

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**MİYOKARDİYAL HÜCRE DİŞİ MATRİS İLE MODİFİYE EDİLEN  
POLİ(BÜTİLENADİPAT-KO-TEREFTALAT) (PBAT) NANOFİBER  
YAPIDA MEMBRANLARININ KARDİYAK DOKU MÜHENDİSLİĞİNDE  
KULLANIM POTANSİYELİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Ece KARAKAYA**

**KİMYA ANABİLİM DALI**

**ANKARA  
2021**

**Her hakkı saklıdır**

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

### MİYOKARDİYAL HÜCRE DIŞI MATRİS İLE MODİFİYE EDİLEN POLİ(BÜTİLENADİPAT-KO-TEREFTALAT) (PBAT) NANOFİBER YAPIDA MEMBRANLARININ KARDİYAK DOKU MÜHENDİSLİĞİNDE KULLANIM POTANSİYELİNİN ARAŞTIRILMASI

Ece KARAKAYA

Ankara Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Emel EMREGÜL

Elektro eğirme yöntemi ile alifatik-aromatik bir kopoliester olan Poli(bütilenadipat-ko-tereftalat) (PBAT) nanofiberler membranlar oluşturulmuştur. Membranlar, hücrelerinden arındırılmış miyokardiyal hücre dışı matris (ECM) ile modifiye edilmiştir. Geliştirilen biyo-uyumlu ve biyoaktif membran yapıdaki biyomalzemenin kardiyak doku mühendisliğinde kullanım potansiyelinin araştırılmıştır. Nanofiber membranların en uygun morfolojide üretilmesi için uygun elektro-eğirme parametreleri belirlenmiştir. Elektro-eğirme yöntemi ile elde edilen PBAT membranların karakterizasyonu için FTIR (Kızılötesi absorpsiyon spektroskopisi) ve SEM (Taramalı elektron mikroskopisi) yöntemleri kullanılmıştır. Miyokardiyal dokular Trizma Hidroklorür, EDTA (etilen diamintetraasetik asit), SDS (sodyum dodesil sülfat) ve perasetik asit içeren çözelti ile muamele edilmiştir. Hücrelerinden arındırılmış dokular, DNA içerik analizi, glikozaminoglikan (GAG) analizi ve BCA total protein analizi yapılarak karakterize edilmiştir. Dokuların morfolojileri histoloji çalışması ve SEM ile değerlendirilmiştir. Membranların bozunma davranışlarını incelemek için enzimatik bozunma testi uygulanmıştır. Modifiye edilmiş nanofiber PBAT membranlara insan kardiyak hücrelerinin tutunması ve çoğalması incelenmiştir. Bunun için hücresel yaşayabilirlik (MTS) ve Canlı-Ölü hücre canlılığı testi uygulanmıştır. Membranlar üzerinde kültür edilen hücrelerin morfolojileri, yüzeye tutunmaları, yayılmaları immünfloresan boyama ile incelenmiştir.

**Haziran 2021, 72 sayfa**

**Anahtar Kelimeler:** Kardiyak doku mühendisliği, elektro-eğirme, membran, Poli(bütilenadipat-ko-tereftalat) (PBAT), ECM, hücresizleştirme, yapı iskelesi

## ABSTRACT

Master Thesis

### INVESTIGATION OF THE POTENTIAL USE OF POLY(BUTYLENADIPATE-CO-TEREPHTHALATE) (PBAT) NANOFIBER MEMBRANES MODIFIED WITH MYOCARDIAL EXTRACELLULAR MATRIX IN CARDIAC TISSUE ENGINEERING

Ece KARAKAYA

Ankara University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Chemistry

Supervisor: Prof.Dr. Emel EMREGÜL

Poly (butylenediadipate-co-terephthalate) (PBAT) nanofiber membranes, an aliphatic-aromatic copolyester, were formed by electro spinning technique. Membranes have been modified with a myocardial extracellular matrix (ECM). The potential use of the developed biocompatible and bioactive membrane in cardiac tissue engineering has been investigated. Appropriate electrospinning parameters have been determined in order to produce nanofiber membranes with optimum morphology. FTIR (fourier transform infrared spectroscopy) and SEM (Scanning electron microscopy) were used for the characterization of the produced PBAT membranes. Myocardial tissues were treated with solutions containing Trizma Hydrochloride, EDTA (ethylene diaminetetraacetic acid), SDS (sodium dodecyl sulfate) and peracetic acid. Cell-free tissues were characterized by DNA content analysis, glycosaminoglycan (GAG) analysis and BCA total protein analysis. The morphologies of the tissues were evaluated by histological study and SEM. Enzymatic degradation test was applied to examine the degradation behavior of membranes. Adhesion and proliferation of human cardiac cells to modified nanofiber PBAT membranes were studied. For this, cellular viability (MTS) and live-dead cell viability tests were applied. The morphology, attachment and spreading of the cells cultured on the membranes were examined by immunofluorescence staining.

**June 2021, 72 pages**

**Key Words:** Cardiac tissue engineering, electrospinning, membrane, Poly(butylene adipate co-teraphtalate) (PBAT), ECM, decellularization, scaffold

## ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR

Öncelikle çalışmalarımı gerçekleştirmem için bilimsel katkılarını sunan ve imkan sağlayan, desteğini her koşulda hissettiğim, akademik olarak gelişmemde etkisi büyük ve emeği çok olan, akademik başarılarının yanında insani değerlerini her zaman örnek alacağım ve öğrencisi olduğum için gurur duyduğum değerli hocam sayın Prof. Dr. Emel EMREGÜL'e (Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Anabilim Dalı),

Çalışmalarım sırasında bilimsel katkısını, yardımlarını ve manevi desteğini esirgemeyen, birlikte çalışma fırsatı elde ettiğim için kendimi şanslı hissettiğim kıymetli hocalarım Prof. Dr. Kaan EMREGÜL'e (Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Anabilim Dalı), Doç. Dr. Burak DERKUŞ'a (Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Anabilim Dalı), Dr. Öğr. Üyesi Yavuz Emre ARSLAN'a (Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Biyomühendislik Anabilim Dalı), Doç. Dr. Sedat ODABAŞ'a (Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Anabilim Dalı) ve Doç. Dr. Fadime KIRAN'a (Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Anabilim Dalı),

Çalışmalarıyla tez konuma ilham olan, elektro-eğirme tekniğini öğrenme fırsatını sunan, laboratuvarında geçirdiğim süre boyunca bilgisini ve yardımını esirgemeyen değerli hocalarım Prof. Dr. Jean-François GERARD'a ve Prof. Dr. Jannick DUCHET-RUMEAU'ya, (Lyon Üniversitesi, INSA),

Bütün desteklerinden dolayı ve her zaman yanımda oldukları için laboratuvar arkadaşlarım Öğr. Gör. Fulya ÖZDEMİR'e (Ufuk Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu), Melis IŞIK'a, İpek ERTUĞRUL'a, Buse SARI'ya, Rihab Ksouri'ye, Araş. Gör. Aybüke GÜLKAYA'ya (Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Anabilim Dalı), histoloji çalışmalarındaki desteklerinden dolayı Öğr. Gör. Hakan ESKİZENGİN'e (Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Anabilim Dalı),

Hayatım boyunca bütün desteğini hissettiğim, beni her kararında destekleyen, haklarını hiçbir zaman ödeyemeyeceğim aileme göstermiş oldukları sevgi, anlayış ve fedakarlıklardan dolayı,

Bütün kalbimle teşekkürlerimi sunarım.

Ece KARAKAYA  
Ankara, Haziran 2021

## İÇİNDEKİLER

### TEZ ONAYI

|                                                                         |      |
|-------------------------------------------------------------------------|------|
| ETİK.....                                                               | i    |
| ÖZET.....                                                               | ii   |
| ABSTRACT .....                                                          | iii  |
| ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR.....                                                  | iv   |
| SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....                                    | viii |
| ŞEKİLLER DİZİNİ .....                                                   | ix   |
| ÇİZELGELER DİZİNİ .....                                                 | xi   |
| 1. GİRİŞ .....                                                          | 1    |
| 2. KURAMSAL TEMELLER.....                                               | 3    |
| 2.1 Biyomalzemeler .....                                                | 3    |
| 2.1.1 Doğal biyomalzemeler.....                                         | 4    |
| 2.1.1.1 Hücre dışı matris (ECM) .....                                   | 4    |
| 2.1.2 Sentetik biyomalzemeler.....                                      | 6    |
| 2.1.2.1 PBAT Poli(bütilenadipat-ko-tereftalat) yapısı .....             | 7    |
| 2.1.2.2 PBAT Poli (bütilenadipat-ko-tereftalat biyobozunurluğu .....    | 7    |
| 2.1.2.3 PBAT ve doku mühendisliği.....                                  | 8    |
| 2.2 Kardiyak Doku Mühendisliği .....                                    | 9    |
| 2.2.1 Kalbin yapısı ve histolojisi.....                                 | 10   |
| 2.2.2 Kardiyak doku iskelesi üretiminde kullanılan biyomalzemeler ..... | 11   |
| 2.3 Doku İskelesi Üretim Yöntemleri .....                               | 13   |
| 2.3.1 Elektro-eğirme yöntemi .....                                      | 13   |
| 2.3.1.1 Elektro-eğirme yönteminde parametreler .....                    | 14   |
| 2.3.1.2 Elektro-Eğirme için kullanılan polimerler .....                 | 15   |
| 2.4 Hücresizleştirme.....                                               | 16   |
| 2.4.1 ECM hidrojel.....                                                 | 18   |
| 3. KAYNAK ÖZETLERİ .....                                                | 19   |
| 4. MATERYAL ve YÖNTEM.....                                              | 24   |
| 4.1 Materyal .....                                                      | 24   |
| 4.2 Yöntem .....                                                        | 25   |

|                                                                                                     |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.2.1 Elektro eğirme yöntemi ile nanofiber PBAT membranların hazırlanması.....                      | 25 |
| 4.2.2 Karakterizasyon çalışmaları .....                                                             | 26 |
| 4.2.2.1 PBAT Pelletlerinin NMR analizi .....                                                        | 26 |
| 4.2.2.2 PBAT nanofiber membranların FTIR analizi.....                                               | 26 |
| 4.2.2.3 PBAT nanofiber membranların SEM analizi .....                                               | 26 |
| 4.2.2.4 İn vitro degradasyon çalışması .....                                                        | 26 |
| 4.2.3 Hücreleştirilmiş sığır miyokardiyal ECM iskelelerin üretimi.....                              | 27 |
| 4.2.3.1 Hücreleştirilmiş sığır miyokardiyal dokuların nötralizasyonu ve jelleştirilmesi .....       | 27 |
| 4.2.4 Karakterizasyon çalışmaları .....                                                             | 28 |
| 4.2.4.1 Hücreleştirilmiş miyokardiyal dokuların DNA içerik analizi .....                            | 28 |
| 4.2.4.2 Glikozaminoglikan (GAG) içerik analizi .....                                                | 28 |
| 4.2.4.3 BCA Analizi ile protein içeriğinin belirlenmesi.....                                        | 29 |
| 4.2.4.4 Reoloji .....                                                                               | 29 |
| 4.2.5 Histoloji çalışmaları .....                                                                   | 30 |
| 4.2.5.1 Hematoksilen ve eozin boyaması .....                                                        | 31 |
| 4.2.5.2 Masson-trikrom boyaması .....                                                               | 31 |
| 4.2.6 Hücre kültürü çalışmaları .....                                                               | 32 |
| 4.2.7 PBAT nanofiber membranların dECM ile modifiye edilmesi .....                                  | 33 |
| 4.2.7.1 Modifiye edilen PBAT membranların SEM analizi.....                                          | 33 |
| 4.2.8 Hücrelerin modifiye edilmiş PBAT membranların üzerine ekilmesi ve membran optimizasyonu ..... | 33 |
| 4.2.8.1 Hücrelerin çoğalma kapasitelerinin belirlenmesi (MTS analizi).....                          | 34 |
| 4.2.8.2 Canlı/ölü hücre boyama.....                                                                 | 35 |
| 4.2.8.3 İmmünfloresan boyama.....                                                                   | 35 |
| 5.1 Karakterizasyon Çalışmaları .....                                                               | 37 |
| 5.1.1 PBAT pelletlerinin NMR analizi .....                                                          | 37 |
| 5.1.2 PBAT nanofiber membranların hazırlanması ve SEM analizi .....                                 | 38 |
| 5.1.3 İn vitro degradasyon çalışması .....                                                          | 40 |
| 5.2.1 DNA içerik analizi .....                                                                      | 46 |
| 5.2.2 Glikozaminoglikan (GAG) içerik analizi .....                                                  | 47 |
| 5.2.3 BCA (Bikinkoninik asit) total protein analizi.....                                            | 47 |
| 5.2.4 Histolojik boyama .....                                                                       | 48 |

|                                                                    |    |
|--------------------------------------------------------------------|----|
| 5.2.5 Reoloji .....                                                | 50 |
| 5.2.6 PBAT nanofiber membranların dECM ile modifiye edilmesi ..... | 51 |
| 5.2.7 Modifiye edilen PBAT membranın FTIR analizi.....             | 52 |
| 5.3 Hücre Kültür Çalışmaları .....                                 | 53 |
| 6. TARTIŞMA ve SONUÇ .....                                         | 61 |
| KAYNAKLAR .....                                                    | 64 |
| ÖZGEÇMİŞ.....                                                      | 72 |



## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

|    |             |
|----|-------------|
| g  | Gram        |
| mg | Miligram    |
| µg | Mikrogram   |
| µl | Mikrolitre  |
| ng | Nanogram    |
| %  | Yüzde oranı |
| M  | Molar       |
| mM | Milimolar   |
| °C | Santigrat   |

### Kısaltmalar

|                 |                                                          |
|-----------------|----------------------------------------------------------|
| PBAT            | Poli(bütilenadipat-ko-tereftalat)                        |
| ECM             | Hücre Dışı Matris                                        |
| dECM            | Hücre dışılaştırılmış Hücre Dışı Matris                  |
| EDTA            | Etilen Diamin Tetraasetik Asit                           |
| DPBS            | Dulbecco's                                               |
| SDS             | Sodyum Dodesil Sülfat                                    |
| FTIR            | Fourier dönüşümlü kızıl ötesi                            |
| TGA             | Termal gravimetrik analiz                                |
| SEM             | Taramalı elektron mikroskobu                             |
| MTS             | 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolyum bromür |
| GAG             | Glikozaminoglikan                                        |
| HCM             | İnsan Kardiyomiyosit                                     |
| MgCl            | Magnezyum Klorür                                         |
| H&E             | Hematoksilin-Eozin                                       |
| FBS             | Fetal Sığır Serum                                        |
| DMEM            | Dulbecco's Modified Eagle Medium                         |
| DMSO            | Dimetil sülfoksit                                        |
| DAPI            | 4', 6-diamidino-2-fenilindol                             |
| DNA             | Deoksiribonükleik asit                                   |
| dsDNA           | Çift sarmallı dna                                        |
| Pen/Strep       | Penisilin/Streptomisin                                   |
| CO <sub>2</sub> | Karbondioksit                                            |
| HCl             | Hidroklorik Asit                                         |
| NaOH            | Sodyumhidroksit                                          |
| Rpm             | Dakikada Devir                                           |

## ŞEKİLLER DİZİNİ

|                                                                                                                                                                                                                                                            |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 2.1 Hücre dışı matris yapısı (Xue ve Jackson, 2015).....                                                                                                                                                                                             | 5  |
| Şekil 2.2 PBAT'nin kimyasal yapısı (x: bütülen adipat, y :bütülen teraftalat).....                                                                                                                                                                         | 7  |
| Şekil 2.3 Şematik olarak elektro-eğirme sistemi.....                                                                                                                                                                                                       | 13 |
| Şekil 3.1 A) Doğal kalp dokusu B) hücreleştirilmiş kalp dokusu C) doğal kalp dokusunun histoloji görüntüsü D) Hücreleştirilmiş kalp dokusunun histoloji görüntüsü (Pati vd. 2014) .....                                                                    | 19 |
| Şekil 3.2 A) Hücreleştirilmiş kalp dokusunun jel haline getirilmesi B) 3 boyutlu basılan hücreleştirilmiş kalp dokusu, C) 3 boyutlu basılan hücreleştirilmiş kalp dokusunun mikroskopik görüntüleri (Pati vd. 2014).....                                   | 20 |
| Şekil 3. 3 Domuz miyokardiyal dokudan hidrojel eldesi görüntüleri A) Doğal doku, B) SDS ile hücreleştirilmiş miyokardiyal doku, C) Liyofilize edilip öğütülen miyokardiyal doku, D) Pepsin ile sindirilen miyokardiyal doku (Wang ve Christman 2015) ..... | 21 |
| Şekil 5.1 PBAT 1H-NMR analizi .....                                                                                                                                                                                                                        | 37 |
| Şekil 5.2 %5, %7,5 ve %10 (w/w) PBAT membranların SEM görüntüleri.....                                                                                                                                                                                     | 39 |
| Şekil 5.3 Enzimatik degradasyon uygulanan a) %5, b) %7,5, c) %10 (w/w) PBAT membranların 3. hafta SEM görüntüleri (12000x) .....                                                                                                                           | 40 |
| Şekil 5.4 Enzimatik degradasyon uygulanan %7,5 (w/w) PBAT membranların a) 1. hafta b) 3. hafta c) 5. hafta SEM görüntüleri (12000x) .....                                                                                                                  | 41 |
| Şekil 5.5 Kalp dokusundan miyokard bölgesinin ayrılması.....                                                                                                                                                                                               | 42 |
| Şekil 5.6 Farklı boyutlarda kesilen sıgır kalp dokularının SDS ile gerçekleştirilen hücreleştirme işlemi sonrasındaki görüntüleri .....                                                                                                                    | 42 |
| Şekil 5.7 Kalp dokularının hücreleştirme aşamaları.....                                                                                                                                                                                                    | 44 |
| Şekil 5.8 dCECM a) jelleştirilmeden önce b) jelleştirildikten sonra.....                                                                                                                                                                                   | 45 |
| Şekil 5.9 Doğal doku ve hücreleştirilmiş doku için DNA içerik analizi grafiği. n=3 (** p<0.01) .....                                                                                                                                                       | 46 |
| Şekil 5.10 Doğal doku ve hücreleştirilmiş doku için GAG içerik analizi grafiği. n=3 (** p<0.01) .....                                                                                                                                                      | 47 |
| Şekil 5.11 dCECM için protein konsantrasyonunu belirlemede kullanılan standart grafik .....                                                                                                                                                                | 48 |
| Şekil 5.12 İşlem görmemiş kalp dokusu ile hücreleştirme işlemi uygulanmış dokunun Masson Trikróm boyamaları .....                                                                                                                                          | 49 |
| Şekil 5.13 İşlem görmemiş kalp dokusu ile hücreleştirme işlemi uygulanmış dokunun Hematoksilin&Eozin boyamaları.....                                                                                                                                       | 49 |

|                                                                                                                                                                                                                                              |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 5.14 Farklı boyutlarda kesildikten sonra hücresizleştirme işlemi uygulanan dokuların Hematoksilen&Eozin boyama görüntüleri a) Doğal doku b) 1cm3 olarak kesilen hücresiz kalp doku c) Küçük parçalara ayrılan hücresiz kalp doku ..... | 50 |
| Şekil 5.15 dCECM hidrojelinin frekans taraması .....                                                                                                                                                                                         | 51 |
| Şekil 5.16 2,5 mg/mL ve 5 mg/mL miyokardiyal hücre dışı matris ile modifiye edilen %7,5 (w/w) PBAT membranların SEM görüntüleri .....                                                                                                        | 52 |
| Şekil 5.17 Hücresizleştirilmiş ECM ile modifiye edilen ve edilmeyen PBAT membranın FTIR analizi.....                                                                                                                                         | 53 |
| Şekil 5.18 ECM spreyleneceği %5, %7,5 ve %10 (w/w) PBAT membranların 2.gün canlı/ölü hücre boyama görüntüleri.....                                                                                                                           | 54 |
| Şekil 5.19 %5, %7,5 ve %10 (w/w) PBAT membranlar üzerine ekimi yapılan HCM'lerin 2. ve 7. günlerde MTS yöntemi ile belirlenen hücre canlılık oranları (** p<0,05) .....                                                                      | 55 |
| Şekil 5.20 2,5 mg/mL ve 5 mg/mL miyokardiyal ECM (dCECM) ile modifiye edilen %7,5 (w/w) PBAT membran üzerinde HCM'lerin 2.gün canlı/ölü hücre boyama görüntüleri .....                                                                       | 56 |
| Şekil 5.21 %7,5 (w/w) PBAT membran üzerine farklı konsantrasyonlarda miyokardiyal ECM spreylendikten sonra ekimi yapılan HCM'lerin 2.günde MTS yöntemi ile belirlenen hücre canlılık oranları (** p<0,001).....                              | 56 |
| Şekil 5.22 PBAT membranlar üzerinde HCM'lere ait YAP/DAPI boyaması a) %5 PBAT b) %7,5 PBAT c) %10 PBAT .....                                                                                                                                 | 57 |
| Şekil 5.23 %5 (w/w) PBAT membran üzerinde HCM'lere ait $\beta$ -aktin/DAPI boyaması a) $\beta$ -aktin boyaması b) DAPI boyaması c) $\beta$ -aktin/DAPI boyaması d)20x $\beta$ -aktin/DAPI boyaması .....                                     | 58 |
| Şekil 5.24 24 %7,5 (w/w) PBAT membranlara ait $\beta$ -aktin/DAPI boyaması a) $\beta$ -aktin boyaması b) DAPI boyaması c) $\beta$ -aktin/DAPI boyaması d)20x $\beta$ -aktin/DAPI boyaması .....                                              | 58 |
| Şekil 5.25 %10 (w/w) PBAT membran üzerinde HCM'lere ait $\beta$ -aktin/DAPI boyaması a) $\beta$ -aktin boyaması b) DAPI boyaması c) $\beta$ -aktin/DAPI boyaması d)20x $\beta$ -aktin/DAPI boyaması .....                                    | 59 |
| Şekil 5.26 %7,5 (w/w) PBAT membran ve kültür kabı üzerindeki HCM'lerin $\beta$ -aktin/DAPI boyaması.....                                                                                                                                     | 59 |

## ÇİZELGELER DİZİNİ

|                                                                                                                              |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Çizelge 2. 1 Elektrospinning parametrelerindeki değişikliklerin fiber morfolojisi üzerindeki etkisi (Pham QP vd. 2006) ..... | 15 |
| Çizelge 5. 1 Elektro-eğirme işleminde kullanılan parametreler.....                                                           | 38 |



## 1. GİRİŞ

Kardiyovasküler hastalıklar, hala dünyadaki önde gelen ölüm nedenlerinden biridir ve her yıl yaklaşık olarak 18 milyon kişinin ölümüne sebep olur (Virani vd. 2020). Yetişkin bireylerde doğal endojen kardiyak kök hücrelerin bulunmaması nedeniyle, kalp hasarı, aritmi veya ejeksiyon fraksiyonunda önemli bir azalma ile kendini gösteren ve geri dönüşü olmayan akut veya kronik kalp yetmezliğine sebep olmaktadır. Kardiyovasküler hastalıkların mevcut ana tedavisi kalp naklidir (Hernandez vd. 2020). Bununla birlikte, kalp donörlerinin yetersizliği ve cerrahi komplikasyonlar nedeniyle, rejeneratif tıp kaynaklarına büyük ölçüde ihtiyaç duyulmaktadır ve farklı tedavilerin geliştirilmesi gerekmektedir. Biyomalzemeleri kullanan doku mühendisliğinin gelişimi ile birlikte, kalp hastalıkları için umut verici gelişmeler ortaya çıkmaktadır.

Kalp doku mühendisliği uygulamaları ile birlikte hasarlı kalp dokusunun onarılması amaçlanmaktadır ve hücreleştirme tekniği ile üretilen hücre dışı matris (ECM) iskeleler, doku rejenerasyonu amacıyla yapay iskeleler oluşturmak için sıklıkla tercih edilmektedir (Arslan vd. 2015). Bunun yanında, mekanik özellikleri ve biyobozunurlukları sebebiyle PBAT gibi alifatik-aromatik ko-poliesterler, doku mühendisliği uygulamaları için güçlü bir adaydır. Son yıllarda, PBAT bazlı malzemelerle doku mühendisliği alanındaki hücre kültür çalışmaları, PBAT'ın biyoyumlu bir malzeme olduğunu ve çeşitli hücre tiplerinin çoğalmasını desteklediğini göstermektedir (Santana-Melo vd. 2017, Granato vd. 2018).

Elektro-eğirme yöntemiyle elde edilen nanofiber yapıdaki iskelelerin, yüksek gözeneklilikleri, gözeneklerin birbirine bağlanabilirliği ve fiziksel-kimyasal özellikleri sayesinde doku mühendisliğinde çok sayıda potansiyel uygulama alanı mevcuttur. Elektro-eğirme yöntemi ile polimerler, kompozitler ve seramikler gibi çeşitli malzemelerden esnek yapıda nanofiber iskeleler üretilmektedir (Agarwal vd. 2008).

Bu tez çalışmasında elektro-eğirme yöntemiyle elde edilecek PBAT nanofiber morfolojide membranların hücrelerinden arındırılmış miyokardiyal hücre dışı matris

(ECM) ile modifiye edilmesiyle oluşturulacak doku iskelesinin kardiyak doku mühendisliğinde kullanım potansiyeli incelenmiştir.



## 2. KURAMSAL TEMELLER

### 2.1 Biyomalzemeler

Biyomalzemeler, yaralanma veya hastalık sebebiyle işlevini yitirmiş hasarlı dokunun biyolojik işlevini desteklemek, geliştirmek veya değiştirmek amacıyla kullanılmaktadır. Bu malzemeler doğal veya sentetik olabileceği gibi, bunların karışımlarından da elde edilebilmektedir. Metaller, seramikler, plastikler, camlar ve hatta hücre ve dokular da bir biyomalzeme oluşturmak için kullanılabilir.

Doku mühendisliği çalışmaları için kullanılacak olan malzemelerin biyouyumlu olması, bir inflamatuvar yanıtı sebep olmaması, rejenerasyon sırasında mekanik destek sağlaması, rejenerasyon hızıyla eşleşmesi yani bozunma hızı, toksik olmaması ve vücuttan kolayca çıkarılabilmesi, hücre yapışmasını ve hayatta kalmasını sağlaması ve özellikle kalp doku mühendisliği için, miyokardın kasılma hareketine dayanıklı olması ve hatta katkıda bulunması oldukça önemlidir.

Biyomalzemenin yapısı, mimarisi ve çapraz bağlanma derecesi, ECM'nin mekanik özelliklerine benzer olup, hücrelerin yapışması, hayatta kalması, yer değiştirmesi ve farklılaşması gibi çok sayıda hücresel süreci kontrol edebilmelidir (Griffith vd. 2006).

Biyomalzemeler kalp hücrelerinin bağlanabileceği, organize olabileceği, olgunlaşabileceği iskeleler, şablonlar veya hücre transplantasyonu için taşıma araçları olarak işlev görürler (Lanza vd. 2014).

