre gerçekleştirilmiş deselülerizasyon uygulamaları iki farklı doku boyutu için detaylı olarak kıyaslanmıştır. SDS temelli deselülerizasyon uygulaması gerek 30 mm uzunluktaki gerekse 10 mm uzunluktaki doku kesitlerinde başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Ancak süperkritik CO₂ yöntemiyle gerçekleştirilen deselülerizasyon yöntemi 30 mm uzunluktaki doku kesitlerinde etkili olmamıştır. Bunun neticesinde, doku kesitleri 10 mm uzunlukta olacak şekilde tekrar disekte edilmiş ve süperkritik CO₂ akışkan uygulamasıyla deselülerizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu boyutlarda olumlu sonuçlar elde edilmiş ve yöntemlerin karşılaştırmaları 10 mm uzunluktaki doku kesitleri üzerinden gerçekleştirilmiştir.

Yapılan kıyaslamalarda ilk olarak DNA miktarları karşılaştırılırken deselülerizasyon sonrasında dokudaki artık DNA miktarının 50 ng değerinin altında olması esas alınmıştır. Bu değerın esas alınmasındaki temel sebep, 50 ng DNA'nın fazlasının *in vivo* çalışmalarda immün reaksiyonlara sebebiyet vermesi ve donörün vücudunun transplant malzemeyi reddetmesidir [142]. Deselülerizasyon etkinliğinin değerlendirilmesinde önemli olan bir diğer kriter ise ESM komponentlerinin dokuda ne kadar başarılı bir oranda korunduğudur. ESM komponentlerinin analizleri gerek kalitatif gerekse kantitatif olarak analiz edilmiştir. SDS bazlı kimyasal deselülerizasyon işlemi ele alındığında, literatür bilgileri SDS'nin ESM komponentleri için konsantrasyon ve süreye bağlı olarak yıkıcı bir etkiye sahip olduğunu vurgulamaktadır [113]. Bu çalışmada ise SDS, ESM komponentlerinde %90'lara varan kayıplara neden olmuştur. Aksine, süperkritik CO₂ yöntemiyle deselülerize edilen dokularda ESM'nin dokuda korunma oranı daha yüksektir. Aynı zamanda dokuların SDS ve skCO₂ akışkanına maruz kalması sonucunda elde edilen görseller, benzer şekilde ESM komponentlerinin kaybına paralel olarak SDS

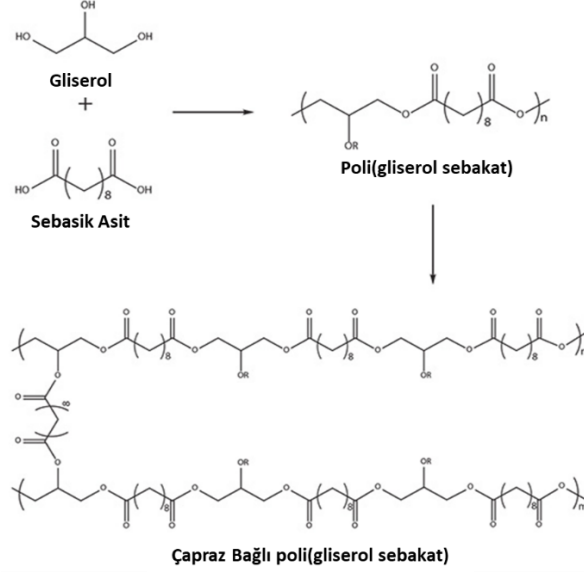
ajanının dokuyu beyazlaştırdığı ve $skCO_2$ uygulamasına bağlı olarak doku renginde önemli bir değişim olmadığını vurgular. Son olarak elde edilen tüm bu sonuçlar elektron mikroskobu görüntüleri ile desteklenmiştir.

4.2. PGS Kardiyak Yamaların Karakterizasyonları

Tez çalışması ikinci aşamasında 8, 10 ve 12 saat süreyle dehidrotermal olarak çapraz bağlanarak sentezlenmiş PGS elastomerlerinin makro boyuttaki görüntüleri kamera yardımıyla çekilmiş ve görüntüler Şekil 4.28’de verilmiştir. Yapılan makro analizlerde çapraz bağlanma süresi materyalin morfolojisi üzerinde bir değişiklik göstermemiştir. Çapraz bağlanmanın kimyasal reaksiyonu Şekil 4.29’da şematik olarak gösterilmiştir. Bu reaksiyonun temel prensibi, gliserol ve sebasik asit monomerlerinin mikrodalga ışınlarıyla yapıdaki suyu uzaklaştırması ve kondenzasyon polimerizasyonu ile birbirine katılmasıyla açıklanır. Ardından yüksek sıcaklık ve vakum etkisiyle yapı dehidrotermal olarak çapraz bağlanır ve ana zincirler üzerinde ester bağları oluşturulur.



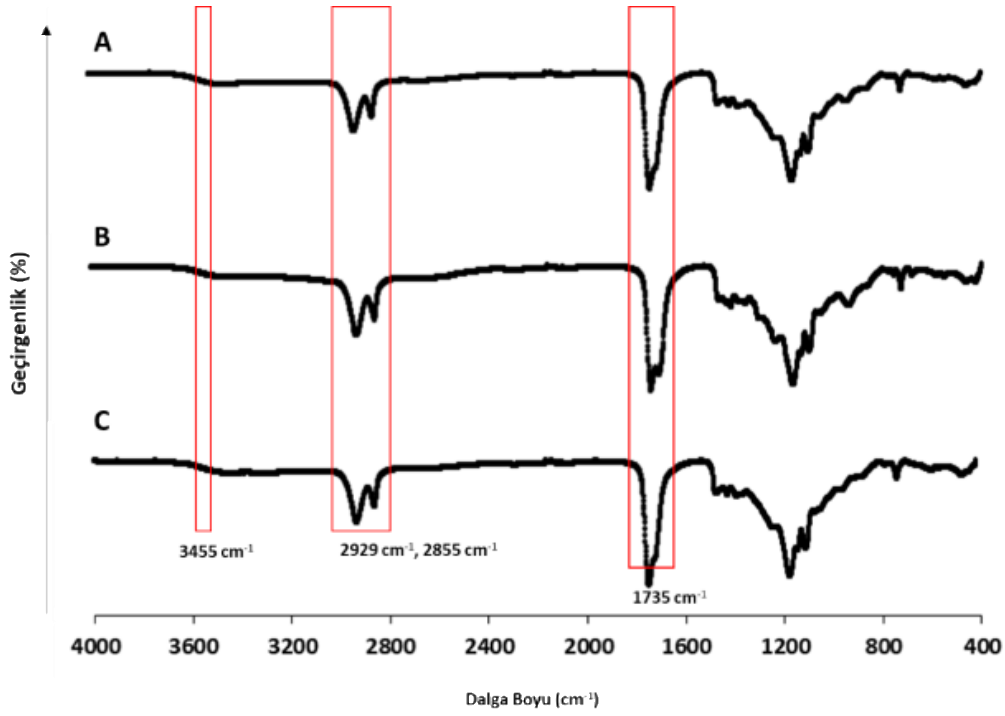
Şekil 4.28. (A) 8 saat, (B) 10 saat (C) 12 saat çapraz bağlanmış PGS polimerine ait görüntüleri.



Şekil 4.29. Poli(gliseroil-sebakat) elastomerinin reaksiyon şematığı [153].

4.2.1. Fourier Transform Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) Analizi

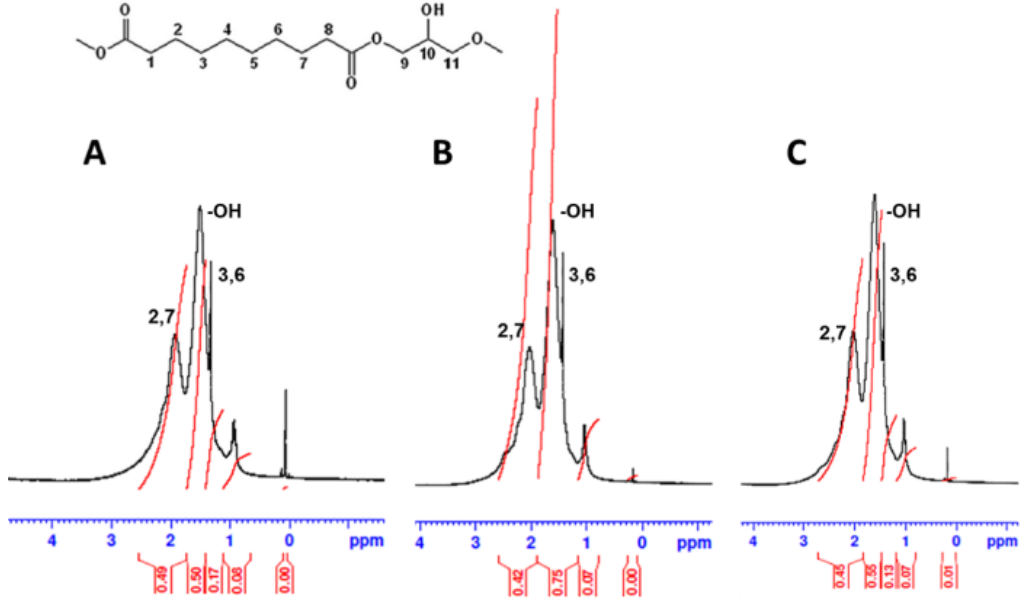
Fourier Transform Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) ile farklı sürelerde çapraz bağlanmış PGS elastomerlerinin yapının kimyasal kompozisyonu belirlenmiştir. Buna göre 8 saat, 10 saat ve 12 süre ile çapraz bağlanmış PGS elastomerinin FTIR sonuçları Şekil 4.30'da verilmiştir. Bu sonuçlara göre, 1735 cm^{-1} dalga boyundaki absorban pikleri PGS polimerinin esterifikasyon tepkimesi ile ilişkili oluşan C=O bağlarına özgüdür. $2929\text{-}2855 \text{ cm}^{-1}$ aralığındaki absorban pikleri alken (-CH) grupları ile ilişkilendirilken; 3455 cm^{-1} dalga boyundaki absorban pikleri ise molekül içerisindeki -OH bağları ile ilişkilendirilir [154].



Şekil 4.30. (A) 8 saat, (B) 10 saat (C) 12 saat çapraz bağlanmış PGS polimerinin FTIR spektrumları.

4.2.2. Hidrojen Nükleer Manyetik Rezonans ($^1\text{H-NMR}$) Spektroskopisi

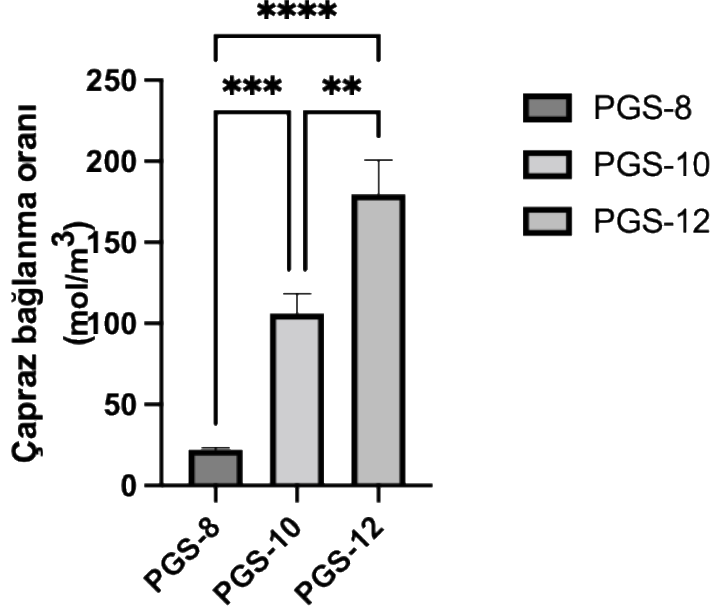
Çapraz bağlanmanın kontrolü ve doğrulanması amacıyla Hidrojen Nükleer Manyetik Rezonans ($^1\text{H-NMR}$) spektroskopisi ile 8, 10 ve 12 saat çapraz bağlanmış PGS elastomerlerinin $^1\text{H-NMR}$ spektrumu Şekil 4.31’de verilmiştir. Ana polimer zinciri üzerindeki 2 ve 7 numaralara ait protonlar (C_2 ve C_7) 2-2,1 ppm aralığında belirlenmiştir. –OH gruplarına ait protonlar 1.5-1.6 ppm aralığında ve 3 ve 7 numaralara ait protonları ise 1,3-1,4 ppm aralığında belirlenmiştir.



Şekil 4.31. (A) 8 saat, (B) 10 saat, (C) 12 saat süreyle çapraz bağlanmış PGS elastomerlerine ait ¹H-NMR spektrumu.

4.2.3. Mekanik Çekme Analizi

Elde edilen elastomerin çapraz bağ yoğunluklarının belirlenmesi amacıyla 8, 10 ve 12 saat çapraz bağlanmış PGS elastomerlerine mekanik çekme testi uygulanmış (n=3) ve elde edilen stres-gerinim eğrisinin %20-40 gerinim aralığından elastisite değerleri elde edilmiştir. Hesaplanan elastisite değerleri Flory teorisi [144] kullanılarak her grubun molar çapraz bağlanma yoğunlukları hesaplanmış (mol/m^3) ve buna göre sonuçlar histogram grafiği cinsinden Şekil 4.32'de verilmiştir.



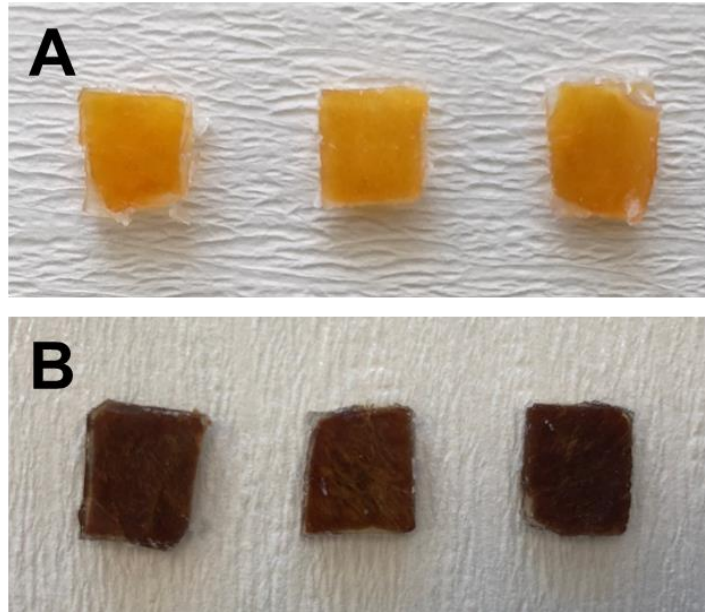
Şekil 4.32. 8, 10 ve 12 saat süreyle çapraz bağlanmış PGS elastomerinin çapraz bağ yoğunluklarını gösteren grafik.

Buna göre 8 saat süreyle çapraz bağlanmış PGS elastomerinin molar çapraz bağ yoğunluğu $22,2 \pm 1,2 \text{ mol/m}^3$, 10 saat süreyle çapraz bağlanmış PGS elastomerinin molar çapraz bağ yoğunluğu $106,39 \pm 12,2 \text{ mol/m}^3$ ve 12 saat süreyle çapraz bağlanmış PGS elastomerinin molar çapraz bağ yoğunluğu ise $179,7 \pm 20,9 \text{ mol/m}^3$ olarak belirlenmiştir. İstatiksel analizlerde tüm gruplar arasındaki farkın anlamlı olduğu bulunmuştur. Buna göre elde edilen prepolimerin ısıl olarak polimerizasyona maruz kalma süresi arttıkça, oluşan polimerin çapraz bağlanma yoğunluğunda artış görülmüştür. Bu artış aynı zamanda malzemelerin mekanik mukavemet değerlerindeki artış ile doğru orantılıdır.

4.3. Hibrit Kardiyak Yamaların Karakterizasyonları

Tez çalışmasının ilk aşamasında 2 farklı yöntemle elde edilen deselülerize kardiyak yamalar sonraki aşamada PGS prepolimeri içerisinde emdirilmiş ve yukarıda optimize edilen süre doğrultusunda (10 saat) dehidrotermal olarak çapraz bağlanmıştır. Böylece, SDS tabanlı ve skCO₂ tabanlı olmak üzere 2 farklı hibrit kardiyak yama elde edilmiştir. Elde edilen kardiyak yamalar S-Hibrit (SDS uygulaması tabanlı elde edilen hibrit yamalar) ve SK-Hibrit (skCO₂ uygulaması tabanlı elde edilen hibrit yamalar) olarak adlandırılmıştır. Elde edilen hibrit yamalar cam petrielerde 10 mm x 10 mm boyutlarında

olacak şekilde petriden kazınarak çıkarılmıştır. Gerek kullanılan cam petri boyutu gerekse kullanılan monomer miktarlarının etkisi göz önünde bulundurularak elde edilen hibrit kardiyak yamaların kalınlıkları, S-Hibrit ve S-Kompozit için sırasıyla $1,98 \pm 0,04$ mm ve $1,85 \pm 0,22$ mm olarak hesaplanmıştır. Literatürde doku mühendisliği uygulamalarında kullanılacak biyomalzemelerin her dokunun kendi özel gereksinimlerini karşılayacak kalınlıkta olması gerektiği vurgulanmaktadır. Buna göre kardiyak yamaları için bu kalınlık en çok 10 mm olacak şekilde tanımlanır [155]. Yapılan çalışmalarda kardiyak yamalar için sentezlenmiş greftlerin kalınlıkları 2 mm [156], 2 mm [157] ve 4,3 mm [158] olarak örneklendirilebilir. Bu çalışmada elde edilen kardiyak yama kalınlıkları bu bilgiler doğrultusunda uyumlu ve uygundur. Bunlara ek olarak elde edilen hibrit kardiyak yamaların görüntüleri Şekil 4.33'te verilmiştir. Elde edilen hibritlerin deselülerize yama- renk morfolojilerinden farklı olması, matrikslerin maruz kaldığı sıcaklık ile ilişkilidir.

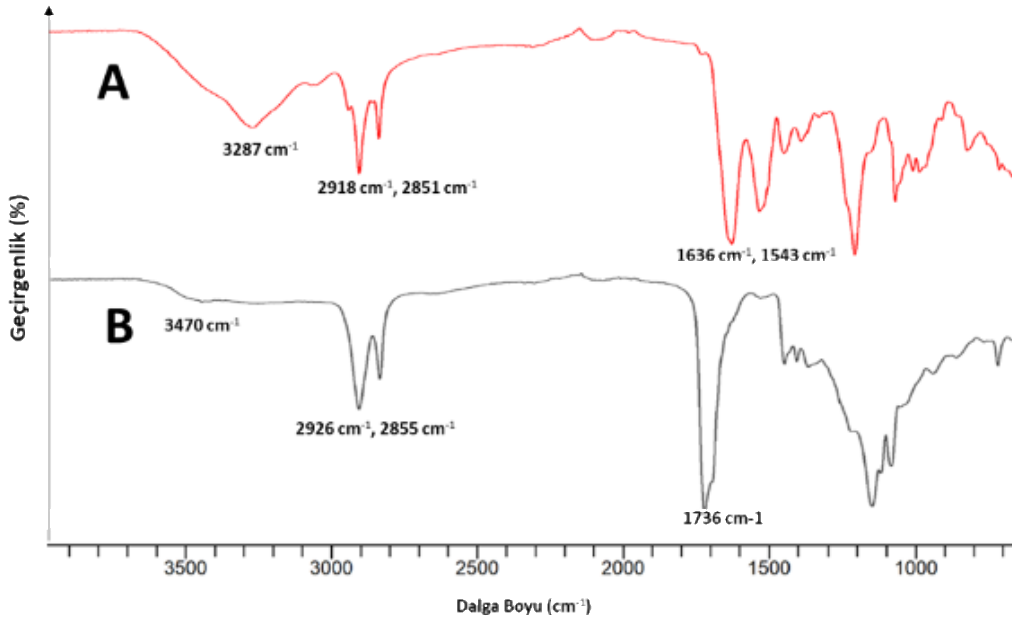


Şekil 4.33. S-Hibrit (A) ve SK-Hibrit (B) gruplarına ait hibrit yamaların morfolojik görüntüleri.

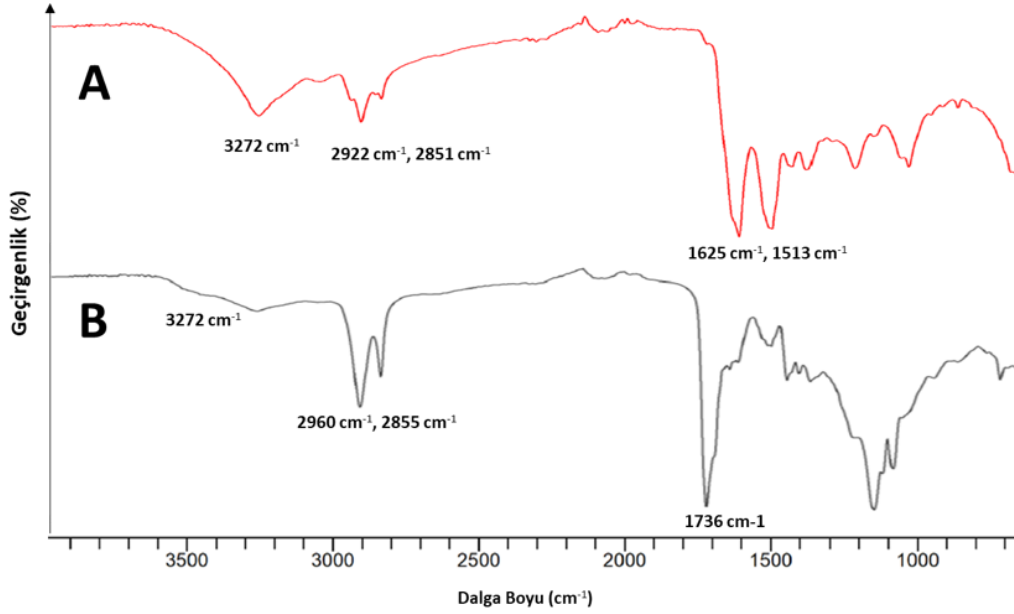
4.3.1. Fourier Transform Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) Analizi

Elde edilen tüm hibrit yamaların kimyasal yapıları FTIR analizi ile belirlenmiştir. SDS muamelesi ile elde edilen deselülerize miyokard yamanın ve hibrit yamanın (S-Hibrit) karşılaştırmalı FTIR spektrumları Şekil 4.34'te ve skCO₂ muamelesi ile elde edilen deselülerize miyokard yamanın ve hibrit yamanın (SK-Hibrit) karşılaştırmalı FTIR

spektrumları ise Şekil 4.35'te verilmiştir. Buna göre deselülerize yamalara ait FTIR spektrumlarında $1513-1543\text{ cm}^{-1}$, $1625-1636\text{ cm}^{-1}$ ve $3287-3470\text{ cm}^{-1}$ absorban pikleri sırasıyla amid II, amid I ve amid A moleküllerine ait olup deselülerize dokudaki hücre dışı matristeki kolajeni temsil eder [159]. $2918-2926\text{ cm}^{-1}$ ve $2851-2855\text{ cm}^{-1}$ absorbanları ise glikozaminoglikanların asimetrik ve simetrik C-H bağlarını ifade etmektedir. Elde edilen hibrit kardiyak yamaların absorbanları, PGS elastomerinin absorban pikleri ile aynıdır ve bu durum PGS elastomerinin başarıyla deselülerize yamalar içerisinde çapraz bağlanabildiğini göstermektedir (3400 cm^{-1} -OH gruplarını; $2900-2850\text{ cm}^{-1}$ -CH gruplarını ve 1736 cm^{-1} ise C=O gruplarını ifade eder.)



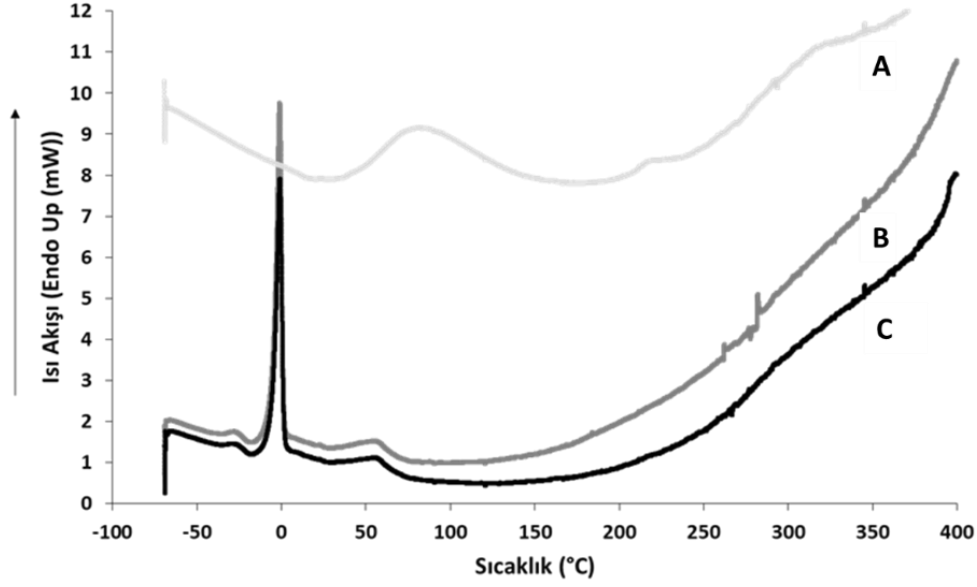
Şekil 4.34. (A) Kimyasal deselülerize miyokard yamanın, (B) Bu yöntemle elde edilmiş hibrit yamanın (S-Hibrit) FTIR spektrumları.



Şekil 4.35. (A) Süperkritik CO₂ deselülerize miyokard yamanın, (B) Bu yöntemle elde edilmiş hibrit yamanın (SK-Hibrit) FTIR spektrumları.

4.3.2. Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC)

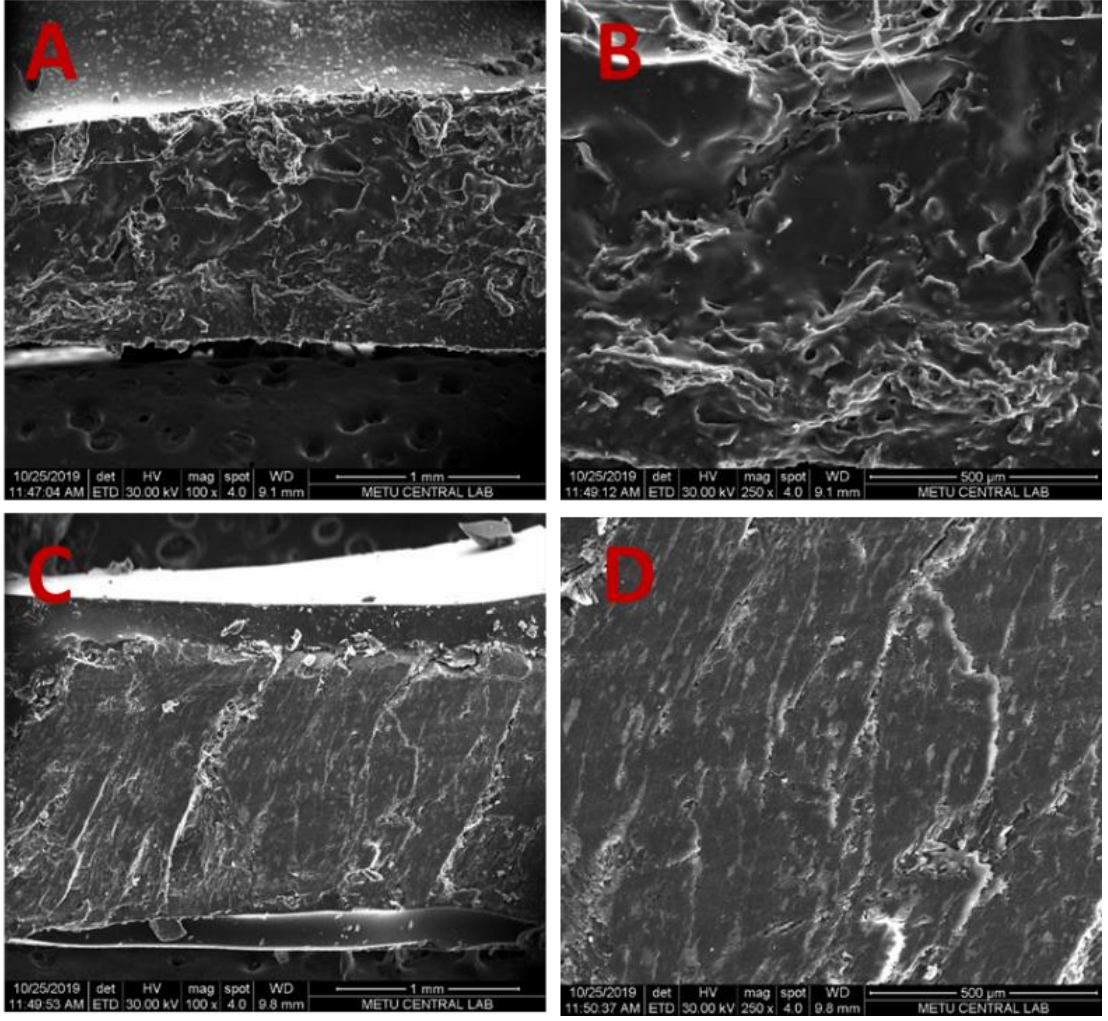
Tez çalışması kapsamında sentezlenen deselülerize matriksin, 10 saat süreyle çapraz bağlanmış PGS elastomerinin ve hibrit kardiyak yamaların termal özellikleri diferansiyel taramalı kalorimetre ile belirlenmiş ve elde edilen DSC diyagramı Şekil 4.36'da verilmiştir. Burada, her iki yöntemle deselülerize edilmiş yamaların ve bu şekilde elde edilen S-Hibrit ve SK-Hibrit yamaların DSC diyagramları ayrıca edilmiş ancak sonuçlar bire bir aynı olduğu için şekilde verilmemiştir. PGS elastomeri erime sıcaklığının altında [160] semikristalin yapıda, 37 °C sıcaklıkta ise amorf yapıdadır. PGS elastomerinin camsı geçiş sıcaklığı (T_g) -37,02 °C; gliserol ve sebasik asitin erime sıcaklığı (T_m) ise sırasıyla 5,23 °C ve 37,62 °C'dir. Şekil 3.36 B ve C'de verilen PGS elastomerinin ve hibrit yamanın (10 saat kürlenme) camsı geçiş sıcaklıkları -25,56 °C ve -24,73 °C olarak belirlenmiştir. Erime sıcaklıkları ise gliserol ve sebasik asit için (T_{m1} , T_{m2}) 58,68 °C ve 56,66 °C olarak belirlenmiştir. Bu değerler polimerdeki monomer oranlarına göre literatürde belirtildiği gibi değişiklik göstermektedir [154]. Son olarak deselülerize matriksteki kolajenin denatürasyon sıcaklığı 79,28 °C olarak belirlenmiştir (A).



Şekil 4.36. (A) Deselülerize matris, (B) PGS elastomeri, (C) Hibrit kardiyak yamanın termal özelliklerini gösteren DSC diyagramı.

4.3.3. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi

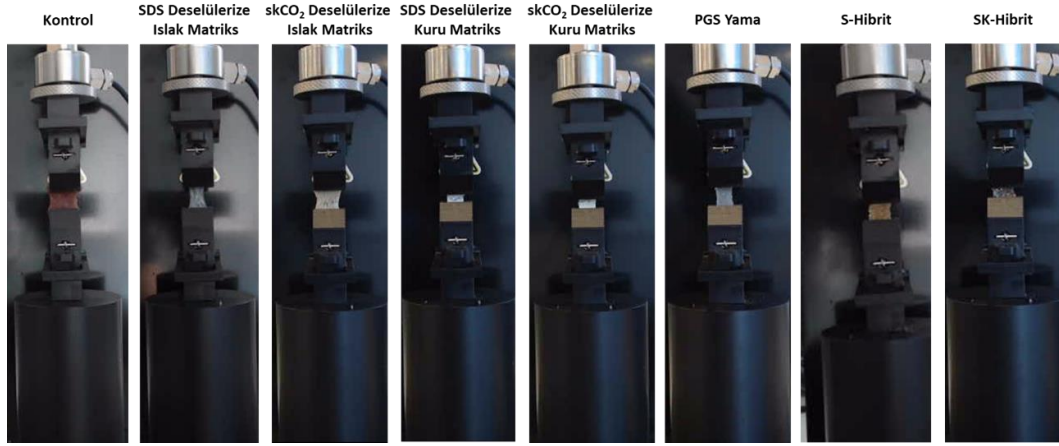
Hibrit kardiyak yamaların mikro boyuttaki yapısı taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile analiz edilmiştir. S- Hibrit ve SK-Hibrit yamalarına ait enine kesitleri Şekil 4.37’de verilmiştir. PGS prepolimerinin SDS tabanlı deselülerizasyon yöntemi uygulamasıyla elde edilen gözenekli matris (Şekil 4.27E) içerisinde başarılı şekilde çapraz bağlandığı iki farklı büyütme oranı ile gösterilmiştir (Şekil 4.37A ve 4.37B). Benzer şekilde $skCO_2$ deselülerizasyonu ile elde edilen kardiyak yamalar (Şekil 4.27F) içerisinde, prepolimer ile dolgulanmış ve başarıyla çapraz bağlanmıştır (Şekil 4.37C ve 4.37D). SEM analizleri, yukarıda ayrıntılı olarak bahsedilen FTIR analizi ile birbirini doğrulamış ve deselülerize yamaların hibritleşme sürecinin başarı ile tamamlandığı gösterilmiştir.



