

T.C.

BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ ORTAK PROGRAMI

**KOYUN KALP KAPAKÇIĞININ HÜCRESİZLEŞTİRİLMESİYLE REJENERATİF
İNSAN KALP KAPAKÇIĞININ GELİŞTİRİLMESİ VE ETKİNLİĞİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

DOKTORA TEZİ

MÜSLÜM SÜLEYMAN İNAL

TEZ DANIŞMANI

PROF. DR. CİHAN DARCAN

İKİNCİ TEZ DANIŞMANI

DOÇ. DR. ALİ AKPEK

BİLECİK, 2023

10584439

BEYAN

“Koyun Kalp Kapakçığının Hücresizleştirilmesiyle Rejeneratif İnsan Kalp Kapakçığının Geliştirilmesi ve Etkinliğinin Değerlendirilmesi” adlı doktora tezi hazırlık ve yazımı sırasında bilimsel araştırma ve etik kurallarına uyduğumu, başkalarının eserlerinden yararlandığım bölümlerde bilimsel kurallara uygun olarak atıfta bulunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, tezin herhangi bir kısmının Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını, aksinin tespit edileceği muhtemel durumlarda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Bu çalışmanın, Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP), TÜBİTAK veya benzeri kuruluşlarca desteklenmesi durumunda; projenin ve destekleyen kurumun adı proje numarası ile birlikte, ETİK KURUL onayı alınması durumunda ise ETİK KURUL tarih karar ve sayı bilgilerinin beyan edilmesi gerekmektedir.			
DESTEK ALINMIŞTIR	☒	DESTEK ALINMAMIŞTIR	☐
Destek alındı ise;			
Destekleyen kurum; Yıldız Teknik Üniversitesi			
Destegin Türü		Proje Numarası	
1- BAP (Bilimsel Araştırma Projesi)		FCD-2021-4687	
ETİK KURUL onayı var ise;			
ETİK KURUL karar tarih/sayı:		/.....	

Müslüm Süleyman İNAL

Tarih

İmza

ÖN SÖZ

Bu tez çalışmasının gerçekleştirilmesinde çalışmamı sahiplenerek takip eden, bilimsel altyapı oluşturmamda öncü olan, bana kattığı farklı bilimsel bakış açıları ve akademik yönlendirmeleri için saygıdeğer danışmanım Prof. Dr. Cihan DARCAN'a katkı ve emekleri için teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Doktora öğrenimimin başlangıcından bu yana her konuda desteğini esirgemeyen, her aşamada tecrübelerini paylaştan, tezin fonlanmasında aracı olan ikinci danışmanım Doç. Dr. Ali AKPEK'e teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Tez çalışmamın son halini almasında değerli katkıları bulunan Doç. Dr. Emel ERGENE ve Doç. Dr. Hüseyin AVCI'ya teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışmasının deneysel kısmındaki yardımlarından dolayı başta Gözde YEŞİLTAŞ olmak üzere Huri ÇINAR, Hanife Sevgi VARLI, Tayfun ŞENGEL ve ismini zikredemediğim birçok kişiye sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu uzun ve zorlu süreçte maddi/manevi desteklerini ve ümitlerini asla yitirmeyen aileme teşekkür ederim.

Bu tez çalışması Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) koordinatörlüğü tarafından FCD-2021-4687 numaralı proje ile desteklenmiştir.

Müslüm Süleyman İNAL

2023

ÖZET

KOYUN KALP KAPAKÇIĞININ HÜCRESİZLEŞTİRİLMESİYLE REJENERATİF İNSAN KALP KAPAKÇIĞININ GELİŞTİRİLMESİ VE ETKİNLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Dünya çapında ölümlerin neredeyse 3'te 1'ine sebep olan kardiyovasküler hastalıklar içerisinde kalp kapakçık hastalıkları en sık rastlanılan türlerden biridir. Mekanik ve biyoprostetik olmak üzere kalp kapakçığı değişimi operasyonlarında kullanılmak için geliştirilmiş iki sınıf kapakçık bulunmaktadır. Fakat mekanik kapakların ömür boyu antikoagülasyon ilaç tedavisi gerektirmesi ve pediatrik hastalar için uygun olmaması gibi dezavantajları bulunmaktadır. Biyoprostetik kapakçıklar da kısa ömürlü olmaları ve immünolojik sıkıntılarından dolayı çeşitli dezavantajlara sahiptir. Bugüne kadar üretilen tüm kapak protezlerinin sınırlı kullanım ömrü olup yeniden operasyon gerektirmektedirler. Dolayısıyla canlı, rejeneratif, biyouyumlu bir kapakçık üretimindeki zorlukların üstesinden gelebilmek için kalp kapakçığı doku mühendisliği umut vaat etmektedir. Bu doğrultuda başlangıç matrisi oluşturmak amacıyla farklı tür canlılardan elde edilen kalp kapakçıkları çeşitli metodlar yardımıyla hücresiz hale getirilmiş ve biyouyumlulukları test edilmiştir. Test edilen kapaklar çoğunlukla domuzlardan elde edilmiş olmasına rağmen literatürde yer alan klinik sonuçlara göre domuz kapakçıkları insanlarda başarısız olmaktadır. Bu yüzden farklı türlerden elde edilmiş hücresiz kapakçıkların başlangıç matrisi olarak değerlendirilmesine ihtiyaç vardır. Ayrıca koyun kalp kapakçıklarının klinik çalışması henüz gerçekleştirilmemiştir. Bu yüzden klinik çalışmalara ışık tutacak şekilde bu tezde ilk defa koyun pulmoner kapakçıkları hücresizleştirildikten sonra insan göbek kordonu endotel hücreleri (HUVEC) ve insan dermal fibroblast hücrelerinin kokültürü aracılığıyla hücresiz iskele yeniden hücrelendirilmeye çalışılmış ve insan hücrelerinin, koyun kapakçık matrisinde hücre dışı matris (ECM) elemanlarını yeniden üretme potansiyelleri araştırılmıştır. Elde edilen bulgulara göre pulmoner arter duvarının interstiyumuna yüksek düzeyde hücre sızması ve yüksek düzeyde yeniden hücrelendirme sağlanmış ve kollajen, elastin gibi temel ECM proteinlerin gen ifadesinde önemli artış gözlenmiştir. Dolayısıyla hücresizleştirilmiş koyun kalp kapakçıkları insan hücreleriyle yeniden hücrelendirildikten sonra canlı ve rejeneratif özellik kazandığı için domuz muadillerine veya diğer protezlere bir alternatif oluşturma potansiyeli yüksektir.

Anahtar Kelimeler: Doku Mühendisliği, Kalp Kapakçığı, Hücresizleştirme, Ksenograft, Rejenerasyon.

ABSTRACT

DEVELOPMENT AND EVALUATION OF THE EFFICACY OF REGENERATIVE HUMAN HEART VALVE BY DECELLULARIZATION OF SHEEP HEART VALVE

Among cardiovascular diseases, which cause almost 1 in 3 deaths worldwide, heart valve diseases are one of the most common types. There are two classes of valves developed for use in heart valve replacement operations: mechanical and bioprosthetic. However, mechanical valves have the disadvantages of requiring lifelong anticoagulation medication and are not suitable for paediatric patients. Bioprosthetic valves also have several disadvantages due to their short life span and immunological problems. All valve prostheses produced to date have a limited lifespan and require reoperation. Therefore, heart valve tissue engineering shows promise in overcoming the challenges of producing a viable, regenerative, biocompatible valve. In this direction, in order to create a starting matrix, heart valves obtained from different species were decellularised by various methods and their biocompatibility was tested. Although the valves tested were mostly derived from pigs, clinical results in the literature suggest that porcine valves fail in humans. Therefore, there is a need to evaluate acellular valves obtained from different species as a starting matrix. In addition, clinical trials of sheep heart valves have not yet been performed. Therefore, in order to shed light on clinical studies, in this thesis, for the first time, after decellularizing sheep pulmonary valves, an attempt was made to recellularize the acellular scaffold through the coculture of human umbilical cord endothelial cells (HUVEC) and human dermal fibroblast cells, and the potential of human cells to regenerate extracellular matrix (ECM) elements in the sheep valve matrix was investigated. According to the findings obtained, a high level of cell infiltration and a high level of recellularisation of the pulmonary artery wall was achieved and a significant increase in the gene expression of basic ECM proteins such as collagen and elastin was observed. Therefore, decellularised sheep heart valves have a high potential to provide an alternative to porcine counterparts or other prostheses as they are viable and regenerative after recellularisation with human cells.

Keywords: Tissue Engineering, Heart Valve, Decellularization, Xenograft, Regeneration.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖN SÖZ.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
TABLolar LİSTESİ.....	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	vii
KISALTMALAR LİSTESİ.....	x
1. GİRİŞ	1
1.1. Literatür Özeti	2
1.1.1. Kalp kapakçıklarının yapısı, gelişimi ve fonksiyonları	2
1.1.2. Kalp kapakçığı hastalıkları ve mevcut tedavi yöntemleri	5
1.1.3. Kalp kapakçıklarının hücresizleştirilmesi	8
1.1.4. Klinik çalışmalarda hücresizleştirilmiş ksenogreftlerin kullanımı ve sonuçları.....	10
1.1.5. Hücresizleştirilmiş ksenogreft kalp kapakçıkları.....	12
2. MATERYAL ve METOD	22
2.1. Hücresizleştirme	23
2.2. Hücresizleştirilmiş Kapakçıkların Karakterizasyonu	24
2.2.1. Kalıntı DNA içeriğinin belirlenmesi.....	24
2.2.2. Şişme testi	25
2.2.3. SEM görüntüleme	25
2.2.4. Çekme testi	25
2.2.5. Kollajenaz degradasyon testi	26
2.2.6. Histolojik karakterizasyon.....	27
2.3. Hücre Kültürü Çalışmaları.....	28
2.3.1. Hücre çözündürme, kültür ve pasajlama.....	28
2.3.2. Hücre dondurma	28
2.4. İskelelerin Yeniden Hücrelendirilmesi ve Karakterizasyonu	29
2.4.1. Yeniden hücrelendirme.....	29
2.4.2. MTT analizi	29

2.4.3. Histolojik karakterizasyon	30
2.4.4. RNA izolasyonu	30
2.4.5. cDNA çevrimi	30
2.4.6. Gen ifade seviyelerinin Real Time PCR ile belirlenmesi.....	31
3. BULGULAR	32
3.1. Hücresizleştirilmiş Kapakçıkların Karakterizasyonu	32
3.1.1. Kalıntı DNA içeriği	32
3.1.2. Şişme testi	33
3.1.3. SEM görüntüleme	34
3.1.4. Biyomekanik karakterizasyon	37
3.1.5. Enzimatik degradasyon	38
3.1.6. Histolojik karakterizasyon	39
3.2. Hücre Kültürü.....	48
3.3. Yeniden Hücrelendirilen İskelelerin Karakterizasyonu	50
3.3.1. MTT analizi	50
3.3.2. Histolojik karakterizasyon	51
3.3.3. SEM görüntüleme	56
3.3.4. Temel ECM proteinlerinin gen ifadeleri.....	58
4. TARTIŞMA VE SONUÇ	59
4.1. Hücresizleştirilmiş Kapakçıkların Karakterizasyonu	59
4.2. Yeniden Hücrelendirilmiş Kapakçıkların Karakterizasyonu	62
KAYNAKÇA	66

TABLÖLER LİSTESİ

Sayfa

Tablo 1.1. Literatürde yer alan kalp kapakçıklarının hücresizleştirme metodları ve sonrasında elde edilen önemli bulgular	12
Tablo 2.1. Materyal listesi tablosu	22
Tablo 2.2. Cihaz listesi tablosu	23
Tablo 2.3. DNA izolasyonunda kullanılan lizis tampon içeriği	24
Tablo 2.4. Ters transkripsiyon reaksiyon içeriği	31
Tablo 2.5. Real Time PCR reaksiyonunda kullanılan primer dizi listesi	31
Tablo 3.1. Doğal ve hücresizleştirilmiş kapakçık örneklerinin çekme testi sonucunda elde edilen UTS ve elastisite modülü değerleri	37

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1. Kalp kapağı makroskopik görüntüsü.....	2
Şekil 1.2. Aort ve pulmoner kapak yaprakçıklarının 3 katmanlı yapısının temsili görüntüsü.....	3
Şekil 1.3. Sağlıklı ve hastalıklı kalp kapakçıklarının açık/kapalı durumdaki temsili görüntüleri.....	6
Şekil 1.4. Kalp kapakçıklarının hücresizleştirilmesinde kullanılan farklı metodlar.....	9
Şekil 1.5. Kalp kapakçığı mühendisliği alanında şimdiye kadar yapılmış çalışmaların genelleştirilmiş özeti.....	19
Şekil 2.1. Örneklerin çekme test cihazına yerleştirildikten sonraki görüntüsü.....	26
Şekil 3.1. Doğal kapakçık bölümlerinde, hücresizleştirme işlemi ile birlikte meydana gelen DNA miktar değişimleri.....	33
Şekil 3.2. Doğal kapakçık bölümlerinde, hücresizleştirme işlemi ile birlikte meydana gelen şişme oranlarındaki değişimler.....	34
Şekil 3.3. Doğal yaprakçık örneğinin SEM mikrografı.....	35
Şekil 3.4. Hücresizleştirilmiş yaprakçık örneğinin SEM mikrografı.....	35
Şekil 3.5. Doğal arter duvarı örneğinin SEM mikrografı.....	36
Şekil 3.6. Hücresizleştirilmiş arter duvarı örneğinin SEM mikrografı.....	36
Şekil 3.7. Arter duvarı, yaprakçık örneklerine ait kontrol grubu ve hücresizleştirilmiş grubun gerilme/gerinim eğrisi grafikleri.....	38
Şekil 3.8. Hücresizleştirilmiş yaprakçık ve arter duvarı örneklerinin enzimatik degradasyon profillerinin kontrol grubu ile karşılaştırması.....	39
Şekil 3.9. H&E ile boyanmış doğal yaprakçık örneğinin ışık mikroskopundaki görüntüsü.....	40
Şekil 3.10. H&E ile boyanmış hücresizleştirilmiş yaprakçık örneğinin ışık mikroskopundaki görüntüsü.....	40

Şekil 3.11. H&E ile boyanmış yaprakçık örneklerinin farklı bölgelerden çekilmiş görüntüleri.....	41
Şekil 3.12. H&E ile boyanmış doğal arter duvarı örneğinin ışık mikroskopundaki görüntüsü.....	42
Şekil 3.13. H&E ile boyanmış hücresizleştirilmiş arter duvarı örneğinin ışık mikroskopundaki görüntüsü.....	42
Şekil 3.14. H&E ile boyanmış arter duvarı örneklerinin farklı bölgelerden çekilmiş görüntüleri.....	43
Şekil 3.15. Movat pentakrom ile boyanmış doğal yaprakçık örneğinin ışık mikroskopundaki görüntüsü.....	44
Şekil 3.16. Movat pentakrom ile boyanmış hücresizleştirilmiş yaprakçık örneğinin ışık mikroskopundaki görüntüsü.....	44
Şekil 3.17. Movat pentakrom ile boyanmış yaprakçık örneklerinin farklı bölgelerden çekilmiş görüntüleri.....	45
Şekil 3.18. Movat pentakrom ile boyanmış doğal arter duvarı örneğinin ışık mikroskopundaki görüntüsü.....	46
Şekil 3.19. Movat pentakrom ile boyanmış hücresizleştirilmiş arter duvarı örneğinin ışık mikroskopundaki görüntüsü.....	46
Şekil 3.20. Movat pentakrom ile boyanmış arter duvarı örneklerinin farklı bölgelerden çekilmiş görüntüleri.....	47
Şekil 3.21. HUVEC'lerin 2 günlük kültüründen sonraki inverted mikroskop ile alınan görüntüsü.....	48
Şekil 3.22. HUVEC'lerin 4 günlük kültüründen sonraki inverted mikroskop ile alınan görüntüsü.....	48
Şekil 3.23. Fibroblast hücrelerinin 7 günlük kültüründen sonraki inverted mikroskop ile alınan görüntüsü.....	49
Şekil 3.24. Fibroblast hücrelerinin 15 günlük kültüründen sonraki inverted mikroskop ile alınan görüntüsü.....	49

Şekil 3.25. Fibroblast hücrelerinin 21 günlük kültüründen sonraki inverted mikroskop ile alınan görüntüsü.....	50
Şekil 3.26. Yeniden hücrelendirilmiş kapakçık dokularının MTT analizi sonuçları.....	51
Şekil 3.27. H&E ile boyanmış yeniden hücrelendirilmiş yaprakçık örneğinin fibroza tabakasında konumlanmış hücrelerin ışık mikroskobundaki görüntüsü.....	52
Şekil 3.28. H&E ile boyanmış yeniden hücrelendirilmiş yaprakçık örneğinin ventrikülaris tabakasında konumlanmış hücrelerin ışık mikroskobundaki görüntüsü.....	53
Şekil 3.29. H&E ile boyanmış yeniden hücrelendirilmiş arter duvarı örneğinin ışık mikroskobundaki görüntüsü.....	54
Şekil 3.30. DAPI/Phalloidin floresan boyalar ile boyanmış yeniden hücrelendirilmiş arter duvarı ve yaprakçık örneklerinin konfokal mikroskop görüntüsü.....	55
Şekil 3.31. Yeniden hücrelendirilmiş yaprakçık örneğinin SEM mikrografı.....	56
Şekil 3.32. Yeniden hücrelendirilmiş arter duvarı örneğinin SEM mikrografı.....	57
Şekil 3.33. Yeniden hücrelendirilmiş arter duvarı ve yaprakçık örneklerindeki temel ECM proteinleri gen ifadelerindeki değişim.....	58

KISALTMALAR LİSTESİ

KVH: Kardiyovasküler Hastalıklar

VEC: Kapak Endotel Hücresi

VIC: Kapak İnterstisyel Hücresi

GAG: Glikozaminoglikan

α -SMA: α -Düz Kas Aktin

ECM: Hücre Dışı Matris

DNA: Deoksiriboz Nükleik Asit

SD: Sodyum Deoksikolat

SDS: Sodyum Dodesil Sülfat

EDTA: Etilen Diamin Tetra Asetik Asit

hMSC: İnsan Mezenkimal Kök Hücresi

α -Gal: Gal α 1-3 Gal beta1-(3)4GlcNAc-R

HUVEC: İnsan Göbek Kordonu Endotel Hücresi

VEGF: Damar Endoteli Büyüme Faktörü

neu5Gc: N-Glikolilnöraminik asit

β 2GalNT2: β -2-Polipeptit N-Asetilgalaktozaminiltransferaz

PBS: Fosfat Tamponlu Salin

DMSO: Di Metil Sülfoksit

1. GİRİŞ

Kardiyovasküler hastalıklar (KVH) dünya çapında önde gelen ölüm nedenlerinden biridir (Kodigepalli vd., 2020). Dünya Sağlık Örgütü'nün internet sitesinde 2021' de yayınlanan habere göre dünya çapında toplam ölümlerin %32'sinin KVH kaynaklı olduğu belirtilmiştir (World Health Organization, 2021). 2022 yılında kardiyovasküler sağlık epidemiyolojisi ile ilgili yapılan bir çalışmada dünya genelinde KVH nedenli ölüm sayılarının 20 milyondan fazla olduğu bildirilmiştir (Vaduganathan vd., 2022). KVH'ler koroner kalp hastalığı, serebrovasküler hastalık, periferik arter hastalığı, romatizmal kalp hastalığı, konjenital kalp kusurları, derin ven trombozu ve pulmoner emboli olarak çeşitli sınıflara ayrılmaktadır.

Kalp kapakçık hastalıkları en sık görülen KVH'ler arasındadır ve temelde yetersizlik (regürjitasyon) veya darlık (stenoz) olmak üzere iki farklı şekilde gelişmektedir (Copeland vd., 2018). Bu iki sorun konjenital kusurlar, romatizmal ateş, enfektif endokardit ve kalp kapakçığı kalsifikasyonu gibi farklı hastalıklar sonucu ortaya çıkmaktadır (VeDepo vd., 2017a). Dünya çapında yeni doğanların yaklaşık %1'inde konjenital kalp kapakçığı kusurları olduğu ve yalnızca ABD'de toplam nüfusun yaklaşık %2,5'ini etkilediği bildirilmiştir (Mozaffarian vd., 2016; Ibrahim vd., 2017). Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı verilerinde ülkemizdeki yıllık kapakçık hasta sayısı ve kapak değişimi operasyon sayısına ulaşamamıştır. Romatizmal kalp hastalığı, streptokok bakterileri enfeksiyonuna bağlı olarak gelişen romatizmal ateşten kaynaklanmakta ve iltihaplanma veya skar oluşumu ile sonuçlanmaktadır (World Health Organization, 2021). Kalp kapağı hastalıklarının erken dönemde teşhisi ile çeşitli ilaçlarla tedavisi mümkün olmakla birlikte, ilaçla tedavinin işe yaramadığı durumlarda cerrahi müdahaleler ile kalp kapağının onarımı veya değiştirilmesi gerekmektedir. Kalp kapağı hastalıklarının tedavisi için dünya çapında her yıl yaklaşık 300.000 kalp kapağı değiştirme ameliyatı yapılmaktadır (Seyrek vd., 2022). Bu sayının 2050'ye kadar yılda 850.000 dolaylarına ulaşacağı öngörülmektedir (Naso ve Gandaglia, 2018; Allan vd., 2019; Saleeb vd., 2019). Ortaya çıkacak olan ihtiyacın giderilmesi için, kalp kapağı ikameleri açısından mevcut teknolojik ürünlerin geliştirilmesi hayati önem arz etmektedir ve bu alanda kalp kapakçığı doku mühendisliği umut vaat etmektedir.

1.1. Literatür Özeti

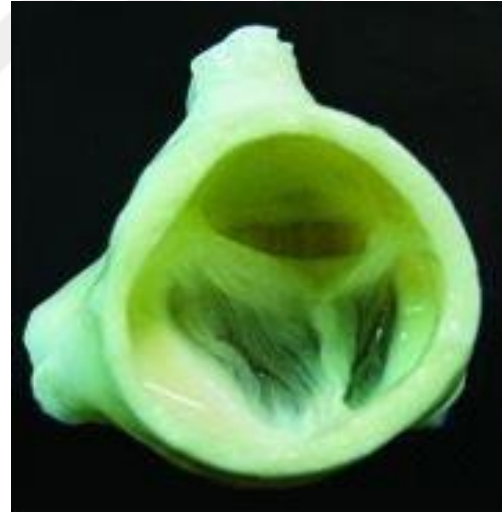
1.1.1. Kalp kapakçıklarının yapısı, gelişimi ve fonksiyonları

Kalp kapakçıkları, atriyumdan ventriküllere ve ventriküllerden kardiyak arterlere tek yönlü kan akışından sorumludurlar. Pulmoner kapaklar kalbin sağ ventrikülü ile pulmoner arter arasında konumlanırken, aort kapaklar sol ventrikül ile aort damarı arasında yer almaktadır. Bu iki kapakçık anatomik olarak birbirine benzemektedir. Ayrıca bunların haricinde kalpte triküspit kapak ve mitral kapak olarak adlandırılan iki kapak daha mevcuttur. Pulmoner kapakçıklar, iki ana toplar damar aracılığıyla sırasıyla sağ atriyum ve sağ ventriküle dolan oksijeni kullanılmış kanın pulmoner arter ile iki akciğere de gönderilmesini sağlar. Bu sırada da kanın geri yöndeki akışını engeller. Benzer şekilde aort kapağı, akciğer toplardamarı ile gelen oksijenlenmiş kanın aort damarı ile tüm vücuda tek yönlü iletimini sağlar. Pulmoner kapaktan farklı olarak aort kapağı, tüm vücuda kan akışını yönetmedeki rolü gereği daha yüksek basınca maruziyeti nedeniyle diğer tüm kapaklara göre hastalığa daha yatkındır (Stewart vd., 1997).

Doğal Aort Kapağı



Hücreleştirilmiş Aort Kapağı

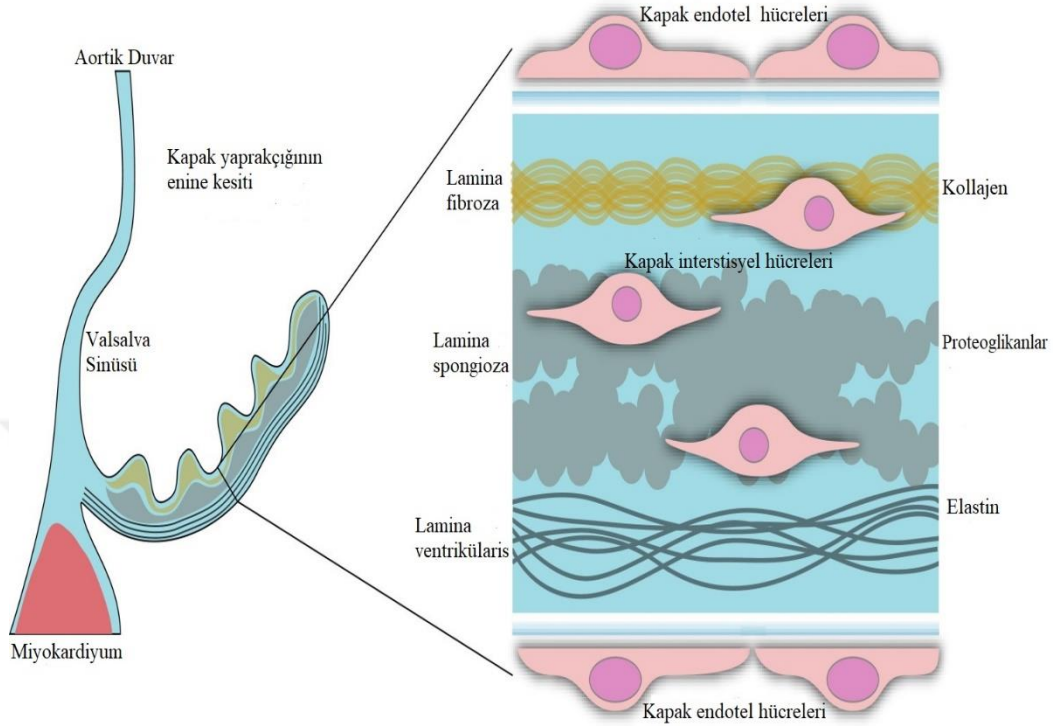


Şekil 1.1. Kalp kapağı makroskopik görüntüsü.

Kaynak: (Sierad vd., 2015)

Pulmoner ve aort kalp kapakçıkları 3 adet esnek yaprakçık ve dairesel bir kök kompleksinden oluşmaktadır (Sacks vd., 2009). Yaprakçıklar pulmoner veya aort duvarına yarım ay şeklinde bağlı olduğu için bu kapakçıklara yarım ay kapakçıkları da denmektedir (Şekil 1.1). Yaprakçıkların duvara bağlandığı ve diğer yaprakçıklarla birleştiği kısma ise komissür adı verilmektedir. Yaprakçıkların arkasında kapakların kök kısmında valsalva sinüsleri adı verilen ve kanın çıkışıyla şişen genişlemiş cepler bulunur. Kapakçıklarda,

yaprakçıkların ince yapısı dolayısıyla besinler ve oksijen kandan doğrudan difüze edilmektedir ve bu nedenle kan damarları yok denecek kadar az bulunmaktadır (Schoen, 2008).



Şekil 1.2. Aort ve pulmoner kapak yaprakçıklarının 3 katmanlı yapısının temsili görüntüsü.

Kaynak: (Rutkovskiy vd., 2017)

Yarım ay kapaklarındaki yaprakçıklar lamina fibroza, lamina spongioza ve lamina ventrikularis olmak üzere 3 katmandan oluşmaktadır (Brazile vd., 2015). Fibroza katmanı, diğer tabakalara göre en kalın ve ana taşıyıcı tabakadır (Şekil 1.2). Aortik/pulmoner arter tarafında bulunur, doku gücü ve dayanıklılığından sorumludur (Vesely ve Noseworthy, 1992). Fibroza katmanı başta tip I kollajen olmak üzere yoğun bir kollajen ağından oluşur ve çevresel yönüne doğru yönlendirilmiş kalın lif demetleri oluşturur (Copeland vd., 2018). Bu katmanda tip III kollajen de mevcuttur ve daha ince, daha ağsı lifler oluşturur. Elastin lifleri kollajen lif ağı ile seyrek olarak birbirine geçmiştir (Vesely ve Noseworthy, 1992). Orta tabaka olarak nitelendirilebilen spongioza, esas olarak proteoglikanlardan ve glikozaminoglikanlardan (GAG) oluşmaktadır (Joyce vd., 2009). Ayrıca fibroza ile ventrikularis tabakalarını birbirine bağlayan seyrek bir kollajen lif ağı da bulundurulur (Stella ve Sacks, 2007). Spongioza tabakası, fibroza ile ventrikularis tabakaları arasında bir yastık görevi görür ve kapak bükülmesinden kaynaklanan kayma gerilimlerini azaltarak kapakların uzun süreli dayanıklılığını sağlar (Copeland vd., 2018). Üç tabakanın en incisi olan

ventrikülaris, radyal yön boyunca büyük deformasyonu engelleyen ve kapağın yüklenmesi ve boşaltılması sırasında enerji dağılımını dengeleyen elastin liflerinden oluşur (Isenberg vd., 2006).

Kalp kapakçığının hücresel bileşenleri, kapağın hacimsel yoğunluğunun yaklaşık %30'unu oluşturan kapak interstisyel hücreleri (VIC) ve kapak endotelyal hücreleri (VEC) içermektedir (Filip vd., 1986). VIC'ler kapakta yer alan en yaygın hücre popülasyonudur ve kapak işlevi, yapısal bütünlüğün korunması için gereklidir (Durbin ve Gotlieb, 2002). Yapısal olarak VIC'ler fibroblastlar ve düz kas hücreleri arasında bir ara hücre tipidir, ancak aynı zamanda yaralanma veya hastalığa yanıt olarak kontraktıl miyofibroblastların özelliklerini de almaktadırlar (Liu vd., 2007). VIC'ler, dokuların yapısal ve mekanik özelliklerinin korunmasından sorumludur ve ayrıca tip I kollajen, GAG ve elastin gibi önemli ECM bileşenlerini sentezleyerek hasarlı kapak dokusunun yeniden şekillenmesinde ve onarılmasında rol oynamaktadır (Merryman vd., 2009). VIC'ler yaprakçıkların 3 katmanında da yer alabilmektedir. VIC ailesini temsil eden 5 farklı fenotip bulunmaktadır ve bir fenotipten diğerine dönüşme potansiyelleri vardır. Bunlar embriyonik progenitör endotelyal/mezenkimal hücreler (eVIC), hareketsiz VIC'ler (qVIC), aktif VIC'ler (aVIC), progenitör VIC'ler (pVIC) ve osteoblastik VIC'lerdir (obVIC) (Liu vd., 2007). Embriyonik progenitör endotelyal/mezenkimal hücreler, embriyoda kapak oluşumu sürecini başlatan endotelyal-mezenkimal dönüşüme (EMT) uğrar. qVIC'ler, yetişkin kapağında dinlenme halinde olan ve normal kapak fizyolojisini koruyan, yaprakçıklarda anjiyogenezi baskılayan hücrelerdir ve osteoblastik farklılaşma ile obVIC'lere farklılaşabilirler. pVIC'ler onarımda önemli olabilecek progenitör hücrelerin heterojen bir popülasyonundan oluşur ve gerektiğinde aVIC' lere farklılaşır. aVIC'ler, hastalık ve yaralanma durumunda kapağın patobiyolojik tepkilerini düzenleyen hücrelerdir. Yaralanma onarımı ve kapak yeniden yapılanmasının ardından aVIC'ler apoptoz yoluyla ortadan kaldırılır. Bununla birlikte, aktivasyon sinyalleri devam ederse veya apoptotik süreçte işlev bozukluğu varsa, aVIC'ler obVIC'lere dönüşebilir ve bu da anjiyogenezi, kronik inflamasyonu, fibrozisi ve kapak hastalığına yol açan kalsifikasyonu teşvik eder (Liu vd., 2007). obVIC'ler kondrogenezi ve osteogenezi düzenler, kapak kalsifikasyonunda aktif rolleri bulunmaktadır (Liu vd., 2007). VEC'ler kan akış yönüne dik olarak hizalanır ve kesintisiz bir endotelyum tabakası oluşturur (Copeland vd., 2018). Hemodinamik akışa yanıt olarak VEC'ler, genel yaprakçık dokusu bütünlüğünü korumak için VIC' lerin fenotipini, kandan VIC'lere giden besinleri ve biyokimyasal sinyalleri düzenlemektedir (Butcher ve Nerem, 2006; Tao vd., 2012).

Kalbin normal gelişimi sırasında kalp tüpü, kalp jeli adı verilen hücresiz bir ECM ile ayrılan endokardiyum ve miyokarddan gelişmektedir (Schoen, 2008). Kalp döngüsünün tamamlanmasından sonra kapak yaprakçıkları, endokardiyal yastıklar olarak bilinen mezenkimal büyümelerden meydana gelmektedir (Armstrong ve Bischoff, 2004; Butcher ve Markwald, 2007). Miyokarddan gelen sinyaller tarafından yönlendirilen yastık oluşturan alandaki endotel hücrelerinin bir alt kümesi, fenotiplerini mezenkimal hücrelerine değiştirir ve eVIC'leri oluşturmak için kalp jölesine göç eder. Embriyonik progenitör endotelyal/endokardiyal hücrelerin mezenkimal hücrelere bu fenotipik/fonksiyonel dönüşümü, transdiferansiyasyon veya epitelyal-mezenkimal transformasyon (EMT) olarak adlandırılmaktadır (Schoen, 2008). Oldukça karmaşık bir süreç olan EMT sırasında aktive edilmiş endotel hücreleri hücre-hücre bağlantılarını kaybeder, düz kas aktin (α -SMA) gibi mezenkimal belirteçler kazanır ve kalp jölesini istila ederken endotelyal belirteçlerini azaltır. İnsan kardiyak morfogenez 8 ila 10 hafta içinde tamamlanır.

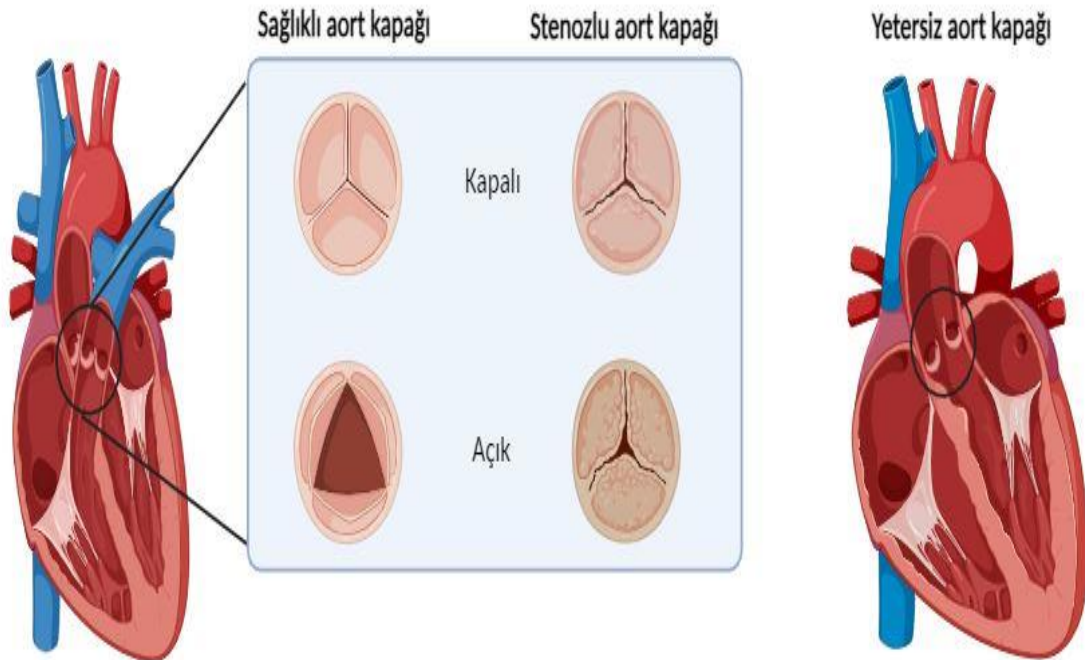
İkinci ve üçüncü trimester fetüslerinden, yenidoğanlardan, çocuklardan ve yetişkinlerden elde edilen insan kapaklarının karşılaştırmalı çalışmaları, kapak yapısının hem hemodinamik koşullara adaptasyonu hem de ECM'de devam eden sentez ve mimari değişiklikleri yansıtarak bir ömür boyunca geliştiğini göstermiştir (Aikawa vd., 2006). İkinci ve üçüncü trimester fetal kapaklarda, yeni oluşan bir ECM ve α -SMA ifade eden hücreler bulunur ve bu da miyofibroblastların göstergesidir. Ayrıca fetal kapaklarda bol miktarda embriyonik miyosin ve matris metalloproteinaz (MMP) kollajenazlar bulunmaktadır ki bu durum matrisin yeniden şekillenmesinde yer alan olgunlaşmamış/aktive edilmiş bir fenotipi gösterir. Aynı zamanda fetal VEC'ler, aktive edilmiş bir endotelyal fenotipin belirteçleri olan hücreler arası adezyon molekülü-1 ve vasküler hücre adezyon molekülü-1'i ifade eder (Schoen, 2008). VIC yoğunluğu, proliferasyon ve apoptozu fetal kapaklarda yüksek iken yetişkin kapaklarında fetal kapaklara göre yaklaşık %10'lara kadar düşmektedir. Fetal kapaklarda büyük ölçüde aVIC fenotipi bulunurken, yetişkin kapaklarda qVIC fenotipi gözlenmektedir. Kollajen içeriği erkenden geç fetal aşamalara doğru artmaktadır. Yaprakçıkların üç katmanlı mimarisi, gebeliğin sonlarında ortaya çıkmaktadır.