Doku mühendisliği için birçok farklı biyomalzeme kullanılmaktadır ve bunlar doğal olarak türetilmiş malzemeler ve sentetik biyomalzemeler olarak sınıflandırılabilir.

### **2.1.1 Doğal biyomalzemeler**

Doğal biyomalzemeler, hücre proliferasyonu, adezyon ve doğal sağlıklı dokular için toksik olmama gibi doğal biyoaktiviteleri nedeniyle doku mühendisliği açısından önemli malzemelerdir. Selüloz, kitin, kitosan, aljinat, dekstran, glikozaminoglikanlar, kollajen, jelatin, elastin, fibrinojen, laminin, ipek ve hücresizleştirilmiş hücre dışı matris (dECM) bazlı biyomalzemeler doğal biyomalzemeler arasındadır. Doğal biyomalzemeler, doğal ECM bileşenlerinin taklitleridir.

ECM, hücreler dışındaki tüm doku bileşenlerini, esas olarak polisakkaritleri ve dokuya ideal bir 3 boyutlu biyolojik ortam sunan proteinleri içerir. ECM, hücrelere fiziksel destek sağlama ve büyüme, proliferasyon, farklılaşma, göç, homeostaz ve morfojeniz dahil olmak üzere hücresel aktiviteyi düzenleme gibi doku rejenerasyonunda önemli bir rol oynar, bu da insan vücudunun küçük hücre, doku ve organ kusurlarını yeniden iyileştirmesini sağlar (Mukherjee vd. 2011, Theocharis vd. 2016).

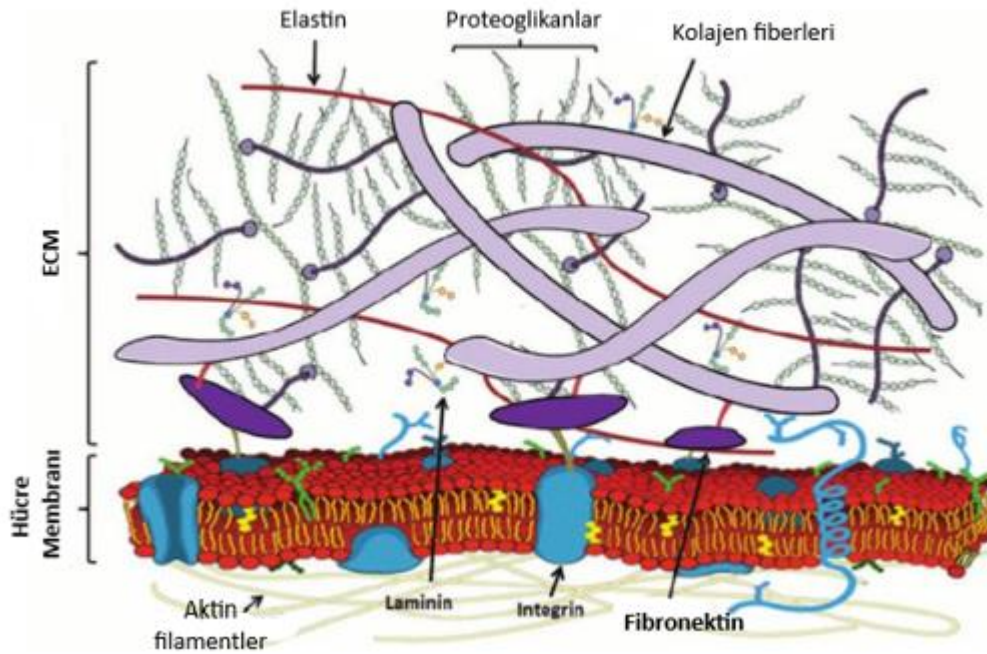
#### **2.1.1.1 Hücre dışı matris (ECM)**

Dokularda ve organlarda hücreler, hücre dışı matris olarak bilinen karmaşık bir makromolekül ağı içinde bulunur. İki ana makromolekül sınıfı ECM'yi oluşturur: proteoglikanlar ve lifli proteinler. Hyaluronan, kondroitin ve dermatan sülfat, heparin sülfat ve keratin sülfat olarak dört ana proteoglikan grubu tanımlanmaktadır (Jarvelainen vd. 2009; Schaefer vd. 2010). Lifli proteinler arasında kolajenler, elastin, lamininler, vitronektin ve fibronektin bulunmaktadır (Alberts vd. 2008). ECM'nin kolajen içeriği, fibriler kolajen tip I (%80), III (%12), IV ve fibriler olmayan kolajendir( tip V, VI) (Weber, 1989).

ECM proteinlerinin çoğu lokal olarak salgılanır ve hücreler tarafından organize bir matris halinde birleştirilir (Frantz vd. 2010). Fibronektin, vitronektin ve laminin gibi çözünür ECM proteinleri de karaciğerde üretilir (Tamkun ve Hynes 1983; Tomihira

1991) ve pıhtılaşmaya yardımcı olmak için kan dolaşımına salınır (Magnusson vd. 1998) veya doku ECM'sinin bir bölümünü oluşturur (Oh vd. 1981).

ECM'nin hücreye bağlanması, integrinler olarak bilinen transmembran hücre yapışma proteinlerini gerektirir. İntegrinler, hücrelerin ECM'ye bağlanmak ve yanıt vermek için kullandığı ana reseptör proteinleridir (Geiger vd. 2001). Bir integrin molekülü,  $\alpha$  ve  $\beta$  olarak adlandırılan, kovalent olmayan bir şekilde ilişkili iki transmembran glikoprotein alt biriminden oluşmaktadır. On sekiz farklı  $\alpha$  ve sekiz farklı  $\beta$  alt birimi tanımlanmıştır. Ancak, in vivo olarak sadece yirmi dört farklı integrin çifti tanımlanmıştır (Hynes 2002). İntegrinlerin hücre dışı kısmı, bir  $\text{Ca}^{2+}$  ve  $\text{Mg}^{2+}$  katyon bağımlı mekanizma yoluyla ECM'nin bileşenlerine bağlanır (Alberts vd. 2008). İntegrinlerin hücre içi kısmı, hücre iskeleti ile talin,  $\alpha$ -aktinin ve filamin gibi adaptör proteinleri aracılığıyla etkileşime girer (Van der Flier vd 2001; Zamir vd. 2001). Bunu yaparken integrinler, ECM ile hücrenin hücre iskeleti arasında fiziksel bir bağlantı kurar (Bissell vd 1987).



Şekil 2.1 Hücre dışı matris yapısı (Xue ve Jackson, 2015)

Hücre tarafından salgılanan ECM proteinlerinin görevi hücreler ve dokular için yalnızca statik ve inert iskele malzemesi olarak bulunmak değildir. Hızlandırılmış immüno Floresan mikroskobu, ECM'nin sürekli hücre aracılı yeniden organizasyona giren dinamik bir yapı olduğunu göstermiştir (Ohashi vd. 1999).

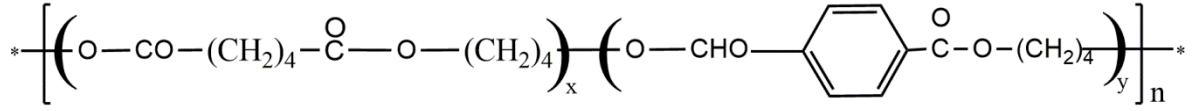
In vitro olarak, ECM, çoğalma (Sottile vd. 1998), farklılaşma (Lee, Lee vd. 1985; Engler, Sen vd. 2006), göç (McCarthy ve Furcht 1984; Hocking ve Chang 2003), hayatta kalma, hücre iskeleti organizasyonu (Freyer vd. 2001) ve kalp kasılması (Hocking, Sottile vd. 2000) dahil olmak üzere çeşitli hücre fonksiyonlarını düzenlemektedir. In vivo deneyler, ECM fibronektinin yeniden vasküler şekillenmeyi düzenleyebildiğini (Chiang, Korshunov vd. 2009) ve iskelet kası kasılması ile lokal vazodilasyon arasında bir bağlantı sağladığını göstermiştir (Hocking vd. 2008). In vivo ve in vitro çalışmalar ECM'nin önemli bir işlevinin hücre davranışlarını düzenlemek olduğunu göstermektedir.

### **2.1.2 Sentetik biyomalzemeler**

Doğal biyomalzemelerin aksine, sentetik biyomalzemeler kontrollü işlemlerle sentezlenirler, böylece malzemelerin mekanik özellikleri, yapıları, biyouyumlulukları ve biyobozunurlukları ayarlanabilir. Bu nedenle, öngörülebilir bir şekilde üretilebilirler (Mathur vd. 2016). Bununla birlikte, sentetik biyomalzemeler genellikle hücre yapışmasını ve hayatta kalmasını desteklemez ve destekleyemedikleri için uygun biyoaktif moleküllerle işlevselleştirilmeleri gerekmektedir. Dahası, in vivo implante edildiklerinde inflamatuvar reaksiyonlara yol açabilir, yeterince uyumlu olmayabilir, konakçı dokuya entegre olamayabilir veya vücuttan tamamen çıkarılamayan bozunma ürünleri üretebilirler (Chen vd. 2008, Reis vd. 2016).

Doku mühendisliği uygulamalarında 3 boyutlu iskeleler oluşturmak için birden fazla sentetik polimer kullanılmıştır. En sık kullanılanlar arasında poliüretan (PU), poli e-kaprolakton (PCL), polilaktik asit (PLA), poliglolikolik asit (PGA), poli (gliserol sebakat) (PGS) ve bunların kopolimerleri bulunmaktadır (Mathur vd. 2016).

### 2.1.2.1 PBAT Poli(bütülenadipat-ko-tereftalat) yapısı



Şekil 2.2 PBAT'nin kimyasal yapısı (x: bütülen adipat, y: bütülen teraftalat)

PBAT, adipik asit, 1,4-butandiol ve tereftalik asit arasında polikondensasyon yoluyla elde edilen fosil kökenli, yaygın olarak kullanılan ve biyolojik olarak parçalanabilen bir kopolyesterdir. PBAT, esneklik ve dayanıklılık dahil olmak üzere birçok özelliğe sahip olduğundan, elektro-eğirme süreci için iyi bir aday olarak düşünülebilir.

### 2.1.2.2 PBAT Poli (bütülenadipat-ko-tereftalat biyobozunurluğu

PBAT antimikrobiyal bir polimerdir ve 80 gün sonra %90'lık bir bozunma oranıyla tamamen biyolojik olarak parçalanabilir (Cranston vd. 2003, Bastarrachea vd. 2010).

Alifatik polyesterler, bozunabilir malzemeler olarak büyük uygulamaları olan en önemli sentetik polimer ailelerinden birini oluşturur (Smith, 2005). Bununla birlikte, diollerden ve dikarboksilik asitlerden türetilen alifatik polyesterlerin mekanik ve termal özellikleri yetersizdir (Ihn vd. 1995). Aromatik homopolyesterler ise yeterli mekanik ve termal özelliklere sahiptir, ancak biyolojik olarak parçalanamazlar. Bu dezavantajların üstesinden gelmek amacıyla alifatik-aromatik kopolyesterler geliştirilmiştir. Bu kopolyesterler, hem alifatik polyesterlerin biyolojik olarak parçalanabilirliğini hem de aromatik polyesterlerin iyi mekanik ve termal özelliklerini sağlamaktadır. Yapılan çalışmalar sonucunda, özellikle biyolojik olarak parçalanabilirlik davranışında en uygun özelliklere sahip olan alifatik-aromatik kopolyesterin PBAT poli(bütülenadipat-ko-tereftalat) olduğu sonucuna varılmıştır (Müller vd. 2001). Bu nedenle PBAT, alifatik malzemelerin dezavantajlarının üstesinden gelir ve aromatik malzemelerin yararlı

malzeme özelliklerini biyolojik olarak parçalanabilirlikle birleştirir. Ticari alifatik-aromatik kopolyesterler için, alifatik birimin konsantrasyonu %45-65 mol'e kadar yüksektir çünkü bu durumda, biyobozunurluk ve fiziksel özelliklerin optimal dengesini gösterirler (Witt vd. 1997).

### **2.1.2.3 PBAT ve doku mühendisliği**

PBAT'nin çevrede doğal olarak bulunan enzimler tarafından birkaç hafta içerisinde parçalanabilmesi, endüstriyel uygulamalar için büyük bir potansiyele sahip olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte, PBAT'nin doku mühendisliği çalışmalarındaki potansiyel rolü yapılan çalışmalar ile incelenmiştir. Bu alandaki çalışmalara bakıldığında, PBAT'yi kimyasal olarak modifiye edecek uygun nano ve mikropartiküllerin kullanılması ya da hidrofilik polimerler ile karışım halinde kullanılmasının biyolojik performansı iyileştirdiği gösterilmiştir.

Bir çalışmada, kemik rejenerasyonu için, nanopartiküllerin, özellikle nHAp'nin eklenmesinin PBAT'ye çok fonksiyonlu özellikler kazandırarak bu dezavantajın üstesinden geldiği bildirilmiştir (Santana-Melo vd. 2017). Bir başka çalışmada, kitosan-heparin ve kitosan-hiyaluronik asit ile modifiye edilmiş PBAT filmlerin, L929 (fare fibroblast hücre hattı) hücre proliferasyonunu artırdığı gösterilmiştir (Jao vd. 2010).

PBAT ile yapılan bir başka çalışmada, montmorillonit ile modifiye edilmiş PBAT kompozitlerinin biyouyumluluğu, protein adsorpsiyonu ve hücre proliferasyonu değerlendirilmiştir. hFOB (insan fetal osteoblast hücre hattı) ve L929 ile yapılan hücre kültürü çalışmalarında kullanılan PBAT/montmorillonit nanokompozit malzemelerin sitotoksik etki göstermediği sonucuna varılmıştır. Montmorillonit kullanımının, PBAT'nin biyouyumluluğunu artırdığı gösterilmiştir (Fukushima vd. 2013).

(Granat vd. 2018), çalışmalarında nöronal büyüme ve farklılaşma için doku iskelesi olarak PBAT ve iletken bir polimer olan polipirrol (PPy) içeren elektrospun hibrit malzemelerin üretimi ve uygulamasını göstermişlerdir. Üretilen elektrospun iskeleler

biyouyumluluk göstermiştir ve mezenkimal kök hücrelerin iskeleye uygun şekilde yapışmasına ve çoğalmasına izin vermişlerdir. PBAT'nin hidrofobik yapısının hücre çoğalmasını ve farklılaşmasını engellediğini fakat PBAT / PPy liflerinin laminin kaplanması ile bu engelin aşıldığı ve nöronal farklılaşmayı desteklediği sonucuna varılmıştır.

## **2.2 Kardiyak Doku Mühendisliği**

Doku mühendisliği temel olarak hasarlı organları taklit etmeyi ve organların doku mimarisini ve işlevini mümkün olduğunca yeniden üretmeyi amaçlamaktadır. Kalp hastalıklarında problem, yetişkin kalp kası hücrelerinin yani kardiyak miyositlerin, yaralı hücreleri değiştirmek için bölünememesidir. Bu nedenle, yeterli sayıda yerleşik kardiyak kök hücre popülasyonuna rağmen, kalp herhangi bir doğal süreçle kendini onaramaz. Hasarlı miyokard bölgeleri üzerinde yara dokusu gelişir, bu durum organ bütünlüğünün korunmasını sağlar fakat kalbin kasılma etkinliğini azaltmaktadır. Yara dokusu geliştiğinde, kalbin kalp debisini sürdürmesine yardımcı olmak amacıyla telafi edici mekanizmalar etkinleştirilir fakat bu durum zayıflamış miyokard dokusunun üzerine ekstra bir yük bindirmektedir. Bu da kalp yetmezliğine, azalmış perfüzyondan dolayı çoklu organ yetmezliğinin gelişmesine ortam hazırlar ve ölüme yol açar. Bu hastalıklara yönelik çalışmalarda, ilk olarak hasarlı kalp dokusuna yeni hücrelerin enjekte edilmesi tedavi yaklaşımı olarak kullanılmıştır. Fakat bu yaklaşım, kalp dokusu ile hücrelerin zayıf entegrasyonu ya da hücre ölümü sebebiyle tedavi için sınırlı kalmıştır (Murry vd. 2004).

Hücrelerin bir ortamda hayatta kalabilmeleri için temel bir gereklilik olan belirli bir fiziksel destek yüzeyidir. Çoğu hücre tipi biyolojik olarak kabul edilebilir bir materyal yüzeyine bağlandıkları zaman gelişmektedir. Doku mühendisliği çalışmalarının amacı, enjekte edilebilir hücrelerin üretilen doku iskelelerinde tutunabilmesi ve organize olabilmeleridir. Hücre içeren bu doku iskeleleri, vücudun ya da organların bir bölümünü tedavi amacıyla ya da değiştirmek amacıyla kullanılabilir. Hücre içermeyen, boş

iskele yapıları da mevcut olan kök hücreleri koşullandırmak amacıyla *in vivo* implante edilebilir (Jawad vd. 2008).

Yapılan çalışmaların bulgularına dayanarak, miyokard hasarını eski haline getirmenin, kalp dokusunu değiştirmenin ya da kasılma sorununun iyileştirmesi cerrahi riskler oluşturması nedeniyle oldukça nadirdir. Bununla birlikte, kardiyovasküler hastalıklar sebebiyle yüksek ölüm oranı göz önüne alındığında yapılan araştırmalar ve kök hücre içeren doku iskeleleri büyük önem kazanmaktadır.

### **2.2.1 Kalbin yapısı ve histolojisi**

Kalp, vücuttaki dokulara yaklaşık olarak günde 7000 litre kan pompalayan, yapısı oldukça karmaşık bir organdır (Radisic vd. 2007). Kardiyak doku, temel olarak kardiyak miyosit hücreleri, düz kas hücreleri, fibroblastlar ve hücre dışı matris bileşenlerini (fibriler kolajen vb) kapsamaktadır (Walker vd. 1999). Kardiyak miyosit hücreleri, ventriküler duvar boyunca kas liflerini oluşturmaktadır (Smail vd. 1999). Bu da hücrelerin özel düzenini, kalp yapısının mekanik ve elektriksel fonksiyonunu oldukça etkilemektedir (LeGrice vd. 1995).

Kardiyak doku, ECM'ye iyi bağlanan kardiyomiyositler, fibroblastlar ve endotel hücreler dahil olmak üzere birkaç hücre tipinden oluşur. (Pinto vd. 2015). Kardiyomiyositler, dik uzanan çizgilerle silindirik şekildedir (Bird, 2003). Kardiyomiyositler, asimetrik ve anizotropik bir ventriküler yapı sağlamak için her biri genel sarmal yapıya yol açan farklı bir oryantasyona sahip kas lifi katmanları halinde birleştirilir ve miyokardiyumun temel işlevinden sorumludur. (Coghlan vd. 2006; Parker ve Ingber, 2007).

Miyokard, yapısının ve işlevinin anahtar rol oynadığı organize bir dokudur. Kardiyomiyositlerin kasılmasına yol açan iyon kanallarının işlevini sürdürerek atan kalbi korumak için bir kontrol mekanizması hiyerarşisi gereklidir (Parker ve Ingber, 2007). Bu kontrol mekanizması, hücre dışı matris (ECM), transmembran integrin

reseptörleri ve işlevsel olarak bağlı olan hücre iskeleti tarafından yönetilen metabolik, elektriksel ve mekanik olayların koordinasyonunu gerektirir. Bu yapısal kontrol ağları, mekanik, elektriksel ve kimyasal sinyalleri aynı anda işleyebilmektedir. (Juliano ve Haskill, 1993; Parker ve Ingber, 2007). Yapı ve işlev arasındaki ilişkiyi ve hücresel işlevi nasıl etkilediğini anlamak, kalp doku mühendisliği için önemli olup aynı zamanda oldukça zordur.

Miyokard, toplam hücre sayısının yalnızca yaklaşık %33'ünü temsil etmesine rağmen, kalp hacminin yaklaşık %75'ini oluşturan 2-4 milyar kardiyomiyosit (CM) içerir (Syed vd. 2014). CM'ler, miyosit olmayan hücreler, yani endotelial hücreler (EC'ler), düz kas hücreleri (SMC'ler) ve fibroblastlar (FB'ler) ile birleşerek karmaşık bir şekilde organize edilmiş bir 3 boyutlu yapı oluşturmaktadır. Kalp yetmezliğinin çoğu nedeni, CM eksikliklerine atfedilebilir ama yaşlanma ile, spesifik kalp hastalığı olmayan bireylerde yılda yaklaşık 1 g miyokardiyum kaybı olmaktadır (Mendoza-Noyelo vd. 2011). CM'nin sınırlı bir rejeneratif kapasitesi vardır. Kalp yetmezliğinin ilerlemesi sırasında kardiyak ECM modifiye edilerek yara (skar) dokusu ile geliştirilir (Mathur vd. 2012). Bu nedenle, hem CM popülasyonunu hem de ECM'yi yeniden oluşturmayı amaçlayan prosedürlerin birleştirilmesi, hücresel tedavinin etkinliğini artırabilir.

### **2.2.2 Kardiyak doku iskelesi üretiminde kullanılan biyomalzemeler**

Kardiyak doku mühendisliği için kullanılacak biyomalzemelerin, kalp hücrelerinin verimli şekilde bağlanmasını, büyümesini ve farklılaşmasını destekleyerek, fonksiyonel kardiyak dokunun oluşmasına imkan sağlayan özelliklere sahip olması gerekmektedir. Kasılmayı kolaylaştırmak için biyomalzemelerin mekanik özelliklerin yanı sıra elektrofizyolojik olarak stabil kalmasını ve elektromekanik entegrasyonu desteklemesi gerekmektedir (Jawad vd. 2008). Ayrıca, in vivo revaskülarizasyonu desteklemeli ve yeni doku oluşana kadar hasarlı dokuyu yeterince desteklemek için uygun oranda bozunur olmaları gerekmektedir (Wu vd. 2006).

Bu nedenle, kardiyak doku mühendisliğinde 3 boyutlu kardiyak doku yapıların oluşturulmasında, anizotropik fibriler yapısı, mekanik özellikleri ve biyomimetik moleküler kompozisyon gibi doğal kardiyak hücre dışı matrisin önemli özelliklerini içeren biyomalzemelerin kullanılması esastır.

İnsan vücudunda, kolajen, özellikle fibriler tip I, hücelere hem yapısal hem de biyolojik destek sağlayan birçok sert ve yumuşak dokunun hücre dışı matriksinin ana bileşenidir. Özellikle miyokardiyal hücre dışı matris, %85 tip I, %15 tip III ve %5 tip V olacak şekilde yaklaşık olarak %70-80 aralığında fibriler kolajenden meydana gelmektedir (De Souza 2002).

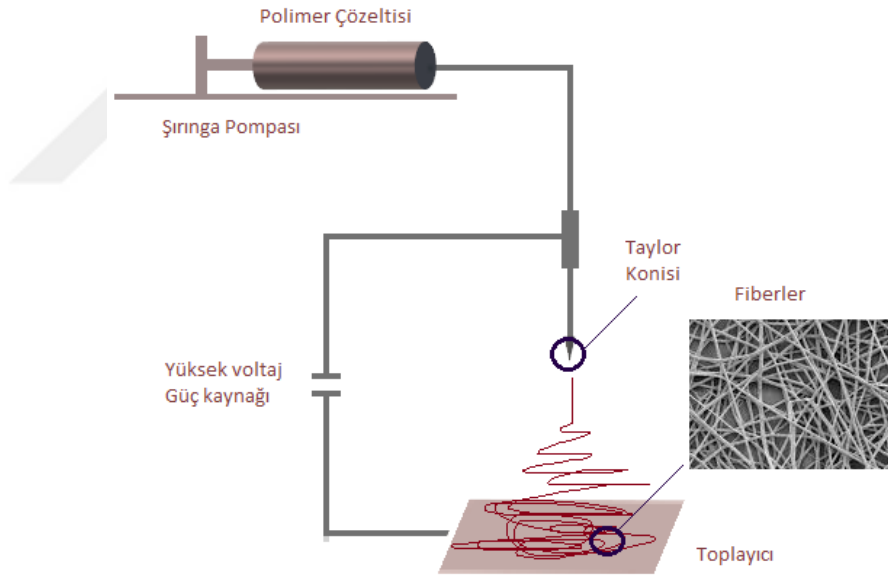
Kardiyak fibroblast hücreleri tarafından sentezlenen fibriler kolajenler, kalp dokusuna esneklik ve yapısal bütünlüğün korunmasını sağlamaktadır, aynı zamanda hücresel yapışmaya yardımcı olan integrinlerle etkileşime girmektedirler (Davidenko vd. 2018). Fibriler kolajenler miyosit hücrelerinin hizalanmasını sağlamaktadır ve matris için bir nevi destek görevi görmektedirler. Özellikle miyokardiyum şeklinin, kalınlığının ve sertliğinin sağlanmasında büyük önem taşımaktadırlar. Kolajenin bu destekleyici özelliklerinden dolayı, kardiyak doku mühendisliği çalışmaları, yapay kardiyak doku oluşturmak amacıyla biyomalzeme olarak kolajen kullanımına odaklanmıştır. Kalp dokusu iskeleleri, kolajen ve kitosan gibi doğal olarak üretilmiş malzemeler ve poli (glikolik asit), poli(kaprolakton) ve PBAT poli(bütülenadipat-co-teraftalat) gibi sentetik malzemeler kullanılarak, doğal ve sentetik malzemelerin kombinasyonu ve hücresizleştirme işlemi ile elde edilen doğal kalp dokusu matrisi kullanılarak üretilbilirler. Kolajen gibi doğal malzemelerin dezavantajı, sentetik malzemelerin bir özelliği olan güçlü mekanik desteğin eksikliğidir. Öte yandan, sentetik malzemeler, doğal malzemelerde bulunan hücre bağlanmasını geliştirme potansiyelinden yoksundur. Doğal ve sentetik malzemelerin birleştirilerek kullanılması, miyokard gibi dokular için daha iyi mekanik ve biyolojik destek sağlayabilmektedir (Krupnick vd, 2002).

## 2.3 Doku İskelesi Üretim Yöntemleri

Doğal ve sentetik malzemeler kullanılarak, istenilen doku tipine göre doku iskelelerinin üretilmesi amacıyla birçok yöntem uygulanmaktadır. Dondurarak kurutma, eriyik kaplama, faz ayırma, çözücü dökümü parçacık uzaklaştırma, gaz köpürtme, 3 boyutlu baskı ve elektro-eğirme bu yöntemler arasında en çok kullanılanlardır.

### 2.3.1 Elektro-eğirme yöntemi

Elektro-eğirme yöntemi hem doğal hem de sentetik polimerlerin çözeltilerini kullanarak 2 nm'den birkaç mikrometreye kadar değişen çaplarda polimer mikro ya da nanofiberler üretmek için elektrik kuvvetleri kullanılan bir tekniktir (Bhardwaj ve Kundu 2010).



Şekil 2.3 Şematik olarak elektro-eğirme sistemi

Elektro-eğirme sisteminin temel konfigürasyonu Şekil 2.2'de gösterilmiştir. Temel olarak; yüksek voltajlı güç kaynağı, lif toplayıcı, şırınga ve şırınga pompasından oluşmaktadır. Polimer çözeltisi, şırınga pompasına bağlanan bir şırınga ile sabit bir akış hızında toplayıcıya gönderilir.