Şekil 4.37. S-Hibrit grubuna ait farklı büyütme oranlarındaki (A) 100X (B) 250X enine kesitleri;SK-Hibrit grubuna ait farklı büyütme oranlarındaki (C) 100X (D) 250X enine kesitlerini gösterentaramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüleri.

4.3.4. Mekanik Çekme Analizi

Tez çalışması kapsamında elde edilen hibrit yamaların mekanik özelliklerini belirlemek amacıyla kontrol grubu, SDS deselüerizasyonu ile elde edilen ıslak ve kuru kardiyak greft grubu, skCO₂ deselüerizasyonu ile elde edilen ıslak ve kuru kardiyak greft grubu, PGS elastomer grubu ve elde edilen hibrit grupların (S-Hibrit, SK-Hibrit) mekanik analiz esnasında elde edilen görüntüleri Şekil 4.38’de verilmiştir. Elde edilen sonuçlar ise tablo şeklinde Tablo 4.1’de verilmiştir.



Şekil 4.38. Tüm grupların çekme testi esnasında elde edilen görüntüleri.

Tablo 4.1. Tüm grupların mukavemet değerleri (kPa), uzama davranışları (%) ve elastisite modüllerini (kPa) gösteren tablo (n=4).

	Çekme Dayanımı (kPa)	Çekme Uzaması (%)	Elastisite Modülü (kPa)
Kontrol	57,5 ± 15,7	81,7 ± 12,6	83,3 ± 22,6
SDS Deselüerize Islak Matriks	130,5 ± 20,6 (ns)	117,8 ± 34,7 (ns)	201,9 ± 13,5 (ns)
skCO₂ Deselüerize Islak Matriks	141,5 ± 49,6 (ns)	155,3 ± 30,9 (p*)	128,6 ± 15,8 (ns)
SDS Deselüerize Kuru Matriks	172,6 ± 89,3 (ns)	28,6 ± 4,1 (ns)	654,6 ± 16,7 (p****)
skCO₂ Deselüerize Kuru Matriks	347 ± 48,1 (p****)	10,8 ± 3,9 (p*)	3213,33 ± 141,1 (p****)
PGS Yama	244,2 ± 17,5 (p*)	188,06 ± 20,3 (**)	143,25 ± 16,9 (ns)
S-Hibrit Yama	350 ± 54,1 (p****)	145,7 ± 13,9 (ns)	340,5 ± 17,8 (p**)
SK-Hibrit Yama	221,3 ± 18,6 (p*)	65 ± 8,5 (ns)	359,9 ± 19,2 (p**)

Tablo 4.1’de verilen sonuçlara göre ilk olarak çekme mukavemeti özelliği kıyaslandığında, doğal doku SDS deselüerizasyonu sonrasındaki mukavemet değeri arasında farklılık görülmemiştir (ns). Ancak çekme mukavemet değeri skCO₂ deselüerizasyonu ve liyofilizasyonu sonrasında artmıştır (p****). Aynı zamanda çekme mukavemet değeri kontrol grubuna kıyasla PGS kardiyak yamaları, S-Hibrit ve SK-Hibrit yamalarıyla farklılık göstermiştir (p*, p****, p*). Bu durum yapıya katılan PGS elastomerinin çekme mukavemet değerini arttırmasıyla açıklanır. Çekme uzamalarının

kıyaslamalarında ise elde edilen yamalar kontrol grubuyla kıyaslandığında skCO₂ deselüerizasyonu sonrasında ıslak matriksin uzamasında artış gözlenmiştir (p*). Bu deselüerize dokunun liyofilize edilmesiyle uzama oranında önemli bir azalma gözlenmiştir (p*). Ancak, % çekme uzama değerindeki bu azalma PGS elastomerinin ilavesiyle iyileştirilmiş (S-Kompozit) ve böylece kontrol grubu ile arasındaki istatistiksel farklılık anlamsız olarak elde edilmiştir (ns). SDS deselüerizasyonu ise % uzama değerlerinde istatistiksel anlamlı bir farklılık yaratmamıştır (ns). Bu şekilde elde edilen S-Hibrit kardiyak yama da kontrol grubu ile kıyaslandığında % uzama değerinin kontrol dokuyu taklit edebildiği gösterilmiştir (ns). Önemli bir nokta ise, kontrol grubu ile PGS kardiyak yamaların % uzama değerleri arasında farklılık bulunmasıdır (p**). Elde edilen elastisite modüllerinin kıyaslamasında ise, kontrol grubu ile deselüerize ıslak matriksler arasında farklılık görülmemiştir (ns). Ancak ıslak matrikslerin hibrit forma dönüştürülebilmesi amacıyla kurutulması elastisite modülünde önemli bir artış yaratmıştır (p****). PGS elastomerinin elastisite modülü değeri literatürde 50-1500 MPa aralığında olduğu vurgulanmıştır [154]. PGS kardiyak yama kontrol grubu ile tek başına kıyaslandığında elastisite modülleri arasında anlamlı farklılık elde edilmemiştir (ns). PGS elastomerinin hibrit yapıya katılması elde edilen elastisite değerlerinde ise artış görülmüştür (p**). Elastisite modül değerleri gerek S-Hibrit gerekse SK-Hibrit kardiyak yamaları için yaklaşık 4 kat artmıştır.

Gruplar arası kıyaslamalarda ise skCO₂ deselüerizasyonu sonrasında elde edilen kuru matrikslerin çekme mukavemet değeri ve SDS deselüerizasyonu sonrasında elde edilen kuru matrikslerin çekme mukavemeti değerinden yüksektir ve istatistiksel olarak anlamlıdır (p*). SDS deselüerizasyonu ile elde edilen kuru matrikslerin PGS elastomeri ile katkılanması sonucu mukavemet değeri 2 kat kadar artmıştır (p*). Ancak skCO₂ deselüerizasyonu ile elde edilen kuru matrikslerin PGS elastomeri ile katkılanması sonucu mukavemet değerinde istatistiksel anlamlı bir farklılık görülmemiştir (ns). S-Hibrit ve S-Kompozit kardiyak yamaların kıyaslamalarında ise çekme mukavemet değerleri arasında istatistiksel anlamlı farklılık görülmemiştir (ns). % uzama davranışlarının kıyaslamalarında, skCO₂ deselüerizasyonu sonrasında elde edilen kuru matrikslerin çekme uzama değeri ve SDS deselüerizasyonu sonrasında elde edilen kuru matrikslerin çekme uzaması değerleri arasında istatistiksel anlamlı farklılık görülmemiştir. SDS deselüerizasyonu ile elde edilen kuru matrikslerin PGS elastomeri ile katkılanması

sonucu % uzama değeri 5 kat kadar artmıştır (p***). Ancak skCO₂ deselüerizasyonu ile elde edilen kuru matrislerin PGS elastomeri ile katkılanması sonucu % uzama değerinde istatistiksel anlamlı bir farklılık görülmemiştir (ns). S-Hibrit ve S-Kompozit kardiyak yamaların kıyaslamalarında ise hibrit grupların çekme uzama değeri kompozit grupların çekme uzama değerlerinden yaklaşık 2,5 kat daha fazladır (*). Son olarak elastisite modüllerinin kıyaslamalarında ise, skCO₂ deselüerizasyonu sonrasında elde edilen kuru matrislerin elastisite değeri ve SDS deselüerizasyonu sonrasında elde edilen kuru matrislerin elastisite değerinden yaklaşık 4 kat daha fazladır (p***). SDS deselüerizasyonu ile elde edilen kuru matrislerin PGS elastomeri ile katkılanması sonucu elastisite değeri yarıya düşmüştür (p***). Bu durum kuru matrisin rijit yapısının elastomerik özellik kazandırılmasıyla açıklanır. Benzer şekilde skCO₂ deselüerizasyonu ile elde edilen kuru matrislerin PGS elastomeri ile katkılanması sonucu elastisite modül değeri yaklaşık 8 kat azalmıştır (p****). Son olarak S-Hibrit ve S-Kompozit kardiyak yamaların kıyaslamalarında ise bu iki grup arasında istatistiksel anlamlı bir farklılık görülmemiştir (n.s.).

4.4. Kompozit Kardiyak Yamaların Karakterizasyonları

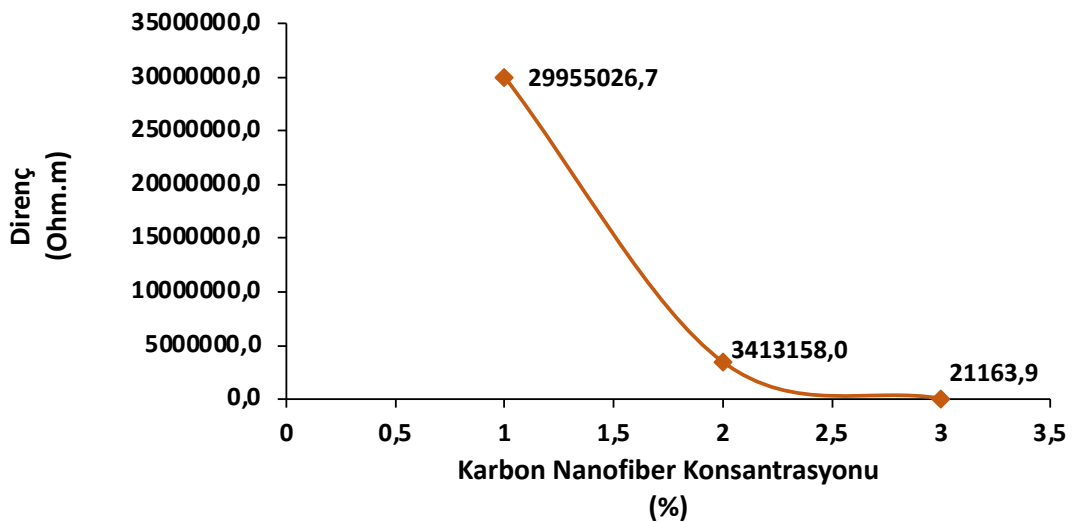
Tez çalışmasının bir sonraki aşamasında hibrit yamalara ek olarak iletken özelliklerin sağlanmasının hedeflendiği kompozit kardiyak yamalar sentezlenmiştir. Kompozit kardiyak yamaların sentezinin ilk aşamasında yama kalınlığının ideal kalınlık boyutunda elde edilebilmesi için farklı deselüerize matrisler farklı prepolimer oranlarında katkılanmış ve buna göre elde edilen kompozit yamaların kalınlık değerleri Tablo 4.2’de verilmiştir. Burada hedeflenen kompozit kardiyak yama kalınlığı deselüerize ve hibrit yamaların kalınlığına eş olması, yani 2 mm kalınlıkta olmasıdır. Tabloya göre 1,85 g - 3,5 g aralığında prepolimer ilavesi kompozit yamaların hedeflenen nihai kalınlığı için yetersiz kalmıştır. Aksine 5,5 g prepolimer ilavesi gerek prepolimerin miktarı sebebiyle gerekse petrinin boyutu sebebiyle THF’in buharlaşması için yetersiz kalmış ve bunun sonucu olarak pürüzlü ve heterojen bir yüzeyler elde edilmiştir. 4,5 g prepolimer katkısı ile 2 mm kalınlıkta ve homojen bir dağılım/yüzey ile kompozit yamalar elde edilmiştir. Buna göre kompozit kardiyak yamaların sentezinde kullanılacak prepolimer miktarı 4,5 g olarak belirlenmiştir.

Tablo 4.2. Farklı prepolimer miktarlarının kompozit kalınlıklarına etkisi.

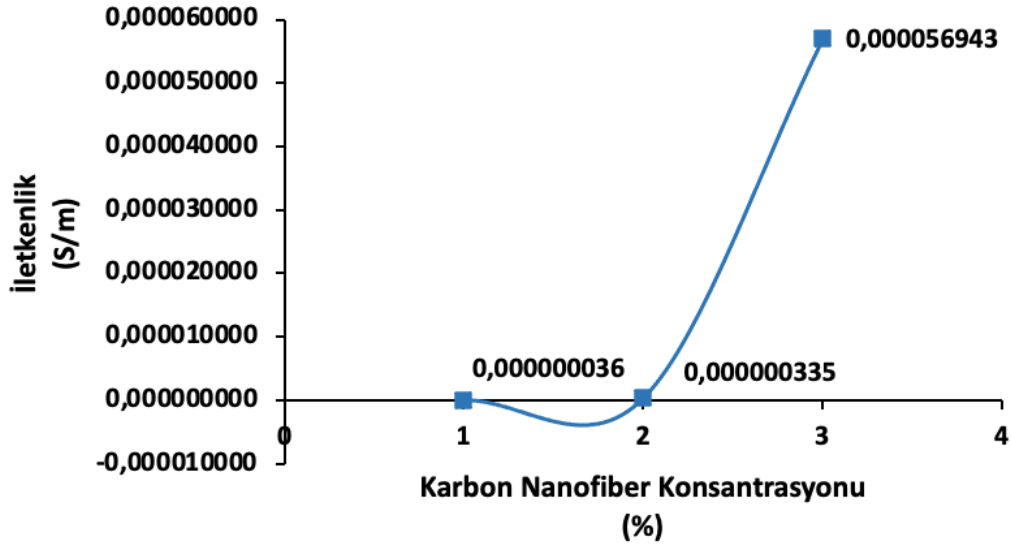
GRUPLAR	A	B	C	D	E
Prepolimer Miktarı (g)	1.85	2.5	3.5	4.5	5.5
%1 Karbon Nanofiber/ %1 Karbon Nanotüp (g)	0.0185	0.025	0.035	0.045	0.055
KALINLIK (mm)	0.5 mm	0.8	1.3	2	2.2-2.4

4.4.1. İletkenlik Ölçümleri

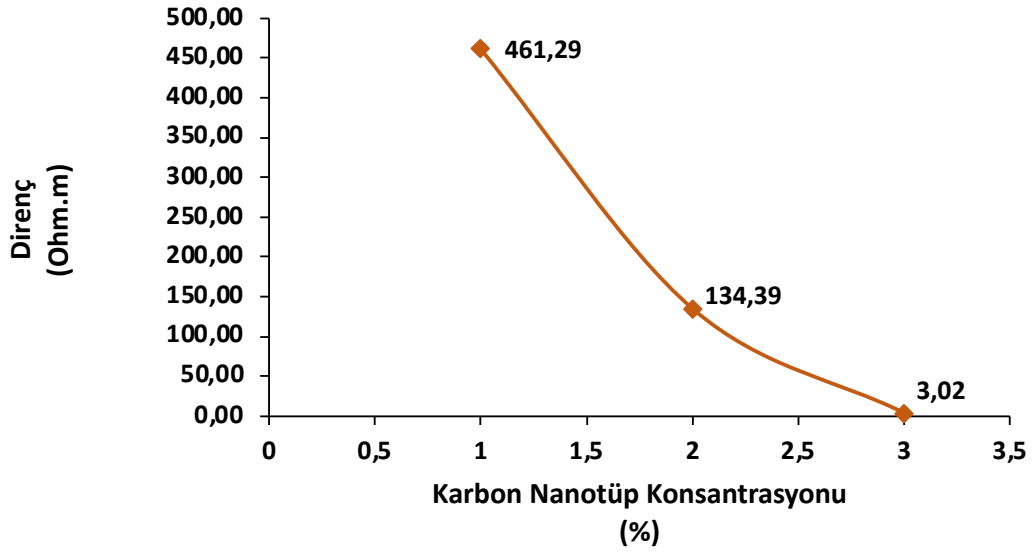
Kompozit kardiyak yamalarının eldesinin ikinci aşamasında prepolimer miktarı sabit tutulmuş ve katkılanan karbon nanofiber (KNF) ve karbon nanotüp (KNT) yüzdesi değiştirilerek iletken özelliklerin incelenmesi hedeflenmiştir. Katkılanan KNT ve KNF oranı ağırlıkça %1, %2 ve %3 (a/a) olarak belirlenmiştir. Bu çalışmada KNF katkısı ile elde edilen kompozit kardiyak yamaların direnç (Ohm.m) ve iletkenlik (S/m) sonuçlarını gösteren grafikler sırasıyla Şekil 4.39 ve Şekil 4.40'ta verilmiştir. Benzer şekilde KNT katkısı ile elde edilen kompozit kardiyak yamaların direnç (Ohm.m) ve iletkenlik (S/m) sonuçlarını gösteren grafikler ise Şekil 4.41 ve Şekil 4.42'de verilmiştir. Elde edilen tüm sonuçlar çizelge haline getirilmiş ve Tablo 4.3'te özetlenmiştir.



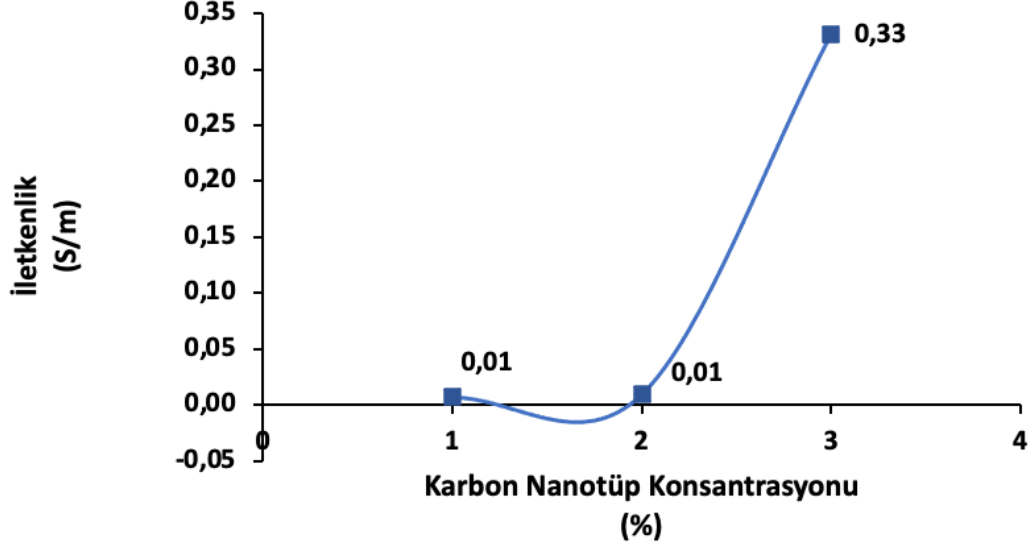
Şekil 4.39. %1, %2 ve %3 karbon nanofiber konsantrasyonu ile çapraz bağlanmış kompozitlerin direnç değerlerini Ohm.m cinsinden gösteren çizgi grafiği.



Şekil 4.40. %1, %2 ve %3 karbon nanofiber konsantrasyonu ile çapraz bağlanmış kompozitlerin iletkenlik değerlerini S/m cinsinden gösteren çizgi grafiği.



Şekil 4.41. %1, %2 ve %3 karbon nanotüp konsantrasyonu ile çapraz bağlanmış kompozitlerin direnç değerlerini Ohm.m cinsinden gösteren çizgi grafiği.



Şekil 4.42. %1, %2 ve %3 karbon nanotüp konsantrasyonu ile çapraz bağlanmış kompozitlerin iletkenlik değerlerini S/m cinsinden gösteren çizgi grafiği.

Tablo 4.3. %1, %2 ve %3 karbon nanofiber ve karbon nanotüp katkısı ile çapraz bağlanmış kompozitlerin direnç (Ohm.m) ve iletkenlik (S/m) değerleri.

	Karbon Nanofiber / Karbon Nanotüp Katkısı (%)		
	1	2	3
İletkenlik (S/m)	$3.6 \times 10^8 / 7.1 \times 10^{-3}$	$3.4 \times 10^7 / 9.5 \times 10^{-3}$	$5.7 \times 10^5 / 3.3 \times 10^{-1}$
Direnç (Ohm.m)	$3 \times 10^7 / 4.6 \times 10^2$	$3.4 \times 10^6 / 1.3 \times 10^2$	$2.1 \times 10^4 / 3.0 \times 10^1$

Şekil 4.39’de artan KNF konsantrasyonlarında direncin azaldığı ve buna bağlı olarak Şekil 4.40’te azalan dirence karşılık iletkenlik değerinin arttığı gözlenmiştir. Benzer şekilde Şekil 4.41’te artan KNT direnç azalmış ve buna bağlı olarak iletkenlik değeri (Şekil 4.42) artmıştır. Tüm değerler kıyaslandığında (Tablo 4.3) özellikle karbon nanotüp katkısının kompozit yapıda karbon nanofiber katkısına kıyasla iletkenlik değerini önemli ölçüde arttırdığı gözlenmiştir. Bununla beraber kompozit yapıdaki artan karbon katkısı kompozit yapının iletkenliğini arttırmış ve bu sonuç literatür ile uyumlu olduğu gözlenmiştir [161]. Buna göre kompozit kardiyak yamalarda kullanılacak geometrinin nanotüp yapısı olmasına karar verilmiştir. Karbon nanotüplerin artan konsantrasyonlarında herhangi bir

sitotoksik etki gösterip göstermediğinin anlaşılabilmesi için kompozit yapıların ayrıca sitotoksik değerlendirmeleri yapılmış ve sonuçlar hücre kültürü çalışmaları başlığı altında ayrıca incelenmiştir. Tüm bu sonuçlar neticesinde kompozit kardiyak yamaların sentezinde kullanılacak karbon nanotüp katkısı %1 (a/a) olarak belirlenmiştir.

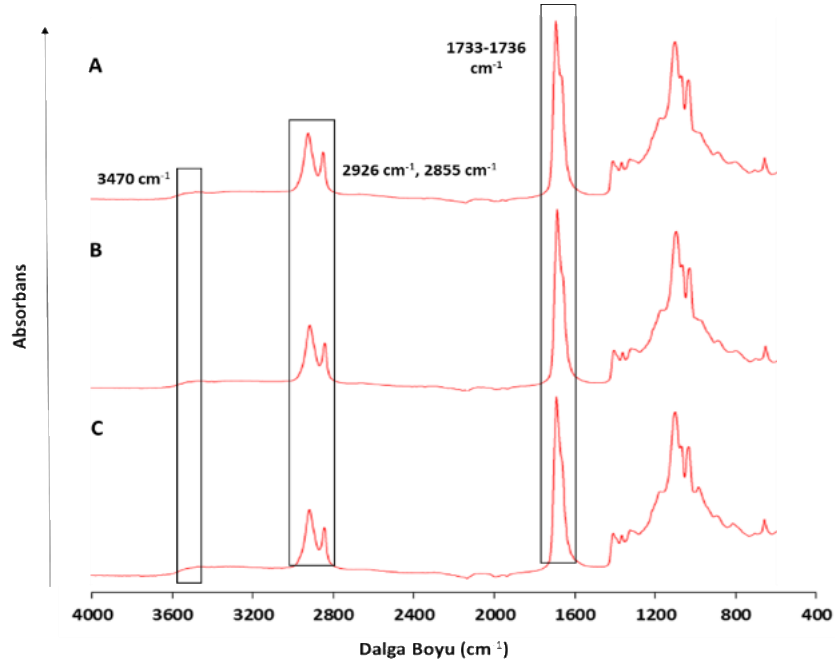
Kullanılacak ideal karbon geometrisi ve yüzdesinin belirlenmesinin ardından son olarak hibrit kardiyak yamaların ve %1 KNT katkılı kompozit kardiyak yamaların direnç (Ohm.m) ve iletkenlik (S/m) değerleri karşılaştırılmış ve sonuçlar Tablo 4.4'te verilmiştir. Buna göre hibrit kardiyak yamaların %1 KNT katkılanması sonucunda direnç değerlerinde azalma tespit edilmiş (p****) ve buna bağlı olarak yapının iletkenlik özelliği kazandığı görülmüştür. Hibrit kardiyak yamaların direnç değerleri GigaOhm seviyelerinde tespit edilmesi nedeniyle iletkenlik özellikleri belirlenememiştir. Buna ek olarak hibrit ve kompozit kardiyak yamaların eldesinde kullanılan deselülerize matriks tipinin (SDS uygulaması ve skCO₂ uygulaması) iletken değerleri üzerinde bir etkisi olmamış ve bu nedenle tablo içerisinde belirtilmemiştir.

Tablo 4.4. Hibrit ve kompozit kardiyak yamaların (%1 KNT Katkılı) direnç ve iletkenlik değerlerini gösteren tablo.

	Direnç (Ohm.m)	İletkenlik (S/m)
Hibrit Kardiyak Yama	$1.63 \times 10^{13} \pm 3.4 \times 10^{12}$	-
%1 KNT Katkılı Kompozit Yama (p****)	$4.61 \times 10^2 \pm 4.2 \times 10^1$	$1 \times 10^{-2} \pm 2 \times 10^{-3}$

4.4.2. Fourier Transform Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) Analizi

Kompozit kardiyak yamaların kimyasal yapı analizleri FTIR ile gerçekleştirilmiş ve ilk olarak %1, %2 ve %3 KNT katkılanmış PGS-KNT polimerleri için elde edilen sonuçlar Şekil 4.43'te verilmiştir. Bu sonuç absorbanza karşılık gelen dalga boyu cinsinden analiz edilmiştir. 3470 cm⁻¹ dalga boyu absorbanları –OH grupları ile ilişkili iken, 1735 cm⁻¹ dalga boyundaki absorban PGS polimerinin esterifikasyon tepkimesi ile ilişkili olan C=O bağlarına özgüdür. Son olarak 2926 ve 2855 cm⁻¹ aralığındaki absorban pikleri ise alken grupları (-CH) ile ilişkilidir. Buna göre FTIR sonucu karbon nanotüplerin PGS elastomeri içerisinde yapıya katıldığını göstermektedir.



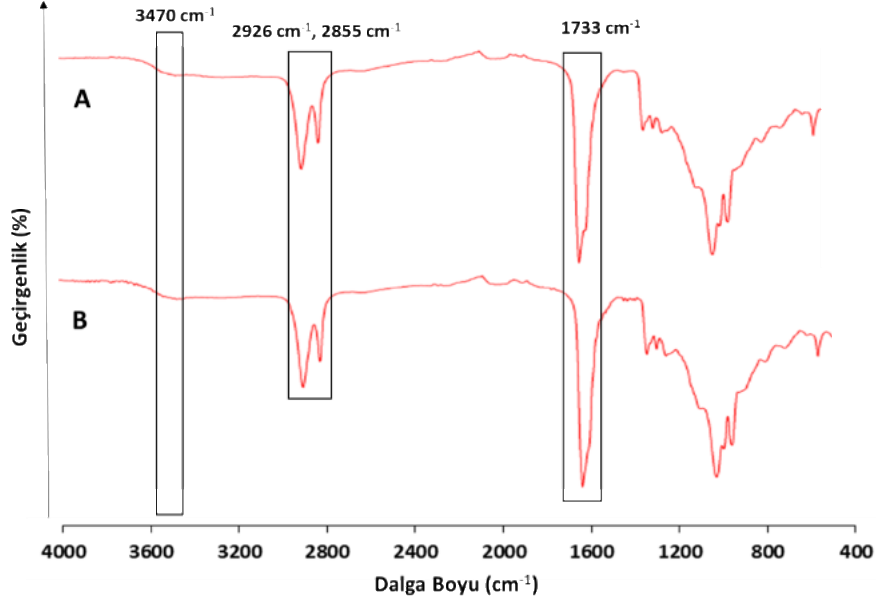
Şekil 4.43. (A) %1 KNT konsantrasyonu, (B) %2 KNT konsantrasyonu, (C) %3 KNT konsantrasyonu ile çapraz bağlanmış polimerlerin FTIR spektrumları.

Tüm bu sonuçlar neticesinde kompozit kardiyak yamalarda kullanılacak ideal KNT katkısı %1 olarak belirlenmiştir. Buna göre tez çalışması kapsamında 2 farklı deselüerizasyon yönteminin uygulanması ile hibrit ve kompozit yapılar olmak üzere 4 farklı kardiyak yama türü elde edilmiştir. Çalışmanın bundan sonraki aşamasında kafa karışıklığına sebebiyet vermemek için elde edilen kardiyak yamalar aşağıdaki şekilde kısaltılarak adlandırılmıştır:

- Kimyasal olarak (SDS) deselüerize edilen dokularla hazırlanmış çapraz bağlı hibrit yamalar: **S-Hibrit***
- Süperkritik CO₂ yöntemle deselüerize edilen dokularla hazırlanmış çapraz bağlı hibrit yamalar: **SK- Hibrit***
- Kimyasal olarak (SDS) deselüerize edilen dokularla hazırlanmış çapraz bağlı %1 KNT katkılı kompozit yamalar: **S-Kompozit***
- Süperkritik CO₂ yöntemle deselüerize edilen dokularla hazırlanmış çapraz bağlı %1 KNT katkılı kompozit yamalar: **SK-Kompozit***

Son olarak, S-Kompozit ve SK-Kompozit kardiyak yamalarını kimyasal yapıları FTIR ile analiz edilmiş ve sonuçlar Şekil 4.44'te verilmiştir. PGS kimyasal analizine benzer

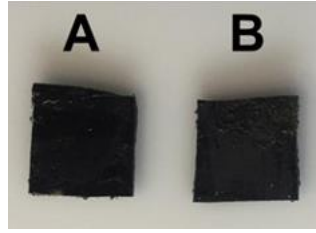
şekilde, 2926 ve 2855 cm^{-1} aralığındaki absorbans pikleri alken (-CH) grupları ile, 1733 cm^{-1} dalga boyundaki absorbans pikleri C=O bağları ile ve 3470 cm^{-1} dalga boyu absorbans pikleri ise (-OH) grupları ile ilişkilidir. PGS-KNF prepolimerinin hazırlanan deselülerize greftlere emdirilerek ve yapı içerisinde başarılı bir şekilde çapraz bağlanmış olduğu gösterilmiştir.



Şekil 4.44. (A) S-Kompozit, (B) SK-Kompozit kardiyak yamalarına ait FTIR spektrumları.

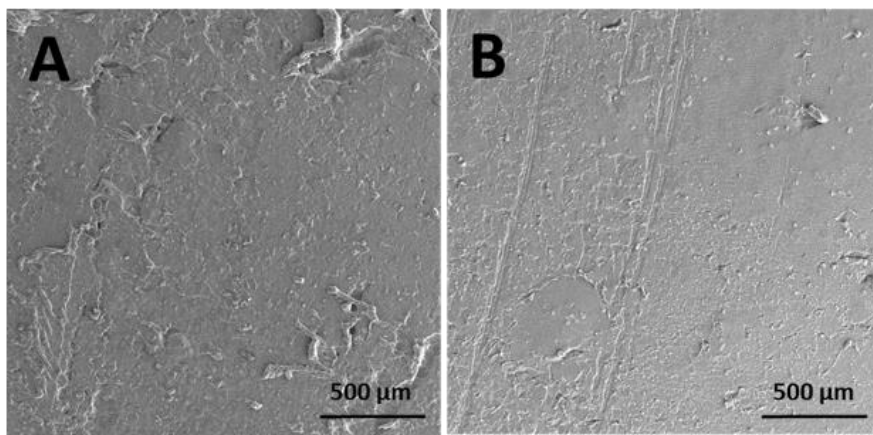
4.4.3. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi

Elde edilen S-Kompozit ve SK-Kompozit kardiyak yamaların mikro boyut analizleri öncesinde morfolojik görüntüleri kamera yardımıyla elde edilmiş ve görüntüler Şekil 4.45'te verilmiştir. Yapıdaki KNT katkısı malzeme rengini tamamen siyaha dönüştürmüştü bu nedenle kompozit yamaların morfolojik olarak bir farklılıkları bulunmamaktadır.

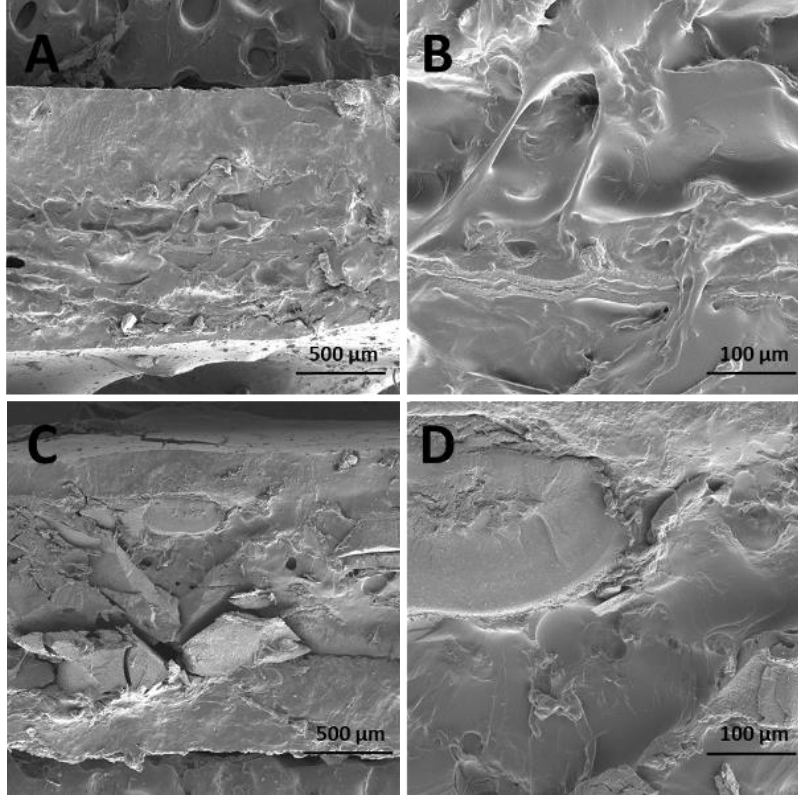


Şekil 4.45. (A) S-Kompozit (B) SK-Kompozit kardiyak yamanın morfolojik görünümü.