1.1.2. Kalp kapakçığı hastalıkları ve mevcut tedavi yöntemleri

Kalp kapakçığı hastalıkları genelde VEC'lerin, VIC'lerin, ECM ve çevrelerinin anormal etkileşimi yoluyla genetik, mekanik ve immünolojik faktörler tarafından normal yapı-işlev korelasyonlarında bir bozulmadan kaynaklanmaktadır (Kodigepalli vd., 2020). Bu

hastalıklar konjenital kusurlar veya sonradan meydana gelen bozukluklar olarak gelişebilmektedir.

Stenoz, genellikle doğuştan gelen bir bozukluk nedeniyle kalp kapak açıklığının dar olması ve kanın yeterince iletilmemesi durumudur (Şekil 1.3). Fakat nadiren de olsa romatizmal ateş veya karsinoid sendromu ile sonradan ortaya çıkabilmektedir (Unger vd., 2011). 4 tip kapak çeşidinde de stenoz sorunu oluşabilmektedir. Beyni ve kardiyovasküler sistemi etkileyen Williams-Beuren Sendromunun, 7q11.23 kromozom bandı üzerindeki 26-28 bitişik genlerin (*Elastin* geni dahil) heterozigot olarak delesyonundan dolayı aortik stenozla ilişkili olduğu bildirilmiştir (Jiménez-Altayó vd., 2020). Benzer şekilde Cutis Laxa Sendromu, yanlış anlamlı mutasyon sonucu *Fibulin-4* ifadesindeki azalma ile kalınlaşmış aort kapak yaprakçıklarına neden olmakta ve dolaylı olarak aort kapak stenozu ile ilişkilendirilmektedir (Hanada vd., 2007). Biküspit aort kapağı hastalığı ise, aort kapağının üç yerine iki yaprakçık içerdiği ve stenozla sonuçlandığı yaygın bir konjenital kalp kusurudur (Michelena vd., 2008). Doğuştan olmayıp sonradan stenoz gelişimi ise bireyin hayat koşulları, kötü alışkanlıklarının olması, ilerleyen yaş ile birlikte yıpranan kapakçıklarda kalsiyum birikiminin artması ile meydana gelmektedir. Stenoz tedavisi darlık seviyesine bağlı olarak invaziv veya cerrahi operasyonlarla kapağın tamiri veya değişimi ile gerçekleştirilmektedir.



Şekil 1.3. Sağlıklı ve hastalıklı kalp kapakçıklarının açık/kapalı durumdaki temsili görüntüleri.

Kalp kapakçığı yetersizliği 4 kapakçıkta da meydana gelebilir. Temelde kapakçık yetersizliği, yaprakçıkların tam bir şekilde kapanmaması sonucu kanın kapaktan geri sızması şeklinde ifade edilebilir. Kapak yetersizlikleri romatizmal hastalık, endokardit ve konjenital kusurlar nedeniyle meydana gelebilmektedir. Aort kapağındaki yetersizlikler doğuştan gelen kusurlar veya enfeksiyon komplikasyonlarından meydana gelebilirken (Abdelazeem vd., 2022), pulmoner yetersizlikler pulmoner hipertansiyonun sonucu olarak açığa çıkabilir (Tominaga vd., 2022). Triküspit yetersizlik ise kalbin sağ tarafındaki genişlemiş bir alt odacık nedeniyle ortaya çıkmaktadır (Baumgartner vd., 2017). Fakat kalbin sol tarafındaki diğer kapak problemlerine yanıt olarak da gelişebilir (Russo vd., 2020). Osteogenesis imperfecta (OI) sendromu, tip I kollajen moleküllerinde kantitatif veya kalitatif bir kusurla sonuçlanan, tip I pro-kollajen zincirlerini kodlayan *COL1A1* ve *COL1A2* genlerindeki otozomal dominant mutasyonlardan kaynaklanır (Shapiro ve Sponseller, 2009). OI'nın özellikle aort kapak yetersizliği ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Lamanna vd., 2013). Yetersizlik durumunda yine invaziv veya cerrahi müdahaleler ile onarım veya kapakçık değişimi gerçekleştirilmektedir.

Kalp kapakçığı değişimi cerrahi operasyonlarında kullanılan ve mevcut olan yapay kapak ürünleri, mekanik kapak protezleri ve biyolojik kökenli (biyoprostetik) kapaklar olmak üzere iki gruba ayrılmıştır (Kodigepalli vd., 2020). Mekanik kapak çeşitleri oldukça fazla olmakla birlikte genel özellikleri açısından kafesli top tipi kapaklar, tek kapakçıklı ve çift kapakçıklı tilting disk olarak üç sınıfta toplanabilir (Yesin, 2015). Mekanik kapakların kullanım ömrünün uzun (>20 yıl), dejenerasyona karşı dirençli, yeniden operasyon ihtimalinin düşük olması gibi avantajları olsa da hastalara ömür boyu antikoagülan ilaç kullanma zorunluluğu getirmesi, hemodinamik özelliklerinin zayıf olması gibi dezavantajları bulunmaktadır (Oxenham, 2003; Yesin, 2015; Friedrich vd., 2020). Ayrıca kadın hastaların hamilelik sürecinde bu ilaçların bebekte malformasyonlara sebep olabileceği, yaşlı hastalarda ise herhangi bir düşme veya yaralanma anında kanın durdurulmasındaki zorluklar göz önüne alındığında mekanik kapaklar nispeten daha genç hastalara (<60 yaş) tavsiye edilmektedir (Baumgartner vd., 2017; D'Souza vd., 2017; Steinberg vd., 2017). Bununla birlikte mekanik kapakların rejeneratif özelliği bulunmadığı için özellikle pediatrik hastalarda somatik büyüme ihtiyacı karşılanamayacak ve kısa sürede yeniden operasyon ihtiyacı ortaya çıkacaktır.

Biyoprostetik kalp kapakları, insan nakli için hem allojenik hem de ksenojenik olarak elde edilebilir. Kadavralardan veya organ bağışçılarından elde edilen kapakçıklar allogreft olarak nitelendirilirken, farklı tür canlılardan elde edilen kapakçıklar ksenogreft olarak nitelendirilmektedir. Otogreft ise Ross operasyonunda olduğu gibi, hastanın kendi pulmoner

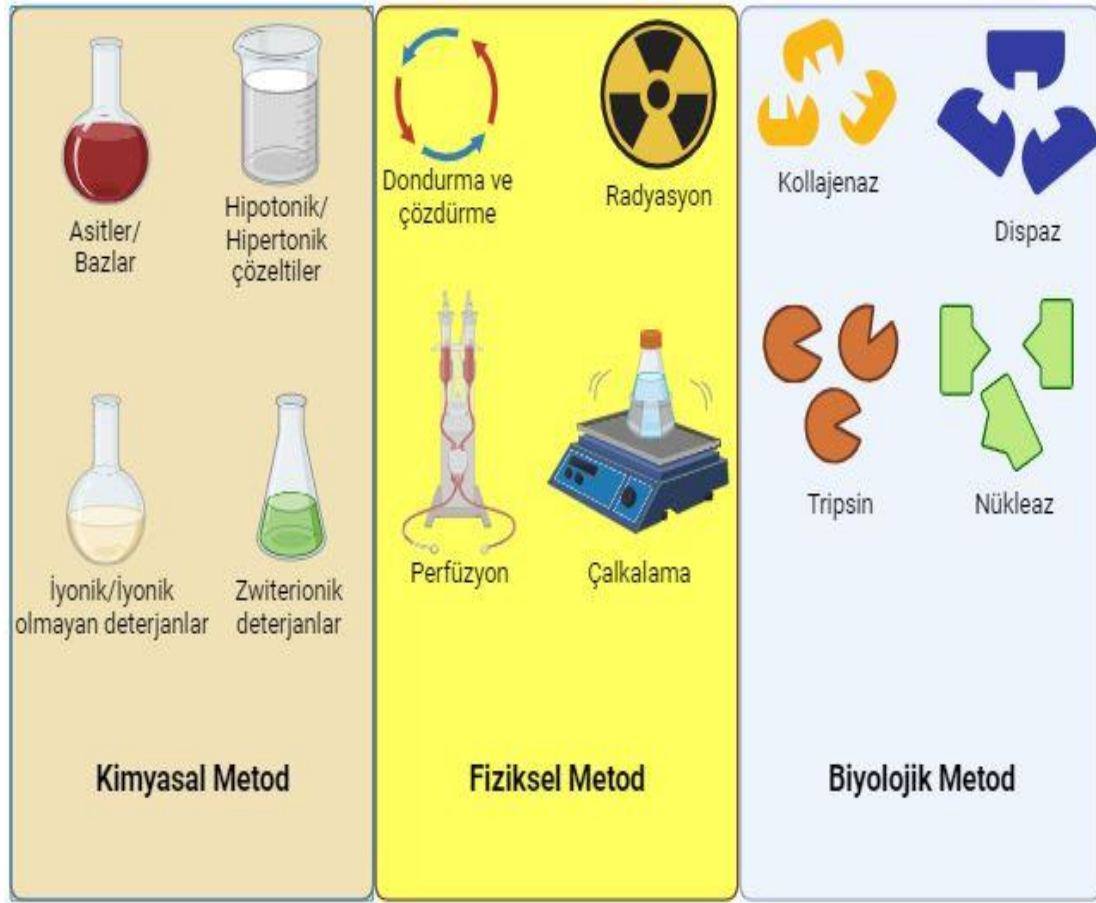
kapağının çıkartılıp hastalıklı aort kapağının yerine implante edilmesiyle gerçekleştirilir (Mazine vd., 2018). Ototogreftler üstün hemodinamik özellikleri, kapağın canlı ve dolayısıyla rejeneratif olması, immün yanıt oluşturmaması gibi avantajları içinde barındırmaktadır (Mazine vd., 2018). Biyoprostetik kapaklar daha iyi hemodinamik özellikler sunar ve uzun süreli antikoagülasyon tedavisi gerektirmez; fakat biyolojik bileşimleri nedeniyle bağışıklık sistemi reaksiyonlarından kaynaklanan bozulmalara ve komplikasyonlara eğilimlidirler (Siddiqui vd., 2009). Bunların yanında otogreftler hariç, hiçbir biyoprostetik kapak (işlenmemiş olanlar dahil) canlılıklarını koruyamaz ve rejeneratif özelliklerini kaybederler (Mazine vd., 2018). Biyoprostetik kapakçıkların dayanıklılığı az olduğu için (<15 yıl) genelde yaşlı hastalara önerilmektedir (Sanz-Garcia vd., 2015). Allogreftler, kadavralardan veya organ bağışçılarından alındığı için kaynak sorunu bulunmaktadır ve bu nedenle ksenogreftlere olan ilgi artmıştır. Ksenogreft kalp kapakçıkları en çok domuzlardan elde edilirken, nadir de olsa sığır perikardiyumundan üretilmiş kapakçıklar kullanılmaktadır (Siddiqui vd., 2009). Fakat ksenogreftlerin olumsuz bağışıklık sistemi reaksiyonları, kalsifik dejenerasyon riski gibi dezavantajları bulunmaktadır (Lovekamp vd., 2006). Biyoprostetik kalp kapakçıkları stentli olabileceği gibi stentsiz olarak da implante edilebilmektedirler (Siddiqui vd., 2009).

Kapakçık değişimi operasyonlarında hastanın durumu (yaş, cinsiyet, farklı bir hastalığın eşlik etmesi vb.) ve hastalık derecesi, kapak türü seçiminde büyük önem arz etmektedir. Genel itibarıyla iyi hemodinamik özelliklere sahip, dayanıklı, canlı ve büyüyeabilen bir kapakçığa olan ihtiyaç hala devam etmektedir. Bu ihtiyacın giderilmesinde doku mühendisliği ile geliştirilmiş kalp kapakçıkları büyük bir rol oynayacaktır.

1.1.3. Kalp kapakçıklarının hücresizleştirilmesi

İdeal kapağa yaklaşmak için kalp kapakçığı doku mühendisliği alanında yoğun çaba sarfedilmektedir. Bu alanda hücresizleştirme çalışmaları son birkaç yıldır ilgi odağı haline gelmiştir. Hücresizleştirme işlemi, bağışıklık tepkisine neden olabilen hücreleri ve bileşenlerini çıkartarak asellüler bir hücre dışı matris (ECM) elde etmeyi amaçlar (Srokowski ve Woodhouse, 2017). Böylece hücresizleştirilmiş kapakçık iskeleleri, hem bir bağışıklık tepkisi oluşturma riskini hem de implantasyondan sonra bağışıklık baskılayıcı ilaçlara olan ihtiyacı ortadan kaldırır. Doku mühendisliğinde başlangıç matrisi olarak kullanılan hücresizleştirilmiş kalp kapağı doğal doku mimarisine sahip olduğu için hücrelerin yapışması, çoğalması ve biyolojik fonksiyonlarını geliştirmesi için uygun bir ortam sağlar (Chan ve Leong, 2008; Urciuolo ve De Coppi, 2018). Hücresizleştirilmiş bir yapı iskelesi elde etmek için fiziksel, kimyasal ve biyolojik (enzimatik) olmak üzere çeşitli yaklaşımlar kullanılmıştır

(Yu vd., 2016; Rana vd., 2017). Bununla birlikte fiziksel ve enzimatik yaklaşımların tek başına hücre gideriminde yeterince etkili olmaması nedeniyle, kimyasal hücresizleştirme ile kombine bir şekilde uygulanmışlardır (Hussein vd., 2016).



Şekil 1.4. Kalp kapakçıklarının hücresizleştirilmesinde kullanılan farklı metodlar.

Hücresizleştirme işlemlerinde yaygın olarak kullanılan fiziksel yöntemler arasında mekanik kuvvetler, dondurma ve çözme, sonikasyon ve radyasyon bulunmaktadır (Şekil 1.4). Yalnızca dokuların yüzeyine yakın hücreler mekanik kuvvetlerle etkili bir şekilde uzaklaştırılabilir. Dondurma ve çözme sırasında hücre içi buz kristalleri hücre zarlarını bozar; fakat hücre içi materyalleri çıkarmak için kimyasal veya enzimatik yaklaşımların kullanılması gerekir. Mekanik ajitasyon ve sonikasyon, hücre kalıntılarının çıkarılmasını kolaylaştırmak için genellikle kimyasal işlemlerle birlikte uygulanmıştır (Gilbert vd., 2006; Copeland vd., 2018).

Hücresizleştirme çalışmalarında tripsin, endonükleazlar, kollajenaz, lipaz, dispaz ve α -galaktosidaz gibi enzimlerin kullanılması hücre kalıntılarının uzaklaştırılmasını sağlar. Ancak enzim fonksiyonuna göre ECM'nin histomimarisinde parçalanma ve bozulma olduğu, hatta iskeleden çıkarılmasının zorluğundan dolayı immün yanıt oluşturabildiği bildirilmiştir

(Rahman vd., 2018; McCrary vd., 2020). Hücresizleştirme uygulamalarında, enzimatik ajanlar tek başına tam hücre giderimini sağlamak için yetersizdir ve diğer hücresizleştirme yöntemleriyle birleştirilmesi gerekmektedir (Crapo vd., 2011).

Kimyasal hücresizleştirmede hücre içeriğinin salınması ve uzaklaştırılması için çeşitli deterjanlar, asitler ve bazlar, hipotonik ve hipertonic çözeltiler kullanılmaktadır (Crapo vd., 2011). Ancak asitler ve bazlar ECM bileşenlerine zarar verebilmekte ve biyomekanik özelliklerin bozulmasına neden olabilmektedir (Reing vd., 2010). Hipertonik (salin) ve hipotonik solüsyonlar DNA uzaklaştırılmasında ve hücre parçalanmasında etkilidir, ayrıca ECM mimarisi diğer yöntemlere göre daha iyi korunur (Cox ve Emili, 2006; Xu vd., 2007). Fakat yine de tek başlarına etkili oldukları söylenemez ve diğer yöntemlerle kombine bir şekilde uygulanmaları gerekmektedir. İyonik ve iyonik olmayan deterjanlardan Triton X-100, sodyum deoksikolat (SD), sodyum dodesil sülfat (SDS) ve etilendiamintetraasetik asit (EDTA) hücre bütünlüğünü bozmada ve nükleik asitleri uzaklaştırmada etkili oldukları için hücresizleştirme çalışmalarında en yaygın kullanılan deterjan türleridir (VeDepo vd., 2017a). Deterjanlar tek başına kullanıldığında tam işlevsellik sağlamazken, deterjanların kombine edildiği bir hücresizleştirme metodunda hücresel bileşenlerin etkili çıkarıldığı ve ECM histomimarisinin daha iyi korunduğu gözlenmiştir (Meyer vd., 2006).

Yeterli hücresizleştirmeyi tanımlayan minimum ölçülebilir kriterler belirlenmiştir (Crapo vd., 2011). Bu kriterler;

- 1) ECM' nin 1 mg kuru ağırlığı başına 50 ng' dan daha az çift sarmallı DNA bulunması.
- 2) DNA fragman uzunluklarının 200 baz çiftinden daha az olması.
- 3) 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) veya hematoksin ve eozin (H&E) ile boyanmış doku kesitlerinde görünür nükleer materyalin bulunmaması.

1.1.4. Klinik çalışmalarda hücresizleştirilmiş ksenogreftlerin kullanımı ve sonuçları

2003 yılında yapılan bir çalışmada pediatrik hastalar için CryoLife (Cryolife Inc., Kennesaw, ABD) tarafından tasarlanan ozmotik şoka dayalı bir metodla hücresizleştirilmiş domuz pulmoner kalp kapakçığının implante edilmesiyle birlikte hastalarda güçlü bir inflamatuvar yanıt ve greft dejenerasyonu meydana gelmiştir (Simon, 2003). Ksenogreftin başarısızlığından sonra aynı şirketin tasarladığı allogreft olan CryoValve, 2008 yılında ABD'de FDA onayı almıştır. Hücresizleştirilmiş kriyoprezervasyonlu allogreft pulmoner kapakların hastalara implantasyonu, özellikle 45 yaşından küçük hastalarda daha yüksek

disfonksiyona sebep olurken, 45 yaşından büyük hastalarda daha düşük disfonksiyon ve daha az yeniden müdahale ile sonuçlanmıştır (Bibevski vd., 2017; Chauvette vd., 2022). Başka bir ksenojenik kapak olarak, SD ile hücreleştirilmiş Matrix P (AutoTissue GmbH, Berlin, Almanya) domuz pulmoner kalp kapağı tasarlanmıştır. Matrix P protezleri 3 farklı formatta mevcuttur; 1) Matrix P (domuz pulmoner), 2) Matrix P Plus (glutaraldehitte sabitlenmiş, at perikardiyal yamasıyla kaplı domuz pulmoner), 3) Matrix P Plus N (hücreleştirilmiş at perikardiyal yamasıyla kaplı domuz pulmoner) (Christ vd., 2019). 2006 yılında yapılan bir çalışmada, Matrix P greftlerin implantasyonundan yaklaşık 2 ay sonra septik multiorgan yetmezliğinden ölen iki hastanın eksplante edilen kapaklarında herhangi bir enflamasyon veya doku reddi bulgusuna rastlanmamış ve *in vivo* repopülasyonun da olduğu bildirilmiştir (Erdrügger vd., 2006). Bu çalışmanın aksine özellikle yetişkinlerde yapısal pulmoner kapak yetersizliği ve olumsuz uzun vadeli ekokardiyografik sonuçlar göstermesinden ötürü Matrix P greftlerinin Ross prosedürlerinde (hastanın kusurlu aort kapakçığının yerine kendi pulmoner kapakçığının takıldığı operasyon) kullanılması önerilmemektedir (Christ vd., 2019). Pediatrik hastalarda Matrix P ve Matrix P Plus ürünlerinin test edildiği bir çalışmada kalsifikasyon gelişmediği, ilerleyici kapak yetmezliği olmadığı ve normal yapısal özelliklerin korunduğu bildirilmiştir (Konertz vd., 2011). Ancak Matrix P ve Matrix P Plus için zıt sonuçlar veren birçok çalışmada erken ve uzun süreli inflamatuvar yanıt, stenoz ve kapak yetmezliği bildirilmiştir (Rüffer vd., 2010; Cicha vd., 2011; Perri vd., 2012; Christ vd., 2019). 2000 ve 2003 yılları arasında 12 hastada test edilen SD ile hücreleştirilmiş domuz kalp kapakçıkları, implantasyondan önce hastaların otolog endotel hücreleri ile ekilmiş ve implantasyondan 5 yıl sonra bile herhangi bir kalsifikasyon belirtisi göstermeden iyi kapak performansı ve yeniden hücrelendirme potansiyeli bildirilmiştir (Dohmen vd., 2007).

Hücreleştirilmiş domuz ince bağırsak submukozası (SIS), klinikte kalp kapakçığı değişimi veya onarımı için biyoprotez materyali olarak kullanılmıştır. Hücreleştirilmiş domuz SIS' inden triküspit kapak olarak üretilen CorMatrix Cor TRICUSPID Kapak implantasyonunun erken bulgularını bildiren bir çalışmada, 10 hastada ve 8 aylık takip sonrasında kalsifikasyon oluşmadığı, iyi kapak performansı gösterdiği, hafif yetersizlik ve konakçı hücreler yoluyla somatik büyüme gösterdiği bildirilmiştir (Gerdisch vd., 2020). Buna karşılık, hücreleştirilmiş domuz SIS ile üretilen aortik yaprakçık olarak CorMatrix'in, 6 hastaya implantasyondan yaklaşık 4-14 ay sonra 5 hastada önemli kapak yetmezliği ve inflamatuvar hücre migrasyonu bildirilmiştir (Hofmann vd., 2017). Benzer şekilde 12 yaşındaki erkek hastada aort kapak tamiri için domuz SIS (CorMatrix Cardiovascular,

Roswell, GA) kullanılan bir çalışmada 2 yıla kadar stabil fonksiyon gözlenmiş, ancak 4 yıl sonra ciddi kalsifikasyon, fibrozis ve retraksiyon sebebiyle yeniden ameliyat gerektirmiş ve greft yetmezliği bildirilmiştir (Mosala Nezhad vd., 2017).

In vitro ve *in vivo* modellerinde olumlu sonuçlara rağmen, neredeyse tüm klinik veriler domuz kapaklarının kalp kapağı doku mühendisliğinde ksenogreft donörleri olarak uzun süreli kullanım için uygun olmadığını göstermektedir. Özellikle biyolojik olarak daha güvenli bir donör bulunmalıdır. Öte yandan, insanlarda koyunlardan alınmış bir kapakçık değişimi yapılmamıştır. Güvenilir ksenogreft donörleri arayışında koyun kaynaklı hücresizleştirilmiş kalp kapakçıkları, insanlar için aday olarak daha iyi bir seçenek sağlayabilir. Bu yüzden insana yönelik kalp kapakçığı matrisi için hücresizleştirilmiş koyun kalp kapakçıklarının kullanımının güvenlik ve etkinliğinin tam olarak değerlendirilmesi gereklidir.

1.2. Hücresizleştirilmiş ksenogreft kalp kapakçıkları

Literatürde günümüze kadar çeşitli canlıların kalp kapakçıkları hücresizleştirilerek *in vivo* veya *in vitro* etkinlikleri araştırılmasına rağmen özellikle domuz ve koyunlar daha fazla araştırmaya tabi tutulmuştur.

Tablo 1.1. Literatürde yer alan kalp kapakçıklarının hücresizleştirme metodları ve sonrasında elde edilen önemli bulgular.

Donör	Kimyasal ajan	İmplantasyon modeli	Hücre Kültürü	Genel bulgular	Referans
Babun	Triton X-100+N-lauroilsarkozin , Benzonaz	<i>In vitro</i>	Hücresiz	Hücresizleştirme işleminin viskoelastik özellikler üzerinde çok az etkisi	(Jiao vd., 2012)
Kanguru	Triton X-100+SD+SDS +GA	Koyun	Hücresiz	GA yüzünden güçlü immün yanıt, yüksek oranda kalsifikasyon	(Van Nooten, 2006)
Tavşan	Tripsin/EDTA	Köpek	Hücresiz	24 haftalık implantasyon sürecinin ardından tam bir endotelium oluşumu, arterin iç kısımları fibroblast benzeri hücrelerle tamamen hücrelendirilmiştir	(Takagi vd., 2006)
Sıçan	SDS, DNaz	Sıçan	Hücresiz	Korunmuş 3 katmanlı yaprakçık yapısı, trombotik birikinti	(Grauss vd., 2003)
Köpek	Triton X-100+SDS	Köpek	Hücresiz	1 aylık implantasyon sürecinden sonra inflamasyon görülmedi, kısmi endotelizasyon	(Wilson vd., 1995)
Domuz	SD	Genç koyun	Otolog vasküler endotel hücreleri	Tek tabakalı endotel oluşumu ve kalsifikasyonun olmaması	(Dohmen vd., 2003)
Genç koyun	SD+SDS	<i>In vitro</i> dinamik biyoreaktör	Koyun endotel hücreleri	Tek tabakalı endotel oluşumu, iyi biyomekanik özellikler	(Lichtenberg vd., 2006)

Tablo 1.1. (Devamı)

Domuz	SD	Genç koyun	Hücresiz	İyi biyomekanik özellikler, iyi hemodinamik fonksiyon, rejenerasyon	(Erdbrügger vd., 2006)
Koyun	N-lauroil sarkozin, Benzonaz	Koyun	Hücresiz	Normal kapak işlevi, uzun süreli dayanıklılık, kalsifikasyonun olmaması	(Hopkins vd., 2009)
Domuz	Tripsin+ SDS	Genç koyun	Hücresiz	Hücrel repopülasyon, bir dereceye kadar kalsifikasyon	(Paniagua Gutierrez vd., 2015)
Koyun	N-lauroil sarkozin + Triton-X, Benzonaz	Genç koyun	Hücresiz	İn vivo yeniden hücrelendirme, iyi hemodinamik performans, kalsifikasyonun olmaması	(Quinn vd., 2011)
Koyun	SDS	Koyun	Hücresiz	Somatik büyüme, kalsifikasyonun olmaması, in vivo yeniden hücrelendirme	(Navarro vd., 2010)
Domuz	SD	Domuz	Hücresiz	Kalsifikasyonun olmaması, in vivo yeniden hücrelendirme	(Honge vd., 2011)
Koyun	SD+SDS	Koyun	Otolog koyun endotel hücreleri	Tek tabakalı endotel oluşumu, kalsifikasyon ve inflamasyonun olmaması	(Tudorache vd., 2013)
Domuz	Triton X-100+SD, Benzonaz	Domuz	Hücresiz	Kalsifikasyonun olmaması, in vivo yeniden hücrelendirme, rejenerasyon	(Iop vd., 2014)
Domuz	Tripsin-ozmotik	Rat	Hücresiz	CD3+ inflamatuvar hücre infiltrasyonu	(Somers vd., 2012)
Koyun	SD+SDS	Koyun	Otolog koyun endotel hücreleri	17 koyundan 2'sinde kalsifikasyon, interstisyel hücre infiltrasyonu, ECM yeniden şekillenmesi	(Theodoridis vd., 2015)
Domuz	SD+SDS	Domuz	Hücresiz	Kapak duvarında yetersiz DNA giderimi, düşük inflamasyon, iyi biyomekanik özellikler	(van Steenberghe vd., 2018)
Domuz	SD	<i>In vitro</i>	Hücresiz	ECM yapılarının tam olarak korunması, in vitro immünolojik yanıt, artan trombojenisite	(Zhou vd., 2010)
Domuz	Tripsin+ ozmotik şok+SDS, DNaz	<i>In vitro</i>	Hücresiz	İyi biyomekanik özellikler, α -gal epitop eksikliği, kollajen tip IV kaybı, in vitro sitotoksitenin olmaması	(Luo vd., 2014)
Domuz	Triton X-100+ SD+ IGEPA CA-630, Benzonaz	Rat	Hücresiz	Kalsifikasyonun olmaması, α -gal epitop kalıntıları, inflamatuvar yanıt	(Qiao vd., 2018)
Koyun	N-lauroil sarkozin+TritonX100, Benzonaz	<i>In vitro</i> mekanik koşullandırma biyoreaktör	İnsan mezenkimal kök hücreleri (hMSC)	Hücrelerin kapak içine sızması, değişmeyen biyomekanik özellikler	(Converse vd., 2017)
Genç koyun	N-lauroil sarkozin+ TritonX-100, rekombinant endonükleaz	Genç koyun	Hücresiz	Kalsifikasyon ve inflamasyonun olmaması, kapağa VIC ve EC infiltrasyonu	(Quinn vd., 2016)

Tablo 1.1. (Devamı)

Domuz	SD+TritonX -100+SDS	<i>In vitro</i>	Hücresiz	İyi biyomekanik özellikler, aort duvarının yetersiz hücresizleştirilmesi	(Sierad vd., 2015)
-------	------------------------	-----------------	----------	--	-----------------------

1.2.1. Hücresizleştirilmiş domuz kalp kapakçıklarının avantaj ve dezavantajları

Literatürde hücresizleştirme çalışmalarının çoğu domuz kökenli kapakçıklarla yapılmıştır. Bunun çeşitli sebepleri olmakla birlikte en önemli sebep domuz kalp kapağının mekanik ve anatomik özelliklerinin insan kalp kapağına benzer olmasıdır (Sands vd., 1969; Hopkins vd., 2013). Bu çalışmaların çoğunda glutaraldehit (GA), ECM yapı bütünlüğü ve ksenoantijenik epitopların maskelenmesi işlemi sırasında çapraz bağlayıcı ajan olarak kullanılmıştır. Ancak GA'nın sitotoksik etkisi nedeniyle hücre canlılığı sınırlandırılmakta ve ayrıca kalsifikasyon nedeniyle dejenerasyona neden olmaktadır (Schoen ve Levy, 2005). GA'ya alternatif olarak daha az sitotoksik genipin ile çapraz bağlanan domuz kalp kapaklarında hücre canlılığının %79'dan fazla korunduğu bildirilmiştir (Somers vd., 2008). Ayrıca GA yerine glisidil metakrilat ile çapraz bağlanarak hücresizleştirilmiş domuz perikardının sitotoksik etkisinin olmadığı ve *in vivo* koşullarında biyomekanik özelliklerin korunduğu bildirilmiştir (Jin vd., 2019).

Domuzdan türetilen hücresizleştirilmiş ksenojenik kalp kapakçıklarında büyük ilerleme kaydedilmiş olsa da başlıca endişe alanlarından biri, insan hücre hatlarını enfekte edebilen ve kolayca çoğalabilen domuz endojen retrovirüsü (PERV) tehlikesidir. SD ile hücresizleştirilen domuz kapakçığında kantitatif gerçek zamanlı PCR sonucuna göre PERV DNA'ların dokudan temizlendiği bildirilmiştir (Erdbrügger vd., 2006). Ek olarak gama radyasyonu uygulamasıyla domuz aort kapağından PERV DNA' sının tamamen temizlendiği gözlenmiştir (Ota vd., 2007). Fakat gama ışını uygulamasının domuz pulmoner kapaklarında ECM bileşenlerinden biri olan elastin liflerinin parçalanmasına, glukozaminoglikan miktarında azalmaya ve kollajen değişikliğine neden olduğu bildirilmiştir (Sarathchandra vd., 2012). Hücresizleştirmeye ek olarak DNase I' in benzonaz ile birlikte uygulanmasının, domuz pulmoner kapakçık DNA içeriğinde %99'dan fazla azalmaya yol açtığı bildirilmiştir; ancak yine de PERV DNA kalıntıları bulunmuştur (Godehardt vd., 2020). Ayrıca son zamanlarda genetiği değiştirilmiş domuz kalbi implantasyonu uygulanan hastanın, implantasyondan 2 ay sonra öldüğü, hastanın domuza özgü viral enfeksiyon geçirdiği ve ölüm nedeninin muhtemelen viral enfeksiyon olduğu bildirilmiştir (Hawthorne, 2022; Le Page, 2022).

İnsanlar ve yüksek primatlar dışında tüm memeli endotel hücrelerinin yüzeylerinde bulunan α -Gal epitopu, insanlarda hiperakut doku reddine neden olmaktadır (Adams vd., 2000; Chen vd., 2000; Simon, 2003). α -Gal gibi bir ksenoantijeni ortadan kaldırmak için çeşitli yöntemler denenmiş olsa da bunların çoğu ya çok maliyetlidir ya da yeterince etkili değildir. Örneğin, nakavt 1,3-galaktoziltransferaz genine sahip domuzlar üretilmiştir (Adams vd., 2000; Chen vd., 2005; Lila vd., 2010). α -Gal nakavt mutant domuzların üretimi hiperakut doku reddini önlemesine rağmen, akut vasküler rejeksiyon/akut hümoral ksenograft reddi ve α -Gal haricinde ksenoantijenlerin varlığı ile sonuçlanmıştır (Miyagawa vd., 2010). ECM'deki α -Gal epitopunun TriCol (TritonX-100+SD) yöntemi ile tamamen temizlendiğini ve doku ECM mimarisine zarar vermediğini gösteren çalışmalar mevcuttur (Naso vd., 2011). Bunun aksine TritonX-100, SD ve benzonaz gibi kimyasal hücresizleştirmeye dayalı uygulamaların domuz kalp kapağındaki α -Gal epitopunun çıkarılmasında etkisiz olduğu kanıtlanmış ve M86 anti-alfa-gal monoklonal antikorunun floresan sinyallerine göre %60'a yakın α -Gal epitopun iskelede hala mevcut olduğu ortaya konmuştur (Spina vd., 2014). Benzer şekilde, deterjan bazlı hücresizleştirilmiş domuz kalp kapakçıklarında α -Gal kalıntılarının %30'unun uzaklaştırılamadığı rapor edilmiştir (Ramm vd., 2016). Bazı çalışmalarda domuz pulmoner kapakçıklarını hücresizleştirirken α -Gal epitopunu çıkarmak için deglikosilasyon metodu kullanılmış, ancak ECM kaybıyla sonuçlanmıştır (Findeisen vd., 2020). Hücresizleştirme sırasında elastin fibrillerinin parçalanmasına neden olan gama ışınlarına maruz kalan domuz aort kapaklarında α -Gal epitopunun tamamen temizlendiği de rapor edilmiştir (Ota vd., 2007). α -Gal epitopunun sadece hücre yüzeylerinde değil, aynı zamanda domuz ECM'sinde bulunan glikoproteinler ve proteoglikanlarda da bulunduğu bildirilmiştir (Maruyama vd., 2000).