### 2.3.1.1 Elektro-eğirme yönteminde parametreler

Elektro-eğirme parametreleri, istenilen lif özelliklerinin elde edilmesinde önemli rol oynar. Elektro-eğirme sürecine etkisine göre bu parametreler, uygulanan voltaj, polimer akış hızı, toplayıcı ile şırınga ucu arasındaki mesafe ve toplayıcı tipleridir.

En önemli elektro-eğirme parametresi uygulanan voltajdır. Taylor, ancak eşik voltajına ulaşıldıktan sonra, çözelti üzerinde elektrik alanı ile birlikte gerekli yükleri indükleyerek nanofiber oluşumunun gerçekleştiğini ve elektro-eğirme sürecini başlattığını söylemiştir (Taylor 1969)

Şırınganın içindeki polimer çözeltisinin akış hızı, bir başka önemli elektro-eğirme işlemi parametresidir. Bu parametrenin seçimi, jet hızının ve malzeme aktarım hızının nanofiber oluşumunu etkileyebilmesi durumunda çok önemlidir (Subbiah vd. 2005)

Genel olarak, polimer çözeltisinin polarizasyon için yeterli zamanı alması için düşük bir akış hızı önerilir. Akış hızı çok yüksek olduğunda, toplayıcıya ulaşmadan önceki kısa kuruma süresi ve düşük gerdirmeye kuvvetleri nedeniyle ince çaplı düz nanofiberler yerine kalın çaplı boncuk nanofiberler oluşacaktır. Örneğin, bir polisülfon / dimetilasetamid karışımından polisülfon nanofiberlerin kullanılması durumunda polimer akış hızının artmasıyla nanofiber çapının arttığını ve akış hızının değiştirilmesiyle morfolojik yapının biraz değiştirilebildiği gözlemlenmiştir (Yuan vd. 2004).

Toplayıcı ile şırınga ucu arasındaki mesafe, nanofiber çaplarını ve morfolojisini kontrol etmek için başka bir önemli parametredir. Bu mesafe, çözücünün doğru zamanda nanofiber oluşumuna neden olacak şekilde buharlaşmasına izin verecek kadar büyük olmalıdır. Eğirme mesafesi çok kısa olduğu zaman, çırpma işleminin olmaması ve yetersiz çözücü buharlaşması nedeniyle fiberler iyice inceltilemeyecektir, bunun sonucunda boncuk oluşumu gözlemlenebilir. Ters durumda, eğirme mesafesinde bir artış ve sabit bir elektrik alanı yoğunluğu varsa, daha küçük çaplı nanofiberler

üretilebilir ve doğal olarak, daha geniş bir nanofiber alanı biriktirilir (Seok Ki vd. 2005). (Zang vd. 2008).

Çizelge 2.1 Elektrospinning parametrelerindeki değişikliklerin fiber morfolojisi üzerindeki etkisi (Pham QP vd. 2006)

| Parametreler                        | Lif Morfolojisine Etkisi                                                                                                          |
|-------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Viskozite/ Konsantrasyon            | Artan konsantrasyonla fiber çapları artar / viskozite ile artar<br>(optimal aralık dahilinde)                                     |
| İletkenlik/ Çözelti yük yoğunluğu   | İletkenliğin artması, üniform boncuksuz liflerin üretimini teşvik eder<br>Genel olarak, artan iletkenlik daha küçük lifler üretir |
| Polimer moleküler ağırlık           | Sabit viskozitede, artan moleküler ağırlık, boncuk ve damlacık sayısını azaltır                                                   |
| Akış hızı                           | Daha düşük akış hızları, daha küçük çaplı lifler üretir<br>Artan akış hızlarında lif çapı azalır                                  |
| Alan gücü / Voltaj                  | Çok yüksek voltajda boncuklanma gözlemlenecektir<br>Artan akış hızlarında lif çapı azalır                                         |
| Şırınga/toplayıcı arasındaki mesafe | Kuru lif elde etmek için minimum mesafe gereklidir<br>Çok yakın veya çok uzak mesafelerde boncuklanma görülebilir                 |

### 2.3.1.2 Elektro-Eğirme için kullanılan polimerler

Doğal biyopolimerler; hyaluronik asit (HA), selüloz, kitosan gibi polisakkaritler ve ipek, fibrinojen, kolajen, jelatin gibi proteinler doku mühendisliği için lifli doku iskeleleri oluşturmak üzere elektro-eğirme çalışmalarında kullanılmıştır. Doku mühendisliği için bu doğal polimerleri kullanmanın avantajı, hücre tutuculuğu ve proliferasyonu için gerekli birçok öğretici ipucu sağlamalarıdır, fakat sentetik polimerlerin aksine, doğal polimerler, partiden partiye varyasyon problemi yaşayabilmektedir (Agarwal S. vd. 2008).

Fizyolojik koşullar altında bozunabilen veya hidrolize edilebilen sentetik polimerler, örneğin alifatik polyesterler, polianhidrürler ve polifosfazenler, doku mühendisliği için elektrospun nanofibröz yapı iskelelerinin üretilmesi için gereklidir (Place E.S vd. 2008).

Alifatik bir polyester olan poli (laktik asit) (PLA), elektro-eğirme için kullanılan en iyi biyobozunur polimerlerden bir tanesidir (Sell vd. 2007, Greiner A ve Wendorff J.H 2007). Poli (glikolik asit) (PGA) da, heksafloroizopropanol (HFIP) haricinde organik çözücülerdeki düşük çözünürlüğü sebebiyle, sınırlı ölçüde elektro-eğirme çalışmalarında kullanılmıştır, buna karşılık poli ( $\epsilon$ -kaprolakton) (PCL) ve PCL kopolimerleri, birçok çözücü tipi içerisinde çözünmektedir ve doku iskeleleri için elektro-eğirme çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır (Greiner ve Wendorff, 2007). Biyouyumlulukları, yavaş bozunma hızları ve elektro-eğirme çalışmalarındaki kolaylıkları nedeniyle, bu elektrospun sentetik polimerler çok çeşitli hücre tiplerini destekleyebilmektedirler (Pham vd. 2006).

## **2.4 Hücresizleştirme**

Hücresizleştirilmiş hücre dışı matris yapı iskelelerinin doku rejenerasyonunda birçok uygulaması vardır. Üç boyutlu ECM'yi bozulmadan bırakırken organdan veya dokudan nükleer materyal dahil hücrelerin çıkarılmasını sağlarlar. Allojenik ve ksenojenik materyalin hücresizleştirilmesiyle hazırlanabilirler. Hücresizleştirmenin yöntemi ve etkinliği, kalan ECM'nin mikro yapısını, bileşimini ve mekanik davranışını etkilemektedir. ECM hücrelere yapısal destek sağlar, hücrelerin sabitlenmesini sağlar, büyüme faktörlerini ayırarak hücreler arası iletişimi düzenler ve doku büyümesi için gereklidir. Hücresizleştirmenin gerekçesi, yabancı ksenojenik ve allojenik hücresel ve nükleer antijenlerin (DNA) ve bir inflamatuvar ve immün aracılı yanıt indüklediği bilinen hasarla ilişkili moleküler yapı (DAMP) moleküllerinin çıkarılması veya maskeleyesidir. İkinci amaç, türler arasında korunan ve ksenojenik alıcılar tarafından bile tolere edilen ECM bileşenlerinin korunması için tekniklerden yararlanmaktır (Gilbert vd. 2006).

Biyolojik matrisler, deri (Chen vd. 2004), kalp kapakçıkları (Bader vd. 1998), kan damarları (Quint vd. 2011), sinirler (Hudson vd. 2004), tendonlar (Cartmell vd. 2000), ince bağırsak submukozası (SIS;) kas, damar greftleri, mesane ve diğerleri gibi çeşitli farklı organ ve dokuların rekonstrüksiyonu için uygulamalarla) (Andree vd. 2013), mesane (Chen vd. 1999), iskelet kası (Borschel vd. 2004) , yemek borusu (Badylak vd. 2011), böbrek (Nakayama 2010), kalp (Ott vd. 2008), karaciğer (Uygun vd. 2010), akciğer (Cortiella vd. 2010) ve merkezi sinir sistemi (optik sinir, omurilik, beyin) (Crapo vd. 2012) bağlar dahil olmak üzere farklı organ ve dokuların hücreleştirilmesinden elde edilmiştir.

Liyofilize edilmiş, toz haline getirilmiş veya jel formuna dönüştürülmüş, insan veya ksenojenik kaynaklardan elde edilmiş ECM'den oluşan otuzdan fazla farklı biyolojik yapı iskelesi şu anda ticari olarak mevcuttur (Badylak vd. 2009).

Hücreleştirme teknikleri, fiziksel, kimyasal ve enzimatik yaklaşımların bir kombinasyonunu içermektedir. Hücre zarının fiziksel tedaviler (hızlı dondurma, mekanik ajitasyon) ve iyonik solüsyonlar (hipotonik ve hipertonic tedaviler) ile parçalanması, hücresel bileşenlerin ECM'den ayrılması (şelatlama ajanları, enzimatik tedaviler), sitoplazmik ve nükleer materyalin çözündürülmesi (noniyonik, iyonik ve zwitteriyonik deterjanlar, alkali ve asit muameleleri, şelatlama ajanları) doğal ECM'nin bozulmasını en aza indirirken, proteaz inhibitörleri dokudan hücresel ve nükleer materyalin uzaklaştırılması sağlamaktadır. Tüm artık kimyasallar hücreleştirmeyi takiben dokudan uzaklaştırılmaktadır. Enzimatik in vivo bozunmayı azaltmak için bir çapraz bağlama ajanı da eklenebilmektedir (Haag vd. 2012), fakat bu, ECM'in mekanik özelliklerini değiştirme potansiyeline sahiptir.

Bu yöntemler farklı kombinasyonlarda kullanılabilir, bunların verimliliği ilgili dokuya bağlıdır ve hücreleştirme işleminin ECM bileşenlerinin yapısı ve işlevi üzerindeki etkileri açıklanmıştır. En titiz işleme yöntemlerinden bazıları bile tüm hücreleri ve hücre ürünlerini tamamı ile yok edememektedir (Badylak vd. 2009, Gilbert vd. 1996).

#### 2.4.1 ECM hidrojel

Doğal dokulardan veya organlardan hücresizleştirme yöntemi ile elde edilen ECM hidrojelleri, doku iskelesi için alternatif bir malzemedir. Dokulara hücresizleştirme işlemi uygulandıktan sonra, ECM bileşenleri sıvı form elde etmek amacıyla işlenir ya da sindirilir. Daha sonra jelleşme kinetiği tetiklenir. Ticari olarak elde edilebilen hidrojellerin doğal ECM'den elde edilen hidrojellere göre dezavantajı, ECM'in biyokimyasal çeşitliliğini temsil etmekteki başarısızlıklarıdır.

Hücresizleştirilmiş ve liyofilize edilmiş organ ve dokuların cerrahi yama olarak kullanımı uygundur fakat hücrelerin tohumlanması ile bu yapıların yeniden düzenlenmesi oldukça zordur. Buna karşılık, ECM'ye jel formunun kazandırılması, reolojik ve mekanik özellikleri sebebiyle düzensiz boşluklu yapı dezavantajını ortadan kaldırır.

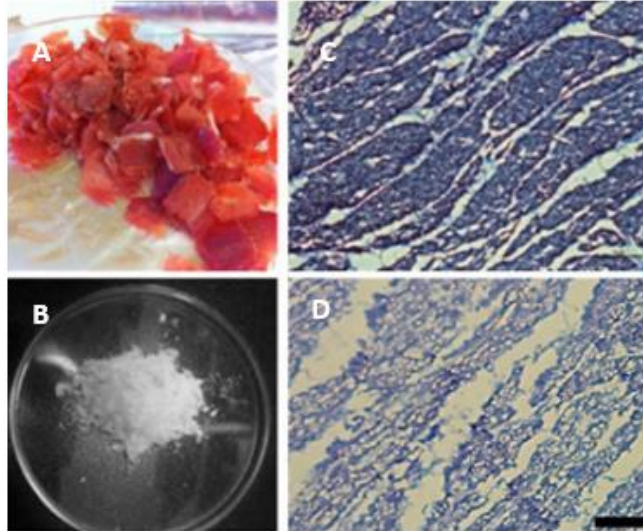
Kolajen ve elastin gibi ECM'nin yapısal proteinlerinin doğal formunun korunması, dECM'nin (hücresizleştirilmiş ECM) jelleşmesinden ve jelin mekanik özelliklerinden sorumlu olduğu için oldukça önemlidir. Hücresizleştirme işleminden sonra, dECM hidrojellerin üretilmesi amacıyla ek adımlar gerçekleştirilmektedir. Bunlar, hücresizleştirilmiş dokuyu dondurarak kurutma, toz haline getirme, enzimatik sindirim ve nötralizasyondur. Toz haline getirme, enzimatik sindirim aşamasında ECM'nin yüzey alanını artırmak amacıyla yapılmaktadır. Bu sayede sindirim aşaması kolaylaşacak ve asidik koşullardaki sindirim süresi azalacaktır. Yetersiz ya da aşırı sindirilmiş ECM'in hidrojel formuna geçmesi başarısız olabilir ya da mekanik olarak dayanıksız hidrojeller meydana gelebilir. Bu nedenlerden dolayı, sindirim süresinin, enzim ve ECM oranının optimizasyonunun yapılması esastır. Çözündürülen dECM, düşük sıcaklıklarda sıvı davranışı gösterir fakat 37 °C'de 30-60 dk inkübe edildikten sonra jel oluşturmaktadır. Bu sayede, dECM bir kalıba doldurulur ve istenilen şekilde hidrojel oluşturulabilir. Ek olarak, dECM ile hücreler ya da ilaçlar karıştırılarak ekjekte edilebilir hidrojeller oluşturulabilir.

### 3. KAYNAK ÖZETLERİ

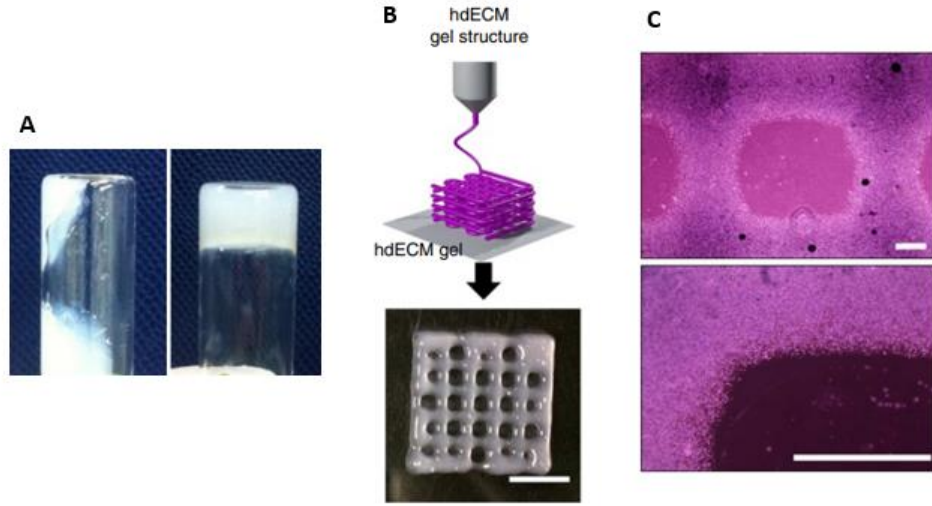
Kalp dokusu ile yapılan hücreleştirme ve karakterizasyon çalışmaları, hücreleştir miyokard dokusunun ve PBAT'nin doku mühendisliği çalışmalarında kullanımı aşğıdaki çalışmalarda özetlenmiştir.

Ott vd. 2008 yılında yaptıkları çalışmada, ilk kez perfüzyon hücreleştirme tekniğini kullanarak, bütün bir fare kalbinin hücreleştirilmesini başarı ile gerçekleştirmişlerdir. Koroner perfüzyon yoluyla, deterjan kullanılarak fare kalpleri hücreleştirilmiş ve bu elde edilen hücreleştir ve sağlam geometrideki hücre dışı matrise kardiyak ve endotel hücreleri tohumlanmıştır. Ayrıca bu tekniği akciğer, karaciğer ve böbrek gibi çeşitli memeli organları için denemişlerdir.

Pati vd. 2014 yılındaki çalışmalarında, yağ, kıkırdak ve kalp dokularını hücreleştirmişlerdir (Şekil 3.1). Kıkırdak ve yağ dokularından elde edilen hücre dışı matrisin PCL ile desteklenerek 3 boyutlu basıldığını, fakat kalp dokusundan elde edilen hücre dışı matrisin destekleyici bir iskele olmadan 3 boyutlu basılabildiğini göstermişlerdir (Şekil 3.1)



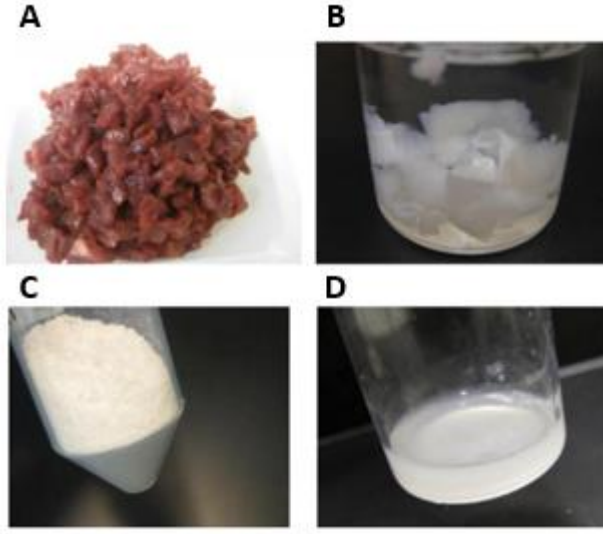
Şekil 3.1 A) Doğal kalp dokusu B) hücreleştirilmiş kalp dokusu C) doğal kalp dokusunun histoloji görüntüsü D) Hücreleştirilmiş kalp dokusunun histoloji görüntüsü (Pati vd. 2014)



Şekil 3.2 A) Hücresizleştirilmiş kalp dokusunun jel haline getirilmesi B) 3 boyutlu basılan hücresizleştirilmiş kalp dokusu, C) 3 boyutlu basılan hücresizleştirilmiş kalp dokusunun mikroskopik görüntüleri (Pati vd. 2014)

Bu çalışma ile birlikte, hücresizleştirilmiş hücre dışı matris migrasyon, olgunlaşma ve farklılaşma gibi hücresel fonksiyonları iyileştirme potansiyeline sahipken, mekanik özelliklerini geliştirmek amacıyla biyoyumlu bir malzeme ile desteklenmesi gerektiği sonucuna varılmıştır.

Wang ve Christman 2015 yılında yaptıkları bir çalışmada, domuz miyokardiyal dokusunu %1 SDS içeren bir çözelti ile hücrelerinden arındırmışlardır. Hücresizleştirme işleminden sonra dokuların Hematoksilen & Eozin ile boyanarak histolojik görüntüleri alınmış, hücresizleştirilen dokulara DNA ve sGAG analizi yapılmıştır. Daha sonra hücresizleştirilen dokular pepsin içeren 0.1 M HCl çözeltisi ile 2 gün boyunca sindirilmiştir. NaOH ile pepsin inaktive edildikten sonra dokular liyofilize edilmiştir. Hidrojel oluşumu için, sindirilen dokular 37 °C'de 30 dk inkübe edilmiştir.



Şekil 3.3 Domuz miyokardiyal dokudan hidrojel eldesi görüntüleri A) Doğal doku, B) SDS ile hücresizleştirilmiş miyokardiyal doku, C) Liyofilize edilip öğütülen miyokardiyal doku, D) Pepsin ile sindirilen miyokardiyal doku (Wang ve Christman 2015)

Arslan vd (2018) yaptıkları çalışmada, sığır miyokardiyal dokusunu 72 saat boyunca 50 mM Trizma hidroklorür, 5 mM EDTA (pH:8.00) ve %1 SDS içeren çözeltiye maruz bırakarak hücrelerinden arındırmışlardır. Yıkama aşamasından sonra dokuların dekontaminasyonu 5 saat boyunca %4 etil alkol ve %0,1 perasetik asit çözeltisi ile sağlanmıştır. Hücrelerinden arındırılan dokular liyofilize edildikten sonra DNA ve sGAG analizi yapılmıştır. Doğal ve hücresiz dokuların kolajen tip 1 içeriği hidroksipirolin analizi ile belirlenmiştir. Hücresizleştirilmiş dokular pepsin içeren 0.01 M HCl içerisinde bırakılarak sindirme işlemi gerçekleştirilmiş ve daha sonra 0.1 N NaOH ve 10x PBS eklenerek enzim inaktive edilmiştir. 3 ml sindirilmiş hücre dışı matris petri kabına alınarak 2 saat boyunca 37 °C'de inkübe edilerek film oluşturulmuştur. Filmler 4 °C'de 3-4 gün bırakılarak kurutulmuştur. Daha sonra NHS ve EDC ile 5 saat boyunca çapraz bağlama protokolü uygulanmıştır. Filmler liyofilize edildikten sonra filmlerin üzerine insan adipoz mezenkimal kök hücreler tohumlanmış ve osteojenik, adipojenik ve kondrojenik farklılaşmalar mikroskop altında görüntülenmiş ve histolojik olarak karakterize edilmiştir.

PBAT'nin son zamanlarda doku mühendisliği çalışmalarında kullanımı artmıştır. Bu çalışmalar daha çok kemik doku mühendisliği için olup kardiyak doku mühendisliği alanında çalışma mevcut değildir.

De Castro vd 2016 yılında yaptıkları bir çalışmada, biyolojik olarak parçalanabilen bir polimer olan PBAT ve bir iletken polimer olan polipirol kullanarak ilk kez elektro-eğirme yöntemiyle elektriksel olarak iletken nano iskeleler oluşturmuşlardır. Ayrıca bu doku iskelesine elektro çökeltme ile nanohidroksiapatitin (nHAp) uygulanabilirliğini göstermişlerdir. Oluşturulan doku iskelelerine insan osteoblast hücreleri tohumlanmış ve hücre canlılığı MTT testi ile analiz edilmiştir. Polipirolün PBAT'ye dahil edilmesi ile doku iskelesinin hücre yapışmasını destekleme kabiliyetini korunmuştur. Dahası, PBAT/PPy doku iskelesi osteoblast farklılaşmasının önemli bir göstergesi olan yüksek alkalın fosfataz değerleri göstermiştir. PBAT / PPy / nHAp nanokompozitleri ise, hücre yapışması ve osteoblast farklılaşması için iyi bir biyouyumluluk göstermiştir.

Kemik doku mühendisliği için yapılan bir başka çalışmada, Vasconcellos vd. 2021 yılında nHAP ve nHAp/grafen nanopartükülleri içeren PBAT doku iskeleleri elektro-eğirme yöntemi ile elde edilmiştir. Bu çalışmada ultra ince fibröz, biyoaktif ve osteokondüktif özelliklere sahip ve kemik rejenerasyonunu iyileştirme amaçlı doku iskeleleri tasarlanmıştır. Üretilen iskeleler taramalı elektron (SEM) ve transmisyon (TEM) mikroskopları kullanılarak morfolojik olarak karakterize edilmiştir. Oluşturulan doku iskeleleri sıçanlarda tibia kusurlarına yerleştirilmiş ve 2 hafta sonra radyografi, mikro bilgisayarlı tomografi, histolojik, histomorfometrik ve biyomekanik analizler kullanılarak analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, nHAP ve nHAp/grafen nanopartükülleri içeren PBAT doku iskeleleri, kontrol ve PBAT gruplarına göre trabeküler sertliği teşvik ederek in vivo lamellar kemik oluşumunu iyileştirmiştir.

Granato vd. 2018 yılında yaptıkları çalışmada, nöronal büyüme ve farklılaşma için doku iskelesi olarak PBAT ve PPy içeren elektro-eğirme yöntemi ile elde edilen hibrit malzemelerin üretimini ve uygulamasını gerçekleştirmişlerdir. PPy içeren ve içermeyen PBAT ile üretilen doku iskeleleri, Neuro2a fare nöroblastoma hücrelerinin yapışması ve

farklılaşması için kullanılmıştır. Neuro2a hücrelerinin laminin kaplaması olmadan PBAT ve PBAT/PPy doku iskelelerine yapıştığı gösterilmiştir. Ayrıca, Neuro2a, retinoik asit ile uyarıldığında PBAT üzerinde farklılaşmayı sağlamadığı fakat PBAT/PPy lifleri üzerinde farklılaşmayı sağladığı gösterilmiştir.



## 4. MATERİYAL ve YÖNTEM

### 4.1 Materyal

Sığır kalp kası dokusu, ticari amaçla kesim yapan bir kesimhaneden temin edilmiştir. Kalp dokusu %0.09 (v/v) NaCl çözeltisi içerisinde laboratuvara transfer edilmiştir. Kalp kası dokusu hücresizleştirme işlemi için küçük parçalara ayrılmıştır ve kullanılmadan önce -86 C'de saklanmıştır. Kalp kası dokusunun hücresizleştirme ve sindirim işlemleri için Trizma Hidroklorür (Sigma, Almanya), sodyum dodesil sülfat (SDS) (AFG Bioscience, ABD), magnezyum klorür (Merck, Almanya), Titriplex® III (Merck, Almanya), pepsin (Sigma Aldrich, Almanya) kullanılmıştır.

Elektro-eğirme işlemi için Siemens SIMATIC HMI elektrospinning cihazı kullanılmıştır. Nanofiber elde etmek amacıyla PBAT poli (bütilen adipat-ko-tereftalat) (Sunar Grup, TR) kullanılmıştır. PBAT polimer çözeltisi elde etmek amacıyla organik çözücü olarak dimetilformamit (DMF) (Riedel-de Haen) ve kloroform (Sigma, St. Louis, MO, ABD) kullanılmıştır. PBAT pelletlerinin kimyasal yapısını analiz etmek amacıyla nükleer manyetik rezonans spektroskopisi cihazı (ODTÜ-Merlab, Bruker Avance) kullanılmıştır.

PBAT nanofiber membranların kimyasal yapısını analiz etmek amacıyla Fourier dönüşümlü kızılötesi spektrofotometresi cihazı (Shimadzu-Infinity FTIR spectrometer, Japonya) kullanılmıştır.

Hücre kültürü çalışmalarının tümü laminer akış kabini ve 37 °C, %5 CO<sub>2</sub> ve %95 nem ortamı sağlayan inkübatör (Panasonic) ile gerçekleştirilmiştir. Besiyeri olarak DMEM (Dulbecco's modified Eagle Medium-High Glucose) (Sigma-Aldrich, Almanya), fetal sığır serumu (FBS), penisilin-streptomisin (antibiyotik-antimikotik), Tripsin/EDTA, GlutaMAX (Thermo Scientific, ABD) kullanılmıştır.

İnsan kardiyomiyosit hücrelerinin görüntülenmesi bir invert mikroskop (Leica, Almanya) ile gerçekleştirilmiştir. Canlı/ ölü hücre boyama analizi için Calcein-AM ve Ethidium homodimer-1 (Molecular Probes, Thermo Fisher, İngiltere) kullanılmıştır. Hüresiz Nanofiber membranların morfolojilerinin görüntülenmesi SEM taramalı elektron mikroskobu (ODTÜ-Merlab, FEI 430 Nova NanoSEM, ABD) yardımıyla gerçekleştirilmiştir.