S-Kompozit ve SK-Kompozit yapıların mikroskobik yapı analizleri taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile gerçekleştirilmiş ve yüzey kesitlerine ait görüntüleri Şekil 4.46'da, enine kesitlerine ait görüntüleri ise Şekil 4.47'de verilmiştir. Yüzey kesitlerine ait görüntüler incelendiğinde (Şekil 4.46) her iki kompozit yapısı için yüzey morfolojileri arasında belirgin bir farklılık gözlenmemiştir. Elde edilen kompozit kardiyak yamaların yüzeydeki pürüzlü yapısı, yamaların eldesi sürecinde cam petriyelerden kazınarak çıkarılmasına bağlı olarak oluşmuştur. Şekil 4.47'de verilen enine kesitlerin kıyaslamasında ise iki farklı deselüerizasyon yöntemiyle elde edilen greflerin PGS-KNT prepolimeri içerisinde homojen bir şekilde emdirildiğini ve bunun sonucu olarak prepolimerin deselüerize matriks içerisinde başarılı bir şekilde çapraz bağlanabildiğini göstermektedir. Bu sonuçlar bir önceki başlıkta açıklanan kimyasal yapı analizlerini doğrulamaktadır.



Şekil 4.46. (A) S-Kompozit, (B) SK-Kompozit grubuna ait 100X büyütme oranındaki yüzey kesitlerini gösteren taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüleri.



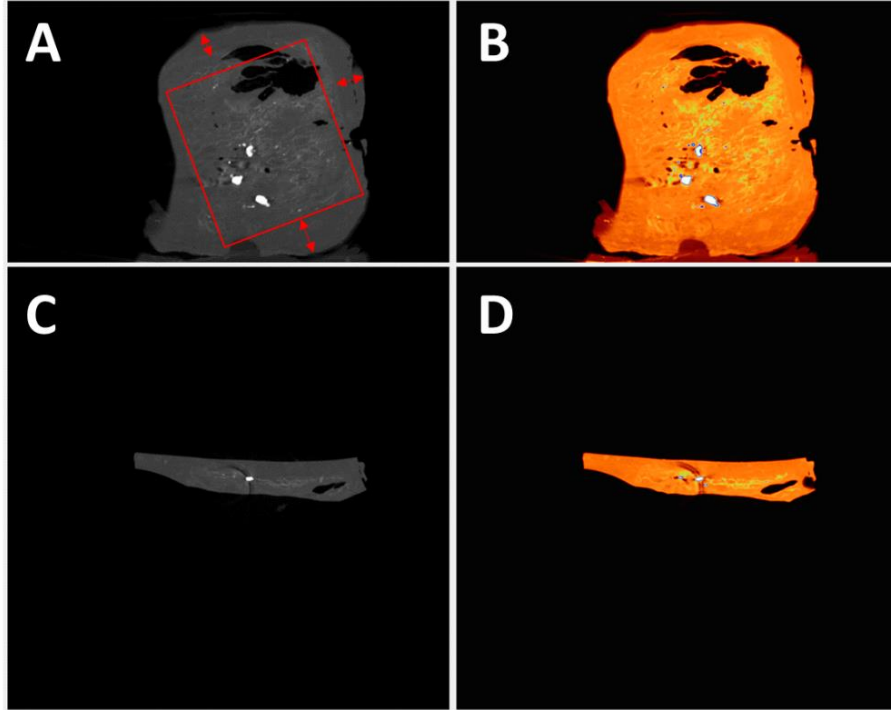
Şekil 4.47. (A, B) S-Kompozit grubuna (C, D) SK-Kompozit grubuna ait enine kesitleri sırasıyla 100X ve 500X büyütme oranında gösteren taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüleri.

4.4.4. Bilgisayarlı Mikro-Tomografi Analizi (Mikro-CT)

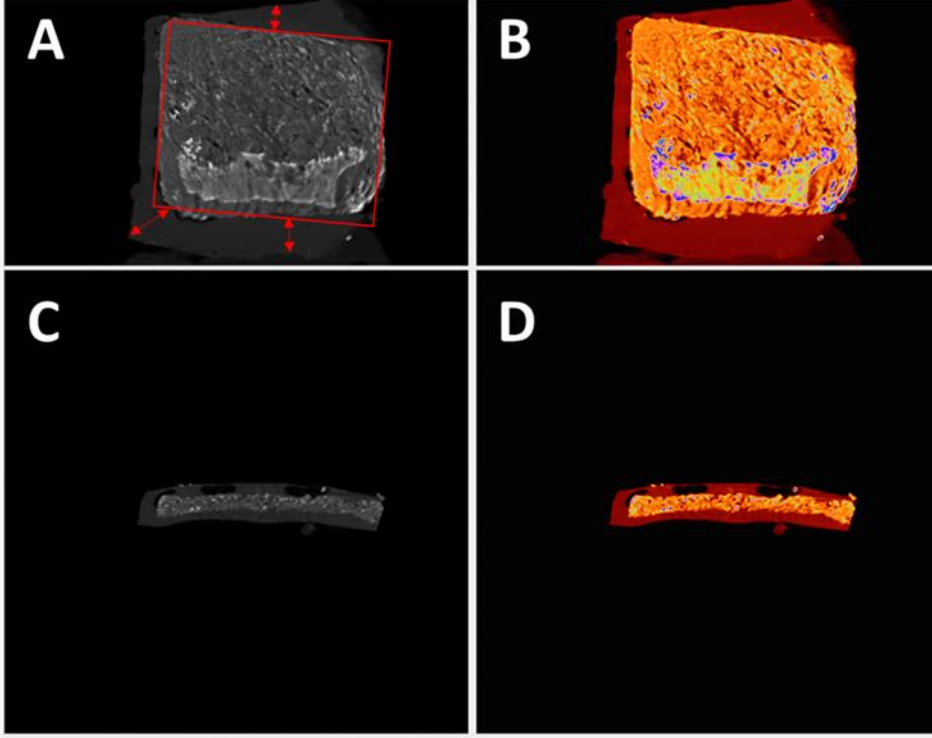
Tez çalışması kapsamında elde edilen S-Kompozit ve SK-Kompozit kardiyak yamaların polimer içerisindeki homojenitesi (karbon nanotüp dağılımları), polimer kompozitinin ekstraselüler matris içerisindeki dağılımı ve gözeneklilik gibi özellikleri bilgisayarlı mikro tomografi (Mikro-CT) cihazı ile incelenmiştir. S-Kompozit ve SK-Kompozit kardiyak yamalarının 2 Boyutlu kesit görüntüleri sırasıyla Şekil 4.48 ve Şekil 4.49’da verilmiştir. Deselülerize greftler içerisindeki ve polimer içerisindeki KNT dağılımının ayırt edilebilmesi amacıyla örnekler üzerindeki PGS-KNT kaplaması alınmamıştır.

Buna göre ilk olarak S-Kompozit kardiyak yamanın yüzey kesitinde (Şekil 4.48A) PGS-KNT yapısı kırmızı oklar ile gösterilmiştir. Bu bölgelerde elde edilen görüntülerde herhangi bir radyopak alana rastlanmamıştır. Bu durum karbon nanotüp geometrilerinin PGS içerisinde homojen dağıldığını göstermektedir. Benzer durum SK-Kompozit

kardiyak yama yüzey ve kenarlarında da gözlenmiştir (Şekil 4.49A’da kırmızı oklar ile gösterilmiştir.) Elde edilen S- Kompozit ve SK-Kompozit yapıların ise 2 boyutlu mikro yüzey kesit görüntüleri ise (Şekil 4.48A, 4.49A) kırmızı dikdörtgen çizgisel yapısıyla gösterilmektedir. Karbon nanotüp geometrilerinin PGS polimeri ile deselülerize matriksler içerisinde homojen bir şekilde dağıldığı görülmektedir. Yamalar içerisindeki beyaz (opak) kısımlar ekstraselüler matriksin bazı bölgelerde yoğun olarak görüldüğü kısımlardır. Bu durum özellikle deselülerizasyon sonrasında matriksin en az hasar gördüğü süperkritik yöntemle elde edilen kompozit yamalarda daha da belirgindir. Buna rağmen PGS polimeri içerisindeki karbon nanotüp dağılımının SK-Kompozit kardiyak yamaları içerisinde de homojen bir şekilde dağılabildiği gösterilmiştir.



Şekil 4.48. S-Kompozit kardiyak yama grubuna ait 2 boyutlu (2B) kesit görüntüsü (A) Yüzey kesiti, (B) Renklendirilmiş-yüzey kesiti, (C) Enine kesiti, (D) Renklendirilmiş enine kesiti.



Şekil 4.49. SK-Kompozit kardiyak yama grubuna ait 2 boyutlu (2B) kesit görüntüsü. (A) Yüzeykesiti, (B) Renklendirilmiş-yüzey kesiti, (C) Enine kesiti, (D) Renklendirilmiş enine kesiti.

Karbon nanotüp dağılımına ek olarak kompozit yapıların hacim ve gözeneklilik özellikleri de ayrıca incelenmiştir. S-Kompozit kardiyak yamalarının görüntüleri üzerinde özel yazılım ile yapılan ayrıntılı analiz sonucu total hacim $132,6 \text{ mm}^3$, kompozit yapının hacmi $9,2 \text{ mm}^3$ olarak belirlenmiştir. Buna göre radyopak olan madde hacmi yani ekstraselüler matriks hacmi total obje hacminin %7,2'sini oluşturmaktadır. Bu hacim içerisinde PGS-KNT kaplamasının da dahil olduğu not edilmelidir. Benzer şekilde SK-Kompozit kardiyak yamaları için yapılan analiz sonucunda ise total hacim $126,4 \text{ mm}^3$, kompozit yapının hacmi $37,1 \text{ mm}^3$ olarak belirlenmiştir. Bu kompozit yama grubunda ise radyopak olan madde hacmi yani ekstraselüler matriks hacmi total obje hacminin %29,4'ünü oluşturmuştur. Buna göre S-Kompozit ve SK-Kompozit kardiyak yamalar içerisindeki ESM hacimleri arasındaki bu önemli farklılık kompozitlerin üretim prosesindeki deselülerizasyon yönteminin farklılığından ileri gelmektedir. Uygulanan deselülerizasyon yönteminin farklılığına bağlı olarak ESM'deki hacimsel farklılıklar ESM'deki total ağırlık kayıpları ile örtüşmektedir (Şekil 4.24).

Son olarak bu analiz ile elde edilen gözeneklilik sonuçlarında S-Kompozit kardiyak yapının total porozitesi %99,6 iken SK-Kompozit yapıya ait deselülerize matriksin total porozitesi ise %84,4 olarak bulunmuştur. ESM'lerin PGS-KNT polimeri ile katkılanmasının ardından hazırlanan kompozit yapıların total porozite yüzdeleri S-Kompozit kardiyak yama için %3,26'ya, SK-Kompozit için %58,7'ye düşmüştür. S-Kompozit içerisindeki aselüler yapının %96 oranında, SK-Kompozit içerisindeki aselüler yapının ise %25,6 oranında PGS-KNT polimeri ile dolgulandığı sonucuna ulaşılmıştır. SK-Kompozit yapının düşük oranda dolgulanması yine deselülerizasyon prosesine bağlı olarak gerek ekstraselüler matriksin yoğunluğu gerekse süperkritik yönteminde aselüler yapının esnekliğini kaybedip daha rijit bir yapıya dönüşmesine bağlıdır. Bu durum süperkritik CO₂ prosesi sonrası elde edilen yamaların mekanik analizleri ile desteklenmiştir (Tablo 4.1).

4.4.5. Mekanik Çekme Analizi

Elde edilen kompozit kardiyak yamaların gerçekleştirilen karakterizasyonları kapsamında son aşamada S-Kompozit ve SK-Kompozit kardiyak yama gruplarının mekanik özellikleri incelenmiştir. Buna göre, analiz sırasında elde edilen görüntüler Şekil 4.50'de ve çekme dayanımı (kPa), çekme uzaması (%) ve elastisite modüllerini (kPa) gösteren çizelge ise kıyaslamalı olarak Tablo 4.5'te verilmiştir.



Şekil 4.50. (A) S-Kompozit, (B) SK-Kompozit gruplarının çekme testi esnasında elde edilen temsili görüntüleri.

Tablo 4.5. S-Kompozit ve SK-Kompozit gruplarının S-Hibrit ve SK-Hibrit gruplarıyla kıyaslamalı mukavemet değerlerini (kPa), uzama davranışlarını (%) ve elastisite modüllerini (kPa) gösteren tablo (n=4).

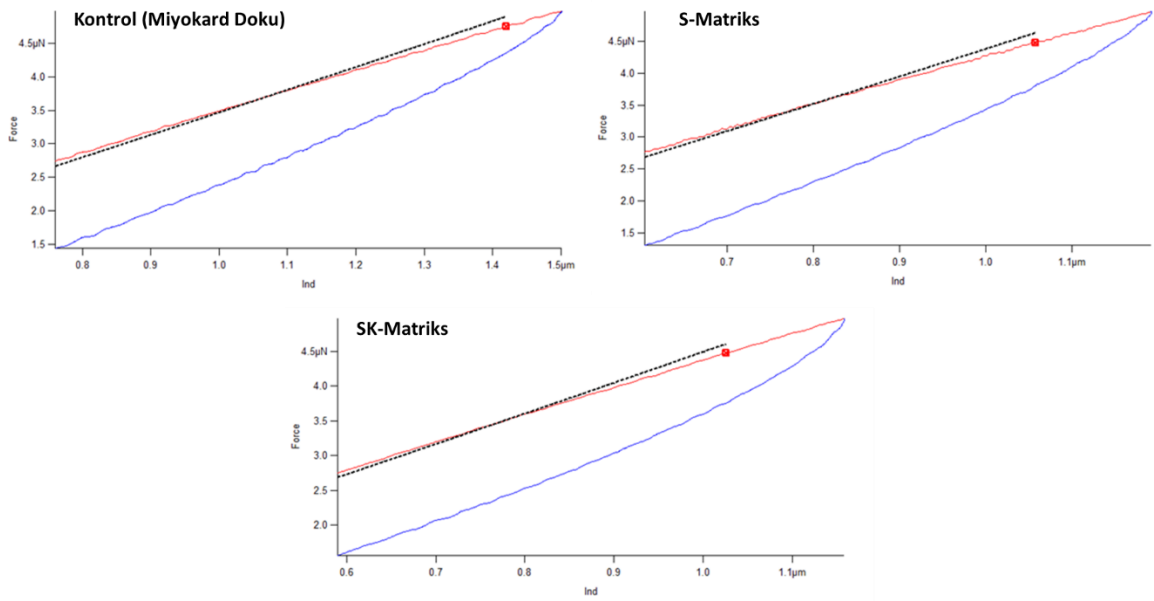
	Çekme Dayanımı (kPa)	Çekme Uzaması (%)	Elastisite Modülü (kPa)
S-Hibrit	350 ± 54,1	145,7 ± 13,9	340,5 ± 17,8
S-Kompozit	382,6 ± 49,8 (p*)	123,2 ± 13,7 (p*)	474 ± 75,8 (p*)
SK-Hibrit	221,3 ± 18,6	65 ± 8,5	359,9 ± 19,2
SK-Kompozit	283,7 ± 23,7 (p*)	36,6 ± 10,7 (p**)	600,3 ± 77,6 (p***)

Elde edilen sonuçlara göre (Tablo 4.5) kimyasal olarak deselülerize yamalarla elde edilen hibrit (S-Hibrit) ve kompozit (S-Kompozit) yamalar kıyaslandığında kompozit yamanın (S-Kompozit) elastisite modülünde artış gözlenmiştir ($474 \pm 75,8$ kPa) (p*). Buna paralel olarak mukavemet değeri artmış (p*) ve çekme uzaması ise yaklaşık %20 kadar azalmıştır (p**). Benzer şekilde süperkritik deselüerizasyonu ile elde edilen hibrit (SK-Hibrit) ve kompozit yamalar kıyaslandığında ise kompozit yamanın (SK-Kompozit) elastisite modülünde artış gözlenmiştir ($600 \pm 77,6$ kPa) (p***). Yine benzer olarak yamanın çekme mukavemet değeri artmış (p*) ve çekme uzaması ise %50 oranında azalmıştır (p**). Kompozit grupların kıyaslamalarında ise SK-Kompozit grubunun S-Kompozit gruba göre çekme mukavemet değeri azalmış (p*); elastisite modülü artmış (p*) ve % uzama değeri ise yaklaşık 3 kat azalmıştır (p**). Bu çalışmanın sonunda %1 KNT ile katkılanmış kardiyak yamaların hibrit gruplara kıyasla elastisite değerlerinde artış gözlenmiştir. Bu durum yapıya katılan KNT ile ilişkilidir. Elde edilen sonuçlar, artışa rağmen, PGS elastomeri için literatürde verilmiş elastisite modülü değerleri arasındadır (50-1500 kPa) [154].

4.5. Kardiyak Yamaların Nano-Mekanik Davranışları

Elde edilen deselüerize greftlerde uygulanan yöntemlerinin farklılıkları aynı zamanda ESM'nin nano-mekanik davranışı ile ayrıca incelenmiştir. Buna göre kontrol grubu (işlem görmemiş miyokard doku), SDS uygulaması ile elde edilmiş deselüerize greftler (S-Matriks) ve skCO₂ uygulamasıyla elde edilmiş deselüerize greftlerin (SK-Matriks) nano indentasyon ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen indentasyon-kuvvet eğrileri

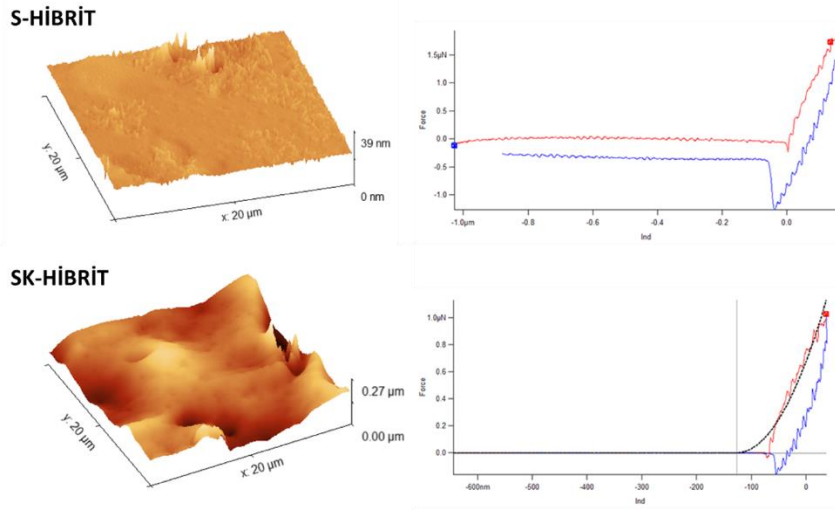
Şekil 4.51’de verilmiştir. Bu eğriler aracılığıyla elastisite modülleri hesaplanmıştır. Kontrol grubu 1,5 μm indentasyon derinliğinde 4,5 μN kuvvet eğrisi oluşturmuş, deselülerize grupların eş kuvvete ulaşması için indentasyon derinliği daha yüzeyle belirlenmiştir. Doğal miyokard dokusu için tek bir ESM fiberinin elastisite modülü 1,90 kPa, S-Matriks ESM fiberinin elastisite modülü 2,39 kPa iken SK-Matriks ESM fiberinin elastisite modülü 2,11 kPa’dır. SDS uygulaması ile yapılan deselülerizasyon prosesi ESM fiberleri üzerinde yıkıcı bir etki gösterirken, skCO₂ yöntemiyle deselülerize edilen ESM fiberlerinin elastisite modülü kontrol grubuna yakın bir değer göstermiştir. Bu durum skCO₂ yönteminin ESM üzerinde daha az yıkıcı bir etki göstermesiyle açıklanır. Bu çalışmada elde edilen elastisite modülleri arasındaki ilişki makro-mekanik analizleri sonuçları ile uyumlu bir ilişki göstermiştir.



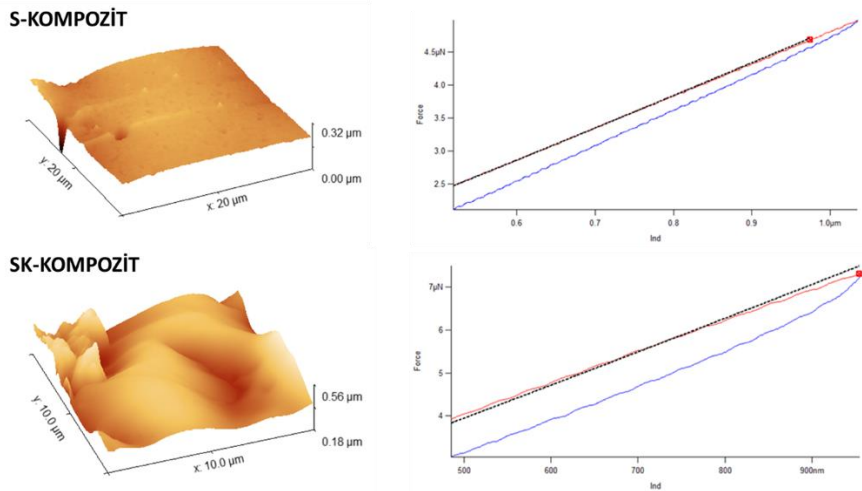
Şekil 4.51. Doğal miyokard dokusu, S-Matriks ve SK-Matriks grupları üzerinde alınmış indentasyon eğrileri.

İkinci aşamada katkılanan PGS elastomerinin ESM fiberi üzerindeki etkisinin incelenmesi amacıyla elde edilen hibrit kardiyak yamaların AKM yüzey görüntüleri ve indentasyon eğrileri incelenmiştir. S-Hibrit ve SK-Hibrit kardiyak yama gruplarına ait yüzey görüntüsü ve indentasyon eğrisi Şekil 4.52’de gösterilmiştir. Buna göre daha yüksek değerlerde bir kuvvete ulaşabilmek için ESM fiberinin daha yüzeysel bir indentasyon yaptığı görülmektedir. PGS elastomerine ek olarak KNT katkısının ESM

fibri üzerindeki etkisinin incelenmesi amacıyla ise elde edilen kompozit kardiyak yamaların AKM yüzey görüntüleri ve indentasyon eğrileri incelenmiştir. S S-Kompozit ve SK-Kompozit kardiyak yama gruplarına ait yüzey görüntüsü ve indentasyon eğrisi ise Şekil 4.53'te gösterilmiştir. Buna göre, kompozit gruplarının indentasyon eğrilerinde benzer indentasyon derinliğine ulaşabilmek için SK-Kompozit kardiyak yama grubunun tepki verdiği kuvvet daha yüksektir.

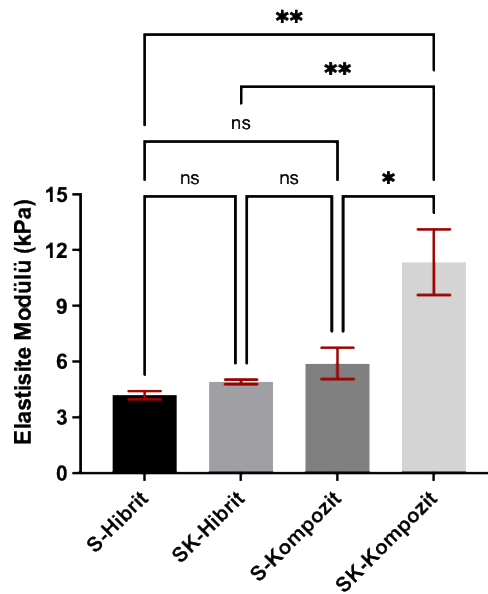


Şekil 4.52. S-Hibrit ve SK-Hibrit gruplarının atomik kuvvet mikroskobu yüzey görüntüleri ve indentasyon eğrileri.



Şekil 4.53. S-Kompozit ve SK-Kompozit gruplarının atomik kuvvet mikroskobu yüzey görüntüleri ve indentasyon eğrileri.

Tüm bu sonuçların değerlendirilmesinde, kuvvet ve indentasyon arasındaki ilişki Hertz Modelinden yararlanılarak ortaya konulmuştur. Bu modele göre elastisite değerleri hesaplanmış ve sonuçlar kPa cinsinden Şekil 4.54'te histogram grafiği ile verilmiştir. Bu grafiğe göre elastisite modülü değerleri S-Hibrit kardiyak yama grubu için 4.18 ± 0.16 kPa, SK-Hibrit kardiyak yama grubu için $4,91 \pm 0,09$ kPa, S-Kompozit kardiyak yama grubu için $5,9 \pm 0,6$ kPa ve SK-Kompozit kardiyak yama grubu için ise $11,35 \pm 1,25$ kPa olarak hesaplanmıştır. S-Hibrit ve S-Kompozit kardiyak yama grubunun istatistiksel analizinde gruplar arasındaki farklılık anlamlı değildir. Benzer şekilde S-Hibrit ve SK-Hibrit grupları arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur. Ancak, kompozit gruplarda uygulanan deselülerizasyon yönteminin farklılığına bağlı olarak gruplar arasında farklılık gözlenmiştir (S-Kompozit ve SK-Kompozit) (p^*). Bunun dışında, SK-Hibrit ve SK-Kompozit grupları arasındaki istatistiksel fark da anlamlıdır ve kompozit formun elastisite değeri hibrit formun elastisite değerinden yaklaşık 1,4 kat fazladır (p^{**}).

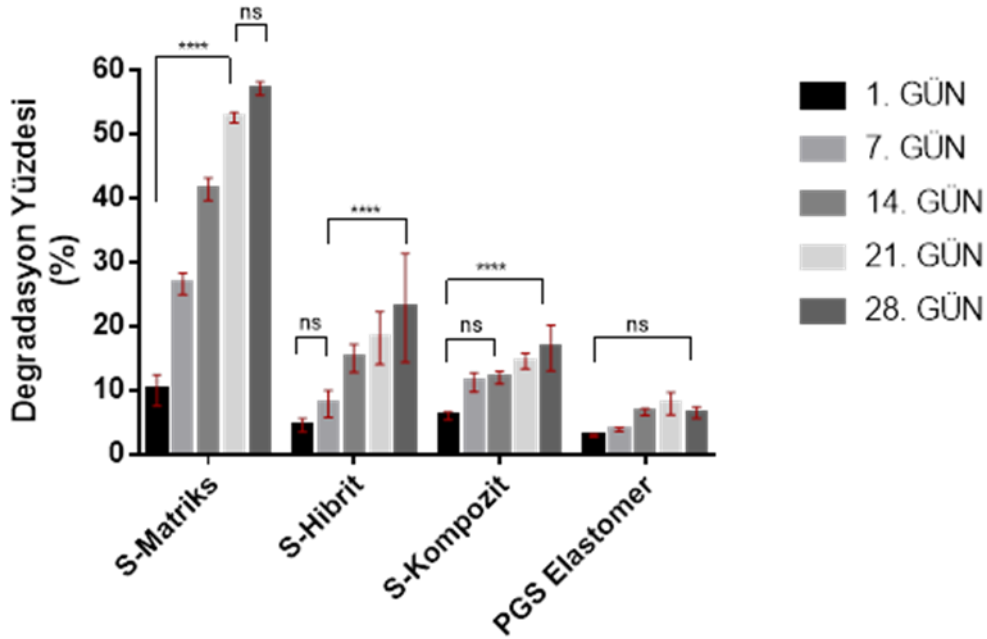


Şekil 4.54. S-Hibrit, SK-Hibrit, S-Kompozit ve SK-Kompozit gruplarının Hertz Modeline göre kPa cinsinden hesaplanmış elastisite modül değerleri.

4.6. Degradasyon Analizi

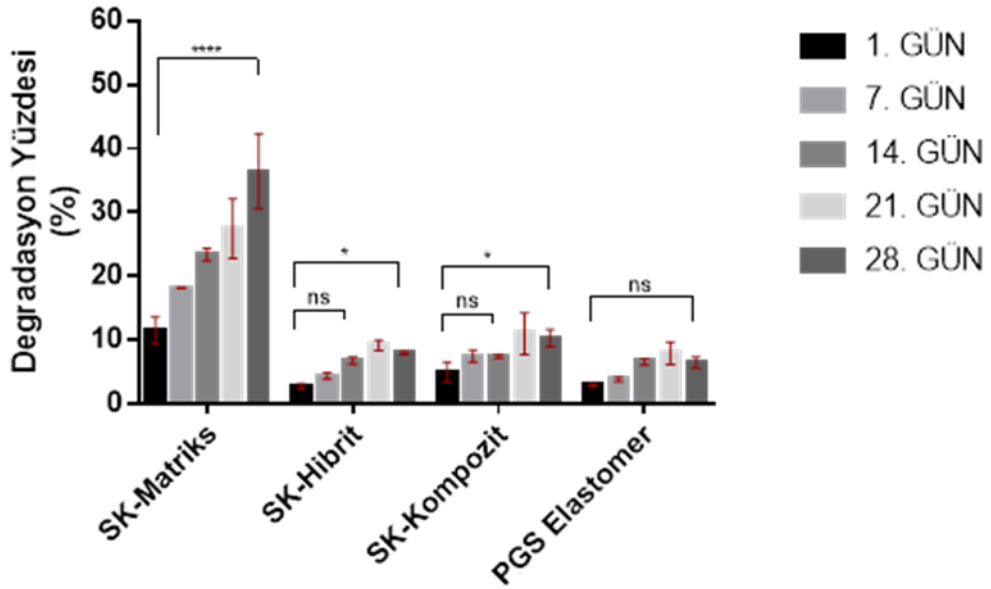
Tez çalışması kapsamında sentezlenen kardiyak yamaların bozunma özellikleri incelenmiştir. İlk olarak S-Matriks, S-Hibrit, S-Kompozit ve PGS elastomerine ait 28 günlük degradasyon yüzdeleri Şekil 4.55'te verilmiştir. Buna göre deselülerize matriksin

(S-Matriks) 1 gün sonundaki degradasyon yüzdesi yaklaşık olarak %10 iken 28 gün sonunda bu değer %57'e yükselmiştir. 1-21 günler arasındaki artış istatistiksel olarak anlamlı iken (p^{****}); 21 ve 28 gün arasında istatistiksel anlamlı bir farklılık görülmemiştir (ns). S-Hibrit grubu 1-7 günler sonunda anlamlı bir farklılık görülmezken, 28 gün sonunda bu oran %22 değerine düşmüştür (p^{****}). S-Kompozit gruplar 28 gün sonunda degradasyon yüzdesi %16 değerine bozunmuştur (p^*). S-Hibrit ve S-Kompozit kardiyak yamalar PGS elastomerine kıyasla degradasyon oranları bir miktar yüksek olarak belirlenmiştir. Elde edilen tüm kardiyak yamaların kıyaslanmasında 1. Günler arasında S-Matriks ve PGS Elastomer haricinde (p^{**}) diğer tüm gruplar arasında istatistiksel anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. 28 gün sonundaki degradasyon yüzdeleri kıyaslandığında ise tüm kardiyak yamalar istatistiksel olarak birbirinden farklıdır (p^{****}). Bu sonuçlar neticesinde, deselülerize yapıların PGS elastomeri katkısıyla degradasyon oranı azalmış, KNT katkısında bu oran daha da azalmıştır. ESM'nin yapısal bütünlüğünün bozulmasıyla artan bozunma oranı, elastomer ve KNT katkısı ile iyileştirilmiştir.



Şekil 4.55. S-Matriks, S-Hibrit, S-Kompozit ve PGS elastomerinin 1., 7., 14., 21. ve 28. günlerde PBS içerisinde degradasyon profilini gösteren histogram grafiği (n=3).

İkinci aşamada SK-Matriks, SK-Hibrit, SK-Kompozit ve PGS elastomerine ait degradasyon davranışı ise Şekil 4.56'da karşılaştırmalı olarak verilmiştir. SK-Matriksin degradasyon yüzdesi 1. gün sonunda yaklaşık olarak %11 iken, 28 gün sonunda bu oran %36 değerine yükselmiştir (p****). SK-Hibrit kardiyak yama grubu için 14 güne kadar istatistiksel anlamlı olarak bir artış gözlenmemiş, 28 gün sonunda degradasyon yüzdesi yaklaşık %8 değerindedir (p*). SK-Kompozit gruplar 28 gün sonunda %10 değerine bozunmuştur (p*). SK-Hibrit ve SK-Kompozit kardiyak yamalar PGS elastomeri ile kıyaslandığında 28 gün sonunda degradasyon oranlarında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmemiştir. Tüm kardiyak yamaların ele alındığında 1. gün sonunda S-Matriks ve PGS Elastomer haricinde (p**) diğer tüm gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmemiştir. Bu kıyaslama 28 gün sonundaki degradasyon yüzdeleri yapıldığında ise tüm kardiyak yamaların degradasyon yüzdeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır (p****). Sonuç olarak skCO₂ yöntemiyle elde edilen deselülerize greftlerin bozunma davranışı PGS elastomerinin ve KNT katkısıyla iyileştirilmiş ve bu yapının degradasyon davranışı PGS elastomerine benzemiştir.



Şekil 4.56. SK-Matriks, SK-Hibrit, SK-Kompozit ve PGS elastomerinin 1., 7., 14., 21. ve 28. günlerde PBS içerisinde degradasyon profilini gösteren histogram grafiği (n=3).

Son olarak Şekil 4.55 ve Şekil 4.56 kıyaslandığında, SDS uygulaması ile elde edilen deselülerize greftlerin bozunma hızının skCO₂ uygulaması ile elde edilen deselülerize greftlerin bozunma hızından daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Uygulanan skCO₂ akışkan yöntemi ile elde edilen matriksler daha rijit yapıdadır. Bu durum aynı zamanda greflerin mekanik özelliklerinin kıyaslaması ile doğrulanmaktadır.