Kapakçıkların TriCol ile hücresizleştirilmesi, tercih edilen bir yöntem olarak ifade edilmektedir. Hücresizleştirmede TriCol yöntemi ile domuz aort kapaklarında mekanik özelliklerin ve ECM yapısının korunduğu, fare deri altı modelinde kalsifikasyonun düşük düzeyde gerçekleştiği ve insan fibroblast hücreleri ile ekiminden sonra hücrelerin çoğaldığı ve yaprakçık çevresine yayıldığı gözlenmiştir (Spina vd., 2003). TriCol ile hücresizleştirilmiş domuz aortik allogreftleri, domuzlara implantasyondan sonra *in vivo* testlerde ECM onarıcı M2 makrofajların infiltrasyonunu indüklerken bağışıklık tepkisi, kalsifik belirteçler ve tromboz belirtileri göstermeden yeni ECM elemanlarının ifadesini desteklemiştir (Iop vd., 2014). Bunlara ek olarak bu allogreftlerin 15 aya kadar normal aort fizyolojisi sergilediği, dilatasyon, stenoz, yetersizlik veya kalsifik bulguların olmadığı gösterilmiştir (Gallo vd., 2012, 2016).

Kalp kapağı implantasyonu sonrası karşılaşılan en büyük sorunlardan biri kalsifikasyondur ve hücreleştirme sonrası elde edilen yapı iskelelerinin antikalsifik özelliklere sahip olup olmadığı tartışmalıdır (Badria vd., 2020). Hücreleştirilmiş domuz pulmoner kapaklarının, koyunların otolog endotel hücreleri ile tohumlandıktan sonra sağ ventrikül çıkış yoluna implante edildiği ve 6 ay sonra eksplante edilen numunelerde herhangi bir kalsifikasyonun gözlenmediği bildirilmiştir (Dohmen vd., 2003). Benzer şekilde hücreleştirilmiş ve sonrasında hücre ekilmemiş domuz kalp kapakçıklarının koyunlara implantasyonundan sonra kalsifikasyon gözlenmemiştir (Erdrügger vd., 2006). Bu bulguların tersine hücreleştirilmiş domuz pulmoner ve aort kapaklarının bir koyun ve sıçan deri altı modeline implantasyonundan sonra düşük seviyede kalsifikasyon gözlenmiştir (Leyh vd., 2003; Ota vd., 2007). Benzer şekilde deterjan bazlı hücreleştirilmiş domuz aort kapaklarının bir koyun modelinde yüksek derecede kalsifikasyona uğradığı bildirilmiştir (Van Nooten, 2006). Fakat allograft olarak hücreleştirilmiş domuz kapakçıkları, domuzlara implantasyondan sonra herhangi bir kalsifik birikim göstermemiştir (Hong vd., 2011; Iop vd., 2014). Çelişkili bulgular hem hücreleştirme prosedüründen hem de farklı implant modellerindeki intergenom farkından kaynaklanıyor olabilir. Özellikle hücre ve DNA kalıntılarının etkili bir şekilde giderilemediği işlemlerde aşırı kalsifikasyon ile karşılaşmak mümkündür. Ayrıca birçok faktörle birlikte immün yanıtın da kalsifikasyona neden olduğu bilinmektedir (Badria vd., 2020). Bu nedenle domuz dokularındaki ksenoantijenlerin immün yanıt aracılı kalsifikasyona neden olabileceği düşünülebilir.

Hücreleştirilmiş domuz kalp kapağı yapı iskelelerinin oldukça trombojenik bir yüzeye sahip olduğunu bildiren çalışmalar olmasına rağmen (Kasimir vd., 2006), tam endotelizasyon sağlanırsa bu sorunun aşılabileceği düşünülmektedir. Güçlü endotelizasyona sahip olmayan domuz kalp kapağı iskelelerinde trombosit adezyonu ve kompleman sistem aktivasyonunun meydana geleceği öne sürülmüştür (Kasimir vd., 2006). Bazı çalışmalarda, hücreleştirilmiş domuz kapak kanalları, *in vitro* analizlerde trombosit yapışmasını ve aktivasyonunu indüklemiştir ve insan göbek kordonu vasküler endotel hücreleri (HUVEC) ile ekiminden sonra endotelizasyonun meydana geldiği yüzeylerde trombosit gözlenmemiştir (Kasimir vd., 2005). Benzer şekilde deterjan tabanlı hücreleştirme yöntemi ile elde edilen domuz ve insan pulmoner kapak iskelelerinde, *in vitro* insan monositik hücre göçünün domuz iskelelerinde daha fazla meydana geldiği bildirilmiştir (Rieder vd., 2005).

Hücreleştirilmiş domuz kalp kapakçıklarının biyoyumluluğu ve hemoyumluluğu farklı *in vivo* çalışmalarda incelenmiştir. Bir koyun implantasyon modelinde,

hücreleştirilmiş domuz aort kapağı düşük seviyelerde kalsifikasyon ve iltihaplanmaya rağmen sınırlı hücre kolonizasyonuna izin vererek yeniden endotelizasyonu desteklemiştir (Juthier vd., 2006). Benzer şekilde hücreleştirilmiş domuz pulmoner kalp kapakçıklarının implantasyonundan 3 ay sonra bile koyun modelinde çok az hücre infiltrasyonu rapor edilmiştir (Jordan vd., 2012). Ancak domuz aortik kalp kapaklarının hücreleştirilmesinden sonra domuz implantasyon modellerinde endotel ve fibroblast hücrelerinin büyüdüğü, endotelizasyonun gerçekleştiği ve düşük düzeyde trombotik materyal birikiminin meydana geldiği gözlenmiştir (Honge vd., 2011). Deterjan bazlı hücreleştirilmeye sahip domuz aort kapaklarının, *in vitro* statik kültürde insan endotelial hücreleri tarafından yeniden endotelizasyonu desteklediği rapor edilmiştir (Bader vd., 1998; Lanuti vd., 2015). 2007'de yapılan bir çalışmada otolog kemik iliği kök hücreleri ve mezenkimal kök hücreler, deterjan bazlı hücreleştirilmiş bir domuz pulmoner kapağında ayrı ayrı tohumlandıktan sonra bir koyun modeline implante edilmiştir (Vincentelli vd., 2007). İmplantasyondan 4 ay sonra, mezenkimal kök hücre tohumlu iskelede tam endotelizasyon meydana gelirken, kemik iliği kök hücreleri ekilen grupta ise inflamatuvar hücre infiltrasyonu gözlenmiştir. Benzer şekilde, farelerde hücreleştirilmiş domuz aort kapağı yaprakçıklarının 4 haftalık deri altı implantasyonundan sonra inflamatuvar hücre infiltrasyonu bildirilmiştir (Jin vd., 2019; Liu vd., 2020).

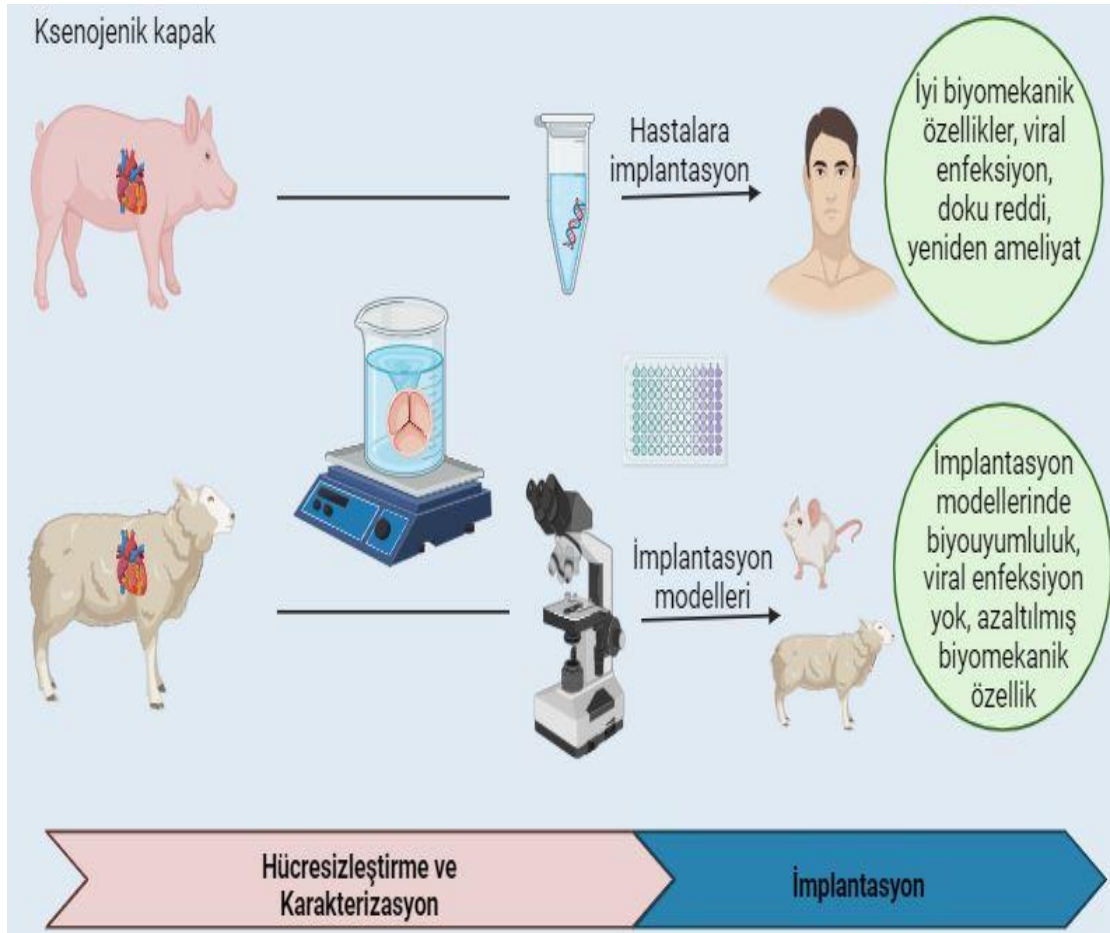
Bazı çalışmalarda yaprakçıkların çeşitli malzemeler ile yüzey modifikasyonu veya kaplaması yapılarak, hücresiz iskelelerin trombotik yüzeylerini değiştirecek olan endotelizasyon daha kolay ve etkili bir şekilde sağlanmıştır. Hücreleştirilmiş domuz pulmoner kapakçıkları CD133 antikoru ile konjuge edildikten sonra otolog endotelial projenitör hücreleri ile ekilmiş ve ardından koyunlara implantasyondan 3 ay sonra tam bir endotelizasyonun gerçekleştiği, konakçı hücrelerin infiltrasyonu gözlenirken kalsifik ve trombotik belirteçlerin olmadığı bildirilmiştir (Jordan vd., 2012). Başka bir çalışmada VEGF yüklü hücreleştirilmiş domuz aort kapağının, hücreleştirilmiş domuz aort kapağına göre daha az hemolitik özellik gösterdiği ve HUVEC'lerin bu iskeleye yapışmasını ve dolayısıyla endotelizasyonu desteklediği, sıçanlarda deri altı implantasyon sonrası vaskülarizasyonu desteklediği bildirilmiştir (Zhou vd., 2019). Ancak bu çalışmada VEGF yüklü hücreleştirilmiş hibrit domuz aort kapağının kalsifikasyon potansiyeli, antitrombotik özellikleri ve dayanıklılığı araştırılmamıştır. Benzer şekilde enzimatik metotla hücreleştirilmiş domuz aort kapak iskelesi polihidroksibutirat ile kaplanmış ve koyunlara

implantasyondan 3 ay sonra tam bir endotelizasyon ve az sayıda inflamatuvar hücre infiltrasyonu gerçekleşmiştir (Stamm vd., 2004).

1.2.2. Hücresizleştirilmiş koyun kalp kapakçıklarının avantaj ve dezavantajları

Kalp kapakçığı doku mühendisliği alanında, *in vivo* çalışmalar için model olarak genelde genç koyunlar kullanılmıştır. Bunun en büyük nedenlerinden biri, genç koyunların kardiyovasküler büyüme dinamiklerinin insanlarınkine eşdeğer olduğu düşüncesidir (Stock vd., 2000; Gallegos vd., 2005). Özellikle koyunlara implante edilen kalp kapakçıklarının kalsifikasyon süreçlerinin insanlarda bulunanlara benzer olduğu gözlenmiş ve klinik öncesi araştırmalarda koyun modelleri kullanılmaya başlanmıştır (Schoen vd., 1994).

Enzimatik metotla hücresizleştirilmiş koyun kalp kapakçıklarının koyunlara implantasyonundan 3-6 ay sonra ciddi erken evre kalsifikasyon gözlenmiştir (Leyh vd., 2003). Transplante edilmiş bir allogreft kapak alan hastaların çoğunda, nakledilen dokuya özgü insan lökosit antijenine karşı hümmoral antikorlar gelişir, konakçı antijen tanıma ve antikor gelişiminin erken başlangıçlı doku kalsifikasyonu ve yapısal kapak bozulması ile bağlantılı olabileceği düşünülmektedir (Hawkins vd., 2003; Konuma vd., 2009). Bu nedenle enzimatik metodların hücresizleştirmede tek başına yetersiz olduğu düşünüldüğünde allogreftlerdeki kalsifikasyonun yetersiz hücresizleştirmeden kaynaklandığı düşünülebilir. Enzime dayalı hücresizleştirme işlemi ile elde edilen koyun aort kapakları kullanılan bir başka çalışmada, tavşanlarda 21 günlük deri altı implantasyon sonrasında inflamatuvar hücrelerin gözlenmediği ve ECM yapısının korunduğu bildirilmiştir (Abdolghafoorian vd., 2017). Deterjan tabanlı hücresizleştirme metodu ile işlenmiş aortik allogreftlerin bir koyun modelinde 20 aylık implantasyondan sonra yalnızca aort duvarlarında kalsifik belirteçlerin ve trombotik birikintilerin bulunduğu ve yaprakçıklarda yeniden hücrelendirmenin meydana geldiği bildirilmiştir (Tudorache vd., 2016). Benzer şekilde, etkili bir deterjan bazlı hücresizleştirmeden sonra koyun modelindeki pulmoner allogreftlerin ne yaprakçıklarında ne de pulmoner duvarında kalsifikasyon gelişmemiş ve *in vivo* yeniden hücrelendirme sağlanmıştır (Quinn vd., 2011, 2012).



Şekil 1.5. Kalp kapakçığı mühendisliği alanında şimdiye kadar yapılmış çalışmaların genelleştirilmiş özeti.

Teorik olarak, hücreleştirilmiş kalp kapakçıklarının otolog hücrelerle *in vitro* yeniden endotelizasyonu, implantasyondan sonra daha kısa sürede doku yeniden şekillenmesine izin verir, trombozu önler ve özellikle ksenogreftlerde doku reddini önler. İmplantasyondan önce hücreleştirilmiş yapı iskelelerinin endotelial hücrelerle tohumlanması ve endotelial katmanın ikamesi ile ilgili raporlar vardır (Cebotari vd., 2002; Dohmen vd., 2002). Lichtenberg ve vd.'nin çalışmasında hücreleştirilmiş koyun pulmoner kapaklarında fizyolojik koşulların sağlandığı dinamik biyoreaktör sisteminde endotel hücrelerinin 7 gün içinde kapak iç yüzeyini kapladığını bildirmiştir (Lichtenberg vd., 2006). Otolog endotelial ve miyofibroblast hücreleri ile ekimden sonra 3 aya kadar koyunlara implante edilen hücreleştirilmiş allogreftlerde endotelizasyon ve ECM yapılandırması gözlenirken, *in vitro* ekim yapılmamış hücresiz allogreftlerde ECM yapılandırması meydana gelmemiş ve kısmi dejenerasyon gözlenmiştir (Steinhoff vd., 2000). Aksine hücreleştirilmiş koyun kalp kapakçıklarının *in vitro* yeniden hücrelendirilmesinin gerekli olmadığını ve iskelelerin yeniden hücrelendirilmesinin, implantasyondan sonra konakçı

hücrelerin infiltrasyonu yoluyla gerçekleşeceğini ve hücresiz iskelelenin trombotik-kalsifik etkisinin olmadığını gösteren çalışmalar da vardır. Örneğin hücresizleştirilmiş koyun pulmoner kapakçıklarının hücre ekilmeden koyunlara implantasyonundan 6 ay sonra tam bir endotelyum oluşumu ve konakçı fibroblast hücrelerinin iskele içine sızdığı ve kalsifik belirteçlere rastlanmadığı tespit edilmiştir (Dohmen vd., 2006). Benzer şekilde başka bir çalışmada *in vitro* hücre ekimi yapılmadan hücresizleştirilmiş koyun aort allogreftlerinin 5 aylık implantasyonundan sonra tromboz veya kalsifikasyon olmadan tam endotelizasyon gözlemlendiği ve ECM yapısının korunduğu bildirilmiştir (Akhyari vd., 2010). Hücresizleştirilmiş koyun pulmoner kapakçıklarının endotelizasyonu destekleyen CCN1 ile kaplanmasının ardından 6 aylık implantasyon süreci sonunda *in vivo* endotelizasyonun sağlandığı, kalsifik belirteçlerin olmadığı ve 3 katmanlı yaprakçık yapısının korunduğu gözlenmiştir (Theodoridis vd., 2015). Deterjan bazlı hücresizleştirilmiş aortik allogreftlerin, *in vitro* hücre ön tohumlama olmadan koyunlarda 9 aylık implantasyondan sonra bile endotelizasyonu sağladığı ve ECM yapısının korunduğu bildirilmiştir (Baraki vd., 2009). Başka bir çalışmada yine hücresizleştirilmiş koyun pulmoner arterlerin, *in vitro* hücre ekilmeksizin koyunlara implantasyonundan sonra erken veya geç evre bir bağışıklık tepkisi olmadığı, endotelizasyonun gerçekleştiği ve interstisyel hücrelerin iskele içine sızması ile greftlerinin başarılı olduğu rapor edilmiştir (Lehr vd., 2011). Bu farklı bulgulardan yola çıkarak 3 aylık bir implantasyon süresinin, hücresiz iskelelere interstisyel hücre sızmasına yetmeyebileceği düşünülmüştür. Nitekim 3 aylık implantasyon sürecinde her ne kadar endotelyum oluşumu gözlenirse de VIC'lerin henüz kapakta yerleşemedikleri rapor edilmiştir (Tudorache vd., 2013).

Ksenogreft olarak ele alındığında hücresizleştirilmiş kalp kapakçıkları, implantasyon modellerinde genelde bağışıklık tepkisine sebep olabilmektedir. Çünkü kalp kapağı hücresizleştirme işlemleri, domuz kalp kapakçıklarındaki hücrelerin çıkarılmasında etkili olmasına rağmen, ksenoantijenik materyallerin (α -Gal, neu5Gc, β 2GalNT2 vb.) ECM'den tamamen çıkarılması henüz tam olarak sağlanamamıştır (Kasimir vd., 2006; Ramm vd., 2016). Koyun ve domuzların pulmoner kapaklarına aynı hücresizleştirme yönteminin uygulandığı bir çalışmada koyunlara implantasyondan 6 ay sonra her iki grup için endotelizasyonun oluştuğu yüzey boyutlarının hemen hemen eşit olduğu, kalsifikasyon gözlenmediği bildirilmiştir (Goecke vd., 2018). Fakat aynı çalışmada hücresizleştirilmiş domuz pulmoner kapakçıklarında, özellikle yüksek seviyelerde fagositik hücrelerin varlığı ve arter duvarlarında daha yüksek lökosit hücrelerinin birikmesi gözlenmiştir. Benzer şekilde,

hücreleştirirmeden sonra ksenoantijenik bileşenlerin tamamen ortadan kaldırılmadığını bildiren bir çalışmada hücreleştirilmiş koyun kalp kapağı, α -Gal mutant domuzlarında (GGTA1-KO) güçlü bir bağışıklık reaksiyonu sergilemiştir (Ramm vd., 2021). Bu çalışmada ayrıca yabancı tip domuzların, GGTA1-KO domuzlarında hafif bağışıklık reaksiyonuna neden olduğu da bildirilmiştir.

Şimdiye kadar çok az sayıda çalışmada *in vitro* koşullar altında hücreleştirilmiş koyun kalp kapakçıklarına insan hücresi ekilmiştir. Ekilmiş insan hücrelerinin adezyonu ve proliferasyonu incelenirken detaylı analizler yapılmamıştır. Örnek olarak literatürde fibrin bazlı tasarlanmış iskelelerin biyomekanik özelliklerinin doğal kapakçıklarla karşılaştırılabilir olduğunu göstermek için hücreleştirilmiş koyun kapakçıklarına insan mezenkimal kök hücreleri (MSC) ekilmiş ve hücre adezyonu ve biyomekanik analizler yapılmıştır (Syedain vd., 2013). Başka bir çalışmada, hücreleştirilmiş ve adeziv peptit sekansları ile yüzeyi modifiye edilmiş koyun pulmoner yaprakçıkları, *in vitro* olarak HUVEC'ler ile ekilmiş ve adeziv peptit sekanslarının HUVEC adezyonu üzerindeki etkisi araştırılmıştır (Aubin vd., 2016). Bu çalışmalarda görüldüğü gibi insan hücreleri ile ekimden sonra hücreleştirilmiş koyun kalp kapakçıkları ile yapılan çalışmalar yalnızca hücre yapışması ve biyomekanik testler ile sınırlıdır. İnsan hücreleri ekilmiş hücreleştirilmiş koyun kalp kapakçıklarında, rejeneratif kapasite henüz belirlenmiş değildir. Bu alandaki boşluğu doldurmak üzere tezdeki amacımız; farklılaşmış insan hücrelerinin, hücreleştirilmiş koyun kapakçık matrisinde hücre dışı matris (ECM) elemanlarını yeniden üretme potansiyellerini araştırmaktır. Amaç doğrultusundaki hedefler; koyun pulmoner kalp kapakçıklarının deterjan tabanlı metodla hücreleştirilmesi, karakterize edilmesi, ardından HUVEC ve insan dermal fibroblast hücrelerinin ekimi ve 7 günlük ko-kültürü takiben çeşitli karakterizasyon testleri ile yeni ECM sentezi veya rejeneratif belirteçlerin ifadelerinin analiz edilmesidir.

2. MATERYAL ve METOD

Tablo 2.1. Materyal listesi tablosu.

İsim	Marka
Fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) tablet	Biomatik, PBS 100ML of 1X buffer (A3602-100)
Sodyum deoksikolat (SD)	Sigma-Aldrich, sodium deoxycholate (D6750)
Sodyum dodesil sülfat (SDS)	Thermo Fisher, J.T. Baker™ Sodium dodecyl sulphate (10451101)
Penisilin/Streptomisin	Thermo Fisher, Gibco™ Gibco™ Penicillin-Streptomycin (15140122)
Magnezyum klorür (MgCl ₂)	Sigma-Aldrich, magnesium chloride, hexahydrate (442611-M)
Tris-HCl	Multicell, Tris-HCl (600-126-EG)
DNaz I	Biomatik, DNase I, Bovine Pancreas (A2442)
RNaz A	Grisp, RNase A (GE011.0100)
Fenol:Kloroform:İzoamil alkol	Gündüz Kimya, fenol kloroform izoamil alkol (GK2069.0100)
Sodyum asetat	Gündüz Kimya, sodyum asetat 3 M pH 5.2 (GK.39072.1000)
Etil alkol	Tekkim, ethanol absolute %99,5 (TK.200655.05001)
Tween 20	Sigma-Aldrich, TWEEN 20 viscous liquid (P1379)
Potasyum klorür (KCl)	Carlo Erba, potassium chloride (360107)
Proteinaz K	NZYTech, Proteinase K (MB01902)
Kollajenaz I	Gibco-17100017
Gluteraldehit	Sigma-Aldrich, glutardialdehyde solution 25% (104239)
Formaldehit	Tekkim, Formaldehit %37 (TK.060160.05001)
Ksilen	Tekkim, Ksilen (İzomerleri Karışımı) (TK.090270.02500)
Hematoksilen	Leica Biosystems, Surgipath Harris Hematoxylin Solution (3801560E)
Eozin	Diapath, Eosin G or Y 0,5% alcoholic (C0353)
Movat Pentakrom boya kiti	abcam, Movat Pentachrome Stain Kit (Modified Russell-Movat) (ab245884)
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	CAPRICORN, DMEM High Glucose (4.5 g/l), with L-Glutamine (DMEM-HA)
Fetal Bovine Serum (FBS)	CAPRICORN, Fetal Bovine Serum (FBS-11B)
1X PBS	CAPRICORN, Dulbecco's PBS (1x), with Ca & Mg, without Phenol Red (PBS-2A)
Trypsin/EDTA	Multicell, TRYPSIN/EDTA (325-542-EL)
DMSO	Sigma-Aldrich, Dimethyl sulfoxide (D2650)
3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT)	Solarbio Life Sciences, Thiazolyl blue tetrazolium bromide(MTT) (M8180)
4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI)	Invitrogen, NucBlue™ Fixed Cell ReadyProbes™ Reagent (DAPI) (R37606)

Tablo 2.1. (Devamı)

Falloidin	Cell Signaling Technology, Alexa Fluor® 488 Phalloidin (8878)
Trigent	Nucleogene, Tri Reagent (NGE023)
Kloroform	Sigma-Aldrich, chloroform (102431)
İzopropanol	Sigma-Aldrich, 2-propanol (34863)
cDNA sentez kiti	abm, OneScript® Plus cdna Synthesis Kit (G236)
Real Time master mix	EuroClone, FluoCycle II™ SYBR® Master Mix (ERD002100BIM)

Tablo 2.2. Cihaz listesi tablosu.

İsim	Marka ve Model
Çalkalamalı inkübatör	Nüve, EN120
Soğutmalı santrifüj	Nüve, NF 800R
Nanodrop	Shimadzu Biotech, Biospec-nano
SEM	Zeiss, Supra 40 VP
Püskürtmeli kaplayıcı	Quorum, Q150R ES
Çekme test cihazı	Instron-5569
Liyofilizatör	Labart, LFD-10N
Mikrotom	Leica, RM2125
Işık mikroskobu	Olympus, BX53
Lazer taramalı konfokal mikroskop	Zeiss LSM 800
İnverted mikroskop	Zeiss, Axio Observer Z1
CO ₂ inkübatörü	Esco, CCL-170B-8
Steril kültür kabini	Esco, Sentinel™ Platinum Class II Type A2
ELISA	Thermo Scientific, Multiskan GO
PCR	Applied Biosystems, 2720
Real Time PCR	Agilent, AriaMx Real-time PCR System

2.1. Hücresizleştirme

Yerel bir mezbahadan 4-6 aylık merinos cinsi koyunların, kesimden yaklaşık 20 dk sonra kalpleri soğuk PBS çözeltisi içine alınarak laboratuvara getirildi. Pulmoner kök ve arterin bir kısmı kalacak şekilde kalpten disekte edildi ve kapaktaki yağ dokularından temizlendi. Kapakların her biri 100 ml hücresizleştirme çözeltisi (1X'lik PBS'de çözdürülmüş %0,8 SD+%0,1 SDS) içine aktarıldı ve 37°C'de 24 saat boyunca 220 rpm çalkalama koşulunda hücresizleştirme işlemine tabi tutuldu. Bu süre sonunda her biri 12 saat süren 6 defa antibiyotik içeren PBS ile (penisilin/streptomisin 100 Unit/ml) yıkama işlemi aynı çalkalama koşulunda gerçekleştirildi. Ardından çıkarılan hücrelerden geriye kalan nükleer materyallerin iskeleden temizlenmesi amacıyla nükleaz enzim uygulaması yapıldı. Bunun için

öncelikle 10 mM MgCl₂ ve 50 mM Tris (pH: 7,5) tamponu hazırlandı ve 300 µg/ml derişimde DNaz I, 50 µg/ml derişimde RNaz A bu tampona eklendi. Hazırlanan çözelti her iskeleye 50 ml olacak şekilde eklendi ve 24 saat boyunca 37°C’de çalkalama koşulunda inkübe edildi. Devamında iskeleler 3 defa ultra saf su ile yıkandı (Erdrügger vd., 2006; Wollmann vd., 2011). Kontrol grubu olarak hücresizleştirilmemiş doğal koyun pulmoner kapaklar kullanıldı. Karakterizasyon çalışmaları yapılana kadar kontrol grubu ve hücresizleştirilmiş iskeleler penisilin/streptomisin içeren PBS çözeltisi içinde 4°C’de muhafaza edildi.

2.2. Hücresizleştirilmiş Kapakçıkların Karakterizasyonu

2.2.1. Kalıntı DNA içeriğinin belirlenmesi

Hücresizleştirme etkinliğinin değerlendirilmesi için yapılan testlerden biri kalıntı DNA miktar analizidir. Bunun için hücresizleştirilmiş iskelelerden manuel yöntemle DNA izolasyonu gerçekleştirildi (Ghatak vd., 2013). Kontrol grubu ve hücresizleştirilmiş iskelelerin yaprakçık ve pulmoner duvar kısmından steril koşullar altında 1 cm² boyutlarında parçalar kesildi ve 2 ml’lik santrifüj tüpüne alındı. Numunelerin üstüne 1,5 ml lizis çözeltisi (Tablo 2.3.) eklendi ve 55°C’de 48 saat süreyle çalkalama koşulunda inkübe edildi. Bu süre sonunda tüpler +4°C’de 3000 g devirde 15 dakika süreyle santrifüj edilerek süpernatant toplandı ve yeni tüpe aktarıldı. Ardından üzerine hacimsel olarak sırasıyla 25:24:1 oranında fenol:kloroform:izoamil alkol eklenerek tüpler hafif çalkalandı ve +4°C’de 3000 g devirde 15 dakika süreyle santrifüj edildi. Süpernatant kısım dikkatli bir şekilde temiz bir tüpe aktarıldı ve üzerine 200 µl 3 M sodyum asetat (pH: 5,5) ve 500 µl %95’lik etil alkol eklendikten sonra -80°C’de 20 dakika bekletildi. Devamında 37°C’de 30 dk bekletilen tüpler 10.000 rpm devirde 10 dakika süreyle santrifüj edildi ve süpernatant kısım uzaklaştırıldı. Kalan pelletin üzerine 100 µl distile su eklenerek çözdürüldü ve nanodrop ile çift zincirli DNA miktarının (ng/µl) ölçümleri yapıldı. Ölçüm sonucunda hücresizleştirme ile dokudan giderilen DNA miktarı % olarak hesaplandı.

Tablo 2.3. DNA izolasyonunda kullanılan lizis tampon içeriği.

MgCl ₂	1,5 mM
Tween 20	%0,5
Tris-HCl	10 mM
KCl	50 mM
Proteinaz K	20 mg/mL

Deney her örnek için 3 bağımsız tekrar olacak şekilde gerçekleştirildi.

2.2.2. Şişme testi

Hücresizleştirme etkinliğinin belirlenmesi adına yapılan diğer bir test şişme testidir ve hücresizleştirme hakkında dolaylı olarak fikir vermektedir. Şöyle ki hücrelerin uzaklaştırılmasından sonra geriye kalan ECM yapısı boşluklu olacağı için, içerisinde su barındırabilme ve şişme potansiyeli doğal dokuya göre artacaktır. Kontrol grubu ve hücresizleştirilmiş iskelelerin yaprakçık ve pulmoner duvar kısmından steril koşullar altında 1 cm² boyutlarında parçalar kesildi ve kurumak üzere oda sıcaklığında 1 saat bekletildi. Başlangıçtaki kuru ağırlıkları tartıldı ve kaydedildi. Kesilen örnekler içinde 10 ml PBS bulunan tüplere daldırıldı. 4 saat 37°C’de tüp içerisinde bekletilen örnekler toplanıp üstündeki fazla PBS dikkatlice silinerek uzaklaştırıldı. Ardından son ağırlıkları tartılarak kaydedildi. % şişme oranı şu denkleme göre hesaplandı: $\% \text{ Şişme} = \left(\frac{\text{Yaş ağırlık} - \text{Kuru ağırlık}}{\text{Kuru ağırlık}} \right) \times 100$ (Hinderer vd., 2014). Deney her örnek için 3 bağımsız tekrar olacak şekilde gerçekleştirildi.

2.2.3. SEM görüntüleme

Hücresizleştirme işleminin ECM üzerindeki yıkıcı etkisini ve yüzeyde olası endotel hücre kalıntılarını görüntüleyebilmek için numuneler SEM altında incelenmiştir. Öncelikle kontrol grubu ve hücresizleştirilmiş örneklerle ait yaprakçık ve pulmoner duvar kısımları, PBS içinde hazırlanmış hacimce %2,5 glutaraldehit içeren çözelti ile 24 saat fikse edildi. Ardından iskeleler ultra saf su ile yıkandı ve dehidrayonu sağlamak için, her etanol serisinde 15 dakika boyunca muamele edilecek şekilde, artan etanol serilerinden geçirilerek (%50, %70, %80, %90, %95 ve %100) oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Kurutulan iskeleler püskürtmeli kaplayıcı tarafından altın:palladyum (%80:%20) ile 90 saniye boyunca kaplandı. Ardından SEM ile görüntüleme işlemine geçildi. Deney her örnek için 3 bağımsız tekrar olacak şekilde gerçekleştirildi.

2.2.4. Çekme testi

Hücresizleştirme işleminin kapakçık ECM’sinin biyomekanik özellikleri üzerindeki etkisini belirlemek için tek eksenli çekme testi gerçekleştirildi (Hinderer vd., 2014). Hem kontrol grubu hem de hücresizleştirilmiş iskelelerin yaprakçık ve pulmoner duvar kısımlarından radyal yönde 1 cm² boyutlarında kesitler alındı. Genişlikleri, uzunlukları ve kalınlıkları dijital kumpas ile ölçülerek kaydedildi. Numuneler PBS ile ıslatılıp genel çekme test cihazına yerleştirildi ve oda sıcaklığında 0.1 MPa başlangıç yükü ile 5 mm/dk hızında gerildi. Test sonrası elde edilen verilerle gerilme/gerinim eğrisi hazırlandı, elastisite modülü

(Young'un modülü) ve nihai çekme dayanımı (UTS) değerleri elde edildi. Deney her örnek için 3 bağımsız tekrar olacak şekilde gerçekleştirildi.



Şekil 2.1. Örneklerin çekme test cihazına yerleştirildikten sonraki görüntüsü.

2.2.5. Kollajenaz degradasyon testi

Kontrol ve hücreleştirilmiş pulmoner kalp kapakçıklarının yaprakçık ve arter duvarı kısımlarından 1 cm²'lik parçalar kesildi ve liyofilizatörde dondurularak kurutuldu. Daha sonra başlangıç kuru ağırlıkları tartılıp kaydedildi. Ardından kuru örnekler 2 ml'lik santrifüj tüpüne alındı. Tüp içerisine PBS tamponu içinde hazırlanmış 1 mg/ml derişime sahip kollajenaz I çözeltisi ilave edildi ve 37 °C ve 60 rpm çalkalama koşulunda 24 saat inkübe edildi. Tüpler daha sonra 10.000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi ve süpernatant kısım uzaklaştırıldı. Daha sonra örnekler PBS ile yıkandıktan sonra liyofilize edildi. PBS tamamen uzaklaştırıldıktan sonra numunelerin son ağırlığı belirlendi ve % bozunma oranı şu formüle göre hesaplandı:

$$\% \text{ Bozunma} = \left(\frac{\text{Başlangıç ağırlığı} - \text{Son ağırlık}}{\text{Başlangıç ağırlığı}} \right) \times 100 \text{ (Yu vd., 2021).}$$

Deney her örnek için 3 bağımsız tekrar olacak şekilde gerçekleştirildi.