Deney aşamalarında kullanılan ultra saf su için Millipore Direct-Q® 3 UV cihazı (Merck, Almanya) kullanılmıştır. Hazırlanan çözeltilerin pH ölçümleri Isolab pH metre ile yapılmıştır. Hüresizleştirilmiş miyokardiyal dokuların DNA analizi için Thermo Scientific GeneJet Genomic DNA Purification Kit kullanılmıştır. Absorbans ölçümleri için bir mikro plaka okuyucu (Thermo Scientific, Multiskan Sky Microplate Spectrophotometer) kullanılmıştır.

## **4.2 Yöntem**

### **4.2.1 Elektro eğirme yöntemi ile nanofiber PBAT membranların hazırlanması**

Elektro eğirme yönteminin optimizasyonu için, farklı konsantrasyonlarda (%5, %7,5 ve %10 (w/w)) Poli (bütilenadipat-ko-tereftalat) (PBAT) çözeltileri hazırlanmıştır. PBAT çözeltileri hazırlanırken organik çözücü olarak %80 Kloroform / %20 DMF kullanılmıştır. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan PBAT çözeltileri gece boyunca manyetik karıştırıcıda oda sıcaklığında karıştırılmıştır. Elde edilen PBAT çözeltileri 5 ml olacak şekilde plastik şırıngaya aktarılmıştır. Şırınga yatay olarak şırınga pompasına yerleştirilmiştir. Toplayıcı üzerine karton kağıt sarılmış ve nanofiberler karton üzerinde toplanmıştır. En iyi morfolojiye sahip nanofiberlerin elde edilmesi için çeşitli parametreler kullanılarak optimum parametreler belirlenmiştir. Optimizasyon için, voltaj 20-24 kV, akış hızı 3-5 ml/h, rotasyon 1100-1300 rpm aralıklarında denemeler yapılmıştır.

## **4.2.2 Karakterizasyon çalışmaları**

### **4.2.2.1 PBAT Pelletlerinin NMR analizi**

PBAT polimerinin yapısının anlaşılması ve doğrulanması amacıyla  $^1\text{H}$ -NMR analizi gerçekleştirilmiştir.

### **4.2.2.2 PBAT nanofiber membranların FTIR analizi**

FTIR analizi, PBAT membranların ve hücresizleştirilmiş ECM ile modifiye edilmiş PBAT membranların kimyasal yapısının incelenmesi amacıyla gerçekleştirilmiştir.

### **4.2.2.3 PBAT nanofiber membranların SEM analizi**

Elektro-eğirme yöntemi ile hazırlanmış farklı %5, %7,5 ve %10 (w/v) PBAT nanofiber membranların ve hücresizleştirilmiş ECM ile modifiye edilmiş PBAT membranların morfolojilerini incelemek amacıyla taramalı elektron mikroskopisi (SEM) analizi yapılmıştır.

### **4.2.2.4 İn vitro degradasyon çalışması**

İn vitro degradasyon çalışması %5, %7,5 ve %10 (w/v) PBAT nanofiber membranlar için 5 hafta süre ile uygulanmıştır. Enzimatik degradasyon çalışması için lipaz enzimi (lipase from porcine pancreas, Sigma, ABD) kullanılmıştır. 2 ml PBS içerisinde 1 mg lipaz olacak şekilde enzim çözeltisi hazırlanmıştır. PBAT membranlar 5 mm olacak şekilde kesilmiş ve 24 kuyucuklu kültür kaplarına alınmıştır. Üzerlerine enzim çözeltisi eklenmiştir. PBAT membranlar 37 °C’de bırakılmıştır. Çözeltiler haftada bir kez taze çözelti ile değiştirilmiştir. Kontrol grubu olarak, hidrolitik degradasyon için PBAT membranlar enzim içermeyen PBS içerisinde aynı şartlarda tutulmuştur. 1. 3. ve 5. hafta

için, membranlar çözeltilerden alınmış ve morfolojilerinin incelenmesi amacıyla SEM görüntüleri alınmıştır.

#### **4.2.3 Hücresizleştirilmiş sığır miyokardiyal ECM iskelelerin üretimi**

Kalp dokusu parçaları ultra saf su ile yıkanmış ve hücresizleştirme işlemi dört aşamalı olarak gerçekleştirilmiştir. Başlangıçta kalp dokuları küçük parçalara bölünerek oda sıcaklığında 48 saat (ilk aşama) 10 mM Trizma® hidroklorür ve 5 mM EDTA (pH: 8.00) içeren hipotonik solüsyon ile çalkalamalı inkübatöre bırakılmıştır. Yıkama aşamasından sonra, kalp dokuları 50 mM Trizma® hidroklorür, 5 mM EDTA (pH: 8.00), %1 SDS içeren bir deterjan solüsyonuna 72 saat süreyle (ikinci aşama) oda sıcaklığında daldırılmıştır. Kalp dokuları daha sonra deterjanın uzaklaştırılmasını sağlamak için tekrar ultra saf su ile yıkanmıştır. Kalp dokuları 37 °C'de 50 mM Trizma® hidroklorür içeren solüsyon ile 24 saat (üçüncü aşama) muamele edilmiştir. Daha sonra kalp dokuları 5 saat (dördüncü aşama) için oda sıcaklığında %4 etanol ve %0,1 perasetik asit karışımı kullanılarak dekontamine edilmiştir. Fazla reaktifleri tamamen çıkarmak için yıkama adımları tekrar edilmiştir.

Doku büyüklüğünün hücresizleştirme çalışmasına etkisini incelemek amacıyla, kalp dokuları 1 cm<sup>3</sup> olacak şekilde kesildikten sonra hücresizleştirme protokolü tekrar edilmiştir. Bu aşamalardan sonra, hücresizleştirilmiş kalp dokuları gece boyunca -86 °C'de dondurulmuştur, daha sonra 24 saat liyofilize edilmiştir.

##### **4.2.3.1 Hücresizleştirilmiş sığır miyokardiyal dokuların nötralizasyonu ve jelleştirilmesi**

Hücresizleştirilen miyokardiyal dokular pepsin sindirim protokolüne göre sindirilmiştir. Bu protokole göre pepsin (600-1200 U/mg) içeren 0.01 M HCl çözeltisi içerisinde 10 mg/ml konsantrasyonda olacak şekilde hücresizleştirilmiş miyokardiyal dokular çözündürülmüş ve manyetik karıştırıcıda işlenmiştir.

Pepsin ile enzimatik sindirim 72 saat boyunca oda sıcaklığında, bulanık ve homojen çözelti elde edilene kadar sürdürülmüştür. Daha sonra 0,1 N NaOH [1/10 (v/v) oranında] ve 10x PBS [1/9 (v/v) oranında] jelleştirme işlemini tamamlamak amacıyla çözeltiye eklenmiştir. Hazırlanan çözelti cam şişelere alınarak 1 saat 37 °C'de inkübe edildikten sonra jelleştirilmiştir.

#### **4.2.4 Karakterizasyon çalışmaları**

##### **4.2.4.1 Hücresizleştirilmiş miyokardiyal dokuların DNA içerik analizi**

Hücresizleştirme öncesi ve sonrası miyokard dokularındaki DNA miktarını belirlemek amacıyla DNA içerik analizi yapılmıştır. Kısaca, 5 mg olacak şekilde liyofilize edilen örnekler 180 µL parçalama solüsyonu ve 20 µL Proteinaz K solüsyonu ile muamele edildikten sonra vortekslenerek iyice karıştırılmıştır. Doku örnekleri, çalkalayıcı bir su banyosu kullanılarak tamamen parçalanana kadar 56 °C'de inkübe edilmiştir. DNA kantifikasyon kitinin talimatı izlenmiştir. DNA içeriği Thermo-Scientific Multiscan GO µdrop plaka okuyucu kullanılarak ölçülmüştür ve DNA miktarındaki yüzde azalma belirlenmiştir.

##### **4.2.4.2 Glikozaminoglikan (GAG) içerik analizi**

Hücresizleştirme öncesi ve sonrası miyokard dokularındaki glikozaminoglikan (GAG) miktarları spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Örneklerin liyofilizasyonundan sonra, parçalama adımı DNA içerik analizinde tarif edildiği gibi 180 uL sindirim solüsyonu ve 20 uL proteinaz K ile 56 °C'de 1 saat çalkalayıcı su banyosu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. 40 ml olacak şekilde örnekler 96 kuyucuklu kültür kabına alınarak, her bir kuyucuğa 200 ml 1,9-dimetil metilen mavisi (DMMB) solüsyonu ilave edilmiş ve ardından 525 nm'de absorbans ölçümü gerçekleştirilmiştir.

#### 4.2.4.3 BCA Analizi ile protein içeriğinin belirlenmesi

BCA protein analiz yönteminin prensibi, bakır sülfatın BCA solüsyonuna eklenmesi ile oluşan kompleksin yeşil renk vermesi esasına dayanmaktadır. Bu solüsyonun protein örnekleri ile etkileşmesi ile BCA, proteinlerden elektron alır.  $\text{Cu}^{2+}$  iyonlarını  $\text{Cu}^+$  iyonlarına indirger ve bakır katyonlarına bağlanır. Bunun sonucu olarak oluşan kompleksin rengi mor renge dönüşür. Mor renk 562 nm’de spektrofotometrik olarak ölçülmektedir.

Doğal ve hücresizleştirilmiş dokuların toplam protein konsantrasyonları, ticari bir kit olan ‘Thermo Scientific BCA analiz kiti’ ile üretici firmanın önerdiği şekilde belirlenmiştir. Standart olarak sığır serum albümin (BSA) kullanılmıştır. Kısaca, 25  $\mu\text{L}$  standart BSA ve 25  $\mu\text{L}$  dilüe edilmiş numunelere 200  $\mu\text{L}$  BCA çalışma reaktifi ilave edildikten sonra karanlıkta 30 dakika inkübe edilmiştir. Daha sonra optik yoğunluk ölçümleri 562 nm’de mikro plaka okuyucu kullanılarak elde edilmiştir. Standart protein çözeltilerinden elde edilen absorbans değerleri yardımıyla standart grafik hazırlanarak, grafikten örneklerle ait protein konsantrasyonları belirlenmiştir.

#### 4.2.4.4 Reoloji

dECM hidrojeli için hidrojelleşmeyi doğrulamak amacıyla, reolojik karakterizasyon gerçekleştirilmiştir. Analiz için bir reometre cihazı (MCR 301, Physica, Almanya) kullanılmıştır. Hidrojin lineer viskoelastik bölgesi (LVR), %0.01-100 gerinim aralığında ve 1 Hz frekansta salınımlı gerinim taraması ile elde edilmiştir. dECM’nin gerçek zamanlı hidrojelasyon kabiliyetini izlemek için, 3s aralıklarla 30 dk boyunca 37 °C’de zaman taraması (1 Hz) gerçekleştirilmiştir.  $G'$  (elastik modül) ve  $G''$  (viskoz modül) değerleri zamana bağlı olarak kaydedilmiştir.

#### 4.2.5 Histoloji alışmaları

Hücreşizleştirilmiş sığır miyokardiyal ECM iskelelerinin ve kontrol (hücreşizleştirme işlemi uygulanmamış) dokular histolojik boyama yapılarak incelenmiştir.

Histolojik boyama, dokuların morfolojilerini anlamaya yardımcı olmak amacıyla histolojik lekeler kullanılarak boyama yapılarak örnek dokuların hazırlanmasında gerçekleştirilen bir dizi teknik işlemdir. Bu işlemde boyama, dokunun önemli özelliklerini vurgulamak ve doku kontrastını artırmak için kullanılır. Hematoksilen, bu amaçla yaygın olarak kullanılan ve çekirdeği mavimsi bir renge boyayan, eozin ise hücrenin sitoplazmasını pembemsi bir renge boyayan temel bir boyadır. Masson Trikrom ise, baę dokusu liflerinin, kollajen fibrillerinin ve hücre çekirdeklerinin görüñtülenmesi için kullanılan histolojik bir boyadır. Kas lifleri kırmızı, çekirdek kahverengi/siyah ve kollajen fibriller mavi tonları ile boyanırlar.

Histolojik alışma için doku iskeleleri fiksasyon amacıyla %10'luk formalin içerisinde 24 saat 4 C'de bekletilmiştir. Dokulardan kesit alınarak tekrar %10'luk formalin çözeltisinde 24 saat 4 C'de bekletilmiştir. Dokular formalin çözeltisinden alınarak 24 saat boyunca suda bekletilmiştir. Daha sonra dokular sırasıyla aşağıdaki çözeltilerde belirtilen sürelerde bekletilmiştir.

1. 15 dk su
2. 15 dk su
3. 30 dk %80 etil alkol
4. 30 dk %90 etil alkol
5. 30 dk %96 etil alkol
6. 15 dk %100 etil alkol
7. 15 dk %100 etil alkol
8. 30 dk 2Alkol 1Ksilol
9. 15 dk 1Alkol 2Ksilol
10. 15 dk ksilol
11. 15 dk 2Ksilol 1Parafin
12. 30 dk 1Ksilol 2Parafin

Daha sonra dokular kasetlere alınarak 24 saat (58 C'de) parafin içerisinde bekletilmiştir. Parafinde bekleyen dokular inkübatörden alınarak üzerlerine beyaz kasetler koyularak ve üzerlerini tam kaplayacak şekilde parafin ilave edilmiştir. Örneklerden 5 µm kesit alınmıştır.

#### **4.2.5.1 Hematoksilen ve eozin boyaması**

Bütün lamlardaki fazla parafinin erimesi için bir gece etüvde bekletilmiştir (65 C). Daha sonra dokular sırasıyla aşağıdaki çözeltilerde ve belirtilen sürelerde bekletilmiştir.

1. 15 dk 65 C ksilol
2. 15 dk oda sıcaklığında ksilol
3. 7 dk %96 etil alkol
4. 7 dk %90 etil alkol
5. 7 dk %80 etil alkol
6. 7 dk %70 etil alkol
7. 10 dk distile su
8. 30 dk hematoksilen
9. 1 dk eozin
10. 5 dk %80 etil alkol
11. 5 dk %90 etil alkol
12. 5 dk %96 etil alkol
13. Yeterki kadar entellan (Mounting Medium) ile lamlar kapatılmıştır.

#### **4.2.5.2 Masson-trikrom boyaması**

A ve B solüsyonlarında eşit miktarda karıştırılıp lamdaki doku örnekleri karışımda 10 dk bekletilmiştir.

1. Örnekler hızlıca distile sudan geçirilmiştir.
2. C solüsyonunda 4 dk bekletilmiştir.
3. Distile sudan geçirilmiştir.
4. D solüsyonunda 15 dk bekletilmiştir.

5. Distile sudan geçirilmiştir.
6. E solüsyonunda 5 dk bekletilmiştir.
7. Örnekler yıkanmadan F solüsyonunda 7-8 dk bekletilmiştir.
8. Distile sudan geçirilmiştir.
9. Sırayla%96 ve %99,9 etil alkolden geçirilmiştir.
10. Sırayla Xyleneden 2 kere 2'şer dakika geçirilmiştir.
11. Yeterki kadar entellan (Mounting Medium) ile lamalar kapatılmıştır.

Hematoksilen& Eozin ve Masson-Trikrom boyamalarından sonra entellan ile kaplanan lamalar 1 gece boyunca etüvde bekletilmiştir. Lamadaki örnekler ışık mikroskobu ile incelenmiştir.

#### **4.2.6 Hücre kültürü çalışmaları**

İnsan kardiyomiyosit hücreleri (HCM), 37 °C sıcaklıkta hızlı bir şekilde çözündürülmüş ve hücre süspansiyonu pipet yardımıyla 15 ml'lik tüplere alınarak 1000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Hücre pelleti çöktürüldükten sonra süpernatant pipet yardımıyla uzaklaştırılmıştır. Daha sonra pellet üzerine 4 ml %10 (v/v) fetal sıgır serumu (FBS) ve %1 (v/v) Antibiyotik-Antimikotik içeren DMEM (yüksek glikoz) eklenmiş ve 3 adet 75 cm<sup>2</sup>'lik kültür kaplarında 37 C'de, %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde kültür edilmişlerdir.

Kültür ortamı her üç günde bir değiştirilmiştir ve hücreler haftada bir pasajlanmıştır. Hücrelerin dondurularak saklanması işleminde ise %10 (v/v) DMSO ve %90 serum içeren DMEM (yüksek glikoz) kullanılmıştır. %80 bolluğa ulaşan hücreler tripsinizasyon işlemi ile pasajlanmıştır. Bu aşama için, vasat kültür kaplarından 10 ml'lik pipet yardımıyla uzaklaştırılmıştır ve 10 ml Dulbecco fosfat tamponlu tuz çözeltisi (DPBS) ile 3 defa yıkanmıştır. Daha sonra 1 ml %0,05 tripsin/ EDTA içeren çözelti ile 4-5 dakika 37 °C'de, %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatör içerisinde bekletilmiştir. Hücreler kültür kabı yüzeyinden ayrılmaya başladığında kültür kabına hafifçe vurularak hücrelerin tamamen kültür kabından ayrılması sağlanmıştır.

Kültür kabı yüzeyinden ayrılan hücrelere 4 ml vasat ilave edilmiş, elde edilen süspansiyon 15 ml'lik santrifüj tüplerine alınmış ve 1000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir.

#### **4.2.7 PBAT nanofiber membranların dECM ile modifiye edilmesi**

Elektro-eğirme tekniği ile farklı konsantrasyonlarda elde edilen PBAT membranlar, 1cm<sup>2</sup> olacak şekilde kesilmiştir ve 24 kuyucuklu kültür kaplarına alınmıştır. Membranların sterilizasyon işlemi için, kuyucuklara alınan PBAT membranlar 1 saat boyunca %80 etil alkol ile muamele edilmiştir. Daha sonra, etil alkol kuyucuklardan çekilerek, membranlar DPBS ile 5 kere yıkanmıştır. Bir süre laminar akış kabini içerisinde membranların kuruması beklenmiştir. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan dECM çözeltileri bir sprey şişesi yardımıyla PBAT membranların üzerlerine 1 kere spreyleneştir.

##### **4.2.7.1 Modifiye edilen PBAT membranların SEM analizi**

Belirlenen optimum PBAT membranlar üzerine spreylene hücre dışı matris konsantrasyonunun etkisinin gözlenmesi ve HCM'lerin modifiye membranlara tutunması ve membran üzerindeki morfolojilerinin incelenmesi amacıyla SEM analizi gerçekleştirilmiştir.

Bu amaçla, PBAT membranlar 1 cm<sup>2</sup> olacak şekilde kesilerek, 24 kuyucuklu kültür kaplarına her kuyucuğa bir membran gelecek şekilde alınmıştır, membran sterilizasyonundan sonra ECM spreyleneerek modifiye edilen membranlar kurutulduktan sonra SEM analizi için hazırlanmıştır. Membranların morfolojileri incelenmiştir.

#### **4.2.8 Hücrelerin modifiye edilmiş PBAT membranların üzerine ekilmesi ve membran optimizasyonu**

Kültür edilen HCM'ler %80 bolluğa ulaştıktan sonra, kültür kaplarındaki vasat pipet yardımıyla çekilerek, hücreler 10 mL DPBS ile yıkanmıştır. Kültür kaplarına 1 mL %0,05 Trypsin- EDTA çözeltisi ilave edilmiştir. Kültür kapları 5 dk boyunca inkübatörde bekletilmiştir. Hücreleri kültür kap yüzeyinden kaldırmak amacıyla kültür kaplarına 1-2 kez hafifçe vurulmuştur. Trypsini inhibe etmek için, hücrelerin yüzeyden kalktığı gözlemlendikten sonra kültür kaplarına 4 mL besi yeri eklenmiştir. Süspansiyon 15

mL'lik tüpler içerisinde 1000 rpm'de 5 dk boyunca santrifüj edilmiştir. Santrifüjden sonra oluşan pellete zarar vermeden süpernatant atılmıştır.

İlk olarak hücre yapışması ve çoğalması için uygun PBAT membranların seçilmesi amacıyla PBAT optimizasyonu yapılmıştır. Bunun için, %5, %7,5 ve %10 (w/w) PBAT membranlar 1 cm<sup>2</sup> olacak şekilde kesilerek, 24 kuyucuklu kültür kaplarına her kuyucuğa bir membran gelecek şekilde alınmıştır. HCM'ler membranlar üzerine 35.000 hücre/membran olacak şekilde ekilmiştir. Üç günde bir kere taze hazırlanan besiyerleri ile besiyeri değişimi yapılmıştır.

MTS analizi, canlı-ölü hücre boyaması ve immünfloresan boyama ile optimum PBAT membran konsantrasyonu belirlendikten sonra, belirlenen konsantrasyondaki PBAT membran üzerine iki farklı konsantrasyonda ECM spreylenecektir. MTS analizi, canlı ölü hücre boyama ve immünfloresan boyamalar ECM spreylenecek PBAT membranlar için de gerçekleştirilmiştir.

#### **4.2.8.1 Hücrelerin çoğalma kapasitelerinin belirlenmesi (MTS analizi)**

İnsan kardiyomiyosit hücrelerinin canlılığı ve çoğalma kapasitesi tespiti için MTS 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-yl)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sülfonil)-2H-tetrazolyum kullanılmıştır. MTS testi, bir kalorimetrik test olup, tetrazolyum bileşiğinin canlı hücrelerin mitokondriyal aktivitesi ile indirgenmesi ve renkli bir formazan bileşiğine dönüştürülmesi prensibine dayanır.

Bu sebeple, PBAT membranlar 1 cm<sup>2</sup> olacak şekilde kesilerek, 24 kuyucuklu kültür kaplarına her kuyucuğa bir membran gelecek şekilde alınmıştır ve ECM spreylenecek modifiye edilen membranlara ve ECM spreylenecek membranlara HCM'ler 35.000 hücre/membran olacak şekilde ekilmiştir. Hücre kültürünün 2. ve 7. gününde kuyucuklardan besiyeri uzaklaştırılarak her bir kuyucuğa 100 µL DPBS ve 20 µL MTS çözeltisi ilave edilerek 37 °C'de ve %5 CO<sub>2</sub> ortamı sağlayan inkübatörde 1 saat

bekletilmiştir. Daha sonra çözelti kuyucuklardan alınarak 96 kuyucuklu kültür kabına alınmış ve 490 nm’de absorbans ölçümü alınmıştır.

#### **4.2.8.2 Canlı/ölü hücre boyama**

Canlı ve ölü hücreleri belirlemek amacıyla boya olarak Kalsein-AM ve ethidium homodimer-1 (Eth-1) kullanılmıştır. Kalsein-AM, canlı hücrelerin membranlarından geçebilme özelliğine sahip olduğundan, canlı hücrelerin tespit edilmesine imkan sağlamaktadır. Ethidium homodimer-1 ise canlı hücrelerin membranlarından geçemediğinden dolayı ölü hücrelerin belirlenmesi amacıyla kullanılan bir boyadır. Canlı-ölü hücre boyaması ECM spreyleneş ve spreyleneşmemiş PBAT membranlar için gerçekleştirilmiştir.

Hücre canlılığının belirlenmesi amacıyla, PBAT membranlar 1 cm<sup>2</sup> olacak şekilde kesilerek, 24 kuyucuklu kültür kaplarına her kuyucuğa bir membran gelecek şekilde alınmıştır, membran sterilizasyonundan sonra ECM spreyleneşerek modifiye edilen membranlara ve ECM spreyleneşmemiş membranlara HCM’ler 35.000 hücre/membran olacak şekilde ekilmiştir. Hücre ekiminin 2. ve 7. günlerinde, canlı-ölü hücre boyama testi yapılmıştır. Bunun için kuyucuklardan besiyeri çekilip atılmış ve ardından tüm numuneler canlı ve ölü hücrelerin varlığını doğrulamak için 150 uL (1:2) Ethidium homodimer-1 ve Kalsein-AM karışımı (DPBS içerisinde) ile boyanmıştır. 5 dakika 37 °C’de inkübasyondan sonra canlı ve ölü hücreler floresans mikroskobu altında incelenmiştir.

#### **4.2.8.3 İmmünfloresan boyama**

Hücrelerin modifiye edilmemiş ve dECM ile modifiye edilmiş nanofiber PBAT membranların üzerindeki yapışması, yayılması ve morfolojik incelemeleri için immün boyama yapılmıştır. Hücre çekirdekleri DAPI ile, aktin filamentleri ise Alexa Fluor 488 Phalloidin β-aktin antikoru ile boyanmış ve floresan mikroskop altında inceleme yapılmıştır.

Bu amaçla, PBAT membranlar 1 cm<sup>2</sup> olacak şekilde kesilerek, 24 kuyucuklu kültür kaplarına her kuyucuğa bir membran gelecek şekilde alınmıştır. Membran sterilizasyonundan sonra ECM spreylenecek modifiye edilen membranlara ve ECM spreylenecek membranlara HCM'ler 35.000 hücre/membran olacak şekilde ekilmiştir.

Hücre kültür çalışmasının 2.gününde hücelere fiksasyon işlemi yapılmıştır. Bu işlem için, kuyucuklardaki besiyeri çekilip atılarak DPBS ile 3 kere yıkama yapılmıştır. Ardından kuyucuklara 300 µL %4 paraformaldehit çözeltisi eklenmiştir. 15 dk 25 °C'de bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda paraformaldehit kuyucuklardan çekilip atılmış ve DPBS ile 3 kere yıkama yapılarak fiksasyon işlemi tamamlanmıştır. Daha sonra her bir kuyucuğa 300 µL (%0,1) triton X 100 çözeltisi eklenerek 15 dk 25 °C'de bekletilmiştir. Triton x-100 çözeltisi çekilip atılmış ve DPBS ile 3 kere yıkama yapılmıştır. DPBS uzaklaştırıldıktan sonra, taze olarak hazırlanan (%0.1) BSA çözeltisi 300 µL olacak şekilde kuyucuklara eklendikten sonra 1 saat 25 °C'de inkübasyon yapılmıştır. Sürenin sonunda BSA çekilip atılmış ve DPBS ile yıkama işlemi tekrar edilmiştir. Malzemeleri kaplayacak kadar primer antikor ilavesi her kuyucuğa yapıldıktan sonra 1 gün +4 °C'de bekletilmiştir. Ertesi gün primer antikor çözeltileri çekilip atıldıktan sonra DPBS ile 3 kere yıkama yapılmıştır. Sekonder antikor ilavesi yapıp 45 dk 25 °C'de ve karanlık ortamda inkübasyon yapılmıştır. Sürenin sonunda DPBS ile yıkama işlemi 3 kere yapılarak her kuyucuğa DAPI boya çözeltisi eklenmiş ve floresan mikroskop altında görüntüleme yapılmıştır.