4.7. Hibrit ve Kompozit Kardiyak Yamaların Değerlendirmesi

Bu aşamanın sonunda tez çalışmasında hedeflenmiş hibrit ve kompozit kardiyak yamalar başarılı ile sentezlenmiş ve karakterizasyonları tamamlanmıştır. Özet olarak, hibrit kardiyak yamaların sentezi öncesinde PGS elastomerinin sentezi tamamlanmış ve bununla ilgili kimyasal yapı analizi gerçekleştirilmiştir. Kimyasal yapı literatür ile kıyaslanarak polimer yapısı doğrulanmıştır [154]. Elde edilen elastomerin çapraz bağlanma süresi hedeflenen kardiyak yamalar için uygun bir elastikiyet göstermesi amacıyla mekanik değerlendirme ile çapraz bağ yoğunlukları incelenmiştir. Malzemenin fiziksel yapısında, 8 saat süreyle çapraz bağlanmış elastomer yapışkan bir formda elde edilmiştir. Elastomerin 12 saat çapraz bağlanması malzemede kopmalara neden olmuş bu durum çapraz bağ yoğunluğuna bağlı olarak yapının kırılma formuna dönüşmesi ile ilişkilendirilmiştir. Buna göre ideal çapraz bağlanma süresi 10 saat olarak belirlenmiş ve bu sonuçlar hibrit kardiyak yamaların mekanik sonuçları ile kıyaslanmıştır. Literatürde bu tip kardiyak yamalara eş olarak sentezlenen malzemelerin mekanik özellikleri polimerin tipine, kimyasal yapısına ve kalınlığına göre çeşitlilik göstermektedir. Burada esas alınan konu, elde edilen kardiyak yamanın tipik bir kalp kasının mekanik özellikleri ile benzerlik göstermesi gerektiğidir. İnsan kalbinin miyokard kas dokusu kalbin sistol durumunda veya diyastol durumunda olup olmadığına göre 20 kPa ila 500 kPa arasında değişiklik göstermektedir [162]. Bu çalışmada kontrol miyokard dokusunun elastisite değeri 80 kPa civarında elde edilmiştir. Tez çalışması kapsamında sentezlenmiş tüm kardiyak yamaların mekanik özellikleri doğal doku ve deselülerize dokulara kıyasla iyileştirildiği görülmektedir. Süperkritik CO₂ uygulaması bir deselülerizasyon yöntemi olarak SDS tabanlı deselülerizasyon yöntemine göre daha başarılı sonuçlar göstermiş olsa da bu yöntemle elde edilmiş kardiyak yamaların esneme kabiliyetlerinde azalma gözlenmiştir. Bu durum deselülerizasyon uygulaması sırasında ortamda bulunan etanolün dokudaki suyu uzaklaştırarak dokuyu sertleştirilmesi ile açıklanır. Önemli bir nokta ise, malzemedeki bu sertliği PGS ilavesi kısmen azaltmış ancak KNT katkısı ile bu sertlik

hedeflenen mekanik özelliklerinin dışında kalmıştır. Kısacası malzeme esneme kabiliyetini büyük ölçüde yitirmiştir. Bu durum özellikle dinamik kültür sonuçlarını büyük ölçüde etkilemiş, dinamik kültür koşullarında uygulanan gerek %5 gerek %10 mekanik stimülasyonda dokuda kısa sürede kopmalara neden olmuştur.

Makro mekanik analizlere ek olarak uygulanan deselüerizasyon yönteminin ESM üzerindeki farklılıklarını belirlemek amacıyla nano-indentasyon çalışmaları gerçekleştirilmiş ve elde edilen sonuçlar makro-mekanik sonuçlarla beraber değerlendirilmiştir. Benzer şekilde elastomerik yapının ve KNT katkılı elastomerik yapının ESM fiberi üzerindeki mekanik değişimleri incelenmiştir. Elde edilen elastisite modülü değerlerinin makro mekanik test sonuçları ile uyum içerisinde olduğu görülmüştür. KNT'lerin PGS elastomeri içerisinde yapıya dahil edilmesi, doğal dokunun mekanik sertliğini iyileştirmiş ancak gerek polimer gerekse KNT ilavesi kalbin kasılma döngüsü sırasında doğal insan miyokardın sertliğini kısmen taklit edebilmiştir [163]. Hertzain modeli kullanılarak kuvvet girintisi verilerinden elde edilen Young modülüs değerleri literatürde elde edilmiş birçok kardiyak yamaya kıyasla daha yüksek değerde elde edilmiştir [129, 164]. Ayrıca, literatür çalışmalarında miyokard doku yaması olarak sentezlenmiş iletken malzemelerin elastisite değerleri polimerin tipine veya iletken katkının tipine göre değişiklik göstermektedir. Örneğin altın yüklü doku iskelelerin elastisite değerleri 1,3 kPa ile 600 kPa arasında değişkenlik gösterirken; karbon yüklenmiş kompozit malzemelerin elastisite değerleri 20 kPa ile 370 kPa arasında değişkenlik göstermektedir [127].

Sentezlenen hibrit ve kompozit formdaki kardiyak yamaların sentez sürecinin başarısı gerek kimyasal ve termal analizler ile gerekse mikroskop görüntüleri ile gösterilmiştir. Elde edilen mikroskop görüntüleri her iki farklı kardiyak yama grubu için polimer yapının ve KNT katkılı polimer yapının deselüerize matriks içerisinde başarılı bir şekilde çapraz bağlanabildiğini göstermiştir. Kimyasal analizler ile deselüerize matrikslerin FTIR spektrumlarında ESM'e ait komponentlerin literatürle uyumlu absorban pikleri belirlenmişken, hibritleşme ve kompozitleşme süreci sonrasında deselüerize doku içerisinde PGS elastomerinin absorban pikleri tayin edilmiştir. Termal karakterizasyon deselüerize matriks içerisindeki kolajenin denatürasyon sıcaklığı ile genel bir bilgi

verirken; hibritleşme sonrasında deselülerize matriksin hibrit yapı içerisinde bir bütün olarak davranış sergilediği gözlenmiştir. Bu durum PGS elastomerinin ve hibrit dokunun benzer termal davranış sergilemesiyle açıklanmaktadır.

Elde edilen kompozit kardiyak yamaların detaylı analizleri (i) polimer-KNT oranının elde edilen kardiyak yamanın kalınlığı üzerindeki etkisini değerlendirmek, (ii) KNT/KNF oranının malzeme iletkenliği üzerindeki etkisini araştırmak, (iii) polimer içerisindeki KNT oranının malzeme toksisitesi üzerindeki etkisini araştırmak amacıyla gerçekleştirilmiştir. KNT'ler mekanik olarak destek ve elektriksel iletkenlik sağlayan [165], kardiyak yapıların onarımında olumlu etkileri bulunan, yüksek iletkenliğe ve spesifik yüzey alanına sahip tek boyutlu için boş yapılardır [166]. Ayrıca, süper hizalanmış KNT'ler, yönlendirilmiş hücresel büyümede bir destek görevi görerek, aynı anda yapay kalp dokuları için elektrofizyolojik homojenliği teşvik eder [167]. Bu çalışmada ilk olarak polimer-KNT oranının kompozit kalınlığına etkisinde 3,5 g'dan daha az miktardaki prepolimer hedeflenmiş polimer kalınlığı için yetersiz kalmıştır. 4,5 g-5,0 g prepolimerden daha fazla miktardaki çözeltilerde ise temel sorun polimer yüzeyindeki heterojen yüzey ve pürüzlülüktür. Artan prepolimer oranına karşılık petri içerisindeki artan THF miktarı çapraz bağlanma öncesinde THF'in yeteri kadar uçmamasına bağlı olarak yüzeyde deformasyonlara sebep olmuştur. Bu durum elde edilen kardiyak yamanın kalınlık stabilizasyonunda tutarsızlıklara sebep olmuştur. İkinci aşamada artan yüzdelerdeki KNT ve KNF oranının malzeme iletkenliğine etkisi araştırılmıştır. Literatür ile kıyaslandığında kardiyak doku mühendisliğinde kullanılan iletken malzemeler için ideal bir iletkenlik değeri henüz tanımlanmamıştır [162]. Yapılan çalışmalarda karbon ilavesi ile elde edilen kompozitlerin iletkenlik değerleri 1.9×10^{-8} ile 0.25 S/m aralığında değişkenlik göstermektedir [127]. Bu çalışma sonucunda elde edilen iletkenlik değerleri karbon nanotüp katkısının karbon nanofiber katkısına kıyasla malzeme iletkenliğini arttırdığını göstermiştir. Bununla beraber kompozit yapıdaki yüksek karbon içeriği kompozitin iletkenliğini arttırdığını göstermiş ve bu sonuç literatür ile uyumludur [161]. Yapılan çalışma sonucunda karbon nanotüp geometrisi katkısının fiber geometrisi katkısına kıyasla kompozit yapıda iletkenliği iyileştirdiği belirlenmiştir. Son olarak polimer içerisindeki KNT oranının hücre sitotoksitesisi üzerindeki etkisi araştırılmış ve buna göre %2 (a/a) ve üzerindeki KNT miktarının hücreler üzerinde toksik etki gösterdiği

belirlenmiştir. Tüm bu değerlendirmeler neticesinde, kompozit yapıların sentezinde kullanılacak olan KNT katkısı %1 olarak belirlenmiştir.

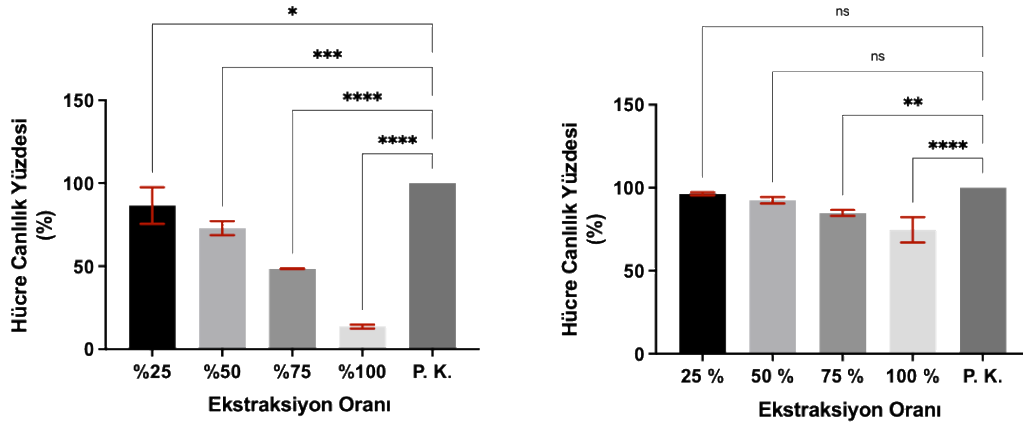
4.8. Hücre Kültürü Çalışmaları

Tez çalışması kapsamında sentezlenmiş tüm kardiyak yamaların statik ve dinamik koşullar altında kültür çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla elde edilen kardiyak yamalar insan kardiyomyosit hücreleri ile tekrardan hücrelendirilmiş (reselüterize edilmiş) ve statik ve dinamik koşullar altında incelenerek sitotoksik özellikleri, hücre metabolik aktiviteleri, canlı/ölü hücre özellikleri, elektron mikroskopu görüntülemeleri, glikozaminoglikan seviyeleri, iletkenlik analizleri, mekanik davranışları ve RT-PCR yöntemi ile gen ifadeleri araştırılmıştır.

4.8.1. Statik Hücre Kültürü Çalışmaları

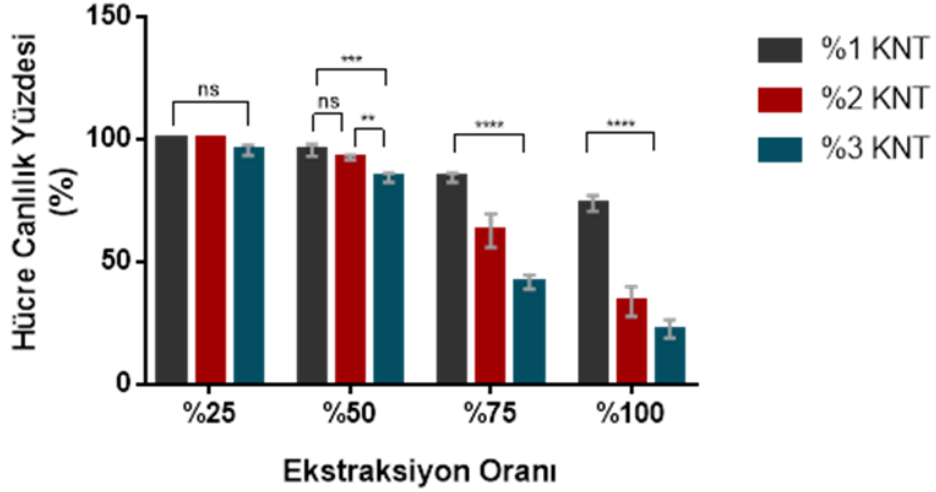
4.8.1.1. Sitotoksisite Analizi

Çalışma kapsamında elde edilen kardiyak yamaların sitotoksik etkileri ISO-10993 standartlarına uygun olarak MTT elüsyon analizi ile gerçekleştirilmiştir. Yapılan çalışmanın ilk aşamasında elde edilen kardiyak yamaların yıkama ve sterilizasyon koşullarının etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla temsili olarak seçili S-Hibrit grupları polimerizasyon aşaması sonrasında çapraz bağlanmamış monomerlerin uzaklaştırılması amacıyla 24 saat etanol (%100) ve 12 saat PBS ile yıkanmıştır. Buna göre sonuçlar yıkama öncesi ve yıkama sonrası olmak üzere değerlendirilmiştir ve Şekil 4.57'de sırasıyla verilmiştir. Buna göre yıkama öncesi (A) ve yıkama sonrası (B) hücre canlılık sonuçlarında, %100 ekstraksiyon ile etkileştirilen grupları ile kontrol grupları kıyaslandığında yıkama öncesinde %13,6 yıkama sonrasında %74,7 oranında canlılık görülmektedir (p****). Buna göre kardiyak yamalara çapraz bağlanmamış monomerlerin uzaklaştırılması için 24 saat süren etanol yıkaması uygulamasına karar verilmiştir. Aynı zamanda uygulanmış sterilizasyon yöntemi, hücre canlılık sonuçlarında olumsuz bir yanıt vermemiştir.



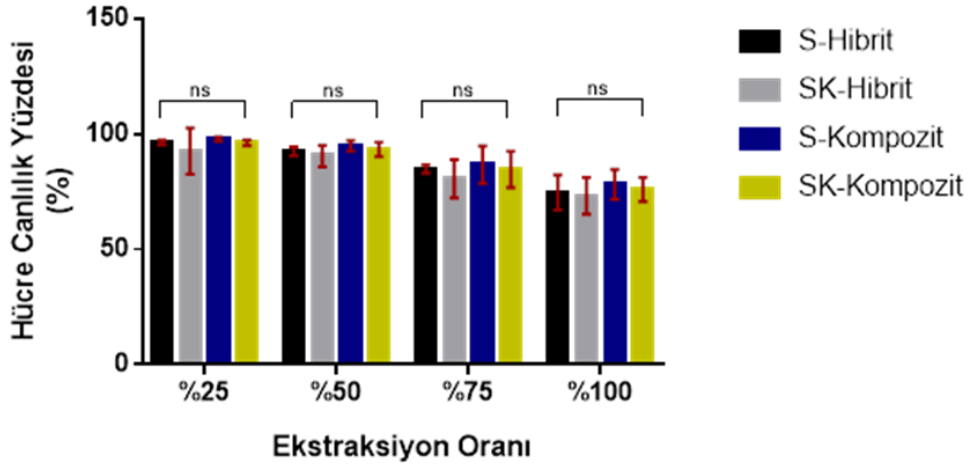
Şekil 4.57. S-Hibrit kardiyak yamalarının (A) alkol yıkaması öncesi (B) alkol yıkaması sonrası sitotoksosite analizleri.

Elde edilen kompozit kardiyak yamalarda KNT katkısının hücre üzerindeki sitotoksik etkisini araştırmak amacıyla, sırasıyla, %1, %2 ve %3 oranında KNT katkılı kompozit yamaların MTT elüsyon analizleri gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar Şekil 4.58'de % canlılık şeklinde ifade edilmiştir. Buna göre %25 ekstraksiyon ile muamele sonrasında hücre canlılık yüzdeleri %100 oranlarına yakın iken ve gruplar arasında istatistiksel anlamlı farklılık görülmemiştir. Ekstraksiyonun etkileşim yüzdesi arttıkça %2 ve %3 KNT katkılı kompozitlerin hücre canlılığı üzerindeki etkisinde bir azalma görülmüştür. Buna göre %100 ekstraksiyon etkileşimi için %2 KNT katkısında %33,7 hücre canlılığı, %3 KNT katkısında %22,5 hücre canlılığı tespit edilmiştir (p****). %1 KNT katkısının hücre canlılığı üzerindeki etkisi ise %73,4 olarak belirlenmiştir (p****). Kompozit kardiyak yamaların gerek iletkenlik özellikleri gerekse sitotoksik etkileri göz önünde bulundurularak %1 KNT katkısı bu kompozit yapılar için uygun bulunmuştur.



Şekil 4.58. %1, %2 ve %3 karbon nanotüp katkılı kompozitlerin (PGS-KNT) sitotoksosite analizleri. (Pozitif Kontrol, %100 canlılık olarak belirlenmiştir.)

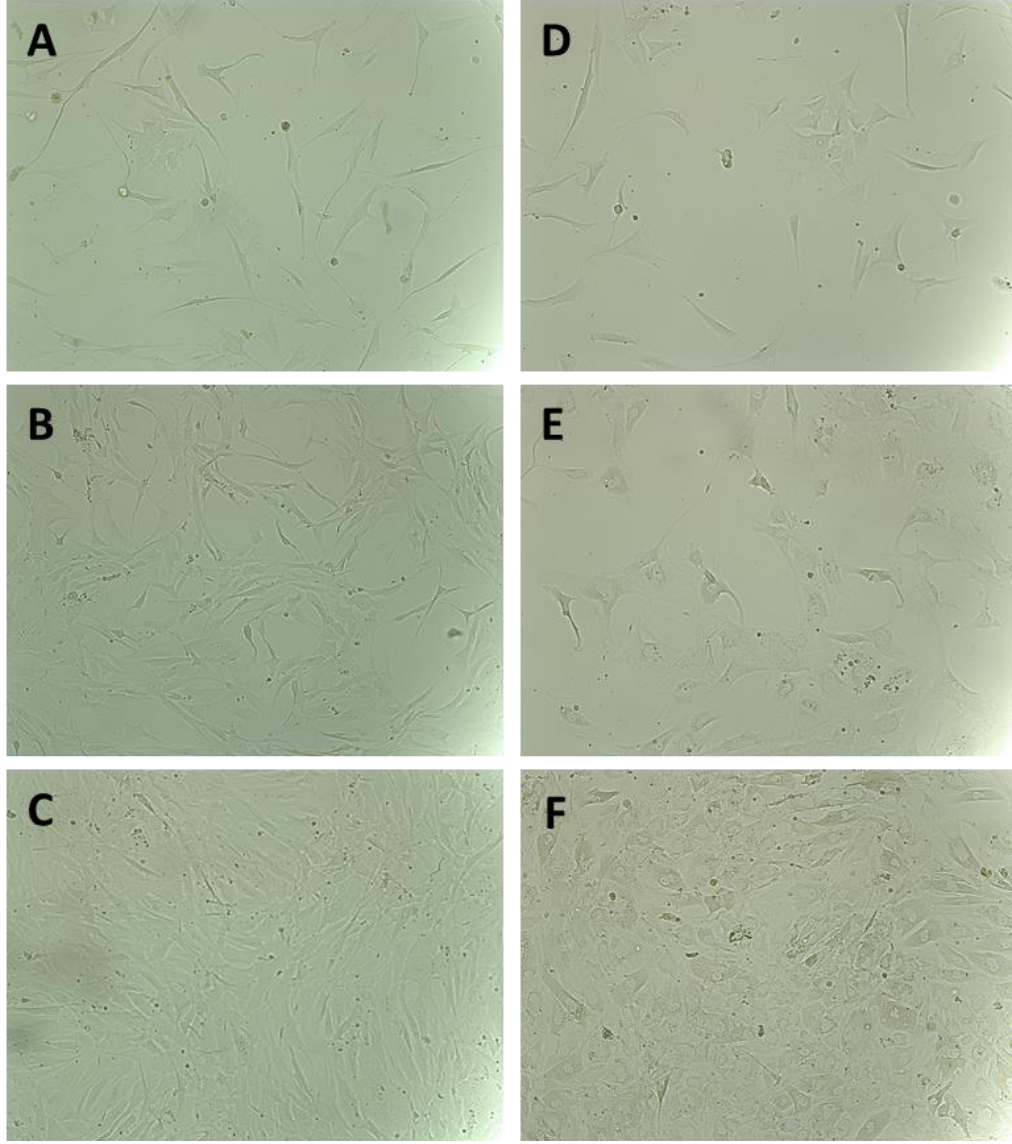
Buna göre tez çalışmasında ele alınan tüm kardiyak yamaların karşılaştırmalı MTT elüsyon analizleri gerçekleştirilmiş ve sonuçlar Şekil 4.59’da verilmiştir. Tüm kardiyak yamalar %25 ekstraksiyon etkileşiminde %100’e yakın değerlerde hücre canlılığı göstermiştir. %100 ekstraksiyon etkileşimleri sonucunda ise hücre canlılıkları S-Hibrit, SK-Hibrit, S-Kompozit ve SK-Kompozit grupları için sırasıyla, %74,7, %73,2, %78,1 ve %75,9 olarak belirlenmiştir. Aynı zamanda tüm kardiyak grupları arasında istatistiksel olarak da anlamlı bir farklılık görülmemiştir. Buna göre elde edilen kardiyak yamaların hücre canlılığı üzerinde sitotoksik bir etkisi bulunmadığı gösterilmiştir.



Şekil 4.59. S-Hibrit, SK-Hibrit, S-Kompozit ve SK-Kompozit kardiyak yama gruplarının sitotoksosite analizleri (ISO 10993). (Pozitif Kontrol %100 canlılık olarak belirlenmiştir.)

4.8.1.2. İnsan Kardiyomiyosit Hücrelerinin Karakterizasyonu

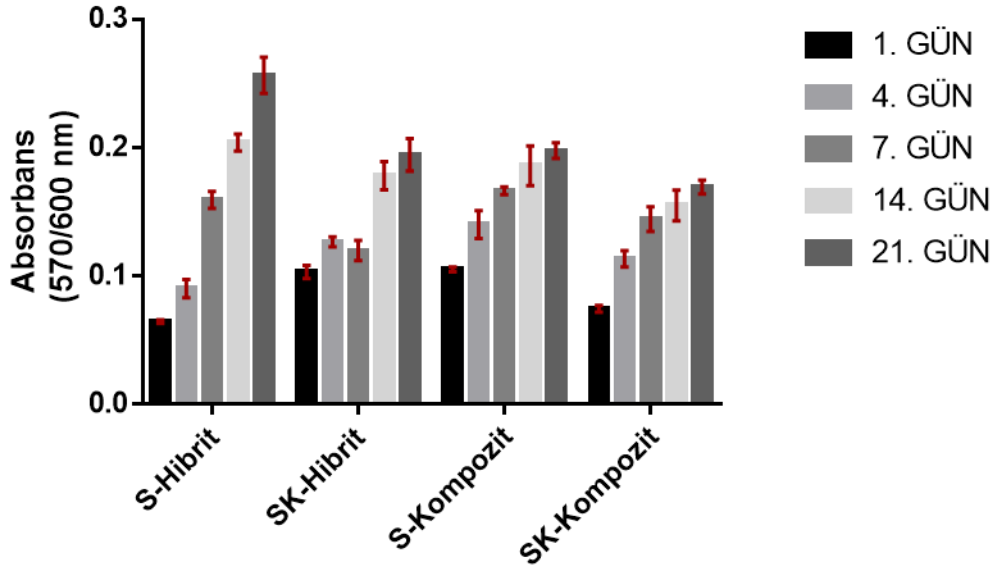
Kültürü gerçekleştirilen insan kardiyomiyosit hücrelerinin kardiyomiyosit besi ortamı ve düşük glikozlu besi ortamı içerisindeki hücre davranışları 7 gün boyunca izlenmiş ve morfolojik olarak değerlendirilmiştir. Buna göre, proliferasyonun mikroskop görüntüleri Şekil 4.60'ta verilmiştir. Hücreler tedarikçi firma tarafından temin edilen besi ortamı içerisinde iğsi ve dallı morfolojik yapılarını korumuş, düşük glikozlu DMEM içerisinde şişerek asıl morfolojilerini kaybetmiştir. Bu çalışma gerek reselülerizasyon sonrasında hücrelerin morfolojik yapılarının korunup korunmadığını belirlemek (hücre kalitesini araştırmak) gerekse besi ortamlarının hücre üzerindeki etkisini araştırmak için gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.60. İnsan kardiyomiyosit hücrelerinin (A-C) kardiyomiyosit besi ortamında, (D-F) düşük glikozlu besi ortamında mikroskop altındaki morfolojik görüntüleri. (A,D) 1. Gün, (B,E) 4. Gün, (C,F) 7. Gün kültürleri.

4.8.1.3. Hücre Metabolik Aktivitesinin Değerlendirilmesi

Alamar Mavisi uygulaması metabolik hücre aktivitesinin değerlendirilmesi amacıyla uygulanmaktadır ve temeli resazurin adlı bileşiğin, canlı hücreler tarafından resorufin bileşiğine dönüştürülmesine dayanmaktadır. Alamar mavisi boyamasıyla insan kardiyomiyosit hücrelerinin elde edilen tüm kardiyak yamalardaki metabolik aktiviteleri değerlendirilmiştir. Buna göre, kültür çalışmasının 1., 4., 7., 14. ve 21. günlerinde metabolik aktiviteleri absorban değerleri baz alınarak (570/600 nm) ifade edilmiş ve sonuçlar Şekil 4.61’de sunulmuştur.



Şekil 4.61. S-Hibrit, SK-Hibrit, S-Kompozit ve SK-Kompozit kardiyak yamalarının 1., 4., 7., 14. ve 21. günlerde hücre metabolik aktivitelerini gösteren grafik.

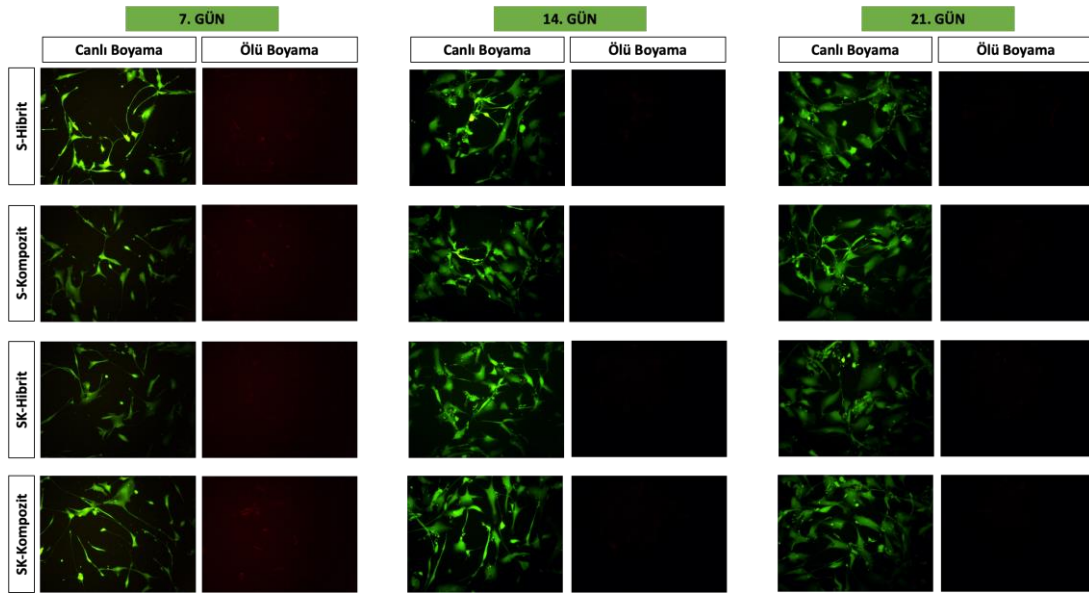
Elde edilen bu sonuca göre S-Hibrit grubu için kültürün 1. gününden itibaren absorbans değerinde önemli bir artış gözlenmiştir ve istatistiksel olarak anlamlı farklılık elde edilmiştir (p^{****}). SK-Hibrit yama grupları için kültür süresince 1. ve 4. günlerde artış gözlenmiştir (p^{**}); 7. Günde önemli bir artış görülmemiştir (p^*). Kültürün 7. gününden itibaren 14. güne kadar metabolik aktivitelerinde artış gözlenmiştir (p^{****}). Son olarak 21 gün sonunda ise istatistiksel olarak anlamlı bir artış görülmemiştir.

S-Kompozit kardiyak yamaları için 1. gün kültüründen itibaren 14.güne kadar hücre metabolik aktivitelerinde bir artış gözlenmiştir (1-4 gün için p^{****} ; 4-7 gün için p^{****} ; 7-14 gün için p^*). Kültürün 21. Gününde ise istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmemiştir. SK-Kompozit kardiyak yama grupları için kültürün 1. gününden 7. gününe kadar hücre metabolik aktivitesinde artış gözlenmiştir (1-4 gün için p^{****} ; 4-7 gün için p^{****}). Ancak kültürün 14.gün sonrasında hücre metabolik aktivitesinde anlamlı bir artış görülmemiştir (ns).

Tüm bu sonuçlara göre 21 günlük statik kültür çalışması sonunda insan kardiyomiyosit hücrelerinin proliferasyonunun elde edilen tüm kardiyak yama gruplarında başarılı şekilde sağlanabildiği gösterilmiştir.

4.8.1.4. Hücre Canlılığının Değerlendirilmesi

Hücre canlılıklarının değerlendirilebilmesi amacıyla reselülerize kardiyak yamalar 7, 14 ve 21 günlük statik kültür sonunda canlı/ölü boyama kiti boyanmıştır. Boyalı doku iskeleleri florasan ataçmanlı mikroskop ile görüntülenmiş ve elde edilen görüntüler Şekil 4.62’de verilmiştir. Bu analiz neticesinde, 7. gün sonunda kardiyomiyosit hücre morfolojilerinin (hücreler yapışmış, çoğalmış ve sitoplazmik köprüleri kurulmuş) iskeleler üzerinde korunmuş oldukları gözlenmiştir. 14. ve 21. günlerde ise hücrelerin çoğalmasına bağlı olarak hücre sayısında artış görülmüş ve verilen günler sonunda kardiyak yamalar üzerinde ölü hücreye rastlanmamıştır.

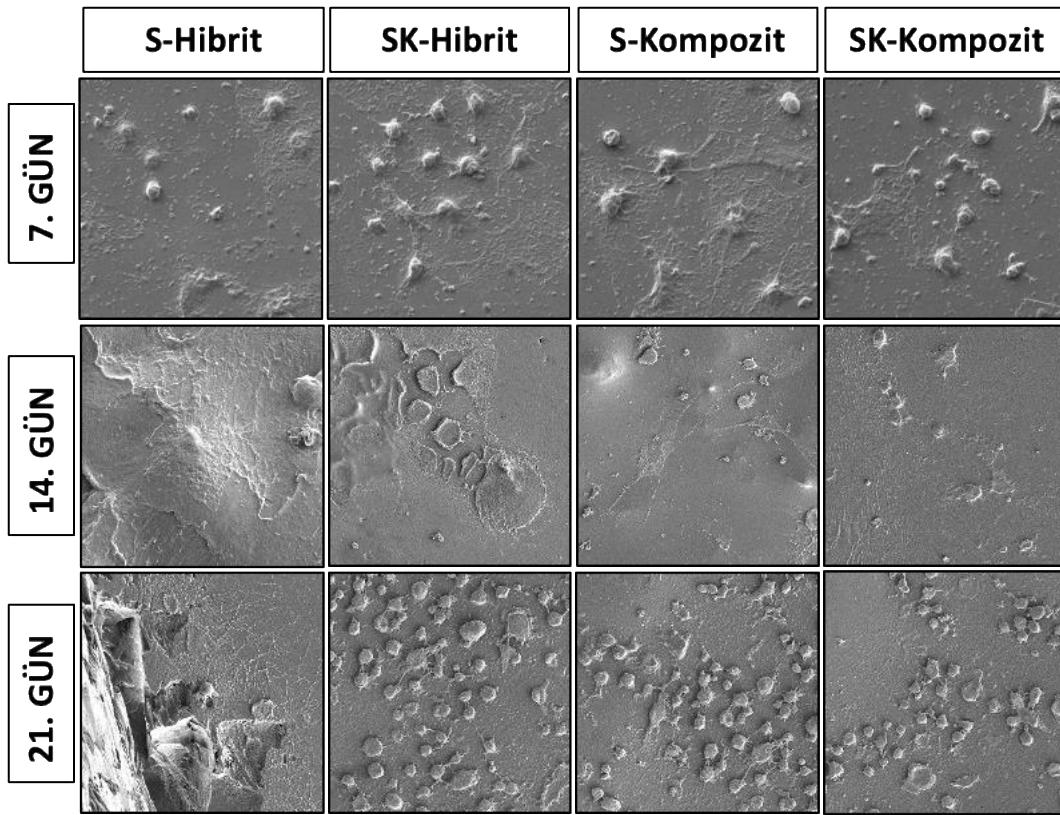


Şekil 4.62. S-Hibrit, SK-Hibrit, S-Kompozit ve SK-Kompozit kardiyak yamaların 7, 14 ve 21 gün statik kültür sonrasındaki florasan mikroskopu görüntüleri (10X Büyütme).