2.2.6. Histolojik karakterizasyon

Hücresizleştirme işleminin pulmoner duvar ve yaprakçık kısımları üzerindeki etkilerini gözlemlemek ve hücresizliği doğrulamak için histolojik boyamalar yapıldı. Kullanılan ürünlerin kullanıcı talimatlarına uyularak prosedür gerçekleştirildi. Ön hazırlık olarak hücresizleştirilmiş yaprakçık ve pulmoner duvar örnekleri ile kontrol grubu örnekleri %10'luk formaldehit çözeltisinde 24 saat fikse edildi. Daha sonra numuneler doku kasetlerine yerleştirildi ve artan etanol serilerinden (60-70-80-90-96-100) geçirilerek dehidrasyon sağlandı. Devamında dokular 55°C'de eritilmiş parafine gömüldü ve parafin donduktan sonra dokulardan mikrotom ile 5 µm kalınlığında kesitler alındı. Bu kesitler lam üzerine alındıktan sonra parafini uzaklaştırmak için 65°C'de ksilen ile muamele edildi. Parafin uzaklaştırıldıktan sonra rehidrasyonu sağlamak üzere kesitler azalan etanol serilerinden geçirildi. Ön hazırlık işlemlerinden sonra boyama prosedürleri uygulandı. Boya olarak Hematoksilen&Eozin (H&E), Movat Pentakrom boyama kiti kullanıldı ve üretici firmanın talimatlarına göre boyama işlemi gerçekleştirildi. Deney her örnek için 3 bağımsız tekrar olacak şekilde gerçekleştirildi.

H&E boyama için kontrol grubu ve hücresizleştirilmiş örneklerle ait kesitler lama yerleştirilip nemlenmeleri için 2 dk boyunca distile su ile muamele edildi. Ardından 8 dakika süreyle Hematoksilen ile muamele edilen kesitler, fazla boyayı uzaklaştırmak üzere distile su ile durulandı. %95'lik etanol ile ekstra durulamanın ardından kesitler Eozin boyasıyla 1 dakika boyunca muamele edildi. %95'lik etanol ile tekrar durulanan lamın üzerine lamel kapatılıp entellan ile sabitlenmesi sağlandı. Devamında preparatlar ışık mikroskopunda görüntülendi. H&E boyama sonucunda hücrelerin çekirdekleri mavi/siyah, ECM elemanları da pembe boyanmaktadır.

Movat Pentakrom boyama prosedürü kısaca özetlenecek olursa kontrol grubu ve hücresizleştirilmiş örneklerle ait kesitler 20 dakika boyunca elastik boyama solüsyonunda bekletildi. Ardından kesitlerde fazla boya kalmayınca kadar akan su altında yıkandı ve Ferrik Klorür (%2) solüsyonuna 15-20 kez batırıldıktan sonra önce musluk suyu altında, daha sonra distile su ile yıkandı. Daha sonra kesitler sodyum tiyosülfat çözeltisi (%5) içine yerleştirildi ve 1 dakika bekletildi. Daha sonra önce musluk suyu ardından distile su ile yıkandı. Asetik asit solüsyonu (%3) içinde 2 dakika bekletilen kesitler daha sonra yıkanmadan Alcian Blue solüsyonu (pH 2.5) ile 25 dakika muamele edildi. Ardından musluk suyu altında 2 dk bekletilen kesitler daha sonra distile su ile yıkandı. Biebrich Scarlet-Acid Fuchsin solüsyonu içine yerleştirilen kesitler 2 dakika inkübe edildi ve devamında 2 defa distile su ile

durulandı. Ardından örnekler 5-10 saniye boyunca asetik asit solüsyonu (%1) içine daldırılıp çalkalandı ve distile su ile hızlıca durulandı. Kesitler Fosfotungstik Asit çözeltisi (%5) içinde 3-7 dk boyunca inkübe edildi ve distile su ile hızlıca durulandı. Asetik Asit solüsyonu (%1) içine 3-5 defa daldırılan örnekler durulama yapılmadan Metanil Yellow solüsyonu ile 15 dk inkübe edildi. Ardından saf etanol ile durulama yapıldı. Fazla alkol kesit üstünden uzaklaştırıldıktan sonra entellan ile kaplama ve kapama yapıldı. Ardından kesitler ışık mikroskobu ile görüntülendi. Movat Pentakrom boyama sonucunda ECM ana bileşenlerinden olan kollajenler sarı, elastinler siyah ve GAG'ler mavi boyanmaktadır. Bunlara ek olarak hücre çekirdekleri mavi/siyah, fibrinler parlak kırmızı, kas dokusu da kırmızı boyanmaktadır.

2.3. Hücre Kültürü Çalışmaları

2.3.1. Hücre çözündürme, kültür ve pasajlama

Sıvı azot tankından çıkartılan HUVEC ve primer sünnet derisi fibroblast hücreleri hızlı bir şekilde çözündürüldü ve steril kabin içinde her birine DMEM (%10 FBS + %1 penisilin/streptomisin) besiyeri eklenip 2500 rpm devirde 5 dk boyunca santrifüj edildi. Besiyeri uzaklaştırıldıktan sonra hücre çökeltileri 7 ml besiyerinde çözündürüldü ve 25 cm²'lik kültür kaplarına aktarıldı. Ardından 37°C ve %5 CO₂ koşullarına ayarlanan inkübatörde hücrelerin kültürü yapıldı. Hücre yoğunluğu kültür kabının %80'ini kaplayana kadar her iki günde bir olmak üzere besiyeri değiştirildi ve inverted mikroskop ile gözlemlendi. En az %80 yoğunluğa ulaşan hücrelerin besiyeri kültür kabından uzaklaştırıldı ve hücreler PBS ile bir kez yıkandı. Daha sonra 2 ml tripsin/EDTA ilavesiyle kültür koşullarında hücreler kabin yüzeyinden kaldırıldı. Hücreler tamamen kalktıktan sonra tripsin inhibisyonu için hacimce enzim miktarının 2 katı kadar serum içeren besiyeri eklendi. Ardından hücreler 50 ml'lik plastik santrifüj tüpüne aktarıldı ve 2500 rpm devirde 5 dk boyunca santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra hücre çökeltileri taze besiyeri ile çözündürüldü ve bu sefer 75 cm²'lik kültür kaplarına aktarıldı. Ardından yeniden kültür koşullarındaki inkübatöre yerleştirildi.

2.3.2. Hücre dondurma

HUVEC'lerin %80 yoğunluğa ulaşma süresi fibroblast hücrelerine göre kısa olduğu için iki pasajlamadan sonra dondurulması gerekmiştir. Bunun için öncelikle kültür kabından besiyeri uzaklaştırıldı ve PBS ile bir kez yıkandı. Ardından tripsinizasyon işlemi gerçekleştirildi. Hücreler yüzeyden ayrıldıktan sonra üzerlerine serum içeren besiyeri eklendi ve 2500 rpm devirde 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant kısım uzaklaştırıldıktan sonra üzerine

serum içeren besiyeri eklenerek hücreler çözündürüldü. Daha sonra hücreler vida kapaklı derin dondurucu tüpü (cryo tüp) içine 900 µl olacak şekilde 4 tüpe eşit olarak bölüştürüldü. Daha sonra her tüpe %10 oranı doğrultusunda 100 µl DMSO eklendi ve yavaş bir şekilde pipetaj yapıldıktan sonra hızlıca -20°C'ye kaldırıldı. Yaklaşık 2 saat sonra tüpler -80°C'ye kaldırılarak muhafaza edildi. Stokları yapılacak hücreler ise -80°C'de bir gece bekletildikten sonra hızlıca sıvı azot tankına transfer edildi.

2.4. İskelelerin Yeniden Hücrelendirilmesi ve Karakterizasyonu

2.4.1. Yeniden hücrelendirme

Hücresizleştirilmiş pulmoner yaprakçık ve arter duvarı kısımlarından 0,5 x 0,5 cm²'lik kesitler alındı ve hücre ekiminden önce bir gece %70'lik etil alkolde steril edildi. Daha sonra steril kabin içine yerleştirilip her iki yüzeyi UV ışığı altında 15 dk boyunca steril edildi. Sterilizasyon işlemlerinden sonra 96 kuyucuklu kültür kabı içine yerleştirilen numunelerin üstüne besiyeri eklendi ve ekim yapılana kadar inkübatöre yerleştirildi.

Öncelikle fibroblast hücreleri tripsinizasyonla kültür kabından ayrıldıktan sonra çöktürüldü ve 1 ml besiyerinde çözündürüldü. Hücre sayımı için hemositometre kullanıldı ve yaprakçıkların fibroza katmanına, duvar örneklerinin intima katmanına 10⁴ yoğunlukta ekim gerçekleştirildi. İki saatlik statik kültürden sonra aynı numunelere 10⁵ yoğunlukta HUVEC'lerin ekimi gerçekleştirildi. Aynı sayıda kültür kabına ekilen hücreler kontrol grubu olarak belirlendi ve tüm örnekler inkübatörde statik olarak kültürlendi. 1, 3 ve 7 günlük periyotlarda *in vitro* sitotoksiteyi ve proliferasyonu belirlemek için MTT analizi gerçekleştirildi.

2.4.2. MTT analizi

1., 3. ve 7. günlerde kontrol grubu, yaprakçık ve duvar numunelerinin bulunduğu kuyucuklardan besiyeri uzaklaştırıldı ve örnekler PBS ile yıkandı. Daha sonra örnek başına serum içermeyen 180 µl DMEM ve 20 µl MTT reaktifi eklenerek kültür koşullarında 4 saat inkübe edildi. Bu süre sonunda çözelti ortamdan uzaklaştırıldı ve örneklerin üstüne 200 µl MTT çözücüsü eklendi. Ardından pipetaj yapıldıktan sonra kuyucukların içindeki mor renkli çözelti 96 kuyucuklu plakaya aktarıldı ve ELISA' da 570 nm dalga boyunda absorbansları ölçüldü. Kör olarak MTT çözücüsü kullanıldı ve kontrol gruplarına kıyasla iskelelerdeki hücre proliferasyonu ve dolayısıyla sitotoksite belirlendi. Deney her örnek için 3 bağımsız tekrar olacak şekilde gerçekleştirildi.

2.4.3. Histolojik karakterizasyon

Yeniden hücrelendirme işlemiyle birlikte hücrelerin iskelelere adezyonunu belirlemek amacıyla H&E boyama tekrarlanmış ve ek olarak DAPI-Falloidin floresan boyamaları gerçekleştirilmiştir. Başlık 2.2.6. daki gibi yeniden hücrelendirilmiş dokular sırayla dehidrasyon, parafinizasyon, kesit alma, deparafinizasyon, rehidrasyon işlemlerine tabi tutuldu. Daha sonra lamdaki kesitler Falloidin ile 15 dk boyunca karanlık ortamda oda sıcaklığında inkübe edildi ve fazla boya lamdan uzaklaştırıldı. Ardından kesitlerin üstüne DAPI içeren kapatma medyumunu eklendi ve lamel ile kesitler kapatıldı. Preparatlar 1 gece +4°C’de bekletildikten sonra konfokal mikroskop ile görüntülendi. Deney her örnek için 3 bağımsız tekrar olacak şekilde gerçekleştirildi.

2.4.4. RNA izolasyonu

Yaklaşık 50-100 mg doku örneklerinin üstüne 1 ml Trizol eşleniği olan Trigent ilave edildi ve homojenizatörde öğütüldü. 2 ml’lik santrifüj tüpüne alınan örnekler 10 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra üstüne 500 µl kloroform eklendi ve oda sıcaklığında 5 dk daha bekletildi. Ardından +4°C’de 14.000 g hızda 15 dk boyunca santrifüj edildi. Daha sonra tüplerdeki süpernatant kısım yeni tüplere aktarıldı ve üstüne 200 µl kloroform eklendi ve santrifüj işlemi aynı koşulda tekrarlandı. Yeniden süpernatant kısım yeni tüplere alındı ve eşit hacimde izopropanol eklenerek tüpler nazıkçe alt üst edildi ve oda sıcaklığında 30 dk bekletildi. Bu sürenin sonunda örnekler +4°C’de 14.000 g hızda 10 dk boyunca santrifüj edildi. Süpernatant kısım uzaklaştırıldı ve tüpün çeperine yapışmış olan şeffaf pellet üstüne 1 ml %75’lik etanol eklendi ve çok yavaş bir şekilde pipetaj yapıldı. Bu işlemin sonunda örnekler +4°C’de 10 dk bekletildi. Daha sonra +4°C’de 14.000 g hızda 10 dk boyunca santrifüj edildi. Ardından etanol tüpten uzaklaştırıldı ve etanol ile yıkama işlemi, ardından santrifüj basamağı tekrarlandı. Etanol tüplerden uzaklaştırıldıktan sonra steril kabin içerisinde yaklaşık 30 dk boyunca tüplerin kapakları açık bir şekilde RNA’ların kuruması sağlandı. Her örneğe 50 µl nükleaz içermeyen steril su eklendi ve 60°C’de 10 dk inkübe edilerek RNA’ların çözünmesi sağlandı. Daha sonra RNA örnekleri -80°C’de muhafaza edildi. Deney her örnek için 3 bağımsız tekrar olacak şekilde gerçekleştirildi.

2.4.5. cDNA çevrimi

Total RNA’ dan cDNA çevrimi için abm OneScript Plus cDNA sentez kiti kullanıldı. Bir örnek için reaksiyon içeriği aşağıdaki tabloda verilmiştir.

Tablo 2.4. Ters transkripsiyon reaksiyon içeriği.

5X RT Buffer	4 µl
dNTP	1 µl
Random Primers	1 µl
OligodT	1 µl
OneScript Plus RTase	1 µl
Total RNA	10 µl
Nuclease free H ₂ O	2 µl

Örnekler PCR cihazına yerleştirildikten sonra 1 döngü 15 dk 55°C, 1 döngü 5 dk 85°C’de reaksiyonun gerçekleşmesi sağlandı. Bu sürenin sonunda örnekler -20°C’de muhafaza edildi. Deney her örnek için 3 bağımsız tekrar olacak şekilde gerçekleştirildi.

2.4.6. Gen ifade seviyelerinin Gerçek Zamanlı PCR ile belirlenmesi

Temel ECM proteinlerini sentezleyen genlerin ifadesi, FluoCycle II™ SYBR® Master Mix kullanılarak Real Time PCR ile belirlendi. 1 örnek için reaksiyon içeriği toplamda 20 µl olacak şekilde ayarlandı ve sırasıyla 10 µl Master Mix, 0,5 µl ileri primer, 0,5 µl geri primer, 1 µl cDNA, 8 µl nükleaz içermeyen steril su eklenerek PCR tüpünde karışım pipetlendi. Daha sonra tüpler cihaza yerleştirildi ve termal profil 1 döngü 95°C’de 5 dk ön denatürasyon, 45 döngülük amplifikasyon basamağı 95°C’de 15 sn ve ardından 60°C’de 1 dk olacak şekilde ayarlandı.

Sonuçların analizleri için $\Delta\Delta C_t$ metodu kullanıldı. *GAPDH*, referans gen olarak analize dahil edildi. Kullanılan primer dizileri Tablo 2.5.’de verilmiştir.

Tablo 2.5. Real Time PCR reaksiyonunda kullanılan primer dizi listesi.

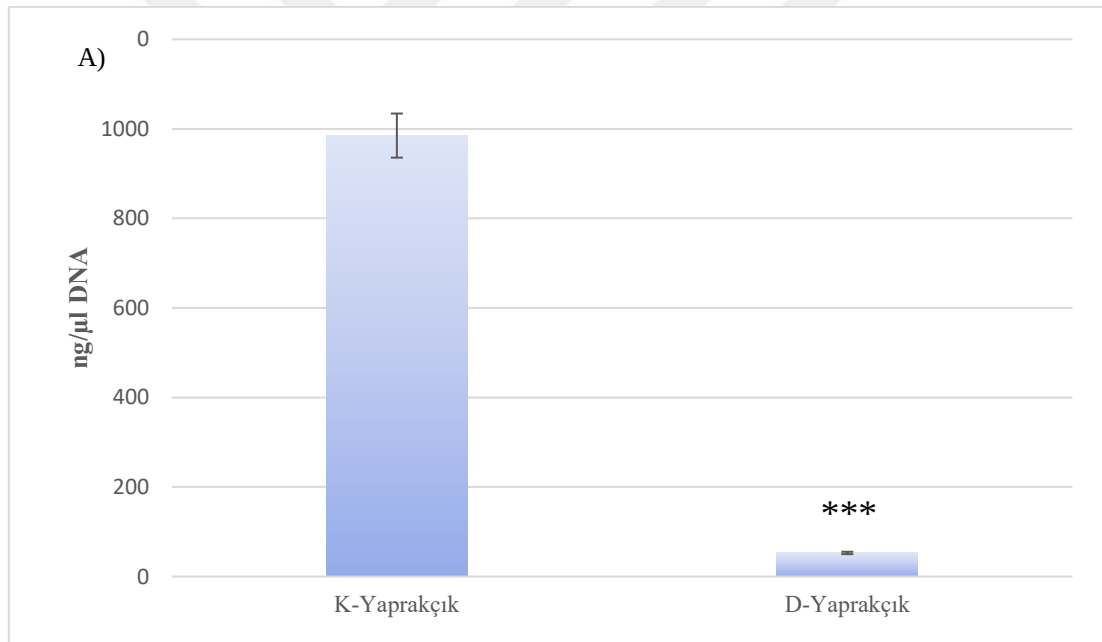
<i>Col1F</i>	5'-CCACTGGTCCCCAAATCTAA-3'	Referans (Eslami vd., 2015)
<i>Col1 R</i>	5'-GCTTCTTTGGCAGTCTGAGG-3'	
<i>Col3 F</i>	5'- CTT CTC TCC AGC CGA GCT TC-3'	(Demir, 2021)
<i>Col3 R</i>	5'- CCA GTG TGT TTC GTG CAA CC-3'	
<i>Eln F</i>	5'-CAGCCAAATACGGTGAAACA-3'	(Eslami vd., 2015)
<i>Eln R</i>	5'-AACACCAGGGACTCCAACAC-3'	
<i>GAPDH F</i>	5'-TGCACCACCAACTGCTTAGC-3'	(Hänninen vd., 2009)
<i>GAPDH R</i>	5'-GGCATGGACTGTGGTCATGAG-3'	

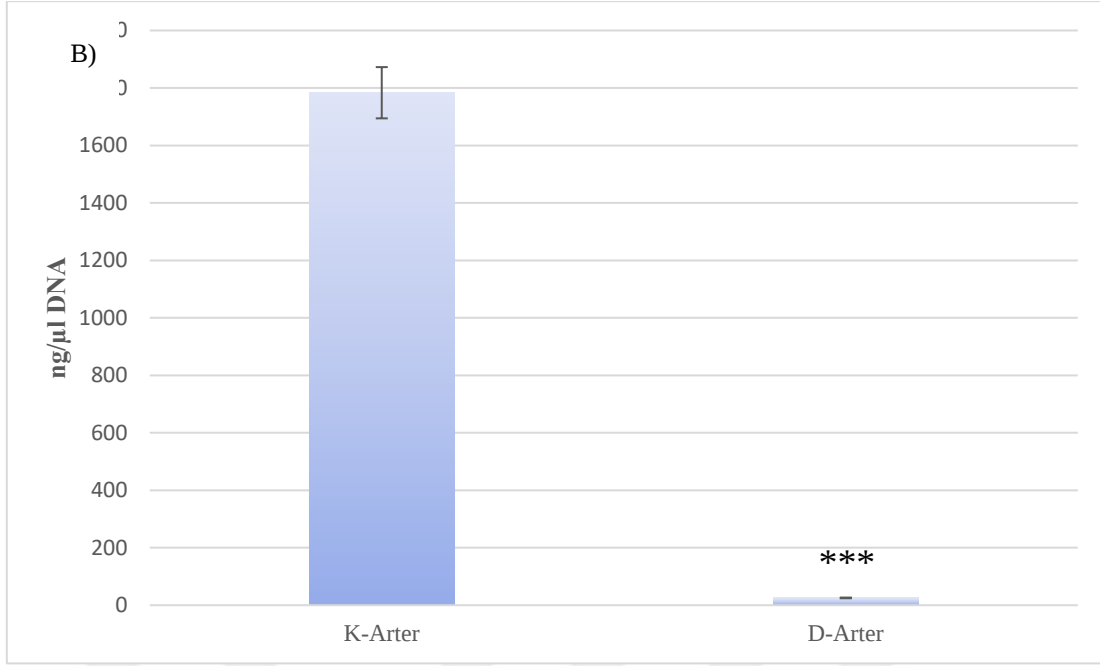
3. BULGULAR

3.1. Hücresizleştirilmiş Kapakçıkların Karakterizasyonu

3.1.1. Kalıntı DNA içeriği

Koyun pulmoner kapakçıkların hücresizleştirme işlemine tabi tutulmasının ardından iskelede kalıntı halinde hala mevcut olan DNA miktarı araştırılmıştır. Nanodrop ölçüm sonuçlarına göre hücresizleştirme ile birlikte hücresizleştirilmemiş kontrol grubuna kıyasla yaprakçık örneklerindeki DNA miktarı $982 \pm 131,3$ ng/ μ l düzeyinden $54,22 \pm 9$ ng/ μ l düzeyine azalarak yaklaşık %94'lük bir DNA giderimi gerçekleşmiştir. Arter duvar örneklerinde ise kontrol grubuna göre hücresizleştirme işleminden sonra DNA miktarı $1783,3 \pm 110,4$ ng/ μ l düzeyinden $26,04 \pm 13$ ng/ μ l düzeyine azalarak yaklaşık %98 oranında DNA giderimi gerçekleşmiştir (Şekil 3.1). DNA miktarındaki bu azalışlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (*** $p < 0,001$).

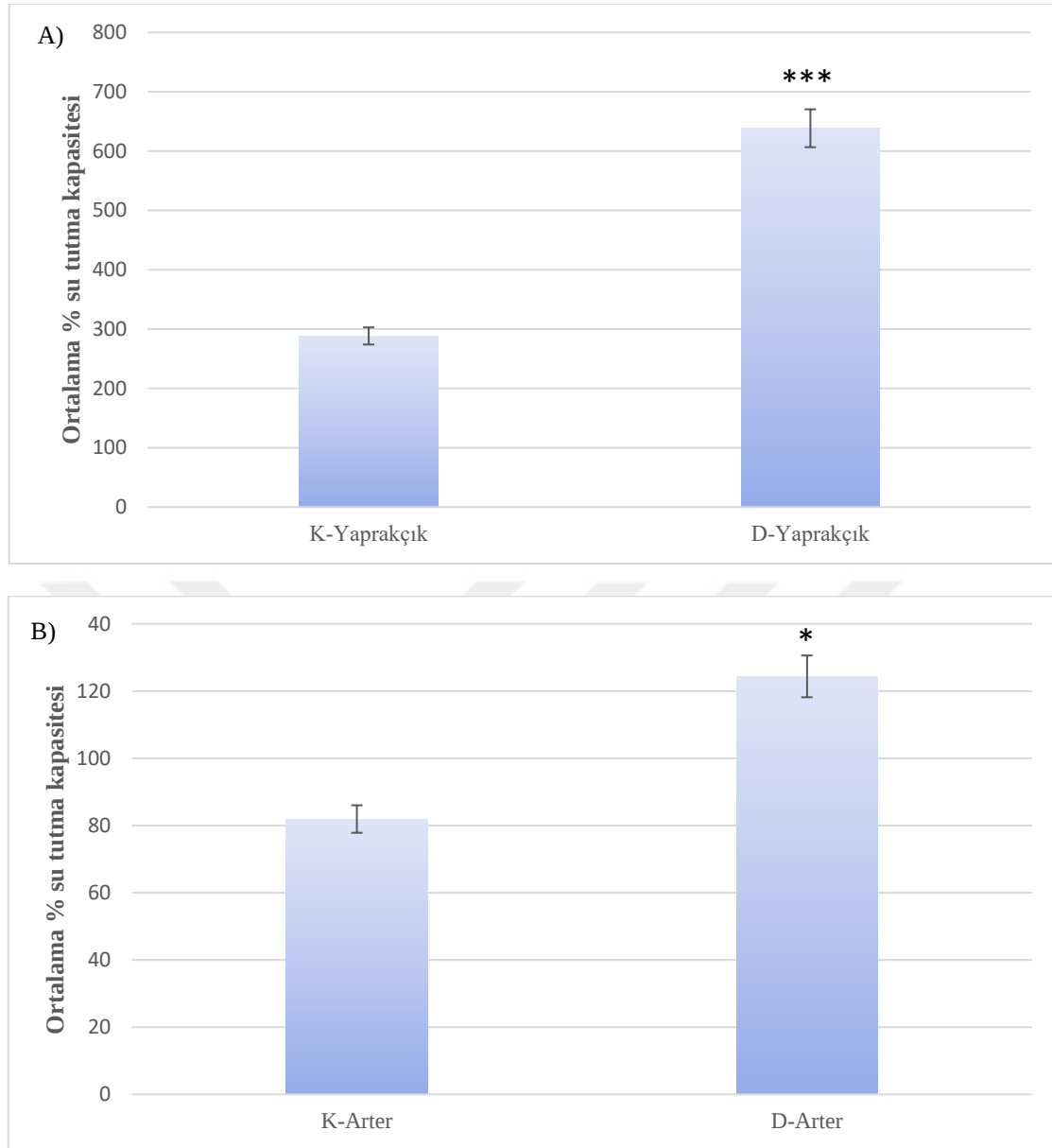




Şekil 3.1. Hücresizleştirilmiş kapakçıklardaki kalıntı DNA analizi. A) Yaprakçık örneklerinin kıyaslanması, B) Arter duvarı örneklerinin kıyaslanması (K: kontrol, D: hücresizleştirilmiş, *** $p < 0,001$).

3.1.2. Şişme testi

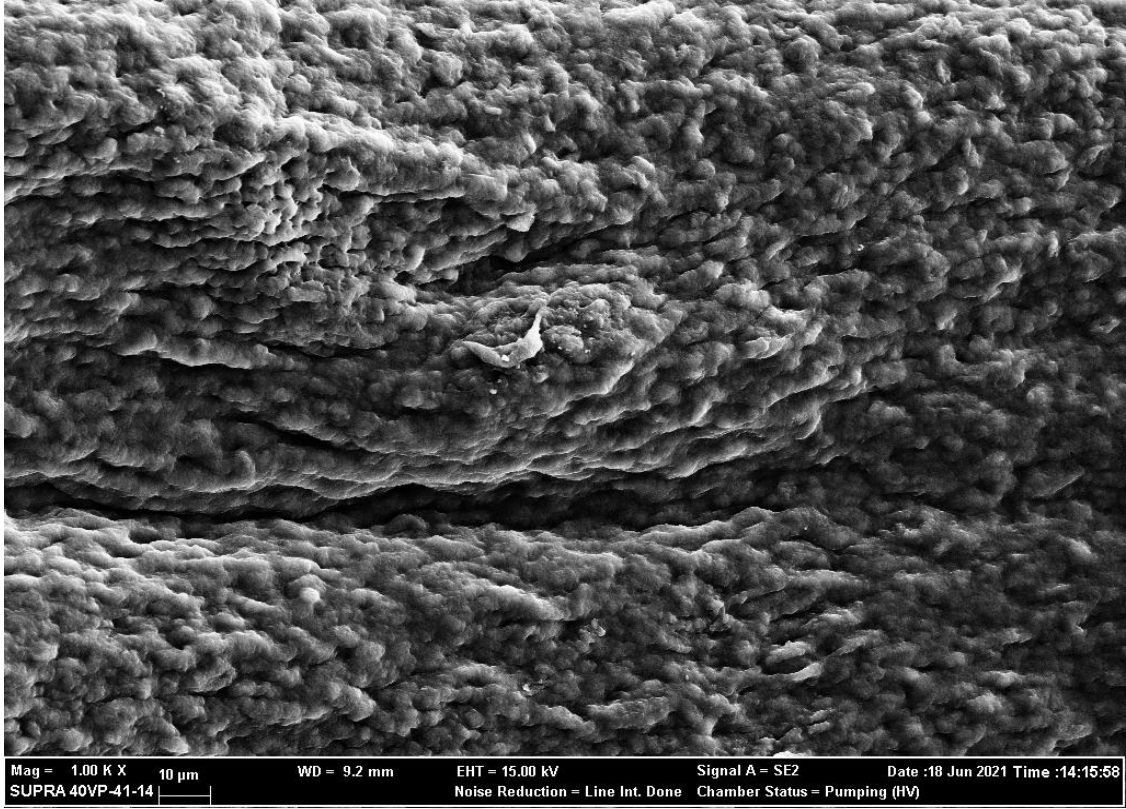
Kontrol grubu ve hücresizleştirilmiş örneklere ait ortalama % su tutma kapasiteleri belirlenmiş ve bu değerler şişme olarak nitelendirilmiştir. Doğal yaprakçık örneklerinin şişme oranı $288,4 \pm 85,6$ iken hücresizleştirme işleminden sonra yaprakçık örneklerinin şişme oranı $638,5 \pm 60$ 'a istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yükselmiştir. Doğal arter duvarı örneklerinin şişme oranı $81,9 \pm 16,3$ olarak ölçülmüş ve bu oran hücresizleştirmeden sonra $124,3 \pm 9,3$ 'e yükselse de istatistiksel olarak önemli bir fark oluşmamıştır (Şekil 3.2).



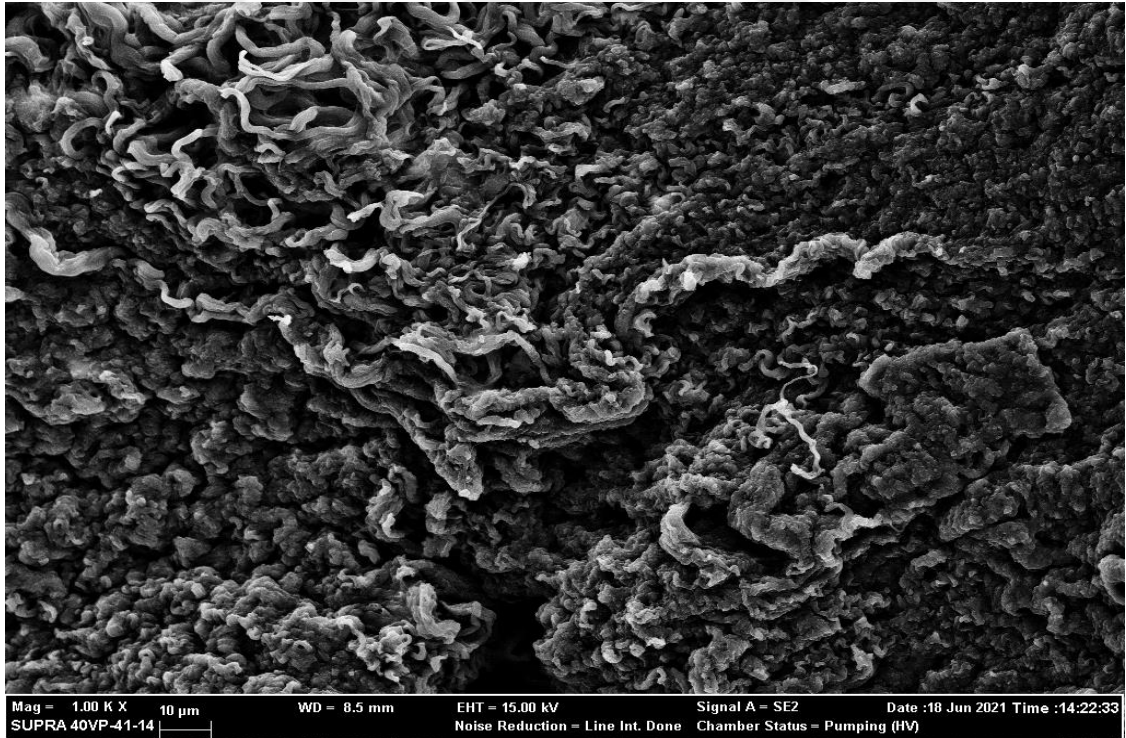
Şekil 3.2. Hüresizleştirilmiş kapakçıklardaki şişme oranları. A) Yaprakçık örneklerinin kıyaslanması, B) Arter duvarı örneklerinin kıyaslanması (K: kontrol, D: hüresizleştirilmiş, * $p<0,05$, *** $p<0,001$).

3.1.3. SEM görüntüleme

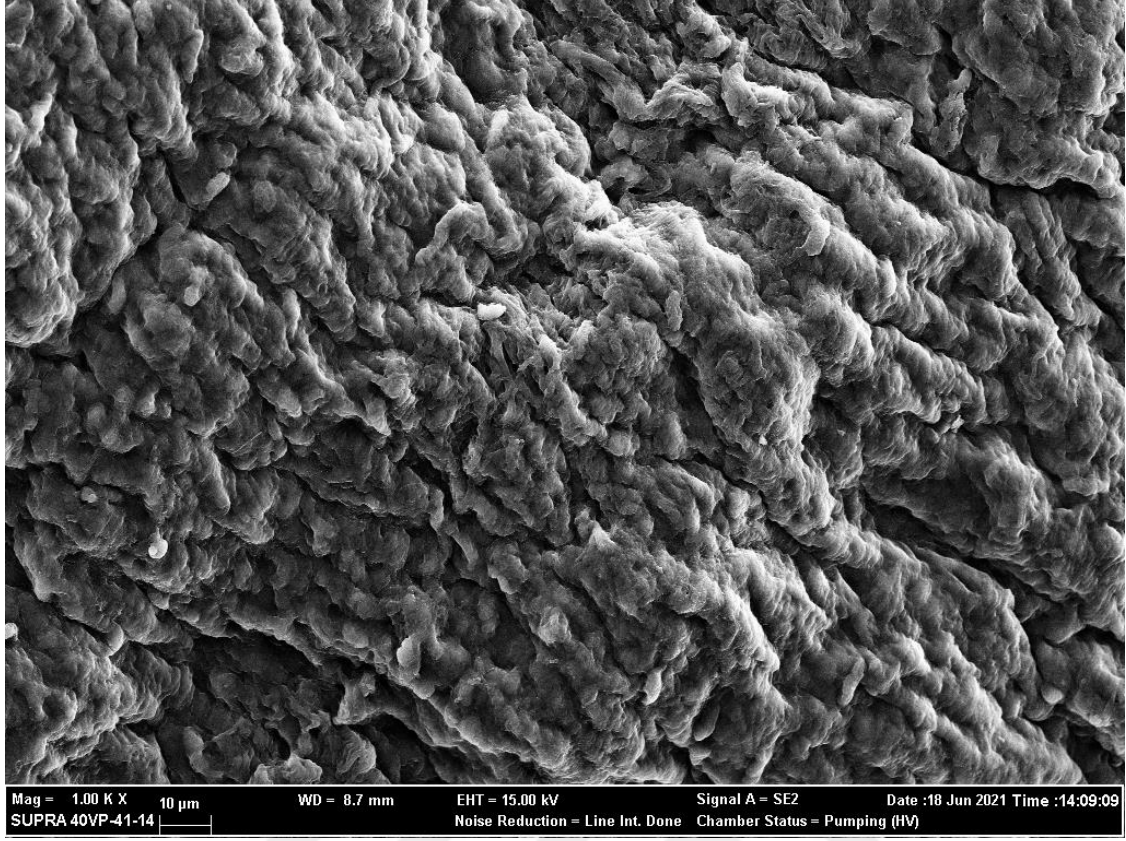
Görüntüleme sonucu elde edilen mikrograflarda doğal yaprakçık ve arter duvarı örneklerinin yüzeyinde mozaik desene benzer bir şekilde karakterize edilebilen endotelyum tabakası gözlenmiştir. Hüresizleştirme işleminden sonra endotelyum tabakasının ortadan kaldırıldığı ve kollajen fibrillerinin açığa çıktığı; fakat yüzeysel olarak herhangi bir dejenerasyonun gerçekleşmediği görülmüştür (Şekil 3.3-3.6).