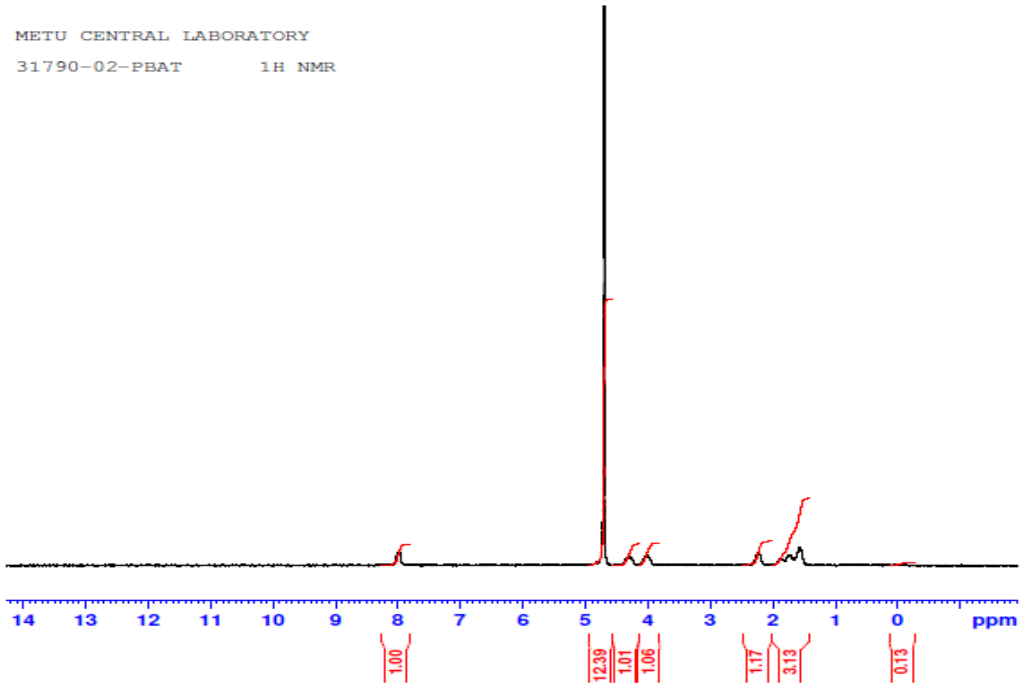
## 5. BULGULAR

Kardiyak doku mühendisliği için ideal iskele malzemesini elde etmek amacıyla, elektro-eğirme yöntemiyle PBAT nanofiber yapıdaki membranlar üretilmiş ve miyokardiyal hücre dışı matris ile modifiye edilmesinden sonra yapılan hücre kültürü çalışmalarının sonucunda aşağıdaki bulgular elde edilmiştir.

### 5.1 Karakterizasyon Çalışmaları

#### 5.1.1 PBAT pelletlerinin NMR analizi

PBAT polimerinin yapısının anlaşılması amacıyla  $^1\text{H}$ -NMR analizi gerçekleştirilmiştir.



Şekil 5.1 PBAT  $^1\text{H}$ -NMR analizi

PBAT'nin  $^1\text{H-NMR}$  spektrumuna bakıldığında, 8 ppm'de (H,4) görünen aromatik protonların sinyali, polimer zincirindeki fenilen yapısını göstermektedir. PBAT'nin yapısındaki bütülen adipat ünitesinin  $\text{CH}_2$  proton gruplarının sinyalleri 4.15, 4.09 ve 2.34 ppm'de görülmektedir.

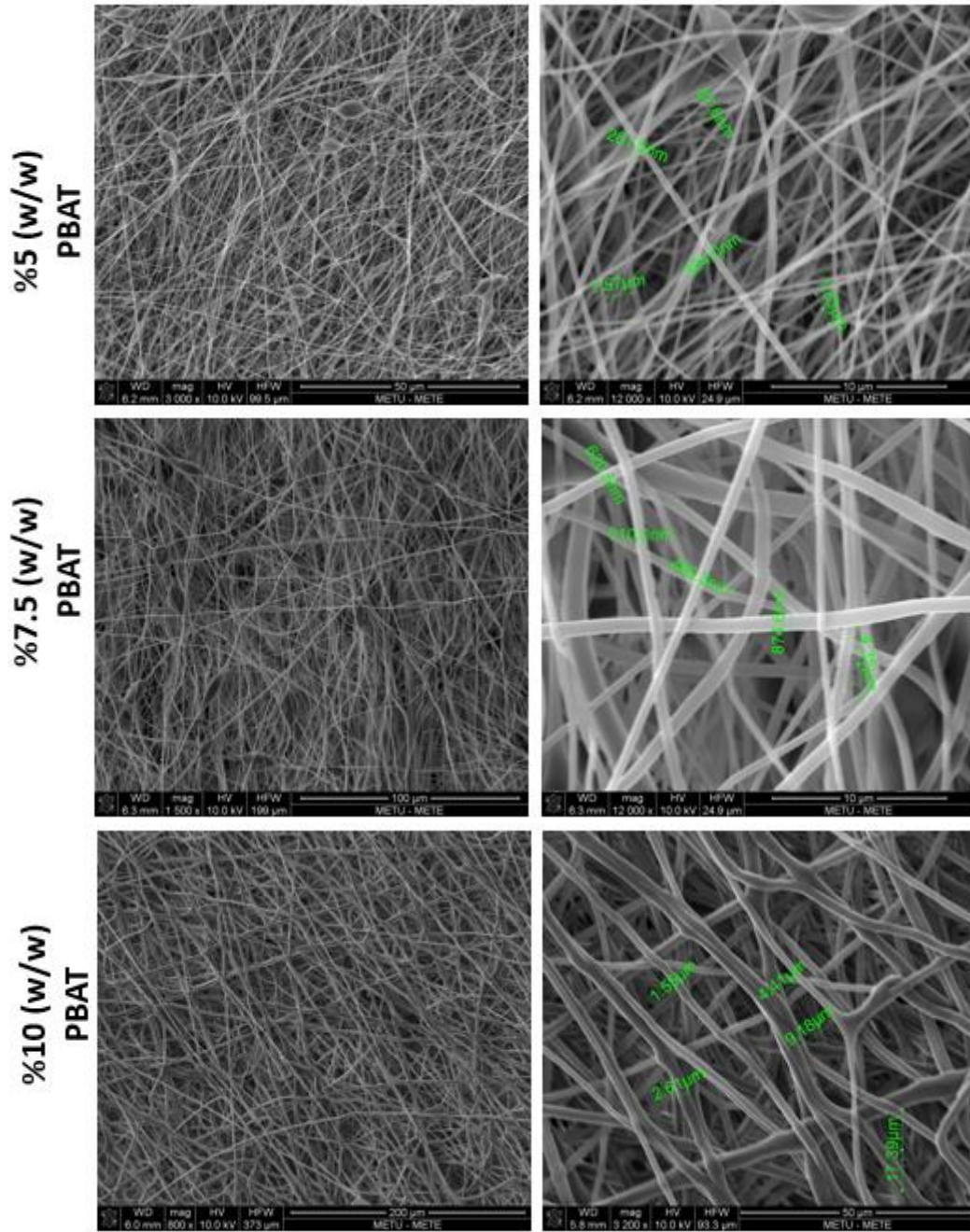
### 5.1.2 PBAT nanofiber membranların hazırlanması ve SEM analizi

Membran optimizasyon için, voltaj 20-24 kV, akış hızı 3-5 ml/h, rotasyon 1100-1300 rpm aralıklarında denemeler yapılmıştır. En uygun parametreler Tablo 2'de verilmiştir. 21 kV voltaj, saatte 4 ml akış hızı, 1100 rpm rotasyon ve şırınga-toplayıcı arasındaki mesafe 124 mm olarak belirlenmiştir. Bu parametreler haricinde uygulama yapıldığında iğne ucu tıkanması ve ıslaklık gözlenmiştir. Hazırlanan bütün PBAT çözeltilerinden aynı parametreler kullanılarak sorunsuz nanofiber membranlar elde edilmiştir.

Çizelge 5. 1 Elektro-eğirme işleminde kullanılan parametreler

| Elektro eğirme parametreleri |          |                                                |        |
|------------------------------|----------|------------------------------------------------|--------|
| <b>Voltaj</b>                | 21 kV    | <b>Çözelti hacmi</b>                           | 5 ml   |
| <b>Akış hızı</b>             | 4 ml/h   | <b>Şırınga-Toplayıcı<br/>Arasındaki mesafe</b> | 124 mm |
| <b>Rotasyon</b>              | 1100 rpm |                                                |        |

%5, %7,5 ve %10 (w/w) olarak üç farklı konsantrasyonda hazırlanan elektrospon nanofiber membranların morfolojilerini incelemek ve fiber çaplarını karşılaştırmak amacıyla taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizi yapılmıştır. Görüntüler 21 kV voltaj değerinde, 124 mm toplayıcı mesafesinde, 1100 rpm'de ve saatte 4 ml akış hızı parametrelerinden elde edilmiştir.

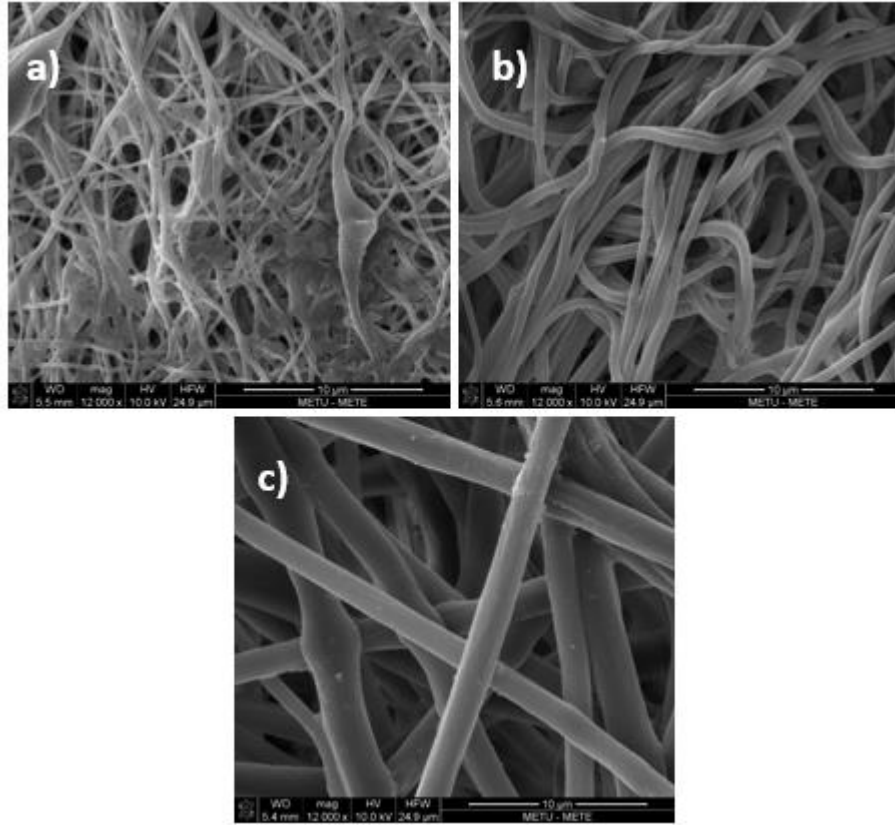


Şekil 5.2 %5, %7,5 ve %10 (w/w) PBAT membranların SEM görüntüleri

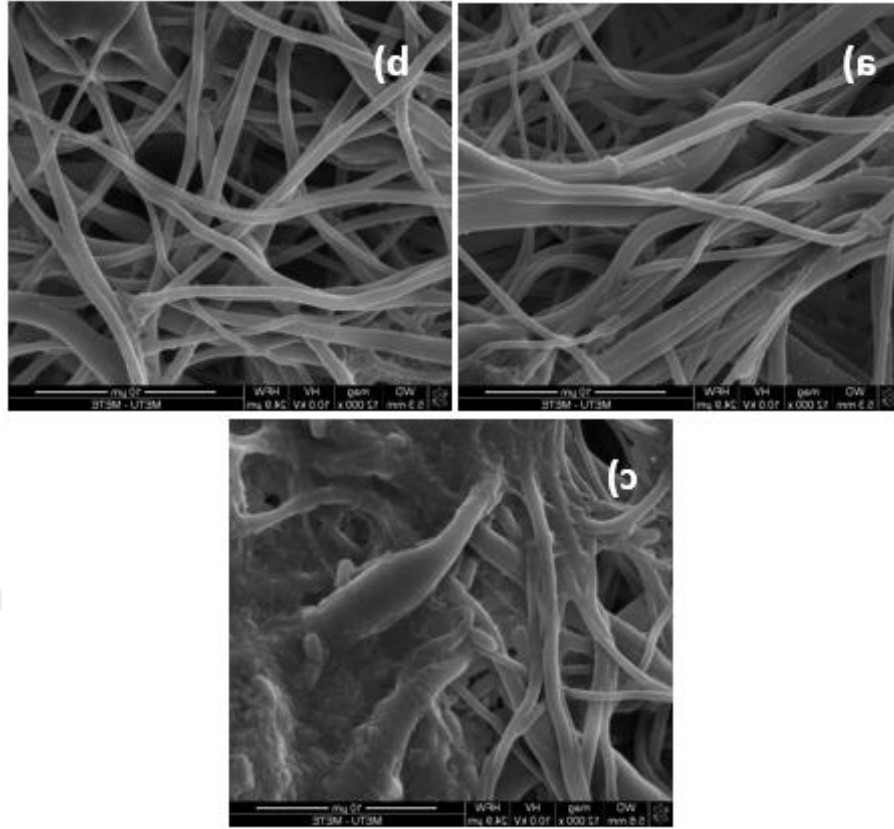
Yapılan analiz sonucu elde edilen SEM görüntüleri Şekil 5.2’de verilmiştir. %10 (w/w) PBAT membranda boncuk oluşumu gözlenmezken, %5 ve %7,5 (w/w) PBAT membranlarda gözlenmiştir. Doku mühendisliğinde kullanılmak üzere hazırlanan elektrospun PBAT nanofiberlerin, temas yüzeyi, mezoporozite, hücre yapışması, adhezyon, protein tanıma ve dolayısıyla kalp dokusu rejenerasyonu için uygun olmasını

sağlamak amacıyla boncuksuz ve kalın olmaması amaçlanmıştır. %5, %7,5 ve %10 (w/w) PBAT membranların ortalama fiber çapları sırasıyla 244.3 nm, 615.7 nm ve 4.4  $\mu$ m olarak ölçülmüştür. PBAT konsantrasyonu arttıkça, fiber çaplarında kalınlaşma olduğu görülmektedir. %5 (w/w) PBAT membranda boncuk oluşumu diğer konsantrasyonlardaki membranlara göre daha fazla görülmüştür. 5%, %7,5 ve %10 (w/w) olarak üç farklı konsantrasyonda hazırlanan çözeltilerden elde edilen elektrospon nanofiber membranların fiber çapları incelendiğinde, doku mühendisliğinde kullanımı için en uygun morfolojide olanın %5 ve %7,5 (w/w) PBAT nanofiber membranlar olduğu sonucuna varılmıştır.

### 5.1.3 İn vitro degradasyon çalışması



Şekil 5.3 Enzimatik degradasyon uygulanan a) %5, b) %7,5, c) %10 (w/w) PBAT membranların 3. hafta SEM görüntüleri (12000x)



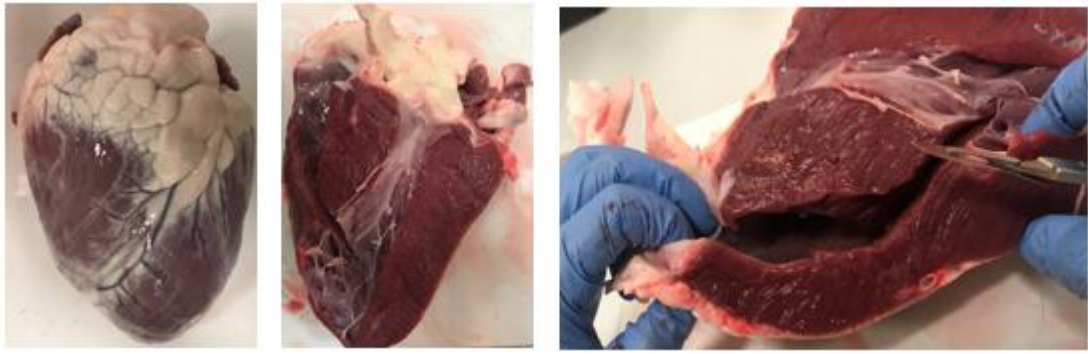
Şekil 5.4 Enzimatik degradasyon uygulanan %7,5 (w/w) PBAT membranların a) 1. hafta b) 3. hafta c) 5. hafta SEM görüntüleri (12000x)

Çoğu alifatik polyesterin aksine, poli (etilen tereftalat) veya poli (bütilen tereftalat) gibi aromatik polyesterler mükemmel malzeme özellikleri sağlamaktadır ve ticari olarak yaygın olarak kullanılmaktadırlar. Biyolojik olarak parçalanabilirliği ve iyi mekanik özellikleri birleştirmek amacıyla alifatik ve aromatik monomerler içeren PBAT gibi kopolyesterler özellikle doku mühendisliği çalışmaları için uygun bir kombinasyondur (Müller vd. 2001).

%5, %7,5 ve %10 (w/w) PBAT membranların in vitro degradasyon çalışmasının 3. hafta SEM görüntüleri Şekil 5.3’de verilmiştir. Lipaz enziminin alifatik polyesterlerin ester bağınyı parçaladığı iyi bilinmektedir. Enzimatik bozunma, katı substratın yüzeyinde ilerler, çünkü enzimler katı substratın polimer sistemlerine nüfuz edemezler (Mochizuki vd. 1997, Marten vd.2005) Bu nedenle, lipaz enzimi ile gerçekleştirilen PBAT

membranların in vitro degradasyon çalışmasında, Şekil 5.4’da görüldüğü üzere 3. ve 5. haftada fiberler üzerinde fazla belirgin olmamakla birlikte pürüz şeklinde yapısal bozunmalar olduğu gözlenmiştir. Fiber yüzeylerindeki parçacıklar lipaz enzimine ait kristallerdir.

## 5.2 Hücresizleştirilmiş Sığır Miyokardiyal Matris Üretimi (dECM) Ve Karakterizasyonu



Şekil 5.5 Kalp dokusundan miyokard bölgesinin ayrılması



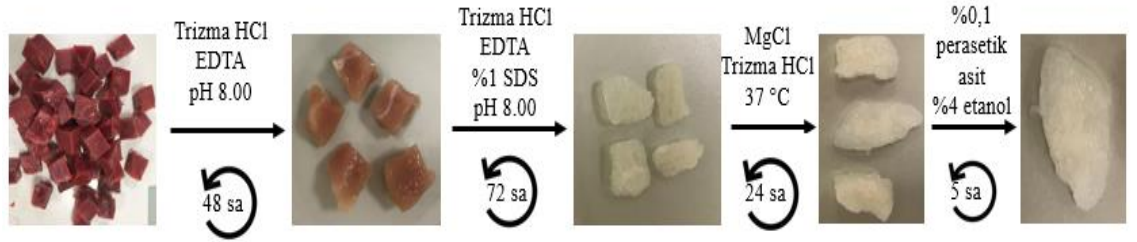
Şekil 5.6 Farklı boyutlarda kesilen sığır kalp dokularının SDS ile gerçekleştirilen hücresizleştirme işlemi sonrasındaki görüntüleri

Kalp dokusundan miyokard bölgesinin ayrılması Şekil 5.5’de, farklı boyutlarda kesildikten sonra hücresizleştirme işlemi uygulanan kalp dokuları ise Şekil 5.6’da verilmiştir. Kalp dokuları küçük parçalara ayrılarak hücresizleştirme işlemi uygulandığında, yüzey alanı küçüldüğünden SDS dokulara fazlaca nüfuz etmiştir. Hücresizleştirme işleminden sonra pepsin ile sindirilen dokulara jelleştirme protokolü uygulanmıştır. Sindirilen dokularda jelleşme çok az miktarda olmuştur. ECM’in jelleştirilememesi SDS’in yıkama işlemlerinde dokulardan tamamen uzaklaştırılamamasına, hücresel materyalin tam olarak uzaklaştırılamamasına veya küçük parçalara ayrılarak SDS uygulamasının ECM’nin yapısını bozmuş olabileceğine bağlanabilir.

Matriks yapısında bulunan proteinler, büyüme faktörü ve hücre yüzey reseptörleri ile etkileşime geçtikleri için, ECM yapısının bozulmadan, bir bütün halinde korunması, hücre için gerekli yapısal ve fonksiyonel molekülleri bulundurması hücre çalışmaları için oldukça önemlidir. Higuchi ve ark. 2013 yılında yaptıkları çalışmada, ECM’nin hücre farklılaşmasındaki rolü bilinmesine rağmen, dokuya özgü ECM bileşenlerinin ve ECM’nin 3 boyutlu yapısının korunmasının hücre farklılaşmasını yönettiğini göstermişlerdir. Bu çalışmada kök hücrelerin kardiyomiyosite farklılaşması amacıyla, proteomik yaklaşım kullanılarak kalp ve karaciğer ECM’leri arasında ECM proteinlerinin protein profillerini karşılaştırılmıştır ve ECM bileşiminin bu iki doku arasında büyük ölçüde farklı olduğu bulunmuştur. Bulgulara göre kalp ECM’si, kardiyomiyosit farklılaşmasına yardımcı olabilecek kolajen V dışında birçok protein bileşenini içermektedir.

Son çalışmalarda, ECM bileşenlerindeki farklılıkların, her bir integrin ailesi reseptörünün aktivasyonu yoluyla hücreler arası dinamikler üzerinde farklı etkilere sahip olduğu gösterilmiştir. Yapılan çalışmalarda şimdiye kadar 24 çeşit integrin rapor edilmiş ve bu integrin aileleri ile ECM molekülleri arasındaki seçici bağlanma ortaya çıkarılmıştır (Hynes, R.O 2002).

Örneğin, integrin dört formunun,  $\alpha 1\beta 1$ ,  $\alpha 2\beta 1$ ,  $\alpha 10\beta 1$  ve  $\alpha 11\beta 1$ 'in kolajene bağlandığı, oysa  $\alpha 1\beta 1$ ,  $\alpha 2\beta 1$  ve  $\alpha 10\beta 1$  integrin reseptörlerinin laminin'e bağlandığı bilinmektedir. ECM bileşenleri de önemli olabilir. Bu çalışmada kalp ECM'sinde bulunan ana bileşenlerin karaciğer ECM'sinde de mevcut olduğu bulunmuştur ve bu nedenle, bileşenler önemli ölçüde farklılık göstermese de, kardiyomiyosit farklılaşmasını teşvik eden belirli bir ECM protein oranı olabileceği gösterilmiştir. Çalışmadaki verilere göre kalp ve karaciğer ECM'si farklı elastisite sergilemektedir ve uygun dokunun ECM molekülleri, gözenek boyutu ve esnekliği ile kardiyomiyositlere farklılaşmayı desteklediği düşünülmektedir. Bu çalışmalardaki sonuçlara dayanarak, kalp ECM'sinin yapısını bozmadan, doku boyutu ayarlanarak hücresizleştirme yapılması oldukça önem taşımaktadır.

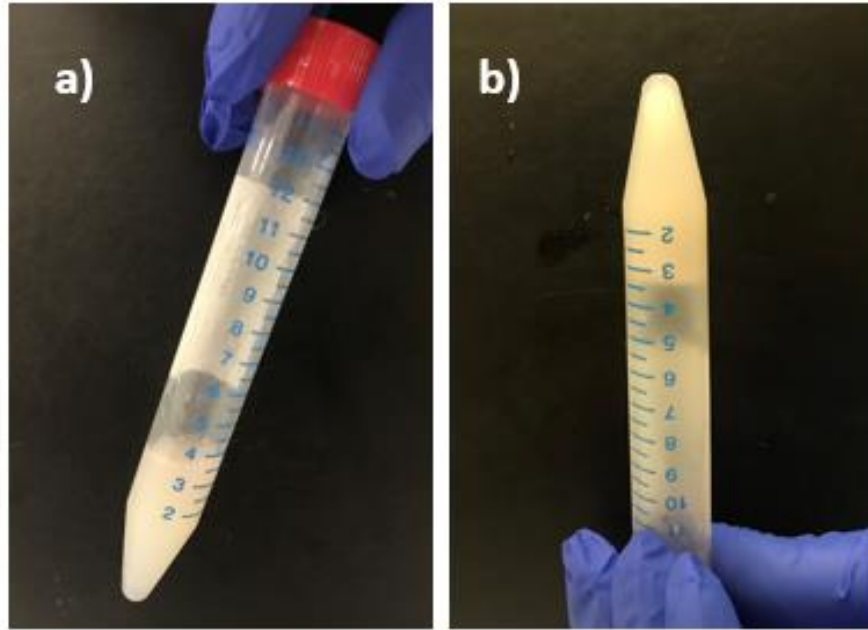


Şekil 5.7 Kalp dokularının hücresizleştirme aşamaları

Sığır kalp dokularının hücresizleştirme aşamaları Şekil 5.7’de verilmiştir. Kalp dokuları 1 cm<sup>3</sup> olacak şekilde parçalara ayrılmış ve hücresizleştirme protokolü uygulanmıştır. Trizma HCl ve EDTA ile 48 saat boyunca manyetik karıştırıcıda bırakıldıktan sonra kalp dokuları SDS ile hücresizleştirmeye devam edilmiştir. Şekil 5.7’de görüldüğü gibi, SDS ile hücresizleştirme yapılan kalp dokuları başarı ile hücrelerinden arındırılmıştır. Bunun sebebi, SDS gibi iyonik deterjanların dokunun istenmeyen doğal bileşenlerini başarıyla çıkarabilmesidir. Fakat SDS dokunun yapısal proteinlerine zarar verebilmektedir. Yapısal proteinlere ve bileşenlere zarar verilmesi, hücrelerin daha önce olduğu gibi dokuya yerleşmesini engellemekle kalmaz, aynı zamanda mekanik özelliklerinin tam olarak korunmasını da engeller. Bu sonuç, özellikle ince dokularda ve hücre tabakalarında yaygın olarak görülmektedir.

Ayrıca, SDS sitotoksik özellik gösterdiğinden dolayı; SDS ile hücresizleştirme işleminden sonra dokunun iyice yıkanması gerekmektedir (O. Sayed ve ark. 2014). Deterjanla muamele edilmiş dokuların çoğu tipik olarak fosfat tamponlu salin (PBS) gibi çözeltilerle yıkanmalıdır, ancak iyonik yapısı nedeniyle SDS'nin çıkarılması Triton-x-100'den daha zordur. Hücresizleştirme aşamasından sonra gereken kapsamlı yıkama işlemi, hücresizleştirme ajanı olarak SDS'nin bir başka dezavantajıdır.

Triton X100 ise iyonik olmadığı için SDS'e göre daha az serttir ve nihayetinde dokunun yapısal bütünlüğüne daha az zarar vermektedir. Amonyum hidroksit ile birlikte kullanıldığında, tüm DNA'yı tamamen uzaklaştırır ve SDS kullanımına kıyasla daha fazla miktarda kolajen I muhafaza etmektedir. Ek olarak, hücresizleştirme sürecinden sonra dokunun ince yapısı ve mekanik özellikleri iyi korunabilmektedir (B. Mendoza-Novelo ve ark 2011).