4.8.1.5. Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM) Analizi

Statik kültürün 7., 14. ve 21. günleri sonunda insan kardiyomiyosit hücreleri reselülerize edilen tüm kardiyak yama gruplarının taramalı elektron mikroskopu analizi

gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla hücreler malzeme üzerinde fikse edilmiş ve böylece yüzeydeki hücrelerin morfolojik analizleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen mikroskop görüntüleri Şekil 4.63'te verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre kültürün 7. gününde az sayıda hücreye rastlanmıştır. 14. gün sonrasında yüzeydeki hücrelerin sitoplazmik bağlantıları kurulmuş ve yüzeyde yayılmış olarak görülmektedir. 21 gün sonunda ise yüzeye yapışmış hücrelerin ve kurulmuş sitoplazmik köprülerin varlığı malzeme yüzeyinde hücrelerin başarılı bir şekilde 21 gün kültürasyonunun sağlanabildiğini göstermiştir.



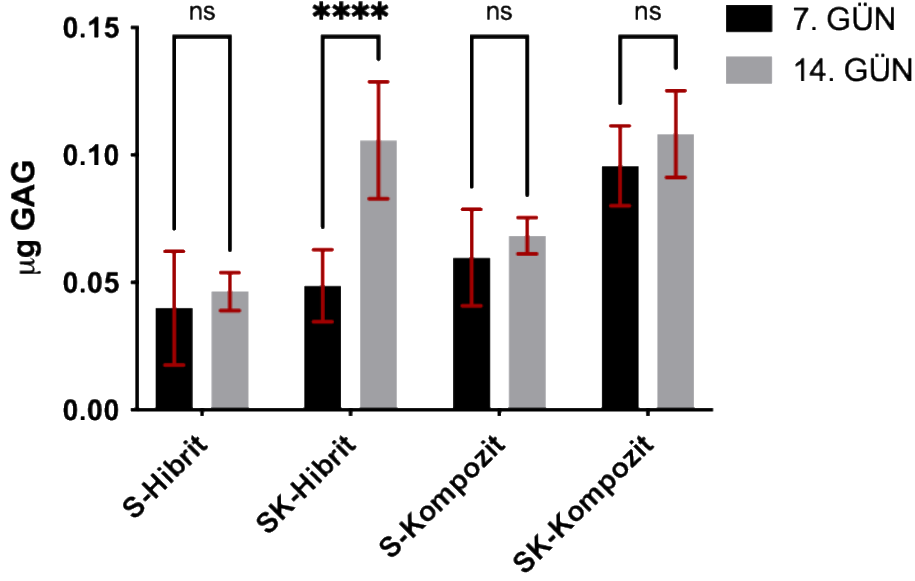
Şekil 4.63. S-Hibrit, SK-Hibrit, S-Kompozit ve SK-Kompozit gruplarının 7., 14. ve 21. kültür günü sonrasında taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile elde edilen yüzey görüntüleri (1000X).

4.8.1.6. Sülfatlanmış Glikozaminoglikan (sGAG) Miktar Tayini

Statik kültür çalışmasının 7. ve 14. günleri sonlarında kardiyak doku yamalarındaki hücrelerin GAG miktarları belirlenmiş ve buna göre sonuçlar histogram grafiği şeklinde Şekil 4.64'te verilmiştir. Sonuçlar total GAG miktarından doku iskelesi miktarının

içerdiği GAG miktarı çıkarılarak hesaplanmıştır. Buna göre S-Hibrit kardiyak yamaları 14 gün sonunda 0,046 µg GAG içerirken; 7 ve 14 gün sonundaki GAG miktarları arasında istatistiksel anlamlı bir farklılık görülmemiştir (ns). SK-Hibrit kardiyak yamaları 14 gün sonunda 0,105 µg GAG içerirken 7. gün sonundaki GAG miktarı (0,048 µg) ile istatistiksel anlamlı bir farklılık vardır (p****). S-Kompozit kardiyak yamaları 14 gün sonunda 0,068 µg GAG içerirken 7. gün sonundaki GAG miktarı ile istatistiksel anlamlı bir fark bulunmamıştır (ns). Son olarak SK-Kompozit kardiyak yamaları 14 gün sonunda 0,11 µg GAG içerirken 7. gün sonundaki GAG miktarı ile istatistiksel anlamlı bir fark bulunmamıştır (ns).

GAG miktarındaki farklılık tüm kardiyak yamalar için kıyaslanmış ve istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Buna göre, 7. gün sonlarında S-Hibrit/SK-Hibrit, S-Hibrit/S-Kompozit grupları arasında anlamlı farklılık yoktur (ns). Ancak SK-Hibrit/SK-Kompozit grupları arasında anlamlı farklılık bulunmuştur (p***). 14. gün sonlarında ise, S-Hibrit/SK-Hibrit grupları arasında farklılık bulunmuştur (p****). Ancak SK-Hibrit/SK-Kompozit ve S-Hibrit/S-Kompozit grupları arasında anlamlı farklılık yoktur (ns). Sonuç olarak 14 günlük kültür sonunda skCO₂ yöntemi ile edilen hibrit ve kompozit kardiyak yamaları GAG miktarında artışı olumlu yönde etkilemiştir.



Şekil 4.64. S-Hibrit, SK-Hibrit, S-Kompozit ve SK-Kompozit kardiyak yamalarının statik kültür koşullarında 7. ve 14.günlerde GAG miktarının artışını mikrogram cinsinden gösteren grafik.

4.8.1.7. Mekanik Çekme Analizleri

Mekanik analiz çalışmaları tüm kardiyak yamalar için statik hücre kültürü çalışması sonunda (21. Gün) tekrardan değerlendirilmiştir. Buna göre, S-Hibrit, SK-Hibrit, S-Kompozit ve SK-Kompozit gruplarına ait kıyaslamalı mekanik analiz sonuçları sırasıyla Tablo 4.6, Tablo 4.7, Tablo 4.8 ve Tablo 4.9’da verilmiştir. Çekme dayanımı (kPa), çekme uzaması (%) ve elastisite modüllerini (kPa) değerleri ise kültür öncesinde elde edilen değerler ile kıyaslamalı olarak tartışılmıştır.

Tablo 4.6. S-Hibrit kardiyak yama grubunun 21 gün statik kültür sonrasında mukavemet değerlerini (kPa), uzama davranışlarını (%) ve elastisite modüllerini (kPa) gösteren tablo (n=3).

	Çekme Dayanımı (kPa)	Çekme Uzaması (%)	Elastisite Modülü (kPa)
S-Hibrit	350 ± 54,1	145,7 ± 13,9	340,5 ± 17,8
S-Hibrit 21.GÜN	153,5 ± 18,3 (p****)	206,3 ± 15,4 (ns)	179,4 ± 31,2 (p****)

Tablo 4.7. SK-Hibrit kardiyak yama grubunun 21 gün statik kültür sonrasında mukavemet değerlerini (kPa), uzama davranışlarını (%) ve elastisite modüllerini (kPa) gösteren tablo (n=3).

	Çekme Dayanımı (kPa)	Çekme Uzaması (%)	Elastisite Modülü (kPa)
SK-Hibrit	221,3 ± 18,6	65 ± 8,5	359,9 ± 19,2
SK-Hibrit 21.GÜN	179,4 ± 6,8 (p*)	98,2 ± 3,4 (ns)	273,8 ± 18,2 (p**)

Tablo 4.8. S-Kompozit kardiyak yama grubunun 21 gün statik kültür sonrasında mukavemet değerlerini (kPa), uzama davranışlarını (%) ve elastisite modüllerini (kPa) gösteren tablo (n=3).

	Çekme Dayanımı (kPa)	Çekme Uzaması (%)	Elastisite Modülü (kPa)
S-Kompozit	382,6 ± 49,8	123,2 ± 13,7	474 ± 75,8
S-Kompozit 21.GÜN	190,4 ± 49,5 (p***)	174,5 ± 14 (ns)	289,5 ± 46,1 (p****)

Tablo 4.9. SK-Kompozit kardiyak yama grubunun 21 gün statik kültür sonrasında mukavemet değerlerini (kPa), uzama davranışlarını (%) ve elastisite modüllerini (kPa) gösteren tablo (n=3).

	Çekme Dayanımı (kPa)	Çekme Uzaması (%)	Elastisite Modülü (kPa)
SK-Kompozit	283,7 ± 23,7	36,6 ± 10,7	600,3 ± 77,6
SK-Kompozit 21.GÜN	194,6 ± 5,1 (p*)	68,6 ± 3,7 (ns)	418,8 ± 21,1 (p**)

Statik kültürün sonunda elde edilen mekanik test sonuçlarına göre tüm kardiyak yamaların elastisite modüllerinde genel olarak azalma elde edilmiştir. Buna paralel olarak çekme dayanımları azalmış ancak çekme uzama oranlarında istatistiksel anlamlı farklılık görülmemiştir. Tüm bu mekanik değişimler statik kültür ortamında malzemelerin uğradığı degradasyona bağlanır. Ancak bu azalma sonucunda bile PGS ideal mekanik değerlerinin altına düşmemiştir. Aynı zamanda bu sonuçlar kardiyak doku mühendisliği için üretilen doku iskelelerinin elastisite modülleri ve gerilme mukavemetleri ile kıyaslanabilir bir aralıktadır [168].

4.8.2. Dinamik Hücre Kültürü Çalışmaları

4.8.2.1. Biyoreaktör Çalışmalarının Optimizasyonu

Statik kültür çalışmalarının sonunda, tüm kardiyak yamalar mekanik stimülasyon altında dinamik olarak incelenmiştir. Yapılan biyoreaktör deneyleri için çalışma koşulları Tablo 4.10'da verilmiştir. Buna göre dinamik kültürün uygulamasında reselülerize edilmiş tüm kardiyak yamalar 1. ve 2. gün statik olarak (durağan) bekletilmiş ardından 12 gün boyunca dinamik uygulama gerçekleştirilmiştir. Uygulama için çekme yüzdesi aralığı %5-%10, frekans 1 Hz ve süre 4 saat olarak belirlenmiştir.

Tablo 4.10. Dinamik kültür çalışma koşullarını gösteren tablo.

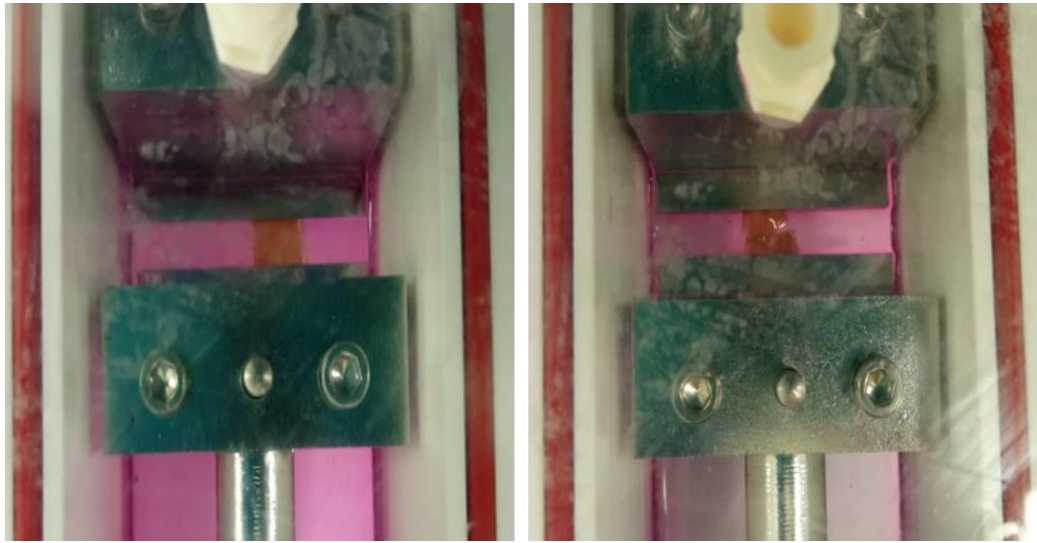
Çekme Yüzdesi	%5 - %10
Çekme Frekansı	1 Hz
Mekanik Etki Uygulama Süresi	4 saat/gün

Elde edilen tüm kardiyak yamalar sırasıyla %5 ve %10 olmak üzere çekme kuvvetine maruz bırakılmıştır. Hazırlık aşamasında, steril edilmiş kardiyak yamalar kuyucuklar içerisine steril pens yardımıyla yerleştirilmiş ve her doku iskelesi için 3×10^4 insan kardiyomyosit hücresi ekimi yapılmıştır. Hücre ekimini takiben, kuyucuklar içerisine 8 mL hacimde kardiyomyosit besi ortamı eklenmiş ve reaktör sistemi kapatılarak 2 gün boyunca statik olarak kültürü yapılmıştır. Besi ortamları iki günde bir olmak üzere

yenilenmiş ve 12 gün boyunca günde 4 saat süreyle belirtilen yüzdelerde çekme kuvvetlerine maruz bırakılmıştır.

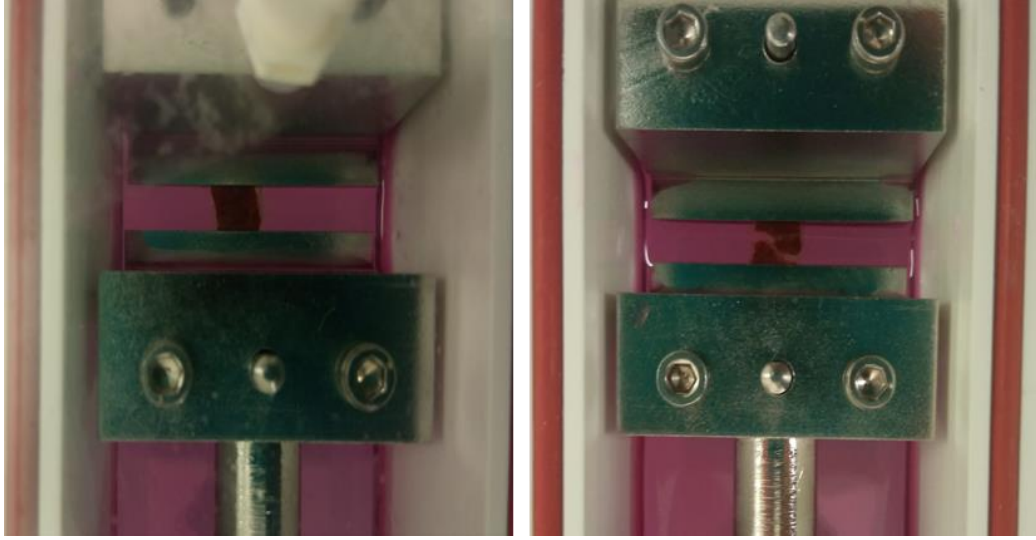
İlk aşamada **%10 çekme kuvvetiyle** kültüre edilen kardiyak yamaların mekanik etkiye verdikleri tepkiler şu şekilde özetlenmiştir:

- S-Hibrit kardiyak yamaları 2 gün statik kültür sonrasında dinamik kültür süresinde **48 saat sonunda kopmuş** ve buna ait öncesi ve sonrası görüntüleri Şekil 4.65'te verilmiştir.



Şekil 4.65. S-Hibrit kardiyak yamaların %10 mekanik etki uygulanan dinamik kültürü esnasında alınmış görüntüleri.

- SK-Hibrit kardiyak yamaları 2 gün statik kültür sonrasında dinamik kültür süresinin **başlangıcında** kopmuş (ilk 30 dakikalık süre içerisinde) ve buna ait öncesi ve sonrası görüntüleri Şekil 4.66'da verilmiştir.



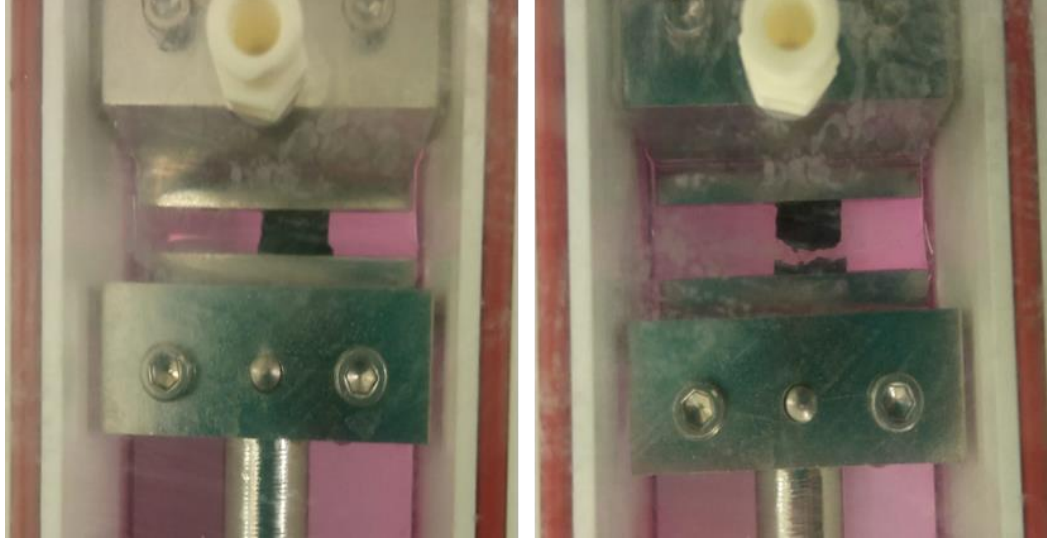
Şekil 4.66. SK-Hibrit kardiyak yamaların %10 mekanik etki uygulanan dinamik kültürü esnasında alınmış görüntüleri.

- S-Kompozit kardiyak yamaları 2 gün statik kültür sonrasında dinamik kültür süresinde **60 saat süre sonunda** kopmuş ve buna ait öncesi ve sonrası görüntüleri Şekil 4.67’de verilmiştir.



Şekil 4.67. S-Kompozit kardiyak yamaların %10 mekanik etki uygulanan dinamik kültürü esnasında alınmış görüntüleri.

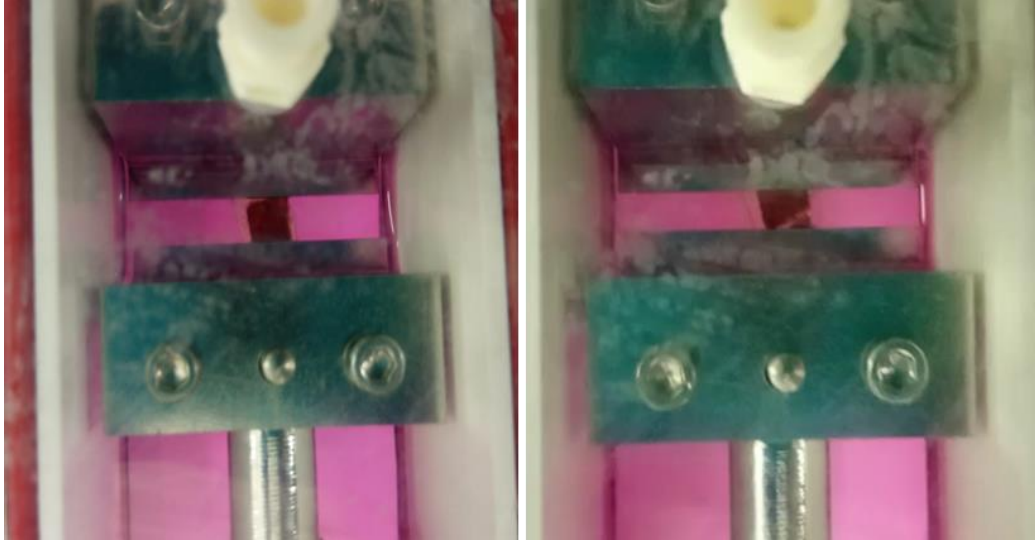
- SK-Kompozit kardiyak yamaları 2 gün statik kültür sonrasında dinamik kültür süresinin başlangıcında kopmuş (ilk 30 dakikalık süre içerisinde) ve buna ait öncesi ve sonrası görüntüleri Şekil 4.68’de verilmiştir.



Şekil 4.68. SK-Kompozit kardiyak yamaların %10 mekanik etki uygulanan dinamik kültürü esnasında alınmış görüntüleri.

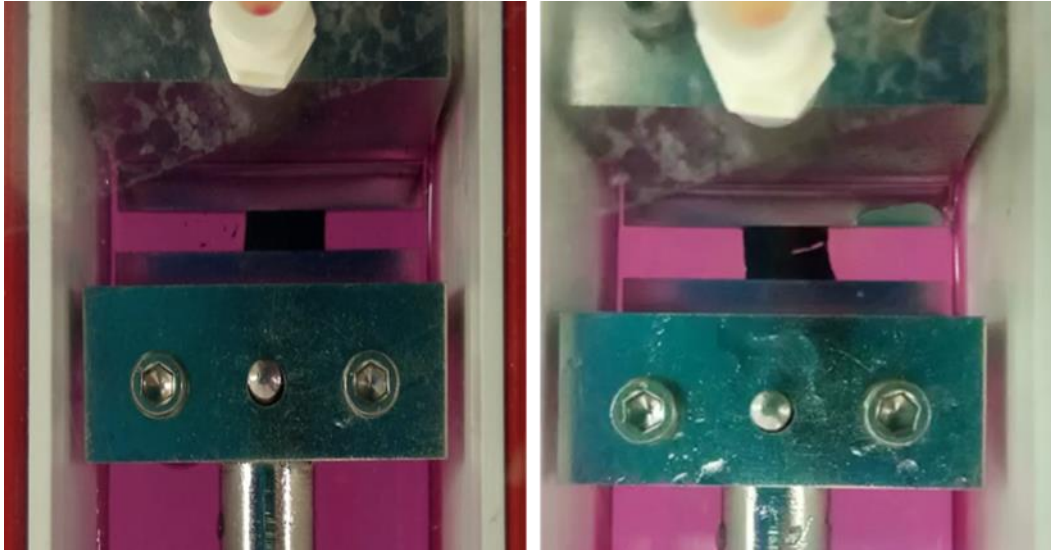
İlk aşamada **%5 çekme kuvvetiyle** kültüre edilen kardiyak yamaların mekanik etkiye verdikleri tepkiler şu şekilde özetlenmiştir:

- S-Hibrit ve S-Kompozit kardiyak yamalarına 2 gün statik kültür sonrasında dinamik kültür süresinde 12 gün mekanik etki uygulanabilmiş ve yamalarda herhangi bir kopma veya yırtılma gözlenmemiştir.
- SK-Hibrit kardiyak yamaları 2 gün statik kültür sonrasında dinamik kültür süresinde **2 saat sonunda** kopmuş ve buna ait öncesi ve sonrası görüntüleri Şekil 4.69’da verilmiştir.



Şekil 4.69. SK-Hibrit kardiyak yamaların %5 mekanik etki uygulanan dinamik kültürü esnasında alınmış görüntüleri.

- SK-Kompozit kardiyak yamaları 2 gün statik kültür sonrasında dinamik kültür süresinde *4 saat sonunda* kopmuş ve buna ait öncesi ve sonrası görüntüleri Şekil 4.70'te verilmiştir.

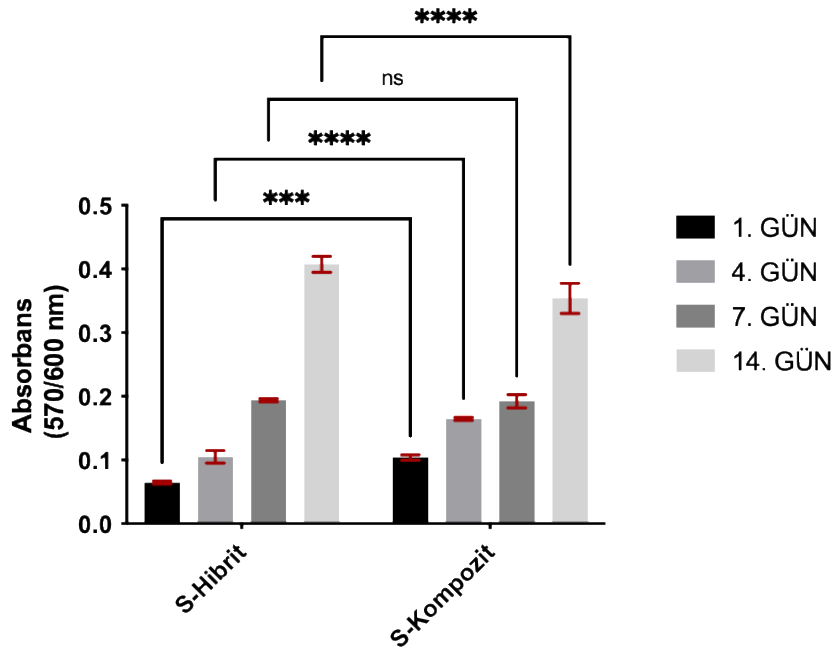


Şekil 4.70. SK-Kompozit kardiyak yamaların %5 mekanik etki uygulanan dinamik kültürü esnasında alınmış görüntüleri.

Dinamik kültürün uygulanan çekme kuvvetlerinin optimizasyonunda, skCO₂ uygulamasıyla elde edilmiş kardiyak yamaların (SK-Hibrit, SK-Kompozit) gerek %10 gerekse %5 çekme kuvvetine maruz kalması sonucunda bu etkiye dayanmadıkları görülmüştür. Bu yamaların karakterizasyonları aşamasında yapılan mekanik test sonuçlarında, uygulanan yöntemin malzeme elastikiyetini azalttığı bildirilmiştir. Buna bağlı olarak %10 çekme kuvveti SK kardiyak yama grupları üzerinde başarısız olmuştur. Aynı zamanda SDS uygulaması ile elde edilen kardiyak yamalar ise (S-Hibrit, S-Kompozit) dinamik etkinin başlatılmasının ardından kültürün en geç 60 saat sonrasında kopmuştur. Bu çalışmada çekme kuvveti %5 olarak tekrar edilmiş ancak yine skCO₂ uygulamasıyla elde edilmiş kardiyak yamaların (SK-Hibrit, SK-Kompozit) dinamik etkinin başlangıcından en geç 4 saat sonrasında koptukları gözlenmiştir. SDS uygulaması ile elde edilen kardiyak yamalar ise dinamik kültür koşullarından (%5 çekme yüzdesi) etkilenmemiştir. Bu optimizasyon sonucunda dinamik kültür çalışmasında uygulanacak çekme yüzdesi %5 olarak belirlenmiş ve dinamik koşullar sadece S-Hibrit ve S-Kompozit gruplarını kapsayacak şekilde ele alınmıştır. Buna göre S-Hibrit ve S-Kompozit kardiyak yamalar statik kültür sonuçları karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir.

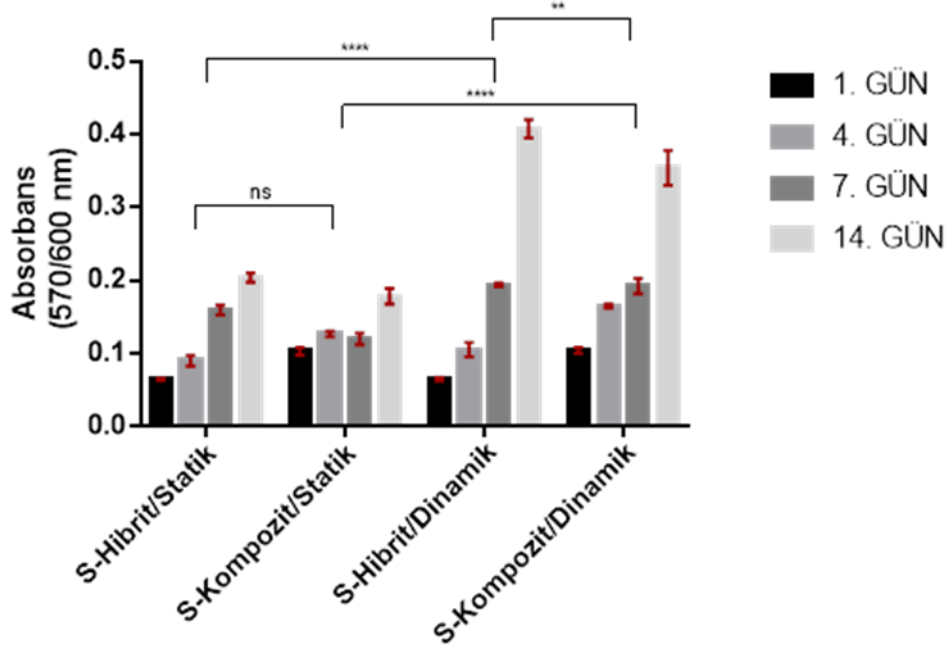
4.8.2.2. Hücre Metabolik Aktivitesinin Değerlendirilmesi

Dinamik kültürün 1., 4., 7. ve 14. Günleri sonlarında metabolik aktiviteleri absorbans değerleri baz alınarak (570/600 nm) incelenmiş ve sonuçlar Şekil 4.71'de S-Hibrit ve S-Kompozit kardiyak yama grupları için verilmiştir. Buna göre Şekil 4.71'de, S-Hibrit kardiyak yama gruplarının 1., 4., 7. ve 14. günler sonundaki hücre metabolik aktivitelerinde artış elde edilmiştir. Tüm günler arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlıdır (p****). Benzer şekilde S-Hibrit kardiyak yama gruplarının 1., 4., 7. ve 14. günler sonundaki hücre metabolik aktivitelerinde artış elde edilmiş ve gruplar arasındaki artış istatistiksel olarak anlamlıdır (p****). Aynı zamanda S-Hibrit ve S-Kompozit kardiyak yamaların birbirleri arasındaki kıyaslaması yapılmış ve sonuçlar istatistiksel olarak grafik üzerinde verilmiştir. Buna göre 7. gün dışında tüm gruplar arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlıdır. Bu sonuçlarla, dinamik etkinin kardiyak yama üzerindeki hücrelerin metabolik aktivitelerini arttırdığı sonucuna varılmıştır.



Şekil 4.71. S-Hibrit ve S-Kompozit kardiyak yamalarının dinamik kültürde 1., 4., 7. ve 14.günlerde hücre metabolik aktivitelerini gösteren grafik.

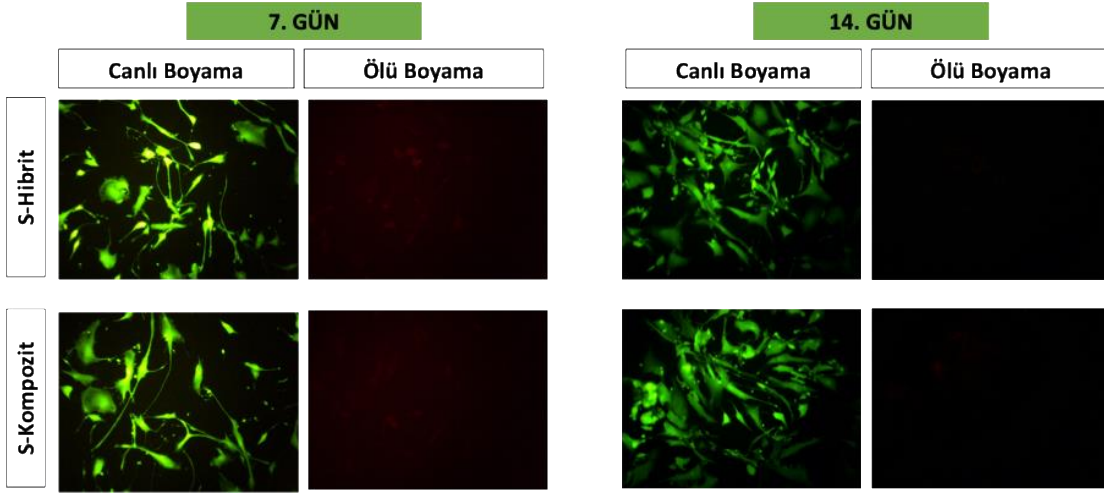
Aynı zamanda bu sonuçlar S-Hibrit ve S-Kompozit kardiyak yamaların statik kültür sonuçları ile kıyaslanmış ve karşılaştırmalı sonuçlar Şekil 4.72' verilmiştir. Buna göre statik koşullarda S-Hibrit ve S-Kompozit grupları arasında anlamlı bir artış gözlenmemiştir (ns). Dinamik koşullarda ise S-Hibrit ve S-Kompozit grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık vardır (p^{**}). Dinamik kültür koşullarının hücre metabolik aktivitesi üzerindeki etkisini değerlendirmek amacıyla ise ilk olarak, S-Hibrit grubu statik ve dinamik olarak karşılaştırılmış buna göre gruplar arasında anlamlı farklılık bulunmuştur (p^{****}). Aynı şekilde, S-Kompozit grubu statik ve dinamik olarak karşılaştırılmış buna göre gruplar arasında anlamlı farklılık bulunmuştur (p^{****}). Tüm bu sonuçlar malzeme etkisine bakılmadan mekanik stimülasyonun hücre metabolik aktivitesinde artışı desteklediğini göstermektedir. Malzeme etkisinin değerlendirmesinde ise, S-Kompozit kardiyak yama grubu statik koşullarda S-Hibrit kardiyak yama grubu ile farklılık göstermezken, dinamik koşullarda kompozit yapının hücre aktivitesinde artışı desteklediği söylenebilir.



Şekil 4.72. S-Hibrit ve S-Kompozit kardiyak yamaların statik ve dinamik kültür karşılaştırmalı 1., 4., 7. ve 14. günlerde hücre metabolik aktivitelerini gösteren grafik.