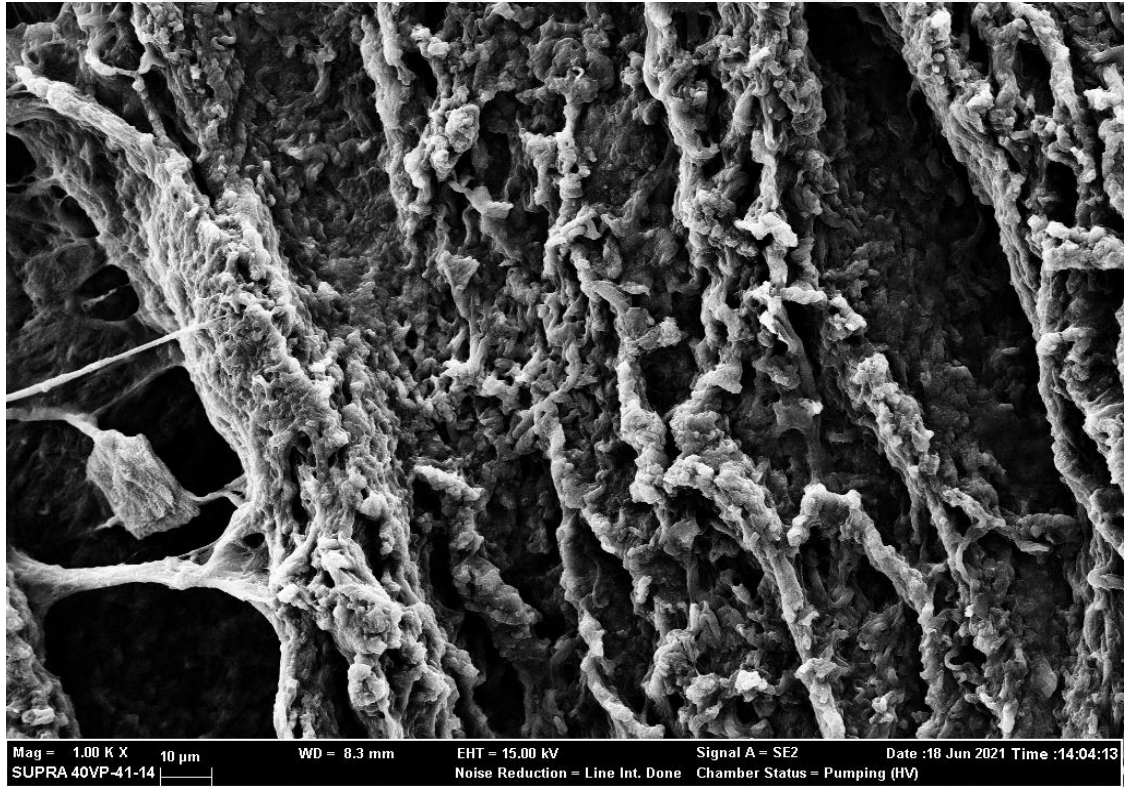
Şekil 3.3. Kontrol yaprakçık örneğinin SEM mikrografi (1000X yakınlaştırma).



Şekil 3.4. Hüresizleştirilmiş yaprakçık örneğinin SEM mikrografi (1000X yakınlaştırma).



Şekil 3.5. Kontrol arter duvarı örneğinin SEM mikrografı (1000X yakınlaştırma).



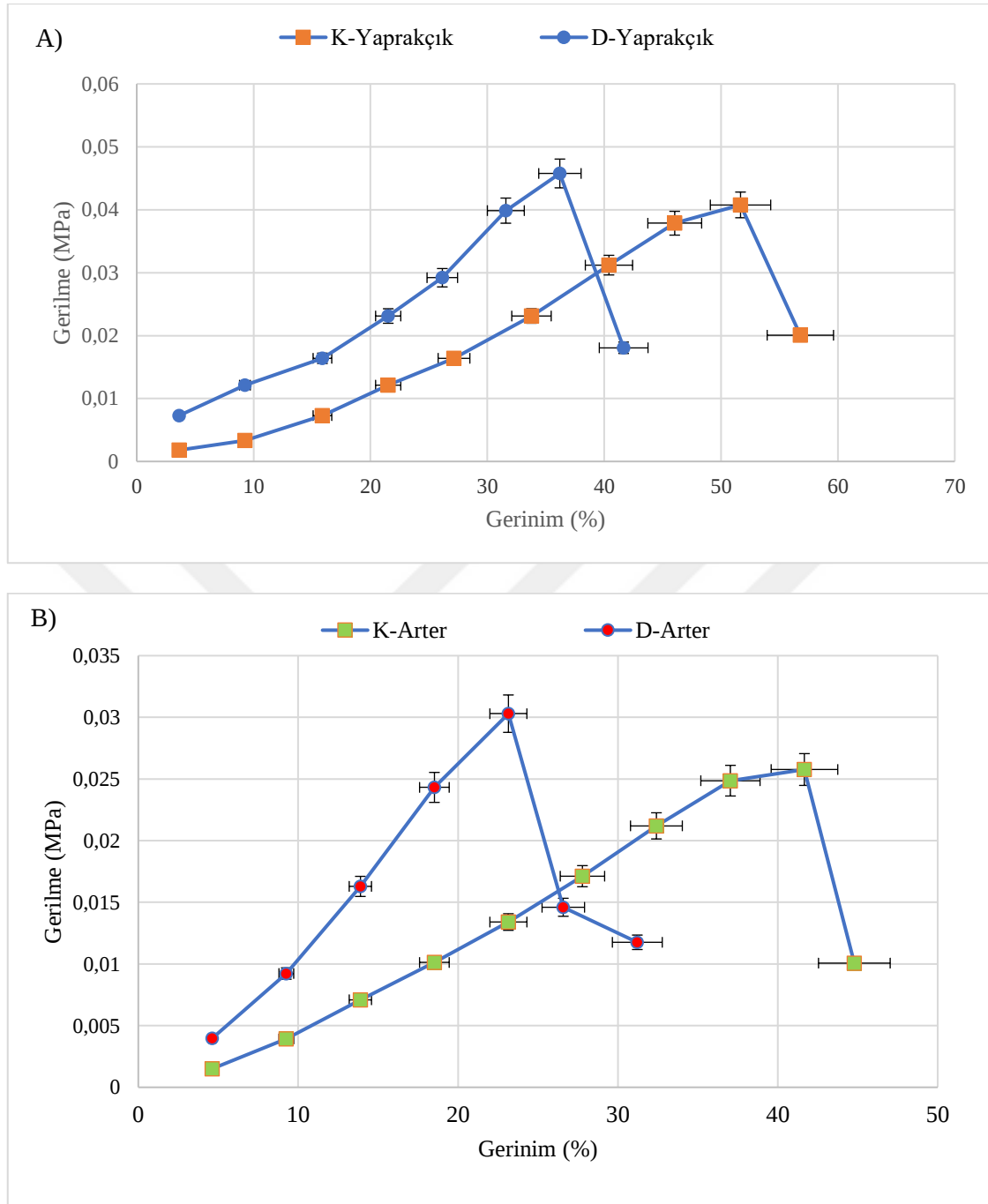
Şekil 3.6. Hücresizleştirilmiş arter duvarı örneğinin SEM mikrografı (1000X yakınlaştırma).

3.1.4. Biyomekanik karakterizasyon

Hücresizleştirme işleminin dokuların biyomekanik özellikleri üzerindeki etkisini incelemek için çekme testi yapılmış ve sonucunda elde edilen gerilme/gerinim grafiğine göre yaprakçık örneklerinin kontrol grubundaki gerilme 0,04 MPa iken gerinimi %57 düzeyinde saptanmıştır. Hücresizleştirme işleminin ardından gerilme değeri 0,046 MPa'ya yükselişi ve gerinim değerinde %42'ye bir düşüş söz konusu olmuştur. Arter duvarı örneğinde de benzer durum gözlenmiş ve kontrol grubundaki gerilme değeri 0,026 MPa ve gerinim değeri %45 iken, bu değerler hücresizleştirme işleminden sonra 0,031 MPa ve %32 olarak saptanmıştır. Dolayısıyla eğrilerden yola çıkarak hem yaprakçık hem de arter duvarı örneklerinde hücresizleştirmeye birlikte sertliğin arttığı fakat uzayabilirliğin azaldığı görülmektedir (Şekil 3.7). Bununla birlikte hücresizleştirme işlemi, nihai gerilme mukavemeti (UTS) ve elastisite modülü değerleri açısından dokular arasında istatistiksel olarak önemli bir farklılığa sebep olmamıştır.

Tablo 3.1. Doğal ve hücresizleştirilmiş kapakçık örneklerinin çekme testi sonucunda elde edilen UTS ve elastisite modülü değerleri.

Örnek	UTS (MPa)	Elastisite Modülü (MPa)
K-Yaprakçık	0,041 ± 0,02	0,0042 ± 0,0017
D-Yaprakçık	0,049 ± 0,01	0,0023 ± 0,001
K-Arter	0,033 ± 0,02	0,0037 ± 0,002
D-Arter	0,047 ± 0,015	0.011 ± 0.003

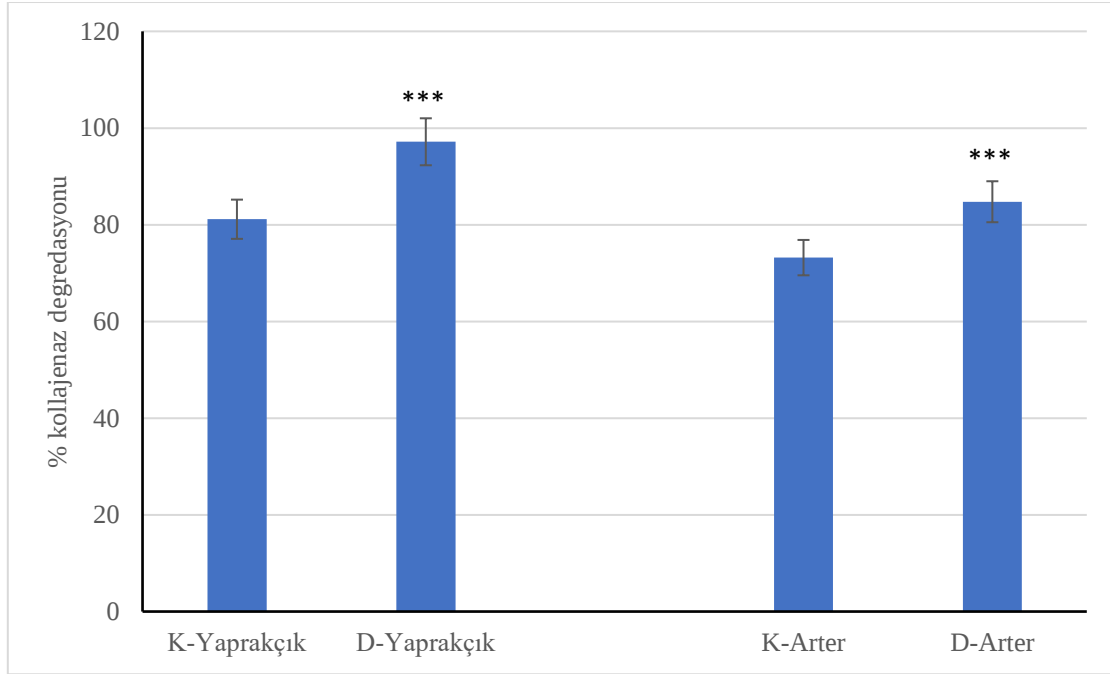


Şekil 3.7. Arter duvarı, yaprakçık örneklerine ait kontrol grubu ve hücresizleştirilmiş grubun gerilme/gerinim eğrisi grafikleri. A: Hücresizleştirilmiş ve kontrol yaprakçık örnekleri, B: Hücresizleştirilmiş ve kontrol arter duvarı örnekleri.

3.1.5. Enzimatik degradasyon

Hücresizleştirilmiş ve kontrol grubu yaprakçık/arter duvarı örneklerinin in vitro stabilitesini belirlemek için 24 saat boyunca kollajenaz enzimi ile bozunmaya maruz bırakılmıştır. Kontrol grubu yaprakçık örneklerinin bozunma oranı $81,14 \pm 2,29$ iken, yaprakçıkların hücresizleştirme sonrası bozunma oranı $97,16 \pm 2,12$ olarak belirlenmiştir.

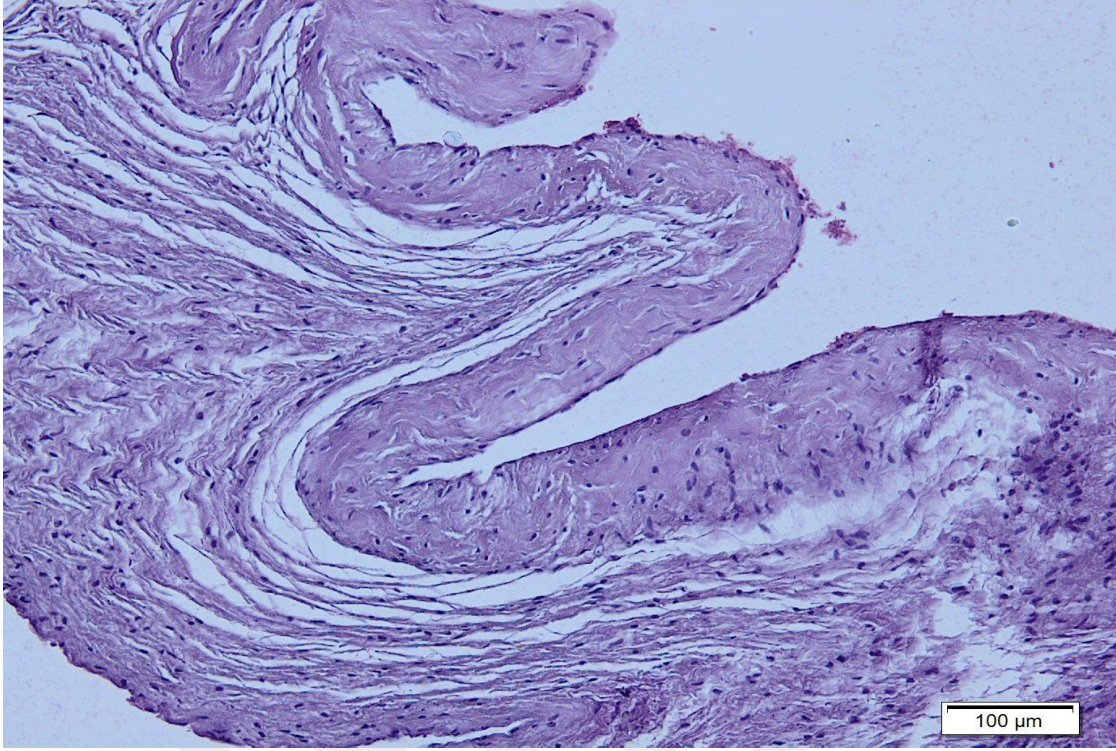
Benzer şekilde kontrol grubu arter duvarı örneğinin bozunma oranı $73,2 \pm 1,45$ iken, bu oran hücreleştirilmesinin ardından $84,76 \pm 2,02$ 'ye yükselmiştir. Hücreleştirme işlemiyle birlikte hem yaprakçık hem de arter duvarı örneklerinin *in vitro* stabilitesi kontrol grubu muadillerine kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmıştır.



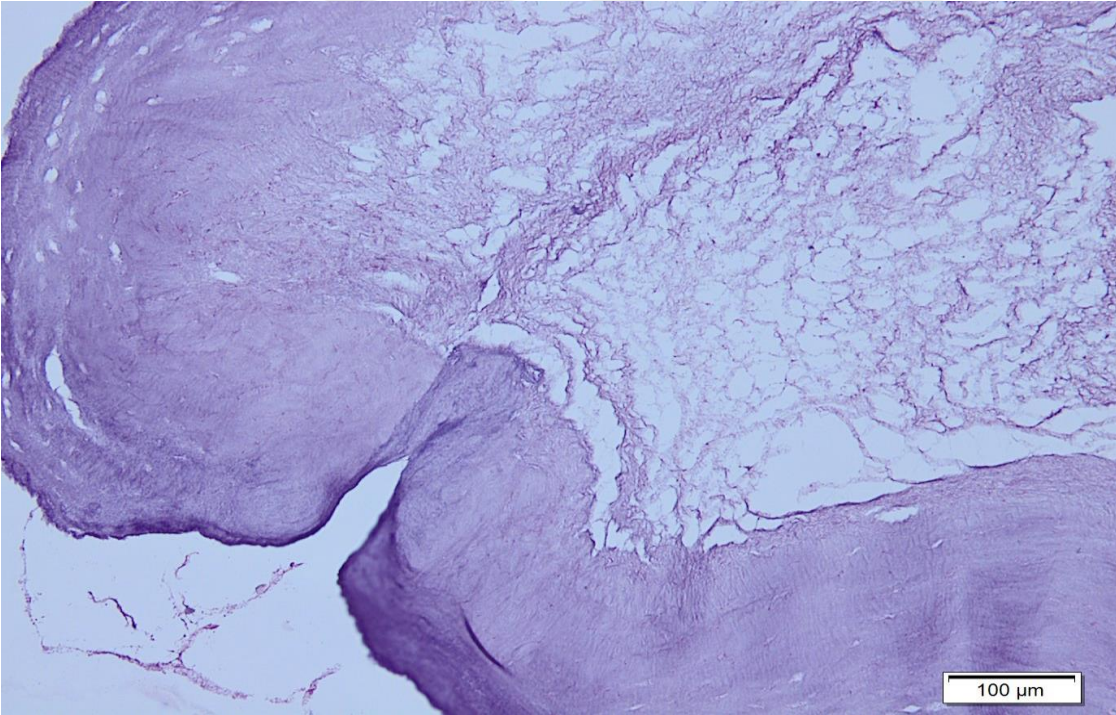
Şekil 3.8. Hücreleştirilmiş yaprakçık ve arter duvarı örneklerinin enzimatik degradasyon profillerinin kontrol grubu ile karşılaştırması (K: kontrol, D: hücreleştirilmiş, *** $p < 0,001$).

3.1.6. Histolojik karakterizasyon

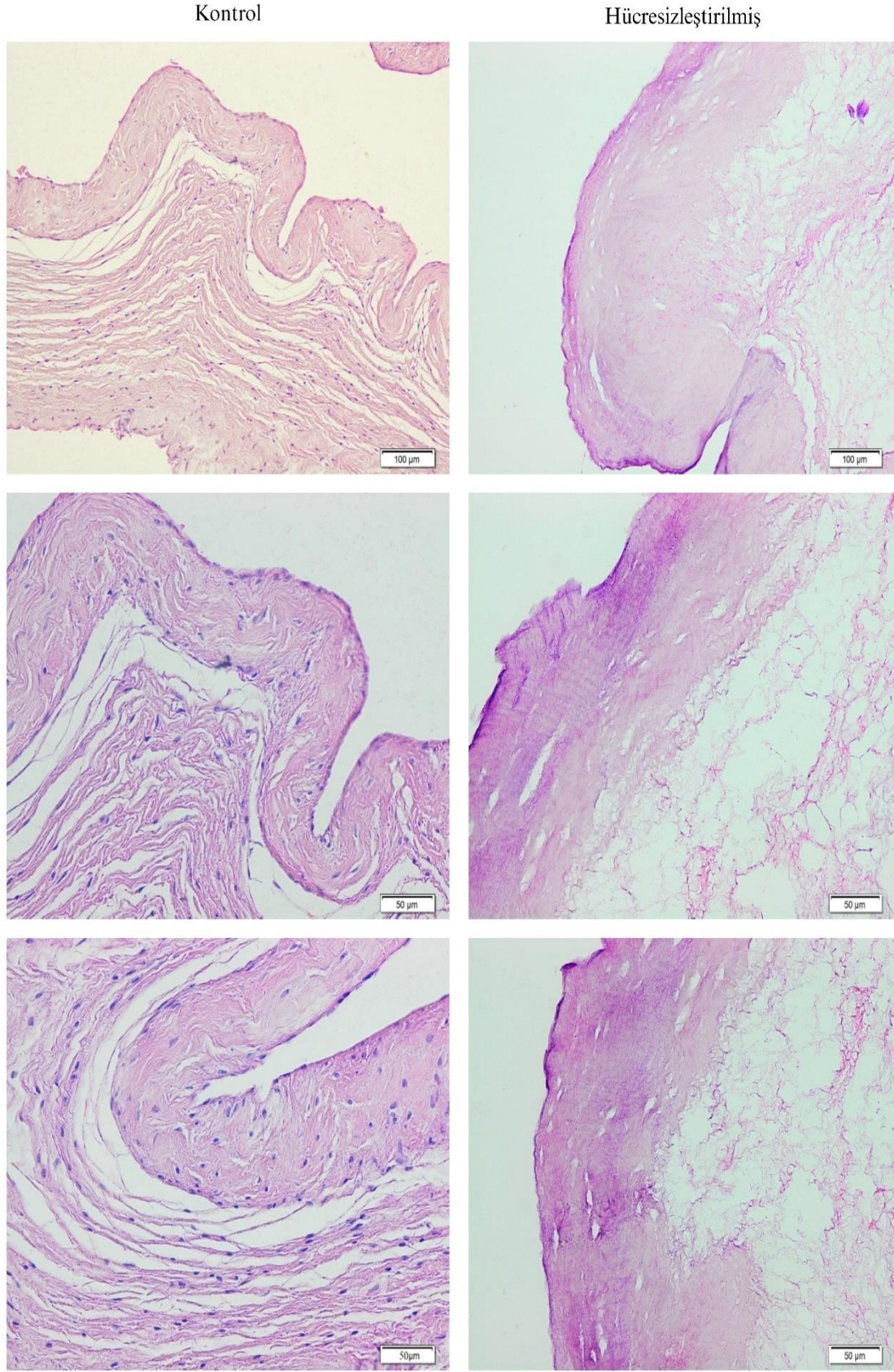
Üç katmanlı yapıdaki yaprakçıklarda hücreleştirme işlemi takiben ECM yapısında meydana gelen değişiklikler H&E ve Movat pentakrom boyama yapılarak incelenmiştir. H&E boyanmış doğal ve hücreleştirilmiş yaprakçıkların fibroza tabakasındaki kollajenin miktarı ve yöneliminde herhangi bir farklılık olmadığı gözlenmiştir (Şekil 3.11.). Kollajen fibrillerinin kıvrımlı yapısında, hücreleştirme ile birlikte bir miktar düzleşme meydana gelirken, özellikle ventrikülaris katmanında kıvrımlı kollajen fibril yapısı hala gözlenebilmektedir. Ayrıca doğal yaprakçıklarda hücre çekirdekleri siyah ile belirgin bir şekilde boyanırken, hücreleştirilmiş yaprakçıklarda herhangi bir çekirdeğe rastlanmamıştır. Arter duvarı örneklerinde de benzer sonuçlarla karşılaşılmış ve hücreleştirilmiş grupta çekirdekler gözlenmemiştir (Şekil 3.9).



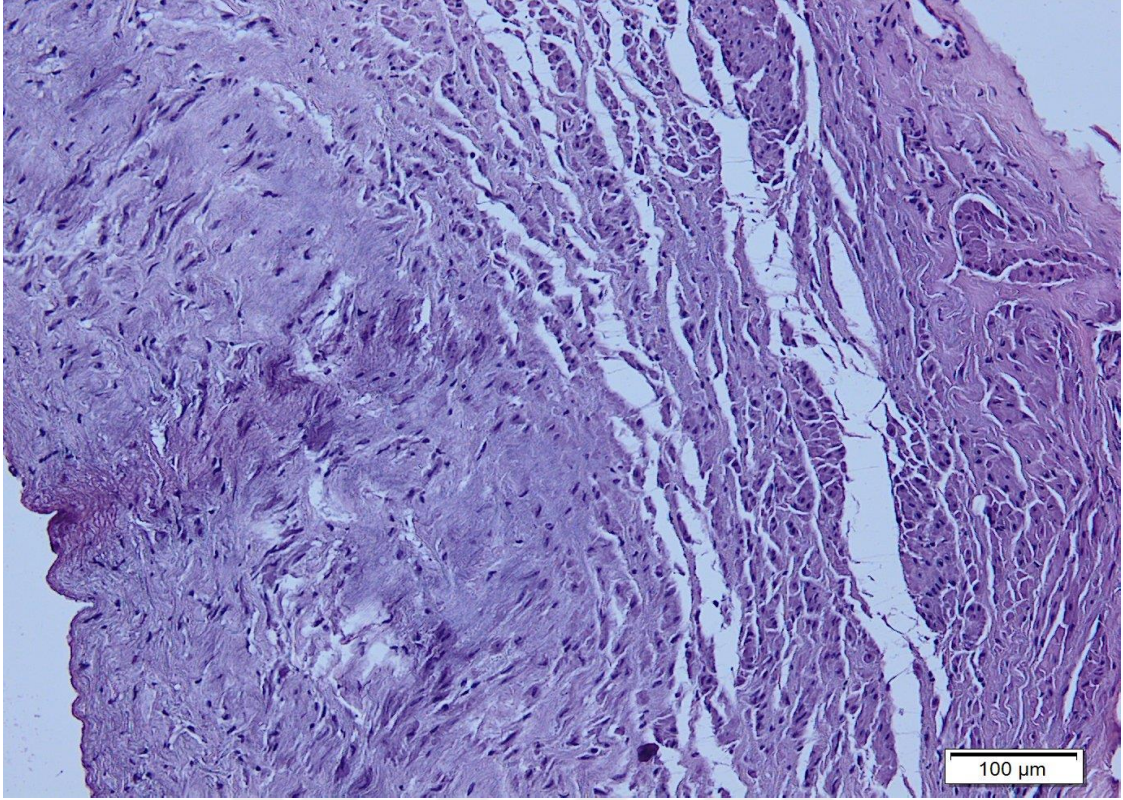
Şekil 3.9. H&E ile boyanmış doğal yaprakçık örneğinin ışık mikroskopundaki görüntüsü (20X'lik objektif).



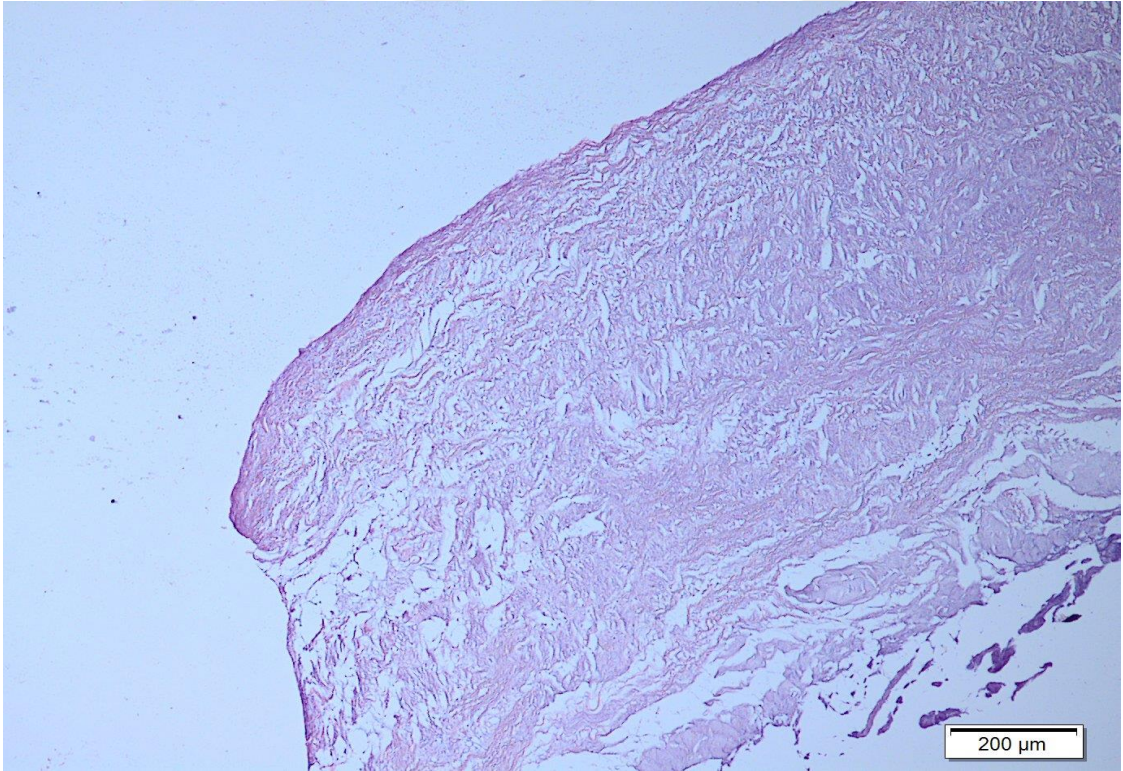
Şekil 3.10. H&E ile boyanmış hücreleştirilmiş yaprakçık örneğinin ışık mikroskopundaki görüntüsü (20X'lik objektif).



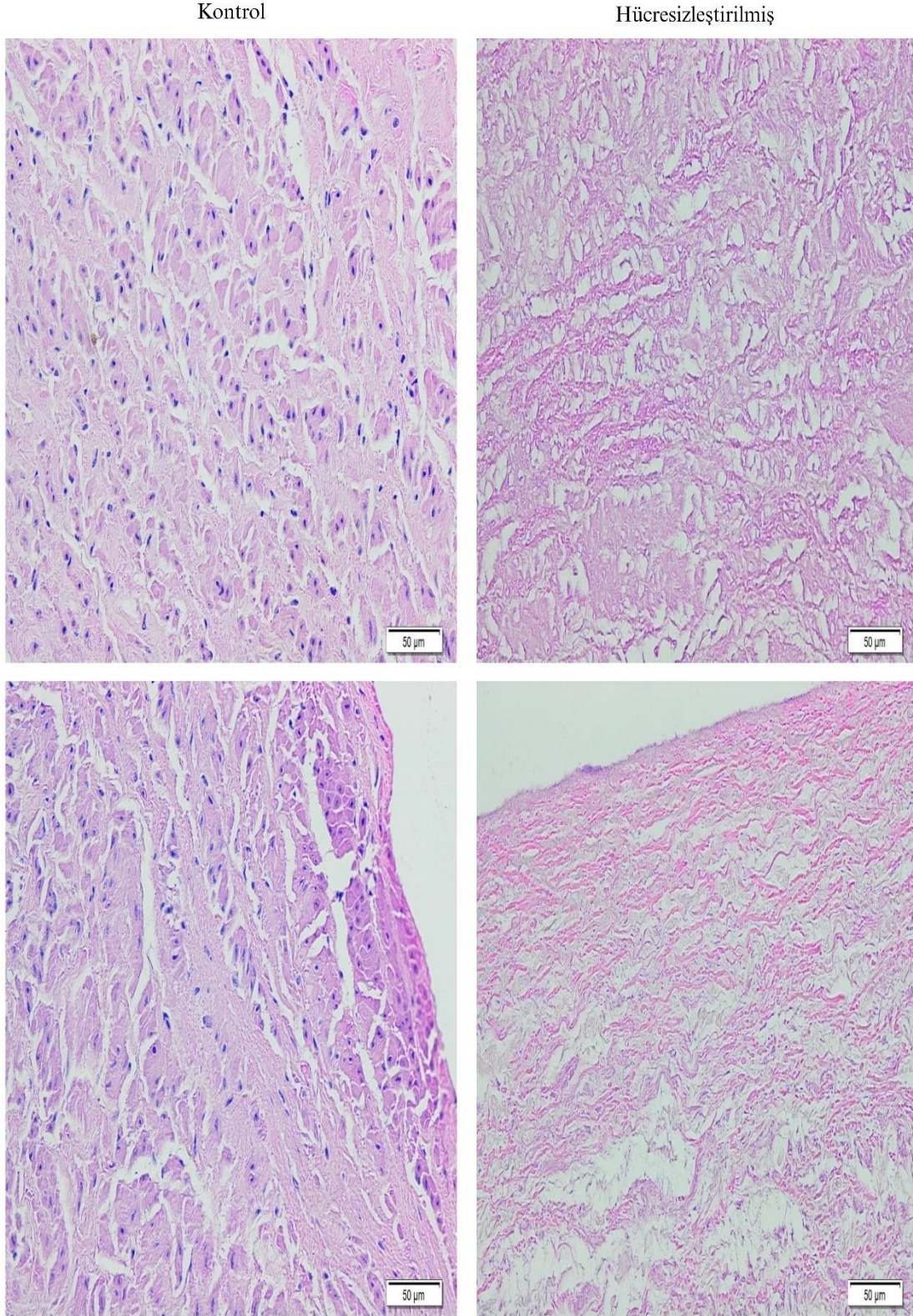
Şekil 3.11. H&E ile boyanmış yaprakçık örneklerinin farklı bölgelerden çekilmiş görüntüleri.



Şekil 3.12. H&E ile boyanmış doğal arter duvarı örneğinin ışık mikroskopundaki görüntüsü (20X'lik objektif).



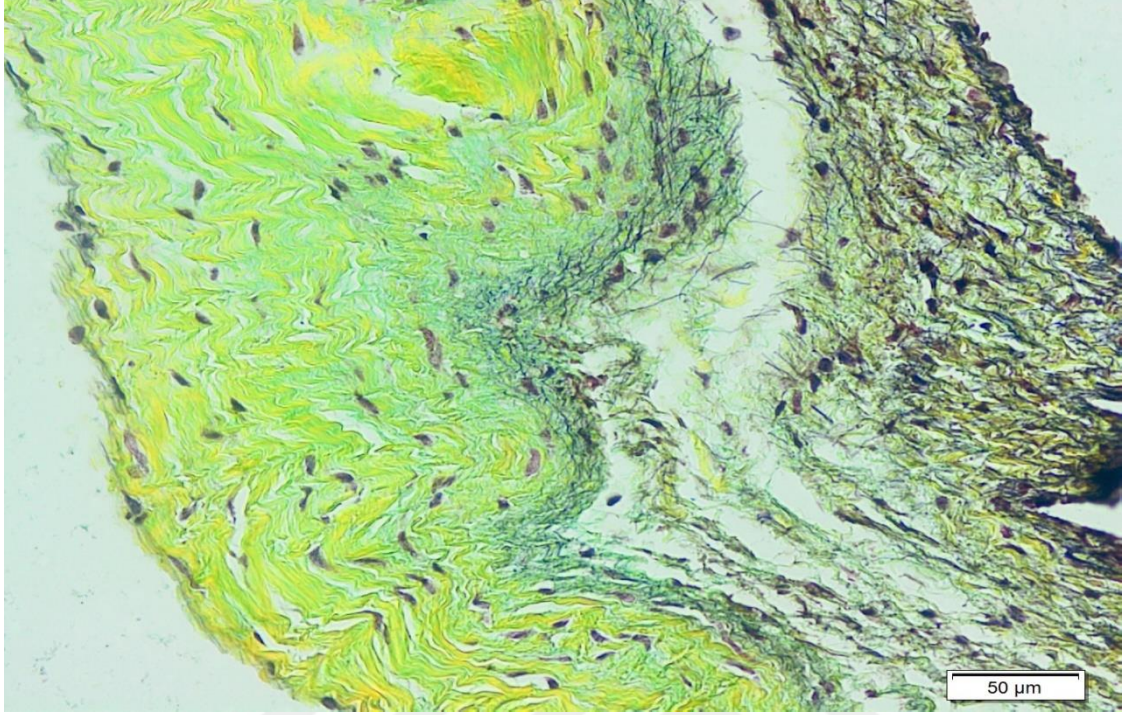
Şekil 3.13. H&E ile boyanmış hücresizleştirilmiş arter duvarı örneğinin ışık mikroskopundaki görüntüsü (10X'lik objektif).



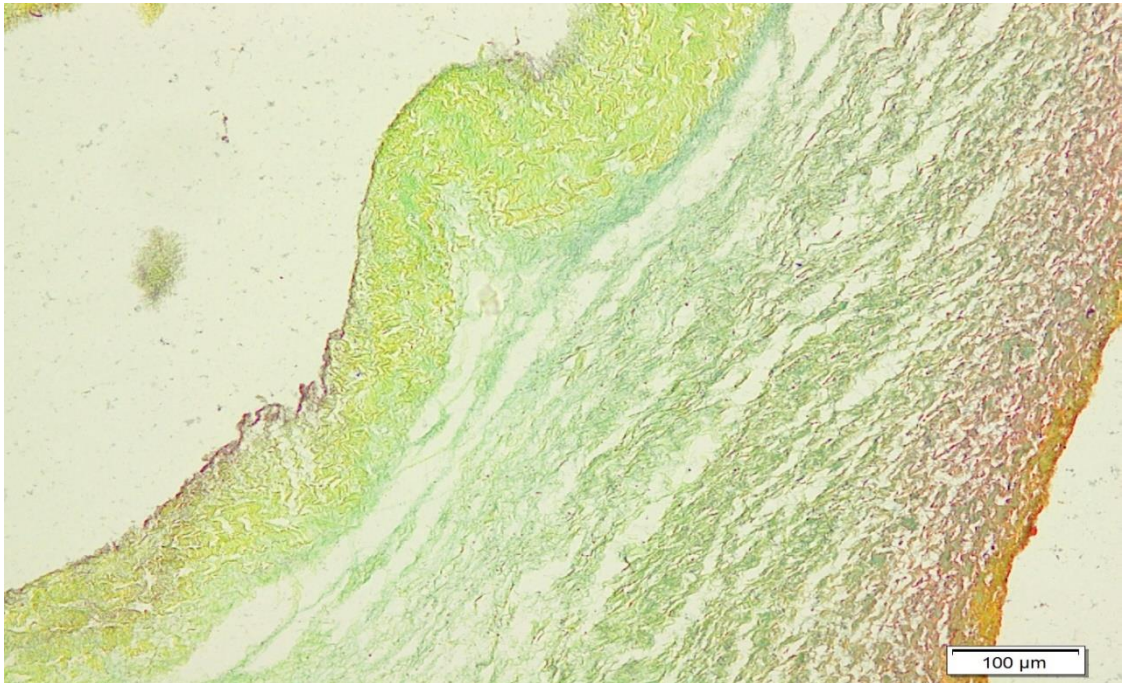
Şekil 3.14. H&E ile boyanmış arter duvarı örneklerinin farklı bölgelerden çekilmiş görüntüleri.