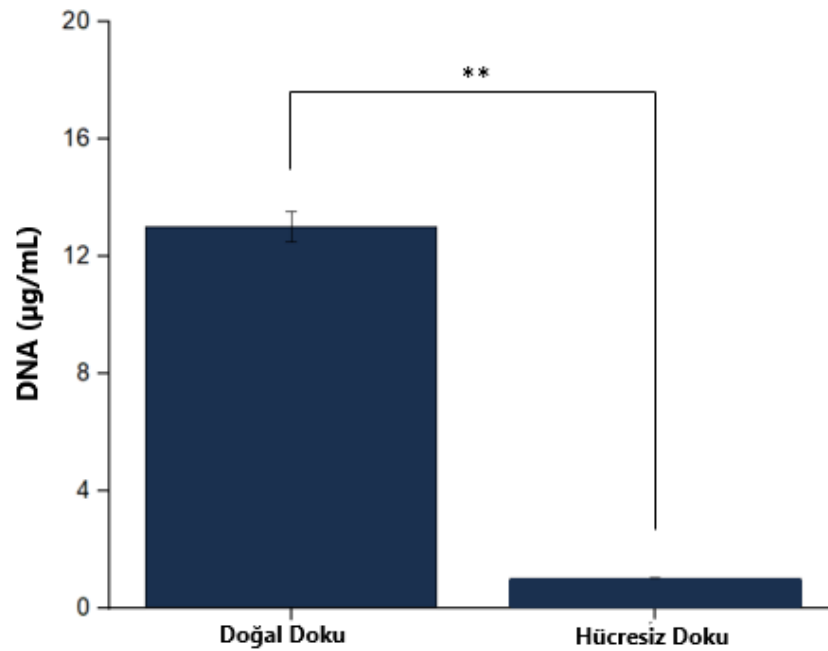
Şekil 5.8 dECM a) jelleştirilmeden önce b) jelleştirildikten sonra

### 5.2.1 DNA içerik analizi

Hücresizleştirme işlemi uygulanmış dokularda kalan DNA miktarının belirlenmesi amacıyla DNA analizi gerçekleştirilmiştir. Bunun için Thermo Scientific GeneJet Genomic DNA Purification Kit kullanılmıştır. DNA analizi için, hücresizleştirme işlemi uygulanmış ve uygulanmamış sığır kalp dokuları dondurulduktan sonra liyofilize edilmiştir. Daha sonra GeneJet DNA saflaştırma kiti protokolü uygulanmıştır. DNA konsantrasyonu aşağıda verilen formüle göre hesaplanmıştır.

$$\text{DNA Konsantrasyonu (ng/ } \mu\text{L)} = (A_{260} - A_{320}) \times 50$$

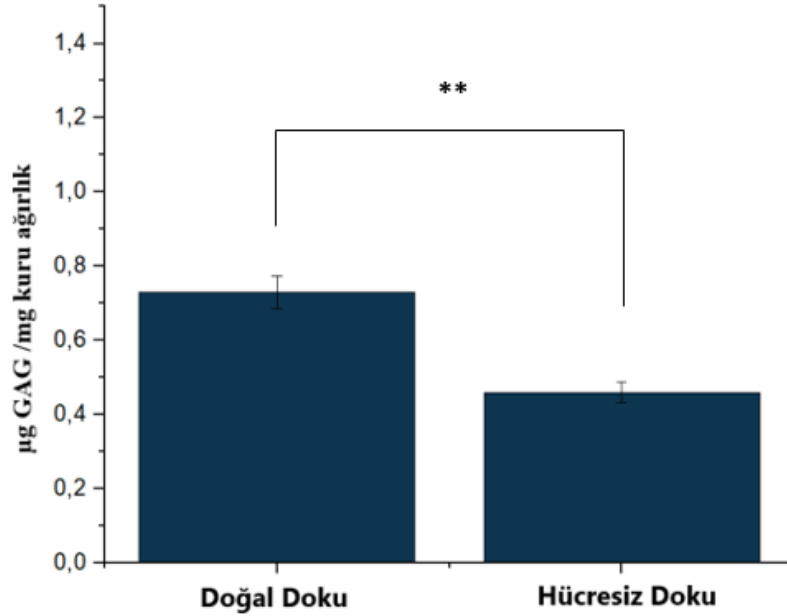
DNA analizi sonuçlarına göre hücresiz doku 40,86 ng/mg kuru ağırlık olarak bulunmuştur. DNA analiz grafiğine bakıldığında doğal doku ile hücresizleştirilmiş doku arasında istatistiksel olarak anlamlı fark görülmüştür ( $p < 0,01$ ). Hücresizleştirilmiş 1 mg kuru ECM'de bulunan dsDNA miktarı 50 ng'dan az olmalıdır. DNA analizi sonucunda bulunan değer 50 ng'a yakın olmasının sebebi hücresizleştirme protokolünde bulunan DNaz ve RNaz enzimlerinin kullanılamamasına bağlanabilir. Bu enzimlerin hücresizleştirme protokolüne katılması ile birlikte DNA miktarındaki azalma beklenildiği gibi olacaktır.



Şekil 5.9 Doğal doku ve hücresizleştirilmiş doku için DNA içerik analizi grafiği. n=3 (\*\*  $p < 0.01$ )

### 5.2.2 Glikozaminoglikan (GAG) içerik analizi

Hüresizleştirme işlemi uygulanmış ve uygulanmamış dokulardaki glikozaminoglikan (GAG) miktarını belirlemek amacıyla GAG analizi gerçekleştirilmiştir. Bunun için hüresizleştirme işlemi uygulanmış ve uygulanmamış sığır kalp dokuları dondurulduktan sonra liyofilize edilmiştir. GAG analiz protokolü uygulanmış, daha sonra 525 nm’de absorbans ölçümü alınmış ve % GAG kaybı hesaplanmıştır. Analiz sonuçlarına göre doğal doku ve hüresizleştirilmiş doku arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmüştür ( $p<0,01$ ). Hüresizleştirilmiş dokuda GAG miktarının %63’ü korunduğu belirlenmiştir.

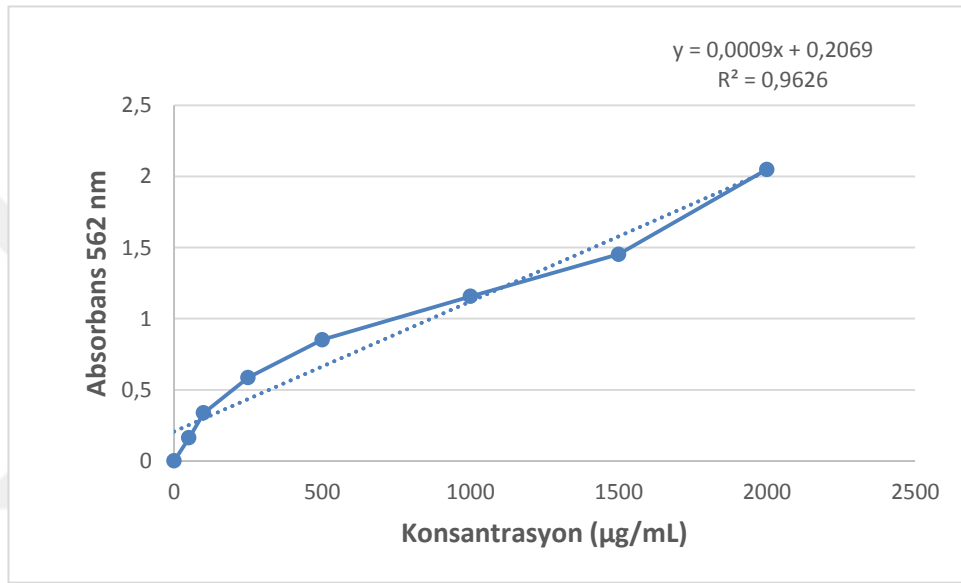


Şekil 5.10 Doğal doku ve hüresizleştirilmiş doku için GAG içerik analizi grafiği.  $n=3$  (\*\*  $p<0.01$ )

### 5.2.3 BCA (Bikinkoninik asit) total protein analizi

Hüresizleştirilmiş miyokardiyal ECM için toplam protein konsantrasyonu, bikinkoninik asit (BCA) analizi (Thermo Scientific) kullanılarak belirlenmiştir. 200 µL BCA çalışma reaktifi 25 µL standart (Sığır serum albümini) ve 25 µL dilüe edilmiş

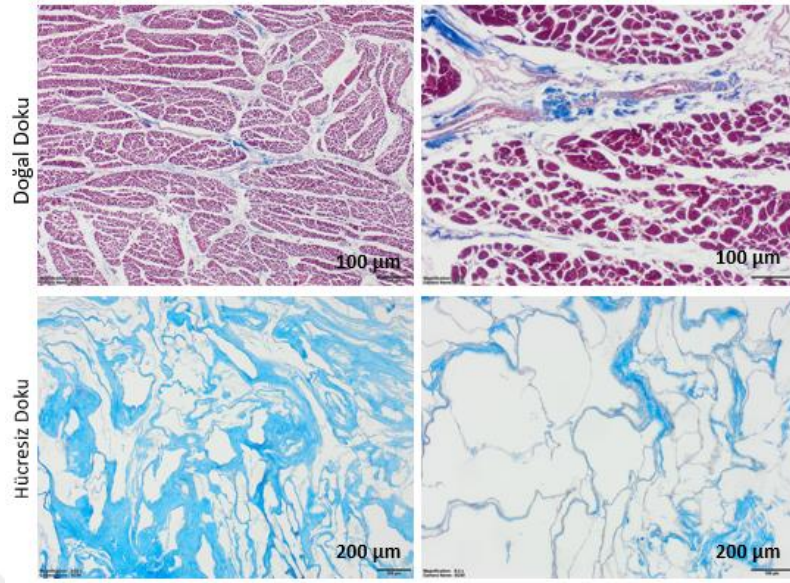
numunelere ilave edildikten sonra karanlıkta 30 dakika inkübe edilmiştir. Daha sonra 562 nm'de mikro plaka okuyucu kullanılarak optik yoğunluk ölçümleri elde edilmiştir. 50, 100, 250, 500, 1000, 1500 ve 2000 µg/mL BSA ile hazırlanmış standart protein çözeltileri ile standart grafik oluşturulmuştur (Şekil 5.15). Standart grafikteki eğri denklemi ile 1:8 seyreltme ile hazırlanan hücresizleştirilmiş miyokardiyal ECM örneği için total protein konsantrasyonu 0,996 mg olarak belirlenmiştir.



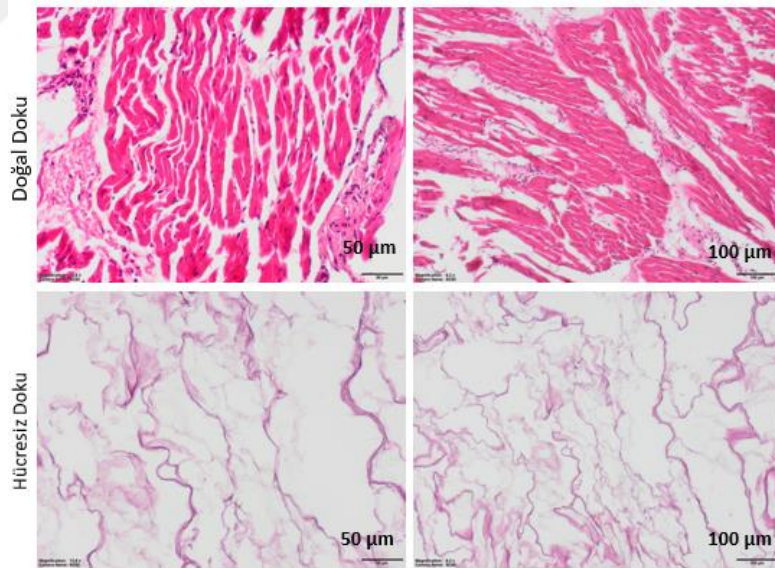
Şekil 5.11 dECM için protein konsantrasyonunu belirlemede kullanılan standart grafik

#### 5.2.4 Histolojik boyama

1 cm<sup>3</sup> şeklinde kesilen ve hücresizleştirme işlemi uygulanan ve uygulanmayan sıgır kalp dokularının Masson-Trikrom boyama görüntüleri Şekil 5.12’de verilmiştir. Hücresizleştirme işlemi uygulanmış doku ECM’inde kollajen fibrillerin mavi renge boyandığı şekilde görülmektedir. İşlem uygulanmayan dokuda ise kas lifleri koyu kırmızı/mor renge ve kollajen lifleri yine mavi renge boyanmıştır. Kollajen liflerinin korunan yapısı ECM’in yeterli düzeyde korunduğu ile ilişkilidir.



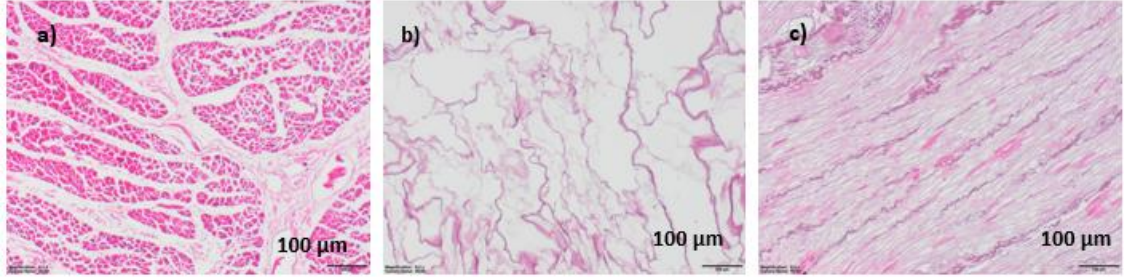
Şekil 5.12 İşlem görmemiş kalp dokusu ile hücresizleştirme işlemi uygulanmış dokunun Masson Trikrom boyamaları



Şekil 5.13 İşlem görmemiş kalp dokusu ile hücresizleştirme işlemi uygulanmış dokunun Hematoksilen&Eozin boyamaları

1 cm<sup>3</sup> şeklinde kesilen ve hücresizleştirme işlemi uygulanan ve uygulanmayan sığır kalp dokularının Hematoksilen&Eozin boyamaları Şekil 5.13’de gösterilmiştir. Görüntüler incelendiğinde, işlem görmemiş kalp dokusundaki çekirdeklerin hematoksilen ile mavi

renkte boyandığı ve sitoplazmanın eozin ile pembe renkte boyandığı görülmektedir. Hücresizleştirme işlemi uygulanan kalp dokusunda ise, çekirdeklerin SDS ile uzaklaştırıldığı, ECM yapı bütünlüğünün yeterli oranda korunduğu ve hücresizleştirme işleminin başarılı olduğu görülmektedir.



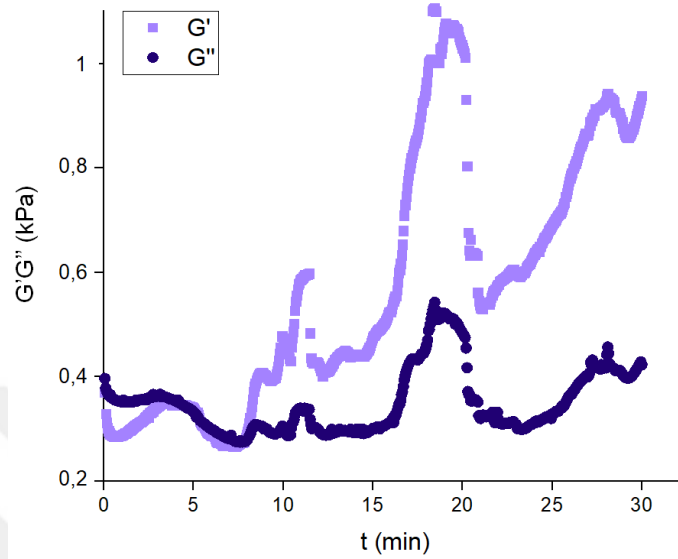
Şekil 5.14 Farklı boyutlarda kesildikten sonra hücresizleştirme işlemi uygulanan dokuların Hematoksilen&Eozin boyama görüntüleri a) Doğal doku b) 1cm<sup>3</sup> olarak kesilen hücresiz kalp doku c) Küçük parçalara ayrılan hücresiz kalp doku

SDS ile farklı boyutlarda kesilerek hücresizleştirme işlemi uygulanan sığır miyokardiyal dokuların Hematoksilen & Eozin boyaması Şekil 5.14’de gösterilmiştir. Görüntüler incelendiğinde, kalp dokuları küçük parçalara ayrılarak hücresizleştirme işlemi uygulandığında, hücresel materyalin tam olarak uzaklaştırılamadığı, hücresizleştirme işleminin başarılı olmadığı görülmektedir.

### 5.2.5 Reoloji

Reoloji, belli koşullar altında katı ya da jel malzemelerin elastikliği ve sıvı malzemelerin akışkanlığı cinsinden, onun akış ve deformasyona karşı davranışını inceleyen bilim dalıdır. Jelleşme protokolü uygulanan hücresizleştirilmiş miyokardiyal ECM için 30 dk boyunca 37 °C’de reolojik karakterizasyon yapılarak, viskoz modül ( $G''$ ) ve elastik modül ( $G'$ ) değişimleri gözlenmiştir. Hidrojellerin reolojik analizlerinden beklenen elastik modülün, viskoz modülünden yüksek olmasıdır. %0.01-100 gerinim aralığında ve 1 Hz frekansta salınımlı gerinim taraması ile elde edilen sonuçlar doğrultusunda, Şekil 5.15’de görüldüğü üzere, beklenildiği gibi  $G'$  değeri,  $G''$

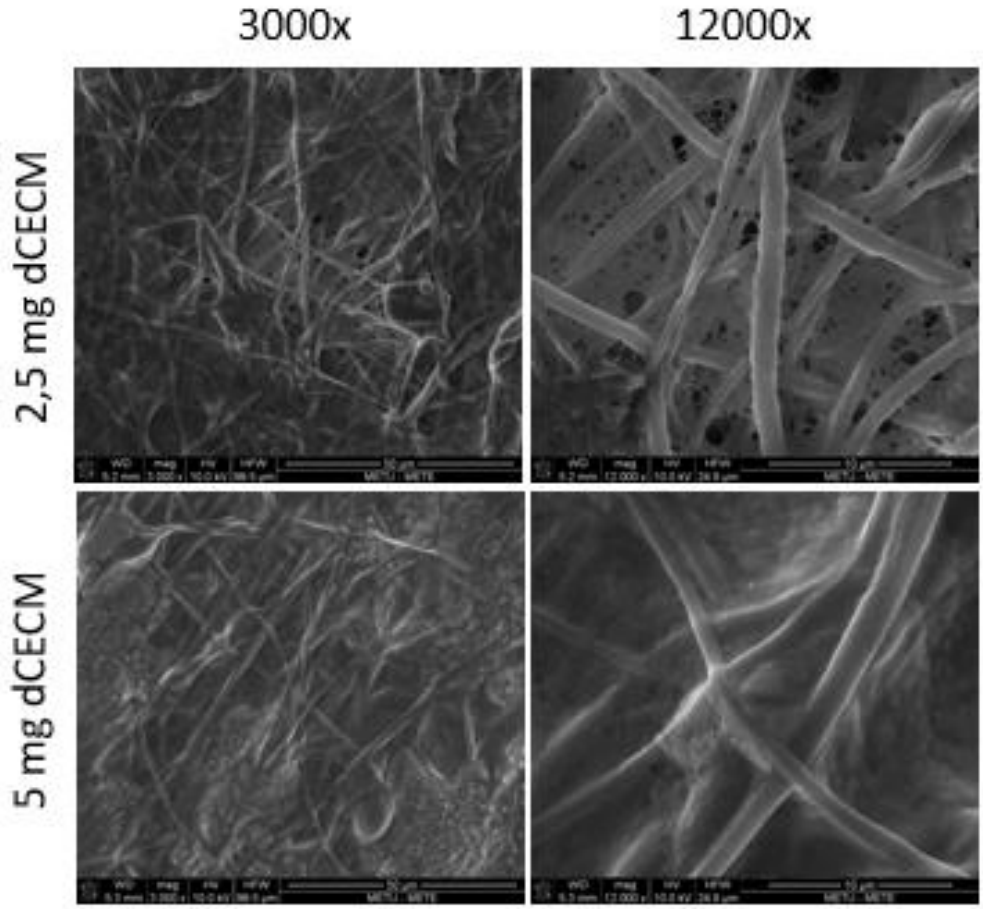
değerinden yüksektir. Bu durum reoloji analizi yapılan örneğin hidrojel karakterde ve elastik yapıda olduğunu göstermektedir.



Şekil 5.15 dECM hidrojelinin frekans taraması

#### 5.2.6 PBAT nanofiber membranların dECM ile modifiye edilmesi

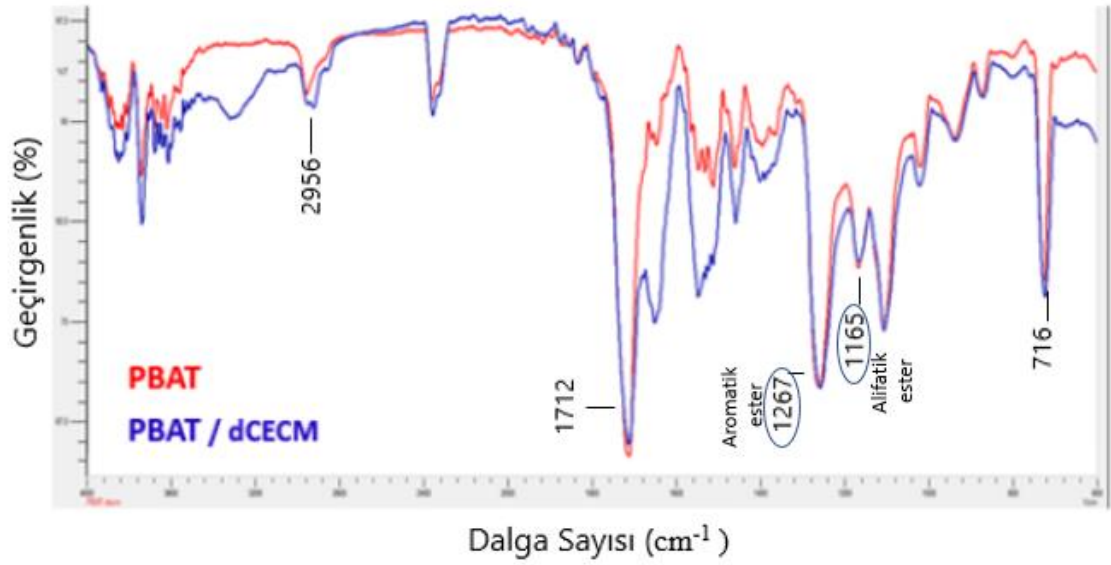
2,5/mg ve 5 mg/mL miyokardiyal hücre dışı matris ile modifiye edilen %7,5 (w/w) PBAT membranların SEM görüntüleri Şekil 5.15'de verilmiştir. %7,5 (w/w) PBAT membranlar %80 etil alkol ile laminar kabin içerisinde steril edilmiştir. Daha sonra 2,5 mg/mL ve 5 mg/mL olacak şekilde dECM hazırlandıktan sonra membranların üzerine spreyleneştir. dECM ile spreyleneen membranlar 1 saat süre ile 37 °C'de inkübe edilerek termal bağlama gerçekleştirilmektedir. dECM spreyleneen membranların morfolojilerini incelemek amacıyla SEM görüntüleri alınmıştır. Membranın 5 mg/mL miyokardiyal hücre dışı matris ile modifiye edildiğinde PBAT fiberlerini kapatmadığı, 2,5 mg/mL miyokardiyal hücre dışı matris ile modifiye edilen membrana göre kaplamanın çok daha başarılı olduğu görülmektedir. 5 mg/mL miyokardiyal hücre dışı matris ile modifiye edilen PBAT membranların SEM görüntüleri MTS sonuçlarını desteklemektedir. Bu sebeple hücre kültürüne 5mg/mL hücre dışı matris spreyleneen %7,5 (w/w) PBAT membranlar ile devam edilmiştir.



Şekil 5.16 2,5 mg/mL ve 5 mg/mL miyokardiyal hücre dışı matris ile modifiye edilen %7,5 (w/w) PBAT membranların SEM görüntüleri

### 5.2.7 Modifiye edilen PBAT membranının FTIR analizi

FTIR analizi, PBAT membranların ve dCEM ile modifiye edilmiş PBAT membranların kimyasal yapısının incelenmesi ve fonksiyonel gruplarının tespit edilmesi amacıyla gerçekleştirilmiştir. Şekil 5.17’de PBAT membranların FTIR analizi verilmiştir.

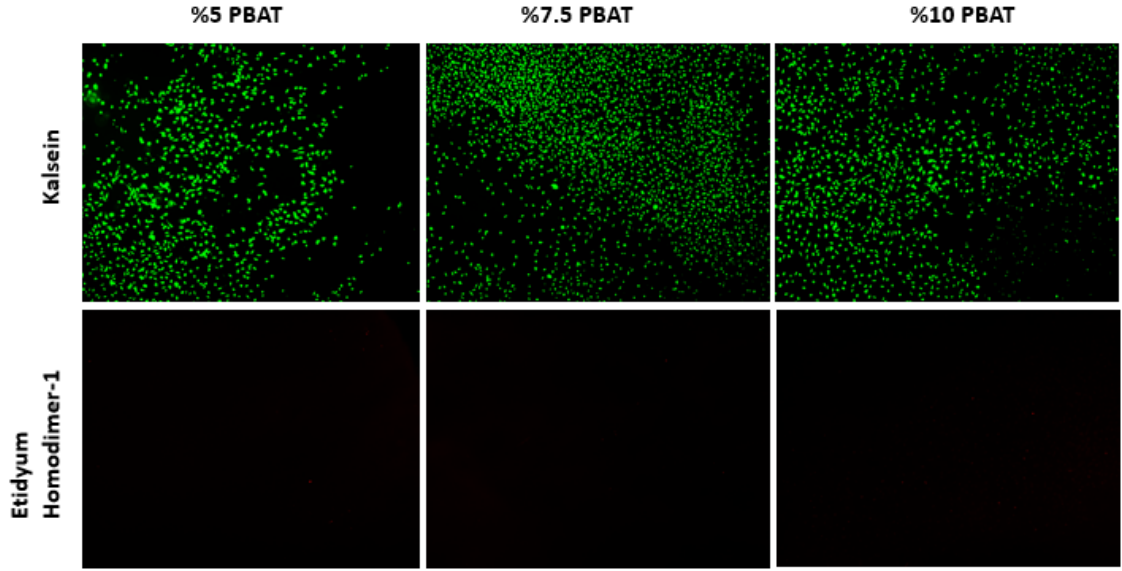


Şekil 5.17 Hücreleştirilmiş ECM ile modifiye edilen ve edilmeyen PBAT membranının FTIR analizi

Spektrum incelendiğinde, karakteristik olarak  $1712\text{ cm}^{-1}$ 'de PBAT'nin alifatik ve aromatik grubunda bulunan C=O gerilmesi,  $2956\text{ cm}^{-1}$ 'de PBAT'nin aromatik grubundaki C-H bağının piki görülmektedir. Bu pikler PBAT'yi tanımlamak için gösterge pikleri olarak alınabilir.  $716\text{ cm}^{-1}$ 'de görülen pik  $\text{CH}_2$  grubunun piki olup, uzun zincirli bileşiklerde belirgindir (Kılıç vd.2019).  $1392\text{ cm}^{-1}$ 'de  $\text{CH}_3$  piki görülmektedir.  $1018$ ,  $1456\text{ cm}^{-1}$ 'deki absorpsiyon bantları, fenil grubunun karakteristik grup gerilmesini göstermektedir.  $1650\text{ cm}^{-1}$  civarında görülen amid I piki dCECM ile modifiye edilen PBAT membranlardaki protein modifikasyonunu göstermektedir.