4.8.2.3. Hücre Canlılığının Değerlendirilmesi

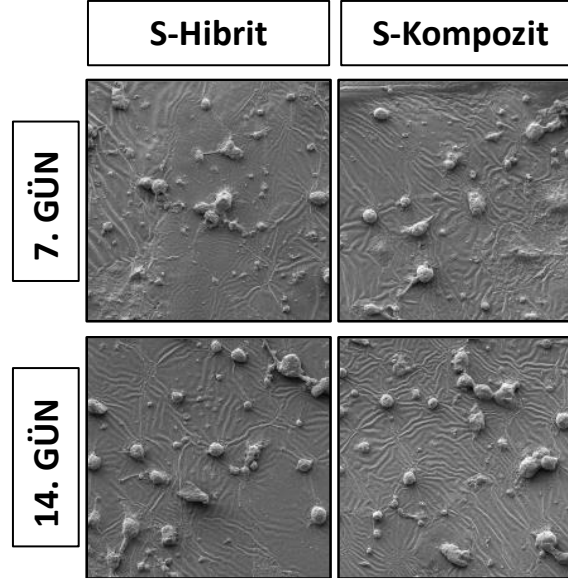
Canlı/ölü hücre boyama analizinde statik kültür çalışmasına benzer olarak reselülerize ve mekanik olarak stimüle edilmiş kardiyak yamalar ile dinamik kültürün 7. ve 14. günü sonunda boyanmıştır. Boyalı doku iskeleri florasan ataçmanlı mikroskop ile görüntülenmiş ve elde edilen görüntüler Şekil 4.73'te verilmiştir. Statik kültür sonuçlarına benzer şekilde reselülerize kardiyak yamaların dinamik olarak mekanik stimülasyonu sonucunda 7. gün sonunda proliferasyon gerçekleşmiş ve sitoplazmik köprülerin kurulduğu gözlenmiştir. 14. gün sonunda üremede artış görülmüş ve gerek 7.gün gerekse 14. gün sonlarında ölü hücreye rastlanmamıştır. Elde edilen bu sonuçlar metabolik aktivitenin artışındaki olumlu sonuçlar ile birbirini desteklemektedir.



Şekil 4.73. S-Hibrit ve S-Kompozit kardiyak yamaların 7 ve 14 gün dinamik kültür sonrasındaki florasan mikroskobu görüntüleri (10X Büyütme).

4.8.2.4. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi

Dinamik kültürün 7. ve 14.günleri sonunda insan kardiyomiyosit hücreleri ile reselülerize edilen kardiyak yama gruplarının taramalı elektron mikroskobu analizi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla hücreler malzeme üzerinde fikse edilmiş ve böylece yüzeydeki hücrelerin morfolojik analizleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen mikroskop görüntüleri Şekil 4.74'te verilmiştir. Buna göre S-Hibrit grubu için dinamik kültürün 7. ve 14. gününde hücreler başarı ile görüntülenmiştir. Bu analiz hücre proliferasyonundaki artışın teyidi amacıyla gerçekleştirilmediği, yüzeydeki hücrelerin varlığının görsel teyidi olarak sunulmuştur. Benzer şekilde S-Kompozit grubu için de dinamik kültürün 7. ve 14. gününde hücreler başarı ile görüntülenmiştir. Buradaki tüm gruplar ve belirtilen günler için hücrelerin yapışıp yayıldığı görülmüştür.



Şekil 4.74. S-Hibrit ve S-Kompozit gruplarının 7. ve 14. dinamik kültür günü sonrasında taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile elde edilen yüzey görüntüleri (1000X).

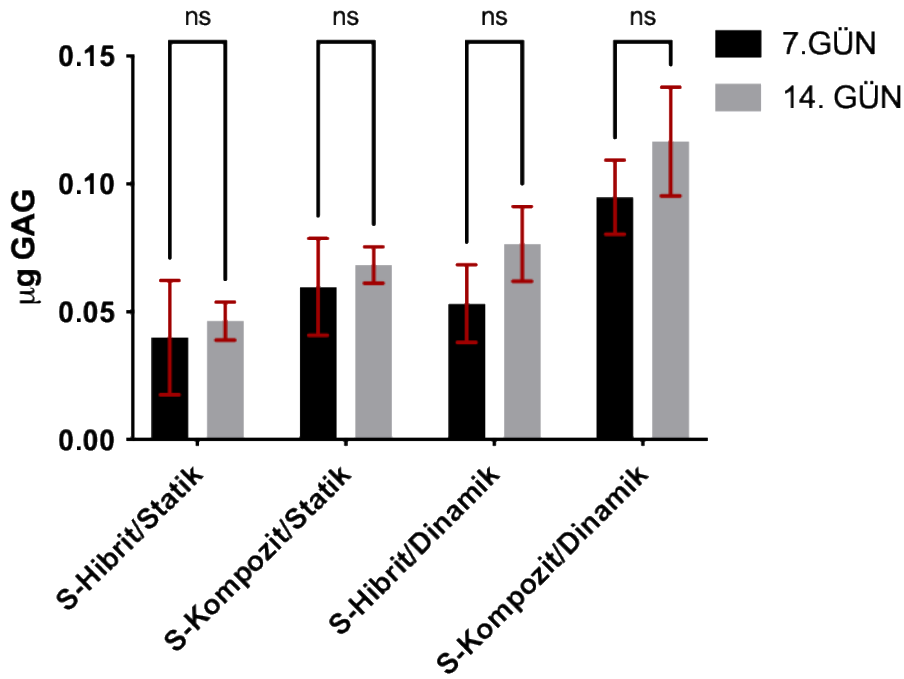
4.8.2.5. Sülfatlanmış Glikozaminoglikan (sGAG) Miktar Tayini

Dinamik kültür çalışmasının 7. ve 14. günleri sonlarında kardiyak doku yamalarındaki hücrelerin GAG miktarları belirlenmiş ve elde edilen sonuçlar statik kültür sonuçlarında verilmiş olan GAG miktarı ile kıyaslamalı olarak Şekil 4.75'te verilmiştir. Sonuçlar total GAG miktarından doku iskelesi miktarının içerdiği GAG miktarı çıkarılarak hesaplanmıştır.

S-Hibrit kardiyak yamaların kıyaslamasında, dinamik koşullarda 14 gün sonunda GAG miktarı $0.076 \mu\text{g}$ olarak belirlenmiş ve bu sonuçların 7. gün sonundaki GAG miktarı ile kıyaslamasında gruplar arasında istatistiksel anlamlı bir fark bulunmamıştır (ns). S-Kompozit kardiyak yamaların kıyaslamasında ise dinamik koşullarda GAG miktarı 14 gün sonunda $0.12 \mu\text{g}$ olarak belirlenmiş ve aynı şekilde bu sonuçların 7. gün sonundaki GAG miktarı ile kıyaslamasında gruplar arasında istatistiksel anlamlı bir fark bulunmamıştır (ns).

GAG miktarındaki değişikliklerin statik ve dinamik koşullar arasında karşılaştırmalı olarak istatistiksel değerlendirilmesinde, S-Hibrit kardiyak yama grubu için 7. gün sonlarında istatistiksel anlamlı farklılık görülmemiştir. Aksine, S-Kompozit kardiyak yama

grubu için 7. gün sonlarında istatistiksel olarak anlamlı farklılık elde edilmiştir (p**). 14. gün sonlarındaki kıyaslamalarda ise S-Hibrit kardiyak yama grubu için statik ve dinamik koşullar arasında istatistiksel anlamlı farklılık görülmemiştir. S-Kompozit kardiyak yama grubu içinse aradaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p**). Sonuç olarak dinamik kültür koşulları kompozit yapıdaki GAG miktarını desteklemiş ancak hibrit gruplar üzerinde anlamlı bir etki yaratmamıştır.

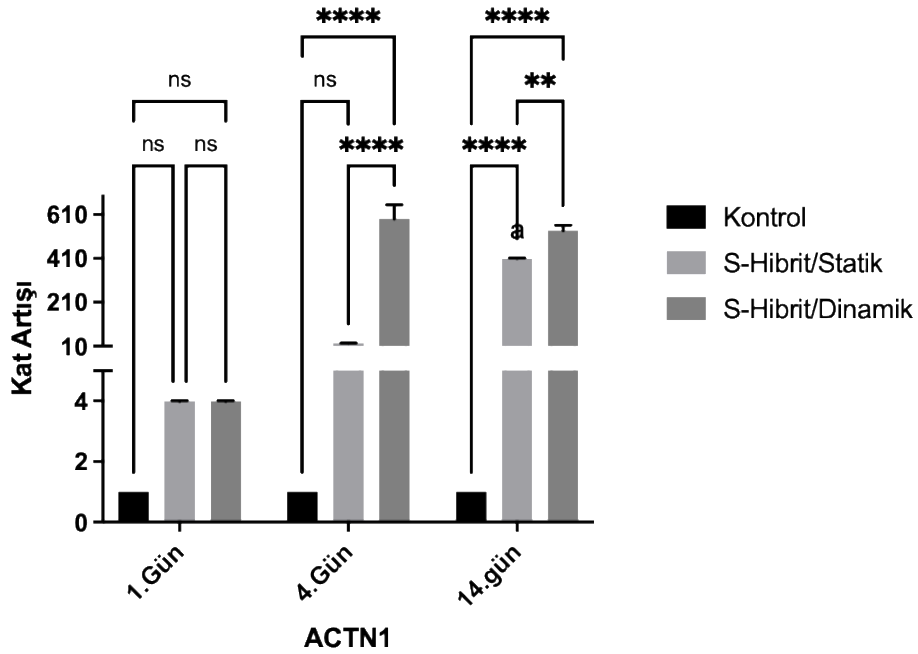


Şekil 4.75. S-Hibrit ve S-Kompozit kardiyak yamaların statik ve dinamik kültür karşılaştırmalı 7. ve 14. günlerde GAG miktarının artışını mikrogram cinsinden gösteren grafik.

4.8.2.6. Gerçek Zamanlı PCR (RT-PCR) Analizleri

Tez çalışması kapsamında metod kısmında verilmiş olan kardiyak genlerin ifade düzeyleri araştırılmıştır. Çalışma sonucunda S-Hibrit ve S-Kompozit kardiyak yama grupları için TBX5, TNNT2, CDH1 ve SNAI1 genlerinin ifadeleri tespit edilememiştir. Tüm çalışma n=4 olacak şekilde tüm gen grupları için tekrar edilmiş ve sonuçlarda iki kardiyak belirteci olan ACTN1 ve GJAI (Konneksin 43) gen ifadeleri tespit edilmiştir. Buna göre bu iki gen grubuna ait ifade düzeyleri ACTN1 ve GJAI genleri için sırasıyla Şekil 4.76 ve Şekil 4.77’de verilmiştir.

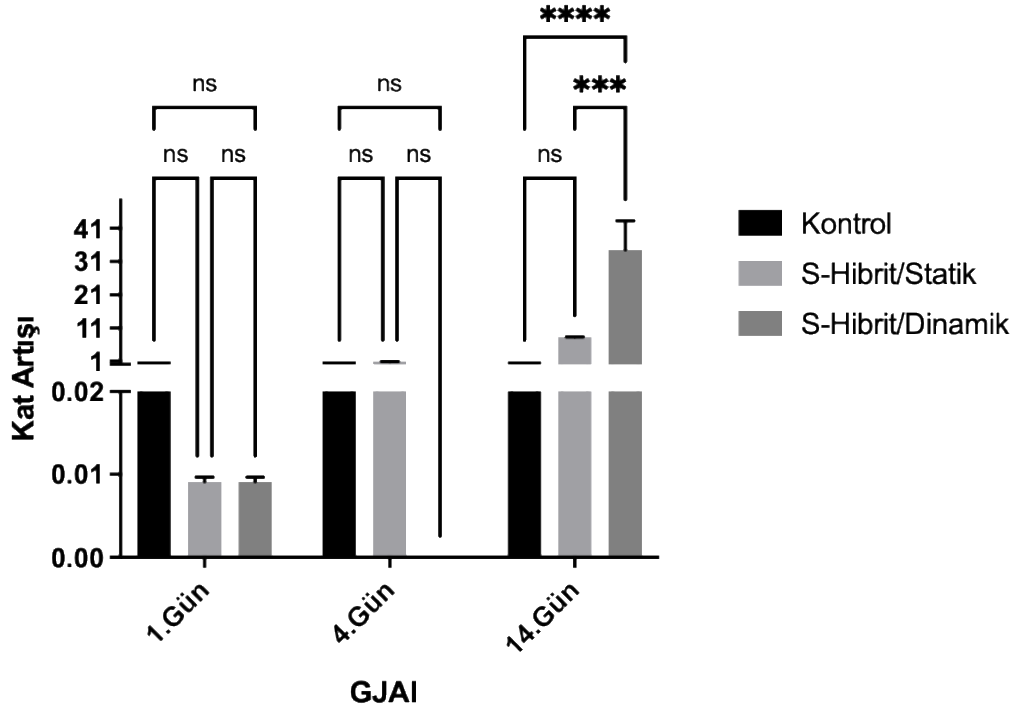
Şekil 4.76'ya göre S-Hibrit gruplarda tüm zaman dilimlerinde kontrol grubuna kıyasla ACTN1'nin ifade düzeylerinin gerek statik gerekse dinamik koşullarda arttığı tespit edilmiştir. 1. günde S-Hibrit kardiyak yama grubunun statik ve dinamik grupları arasında ACTN1 gen ifadesinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik görülmemiştir (ns). Ancak, ACTN1 gen ifadesinin 4. ve 14. günlerde S-Hibrit kardiyak yama grubunun dinamik koşullarında daha yüksek olduğu tespit edilmiştir ve artış istatistiksel olarak anlamlıdır (p****). 4. günde S-Hibrit kardiyak yamanın statik koşullarında kontrol grubuna göre 10 kat artış görülmüş ancak aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir (ns). 4. ve 14. günlerde, ACTN1 gen ifadesinin, S-Hibrit kardiyak yama grubu için dinamik koşulları altında kontrol grubuna kıyasla 500 kattan fazla önemli ölçüde arttığı tespit edilmiştir.



Şekil 4.76. Statik ve dinamik koşullar altında ACTN1 gen ekspresyonunu gösteren grafik.

Şekil 4.77'de verilen GJAI'nın ifade düzeyleri kıyaslandığında ise, S-Hibrit kardiyak yama grubu için tüm zaman dilimlerinde statik ve dinamik gruplarda, 1. günde kontrol grubuna kıyasla göre önemli ölçüde düşük olduğu tespit edilmiştir. S-Hibrit kardiyak yama grubunun dinamik koşullarında 4. günde GJAI gen ifadesi saptanamamış; ancak S-Hibrit kardiyak yama grubunu statik koşullar altında ise GJAI gen ifadesinin kontrol grubunda görülenle aynı seviyede olduğu belirlenmiştir. 14. günde S-Hibrit kardiyak

yama grubunun statik koşullarında kontrol grubuna göre GJAI gen ifadesi sekiz kat artmasına rağmen, artış istatistiksel olarak anlamlı değildir (ns). Son olarak gerek kontrol grubu gerekse statik durum ile karşılaştırıldığında, GJAI gen ifadesinin dinamik grupta önemli ölçüde daha yüksek olduğu tespit edilmiştir.



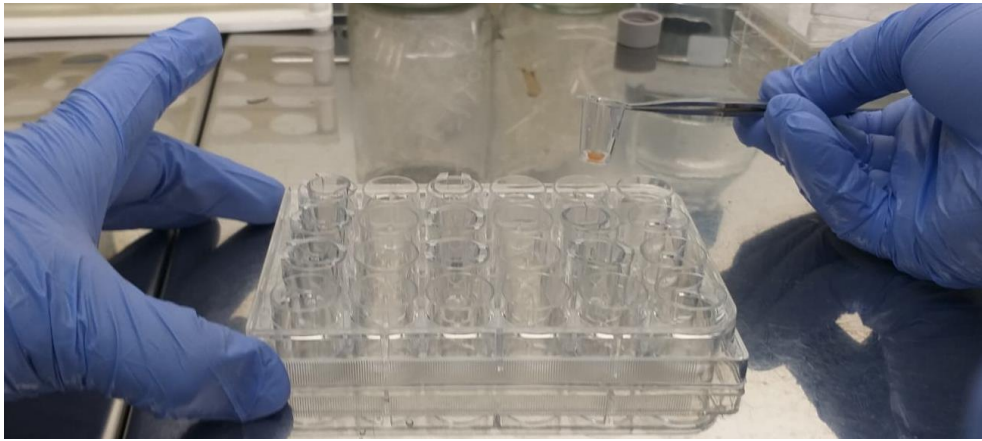
Şekil 4.77. Statik ve dinamik koşullar altında GJAI gen ekspresyonunu gösteren grafik.

4.8.3. İletkenlik Analizleri

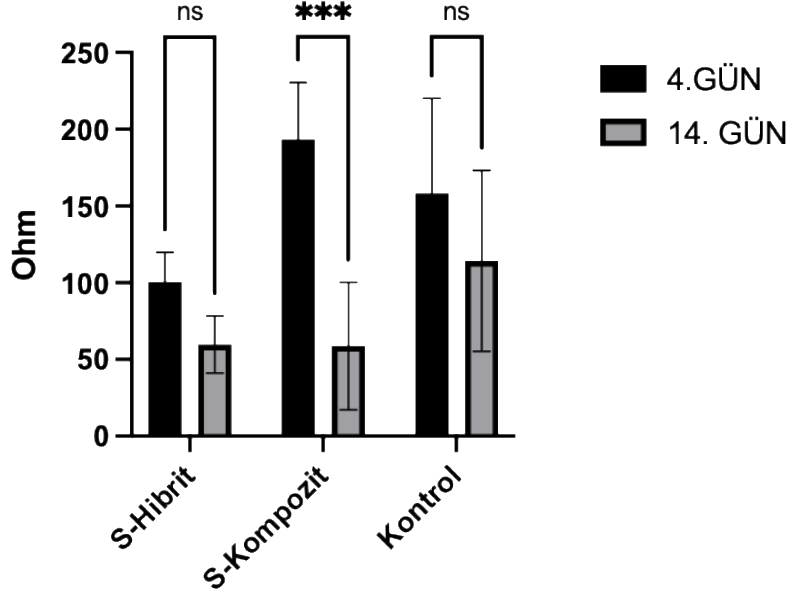
Kompozit yapılarla kazandırılan elektriksel iletkenliğin hücreler üzerindeki etkisinin incelenmesi amacıyla, modifiye transwell sistemi içerisinde reselülerize S-Hibrit ve reselülerize S-Kompozit kardiyak yama grupları, hücresiz S-Hibrit ve hücresiz S-Kompozit kardiyak yama grupları, sadece hücre ekili transwell grupları ve boş transwell grupları hücre ekimlerini takip eden 4. ve 14. gün sonlarında direnç farkları elde edilmiştir. Bu çalışma sırasında örneklerin transwell sisteme yerleştirilmesini gösteren resim Şekil 4.78’de verilmiştir. Hücresiz kardiyak yamaların direnç farkları hücreli kardiyak yamaların direnç farklarından çıkarılarak normalize edilmiştir. Buna göre elde edilen sonuçlar ohm cinsinden Şekil 4.79’da verilmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre (Şekil 4.79) 4. gün sonundaki direnç değerleri S-Hibrit kardiyak yama grubu için $100,5 \pm 19,3$ ohm, S-Kompozit kardiyak yama grubu için $193,5 \pm 37,1$ ohm ve kontrol grupları için $158,3 \pm 61,8$ ohm olarak belirlenmiştir. 14. gün sonunda ise direnç değerleri S-Hibrit kardiyak yama grubu için $59,7 \pm 18,6$ ohm, S-Kompozit kardiyak yama grubu için $58,75 \pm 41,5$ ohm ve kontrol grupları için $114,3 \pm 58,8$ ohm olarak tespit edilmiştir. Tüm bu sonuçların istatistiksel değerlendirmelerinde ise S-Hibrit ve kontrol gruplarında direnç farklılıklarında anlamlı bir azalma tespit edilmiştir. Ancak S-Kompozit kardiyak yama grubu için direnç farklılığındaki azalma istatistiksel olarak anlamlı değildir.

İstatistiksel kıyaslamalar aynı zamanda gruplar arası olarak da gerçekleştirilmiş ve bu sonuçlara göre S-Hibrit ve S-Kompozitin 4. günleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmuştur (p^*). Bunun dışında diğer tüm kıyaslamalarda farklılıklar istatistiksel açıdan anlamlı değildir (ns). Bu çalışma 3 kez tekrar edilmiş ancak elde edilen sonuçlar anlamlı bulunmamıştır. Bu durum transwell yüzeyinin insan kardiyomyosit hücre proliferasyonunu desteklememesi ve bu bağlamda hücrelerin yeterli ölçüde çoğalmamış olmasına bağlıdır. Yeterli proliferasyonun sağlanmaması ile hücreler arası boşluklar transwell alt kısmı ve üst kısmı arasında besi ortamı geçişine izin vermiş ve ölçümler buna bağlı olarak belirsizdir.

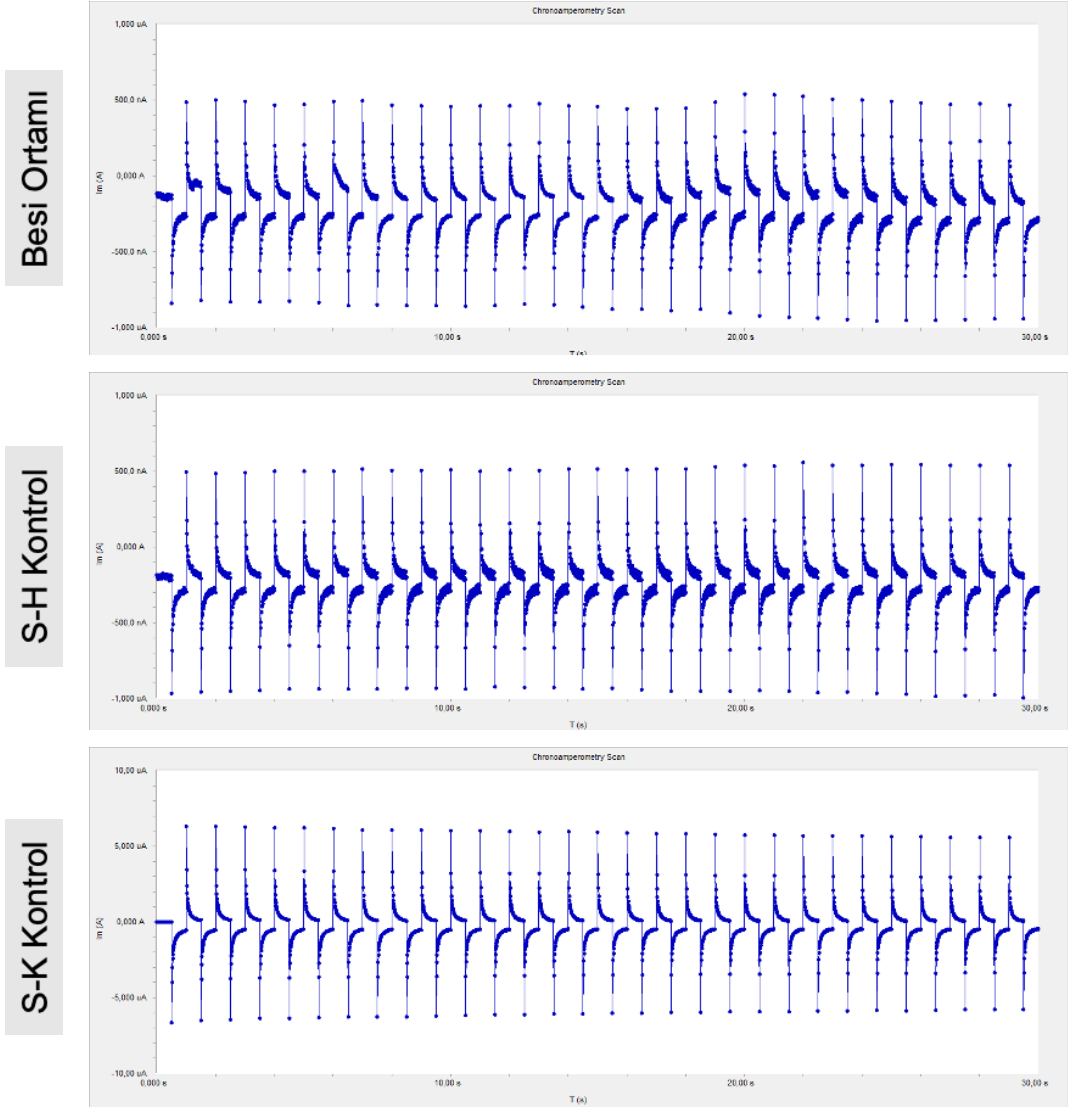


Şekil 4.78. Örneklerin transwell sistem ile yerleştirilmesini gösteren temsili fotoğraf.



Şekil 4.79. S-Hibrit, S-Kompozit ve kontrol grubunun 4. ve 14. günler sonunda elde edilen direnç farklılıklarını ohm cinsinden gösteren grafik.

Kompozit yapılarla kazandırılan elektriksel iletkenliğin hücreler üzerindeki etkisi bu sonuçlara bağlı olarak farklı bir sistemin geliştirilmesini gerektirmiştir (Şekil 3.4, Şekil 3.5). Bu analiz kapsamında reselülerize S-Hibrit ve reselülerize S-Kompozit kardiyak yama gruplarına, hücreli S-Hibrit ve hücreli S-Kompozit kardiyak yama gruplarına, besi ortamına ve son olarak hücre ekili kültür kuyucuklarına 10 s süreyle sabit voltaj uygulanmıştır. Besi ortamının, besi ortamı içerisindeki hücreli hibrit kardiyak yamanın (S-Hibrit) ve hücreli kompozit kardiyak yamanın (S-kompozit) voltaj uyarımına verdiği tepkiler kaydedilmiş ve görüntüler Şekil 4.80’de verilmiştir. Burada Y ekseninde elde edilen +/- akım değerleri ayrıca not edilmiştir. Besi ortamı ve S-Hibrit yama grubu nanoamper seviyesinde oldukça düşük seviyelerde akımı iletirken, bu akım değeri KNT katkısına bağlı olarak S-Kompozit gruplarda mikroamper biriminde kaydedilmiştir. Bu değerlere göre hesaplanmış direnç ve iletkenlik değerleri Tablo 4.11’de ayrıca verilmiştir. Buna göre besi ortamı ve besi ortamı içerisindeki hibrit grup iletken sınıfında değerlendirilirken, besi ortamı içerisindeki kompozit grupların ise iletkenliğinin KNT katkısına bağlı olarak bir miktar fazla olduğu tespit edilmiştir.

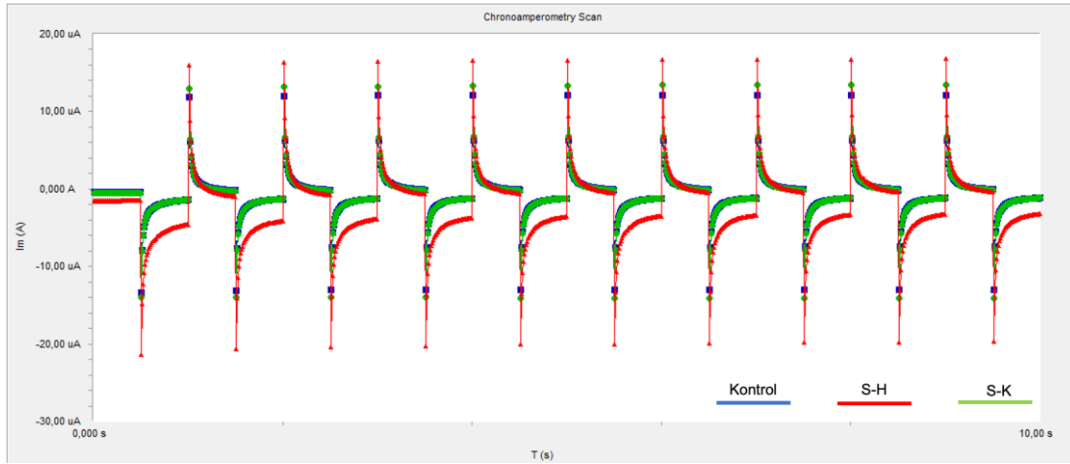


Şekil 4.80. 0,15 V elektriksel uyarımın besi ortamı, S-Hibrit ve S-Kompozit kardiyak yama gruplarındaki akım cevabını gösteren elektrodiyagramlar.

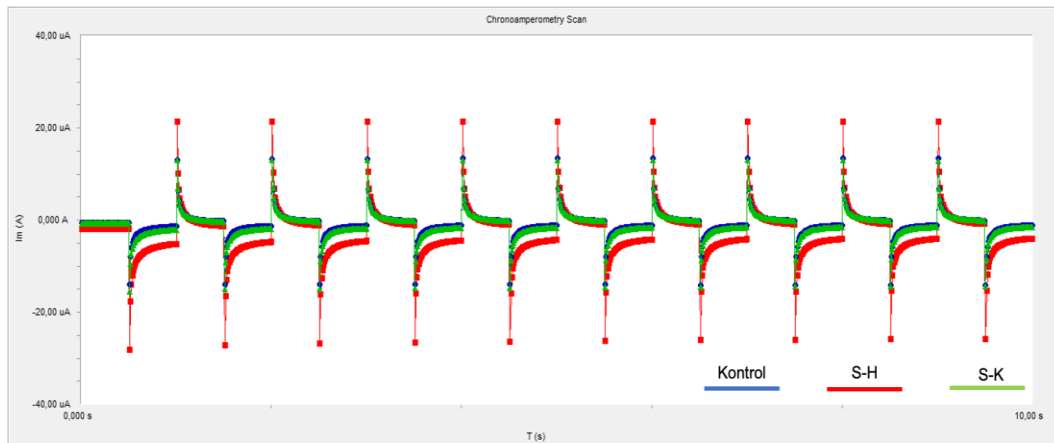
Tablo 4.11. Besi ortamı ve besi ortamı içerisindeki S-Hibrit ve S-Kompozit kardiyak yama gruplarının direnç (ohm) ve iletkenlik değerlerini gösteren tablo (ohm).

	Direnç (Ohm)	İletkenlik (S)
Besi Ortamı	$3.0 \times 10^5 \pm 8 \times 10^3$	$3.3 \times 10^{-6} \pm 8.9 \times 10^{-8}$
Hibrit Kardiyak Yama (S-Hibrit)	$3.1 \times 10^5 \pm 8.2 \times 10^3$	$3.3 \times 10^{-6} \pm 8.5 \times 10^{-8}$
Kompozit Kardiyak Yama (S-Kompozit)	$2.5 \times 10^4 \pm 7.5 \times 10^2$	$4.1 \times 10^{-5} \pm 1.3 \times 10^{-6}$

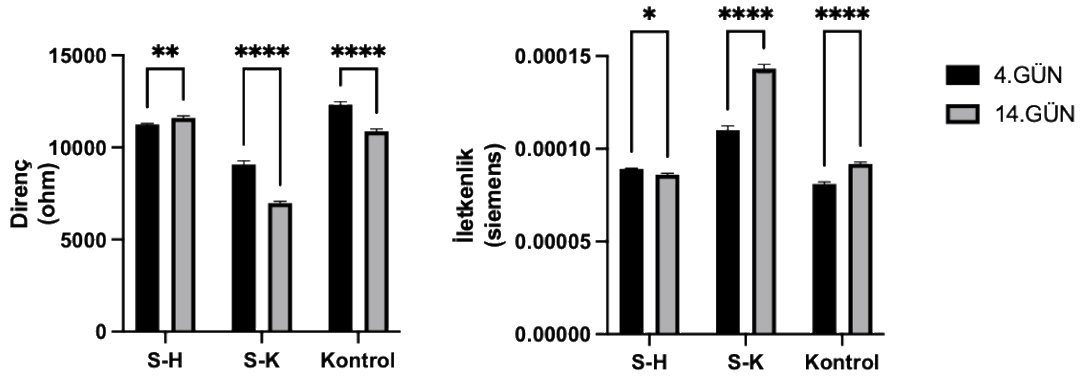
Diğer aşamada, kontrol grubu, reselülerize S-Hibrit kardiyak yama grubu ve reselülerize S-Kompozit kardiyak yama gruplarına uygulanan voltaj sırasında elde edilen akım değerleri kültürün 4. günü sonunda Şekil 4.81’de 14. günü sonunda ise Şekil 4.82’de karşılaştırmalı olarak verilmiştir. 4. ve 14. günlerde voltaj uygulamasına karşılık gelen akım değerleri kaydedilmiş ve buna göre direnç (ohm) ve iletkenlik (Siemens) değerleri hesaplanmıştır. Buna göre hesaplanmış direnç ve iletkenlik değerleri Şekil 4.83’te sütun grafiği olarak verilmiştir.



Şekil 4.81. Kontrol grubu, S-Hibrit ve S-Kompozit kardiyak yamaların kültürün 4. gün sonundaki uyarıma verdiği tepkiyi gösteren elektrik stimülasyonu.



Şekil 4.82. Kontrol grubu, S-Hibrit ve S-Kompozit kardiyak yamaların kültürün 14. gün sonundaki uyarıma verdiği tepkiyi gösteren elektrik stimülasyonu.



Şekil 4.83. Kültür ortamında S-Hibrit ve S-Kompozit kardiyak yamaların hücre iletkenliği üzerindeki etkisini gösteren tablo.

Şekil 4.83'e göre S-Hibrit, S-Kompozit ve Kontrol gruplarının 4. gün sonlarında direnç değerleri sırasıyla $1,1 \times 10^4 \pm 4,7 \times 10^1$ ohm, $9,1 \times 10^3 \pm 2 \times 10^2$ ohm ve $1,2 \times 10^4 \pm 1,6 \times 10^2$ ohm olarak; 14. gün sonlarında ise sırasıyla $1,2 \times 10^4 \pm 9,8 \times 10^1$ ohm, $6,9 \times 10^3 \pm 1,1 \times 10^2$ ohm ve $1,1 \times 10^4 \pm 1,2 \times 10^2$ ohm olarak belirlenmiştir. Direnç değerlerindeki artışa paralel olarak iletkenlik değerleri S-Hibrit, S-Kompozit ve Kontrol grupları için 4. gün sonlarında $8,9 \times 10^{-5} \pm 3,8 \times 10^{-7}$ Siemens, $1,1 \times 10^{-4} \pm 2,4 \times 10^{-6}$ Siemens $8,1 \times 10^{-5} \pm 1 \times 10^{-6}$ Siemens ve 14. gün sonlarında ise $8,6 \times 10^{-5} \pm 7,3 \times 10^{-7}$ Siemens, $1,4 \times 10^{-4} \pm 2,2 \times 10^{-6}$ Siemens ve $9,2 \times 10^{-5} \pm 1,1 \times 10^{-6}$ Siemens olarak hesaplanmıştır.