Hücresizleştirme sonrası Movat pentakrom ile boyanan yaprakçıkların üç katmanında kollajen dizilişi ve miktarı açısından doğal grupla karşılaştırıldığında anlamlı bir fark

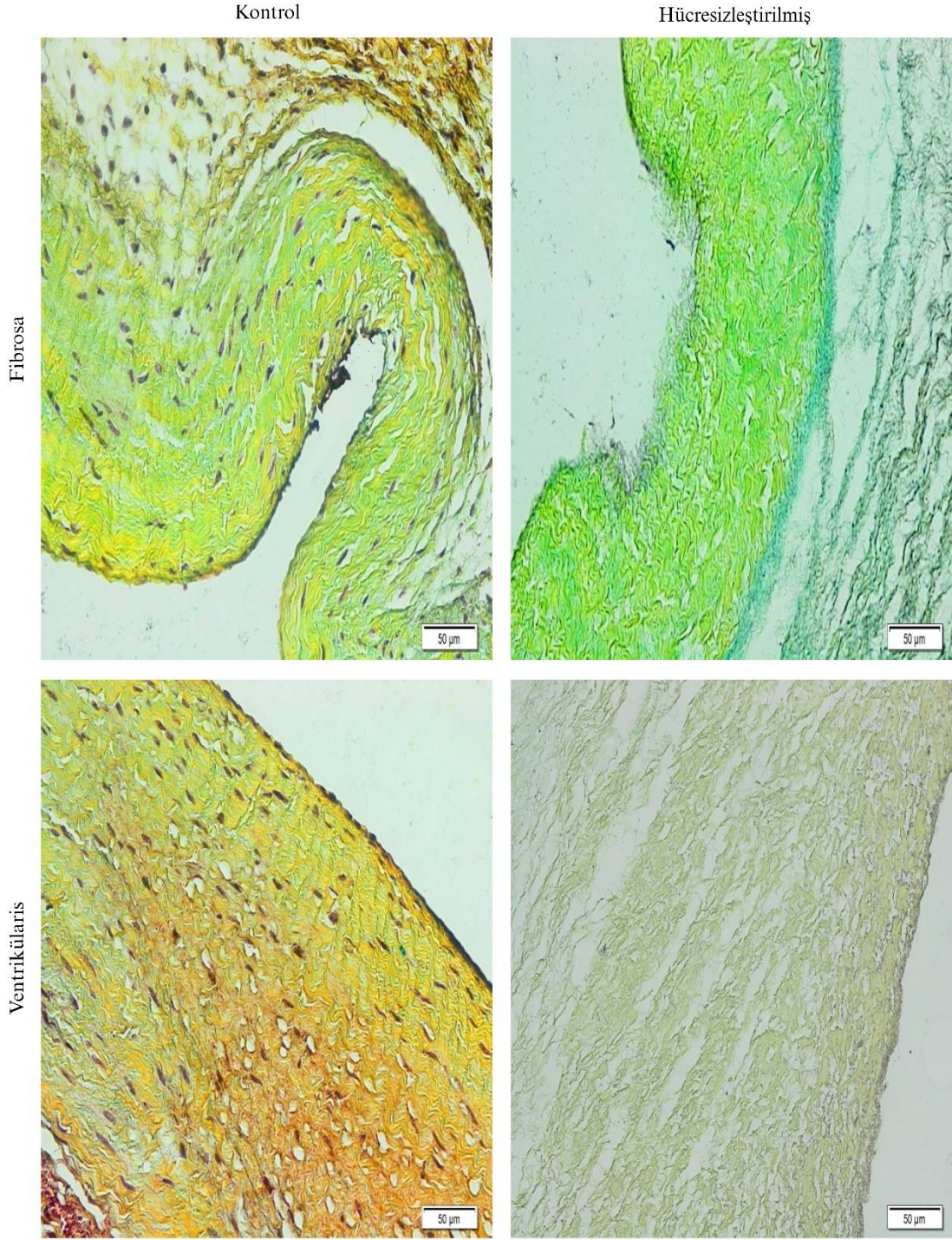
gözenmemiştir (Şekil 3.17). Bu boya ile boyanmış preparatlarda kollajen fibrillerinin kıvrımlı yapısının hücresizleştirmeden sonra korunduğu da görülmektedir.



Şekil 3.15. Movat pentakrom ile boyanmış doğal yaprakçık örneğinin ışık mikroskopundaki görüntüsü (40X'lik objektif).

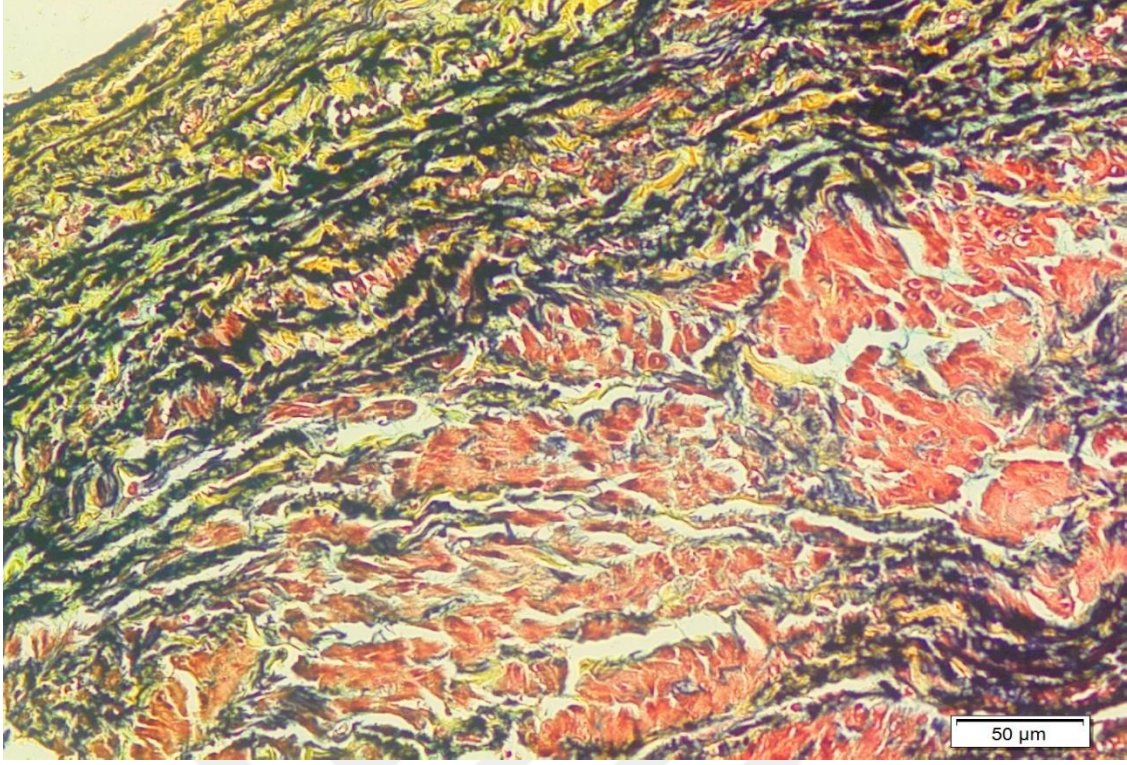


Şekil 3.16. Movat pentakrom ile boyanmış hücresizleştirilmiş yaprakçık örneğinin ışık mikroskopundaki görüntüsü (20X'lik objektif).

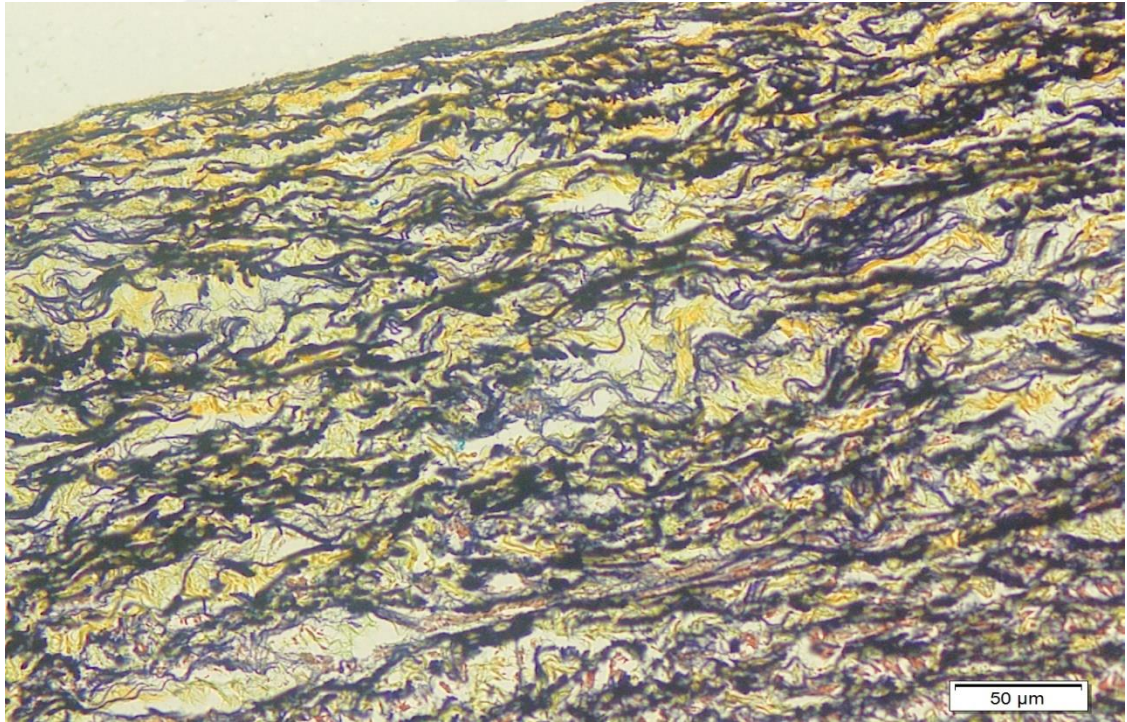


Şekil 3.17. Movat pentakrom ile boyanmış yaprakçık örneklerinin farklı bölgelerden çekilmiş görüntüleri.

Arter duvarı örneklerinde de yoğun bulunan ve siyaha boyanmış elastinlerin miktarının ve yapısının hücresizleştirme işleminden olumsuz yönde etkilenmediği görülmüştür (Şekil 3.19).

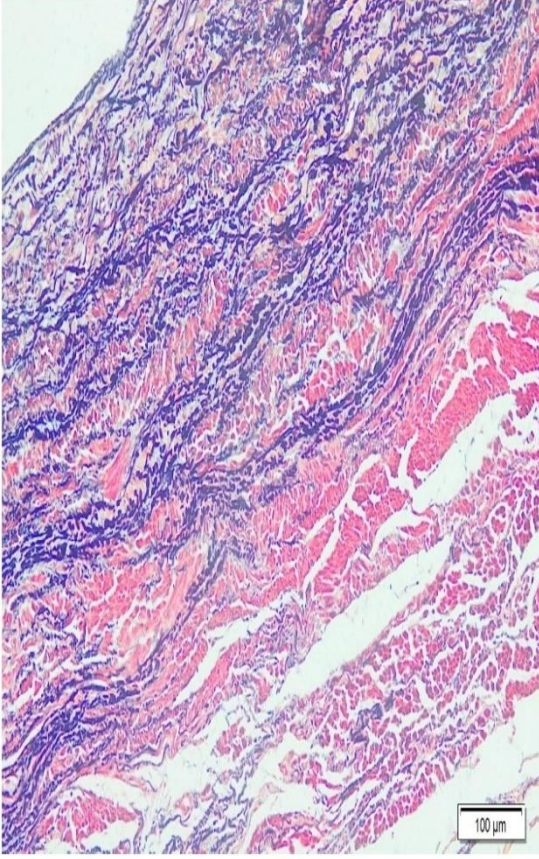


Şekil 3.18. Movat pentakrom ile boyanmış doğal arter duvarı örneğinin ışık mikroskopundaki görüntüsü (40X'lik objektif).

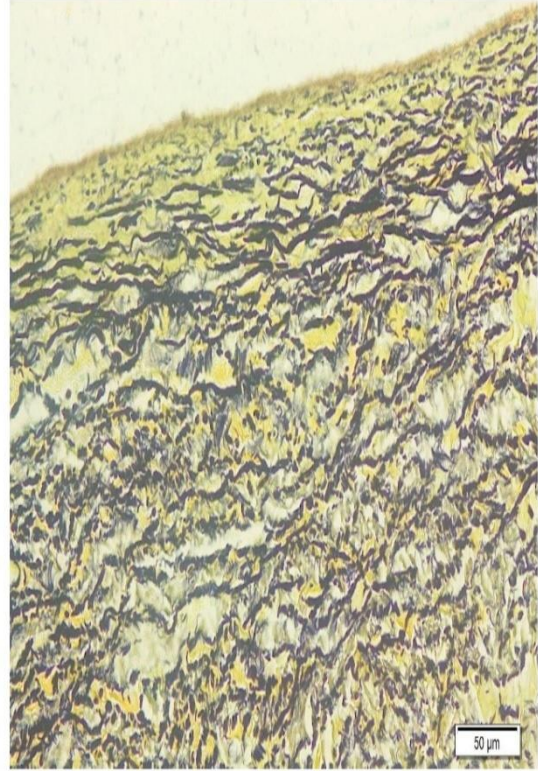
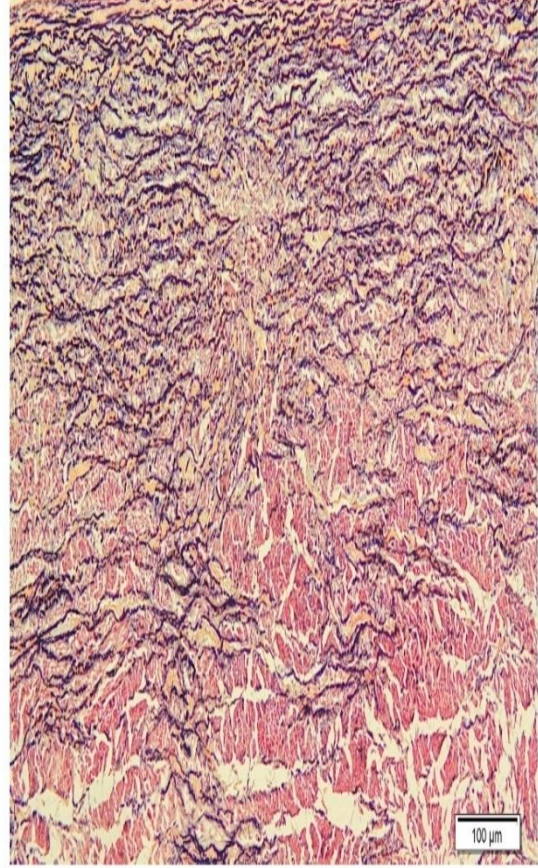


Şekil 3.19. Movat pentakrom ile boyanmış hücresizleştirilmiş arter duvarı örneğinin ışık mikroskopundaki görüntüsü (40X'lik objektif).

Kontrol



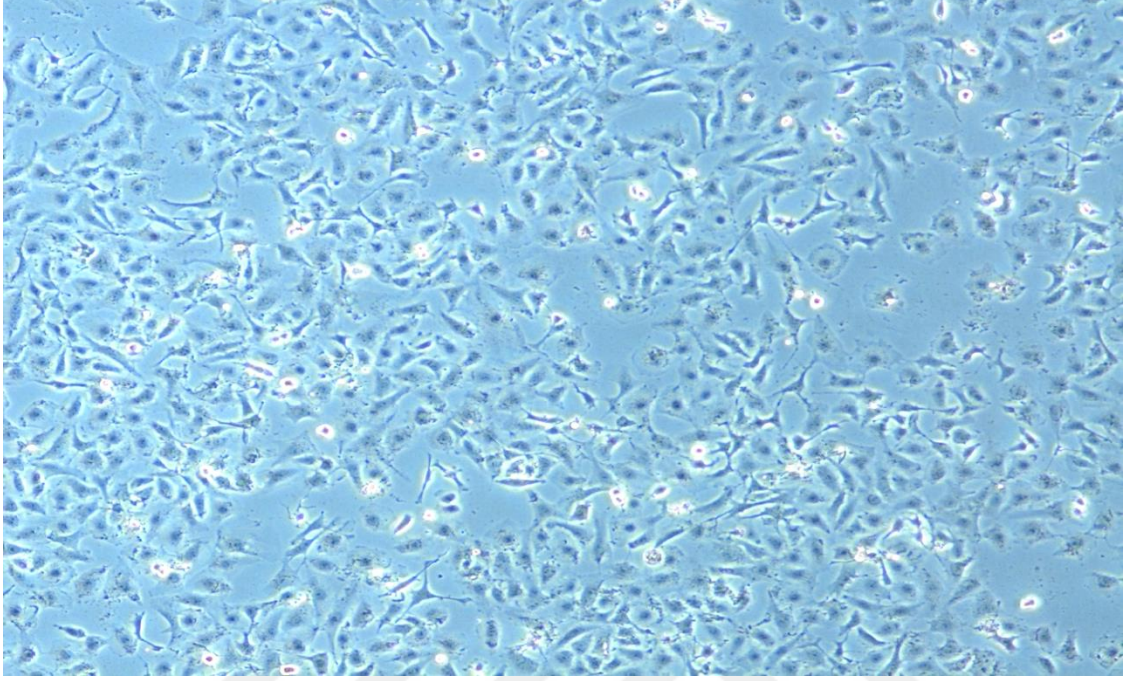
Hücresizleştirilmiş



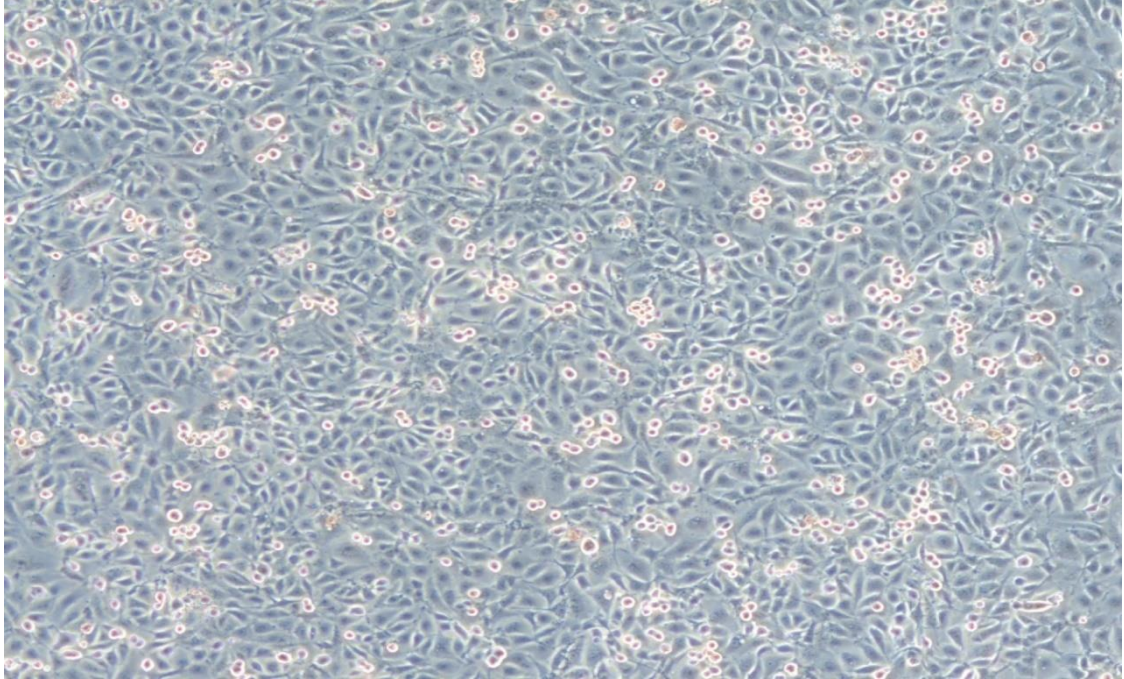
Şekil 3.20. Movat pentakrom ile boyanmış arter duvarı örneklerinin farklı bölgelerden çekilmiş görüntüleri.

3.2. Hücre Kültürü

HUVEC hücreleri kültüre başladıktan 4 gün sonra %80 yoğunluğa ulaşmıştır (Şekil 3.22.).

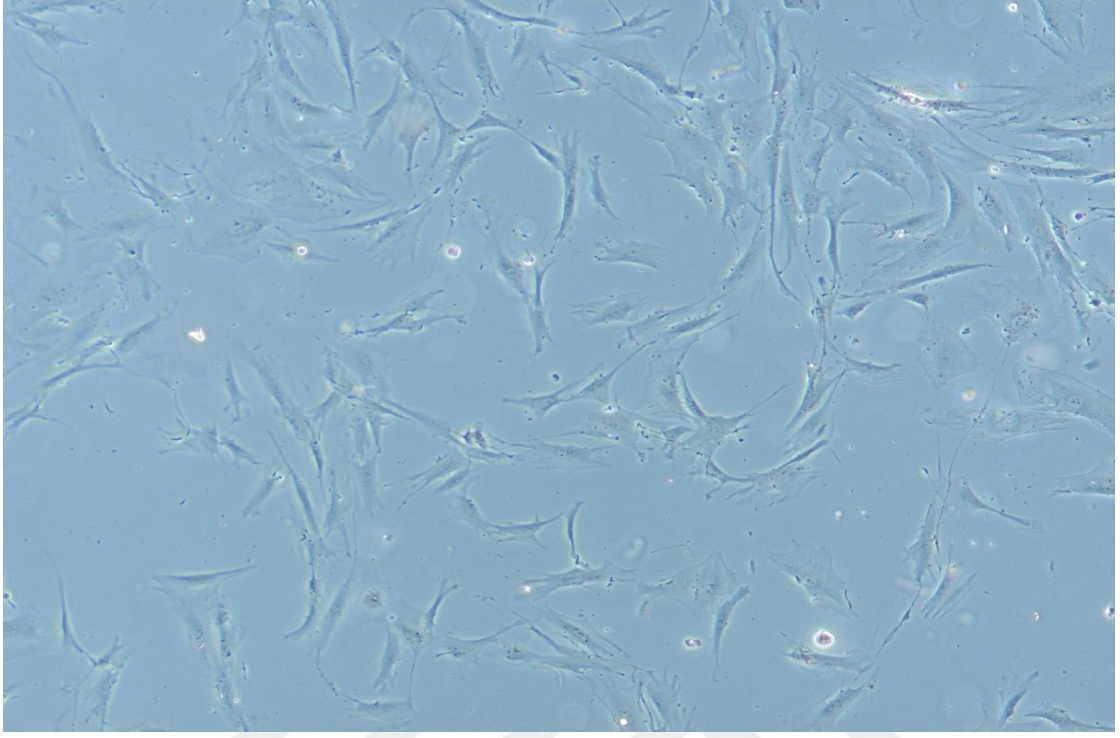


Şekil 3.21. HUVEC'lerin 2 günlük kültüründen sonraki inverted mikroskop ile alınan görüntüsü (10X'lik objektif).

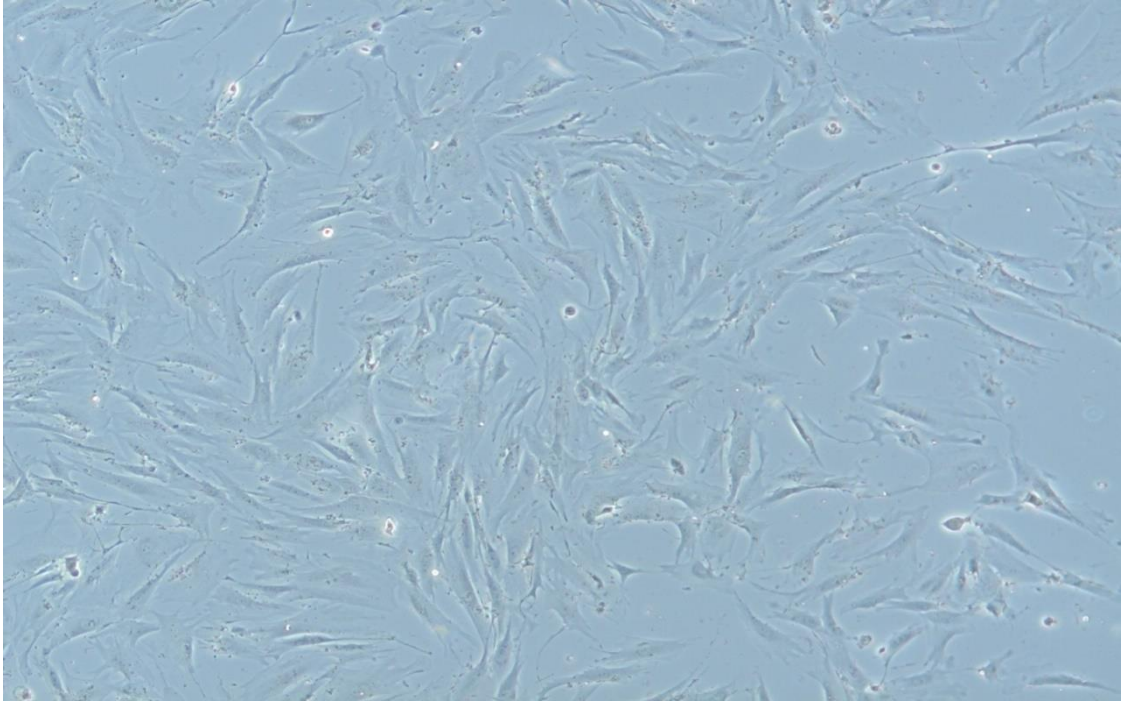


Şekil 3.22. HUVEC'lerin 4 günlük kültüründen sonraki inverted mikroskop ile alınan görüntüsü (10X'lik objektif).

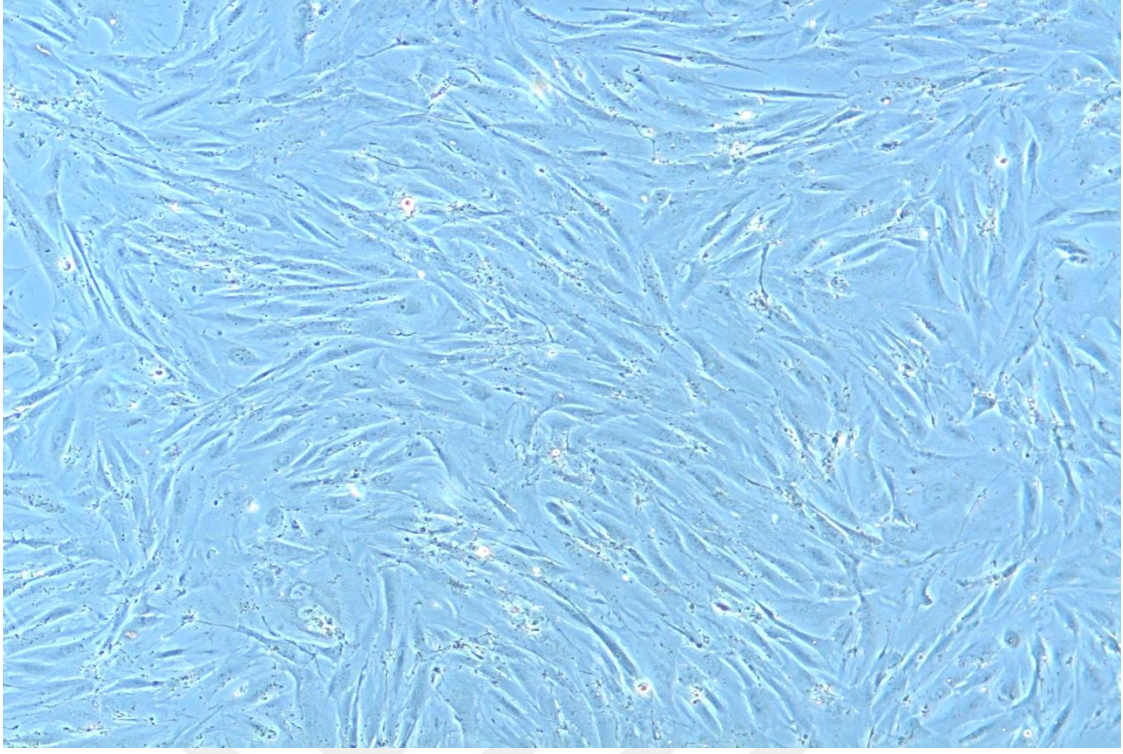
Fibroblast hücrelerinin %80 yoğunluğa ulaşmaları HUVEC'lere göre daha uzun sürmüş ve yaklaşık 3 haftalık bir kültür süreci gerektirmiştir (Şekil 3.25).



Şekil 3.23. Fibroblast hücrelerinin 7 günlük kültüründen sonraki inverted mikroskop ile alınan görüntüsü (10X'lik objektif).



Şekil 3.24. Fibroblast hücrelerinin 15 günlük kültüründen sonraki inverted mikroskop ile alınan görüntüsü (10X'lik objektif).

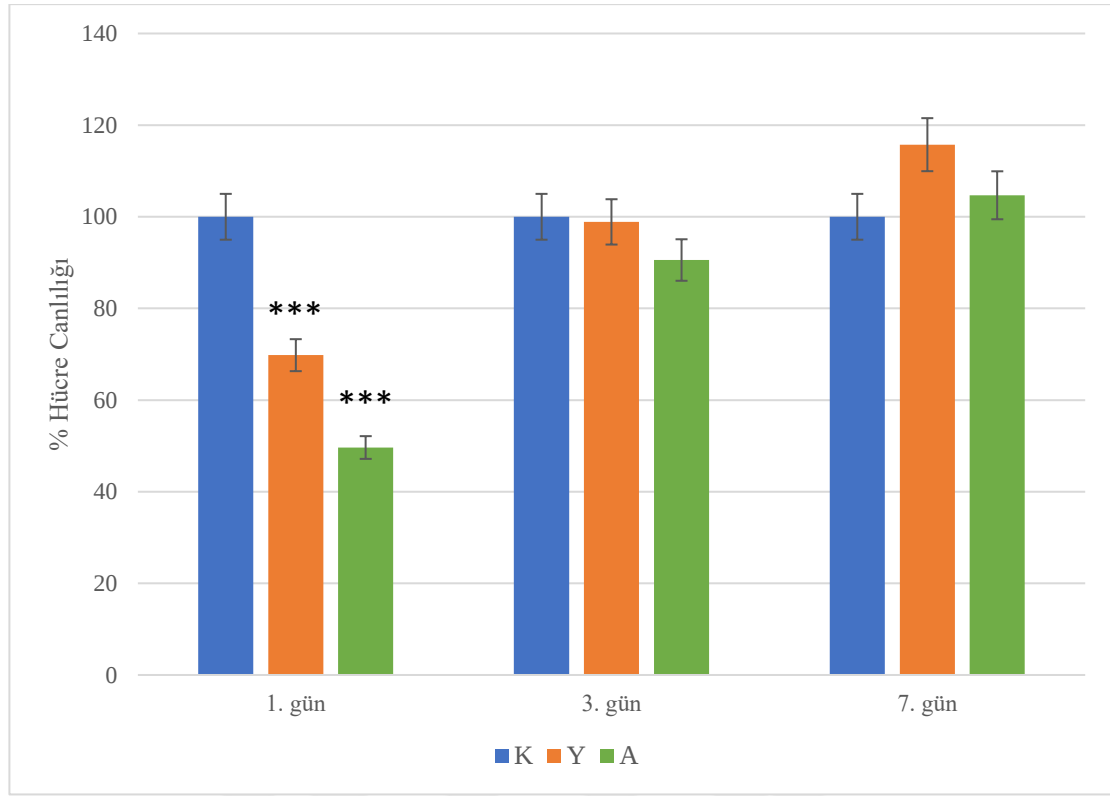


Şekil 3.25. Fibroblast hücrelerinin 21 günlük kültüründen sonraki inverted mikroskop ile alınan görüntüsü (10X'lik objektif).

3.3. Yeniden Hücrelendirilen İskelelerin Karakterizasyonu

3.3.1. MTT analizi

Hücreleştirilmiş yaprakçık ve arter duvarı üzerine ekilen hücrelerin proliferasyonunu ve olası sitotoksiteyi belirlemek için MTT analizi yapılmıştır. Kontrol grubu olarak 96 kuyucuklu plakaya ekilen hücreler kullanılmıştır. Analiz verilerine göre ekimden 1 gün sonra canlı hücre yoğunluğunun en çok olduğu grup kontrol grubu iken, hücreleştirilmiş arter duvarı örneklerine ekilen hücrelerin canlılığı kontrol grubunun yaklaşık %50'si, hücreleştirilmiş yaprakçık örneklerine ekilen hücrelerin canlılığı kontrol grubunun yaklaşık %70'i düzeyindedir. Ekimden 3 gün sonra kontrol grubuna kıyasla hücre canlılığı arter duvarı örneklerinde %90'a, yaprakçık örneklerinde ise yaklaşık %98'e ulaşmıştır. 7. günde ise hücre canlılığı en yüksek olan grup neredeyse %115'lik bir oranla yaprakçık örnekleri olurken arter duvarlarındaki hücre canlılığı yaklaşık %105'lik bir oranla kontrol grubundan daha yüksek bir metabolik aktivite sergilemiştir (Şekil 3.26).

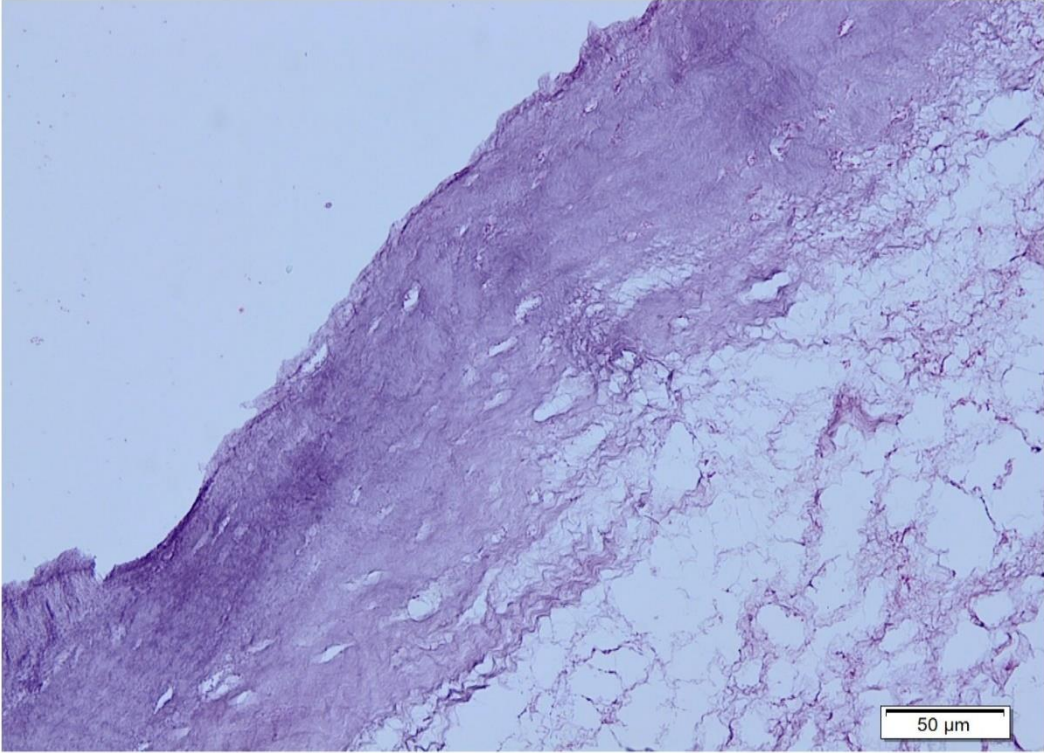


Şekil 3.26. Yeniden hücrelendirilmiş kapakçık dokularının MTT analizi sonuçları (K: kontrol, Y: yaprakçık, A: arter duvarı).