### 5.3 Hücre Kültür Çalışmaları

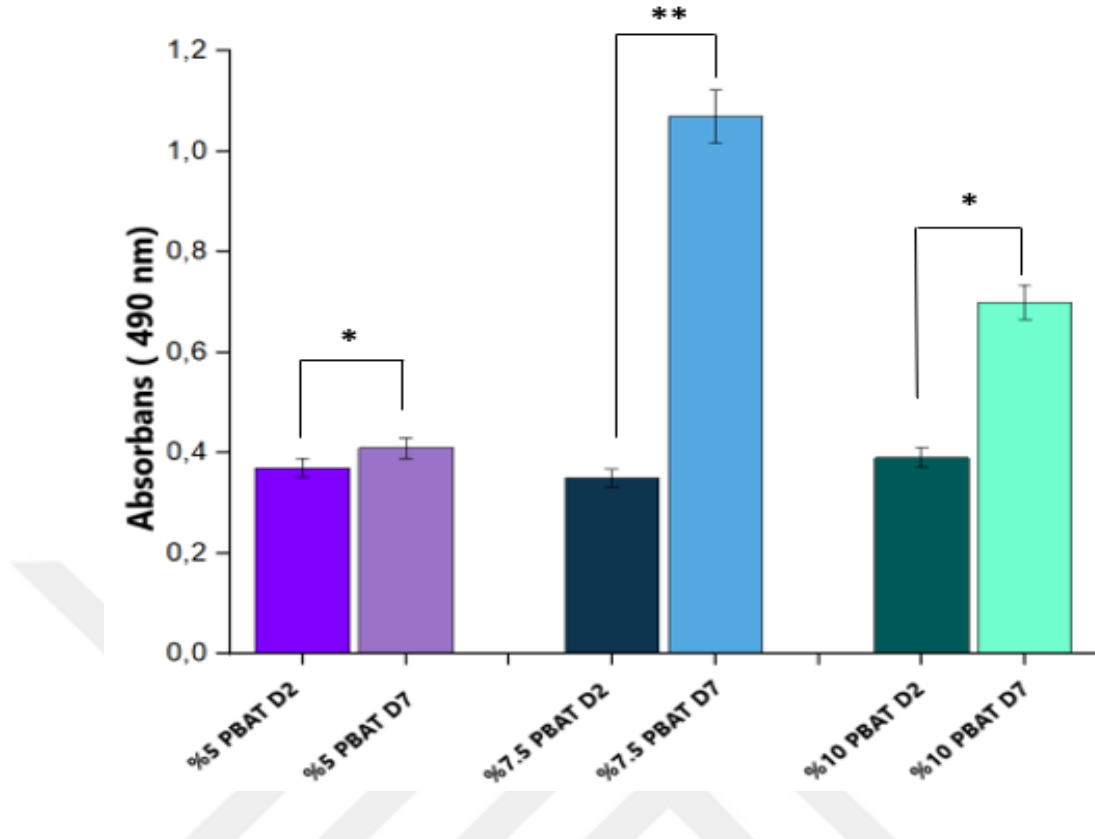
Farklı konsantrasyonlarda üretilen PBAT membranlar üzerine ekilen HCM'lerin canlılıklarını belirlemek için canlı/ölü hücre boyaması yapılmıştır. ECM spreylenmemiş %5, %7,5 ve %10 (w/w) PBAT membranların üzerine ekilen HCM'lerin 2.gün canlı/ölü hücre boyama görüntüleri Şekil 5.18'de verilmiştir



Şekil 5.18 ECM spreylene memiş %5, %7,5 ve %10 (w/w) PBAT membranların 2.gün canlı/ölü hücre boyama görüntüleri

Görüntüler incelendiğinde, %7,5 (w/w) PBAT membran üzerinde hücrelerin canlılıklarını %5 ve %10 (w/w) PBAT membranlarla karşılaştırıldığında yüksek oranda devam ettirdikleri görülmektedir. Ölü hücreler bütün membranlar için çok az sayıdadır. HCM'lerin PBAT membranlardan olumsuz şekilde etkilenmemiş oldukları sonucuna varılmıştır. %7,5 (w/w) PBAT membranın fiber çapları dolayısıyla HCM hücrelerinin canlılığı ve çoğalması üzerine olumlu etkilerinin olduğu görülmektedir.

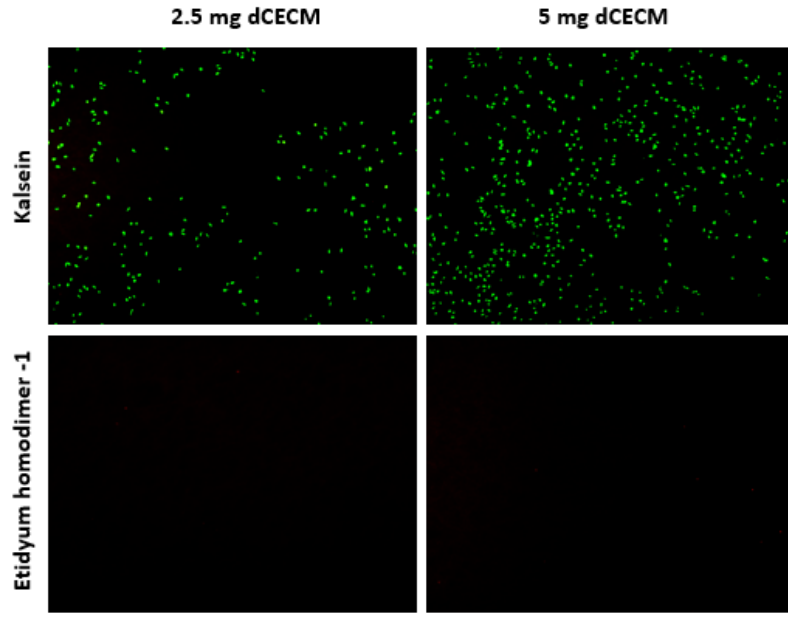
Şekil 5.19'de %5, %7,5 ve %10 (w/w) PBAT membranlar üzerine ekimi yapılan HCM'lerin 2. ve 7. günlerde yapılan MTS analizi grafiği verilmiştir. Şekilde görüldüğü gibi, PBAT membranlar üzerine ekilen HCM'ler membranlardan hiçbir şekilde olumsuz etkilenmemiştir. %7,5 (w/w) PBAT membran üzerine ekilen HCM'lerin 7.gün sonundaki metabolik aktiviteleri %5 ve %10 (w/w) PBAT membranlara göre en yüksek olduğu görülmektedir. Canlı/ölü hücre boyamaları ve MTS analiz sonuçlarına bakılarak, hücre kültür çalışmalarına %7,5 (w/w) PBAT membran ile devam edilmesine karar verilmiştir.



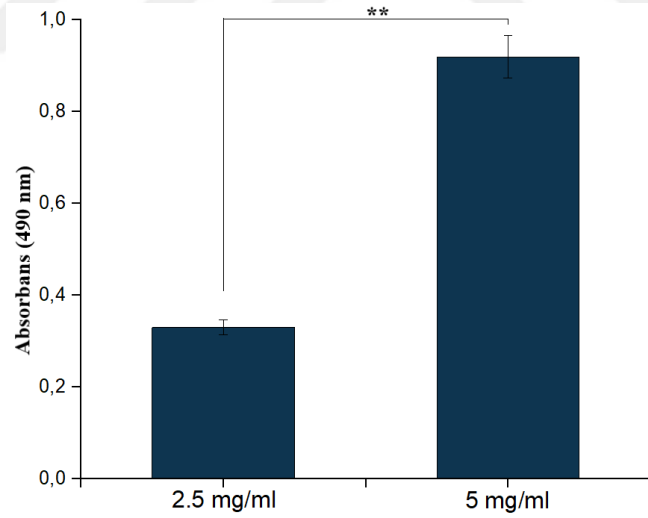
Şekil 5.19 %5, %7,5 ve %10 (w/w) PBAT membranlar üzerine ekimi yapılan HCM'lerin 2. ve 7. günlerde MTS yöntemi ile belirlenen hücre canlılık oranları (\*\* p<0,05)

%7,5 (w/w) PBAT membran üzerine 2,5 mg/mL ve 5 mg/mL olacak şekilde 2 farklı konsantrasyonda miyokardiyal ECM spreylendikten sonra membranlar üzerine HCM'lerin ekimi yapılmış ve hücre kültürünün 2. gününde canlı/ölü hücre boyama ve MTS analizi yapılmıştır. Canlı/ölü hücre boyama görüntüleri Şekil 5.20'da, MTS analizi sonuçları Şekil 5.21'de verilmiştir.

Analiz sonuçlarına göre, 5 mg/mL olacak şekilde dECM spreylenen PBAT membranların metabolik aktiviteleri, 2,5 mg/mL dECM spreylenen PBAT membranlara göre çok daha fazla olduğu Şekil 5.21'de görülmektedir. MTS analizi sonuçları canlı/ölü hücre boyama sonuçlarını desteklemektedir. Optimum ECM konsantrasyonu 5 mg/mL dECM olarak belirlenmiştir.

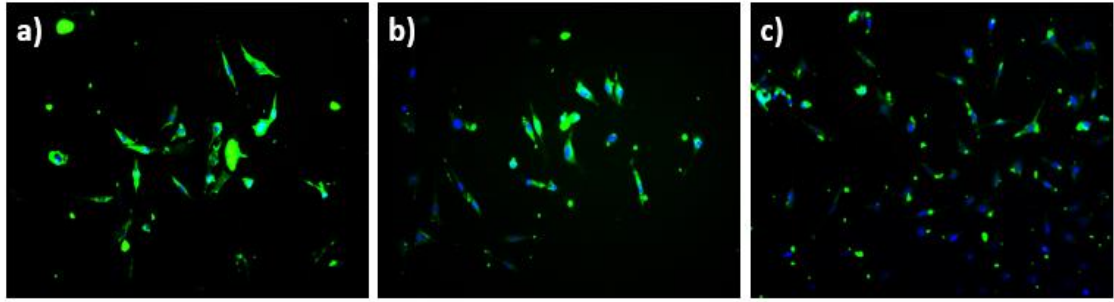


Şekil 5.20 2,5 mg/mL ve 5 mg/mL dCECM ile modifiye edilen %7,5 (w/w) PBAT membran üzerinde HCM'lerin 2.gün canlı/ölü hücre boyama görüntüleri



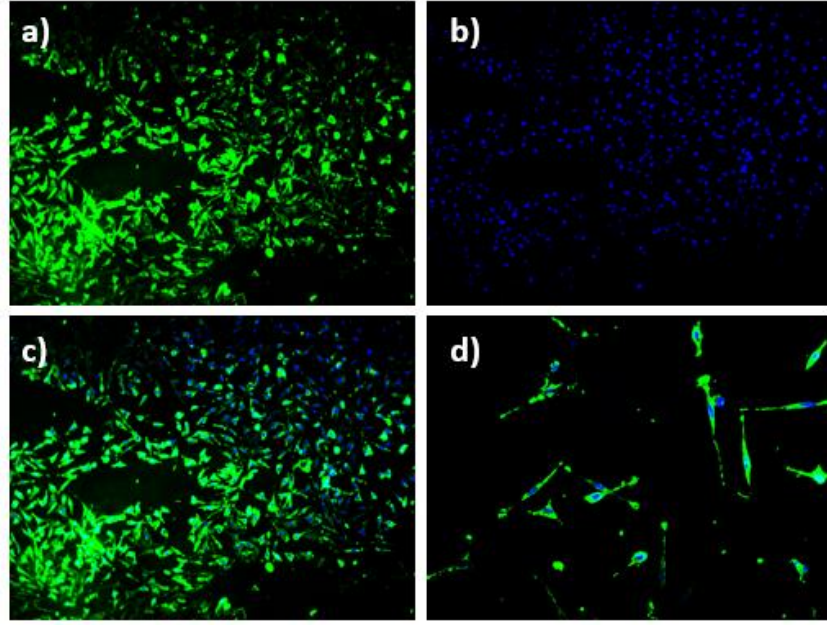
Şekil 5.21 %7,5 (w/w) PBAT membran üzerine farklı konsantrasyonlarda miyokardiyal ECM spreylendikten sonra ekimi yapılan HCM'lerin 2.günde MTS yöntemi ile belirlenen hücre canlılık oranları (\*\* p<0,001)

5 mg/mL dECM spreyleneş %5, %7,5 ve %10 (w/w) PBAT membranların YAP / DAPI immünfloresan görüntüleri Şekil 5.21’de verilmiştir. Yes ile ilişkili protein (YAP / Yes-associated protein), hücre çoğalması ve hücre yenilenmesinde önemli olan Hippo yolağındaki aşğı akış düzenleyici proteinlerden biridir. İskelet kası dahil olmak üzere çeşitli dokularda mekanik transdüksiyonda önemli rol oynamaktadır (Dupont vd. 2011, Wackerhage vd. 2014). Nükleer YAP aktivitesi, hücre döngüsü kontrolünde yer alan genlerin transkripsiyonunu kontrol eder, hücre proliferasyonunu ve hayatta kalmayı sağlar, apoptozu inhibe eder (Dong vd. 2007). Böylece hücre proliferasyonunu ve hücre ölümünü dengelemektedir. YAP’ın yanlış düzenlenmesi tümör oluşumuna yol açabilmektedir. YAP sitoplazmada inaktif formda bulunur ve aktive edildiğinde yani mekanik stres koşullarında çekirdeğe girer ve transkripsiyon düzeyinde cevap oluşturur. Stres koşulu ortadan kalktığında ise sitoplazmaya çıkmaktadır (Fischer vd. 2016).

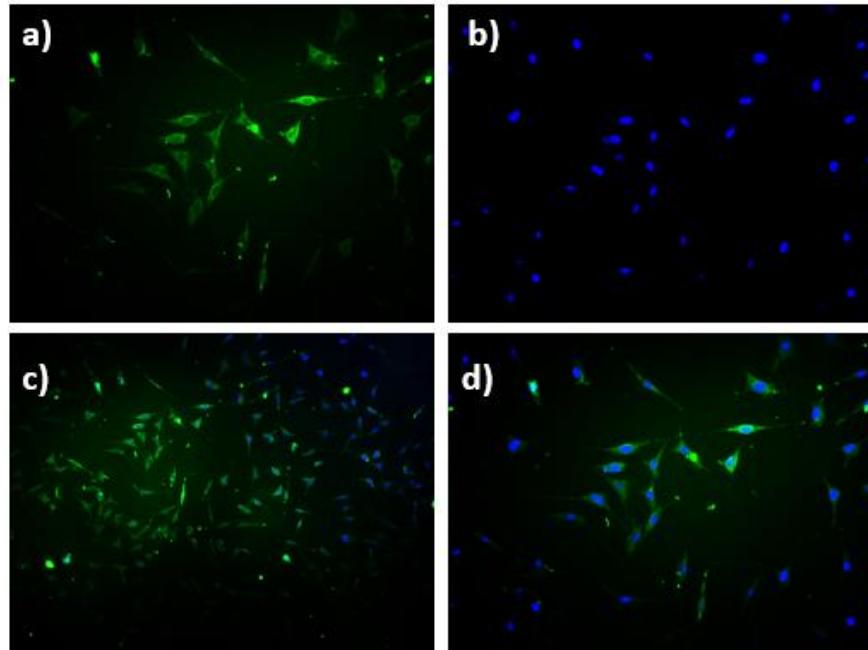


Şekil 5.22 PBAT membranlar üzerinde HCM’lere ait YAP/DAPI boyaması a) %5 PBAT b) %7,5 PBAT c) %10 PBAT

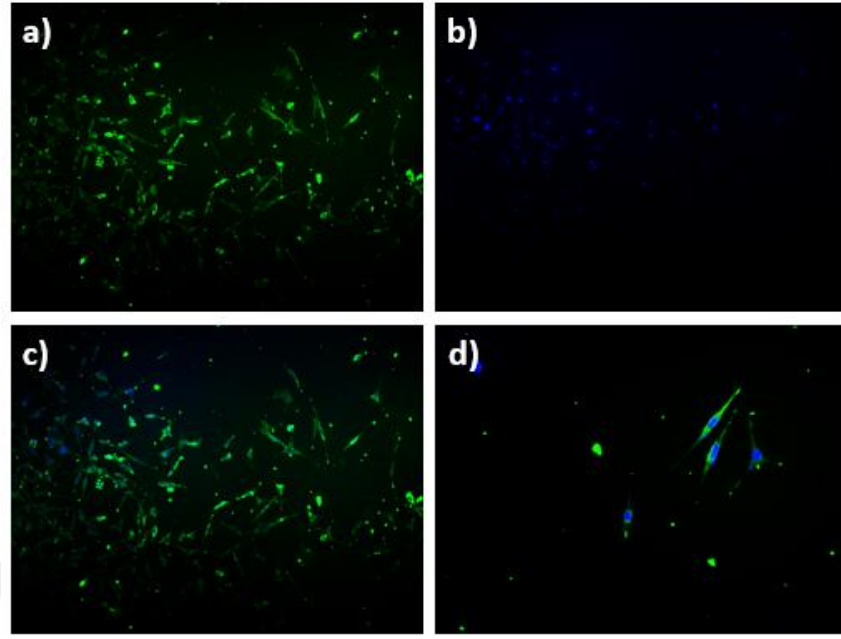
Şekil 5.22’deki görüntüler incelendiğinde, %5 (w/w) PBAT/dECM üzerine ekilen HCM’lerde YAP’ın sitoplazmada bulunduğu, %7,5 ve %10 (w/w) PBAT/dECM üzerine ekilen HCM’lerde ise çekirdekte veya çekirdeğe yakın konumda bulunduğu gözlenmiştir. YAP’ın çekirdeğe lokalize olması sert hücre dışı matris ya da sert doku iskeleleri gibi yüksek hücre içi gerilime yol açan mekanik koşullar altında olduğunu göstermektedir.



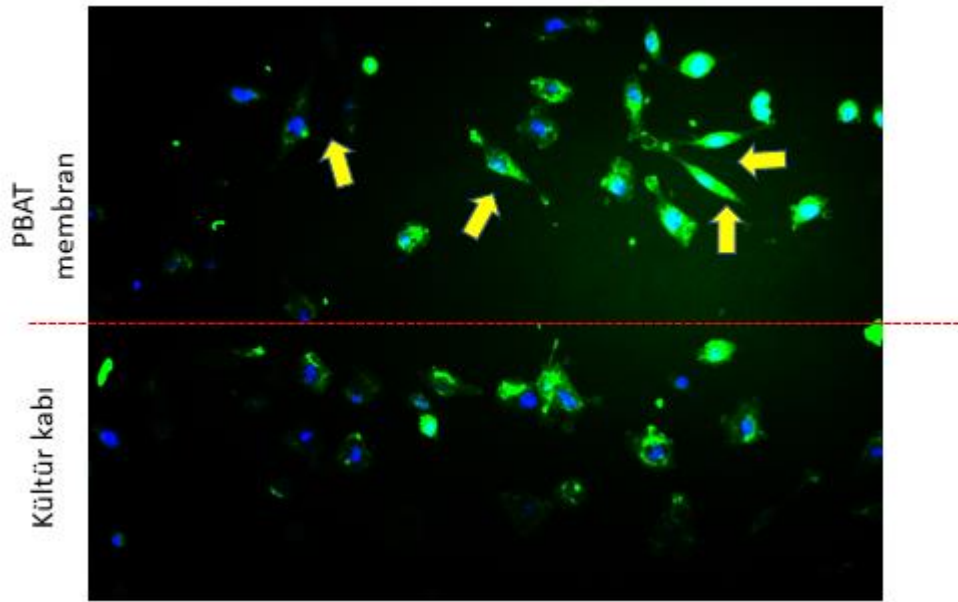
Şekil 5.23 %5 (w/w) PBAT membran üzerinde HCM'lere ait  $\beta$ -aktin/DAPI boyaması a)  $\beta$ -aktin boyaması b) DAPI boyaması c)  $\beta$ -aktin/DAPI çakışık görüntü d)20x  $\beta$ -aktin/DAPI çakışık görüntü



Şekil 5.24 24 %7,5 (w/w) PBAT membranlara ait  $\beta$ -aktin/DAPI boyaması a)  $\beta$ -aktin boyaması b) DAPI boyaması c)  $\beta$ -aktin/DAPI çakışık görüntü d)20x  $\beta$ -aktin/DAPI çakışık görüntü



Şekil 5.25 %10 (w/w) PBAT membran üzerinde HCM'lere ait  $\beta$ -aktin/DAPI boyaması  
a)  $\beta$ -aktin boyaması b) DAPI boyaması c)  $\chi$ akışık görüntü d)20x  $\chi$ akışık görüntü



Şekil 5.26 %7,5 (w/w) PBAT membran ve kültür kabı üzerindeki HCM'lerin  $\beta$ -aktin/DAPI boyaması

%5, %7,5 ve %10 (w/w) PBAT/dECM membranlar üzerinde HCM'lerin aktin hücre iskeletleri ve hücre çekirdekleri immünfloresan boyama tekniği kullanılarak floresan mikroskop altında incelenmiştir. Hücre çekirdekleri DAPI ile boyanarak işaretlenmiştir. PBAT membranlar üzerindeki HCM'lere ait  $\beta$ -aktin/DAPI boyamaları Şekil 5.23, Şekil 5.24 ve Şekil 5.25'de verilmiştir. Görüntülerde, aktin filamentlerin sitoplazma boyunca uzanması görülmektedir. 5%, %7,5 ve %10 (w/w) PBAT membranlar üzerindeki HCM'lerde morfolojik olarak farklılık gözlenmemiştir. PBAT nanofiberlerin hücrelerin yayılması ve morfolojilerini almalarındaki etkisinin büyük olduğu gözlenmiştir. Şekil 5.26'de sarı oklar aktin filamentlerin, PBAT membran üzerine ekilen HCM'lerde demetler halinde sitoplazma boyunca uzanmasını göstermektedir. Kültür kabı üzerindeki HCM'lerde ise hücre uzaması görülmemektedir.

## 6. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu tez çalışmasında dECM ile modifiye edilmiş ve edilmemiş nanofiber PBAT membranlara insan kardiyak hücrelerin tutunması ve çoğalması incelenmiştir. PBAT ve doku mühendisliği üzerine yapılan çalışmalar son yıllarda artış göstermektedir. Yapılan çalışmaların çoğu kemik doku mühendisliği üzerine olup, kardiyak doku mühendisliği üzerine yapılmış bir çalışma mevcut değildir (Fukushima vd. 2013, Santana-Melo vd. 2017). PBAT'nin esnek, biyouyumlu ve biyobozunur bir polimer olması, doku mühendisliği çalışmalarında kullanım potansiyelinin yüksek olduğunu göstermektedir. Bu amaçla, elektro-eğirme süreci için uygun bir alifatik-aromatik kopolyester olan PBAT kullanılmıştır (Müller vd. 2001).

En uygun morfolojide PBAT nanofiberleri elde etmek amacıyla optimum parametreler 21 kV voltaj, saatte 4 ml akış hızı, 1100 rpm rotasyon ve şırınga-toplayıcı arasındaki mesafe 124 mm olarak belirlenmiştir. Bu parametreler haricinde uygulama yapıldığında iğne ucu tıkanması ve ıslaklık gözlenmiştir. Elde edilen PBAT nanofiberlerin karakterizasyonu için SEM görüntüleri alınmıştır. 5%, %7,5 ve %10 (w/w) olarak üç farklı konsantrasyonda hazırlanan çözeltilerden elde edilen elektrospun nanofiber membranların fiber çapları sırasıyla 244.3 nm, 615.7 nm ve 4.4 µm olarak ölçülmüştür. Membranlarda fazla boncuk oluşumu gözlenmemekle birlikte, %5 (w/w) PBAT membranda boncuk oluşumu diğer konsantrasyonlardaki membranlara göre daha fazla görülmüştür. Fiber çapları karşılaştırıldığında en uygun morfolojide olanın %5 ve %7,5 (w/w) PBAT nanofiber membranlar olduğu sonucuna varılmıştır.

PBAT membranlar üzerine ekilen insan kardiyomiyositlerin canlılık oranı için canlı- ölü hücre canlılığı ve hücrel yaşayabilirlik (MTS) analizi uygulanmıştır. PBAT membranların hücre canlılığı üzerinde herhangi bir olumsuz etkisi olmamıştır. %7,5 (w/w) PBAT membranın fiber çapları dolayısıyla HCM hücrelerinin canlılığı ve çoğalması üzerine olumlu etkilerinin olduğu anlaşılmıştır (Şekil 5.18, Şekil 5.19).

Sığır kalp dokularından hücresel materyalin uzaklaştırılması amacıyla hücresizleştirme işlemi uygulanmıştır. Miyokardiyal dokular çok küçük parçalara kesildiğinde ve bu parçalara hücresizleştirme işlemi uygulandığında, dokuların yüzey alanı küçüldüğünden SDS dokulara çok fazla nüfuz etmiştir. Dolayısıyla SDS'i dokulardan yıkama aşamaları ile uzaklaştırmak yeterli olmamıştır. Dokular istenilen düzeyde hücresizleştirilememiştir. Bu durumu önlemek amacıyla, sığır miyokardiyal dokular 1 cm<sup>3</sup> olacak şekilde kesilmiş, daha sonra aynı protokol izlenerek SDS hücresizleştirme işlemi uygulanmıştır. H&E ve Masson's Trikom boyaması ile hücrelerinden arındırılmış sığır miyokardiyal matrikslerin ECM yapıları incelenmiştir ve karşılaştırılmıştır. Hücresizleştirilmiş dokuların H&E ve Masson's Trikom boyama görüntülerinde, SDS uygulamasının ECM yapısına fazla zarar vermediği ve hücresel materyalin uzaklaştırıldığı görülmektedir (Şekil 5.12, Şekil 5.13).

Hücresiz dokunun DNA içerik analizi sonucu 40,86 ng/mg kuru ağırlık, doğal dokunun ise 530 ng/mg kuru ağırlık olarak bulunmuştur. DNA içeriğinde %90'a varan bir azalma meydana gelmiştir. DNA içerik analizi sonucu Hematoksilen & Eozin ve Masson's Trikom boyama sonuçlarını doğrulamaktadır. Literatürde bildirilen sonuçlara göre, optimal hücresizleştirme için dsDNA miktarı mg kuru ağırlık başına <50 ng olmalıdır. Bunun yanı sıra H&E / Masson's Trikom ile boyanmış doku bölümlerinde görünür nükleer materyal eksikliği DNA sonuçlarını desteklemelidir. Bu bilgiler doğrultusunda, elde edilen sonuçlar literatür sonuçlarıyla uyumludur (Pati vd. 2014). Hücresizleştirme işlemi başarı ile gerçekleştirilmiştir. Glikozaminoglikan analizi sonucu ile hücresizleştirilmiş dokuda GAG miktarının %63'ünün korunduğu belirlenmiştir.