Direnç değerleri 4. günden 14. güne doğru tüm gruplar için azalma göstermiş ve buna bağlı olarak iletkenlik değerlerinde artış olduğu gözlenmiştir (İstatiksel farklılıklar bu kıyaslamalar için tablo üzerinde verilmiştir.) 4. gün sonuçlarında en yüksek direnç değeri kontrol grubunun iken bunu S-Hibrit kardiyak yama grubu ve ardından S-Kompozit kardiyak yama grubu takip eder (p****). 14. gün sonunda ise S-Kompozit kardiyak yama grubunun direnç değerlerinde azalma gözlenmiştir (p****). Ancak 14. gün sonunda S-Hibrit ve Kontrol grubu arasında istatiksel anlamlı bir farklılık yoktur. Direnç değerlerindeki azalma aynı zamanda doğru orantılı olarak iletkenlikteki artışı ifade eder ve sonuçlardaki azalma doğrudan malzemedeki hücrenin proliferasyonuna bağlı olarak iletkenlik değerlerinin artışı ile ilgilidir. Hücrelerin sayısındaki artışa ve hücreler arası köprülerin kurulmasına bağlı olarak S-Kompozit kardiyak yamaları değerlendirildiğinde malzemenin 4. günden 14. güne iletkenlik değerlerinde artış gözlenmiştir (p****). Kontrol grubunda da benzer bir artış gözlenmiş ancak bu grup S-Kompozit kardiyak yama

grubu ile kıyaslandığında kompozit yapı hücre ile etkileşiminde elektriksel akımın artışı sağlanmıştır (p****). Benzer şekilde S-Hibrit kardiyak yama grubu S-Kompozit kardiyak yama grubu ile kıyaslandığında ise kompozit yapı hücre ile etkileşiminde elektriksel akımın artışı sağladığı tekrar gösterilmiştir (p****). S-Hibrit kardiyak yama grubunun 4. ve 14. arasındaki iletkenlik değerindeki azalma (*) hibrit yapının sapma değerlerinin yüksek olması ile ilişkilidir. Bu durum dikkate alınmamış iletkenliğin esas etkisi gruplar arası farklılıklar kıyaslanarak değerlendirilmiştir.

4.8.4. Kültür Çalışmalarının Değerlendirmesi

Tez çalışmasının son aşamasında özet olarak elde edilen hibrit ve kompozit kardiyak yamalar insan kardiyomiyosit hücreleri ile tekrar hücrelendirilmiş ve statik koşullar altında *in vitro* kültürü gerçekleştirilmiştir. Hücrelerin davranışları belirlenen günler sonunda ayrıntılı olarak incelenmiştir. Ardından tüm kardiyak yamalar reselüerize edilerek mekanik sitümülasyona maruz bırakılmış ve 14 gün boyunca izlenmiştir. Belirlenen gün sonlarında hücre davranışları incelenmiş ve elde edilen tüm sonuçlar statik koşullar ile kıyaslanmıştır.

Dinamik kültür çalışmalarında uygulanacak mekanik stimülasyonun belirlenmesinde literatürde uygulanan mekanik çalışmalar (çekme yüzdesi, frekans değeri gibi) göz önünde bulundurulmuştur [169-174]. SkCO₂ uygulamasıyla elde edilen hibrit ve kompozit kardiyak yamalar dinamik koşulların uygulanmasında mekanik özellikleri nedeniyle başarısız olmuş ve bu nedenle değerlendirmeye alınmamıştır. Hücre canlılığının, hücre metabolik aktivitesinin ve GAG miktarının değerlendirilmesinde genel olarak dinamik koşullar hücresel oluşumu pozitif yönde desteklemiş ve katkı sağlamıştır. KNT katkısının hücre davranışlarında önemli bir katkısı görülmemiş ancak dinamik koşullar altında iletken kardiyak yamaların bu davranışı iyileştirdiği görülmüştür. Buna göre, kalbin sistol ve diyastol durumlarına bağlı olarak yapısal olarak uğradığı sürekli-mekanik uyarı altında, elde edilen kompozit yapıların hücre yapışmasını ve çoğalmasını desteklediği ortaya konmuştur.

Gerçekleştirilen gen ifadesi analizlerinde hibrit kardiyak yama grupları için iki farklı gen ifadesi tespit edilmiştir. Bunlardan biri hücreler arası ilişkilerden ve senkronize kardiyak

kasılmayı düzenlemekten sorumlu olan GJAI'dır. GJAI, kardiyomiyositler arasında elektrik sinyallerini iletmekten sorumlu bir bağlantı proteini olan Konneksin-43'e kopyalanır [175, 176]. Elde edilen sonuçlarda, S-Hibrit kardiyak yama gruplarında mekanik stimülasyonun yapıdaki bu genin ekspresyonunu arttırdığını açıkça ortaya koymuştur. Bu durum ile aynı zamanda mekanik uyarımın kardiyomiyositlere gerilim kuvvetini uygun şekilde aktarıldığını ifade eder. Özetle, mekanik uyarım gen ifadesinin düzeyini arttırmıştır. Diğer bir gen grubu olan ACTN1 (sarkomerik aktinin),k kardiyomiyosit olgunlaşmasının ifadesidir [177]. ACTN1 gen ifadesinin dinamik koşullardaki artışı kardiyomiyosit olgunlaşmasının yetişkin bir fenotipe doğru farklılaştığını doğrular. Bunların aksine, kompozit kardiyak yapılarıdaki gen ifadelerinin tespit edilememesi kompozit yapının mekanik uyarımı kardiyomiyositlere düzgün bir şekilde aktaramadığından kaynaklandığı düşünülmektedir. Aynı zamanda gen ekspresyon analizlerinin kültürün erken döneminde yapılması gen ifadelerinin tespit edilememesinde diğer bir faktör olarak değerlendirilmiştir. Bu çalışmanın aksine, uygulanacak mekanik stimülasyonun koşullarının değiştirilmesi (daha düşük veya daha yüksek frekanslar gibi) ve kültür sürelerinin uzatılması bu genlerin ifade düzeylerini etkileyebilir.

Son aşamada elektriksel iletkenliğin *in vitro* ortamdaki etkisine ilk olarak transwell sistemle bakılmış ancak hücreler transwell yüzeyini tamamıyla kaplamaması nedeniyle anlamlı bir bulgu elde edilememiştir. Buna alternatif olarak literatür çalışmaları baz alınarak başka bir sistem tasarlanmış ve böylece reselülerize malzemelerin iletkenlik özellikleri daha ayrıntılı bir şekilde incelenmiştir [178-182]. Bu sisteme göre malzemenin akım ve direnç değerleri elde edilmiş ve böylece yapıların iletkenlik değerleri hesaplanmıştır. Reselülerize kompozit yapılar hibrit yapıların aksine hücresel anlamda iletkenliği desteklediği gözlenmiştir.

5. YORUM

Gerçekleştirilen tez çalışması kapsamında kalp kası onarımına yönelik olarak yenilikçi sentetik/deselülerize hibrit ve kompozit yamalar hazırlanmış; kimyasal, yapısal ve nano-/makro- mekanik açılardan karakterize edilmiş ve elektriksel/mekanik olarak kardiyomiyositler varlığında statik ve dinamik kültürlerde *in vitro* performansları incelenmiştir. Tez çalışmasında elde edilen genel sonuçlar şu şekilde özetlenebilir:

- ✓ Sığır kalbi miyokard doku tabakasının sol ventriküler duvarından radyal kesitler alınmış ve bu kesitlere SDS ajanı ve enzimlerle kombine edilmiş konvansiyonel yöntem ile süperkritik CO₂ akışkan uygulaması ile iki farklı deselülerizasyon yöntemi uygulanmıştır. Tez çalışmasının bu kısmında, konvansiyonel deselülerizasyon metodlarına ek olarak süperkritik CO₂ sistemlerinin deselülerizasyonda başarısı ortaya koymuştur. Miyokard doku deselülerizasyonu için bu yöntem solvent/çözücü sistemleri değiştirilerek ve optimize edilerek geliştirilmeye açıktır.
- ✓ Deselülerizasyon işleminin ardından elde edilen greftler başarılı bir şekilde elastomer/matriks birleşimi ile hibrit formlara dönüştürülmüş ve deselülerizasyonun ESM'deki yıkıcı etkisinin polimer sistemler ile mekanik olarak iyileştirilmeye açık olduğu ortaya konmuştur. Dokunun ESM componentlerini koruyarak elde edilen bu tür hibrit yapıların farklı polimer tipleri ile elde edilebileceği gösterilmiştir.
- ✓ Hibrit yapılara karbon nanotüpler katılanmış ve böylece miyokard doku eşlenikleri için esneme kabiliyeti yüksek, iletken ve hücre etkileşimlerini destekleyen kompozit formların geliştirilmeye açık olduğu gösterilmiştir.
- ✓ Elde edilen kardiyak yamalar insan kardiyomiyosit hücreleri ile reselülerize edilmiş ve malzeme-hücre etkileşimleri statik koşullarda ayrıntılı olarak incelenmiştir. Bu aşamada özellikle kompozit yapıların hücre davranışı üzerindeki olumlu etkileri açıkça ortaya konulmuştur.
- ✓ Son olarak elde edilen kardiyak yamalar insan kardiyomiyosit hücreleri ile reselülerize edilmiş ve mekanik uyarmı altında hücre kültürü çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu aşamada, süperkritik CO₂ akışkan uygulaması ile edilen matriksler aracılığıyla sentezlenmiş hibrit ve kompozit formların elastik özelliklerini kaybetmelerinden ötürü uygulanan mekanik uyarımda başarısız oldukları bildirilmiştir. Hibritleştirme sürecinde karşılaşılan bu tür sorunlar solvent tipi değiştirilerek tekrar optimize edilmeye açıktır. Bu sebeple, konvansiyonel yöntemlerle elde edilmiş hibrit ve kompozit yapıların dinamik kültürleri

gerçekleştirilmiş ve hücre-malzeme etkileşimleri incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar statik kültürün malzeme üzerindeki etkisiyle detaylı olarak kıyaslanmıştır. Genel sonuç olarak, kompozit yapıların hücre davranışı üzerindeki etkilerinin yanı sıra mekanik uyarımın da hücre davranışı üzerindeki olumlu etkileri ortaya konmuştur.

Yapılan tez çalışmasının bulgularıyla literatüre miyokard doku rejenerasyonu için hibrit ve kompozit yapı olmak üzere iki farklı yapıda kardiyak yama sunulmuştur. Çalışmanın deselülerizasyon aşamasında elde edilen sonuçları süperkritik CO₂ akışkan sisteminin miyokard dokuda 2 mm kalınlığa kadar uygulanabilir olduğu gösterilmiştir. Daha kompakt yapılar için bu yöntem solvent/çözücü sistemleri değiştirilerek ve optimize edilerek geliştirilmeye açıktır. Ayrıca, süperkritik CO₂ akışkan sistemiyle yapılan deselülerizasyon işleminin vucudün çeşitli dokularında ESM'ye en az hasarı verecek şekilde uygulanabilir olduğu aşıkardır. Deselülerize doku iskelesine kazandırılan elastomerik özellik, esnemeye ve mekanik olarak iyileştirilmeye ihtiyaç duyulan diğer yumuşak dokularda da benzer şekilde kazandırılabilir. Daha da önemlisi çalışma sonucunda mekanik olarak iyileştirilmiş, iletkenlik özellik kazandırılmış ve hücre etkileşimlerini destekleyen kompozit yapının avantajları doku mühendisliği alanında daha geniş bir yelpazede uygulanabilir.

6. KAYNAKLAR

- [1] B. Cannon, Cardiovascular disease: Biochemistry to behaviour, *Nature*, 493 (2013) S2-S3.
- [2] H. Jawad, A.R. Lyon, S.E. Harding, N.N. Ali, A.R. Boccaccini, Myocardial tissue engineering, *Br Med Bull*, 87 (2008) 31-47.
- [3] M. Perán, M.A. García, E. Lopez-Ruiz, G. Jiménez, J.A. Marchal, How can nanotechnology help to repair the body? Advances in cardiac, skin, bone, cartilage and nerve tissue regeneration, *Materials*, 6 (2013) 1333-1359.
- [4] D. Dippold, M. Tallawi, S. Tansaz, J. Roether, A. Boccaccini, Novel electrospun poly (glycerol sebacate)–zein fiber mats as candidate materials for cardiac tissue engineering, *European Polymer Journal*, 75 (2016) 504-513.
- [5] F. Guilak, D.L. Butler, S.A. Goldstein, F.P. Baaijens, Biomechanics and mechanobiology in functional tissue engineering, *J Biomech*, 47 (2014) 1933-1940.
- [6] M. Guvendiren, J.A. Burdick, Engineering synthetic hydrogel microenvironments to instruct stem cells, *Current opinion in biotechnology*, 24 (2013) 841-846.
- [7] Y. Haraguchi, T. Shimizu, M. Yamato, T. Okano, Concise review: cell therapy and tissue engineering for cardiovascular disease, *Stem Cells Translational Medicine*, 1 (2012) 136-141.
- [8] J. Leor, S. Cohen, Myocardial tissue engineering: creating a muscle patch for a wounded heart, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1015 (2004) 312-319.
- [9] Y. Wang, G.A. Ameer, B.J. Sheppard, R. Langer, A tough biodegradable elastomer, *Nature biotechnology*, 20 (2002) 602-606.
- [10] K. Yang, J. Zhang, X. Ma, Y. Ma, C. Kan, H. Ma, Y. Li, Y. Yuan, C. Liu, β -Tricalcium phosphate/poly (glycerol sebacate) scaffolds with robust mechanical property for bone tissue engineering, *Materials Science and Engineering: C*, 56 (2015) 37-47.
- [11] A.J. Weinhaus, K.P. Roberts, Anatomy of the Human Heart, in: P.A. Iaizzo (Ed.) *Handbook of Cardiac Anatomy, Physiology, and Devices*, Humana Press, Totowa, NJ, 2005, pp. 51-79.
- [12] F. Saremi, D. Sánchez-Quintana, S. Mori, H. Muresian, D.E. Spicer, C. Hassani, R.H. Anderson, Fibrous Skeleton of the Heart: Anatomic Overview and Evaluation of Pathologic Conditions with CT and MR Imaging, *Radiographics*, 37 (2017) 1330-1351.
- [13] A. Arackal, K. Alsayouri, Histology, Heart, StatPearls [Internet], (2020).

- [14] S.K. Gollapudi, J.J. Michael, M. Chandra, Striated Muscle Dynamics, Reference Module in Biomedical Sciences, Elsevier 2014.
- [15] A. Çelik, Kardiyak Yapılar, www.aritmirehberi.com/kardiyak-yapilar, (Erişim Tarihi 6 Kasım 2021).
- [16] K.T. Weber, Y. Sun, S.C. Tyagi, J.P. Cleutjens, Collagen network of the myocardium: function, structural remodeling and regulatory mechanisms, *Journal of molecular and cellular cardiology*, 26 (1994) 279-292.
- [17] K.T. Weber, Fibrosis and hypertensive heart disease, *Current opinion in cardiology*, 15 (2000) 264-272.
- [18] F. Farhadian, F. Contard, A. Corbier, A. Barrieux, L. Rappaport, J.L. Samuel, Fibronectin expression during physiological and pathological cardiac growth, *Journal of molecular and cellular cardiology*, 27 (1995) 981-990.
- [19] K.T. Weber, Cardioreparation in hypertensive heart disease, *Hypertension*, 38 (2001) 588-591.
- [20] P. Assayag, F. Carre, B. Chevalier, C. Delcayre, P. Mansier, B. Swynghedauw, Compensated cardiac hypertrophy: arrhythmogenicity and the new myocardial phenotype. I. Fibrosis, *Cardiovascular research*, 34 (1997) 439-444.
- [21] M. Arnal-Pastor, J. Carlos Chachques, A. Vallés-Lluch, M. Monleón Pradas, Chapter Biomaterials for Cardiac Tissue Engineering, (2013).
- [22] F. Zannad, N. Agrinier, F. Alla, Heart failure burden and therapy, *Europace*, 11 (2009) v1-v9.
- [23] R.K. Wexler, T. Elton, A. Pleister, D. Feldman, Cardiomyopathy: an overview, *Am Fam Physician*, 79 (2009) 778-784.
- [24] B.J. Maron, J.A. Towbin, G. Thiene, C. Antzelevitch, D. Corrado, D. Arnett, A.J. Moss, C.E. Seidman, J.B. Young, Contemporary Definitions and Classification of the Cardiomyopathies, *Circulation*, 113 (2006) 1807-1816.
- [25] O. Özdemir, Kardiyomiyopati ve Tedavisi, drosmanozdemir.com/kardiyomiyopati-ve-tedavisi, (Erişim tarihi: 5 Kasım 2021).
- [26] M. Radisic, G. Vunjak-Novakovic, Cardiac tissue engineering, *JOURNAL-SERBIAN CHEMICAL SOCIETY*, 70 (2005) 541.
- [27] J.R. Venugopal, M.P. Prabhakaran, S. Mukherjee, R. Ravichandran, K. Dan, S. Ramakrishna, Biomaterial strategies for alleviation of myocardial infarction, *Journal of the Royal Society Interface*, 9 (2012) 1-19.

- [28] O. Bergmann, R.D. Bhardwaj, S. Bernard, S. Zdunek, F. Barnabé-Heider, S. Walsh, J. Zupicich, K. Alkass, B.A. Buchholz, H. Druid, Evidence for cardiomyocyte renewal in humans, *Science*, 324 (2009) 98-102.
- [29] P.K. Nguyen, J.-W. Rhee, J.C. Wu, Adult stem cell therapy and heart failure, 2000 to 2016: a systematic review, *JAMA cardiology*, 1 (2016) 831-841.
- [30] S. Pascual-Gil, E. Garbayo, P. Díaz-Herráez, F. Prosper, M.J. Blanco-Prieto, Heart regeneration after myocardial infarction using synthetic biomaterials, *J Control Release*, 203 (2015) 23-38.
- [31] S.Y. Liao, C.W. Siu, Y. Liu, Y. Zhang, W.S. Chan, E.X. Wu, Y. Wu, J.M. Nicholls, R.A. Li, M.E. Benser, S.P. Rosenberg, E. Park, C.P. Lau, H.F. Tse, Attenuation of left ventricular adverse remodeling with epicardial patching after myocardial infarction, *J Card Fail*, 16 (2010) 590-598.
- [32] Y. Enomoto, J.H. Gorman, 3rd, S.L. Moainie, B.M. Jackson, L.M. Parish, T. Plappert, A. Zeeshan, M.G. St John-Sutton, R.C. Gorman, Early ventricular restraint after myocardial infarction: extent of the wrap determines the outcome of remodeling, *Ann Thorac Surg*, 79 (2005) 881-887; discussion 881-887.
- [33] C.T. Klodell, Jr., J.M. Aranda, Jr., D.C. McGiffin, B.K. Rayburn, B. Sun, W.T. Abraham, W.E. Pae, Jr., J.P. Boehmer, H. Klein, C. Huth, Worldwide surgical experience with the Paracor HeartNet cardiac restraint device, *J Thorac Cardiovasc Surg*, 135 (2008) 188-195.
- [34] J.J. Pilla, A.S. Blom, D.J. Brockman, V.A. Ferrari, Q. Yuan, M.A. Acker, Passive ventricular constraint to improve left ventricular function and mechanics in an ovine model of heart failure secondary to acute myocardial infarction, *J Thorac Cardiovasc Surg*, 126 (2003) 1467-1476.
- [35] A. Olsson, F. Bredin, A. Franco-Cereceda, Echocardiographic findings using tissue velocity imaging following passive containment surgery with the Acorn CorCap cardiac support device, *Eur J Cardiothorac Surg*, 28 (2005) 448-453.
- [36] A. Shafy, T. Fink, V. Zachar, N. Lila, A. Carpentier, J.C. Chachques, Development of cardiac support bioprotheses for ventricular restoration and myocardial regeneration, *Eur J Cardiothorac Surg*, 43 (2013) 1211-1219.
- [37] T. Shimizu, M. Yamato, A. Kikuchi, T. Okano, Cell sheet engineering for myocardial tissue reconstruction, *Biomaterials*, 24 (2003) 2309-2316.
- [38] A. Alcon, E.C. Bozkulak, Y. Qyang, Regenerating functional heart tissue for myocardial repair, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 69 (2012) 2635-2656.

- [39] A. Furuta, S. Miyoshi, Y. Itabashi, T. Shimizu, S. Kira, K. Hayakawa, N. Nishiyama, K. Tanimoto, Y. Hagiwara, T. Satoh, Pulsatile cardiac tissue grafts using a novel three-dimensional cell sheet manipulation technique functionally integrates with the host heart, *in vivo*, *Circulation research*, 98 (2006) 705-712.
- [40] G. Vunjak-Novakovic, K.O. Lui, N. Tandon, K.R. Chien, Bioengineering heart muscle: a paradigm for regenerative medicine, *Annual review of biomedical engineering*, 13 (2011) 245-267.
- [41] Y. Haraguchi, T. Shimizu, M. Yamato, A. Kikuchi, T. Okano, Electrical coupling of cardiomyocyte sheets occurs rapidly via functional gap junction formation, *Biomaterials*, 27 (2006) 4765-4774.
- [42] T. Shimizu, H. Sekine, J. Yang, Y. Isoi, M. Yamato, A. Kikuchi, E. Kobayashi, T. Okano, Polysurgery of cell sheet grafts overcomes diffusion limits to produce thick, vascularized myocardial tissues, *The FASEB journal*, 20 (2006) 708-710.
- [43] M. Habib, K. Shapira-Schweitzer, O. Caspi, A. Gepstein, G. Arbel, D. Aronson, D. Seliktar, L. Gepstein, A combined cell therapy and in-situ tissue-engineering approach for myocardial repair, *Biomaterials*, 32 (2011) 7514-7523.
- [44] S.T. Wall, J.C. Walker, K.E. Healy, M.B. Ratcliffe, J.M. Guccione, Theoretical impact of the injection of material into the myocardium: a finite element model simulation, *Circulation*, 114 (2006) 2627-2635.
- [45] O. Schussler, J.C. Chachques, T.G. Mesana, E.J. Suuronen, Y. Lecarpentier, M. Ruel, 3-dimensional structures to enhance cell therapy and engineer contractile tissue, *Asian Cardiovascular and Thoracic Annals*, 18 (2010) 188-198.
- [46] F. Wang, J. Guan, Cellular cardiomyoplasty and cardiac tissue engineering for myocardial therapy, *Advanced drug delivery reviews*, 62 (2010) 784-797.
- [47] H.-D. Guo, H.-J. Wang, Y.-Z. Tan, J.-H. Wu, Transplantation of marrow-derived cardiac stem cells carried in fibrin improves cardiac function after myocardial infarction, *Tissue Engineering Part A*, 17 (2011) 45-58.
- [48] T.P. Martens, A.F. Godier, J.J. Parks, L.Q. Wan, M.S. Koeckert, G.M. Eng, B.I. Hudson, W. Sherman, G. Vunjak-Novakovic, Percutaneous cell delivery into the heart using hydrogels polymerizing in situ, *Cell transplantation*, 18 (2009) 297-304.
- [49] J.H. Ryu, I.-K. Kim, S.-W. Cho, M.-C. Cho, K.-K. Hwang, H. Piao, S. Piao, S.H. Lim, Y.S. Hong, C.Y. Choi, Implantation of bone marrow mononuclear cells using injectable fibrin matrix enhances neovascularization in infarcted myocardium, *Biomaterials*, 26 (2005) 319-326.

- [50] V. Chekanov, M. Akhtar, G. Tchekanov, G. Dangas, M.Z. Shehzad, F. Tio, M. Adamian, A. Colombo, G. Roubin, M.B. Leon, Transplantation of autologous endothelial cells induces angiogenesis, *Pacing and clinical electrophysiology*, 26 (2003) 496-499.
- [51] A. Chenite, C. Chaput, D. Wang, C. Combes, M. Buschmann, C. Hoemann, J. Leroux, B. Atkinson, F. Binette, A. Selmani, Novel injectable neutral solutions of chitosan form biodegradable gels in situ, *Biomaterials*, 21 (2000) 2155-2161.
- [52] L.A. Reis, L.L. Chiu, Y. Liang, K. Hyunh, A. Momen, M. Radisic, A peptide-modified chitosan–collagen hydrogel for cardiac cell culture and delivery, *Acta biomaterialia*, 8 (2012) 1022-1036.
- [53] Z. Liu, H. Wang, Y. Wang, Q. Lin, A. Yao, F. Cao, D. Li, J. Zhou, C. Duan, Z. Du, The influence of chitosan hydrogel on stem cell engraftment, survival and homing in the ischemic myocardial microenvironment, *Biomaterials*, 33 (2012) 3093-3106.
- [54] D.M. Nelson, Z. Ma, K.L. Fujimoto, R. Hashizume, W.R. Wagner, Intra-myocardial biomaterial injection therapy in the treatment of heart failure: Materials, outcomes and challenges, *Acta biomaterialia*, 7 (2011) 1-15.
- [55] T. Kofidis, D.R. Lebl, E.C. Martinez, G. Hoyt, M. Tanaka, R.C. Robbins, Novel injectable bioartificial tissue facilitates targeted, less invasive, large-scale tissue restoration on the beating heart after myocardial injury, *Circulation*, 112 (2005) I-173-I-177.
- [56] P. Zhang, H. Zhang, H. Wang, Y. Wei, S. Hu, Artificial matrix helps neonatal cardiomyocytes restore injured myocardium in rats, *Artificial organs*, 30 (2006) 86-93.
- [57] D. Shen, X. Wang, L. Zhang, X. Zhao, J. Li, K. Cheng, J. Zhang, The amelioration of cardiac dysfunction after myocardial infarction by the injection of keratin biomaterials derived from human hair, *Biomaterials*, 32 (2011) 9290-9299.
- [58] J. Yu, Y. Gu, K.T. Du, S. Mihardja, R.E. Sievers, R.J. Lee, The effect of injected RGD modified alginate on angiogenesis and left ventricular function in a chronic rat infarct model, *Biomaterials*, 30 (2009) 751-756.
- [59] S.S. Mihardja, R.E. Sievers, R.J. Lee, The effect of polypyrrole on arteriogenesis in an acute rat infarct model, *Biomaterials*, 29 (2008) 4205-4210.
- [60] K. Cheng, A. Blusztajn, D. Shen, T.-S. Li, B. Sun, G. Galang, T.I. Zarembinski, G.D. Prestwich, E. Marbán, R.R. Smith, Functional performance of human cardiosphere-derived cells delivered in an in situ polymerizable hyaluronan-gelatin hydrogel, *Biomaterials*, 33 (2012) 5317-5324.

- [61] W. Dai, L.E. Wold, J.S. Dow, R.A. Kloner, Thickening of the infarcted wall by collagen injection improves left ventricular function in rats: a novel approach to preserve cardiac function after myocardial infarction, *Journal of the American College of Cardiology*, 46 (2005) 714-719.
- [62] C.A. Thompson, B.A. Nasser, J. Makower, S. Houser, M. McGarry, T. Lamson, I. Pomerantseva, J.Y. Chang, H.K. Gold, J.P. Vacanti, Percutaneous transvenous cellular cardiomyoplasty: a novel nonsurgical approach for myocardial cell transplantation, *Journal of the American College of Cardiology*, 41 (2003) 1964-1971.
- [63] E.J. Suuronen, J.P. Veinot, S. Wong, V. Kapila, J. Price, M. Griffith, T.G. Mesana, M. Ruel, Tissue-engineered injectable collagen-based matrices for improved cell delivery and vascularization of ischemic tissue using CD133+ progenitors expanded from the peripheral blood, *Circulation*, 114 (2006) I-138-I-144.
- [64] Z.-Q. Shao, K. Takaji, Y. Katayama, R. Kunitomo, H. Sakaguchi, Z.-F. Lai, M. Kawasuji, Effects of intramyocardial administration of slow-release basic fibroblast growth factor on angiogenesis and ventricular remodeling in a rat infarct model, *Circulation Journal*, 70 (2006) 471-477.
- [65] A. Iwakura, M. Fujita, K. Kataoka, K. Tambara, Y. Sakakibara, M. Komeda, Y. Tabata, Intramyocardial sustained delivery of basic fibroblast growth factor improves angiogenesis and ventricular function in a rat infarct model, *Heart and vessels*, 18 (2003) 93-99.
- [66] J.M. Singelyn, J.A. DeQuach, S.B. Seif-Naraghi, R.B. Littlefield, P.J. Schup-Magoffin, K.L. Christman, Naturally derived myocardial matrix as an injectable scaffold for cardiac tissue engineering, *Biomaterials*, 30 (2009) 5409-5416.
- [67] M. Okada, T.R. Payne, H. Oshima, N. Momoi, K. Tobita, J. Huard, Differential efficacy of gels derived from small intestinal submucosa as an injectable biomaterial for myocardial infarct repair, *Biomaterials*, 31 (2010) 7678-7683.
- [68] Z.-Q. Zhao, J.D. Puskas, D. Xu, N.-P. Wang, M. Mosunjac, R.A. Guyton, J. Vinten-Johansen, R. Matheny, Improvement in cardiac function with small intestine extracellular matrix is associated with recruitment of C-kit cells, myofibroblasts, and macrophages after myocardial infarction, *Journal of the American College of Cardiology*, 55 (2010) 1250-1261.
- [69] K.L. Fujimoto, Z. Ma, D.M. Nelson, R. Hashizume, J. Guan, K. Tobita, W.R. Wagner, Synthesis, characterization and therapeutic efficacy of a biodegradable,

thermoreponsive hydrogel designed for application in chronic infarcted myocardium, *Biomaterials*, 30 (2009) 4357-4368.

[70] Z. Li, X. Guo, S. Matsushita, J. Guan, Differentiation of cardiosphere-derived cells into a mature cardiac lineage using biodegradable poly(N-isopropylacrylamide) hydrogels, *Biomaterials*, 32 (2011) 3220-3232.

[71] S. Dobner, D. Bezuidenhout, P. Govender, P. Zilla, N. Davies, A synthetic non-degradable polyethylene glycol hydrogel retards adverse post-infarct left ventricular remodeling, *Journal of cardiac failure*, 15 (2009) 629-636.

[72] T. Wang, X.-J. Jiang, Q.-Z. Tang, X.-Y. Li, T. Lin, D.-Q. Wu, X.-Z. Zhang, E. Okello, Bone marrow stem cells implantation with α -cyclodextrin/MPEG-PCL-MPEG hydrogel improves cardiac function after myocardial infarction, *Acta Biomaterialia*, 5 (2009) 2939-2944.

[73] G.C. Engelmayr, Jr., M. Cheng, C.J. Bettinger, J.T. Borenstein, R. Langer, L.E. Freed, Accordion-like honeycombs for tissue engineering of cardiac anisotropy, *Nat Mater*, 7 (2008) 1003-1010.

[74] P.-H. Kim, J.-Y. Cho, Myocardial tissue engineering using electrospun nanofiber composites, *BMB Rep*, 49 (2016) 26-36.

[75] Y. Lin, H. Lin, M. Ramamoorthi, D.T. Wu, Z. Zhang, S.D. Tran, 21 - Scaffolds for temporomandibular joint disc engineering, in: M. Mozafari, F. Sefat, A. Atala (Eds.) *Handbook of Tissue Engineering Scaffolds: Volume One*, Woodhead Publishing 2019, pp. 437-455.

[76] D.W. Hutmacher, T.B.F. Woodfield, P.D. Dalton, Chapter 10 - Scaffold Design and Fabrication, in: C.A.V. Blitterswijk, J. De Boer (Eds.) *Tissue Engineering (Second Edition)*, Academic Press, Oxford, 2014, pp. 311-346.

[77] I. Khan, A. Elhissi, M. Shah, M.A. Alhnan, W. Ahmed, 9 - Liposome-based carrier systems and devices used for pulmonary drug delivery, in: J.P. Davim (Ed.) *Biomaterials and Medical Tribology*, Woodhead Publishing 2013, pp. 395-443.

[78] K.H. Tan, C.K. Chua, K.F. Leong, C.M. Cheah, W.S. Gui, W.S. Tan, F.E. Wiria, Selective laser sintering of biocompatible polymers for applications in tissue engineering, *Bio-Medical Materials and Engineering*, 15 (2005) 113-124.

[79] A. Atmanli, I.J. Domian, Generation of aligned functional myocardial tissue through microcontact printing, *J Vis Exp*, (2013) e50288-e50288.