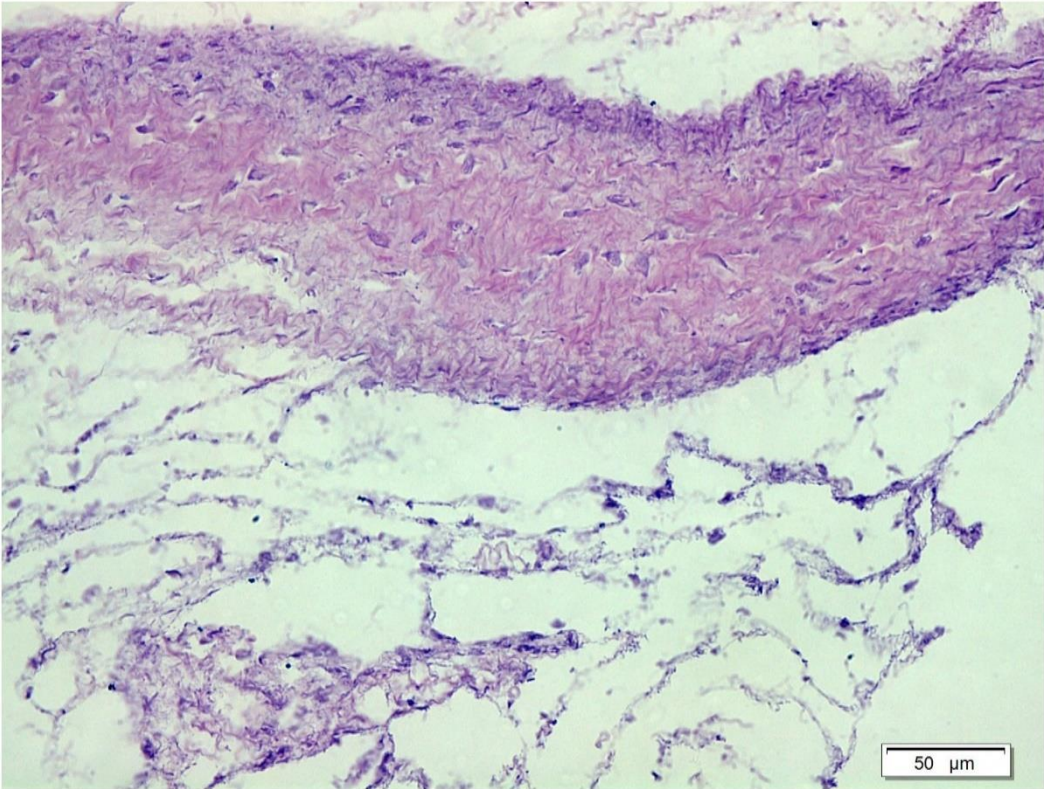
3.3.2. Histolojik karakterizasyon

Yeniden hücrelendirme sonrası arter duvarı ve yaprakçıklardaki hücre adezyonunu belirlemek amacıyla H&E boyama yapılmıştır. Yaprakçık örneklerinin görüntülerinde fibroza ve ventrikülaris tabakasında konumlanmış hücre çekirdekleri görünmektedir (Şekil 3.27 ve 3.28).

Hücresizleştirilmiş

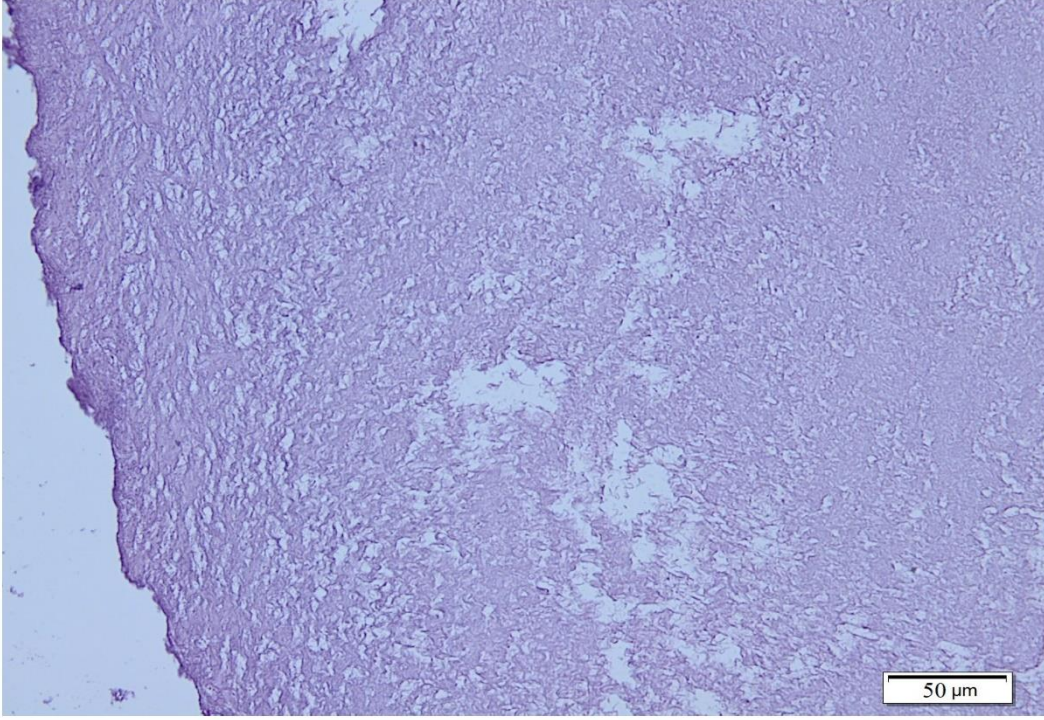


Yeniden hücrelendirilmiş

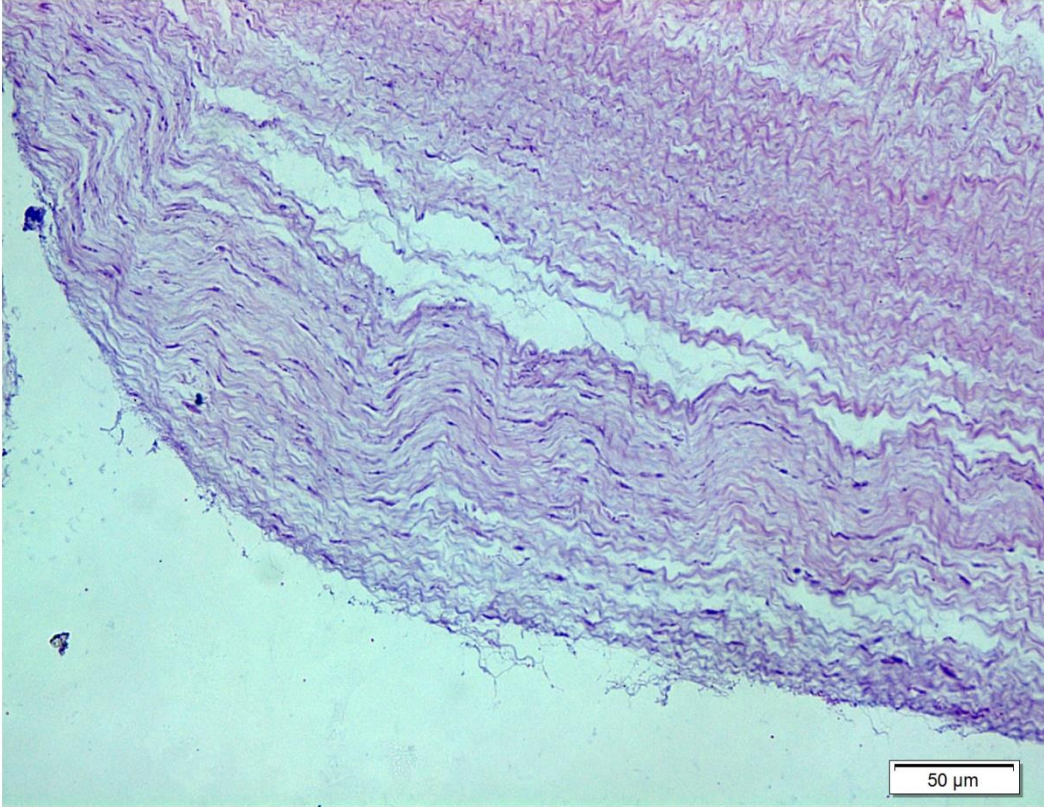


Şekil 3.27. H&E ile boyanmış yeniden hücrelendirilmiş yaprakçık örneğinin fibroza tabakasında konumlanmış hücrelerin ışık mikroskopundaki görüntüsü (40X'lik objektif).

Hücresizleştirilmiş



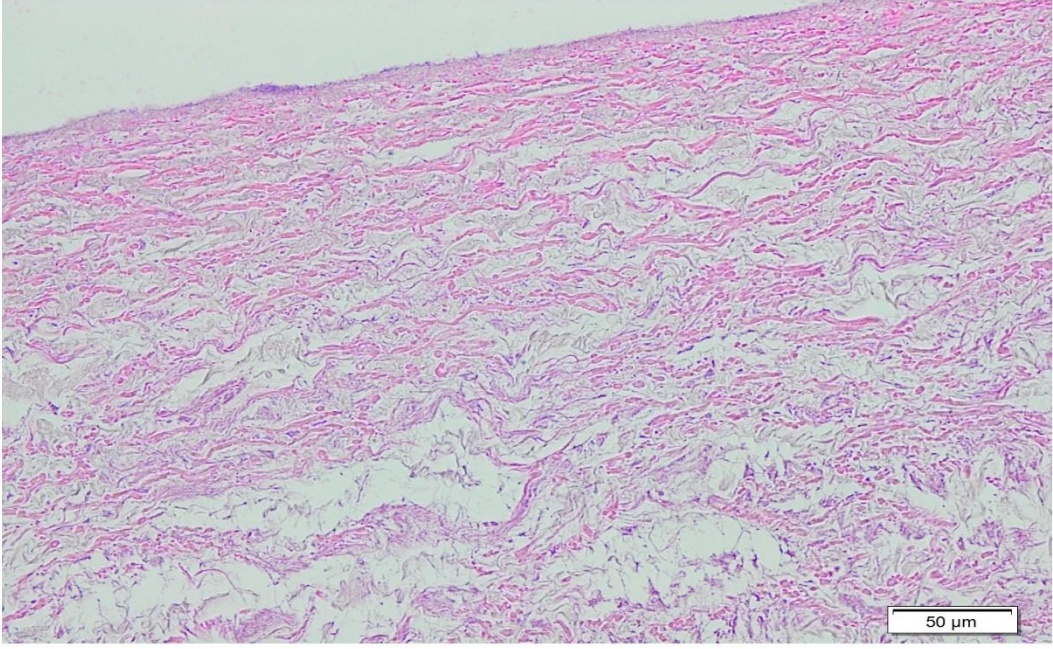
Yeniden hücrelendirilmiş



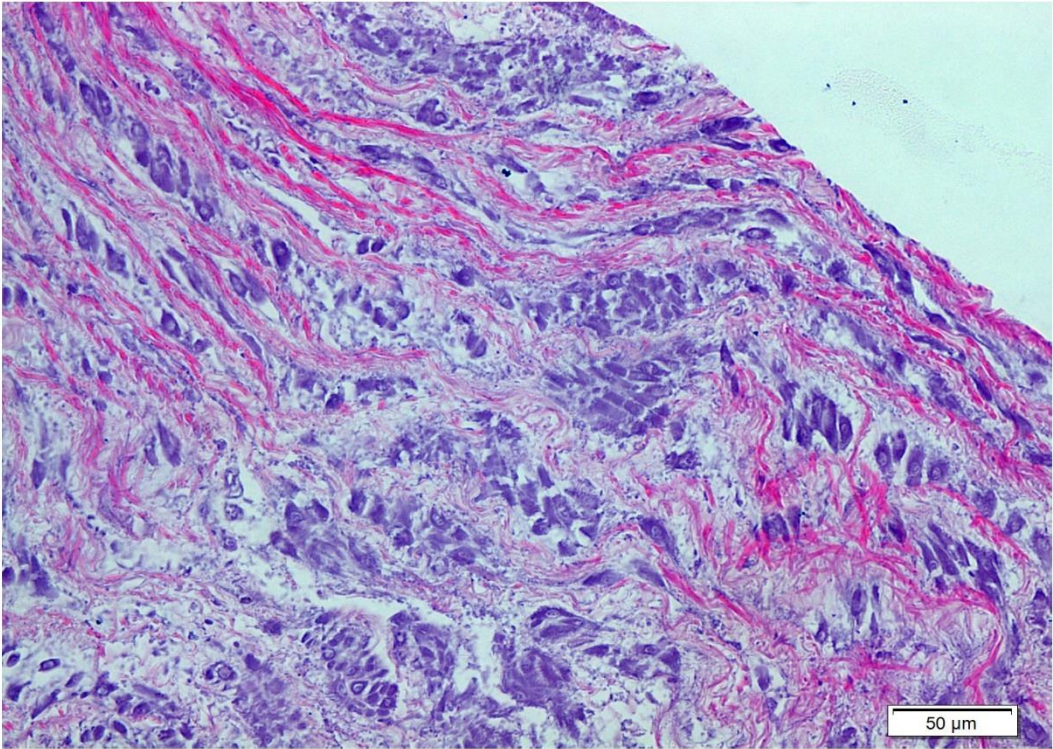
Şekil 3.28. H&E ile boyanmış yeniden hücrelendirilmiş yaprakçık örneğinin ventrikülaris tabakasında konumlanmış hücrelerin ışık mikroskopundaki görüntüsü (40X'lik objektif).

Arter duvarı örneklerinde de yoğun bir şekilde geniş alana yayılmış hücre çekirdekleri görünmektedir.

Hücresizleştirilmiş



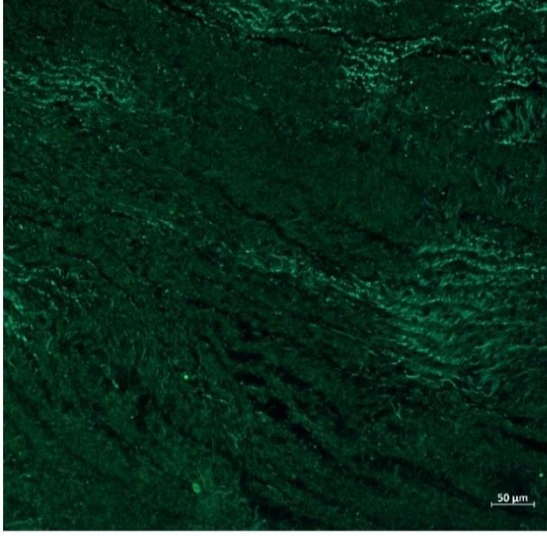
Yeniden hücrelendirilmiş



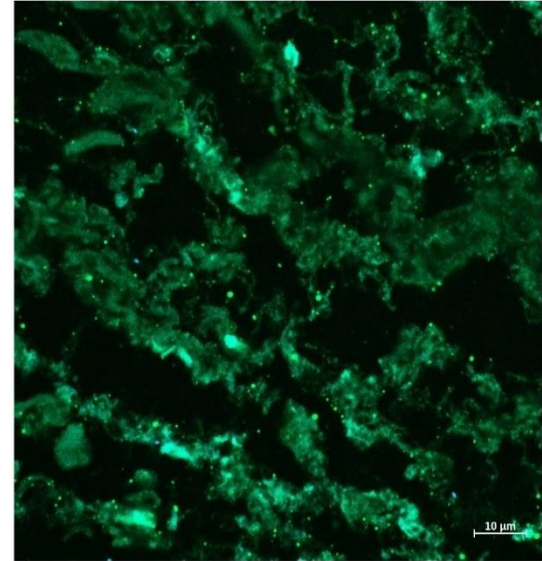
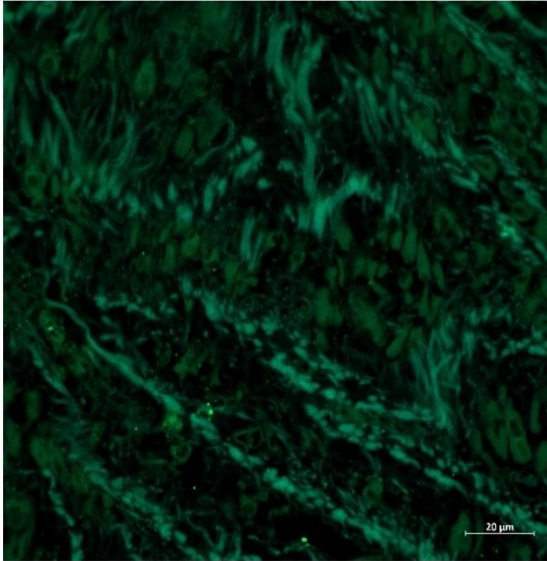
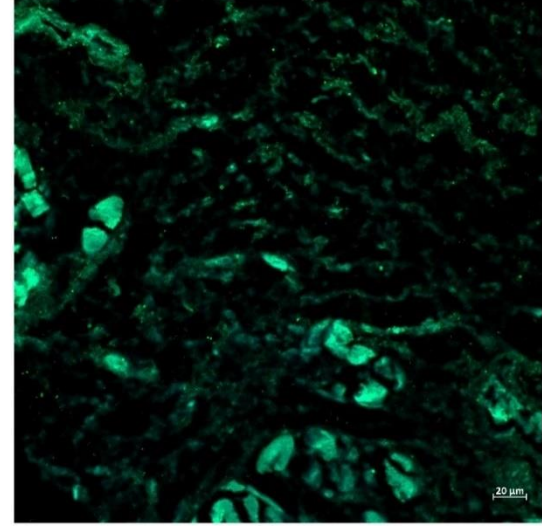
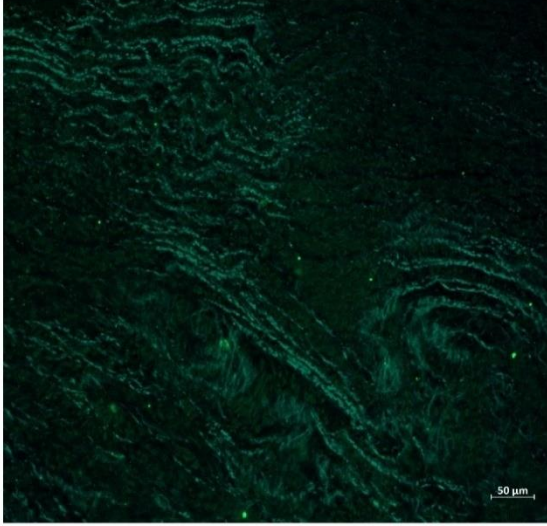
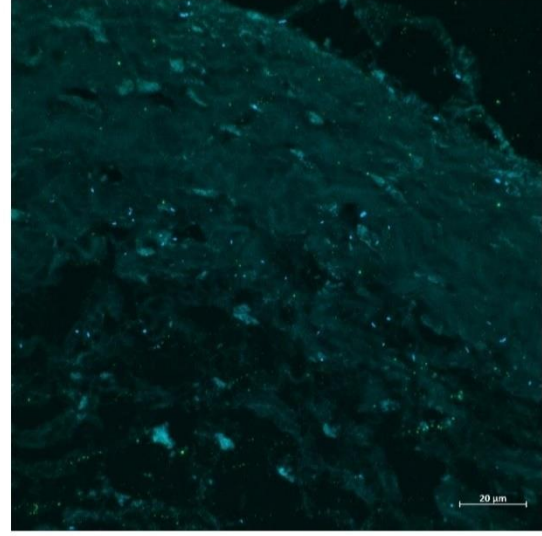
Şekil 3.29. H&E ile boyanmış yeniden hücrelendirilmiş arter duvarı örneğinin ışık mikroskopundaki görüntüsü (40X’lik objektif).

DAPI/Phalloidin ile floresan olarak boyanan örneklerde, özellikle arter duvarı örneklerinin iç katmanlarına kadar fibroblast hücrelerinin sızdığı net bir şekilde görülürken, yaprakçık örneklerindeki yeniden hücrelenme arter duvarı örneklerine göre çok düşük seviyede ve yaprakçık yüzeyine yakın bölgelerle sınırlı kalmıştır (Şekil 3.30).

Arter Duvarı



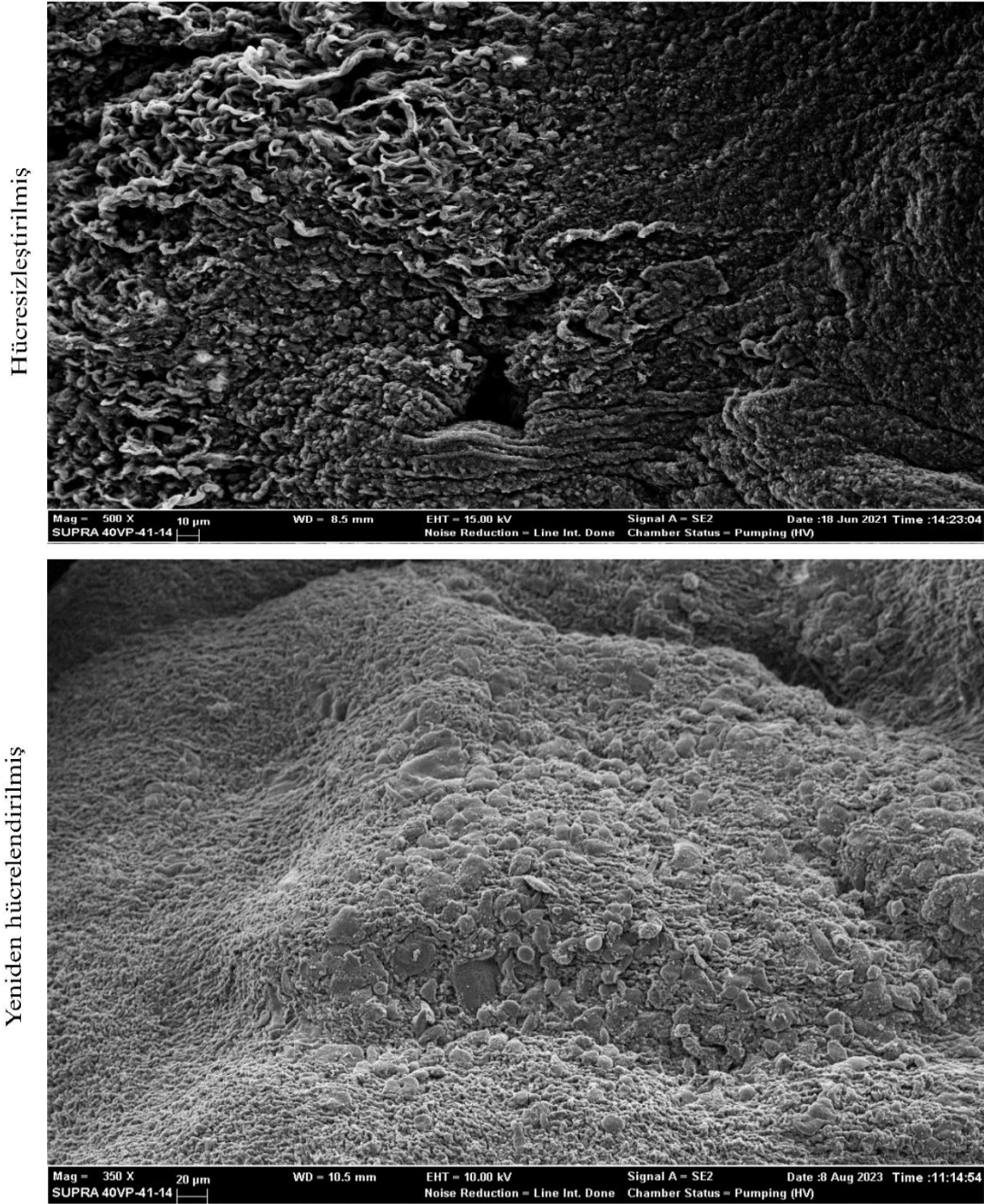
Yaprakçık



Şekil 3.30. DAPI/Falloidin floresan boyalar ile boyanmış yeniden hücrelendirilmiş arter duvarı ve yaprakçık örneklerinin konfokal mikroskop görüntüsü.

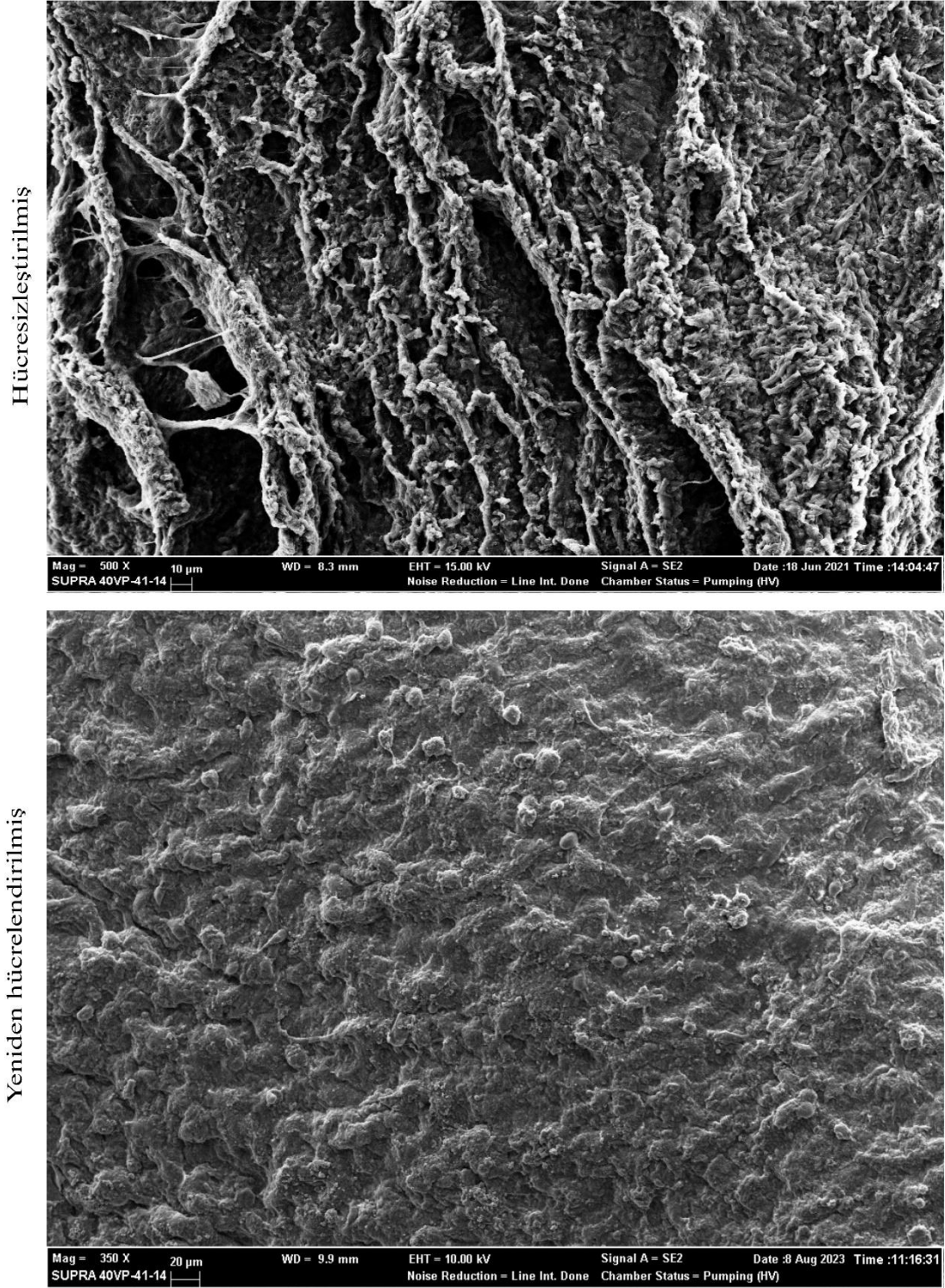
3.3.3. SEM görüntüleme

Yeniden hücrelendirme sonrası arter duvarı ve yaprakçıklardaki hücre adezyonunu ve endotelizasyonu belirlemek amacıyla SEM görüntüleri çekilmiştir. Yaprakçık örneklerinin yüzeyinde HUVEC hücreleri net bir şekilde görünmekle birlikte 7 günlük kültürde endotelizasyon bütünüyle sağlanamasa da hücrelerin tutunduğu bölgelerde tek katlı endotelyum oluşmaya başlamıştır (Şekil 3.31).



Şekil 3.31. Yeniden hücrelendirilmiş yaprakçık örneğinin SEM mikrografı (350X yakınlaştırma).

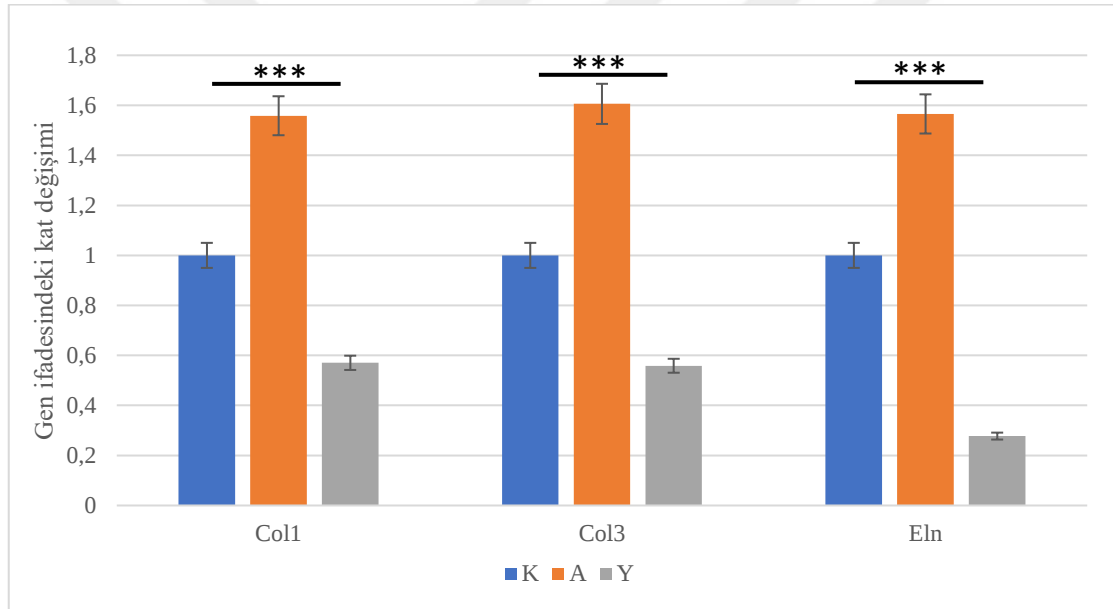
Arter duvarı örneklerinde ise HUVEC'lerin daha geniş alana yayılımı ve tek katlı endotelyumun daha büyük boyutlarda, yaprakçık örneklerine göre daha kesintisiz olduğu görülmektedir (Şekil 3.32).



Şekil 3.32. Yeniden hücrelendirilmiş arter duvarı örneğinin SEM mikrofrafı (350X yakınlaştırma).

3.3.4. Temel ECM proteinlerinin gen ifadeleri

Yeniden hücrelendirilmiş yaprakçık ve arter duvarı örneklerinde yeni ECM sentezini belirleyebilmek için, temel ECM proteinlerini ifade eden genlerin ifade oranları Real Time PCR ile belirlenmiştir (Şekil 3.33). Elde edilen sonuçlara göre arter duvarındaki *Col1* gen ifadesi kontrol grubuna göre 1,56 katlık önemli bir artış gösterirken, yaprakçık örneklerindeki *Col1* gen ifadesinde kontrol grubuna göre yaklaşık 0,4 katlık önemli bir azalma meydana gelmiştir. Benzer şekilde *Col3* gen ifadesinde kontrol grubuna göre arter duvarı örneklerinde 1,6 katlık bir artış gözlenirken yaprakçık örneklerinde yaklaşık 0,4 katlık önemli bir azalma meydana gelmiştir. *Eln* gen ifadesi de hemen hemen aynı sonuçlar vererek arter duvarında kontrol grubuna göre 1,57 katlık bir artış, yaprakçık örneklerinde yaklaşık 0,7 katlık bir azalış gözlenmiştir. İstatistiksel olarak bu değişimler anlamlı bulunmuştur ($p<0,001$).



Şekil 3.33. Yeniden hücrelendirilmiş arter duvarı ve yaprakçık örneklerindeki temel ECM proteinleri gen ifadelerindeki değişim. Sonuçlar kontrol grubuna göre normalize edilmiştir (K: Kontrol, Y: Yaprakçık, A: Arter duvarı).

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu tezde koyun pulmoner kalp kapakçıkları SD ve SDS ile hücresizleştirilmiş ve hücresizleştirme işleminin etkinliği çeşitli karakterizasyon testleriyle belirlenmiştir. Ardından HUVEC ve fibroblast hücreleriyle bu iskelelere yeniden ekim yapılarak rejeneratif belirteçler analiz edilmiştir. Amacımız, literatürde yer alan az sayıda hücresizleştirilmiş koyun kalp kapakçıklarının çalışmasına katkıda bulunmak ve ilk defa farklılaşmış insan hücrelerinin bu kapakçıklarda temel ECM proteinlerini ifade edebildiğini kanıtlayarak rejeneratif kalp kapakçığı üretilebileceğini göstermektir.

4.1. Hücresizleştirilmiş Kapakçıkların Karakterizasyonu

Hücresizleştirilmiş iskelelerin karakterizasyon testlerinden biri olan şişme davranışı hücre göçünü, çoğalmasını, oksijen emilimini ve atıkların bertaraf edilmesini kolaylaştırdığı için oldukça önemlidir (Asgari vd., 2021). Ayrıca hücresizleştirme sonrası geriye kalan boşluklara ve porlu ECM yapısına istinaden iskele tarafından emilebilen su miktarı artacağı için hücresizleştirmenin etkinliği hakkında fikir vermektedir. Deterjan bazlı metodla hücresizleştirilen dokuların, doğal dokulara kıyasla şişme oranında %50'lik artış gözlemlendiği bildirilmiştir (Xu vd., 2014). Hücresizleştirilmiş arter duvarı şişme oranına bakıldığında %50'lik bir artış söz konusu olurken yaprakçık örneklerinin su tutma kapasitesi yaklaşık %100'lük bir artış göstermiştir. Histolojik görüntülerde gözlemlendiği üzere hücresizleştirme işleminin yaprakçıklardaki spongioza katmanında belirgin bir açıklık oluşturması, su tutma kapasitesinde böylesine yüksek bir artışa sebebiyet vermiş olabilir. Hücresizleştirilmiş yaprakçık ve arter duvarı örneklerindeki DNA giderimi sırasıyla %95 ve %98 olarak bulunmuştur. Literatürdeki koyun kalp kapakçığı DNA'sının yaklaşık %95'inin hücresizleştirme yoluyla temizlendiği bildirilmiştir (Lichtenberg vd., 2006; Quinn vd., 2011). Hücre çıkarımını daha net bir şekilde doğrulamak için DNA giderimine ek olarak SEM ve histolojik görüntülerle de desteklemek gerekmektedir. Hücresizleştirilmiş yaprakçık ve arter duvarı örneklerinin SEM mikrograflarında endotel tabakasının ortadan kaldırıldığı ve altındaki karmaşık fibröz ağların açığa çıktığı görülmektedir (Syedain vd., 2013; Findeisen vd., 2020). Açığa çıkan kıvrık kollajen fibrillerinin yöneliminde önemli bir değişiklik olmamıştır. Ayrıca bu görüntülere göre hücresizleştirme sonrasında yüzeye yakın hiçbir hücreye rastlanmamıştır. H&E ve movat pentakrom boyamalar sonucunda boyanmış hiçbir hücre çekirdeğine rastlanmazken, direkt nükleer materyali floresan olarak işaretleyen DAPI boyama sonucunda kalıntı DNA saptanmamıştır. Dolayısıyla literatür verileriyle benzerlik

gösteren bulgularımız sonucunda hücresizleştirme işleminin etkili bir şekilde gerçekleştiği anlaşılmaktadır.