Hücresizleştirilen miyokardiyal dokular pepsin ile sindirilip, nötralizasyon basamağından sonra jelleşme protokolü uygulanmıştır. Jelleştirilen dECM için reolojik karakterizasyon yapılarak (Şekil 5.15), viskoz modül (G'') ve elastik modül (G') değişimleri gözlenmiştir. Hidrojel karakterde yapılardan beklenildiği gibi G' değeri, G'' değerinden yüksektir (Pati vd. 2014).

Jelleştirilen dECM 2,5 mg/mL ve 5 mg/mL olacak şekilde seyreltilmiş ve %7,5 (w/w) PBAT membranların üzerine spreyleneştir. En uygun dECM konsantrasyonu canlı-ölü hücre boyama, MTS analizi ve SEM görüntüleri ile değerlendirilmiştir. Elde edilen bulgulara göre, en uygun konsantrasyonun 5 mg/mL olduğu anlaşılmıştır.

PBAT nanofiber membranların üzerine tutunmuş hücrelerin morfolojik incelemeleri için YAP /  $\beta$ -aktin / DAPI immünfloresan boyama yapılmış ve morfolojileri floresan mikroskop altında incelenmiştir. PBAT nanofiberlerin hücrelerin morfolojilerini kazanmalarında oldukça etkili oldukları Şekil 5.26'da görülmektedir. %5 (w/w) PBAT/dECM üzerine ekilen HCM'lerde YAP'ın sitoplazmada bulunduğu, %7,5 ve %10 (w/w) PBAT/dECM üzerine ekilen HCM'lerde ise çekirdekte veya çekirdeğe yakın konumda bulunduğu gözlenmiştir. Şekil 5.25'te görüldüğü üzere, YAP'ın çekirdeğe lokalize olması sert hücre dışı matris ya da sert doku iskeleleri gibi yüksek hücre içi gerilime yol açan mekanik koşullar altında olduğunu göstermektedir (Fischer vd. 2016).

$\beta$ -aktin ile yapılan immünfloresan boyama görüntülerinde aktin filamentlerin sitoplazma boyunca uzanması görülmektedir. 5%, %7,5 ve %10 (w/w) PBAT membranlar üzerindeki HCM'lerde morfolojik olarak farklılık gözlenmemiştir. PBAT nanofiberleri boyunca hücrelerin, kültür kabı üzerindeki HCM'lere kıyasla morfolojilerini alarak korudukları ve nanofiberlerin hücrelerin yayılması ve morfolojilerini almalarındaki etkisinin büyük olduğu gözlenmiştir.

Elde edilen bulgular, dECM ile modifiye edilen PBAT nanofiber membranların kardiyak doku mühendisliği için in vitro uygulamalarda kullanılmak üzere etkili bir seçenek olarak kabul edilebileceğini göstermektedir. dECM ile modifiye edilen PBAT membranların kardiyak doku mühendisliğinde kullanım potansiyelinin yüksek olduğu anlaşılmıştır.

## KAYNAKLAR

- Agarwal, Seema, Joachim H Wendorff, and Andreas Greiner. 2008. 'Use of electrospinning technique for biomedical applications', *Polymer*, 49: 5603-21.
- Alberts, Bruce, Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, and Peter Walter. 2008. 'Molecular biology of the cell, 5th edn. Garland Science', *New York*.
- Andrée, Birgit, Antonia Bär, Axel Haverich, and Andres Hilfiker. 2013. 'Small intestinal submucosa segments as matrix for tissue engineering', *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 19: 279-91.
- Arslan, Yavuz Emre, Yusuf Furkan Galata, Tugba Sezgin Arslan, and Burak Derkus. 2018. 'Trans-differentiation of human adipose-derived mesenchymal stem cells into cardiomyocyte-like cells on decellularized bovine myocardial extracellular matrix-based films', *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 29: 1-13.
- Arslan, Yavuz Emre, MM Hız, and T Sezgin Arslan. 2015. 'The use of decellularized animal tissues in regenerative therapies', *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 21: 139-45.
- Bader, Augustinus, Tobias Schilling, Omke Enno Teebken, Gudrun Brandes, Tanja Herden, Gustav Steinhoff, and Axel Haverich. 1998. 'Tissue engineering of heart valves–human endothelial cell seeding of detergent acellularized porcine valves', *European journal of cardio-thoracic surgery*, 14: 279-84.
- Badylak, Stephen F, Donald O Freytes, and Thomas W Gilbert. 2009. 'Extracellular matrix as a biological scaffold material: structure and function', *Acta biomaterialia*, 5: 1-13.
- Badylak, Stephen F, Toshitaka Hoppo, Alejandro Nieponice, Thomas W Gilbert, Jon M Davison, and Blair A Jobe. 2011. 'Esophageal preservation in five male patients after endoscopic inner-layer circumferential resection in the setting of superficial cancer: a regenerative medicine approach with a biologic scaffold', *Tissue Engineering Part A*, 17: 1643-50.
- Bastarrachea, Luis, Sumeet Dhawan, Shyam S Sablani, Jae-Hyung Mah, Dong-Hyun Kang, Jinwen Zhang, and Juming Tang. 2010. 'Biodegradable Poly (butylene adipate-co-terephthalate) Films Incorporated with Nisin: Characterization and

Effectiveness against *Listeria innocua*', *Journal of food science*, 75: E215-E24.

- Bhardwaj, Nandana, and Subhas C Kundu. 2010. 'Electrospinning: a fascinating fiber fabrication technique', *Biotechnology advances*, 28: 325-47.
- Bird, SD, PA Doevendans, MA Van Rooijen, A Brutel De La Riviere, RJ Hassink, R Passier, and CL Mummery. 2003. 'The human adult cardiomyocyte phenotype', *Cardiovascular research*, 58: 423-34.
- Bissell, MJ, and J Aggeler. 1987. 'Dynamic reciprocity: how do extracellular matrix and hormones direct gene expression?', *Progress in clinical and biological research*, 249: 251-62.
- Borschel, Gregory H, Robert G Dennis, and William M Kuzon Jr. 2004. 'Contractile skeletal muscle tissue-engineered on an acellular scaffold', *Plastic and reconstructive surgery*, 113: 595-602.
- Cartmell, Jeffrey S, and Michael G Dunn. 2000. 'Effect of chemical treatments on tendon cellularity and mechanical properties', *Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, 49: 134-40.
- Chen, Fang, James J Yoo, and Anthony Atala. 1999. 'Acellular collagen matrix as a possible "off the shelf" biomaterial for urethral repair', *Urology*, 54: 407-10.
- Chen, Qi-Zhi, Sian E Harding, Nadire N Ali, Alexander R Lyon, and Aldo R Boccaccini. 2008. 'Biomaterials in cardiac tissue engineering: ten years of research survey', *Materials Science and Engineering: R: Reports*, 59: 1-37.
- Chen, Ray-Neng, Hsiu-O Ho, Yu-Ting Tsai, and Ming-Thau Sheu. 2004. 'Process development of an acellular dermal matrix (ADM) for biomedical applications', *Biomaterials*, 25: 2679-86.
- Chiang, Hou-Yu, Vyacheslav A Korshunov, Andrew Serour, Feng Shi, and Jane Sottile. 2009. 'Fibronectin is an important regulator of flow-induced vascular remodeling', *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 29: 1074-79.
- Coghlan, H Cecil, Anthony R Coghlan, Gerald D Buckberg, and James L Cox. 2006. 'The electrical spiral of the heart': its role in the helical continuum: The hypothesis of the anisotropic conducting matrix', *European journal of cardio-thoracic surgery*, 29: S178-S87.
- Cortiella, Joaquin, Jean Niles, Andrea Cantu, Andrea Brettler, Anthony Pham, Gracie Vargas, Sean Winston, Jennifer Wang, Shannon Walls, and Joan E Nichols. 2010. 'Influence of acellular natural lung matrix on murine embryonic stem cell differentiation and tissue formation', *Tissue Engineering Part A*, 16: 2565-80.
- Cranston, Emily, Jumpei Kawada, Stephane Raymond, Frederick G Morin, and Robert H Marchessault. 2003. 'Cocrystallization model for synthetic biodegradable

- poly (butylene adipate-co-butylene terephthalate)', *Biomacromolecules*, 4: 995-99.
- Crapo, Peter M, Christopher J Medberry, Janet E Reing, Stephen Tottey, Yolandi van der Merwe, Kristen E Jones, and Stephen F Badylak. 2012. 'Biologic scaffolds composed of central nervous system extracellular matrix', *Biomaterials*, 33: 3539-47.
- Davidenko, Natalia, Samir Hamaia, Daniel V Bax, Jean-Daniel Malcor, Carlos F Schuster, Donald Gullberg, Richard W Farndale, Serena M Best, and Ruth E Cameron. 2018. 'Selecting the correct cellular model for assessing of the biological response of collagen-based biomaterials', *Acta biomaterialia*, 65: 88-101.
- de Castro, Juçara G, Bruno VM Rodrigues, Ritchelli Ricci, Máira M Costa, André FC Ribeiro, Fernanda R Marciano, and Anderson O Lobo. 2016. 'Designing a novel nanocomposite for bone tissue engineering using electrospun conductive PBAT/polypyrrole as a scaffold to direct nanohydroxyapatite electrodeposition', *RSC advances*, 6: 32615-23.
- de Souza, R Rodrigues. 2002. 'Aging of myocardial collagen', *Biogerontology*, 3: 325-35.
- Engler, Adam J, Shamik Sen, H Lee Sweeney, and Dennis E Discher. 2006. 'Matrix elasticity directs stem cell lineage specification', *Cell*, 126: 677-89.
- Frantz, Christian, Kathleen M Stewart, and Valerie M Weaver. 2010. 'The extracellular matrix at a glance', *Journal of cell science*, 123: 4195-200.
- Freyer, Anette M, Simon R Johnson, and Ian P Hall. 2001. 'Effects of growth factors and extracellular matrix on survival of human airway smooth muscle cells', *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 25: 569-76.
- Fukushima, Kikku, Amaliya Rasyida, and Ming-Chien Yang. 2013. 'Biocompatibility of organically modified nanocomposites based on PBAT', *Journal of Polymer Research*, 20: 1-12.
- Gaetani, Roberto, Peter A Doevendans, Corina HG Metz, Jacqueline Alblas, Elisa Messina, Alessandro Giacomello, and Joost PG Sluijter. 2012. 'Cardiac tissue engineering using tissue printing technology and human cardiac progenitor cells', *Biomaterials*, 33: 1782-90.
- Gilbert, Thomas W, Tiffany L Sellaro, and Stephen F Badylak. 2006. 'Decellularization of tissues and organs', *Biomaterials*, 27: 3675-83.
- Granato, Alessandro EC, André C Ribeiro, Fernanda R Marciano, Bruno VM Rodrigues, Anderson O Lobo, and Marimelia Porcionatto. 2018. 'Polypyrrole increases branching and neurite extension by Neuro2A cells on PBAT ultrathin fibers', *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 14: 1753-63.
- Greiner, Andreas, and Joachim H Wendorff. 2007. 'Electrospinning: a fascinating method for the preparation of ultrathin fibers', *Angewandte Chemie International Edition*, 46: 5670-703.

- Griffith, Linda G, and Melody A Swartz. 2006. 'Capturing complex 3D tissue physiology in vitro', *Nature reviews Molecular cell biology*, 7: 211-24.
- Hernandez, Gabriel A, Alejandro Lemor, Daniel Clark, Vanessa Blumer, Danielle Burstein, Ryan Byrne, Rachel Fowler, Benjamin Frischhertz, Emily Sandhaus, and Kelly Schlendorf. 2020. 'Heart transplantation and in-hospital outcomes in adult congenital heart disease patients with Fontan: A decade nationwide analysis from 2004 to 2014', *Journal of cardiac surgery*, 35: 603-08.
- Hocking, Denise C, and Cecilia H Chang. 2003. 'Fibronectin matrix polymerization regulates small airway epithelial cell migration', *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 285: L169-L79.
- Hocking, Denise C, Jane Sottile, and Kurt J Langenbach. 2000. 'Stimulation of integrin-mediated cell contractility by fibronectin polymerization', *Journal of Biological Chemistry*, 275: 10673-82.
- Hocking, Denise C, Patricia A Titus, Ronen Sumagin, and Ingrid H Sarelius. 2008. 'Extracellular matrix fibronectin mechanically couples skeletal muscle contraction with local vasodilation', *Circulation research*, 102: 372-79.
- Hudson, Terry W, Stephen Y Liu, and Christine E Schmidt. 2004. 'Engineering an improved acellular nerve graft via optimized chemical processing', *Tissue engineering*, 10: 1346-58.
- Hynes, Richard O. 2002. 'Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines', *cell*, 110: 673-87.
- Ihn, KJ, ES Yoo, and SS Im. 1995. 'Structure and morphology of poly (tetramethylene succinate) crystals', *Macromolecules*, 28: 2460-64.
- Jao, Win-Chun, Chien-Hong Lin, Jui-Yuan Hsieh, Yi-Hsing Yeh, Chia-Yi Liu, and Ming-Chien Yang. 2010. 'Effect of immobilization of polysaccharides on the biocompatibility of poly (butyleneadipate-co-terephthalate) films', *Polymers for Advanced Technologies*, 21: 543-53.
- Järveläinen, Hannu, Annele Sainio, Markku Koulu, Thomas N Wight, and Risto Penttinen. 2009. 'Extracellular matrix molecules: potential targets in pharmacotherapy', *Pharmacological reviews*, 61: 198-223.
- Jawad, Hedeer, Alex R Lyon, Sian E Harding, Nadire N Ali, and Aldo R Boccaccini. 2008. 'Myocardial tissue engineering', *British medical bulletin*, 87.
- Juliano, RL. 'S. Haskill. 1993', *Signal transduction from the extracellular matrix. J. Cell Biol*, 120: 577-85.
- Ki, Chang Seok, Doo Hyun Baek, Kyung Don Gang, Ki Hoon Lee, In Chul Um, and Young Hwan Park. 2005. 'Characterization of gelatin nanofiber prepared from gelatin-formic acid solution', *Polymer*, 46: 5094-102.
- Krupnick, Alexander S, Daniel Kreisel, Friederike H Engels, Wilson Y Szeto, Theodore Plappert, Sicco H Popma, Alan W Flake, and Bruce R Rosengard. 2002. 'A novel small animal model of left ventricular tissue engineering', *The Journal of heart and lung transplantation*, 21: 233-43.

- Lee, EY, Wen-Hwa Lee, Charlotte S Kaetzel, Gordon Parry, and Mina J Bissell. 1985. 'Interaction of mouse mammary epithelial cells with collagen substrata: regulation of casein gene expression and secretion', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 82: 1419-23.
- LeGrice, Ian J, BH Smaill, LZ Chai, SG Edgar, JB Gavin, and Peter J Hunter. 1995. 'Laminar structure of the heart: ventricular myocyte arrangement and connective tissue architecture in the dog', *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 269: H571-H82.
- Magnusson, Magnus K, and Deane F Mosher. 1998. 'Fibronectin: structure, assembly, and cardiovascular implications', *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 18: 1363-70.
- Mathur, Anurag, Zhen Ma, Peter Loskill, Shaheen Jeeawoody, and Kevin E Healy. 2016. 'In vitro cardiac tissue models: current status and future prospects', *Advanced drug delivery reviews*, 96: 203-13.
- McCARTHY, JAMES B, and Leo T Furcht. 1984. 'Laminin and fibronectin promote the haptotactic migration of B16 mouse melanoma cells in vitro', *The Journal of cell biology*, 98: 1474-80.
- Mendoza-Novelo, Birzabith, Eva E Avila, Juan V Cauich-Rodríguez, Eduardo Jorge-Herrero, Francisco J Rojo, Gustavo V Guinea, and José L Mata-Mata. 2011. 'Decellularization of pericardial tissue and its impact on tensile viscoelasticity and glycosaminoglycan content', *Acta biomaterialia*, 7: 1241-48.
- Mukherjee, Shayanti, Jayarama Reddy Venugopal, Rajeswari Ravichandran, Seeram Ramakrishna, and Michael Raghunath. 2011. 'Evaluation of the biocompatibility of PLACL/collagen nanostructured matrices with cardiomyocytes as a model for the regeneration of infarcted myocardium', *Advanced Functional Materials*, 21: 2291-300.
- Murry, Charles E, Mark H Soonpaa, Hans Reinecke, Hidehiro Nakajima, Hisako O Nakajima, Michael Rubart, Kishore BS Pasumarthi, Jitka Ismail Virag, Stephen H Bartelmez, and Veronica Poppa. 2004. 'Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts', *Nature*, 428: 664-68.
- Müller, Rolf-Joachim, Ilona Kleeberg, and Wolf-Dieter Deckwer. 2001. 'Biodegradation of polyesters containing aromatic constituents', *Journal of biotechnology*, 86: 87-95.
- Nakayama, Karina H, Cynthia A Batchelder, Chang I Lee, and Alice F Tarantal. 2010. 'Decellularized rhesus monkey kidney as a three-dimensional scaffold for renal tissue engineering', *Tissue Engineering Part A*, 16: 2207-16.
- Oh, Esther, Michael Pierschbacher, and Erkki Ruoslahti. 1981. 'Deposition of plasma fibronectin in tissues', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 78: 3218-21.
- Ohashi, Tomoo, Daniel P Kiehart, and Harold P Erickson. 1999. 'Dynamics and elasticity of the fibronectin matrix in living cell culture visualized by fibronectin-green fluorescent protein', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96: 2153-58.

- Ott, Harald C, Thomas S Matthiesen, Saik-Kia Goh, Lauren D Black, Stefan M Kren, Theoden I Netoff, and Doris A Taylor. 2008. 'Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart', *Nature medicine*, 14: 213-21.
- Parker, Kevin K, and Donald E Ingber. 2007. 'Extracellular matrix, mechanotransduction and structural hierarchies in heart tissue engineering', *Philosophical transactions of the royal society b: biological sciences*, 362: 1267-79.
- Pati, F, J Jang, D Ha, SW Kim, J Rhie, J Shim, D Kim, and D Cho. 2014. "Printing 3D tissue analogues with decellularized extracellular matrix bioink Nat." In.: Commun.
- Pham, Quynh P, Upma Sharma, and Antonios G Mikos. 2006. 'Electrospinning of polymeric nanofibers for tissue engineering applications: a review', *Tissue engineering*, 12: 1197-211.
- Place, Elsie S, Julian H George, Charlotte K Williams, and Molly M Stevens. 2009. 'Synthetic polymer scaffolds for tissue engineering', *Chemical society reviews*, 38: 1139-51.
- Quint, Clay, Yuka Kondo, Roberto J Manson, Jeffrey H Lawson, Alan Dardik, and Laura E Niklason. 2011. 'Decellularized tissue-engineered blood vessel as an arterial conduit', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108: 9214-19.
- Radisic, Milica, H Park, S Gerecht, C Cannizzaro, R Langer, and G Vunjak-Novakovic. 2007. 'Biomimetic approach to cardiac tissue engineering', *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 362: 1357-68.
- Reis, Lewis A, Loraine LY Chiu, Nicole Feric, Lara Fu, and Milica Radisic. 2016. 'Biomaterials in myocardial tissue engineering', *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, 10: 11-28.
- Rentsch, C, B Rentsch, S Heinemann, R Bernhardt, B Bischoff, Y Förster, D Scharnweber, and S Rammelt. 2014. 'ECM inspired coating of embroidered 3D scaffolds enhances calvaria bone regeneration', *BioMed research international*, 2014.
- Santana-Melo, Gabriela F, Bruno VM Rodrigues, Edmundo da Silva, Ritchelli Ricci, Fernanda R Marciano, Thomas J Webster, Luana MR Vasconcellos, and Anderson O Lobo. 2017. 'Electrospun ultrathin PBAT/nHAp fibers influenced the in vitro and in vivo osteogenesis and improved the mechanical properties of neoformed bone', *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 155: 544-52.
- Schaefer, Liliana, and Roland M Schaefer. 2010. 'Proteoglycans: from structural compounds to signaling molecules', *Cell and tissue research*, 339: 237-46.
- Schurink, Fred. 2008. 'The Review of English Studies Prize Essay 'Like a Hand in the Margine of a Booke': William Blount's Marginalia and the Politics of Sidney's Arcadia', *Review of English Studies*, 59: 1-24.
- Sell, Scott, Catherine Barnes, Matthew Smith, Michael McClure, Parthasarathy Madurantakam, Joshua Grant, Michael Mcmanus, and Gary Bowlin. 2007.

- 'Extracellular matrix regenerated: tissue engineering via electrospun biomimetic nanofibers', *Polymer International*, 56: 1349-60.
- Smaill, Bruce H, Ian J LeGrice, Darren A Hooks, Andrew J Pullan, Bryan J Caldwell, and Peter J Hunter. 2004. "Cardiac structure and electrical activation: models and measurement." In *Proc Austral Physiol Pharm Soc*, 141-9.
- Smith, Ray. 2005. *Biodegradable polymers for industrial applications* (CRC Press).
- Sottile, Jane, Denise C Hocking, and Pamela J Swiatek. 1998. 'Fibronectin matrix assembly enhances adhesion-dependent cell growth', *Journal of cell science*, 111: 2933-43.
- Subbiah, Thandavamoorthy, Gajanan S Bhat, Richard W Tock, Siva Parameswaran, and Seshadri S Ramkumar. 2005. 'Electrospinning of nanofibers', *Journal of applied polymer science*, 96: 557-69.
- Syed, Omaer, Nick J Walters, Richard M Day, Hae-Won Kim, and Jonathan C Knowles. 2014. 'Evaluation of decellularization protocols for production of tubular small intestine submucosa scaffolds for use in oesophageal tissue engineering', *Acta biomaterialia*, 10: 5043-54.
- Tallquist, MD. 2015. 'Revisiting Cardiac Cellular Composition', *Circulation Research*, CIRCRESAHA, 115.
- Tamkun, JW, and RO Hynes. 1983. 'Plasma fibronectin is synthesized and secreted by hepatocytes', *Journal of Biological Chemistry*, 258: 4641-47.
- Theocharis, Achilleas D, Spyros S Skandalis, Chrysostomi Gialeli, and Nikos K Karamanos. 2016. 'Extracellular matrix structure', *Advanced drug delivery reviews*, 97: 4-27.
- Tomihira, M. 1991. 'Changes in plasma vitronectin, fibronectin, and serum laminin P1 levels and immunohistochemical study of vitronectin in the liver of patients with chronic liver diseases', *Fukuoka igaku zasshi= Hukuoka acta medica*, 82: 21-30.
- Uchida, Noriyuki, Srikanth Sivaraman, Nicholas J Amoroso, William R Wagner, Akihiro Nishiguchi, Michiya Matsusaki, Mitsuru Akashi, and Jiro Nagatomi. 2016. 'Nanometer-sized extracellular matrix coating on polymer-based scaffold for tissue engineering applications', *Journal of biomedical materials research Part A*, 104: 94-103.
- Uygun, Basak E, Alejandro Soto-Gutierrez, Hiroshi Yagi, Maria-Louisa Izamis, Maria A Guzzardi, Carley Shulman, Jack Milwid, Naoya Kobayashi, Arno Tilles, and Francois Berthiaume. 2010. 'Organ reengineering through development of a transplantable recellularized liver graft using decellularized liver matrix', *Nature medicine*, 16: 814.
- Vacanti, Joseph P, and Charles A Vacanti. 2014. 'The history and scope of tissue engineering.' in, *Principles of tissue engineering* (Elsevier).
- Van der Flier, Arjan, and Arnoud Sonnenberg. 2001. 'Function and interactions of integrins', *Cell and tissue research*, 305: 285-98.
- Vasconcellos, Luana Marotta Reis, Gabriela F Santana-Melo, Edmundo Silva, Vanessa Fernandes Pereira, Juliani Caroline Ribeiro Araújo, André Diniz Rosa Silva,

- André SA Furtado, Conceição de Maria Vaz Elias, Bartolomeu Cruz Viana, and Fernanda Roberta Marciano. 2021. 'Electrospun Poly (butylene-adipate-co-terephthalate)/Nanohydroxyapatite/Graphene Nanoribbon Scaffolds Improved the In Vivo Osteogenesis of the Neoformed Bone', *Journal of Functional Biomaterials*, 12: 11.
- Virani, Salim S, Alvaro Alonso, Emelia J Benjamin, Marcio S Bittencourt, Clifton W Callaway, April P Carson, Alanna M Chamberlain, Alexander R Chang, Susan Cheng, and Francesca N Dellinger. 2020. 'Heart disease and stroke statistics—2020 update: a report from the American Heart Association', *Circulation*, 141: e139-e596.
- Walker, C Allyson, and Francis G Spinale. 1999. 'The structure and function of the cardiac myocyte: a review of fundamental concepts', *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*, 118: 375-82.
- Wang, Raymond M, and Karen L Christman. 2016. 'Decellularized myocardial matrix hydrogels: In basic research and preclinical studies', *Advanced drug delivery reviews*, 96: 77-82.
- Weber, Karl T. 1989. 'Cardiac interstitium in health and disease: the fibrillar collagen network', *Journal of the American College of Cardiology*, 13: 1637-52.
- Witt, Uwe, Rolf-Joachim Müller, and Wolf-Dieter Deckwer. 1997. 'Biodegradation behavior and material properties of aliphatic/aromatic polyesters of commercial importance', *Journal of environmental polymer degradation*, 5: 81-89.
- Witt, Uwe, Motonori Yamamoto, Ursula Seeliger, Rolf-Joachim Müller, and Volker Warzelhan. 1999. 'Biodegradable polymeric materials—not the origin but the chemical structure determines biodegradability', *Angewandte Chemie International Edition*, 38: 1438-42.
- Wu, Kaihong, Ying Long Liu, Bin Cui, and Zhongchao Han. 2006. 'Application of stem cells for cardiovascular grafts tissue engineering', *Transplant immunology*, 16: 1-7.
- Xue M, Jackson CJ. 2015 'Extracellular Matrix Reorganization During Wound Healing and Its Impact on Abnormal Scarring', *Adv Wound Care (New Rochelle)*, 1;4(3):119-136.
- Yuan, Xiaoyan, Yuanyuan Zhang, Cunhai Dong, and Jing Sheng. 2004. 'Morphology of ultrafine polysulfone fibers prepared by electrospinning', *Polymer international*, 53: 1704-10.
- Zamir, Eli, and Benjamin Geiger. 2001. 'Molecular complexity and dynamics of cell-matrix adhesions', *Journal of cell science*, 114: 3583-90.
- Zhang, Yang, Xiuli He, Jianping Li, Zhenjiang Miao, and Feng Huang. 2008. 'Fabrication and ethanol-sensing properties of micro gas sensor based on electrospun SnO<sub>2</sub> nanofibers', *Sensors and Actuators B: Chemical*, 132: 67-73.