- [80] H. Park, M. Radisic, J.O. Lim, B.H. Chang, G. Vunjak-Novakovic, A novel composite scaffold for cardiac tissue engineering, *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal*, 41 (2005) 188-196.
- [81] A. Callegari, S. Bollini, L. Iop, A. Chiavegato, G. Torregrossa, M. Pozzobon, G. Gerosa, P. De Coppi, N. Elvassore, S. Sartore, Neovascularization induced by porous collagen scaffold implanted on intact and cryoinjured rat hearts, *Biomaterials*, 28 (2007) 5449-5461.
- [82] Z. Xiang, R. Liao, M.S. Kelly, M. Spector, Collagen-GAG scaffolds grafted onto myocardial infarcts in a rat model: a delivery vehicle for mesenchymal stem cells, *Tissue Eng*, 12 (2006) 2467-2478.
- [83] J.C. Chachques, J.C. Trainini, N. Lago, O.H. Masoli, J.L. Barisani, M. Cortes-Morichetti, O. Schussler, A. Carpentier, Myocardial assistance by grafting a new bioartificial upgraded myocardium (MAGNUM clinical trial): one year follow-up, *Cell Transplant*, 16 (2007) 927-934.
- [84] I. Chimenti, G. Rizzitelli, R. Gaetani, F. Angelini, V. Ionta, E. Forte, G. Frati, O. Schussler, A. Barbetta, E. Messina, M. Dentini, A. Giacomello, Human cardiosphere-seeded gelatin and collagen scaffolds as cardiogenic engineered bioconstructs, *Biomaterials*, 32 (2011) 9271-9281.
- [85] Y.C. Yeh, W.Y. Lee, C.L. Yu, S.M. Hwang, M.F. Chung, L.W. Hsu, Y. Chang, W.W. Lin, M.S. Tsai, H.J. Wei, H.W. Sung, Cardiac repair with injectable cell sheet fragments of human amniotic fluid stem cells in an immune-suppressed rat model, *Biomaterials*, 31 (2010) 6444-6453.
- [86] T. Sakai, R.K. Li, R.D. Weisel, D.A. Mickle, E.T. Kim, Z.Q. Jia, T.M. Yau, The fate of a tissue-engineered cardiac graft in the right ventricular outflow tract of the rat, *J Thorac Cardiovasc Surg*, 121 (2001) 932-942.
- [87] J. Leor, S. Aboulaflia-Etzion, A. Dar, L. Shapiro, I.M. Barbash, A. Battler, Y. Granot, S. Cohen, Bioengineered cardiac grafts: A new approach to repair the infarcted myocardium?, *Circulation*, 102 (2000) Iii56-61.
- [88] A. Dar, M. Shachar, J. Leor, S. Cohen, Optimization of cardiac cell seeding and distribution in 3D porous alginate scaffolds, *Biotechnol Bioeng*, 80 (2002) 305-312.
- [89] M. Shachar, O. Tsur-Gang, T. Dvir, J. Leor, S. Cohen, The effect of immobilized RGD peptide in alginate scaffolds on cardiac tissue engineering, *Acta Biomater*, 7 (2011) 152-162.

- [90] Y. Cao, B. Wang, Biodegradation of silk biomaterials, *Int J Mol Sci*, 10 (2009) 1514-1524.
- [91] M.C. Yang, S.S. Wang, N.K. Chou, N.H. Chi, Y.Y. Huang, Y.L. Chang, M.J. Shieh, T.W. Chung, The cardiomyogenic differentiation of rat mesenchymal stem cells on silk fibroin-polysaccharide cardiac patches in vitro, *Biomaterials*, 30 (2009) 3757-3765.
- [92] K.A. Robinson, J. Li, M. Mathison, A. Redkar, J. Cui, N.A. Chronos, R.G. Matheny, S.F. Badylak, Extracellular matrix scaffold for cardiac repair, *Circulation*, 112 (2005) 1135-143.
- [93] A.F. Godier-Furnémont, T.P. Martens, M.S. Koeckert, L. Wan, J. Parks, K. Arai, G. Zhang, B. Hudson, S. Homma, G. Vunjak-Novakovic, Composite scaffold provides a cell delivery platform for cardiovascular repair, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108 (2011) 7974-7979.
- [94] H.J. Wei, C.H. Chen, W.Y. Lee, I. Chiu, S.M. Hwang, W.W. Lin, C.C. Huang, Y.C. Yeh, Y. Chang, H.W. Sung, Bioengineered cardiac patch constructed from multilayered mesenchymal stem cells for myocardial repair, *Biomaterials*, 29 (2008) 3547-3556.
- [95] H.C. Ott, T.S. Matthiesen, S.K. Goh, L.D. Black, S.M. Kren, T.I. Netoff, D.A. Taylor, Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart, *Nat Med*, 14 (2008) 213-221.
- [96] A. Alcon, E. Cagavi Bozkulak, Y. Qyang, Regenerating functional heart tissue for myocardial repair, *Cell Mol Life Sci*, 69 (2012) 2635-2656.
- [97] C.C. Huang, H.J. Wei, Y.C. Yeh, J.J. Wang, W.W. Lin, T.Y. Lee, S.M. Hwang, S.W. Choi, Y. Xia, Y. Chang, H.W. Sung, Injectable PLGA porous beads cellularized by hAFSCs for cellular cardiomyoplasty, *Biomaterials*, 33 (2012) 4069-4077.
- [98] D.A. Stout, B. Basu, T.J. Webster, Poly(lactic-co-glycolic acid): carbon nanofiber composites for myocardial tissue engineering applications, *Acta Biomater*, 7 (2011) 3101-3112.
- [99] O. Ishii, M. Shin, T. Sueda, J.P. Vacanti, In vitro tissue engineering of a cardiac graft using a degradable scaffold with an extracellular matrix-like topography, *J Thorac Cardiovasc Surg*, 130 (2005) 1358-1363.
- [100] H. Piao, J.S. Kwon, S. Piao, J.H. Sohn, Y.S. Lee, J.W. Bae, K.K. Hwang, D.W. Kim, O. Jeon, B.S. Kim, Y.B. Park, M.C. Cho, Effects of cardiac patches engineered with bone marrow-derived mononuclear cells and PGCL scaffolds in a rat myocardial infarction model, *Biomaterials*, 28 (2007) 641-649.

- [101] K.L. Fujimoto, K. Tobita, W.D. Merryman, J. Guan, N. Momoi, D.B. Stolz, M.S. Sacks, B.B. Keller, W.R. Wagner, An elastic, biodegradable cardiac patch induces contractile smooth muscle and improves cardiac remodeling and function in subacute myocardial infarction, *Journal of the American College of Cardiology*, 49 (2007) 2292-2300.
- [102] R. Rai, M. Tallawi, A. Grigore, A.R. Boccaccini, Synthesis, properties and biomedical applications of poly(glycerol sebacate) (PGS): A review, *Progress in Polymer Science*, 37 (2012) 1051-1078.
- [103] M.-C. Lee, R.C. Haut, Strain rate effects on tensile failure properties of the common carotid artery and jugular veins of ferrets, *J Biomech*, 25 (1992) 925-927.
- [104] D. Ozdil, H.M. Aydin, Polymers for medical and tissue engineering applications, *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 89 (2014) 1793-1810.
- [105] M. Vert, S.M. Li, G. Spenlehauer, P. Guerin, Bioresorbability and biocompatibility of aliphatic polyesters, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 3 (1992) 432-446.
- [106] Q.-Z. Chen, A. Bismarck, U. Hansen, S. Junaid, M.Q. Tran, S.E. Harding, N.N. Ali, A.R. Boccaccini, Characterisation of a soft elastomer poly (glycerol sebacate) designed to match the mechanical properties of myocardial tissue, *Biomaterials*, 29 (2008) 47-57.
- [107] Q.Z. Chen, H. Ishii, G.A. Thouas, A.R. Lyon, J.S. Wright, J.J. Blaker, W. Chrzanowski, A.R. Boccaccini, N.N. Ali, J.C. Knowles, S.E. Harding, An elastomeric patch derived from poly(glycerol sebacate) for delivery of embryonic stem cells to the heart, *Biomaterials*, 31 (2010) 3885-3893.
- [108] A. Jean, G.C. Engelmayr, Jr., Finite element analysis of an accordion-like honeycomb scaffold for cardiac tissue engineering, *J Biomech*, 43 (2010) 3035-3043.
- [109] M. Radisic, H. Park, T.P. Martens, J.E. Salazar-Lazaro, W. Geng, Y. Wang, R. Langer, L.E. Freed, G. Vunjak-Novakovic, Pre-treatment of synthetic elastomeric scaffolds by cardiac fibroblasts improves engineered heart tissue, *J Biomed Mater Res A*, 86 (2008) 713-724.
- [110] M. Radisic, H. Park, F. Chen, J.E. Salazar-Lazzaro, Y. Wang, R. Dennis, R. Langer, L.E. Freed, G. Vunjak-Novakovic, Biomimetic approach to cardiac tissue engineering: oxygen carriers and channeled scaffolds, *Tissue Eng*, 12 (2006) 2077-2091.
- [111] A. Jean, G.C. Engelmayr, Jr., Finite element analysis of an accordion-like honeycomb scaffold for cardiac tissue engineering, *J Biomech*, 43 (2010) 3035-3043.

- [112] J.L. Ifkovits, J.J. Devlin, G. Eng, T.P. Martens, G. Vunjak-Novakovic, J.A. Burdick, Biodegradable fibrous scaffolds with tunable properties formed from photo-cross-linkable poly(glycerol sebacate), *ACS Appl Mater Interfaces*, 1 (2009) 1878-1886.
- [113] T.W. Gilbert, T.L. Sellaro, S.F. Badylak, Decellularization of tissues and organs, *Biomaterials*, 27 (2006) 3675-3683.
- [114] Y. Seo, Y. Jung, S.H. Kim, Decellularized heart ECM hydrogel using supercritical carbon dioxide for improved angiogenesis, *Acta biomaterialia*, 67 (2018) 270-281.
- [115] K. Sawada, D. Terada, T. Yamaoka, S. Kitamura, T. Fujisato, Cell removal with supercritical carbon dioxide for acellular artificial tissue, *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 83 (2008) 943-949.
- [116] S. Guler, B. Aslan, P. Hosseinian, H.M. Aydin, Supercritical Carbon Dioxide-Assisted Decellularization of Aorta and Cornea, *Tissue Eng Part C Methods*, 23 (2017) 540-547.
- [117] B. Topuz, G. Günal, S. Guler, H.M. Aydin, Use of supercritical CO₂ in soft tissue decellularization, *Methods Cell Biol*, 157 (2020) 49-79.
- [118] S. Chung, H. Kwon, N.P. Kim, Supercritical extraction of decellularized extracellular matrix from porcine adipose tissue as regeneration therapeutics, *J Cosmet Med*, 3 (2019) 86-93.
- [119] Y.T. Chen, H.S. Lee, D.J. Hsieh, S. Periasamy, Y.C. Yeh, Y.P. Lai, Y.W. Tarng, 3D composite engineered using supercritical CO₂ decellularized porcine cartilage scaffold, chondrocytes, and PRP: Role in articular cartilage regeneration, *J Tissue Eng Regen Med*, 15 (2021) 163-175.
- [120] J. Liao, B. Xu, R. Zhang, Y. Fan, H. Xie, X. Li, Applications of decellularized materials in tissue engineering: advantages, drawbacks and current improvements, and future perspectives, *J Mater Chem B*, 8 (2020) 10023-10049.
- [121] S.R. Meyer, B. Chiu, T.A. Churchill, L. Zhu, J.R.T. Lakey, D.B. Ross, Comparison of aortic valve allograft decellularization techniques in the rat, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 79A (2006) 254-262.
- [122] E. Meezan, J.T. Hjelle, K. Brendel, E.C. Carlson, A simple, versatile, nondisruptive method for the isolation of morphologically and chemically pure basement membranes from several tissues, *Life Sciences*, 17 (1975) 1721-1732.
- [123] S.B. Lumpkins, N. Pierre, P.S. McFetridge, A mechanical evaluation of three decellularization methods in the design of a xenogeneic scaffold for tissue engineering the temporomandibular joint disc, *Acta Biomaterialia*, 4 (2008) 808-816.

- [124] J.E. Reing, B.N. Brown, K.A. Daly, J.M. Freund, T.W. Gilbert, S.X. Hsiong, A. Huber, K.E. Kullas, S. Tottey, M.T. Wolf, S.F. Badylak, The effects of processing methods upon mechanical and biologic properties of porcine dermal extracellular matrix scaffolds, *Biomaterials*, 31 (2010) 8626-8633.
- [125] J.E. Brooker, L.B. Camison, M.R. Bykowski, E.T. Hurley, S.S. Yerneni, P.G. Campbell, L.E. Weiss, M.P. Mooney, J. Cray, J.R. Gilbert, G.M. Cooper, J.E. Losee, Reconstruction of a Calvarial Wound Complicated by Infection: Comparing the Effects of Biopatterned Bone Morphogenetic Protein 2 and Vascular Endothelial Growth Factor, *Journal of Craniofacial Surgery*, 30 (2019) 260-264.
- [126] B. Yang, Y. Zhang, L. Zhou, Z. Sun, J. Zheng, Y. Chen, Y. Dai, Development of a porcine bladder acellular matrix with well-preserved extracellular bioactive factors for tissue engineering, *Tissue Eng Part C Methods*, 16 (2010) 1201-1211.
- [127] L.M. Monteiro, F. Vasques-Nóvoa, L. Ferreira, D.S. Nascimento, Restoring heart function and electrical integrity: closing the circuit, *NPJ Regenerative medicine*, 2 (2017) 1-13.
- [128] M. Radisic, H. Park, H. Shing, T. Consi, F.J. Schoen, R. Langer, L.E. Freed, G. Vunjak-Novakovic, Functional assembly of engineered myocardium by electrical stimulation of cardiac myocytes cultured on scaffolds, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101 (2004) 18129-18134.
- [129] T. Dvir, B.P. Timko, M.D. Brigham, S.R. Naik, S.S. Karajanagi, O. Levy, H. Jin, K.K. Parker, R. Langer, D.S. Kohane, Nanowired three-dimensional cardiac patches, *Nature nanotechnology*, 6 (2011) 720-725.
- [130] Y. Ganji, Q. Li, E.S. Quabius, M. Böttner, C. Selhuber-Unkel, M. Kasra, Cardiomyocyte behavior on biodegradable polyurethane/gold nanocomposite scaffolds under electrical stimulation, *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 59 (2016) 10-18.
- [131] C.W. Hsiao, M.Y. Bai, Y. Chang, M.F. Chung, T.Y. Lee, C.T. Wu, B. Maiti, Z.X. Liao, R.K. Li, H.W. Sung, Electrical coupling of isolated cardiomyocyte clusters grown on aligned conductive nanofibrous meshes for their synchronized beating, *Biomaterials*, 34 (2013) 1063-1072.
- [132] N. Baheiraei, H. Yeganeh, J. Ai, R. Gharibi, S. Ebrahimi-Barough, M. Azami, S. Vahdat, H. Baharvand, Preparation of a porous conductive scaffold from aniline pentamer-modified polyurethane/PCL blend for cardiac tissue engineering, *J Biomed Mater Res A*, 103 (2015) 3179-3187.

- [133] D. Kai, M.P. Prabhakaran, G. Jin, S. Ramakrishna, Polypyrrole-contained electrospun conductive nanofibrous membranes for cardiac tissue engineering, *J Biomed Mater Res A*, 99 (2011) 376-385.
- [134] A. Mihic, Z. Cui, J. Wu, G. Vlacic, Y. Miyagi, S.H. Li, S. Lu, H.W. Sung, R.D. Weisel, R.K. Li, A Conductive Polymer Hydrogel Supports Cell Electrical Signaling and Improves Cardiac Function After Implantation into Myocardial Infarct, *Circulation*, 132 (2015) 772-784.
- [135] B. Gorain, H. Choudhury, M. Pandey, P. Kesharwani, M.M. Abeer, R.K. Tekade, Z. Hussain, Carbon nanotube scaffolds as emerging nanoplatform for myocardial tissue regeneration: A review of recent developments and therapeutic implications, *Biomed Pharmacother*, 104 (2018) 496-508.
- [136] S.B. Sinnott, R. Andrews, Carbon Nanotubes: Synthesis, Properties, and Applications, *Critical Reviews in Solid State and Materials Sciences*, 26 (2001) 145-249.
- [137] P. Deng, Z. Xu, J. Li, Simultaneous determination of ascorbic acid and rutin in pharmaceutical preparations with electrochemical method based on multi-walled carbon nanotubes–chitosan composite film modified electrode, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 76 (2013) 234-242.
- [138] N.W. Kam, M. O'Connell, J.A. Wisdom, H. Dai, Carbon nanotubes as multifunctional biological transporters and near-infrared agents for selective cancer cell destruction, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102 (2005) 11600-11605.
- [139] M. Kharaziha, S.R. Shin, M. Nikkhah, S.N. Topkaya, N. Masoumi, N. Annabi, M.R. Dokmeci, A. Khademhosseini, Tough and flexible CNT-polymeric hybrid scaffolds for engineering cardiac constructs, *Biomaterials*, 35 (2014) 7346-7354.
- [140] J. Zhou, J. Chen, H. Sun, X. Qiu, Y. Mou, Z. Liu, Y. Zhao, X. Li, Y. Han, C. Duan, R. Tang, C. Wang, W. Zhong, J. Liu, Y. Luo, M. Mengqiu Xing, C. Wang, Engineering the heart: evaluation of conductive nanomaterials for improving implant integration and cardiac function, *Sci Rep*, 4 (2014) 3733.
- [141] B. Topuz, G. Günal, S. Guler, H.M. Aydin, Use of supercritical CO₂ in soft tissue decellularization, *Methods in cell biology*, 157 (2020) 49-79.
- [142] D.M. Faulk, S.F. Badylak, Natural biomaterials for regenerative medicine applications, *Regenerative Medicine Applications in Organ Transplantation*, (2014) 101-112.
- [143] P.J. Flory, *Principles of polymer chemistry*, Cornell University Press 1953.

- [144] P.J. Flory, Statistical mechanics of swelling of network structures, *The Journal of Chemical Physics*, 18 (1950) 108-111.
- [145] C. Edwards, W. O'Brien Jr, Modified assay for determination of hydroxyproline in a tissue hydrolyzate, *Clinica chimica acta*, 104 (1980) 161-167.
- [146] H. Stegemann, K. Stalder, Determination of hydroxyproline, *Clinica chimica acta*, 18 (1967) 267-273.
- [147] B. Oberwallner, A. Brodarac, Y.H. Choi, T. Saric, P. Anić, L. Morawietz, C. Stamm, Preparation of cardiac extracellular matrix scaffolds by decellularization of human myocardium, *Journal of biomedical materials research Part A*, 102 (2014) 3263-3272.
- [148] Y.-H. Rong, G.-A. Zhang, C. Wang, F.-G. Ning, Quantification of type I and III collagen content in normal human skin in different age groups, *Zhonghua shao shang za zhi= Zhonghua shaoshang zazhi= Chinese journal of burns*, 24 (2008) 51-53.
- [149] X. Wang, J. Chang, T. Tian, B. Ma, Preparation of calcium silicate/decellularized porcine myocardial matrix crosslinked by procyanidins for cardiac tissue engineering, *RSC advances*, 6 (2016) 35091-35101.
- [150] B. Wang, A. Borazjani, M. Tahai, A.L. de Jongh Curry, D.T. Simionescu, J. Guan, F. To, S.H. Elder, J. Liao, Fabrication of cardiac patch with decellularized porcine myocardial scaffold and bone marrow mononuclear cells, *Journal of biomedical materials research Part A*, 94 (2010) 1100-1110.
- [151] U. Sarig, G.C. Au-Yeung, Y. Wang, T. Bronshtein, N. Dahan, F.Y. Boey, S.S. Venkatraman, M. Machluf, Thick acellular heart extracellular matrix with inherent vasculature: a potential platform for myocardial tissue regeneration, *Tissue Engineering Part A*, 18 (2012) 2125-2137.
- [152] F. Di Meglio, D. Nurzynska, V. Romano, R. Miraglia, I. Belviso, A.M. Sacco, V. Barbato, M. Di Gennaro, G. Granato, C. Maiello, Optimization of human myocardium decellularization method for the construction of implantable patches, *Tissue Engineering Part C: Methods*, 23 (2017) 525-539.
- [153] Y. Wang, S. Lu, P. Gabriele, J.J. Harris, Poly (Glycerol Sebacate) in *Tissue Engineering and Regenerative Medicine, Material Matters*, 11 (2016).
- [154] H. Aydin, K. Salimi, Z. Rzayev, E. Pişkin, Microwave-assisted rapid synthesis of poly (glycerol-sebacate) elastomers, *Biomaterials science*, 1 (2013) 503-509.
- [155] L.A. Reis, L.L. Chiu, N. Feric, L. Fu, M. Radisic, Biomaterials in myocardial tissue engineering, *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, 10 (2016) 11-28.

- [156] L.L. Chiu, M. Radisic, Scaffolds with covalently immobilized VEGF and Angiopoietin-1 for vascularization of engineered tissues, *Biomaterials*, 31 (2010) 226-241.
- [157] T. Dvir, A. Kedem, E. Ruvinov, O. Levy, I. Freeman, N. Landa, R. Holbova, M.S. Feinberg, S. Dror, Y. Etzion, Prevascularization of cardiac patch on the omentum improves its therapeutic outcome, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106 (2009) 14990-14995.
- [158] W. Yeong, N. Sudarmadji, H. Yu, C. Chua, K. Leong, S. Venkatraman, Y. Boey, L. Tan, Porous polycaprolactone scaffold for cardiac tissue engineering fabricated by selective laser sintering, *Acta biomaterialia*, 6 (2010) 2028-2034.
- [159] N. Poornejad, J.J. Nielsen, R.J. Morris, J.R. Gassman, P.R. Reynolds, B.L. Roeder, A.D. Cook, Comparison of four decontamination treatments on porcine renal decellularized extracellular matrix structure, composition, and support of renal tubular epithelium cells, *Journal of biomaterials applications*, 30 (2016) 1154-1167.
- [160] J.M. Singelyn, K.L. Christman, Modulation of material properties of a decellularized myocardial matrix scaffold, *Macromolecular bioscience*, 11 (2011) 731-738.
- [161] L. Korn, S. Lyra, D. Rüschen, A. Pugovkin, D. Telyshev, S. Leonhardt, M. Walter, Heart phantom with electrical properties of heart muscle tissue, *Current Directions in Biomedical Engineering*, 4 (2018) 97-100.
- [162] M. Kapnisi, C. Mansfield, C. Marijon, A.G. Guex, F. Perbellini, I. Bardi, E.J. Humphrey, J.L. Puetzer, D. Mawad, D.C. Koutsogeorgis, Auxetic cardiac patches with tunable mechanical and conductive properties toward treating myocardial infarction, *Advanced functional materials*, 28 (2018) 1800618.
- [163] A.I. Hassaballah, M.A. Hassan, A.N. Mardi, M. Hamdi, An inverse finite element method for determining the tissue compressibility of human left ventricular wall during the cardiac cycle, *Plos One*, 8 (2013) e82703.
- [164] S.R. Shin, S.M. Jung, M. Zalabany, K. Kim, P. Zorlutuna, S.b. Kim, M. Nikkhah, M. Khabiry, M. Azize, J. Kong, Carbon-nanotube-embedded hydrogel sheets for engineering cardiac constructs and bioactuators, *ACS nano*, 7 (2013) 2369-2380.
- [165] S. Ahadian, S. Yamada, J. Ramón-Azcón, M. Estili, X. Liang, K. Nakajima, H. Shiku, A. Khademhosseini, T. Matsue, Hybrid hydrogel-aligned carbon nanotube scaffolds to enhance cardiac differentiation of embryoid bodies, *Acta biomaterialia*, 31 (2016) 134-143.

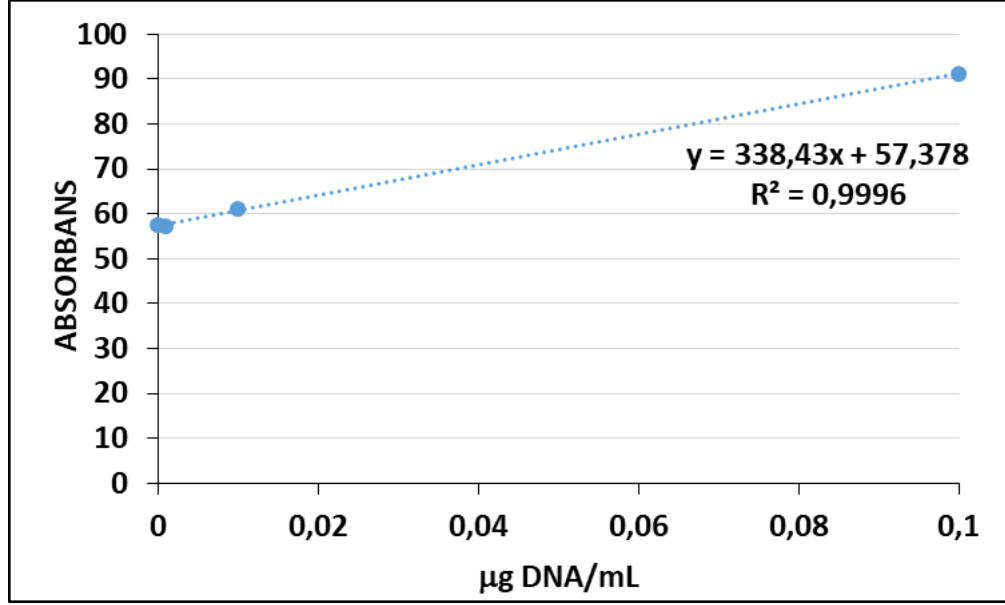
- [166] Y. Li, L. Wei, L. Lan, Y. Gao, Q. Zhang, H. Dawit, J. Mao, L. Guo, L. Shen, L. Wang, Conductive biomaterials for cardiac repair: A review, *Acta Biomaterialia*, (2021).
- [167] J. Ren, Q. Xu, X. Chen, W. Li, K. Guo, Y. Zhao, Q. Wang, Z. Zhang, H. Peng, Y.G. Li, Superaligned carbon nanotubes guide oriented cell growth and promote electrophysiological homogeneity for synthetic cardiac tissues, *Advanced Materials*, 29 (2017) 1702713.
- [168] Q.-Z. Chen, S.E. Harding, N.N. Ali, A.R. Lyon, A.R. Boccaccini, Biomaterials in cardiac tissue engineering: ten years of research survey, *Materials Science and Engineering: R: Reports*, 59 (2008) 1-37.
- [169] T. Hendrickson, C. Mancino, L. Whitney, C. Tsao, M. Rahimi, F. Taraballi, Mimicking cardiac tissue complexity through physical cues: A review on cardiac tissue engineering approaches, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, (2021) 102367.
- [170] P. Akhyari, P.W. Fedak, R.D. Weisel, T.-Y.J. Lee, S. Verma, D.A. Mickle, R.-K. Li, Mechanical stretch regimen enhances the formation of bioengineered autologous cardiac muscle grafts, *Circulation*, 106 (2002) I-137-I-142.
- [171] N.L. Tulloch, V. Muskheli, M.V. Razumova, F.S. Korte, M. Regnier, K.D. Hauch, L. Pabon, H. Reinecke, C.E. Murry, Growth of engineered human myocardium with mechanical loading and vascular coculture, *Circulation research*, 109 (2011) 47-59.
- [172] B.H. Salazar, A.T. Cashion, R.G. Dennis, R.K. Birla, Development of a cyclic strain bioreactor for mechanical enhancement and assessment of bioengineered myocardial constructs, *Cardiovascular engineering and technology*, 6 (2015) 533-545.
- [173] R. Birla, Y. Huang, R. Dennis, Development of a novel bioreactor for the mechanical loading of tissue-engineered heart muscle, *Tissue engineering*, 13 (2007) 2239-2248.
- [174] P. Deniz, S. Guler, E. Çelik, P. Hosseinian, H.M. Aydin, Use of cyclic strain bioreactor for the upregulation of key tenocyte gene expression on Poly (glycerol-sebacate)(PGS) sheets, *Materials Science and Engineering: C*, 106 (2020) 110293.
- [175] V.F. Shimko, W.C. Claycomb, Effect of mechanical loading on three-dimensional cultures of embryonic stem cell-derived cardiomyocytes, *Tissue Engineering Part A*, 14 (2008) 49-58.
- [176] M. Radisic, H. Park, S. Gerecht, C. Cannizzaro, R. Langer, G. Vunjak-Novakovic, Biomimetic approach to cardiac tissue engineering, *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 362 (2007) 1357-1368.

- [177] S. Mehrotra, B.A. de Melo, M. Hirano, W. Keung, R.A. Li, B.B. Mandal, S.R. Shin, Nonmulberry silk based ink for fabricating mechanically robust cardiac patches and endothelialized myocardium-on-a-chip application, *Advanced functional materials*, 30 (2020) 1907436.
- [178] E. Mooney, J.N. Mackle, D.J.-P. Blond, E. O'Cearbhaill, G. Shaw, W.J. Blau, F.P. Barry, V. Barron, J.M. Murphy, The electrical stimulation of carbon nanotubes to provide a cardiomimetic cue to MSCs, *Biomaterials*, 33 (2012) 6132-6139.
- [179] Y. Xia, L.M. Buja, R.C. Scarpulla, J.B. McMillin, Electrical stimulation of neonatal cardiomyocytes results in the sequential activation of nuclear genes governing mitochondrial proliferation and differentiation, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94 (1997) 11399-11404.
- [180] N. Tandon, A. Taubman, E. Cimetta, L. Saccenti, G. Vunjak-Novakovic, Portable bioreactor for perfusion and electrical stimulation of engineered cardiac tissue, 2013 35th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC), IEEE, 2013, pp. 6219-6223.
- [181] H. Nazari, M. Kehtari, I. Rad, B. Ashtari, M.T. Joghataei, Electrical stimulation induces differentiation of human cardiosphere-derived cells (hCDCs) to committed cardiomyocyte, *Molecular and cellular biochemistry*, 470 (2020) 29-39.
- [182] Y. Barash, T. Dvir, P. Tandeitnik, E. Ruvinov, H. Guterman, S. Cohen, Electric field stimulation integrated into perfusion bioreactor for cardiac tissue engineering, *Tissue Engineering Part C: Methods*, 16 (2010) 1417-1426.

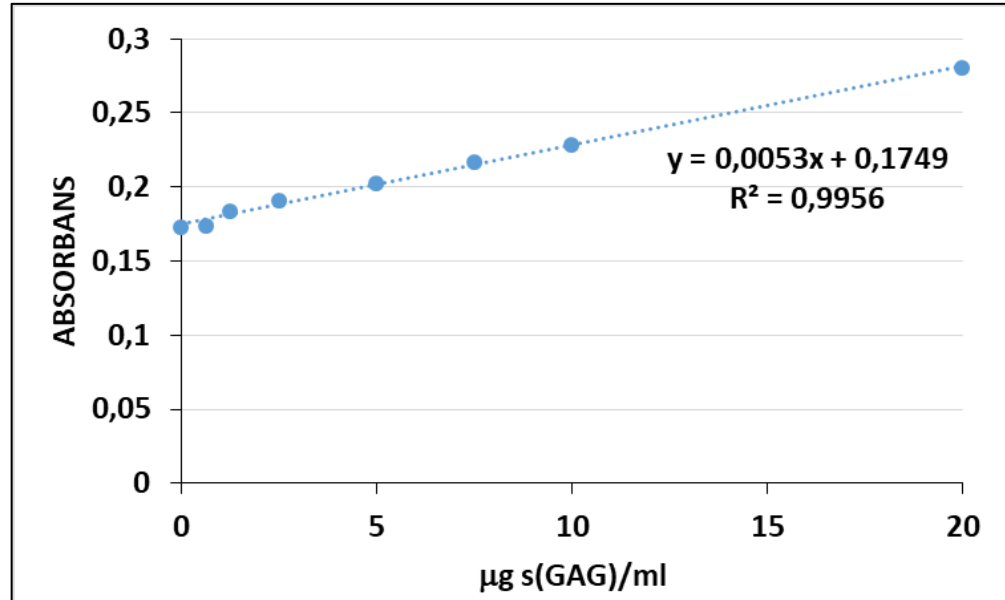
EKLER

EK 1 – Biyokimyasal Analizlerde Kullanılan Standart Grafikleri ve Kalibrasyon Eğrileri

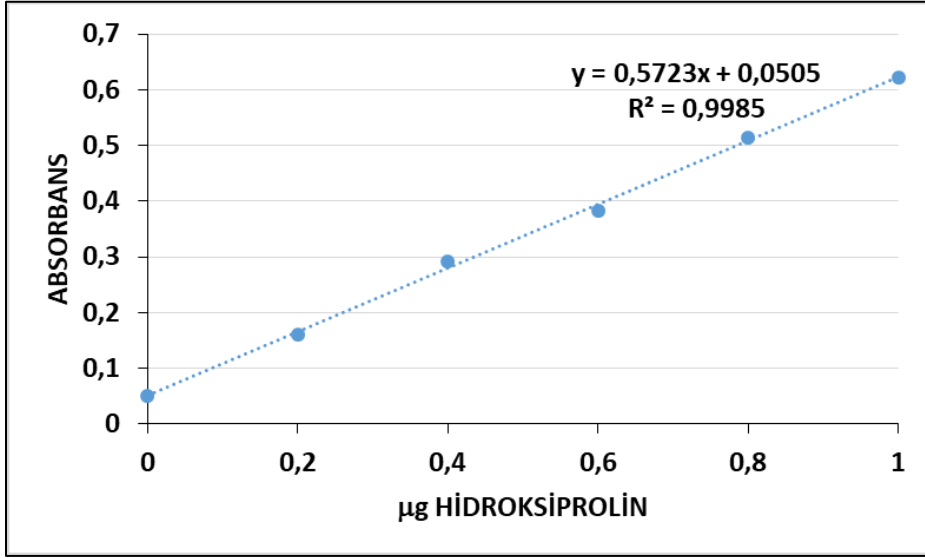
1.1. DNA Kalibrasyon Grafiği ve Kalibrasyon Eğrisi



1.2. Kondroitin Sülfat Kalibrasyon Grafiği ve Kalibrasyon Eğrisi



1.3. Hidroksiprolin Kalibrasyon Grafiği ve Kalibrasyon Eğrisi



EK 2 - Tezden Türetilmiş Yayınlar

Topuz, B., Günel, G., Guler, S., & Aydın, H. M. (2020). Use of supercritical CO₂ in soft tissue decellularization. *Methods in cell biology*, 157, 49-79.

EK 3 - Tezden Türetilmiş Bildiriler

- Günal, G., Tevlek, A., Aydın, H.M., Elastomer Reinforced Decellularized Myocardium Constructs, Poster Sunumu, TERMIS EU 2019 (Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society European Chapter), 27-21 May, Rhodes, Greece, 2019.