Hücrelerin uzaklaştırılmasının yanı sıra ECM mimarisinin de hücresizleştirme işleminden ne kadar etkilendiği büyük önem arz etmektedir. Nitekim hücresizleştirme gibi ECM'ye doğrudan müdahale söz konusu olan işlemler, histomimari yapıda az veya çok miktarda bozulmaya yol açacaktır. Bu bozulmalar hücre davranışını etkilerken aynı zamanda dokunun biyomekanik özelliklerini olumsuz etkileyecektir. Kalp kapağının içinde bulunduğu yüksek basınçlı hemodinamik ortam nedeniyle iyi biyomekanik özelliklere sahip olması gerekmektedir. Yaptığımız karakterizasyon testlerinde histomimariyi belirleyen H&E ve movat pentakrom boyama görüntülerine göre özellikle yaprakçıkların spongioza tabakasında ciddi bir bozulma gözlenirken, fibroza ve ventrikülaris katmanlarında önemli sayılabilecek bir farklılık gözlenmemiştir. Movat pentakrom ile boyanmış yaprakçıkların fibroza tabakasında kollajen fibrillerinin kıvrıklığının, yöneliminin ve miktarının iyi korunduğu görülmektedir. Ayrıca spongioza tabakasında maviye boyanmış GAG'ların da hala iskelede mevcut olduğu görünmekle birlikte literatürde hücresizleştirme işleminden sonra toplam GAG'lerin %50'den fazlasının kaybedildiği bildirilmiştir (Sierad vd., 2015). Bu sonuçlardan yola çıkarak spongioza katmanındaki bozulmanın, yüksek düzeyde GAG kaybından kaynaklandığı düşünülebilir. Bu konuya ilişkin yapılan bir çalışmada koyun kalp kapakçıklarının hücresizleştirilmesinden sonra yüksek oranda GAG kaybına uğramasının sebebinin, koyun kalp kapakçıklarının baştaki hücreliliğinin insan kapakçıklarına göre daha fazla olduğu (yaklaşık 3 kat) belirtilmiştir (VeDepo vd., 2017b). Aynı çalışmada hücresizleştirmeden sonra koyun kapakçıklarında %89, insan kapakçıklarında %57 oranında GAG kaybı bildirilmiştir. Bu yüzden dokudan çıkartılan hücre sayısı arttıkça daha fazla GAG kaybı meydana gelmiştir. Kapakçıklardaki GAG'ların kollajen fibrilleriyle birlikte hareket ederek içerdikleri su sayesinde basınca karşı dirence yardımcı oldukları ileri sürülmüştür (Hinton ve Yutzey, 2011). Fakat GAG gibi proteoglikanların kapakçıkların mukavemeti, sertliği gibi özellikleriyle ilişkili olmadığı, içerdikleri negatif yükler sayesinde dokunun su içeriğini korumada ve dolayısıyla kapakçığın viskoelastik özelliklerine katkı sağlamada rolü olduğu bilinmektedir (Schaefer ve Schaefer, 2010; Hinderer vd., 2014). Bu yüzden GAG'ların hücresizleştirme sonrası iskeleden uzaklaştırılmasının doku biyomekaniği üzerinde etkisi olmayacağı düşünülebilir. Yine de GAG eksikliğinin iskele dayanımı üzerinde kesin bir etkisinin olup olmadığı henüz bilinmemekle birlikte bu konuda ayrıntılı çalışmalara ihtiyaç vardır (Sierad vd., 2015).

Yaprakçıkların özellikle fibroza katmanında konumlanmış kollajen tip 1'in doku stabilitesi ve gerilme sertliğinden sorumlu olduğu bilinmektedir (Hinton ve Yutzey, 2011; Sanz-Garcia vd., 2015). Bunun yanında yüksek hemodinamik basınç koşullarına karşı mukavemeti sağlamaktadır (Aparecida de Aro vd., 2012). Hücresizleştirme işlemiyle birlikte kollajen tip 1 miktarında azalış olduğu rapor edilmiştir (Flameng vd., 2014). Aksine, bu tez çalışmasında olduğu gibi, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında hücresizleştirilmiş yaprakçık ve arter duvarının kollajen organizasyonu ve miktarı açısından benzer olduğu da bildirilmiştir (Haupt vd., 2018). Histolojik bulgulara görüldüğü üzere iyi korunmuş kollajen tip 1 ve elastin sayesinde doğal ve hücresizleştirilmiş dokular arasında biyomekanik özellikler açısından büyük bir farklılık gözlenmemiştir. Gerilim/gerinim eğrisi sonucunda hem yaprakçık hem de arter duvarı örneklerinde hücresizleştirmeye birlikte sertliğin arttığı ve uzamaların azaldığı görülmektedir (Şekil 3.1.4.1.). Uzayabilirliğin azalmasının sebebini, kollajen fibrillerindeki kıvrıklığın azalmış olmasıyla ilişkilendiren bir çalışma bulunmaktadır (Granados vd., 2017). H&E görüntüleri yaprakçıklarda kollajen fibrillerinin kıvrıklığındaki azalmayı gösterse de kollajen fibrillerini özel olarak boyayan movat pentakrom görüntülerinde esasen kıvrık yapının iyi bir şekilde korunduğu görülmektedir. Uzayabilirliğin azalmasının muhtemel sebebi kovalent çapraz bağlı kollajenlerin hücresizleştirmeye birlikte serbest hale geçmesi olabilir. Çünkü hücresizleştirilmiş kalp kapakçıklarının çeşitli çapraz bağlama ajanlarıyla muamelesi sonucu kollajenler stabil hale getirilerek biyomekanik özelliklerde iyileşme gerçekleştiği bildirilmiştir (Liu vd., 2020). Bunların yanında UTS ve elastisite modülü değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik olmadığı görülmektedir. Sonuçlarımıza benzer şekilde deterjan bazlı hücresizleştirme sonrası koyun kalp kapakçıklarında, kontrol grubuna göre başta UTS olmak üzere esneme özelliklerinde herhangi bir değişiklik olmadığı rapor edilmiştir (Syedain vd., 2013). Histolojik boyamalarda görüldüğü gibi kollajen, elastin ve GAG bileşenlerindeki değişikliklerin minimum düzeyde olması ve 3 boyutlu mimarinin genel itibarı ile korunması, mekanik özelliklerin korunmasını sağlamıştır. Hücresizleştirme sonrası biyomekanik özelliklerinin korunduğu bilinen domuz kalp kapaklarında da benzer bulgular elde edilmiş ve kontrol grupları ile karşılaştırıldığında çekme özelliklerinde anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir (Findeisen vd., 2020). Çekme testi tek başına hücresizleştirmenin kalp kapakçıklarının biyomekanik özellikleri üzerindeki etkisini incelemek için yeterli değildir. Bu nedenle yorgunluk testi gibi fonksiyonel testlerin fizyolojik koşullar altında yapılmasına ihtiyaç vardır.

Enzimatik degradasyon analizi bulgularımıza göre, hücresizleştirme işlemiyle birlikte hem yaprakçık hem de arter duvarı örneklerinin *in vitro* stabilitesinde kontrol gruplarına kıyasla bir azalma meydana gelmiştir. Sonuçlarımıza benzer şekilde 2019 yılında yapılan bir çalışmada, domuz pulmoner kapakları deterjan bazlı bir yöntem kullanılarak hücresizleştirilmiş ve kolajenaz işleminden sonra bozunma oranları Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi ile belirlenmiştir (Vásquez-Rivera vd., 2019). Bu çalışmanın sonuçlarına göre, kızılötesi absorpsiyon spektrumlarından, hücresizleştirilmiş yaprakçıkların tamamen bozunduğu ve pulmoner arter duvarı örneklerinin, özellikle dış tabakanın, iç tabakalara göre daha fazla bozunduğu anlaşılmıştır. Bu sonuçlar, hücresizleştirilmiş kalp kapakçıklarının *in vitro* yeniden hücrelendirilmesinin gerekliliğini göstermektedir. Sonuç olarak, ECM'nin ana proteini olan kollajen, hücresizleştirme işlemi ile açığa çıkmakta ve enzimatik bozunmaya karşı daha duyarlı hale gelmektedir. Ayrıca, hücresizleştirme sonrasında ECM'de çeşitli modifikasyonlar yapılarak degradasyon oranının önemli ölçüde azaltıldığı çalışmalar da mevcuttur (Yu vd., 2021; Seyrek vd., 2022). Hücresizleştirilmiş koyun kalp kapakçıklarının biyomekanik özellikleri ve *in vitro* stabilitesi bu yöntemlerle geliştirilebilir.

Sonuç olarak, histolojik bulgulara boyalı çekirdek veya hücre kalıntısına rastlanmadığı, yüksek düzeyde DNA giderildiği, temel ECM bileşenlerinde anlamlı bir değişiklik görülmediği, biyomekanik özelliklerde anlamlı bir fark gözlenmediği, SEM görüntülerinde yüzeye yakın hücre bulunmadığı doğrulanmıştır. Bu sonuçlar SD ve düşük yoğunluklu SDS ile hücresizleştirilmiş yaprakçık ve arter duvarı kısımlarında hücresizleştirmenin başarıyla gerçekleştirildiğini kanıtlamaktadır.

4.2. Yeniden Hücrelendirilmiş Kapakçıkların Karakterizasyonu

Doku mühendisliği ile üretilmiş canlı bir kapak elde etmek için hücresizleştirilmiş kapakçıkların, doğal kapak hücre popülasyonunu taklit edebilmesi adına VEC'ler ve VIC'lerden oluşan karışık hücre grubuyla tohumlanması gerekmektedir. VEC'ler kapak yüzeyi üzerinde trombotik olmayan bir tek tabaka sağlar ve kapak hemodinamiklerinde önemli bir rol oynar (Butcher ve Nerem, 2006). VIC'ler kapağın ECM'sinin yeniden şekillenmesinde aktif olup hem doku dayanıklılığını hem de büyüme özelliklerini sağlar (Liu vd., 2007). Ortak kültürde VEC'ler VIC'leri daha doğal bir fenotipe doğru düzenlediği için, iki hücre tipi arasında güçlü bir ilişki bulunmaktadır (Butcher ve Nerem, 2006). Doku mühendislikli kapakları üretmenin temel zorluklarından biri bu iki hücre grubunun birlikte ekilmesidir. VEC'ler tarafından re-endotelizasyon tüm kapak yüzeylerinde meydana gelirken, VIC'ler tarafından interstisyel yeniden hücreleme arter duvarı ve sinüs ile sınırlı kalmaktadır. Bu

nedenle asıl zorluk yaprakçık interstisyumunun VIC benzeri hücrelerle yeniden doldurulmasında yatmaktadır (Dohmen vd., 2007; Baraki vd., 2009; da Costa vd., 2010; Quinn vd., 2011, 2012; Iop vd., 2014). Bu tezde HUVEC ve fibroblast hücreleri, hücre-siz kapakçığa birlikte ekilerek 7 güne kadar statik olarak kültürlenmiştir. Bu süre zarfında 1, 3 ve 7 günlük periyotlarda hücre proliferasyonu ve olası deterjan kalıntısına karşı sitotoksite MTT analiziyle belirlenmiştir. MTT bulgularına göre kontrol grubu ile karşılaştırıldığında günden güne artan metabolik aktivite, SD ve düşük yoğunluklu SDS ile hücre-sizleştirme işleminden sonra etkili yıkamanın gerçekleştirildiği ve sitotoksiteye sebep olabilecek düzeyde bir deterjan kalıntısının olmadığını göstermektedir. Bunun yanında ekilen hücrelerin, hücre-sizleştirilmiş koyun kalp kapakçığına tutunabildiği ve sorunsuz bir şekilde çoğalabildiği sonucuna varılmaktadır.

SEM mikrografları incelendiğinde arter duvarı ve yaprakçıklarda HUVEC'lerin iskelelere tutunduğu ve geniş alana yayıldıkları görülmektedir. İki grupta da tek tabakalı hücre katmanı oluşmaya başlamış fakat arter duvarında daha kesintisiz ve geniş şekilde olurken yaprakçıklarda kesintili ve özellikle kıvrımların olduğu yüzeylerde gerçekleşmiştir. Genel olarak reendotelizasyon, hücre-sizleştirilmiş koyun kapakçıklarında 7 gün gibi kısa sürede önemli sayılabilecek düzeyde gerçekleşmiştir. Fakat histolojik bulgularımız literatürdeki diğer çalışmalara paralel olarak özellikle yaprakçıkların iç katmanlarına çok sınırlı fibroblast hücre infiltrasyonu göstermiştir. Benzer şekilde hücre-sizleştirilmiş insan kalp kapakçığına ekilen kardiyak mezenkimal stromal hücreler (CStC) yaprakçık yüzeyine yapışarak orijinal hücre yoğunluğunun %90'ını korumuş ancak iç katmanlara sızma konusunda verimsiz olduğu bildirilmiştir (Dainese vd., 2012). Çalışmamızda arter duvarında yaprakçıklara nispeten daha yoğun infiltrasyon gözlenmektedir. Kalp kapakçığı doku mühendisliğinde zaten var olan bu sorunu çözmek için statik kültürden ziyade hücre ekiminden sonra mekanik veya kimyasal koşullandırma uygulamalarıyla daha yoğun bir hücre popülasyonu elde edilmeye çalışılmıştır. Hücre-sizleştirilmiş pulmoner kapakçık koyun miyofibroblast ve endotel hücreleriyle ekildikten sonra biyoreaktörde fizyolojik pulmonik koşullar altında kültürlenmiştir (Schenke-Layland, 2003). Bunun sonucunda yaprakçıkların iç katmanlarında neredeyse doğal dokuyla aynı derecede hücresellik elde edilmiştir. Başka bir mekanik koşullandırmanın hücre infiltrasyonu üzerine etkisini inceleyen bir çalışmada hücre-sizleştirilmiş koyun aort kapakçıkları biyoreaktör sisteminde insan MSC'leri ile ekilmiş ve negatif-pozitif basınç koşulları altında yeniden hücrelendirme araştırılmıştır (Converse vd., 2017). Mekanik koşullandırma uygulanmayan statik kültürlenmiş dokuda yaprakçık iç dokularına hücre

sızıntısı olmazken koşullandırılmış yaprakçıkların iç katmanlarına hücreler sızabilmiş fakat tam bir hücresellik gözlenmemiştir. Kimyasal modifikasyonda fenotipe özgü hücresel bağlanmayı desteklemek, kapakçık mekaniğini desteklemek ve hücre farklılaşmasını yönlendirmek için sitokinler, kemokinler, büyüme faktörleri, antikorlar ve polimerler kullanılmaktadır (VeDepo vd., 2017a). Fakat kimyasal koşullandırma ile yaprakçık iç katmanlarının yeniden hücrelendirme oranı, mekanik koşullandırmaya göre daha düşük bulunmuştur (Ye vd., 2013; Zhou vd., 2015 a,b). Dolayısıyla *in vitro* yeniden hücrelendirmenin tam olarak sağlanabilmesi için daha etkin hücre ekim metodlarına ve fizyolojik koşullandırma altında popülasyonun geliştirilmesine ihtiyaç vardır.

Tüm bu araştırmaların aksine hücresizleştirilmiş kapakçıklara *in vitroda* hücre ekilmesine gerek olmadığını, implant modellerinde otolog hücreler tarafından hücresiz iskelenin istila edildiğini bildiren çalışmalar da mevcuttur. Örnek olarak hücresizleştirilmiş domuz ve koyun kapakçıkları, koyunlara implante edildikten sonra arter duvarlarının yeniden hücrelendirildiği, yaprakçık iç katmanlarına ise minimal hücre sızıntısı gerçekleştiği rapor edilmiştir (Baraki vd., 2009; Quinn vd., 2011; Paniagua Gutierrez vd., 2015). Yaprakçıkların iç katmanlarına hücre infiltrasyonunun neden bu kadar zor olduğunun kesin sebebi henüz açıklanamamıştır. Fakat hücresizleştirme uygulamalarıyla özellikle spomgioza katmanında meydana gelen açıklık ve bozulmalar, hücrelerin orta katmana kadar göçünü ve tutunmasını engelliyor olabilir. Bunların yanında yapı itibarıyla arter duvar yüzeyinin yaprakçıklara göre daha düz olduğu ve yaprakçıkların kıvrımlı yapısı göz önünde bulundurulursa, özellikle VIC'lerin kıvrımlı bölgelerde kümelenmeye başladığı ve düzgün bir yayılım sağlayamadığı ihtimali de ortaya çıkabilir.

Yeniden hücrelendirilen iskelelerde yeni ECM sentezinin gerçekleşip gerçekleşmediğini belirlemek adına temel ECM proteinlerinden olan kollajen tip 1, tip 3 ve elastinleri kodlayan genlerin ifadeleri Real Time PCR ile gerçekleştirilmiştir. Elde ettiğimiz bulgulara göre arter duvarlarında araştırılan 3 genin ifadesinde kontrol grubuna göre önemli artışlar gözlenmiştir. Dolayısıyla iskele içine sızabilmiş hücreler hücresizleştirilmiş koyun kalp kapakçıklarında yeni ECM bileşenlerini sentezlemeye başlamışlardır. Fakat yaprakçıklarda aksi şekilde kontrol grubuna göre bu gen ifade seviyelerinde kritik düşüşler gözlenmiştir. Bunun sebebi histolojik bulgulara görüldüğü üzere yaprakçık iç katmanlarının çok yetersiz veya hiç hücrelenmemesidir. Theodoridis ve ark. 2015' de yaptıkları bir çalışmada koyun pulmoner kapakçıklarını hücresizleştirmiş, otolog koyun endotel hücreleriyle *in vitroda* yeniden hücrelendirip koyunlara 12 ay kalacak şekilde implante

etmişler ve doku rejenerasyonunu araştırmışlardır (Theodoridis vd., 2015). Elde ettikleri bulgulara göre arter duvarına yoğun konakçı VIC sızıntısı gerçekleşirken yaprakçıkların sadece yüzeyine yakın bölgede minimal VIC gözlenmiştir. Bunun yanısıra kollajen öncüsü olan ve içsel kollajeni gösteren prokollajen tip 1 antikoruyla immünofloresan olarak işaretlenmiş örneklerde pozitif boyama ve dolayısıyla doku rejenerasyonunun gerçekleşmeye başladığı gözlenmiştir. Fakat bulgularımıza benzer şekilde yaprakçık iç katmanlarına ilerleyemeyen VIC'ler arter duvarı ile karşılaştırıldığında çok az pozitif boyama göstermiştir. Benzer durum domuz kapakçıklarında da meydana gelmiştir; hücreleştirilmiş domuz kalp kapağı allogreftlerinin 15 aylık implantasyonun ardından herhangi bir koşullandırma olmaksızın yeniden hücrelendiği ve yapılan mikromikroarray analizine göre özellikle arter duvarlarında kollajen, elastin gibi ECM proteinlerinin aktif olarak sentezlendiği bildirilmiştir (Iop vd., 2014).

Sonuç olarak bu tezde ilk defa HUVEC ve insan dermal fibroblast hücrelerinin kokültürüyle yeniden hücrelendirilen hücreleştirilmiş koyun kalp kapakçıklarında yeniden yapılanmaya dair belirteçlerin ifade edildiği gösterilmiştir. Ayrıca yeniden hücrelendirmenin kapak yüzeyleri boyunca başarılı bir şekilde sağlanması, hücreleştirilmiş koyun kalp kapakçıklarının biyouyumlu olduğunun göstergesidir. Dolayısıyla bulgularımızdan yola çıkarak insanlara yönelik tasarlanacak olan kalp kapakçığı implantlarında hücreleştirilmiş koyun kalp kapakçıklarının kullanılabileceği, otolog hücre ekimi ile birlikte kişiye özel kalp kapakçığı üretmenin mümkün olduğu öngörülmektedir. Bu yüzden hücreleştirilmiş koyun kalp kapakçıklarının klinik çalışmalarda değerlendirilmesine mutlak surette ihtiyaç vardır.

KAYNAKÇA

- Abdelazeem, B. vd.** (2022). Aortic valve insufficiency due to myxomatous degeneration: a case report and literature review. *AME Case Rep* 6, 10–10.
- Abdolghafoorian, H. vd.** (2017). Effect of Heart Valve Decellularization on Xenograft Rejection. *Exp Clin Transplant* 15, 329–336.
- Adams, D. H., Chen, R. H., & Kadner, A.** (2000). Cardiac xenotransplantation: clinical experience and future direction. *Ann Thorac Surg* 70, 320–326.
- Aikawa, E. vd.** (2006). Human Semilunar Cardiac Valve Remodeling by Activated Cells From Fetus to Adult. *Circulation* 113, 1344–1352.
- Akhyari, P. vd.** (2010). In vivo functional performance and structural maturation of decellularised allogenic aortic valves in the subcoronary position. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery* 38, 539–546.
- Allan, K.S. vd.** (2019). Unexpected High Prevalence of Cardiovascular Disease Risk Factors and Psychiatric Disease Among Young People With Sudden Cardiac Arrest. *J Am Heart Assoc* 8.
- Aparecida de Aro, A., de Campos Vidal, B., & Pimentel, E. R.** (2012). Biochemical and anisotropical properties of tendons. *Micron* 43, 205–214.
- Armstrong, E. J., & Bischoff, J.** (2004). Heart Valve Development. *Circ Res* 95, 459–470.
- Asgari, F. vd.** (2021). Optimization of decellularized human placental macroporous scaffolds for spermatogonial stem cells homing. *J Mater Sci Mater Med* 32, 47.
- Aubin, H. vd.** (2016). Customized Interface Biofunctionalization of Decellularized Extracellular Matrix: Toward Enhanced Endothelialization. *Tissue Eng Part C Methods* 22, 496–508.
- Bader, A. vd.** (1998). Tissue engineering of heart valves – human endothelial cell seeding of detergent acellularized porcine valves¹. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery* 14, 279–284.
- Badria, A.F., Koutsoukos, P. G., & Mavrilas, D.** (2020). Decellularized tissue-engineered heart valves calcification: what do animal and clinical studies tell us? *J Mater Sci Mater Med* 31, 132.

- Baraki, H. vd.** (2009). Orthotopic replacement of the aortic valve with decellularized allograft in a sheep model. *Biomaterials* 30, 6240–6246.
- Baumgartner, H. vd.** (2017). 2017 ESC/EACTS Guidelines for the management of valvular heart disease. *Eur Heart J* 38, 2739–2791.
- Bibeovski, S. vd.** (2017). Performance of SynerGraft Decellularized Pulmonary Allografts Compared With Standard Cryopreserved Allografts: Results From Multiinstitutional Data. *Ann Thorac Surg* 103, 869–874.
- Brazile, B. vd.** (2015). On the Bending Properties of Porcine Mitral, Tricuspid, Aortic, and Pulmonary Valve Leaflets. *J Long Term Eff Med Implants* 25, 41–53.
- Butcher, J.T., & Markwald, R.R.** (2007). Valvulogenesis: the moving target. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 362, 1489–1503.
- Butcher, J.T., & Nerem, R.M.** (2006). Valvular Endothelial Cells Regulate the Phenotype of Interstitial Cells in Co-culture: Effects of Steady Shear Stress. *Tissue Eng* 12, 905–915.
- Cebotari, S. vd.** (2002). Construction of Autologous Human Heart Valves Based on an Acellular Allograft Matrix. *Circulation* 106.
- Chan, B.P., & Leong, K.W.** (2008). Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations. *European Spine Journal* 17, 467–479.
- Chauvette, V. vd.** (2022). Pulmonary homograft dysfunction after the Ross procedure using decellularized homografts—a multicenter study. *J Thorac Cardiovasc Surg* 163, 1296–1305.e3.
- Chen, G. vd.** (2005). Acute rejection is associated with antibodies to non-Gal antigens in baboons using Gal-knockout pig kidneys. *Nat Med* 11, 1295–1298.
- Chen, R.H., Kadner, A., Mitchell, R.N., & Adams, D.H.** (2000). Mechanism of Delayed Rejection in Transgenic Pig-to-Primate Cardiac Xenotransplantation. *Journal of Surgical Research* 90, 119–125.
- Christ, T. vd.** (2019). Long-term results after the Ross procedure with the decellularized AutoTissue Matrix P® bioprosthesis used for pulmonary valve replacement. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery* 55, 885–892.

- Cicha, I. vd.** (2011). Early obstruction of decellularized xenogenic valves in pediatric patients: involvement of inflammatory and fibroproliferative processes. *Cardiovascular Pathology* 20, 222–231.
- Converse, G.L. vd.** (2017). Design and efficacy of a single-use bioreactor for heart valve tissue engineering. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 105, 249–259.
- Copeland, K.M. vd.** (2018). “Decellularization in Heart Valve Tissue Engineering,” in *Advances in Heart Valve Biomechanics* (Cham: Springer International Publishing), 289–317.
- Cox, B., & Emili, A.** (2006). Tissue subcellular fractionation and protein extraction for use in mass-spectrometry-based proteomics. *Nat Protoc* 1, 1872–1878.
- Crapo, P. M., Gilbert, T. W., & Badylak, S. F.** (2011). An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials* 32, 3233–3243.
- da Costa, F.D.A. vd.** (2010). The Early and Midterm Function of Decellularized Aortic Valve Allografts. *Ann Thorac Surg* 90, 1854–1860.
- Dainese, L. vd.** (2012). Heart valve engineering: decellularized aortic homograft seeded with human cardiac stromal cells. *J Heart Valve Dis* 21, 125–34.
- Demir, H.** (2021). Farklı hücre tiplerinin fotobiyomodülasyon ve askorbik asit varlığında hücre tabakası oluşturma potansiyellerinin incelenmesi. (Yayınlanmış Yüksek Lisans Tezi). Hacettepe Üniversitesi, Biyomühendislik Anabilim Dalı, Ankara.
- Dohmen, P.M. vd.** (2006). Histological evaluation of tissue-engineered heart valves implanted in the juvenile sheep model: is there a need for in-vitro seeding? *J Heart Valve Dis* 15, 823–9.
- Dohmen, P.M. vd.** (2007). In-vivo repopularization of a tissue-engineered heart valve in a human subject. *J Heart Valve Dis* 16, 447–9.
- Dohmen, P.M.vd.** (2002). Ross operation with a tissue-engineered heart valve. *Ann Thorac Surg* 74, 1438–1442.
- Dohmen, P.M. vd.** (2003). A tissue engineered heart valve implanted in a juvenile sheep model. *Med Sci Monit* 9, BR97–BR104.
- D’Souza, R. vd.** (2017). Anticoagulation for pregnant women with mechanical heart valves: a systematic review and meta-analysis. *Eur Heart J* 38, 1509–1516.

- Durbin, A. D., & Gotlieb, A. I.** (2002). Advances towards understanding heart valve response to injury. *Cardiovascular Pathology* 11, 69–77.
- Erdbrügger, W. vd.** (2006). Decellularized Xenogenic Heart Valves Reveal Remodeling and Growth Potential *in Vivo*. *Tissue Eng* 12, 2059–2068.
- Eslami, M. vd.** (2015). Expression of COLLAGEN 1 and ELASTIN Genes in Mitral Valvular Interstitial Cells within Microfiber Reinforced Hydrogel. *Cell J* 17, 478–88.
- Filip, D. A., Radu, A., & Simionescu, M.** (1986). Interstitial cells of the heart valves possess characteristics similar to smooth muscle cells. *Circ Res* 59, 310–320.
- Findeisen, K. vd.** (2020). Toward acellular xenogeneic heart valve prostheses: Histological and biomechanical characterization of decellularized and enzymatically deglycosylated porcine pulmonary heart valve matrices. *Xenotransplantation*, 27.
- Flameng, W. vd.** (2014). Coating with fibronectin and stromal cell–derived factor-1 α of decellularized homografts used for right ventricular outflow tract reconstruction eliminates immune response–related degeneration. *J Thorac Cardiovasc Surg* 147, 1398-1404.e2.
- Friedrich, G. vd.** (2020). Valve Thrombosis Or Hypo-attenuating Leaflet Thickening After Tavr And Savr: Is There A Need For Different Therapeutic Strategies? *J Cardiovasc Comput Tomogr* 14, S86–S87.
- Gallegos, R.P. vd.** (2005). The current state of in-vivo pre-clinical animal models for heart valve evaluation. *J Heart Valve Dis* 14, 423–32.
- Gallo, M. vd.** (2016). Decellularized aortic conduits: could their cryopreservation affect post-implantation outcomes? A morpho-functional study on porcine homografts. *Heart Vessels* 31, 1862–1873.
- Gallo, M. vd.** (2012). Physiological Performance of a Detergent Decellularized Heart Valve Implanted for 15 Months in Vietnamese Pigs: Surgical Procedure, Follow-up, and Explant Inspection. *Artif Organs* 36, E138–E150.
- Gerdisch, M. vd.** (2020). Early Results from the FDA Extracellular Matrix (ECM) Cylinder Valve Clinical Feasibility Trial. *Structural Heart* 4, 102.

- Ghatak, S., Muthukumaran, R. B., & Nachimuthu, S. K.** (2013). A Simple Method of Genomic DNA Extraction from Human Samples for PCR-RFLP Analysis. *J Biomol Tech*, jbt.13-2404-001.
- Gilbert, T., Sellaro, T., & Badylak, S.** (2006). Decellularization of tissues and organs. *Biomaterials*.27(19), 3675-3683.
- Godehardt, A.W. vd.** (2020). Decellularized pig pulmonary heart valves—Depletion of nucleic acids measured by proviral PERV *pol*. *Xenotransplantation* 27(2), e12565.
- Goecke, T. vd.** (2018). In vivo performance of freeze-dried decellularized pulmonary heart valve allo- and xenografts orthotopically implanted into juvenile sheep. *Acta Biomater* 68, 41–52.
- Granados, M. vd.** (2017). Development and Characterization of a Porcine Mitral Valve Scaffold for Tissue Engineering. *J Cardiovasc Transl Res* 10, 374–390.
- Grauss, R.W. vd.** (2003). Decellularization of rat aortic valve allografts reduces leaflet destruction and extracellular matrix remodeling. *J Thorac Cardiovasc Surg* 126, 2003–2010.
- Hanada, K. vd.** (2007). Perturbations of Vascular Homeostasis and Aortic Valve Abnormalities in Fibulin-4 Deficient Mice. *Circ Res* 100, 738–746.
- Hänninen, M.M. vd.** (2009). Expression of iron-related genes in human brain and brain tumors. *BMC Neurosci* 10, 36.
- Haupt, J. vd.** (2018). Detergent-based decellularization strategy preserves macro- and microstructure of heart valves. *Interact Cardiovasc Thorac Surg* 26, 230–236.
- Hawkins, J.A. vd.** (2003). Immunogenicity of decellularized cryopreserved allografts in pediatric cardiac surgery: comparison with standard cryopreserved allografts. *J Thorac Cardiovasc Surg* 126, 247–252.
- Hawthorne, W. J.** (2022). World first pig-to-human cardiac xenotransplantation. *Xenotransplantation*, 29(1), e12733.
- Hinderer, S. vd.** (2014). Engineering of a bio-functionalized hybrid off-the-shelf heart valve. *Biomaterials* 35, 2130–2139.
- Hinton, R.B., & Yutzey, K. E.** (2011). Heart Valve Structure and Function in Development and Disease. *Annu Rev Physiol* 73, 29–46.

- Hofmann, M. vd.** (2017). Congenital aortic valve repair using CorMatrix[®]: A histologic evaluation. *Xenotransplantation* 24, e12341.
- Honge, J.L. vd.** (2011). Recellularization of aortic valves in pigs. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery* 39, 829–834.
- Hopkins, R.A. vd.** (2013). Bioengineered human and allogeneic pulmonary valve conduits chronically implanted orthotopically in baboons: Hemodynamic performance and immunologic consequences. *J Thorac Cardiovasc Surg* 145, 1098-1107.e3.
- Hopkins, R.A. vd.** (2009). Decellularization reduces calcification while improving both durability and 1-year functional results of pulmonary homograft valves in juvenile sheep. *J Thorac Cardiovasc Surg* 137, 907-913.e4.
- Hussein, K.H. vd.** (2016). Biocompatibility evaluation of tissue-engineered decellularized scaffolds for biomedical application. *Materials Science and Engineering: C* 67, 766–778.
- Ibrahim, D. M., Kakaroukas, A., & Allam, N. K.** (2017). Recent advances on electrospun scaffolds as matrices for tissue-engineered heart valves. *Mater Today Chem* 5, 11–23.
- Iop, L. vd.** (2014). Decellularized Allogeneic Heart Valves Demonstrate Self-Regeneration Potential after a Long-Term Preclinical Evaluation. *PLoS One* 9, e99593.
- Isenberg, B. C., Williams, C., & Tranquillo, R. T.** (2006). Small-Diameter Artificial Arteries Engineered In Vitro. *Circ Res* 98, 25–35.
- Jiao, T. vd.** (2012). Measurements of the Effects of Decellularization on Viscoelastic Properties of Tissues in Ovine, Baboon, and Human Heart Valves. *Tissue Eng Part A* 18, 423–431.
- Jiménez-Altayó, F. vd.** (2020). Stenosis coexists with compromised α 1-adrenergic contractions in the ascending aorta of a mouse model of Williams-Beuren syndrome. *Sci Rep* 10, 889.
- Jin, L. vd.** (2019). Cross-Linking Methacrylated Porcine Pericardium by Radical Polymerization Confers Enhanced Extracellular Matrix Stability, Reduced Calcification, and Mitigated Immune Response to Bioprosthetic Heart Valves. *ACS Biomater Sci Eng* 5, 1822–1832.

- Jordan, J.E. vd.** (2012). Bioengineered self-seeding heart valves. *J Thorac Cardiovasc Surg* 143, 201–208.
- Joyce, E.M. vd.** (2009). Functional Collagen Fiber Architecture of the Pulmonary Heart Valve Cusp. *Ann Thorac Surg* 87, 1240–1249.
- Juthier, F. vd.** (2006). Decellularized heart valve as a scaffold for in vivo recellularization: Deleterious effects of granulocyte colony-stimulating factor. *J Thorac Cardiovasc Surg* 131, 843–852.
- Kasimir, M.T. vd.** (2006). Decellularization does not eliminate thrombogenicity and inflammatory stimulation in tissue-engineered porcine heart valves. *J Heart Valve Dis* 15, 278–86; discussion 286.
- Kasimir, M.T. vd.** (2005). The decellularized porcine heart valve matrix in tissue engineering. *Thromb Haemost* 94, 562–567.
- Kodigepalli, K.M. vd.** (2020). Biology and Biomechanics of the Heart Valve Extracellular Matrix. *J Cardiovasc Dev Dis* 7, 57.
- Konertz, W. vd.** (2011). Right ventricular outflow tract reconstruction with decellularized porcine xenografts in patients with congenital heart disease. *J Heart Valve Dis* 20, 341–7.
- Konuma, T. vd.** (2009). Performance of CryoValve SG Decellularized Pulmonary Allografts Compared With Standard Cryopreserved Allografts. *Ann Thorac Surg* 88, 849–855.
- Lamanna, A. vd.** (2013). Valvular and Aortic Diseases in Osteogenesis Imperfecta. *Heart Lung Circ* 22, 801–810.
- Lanuti, P. vd.** (2015). Human Mesenchymal Stem Cells Reendothelialize Porcine Heart Valve Scaffolds: Novel Perspectives in Heart Valve Tissue Engineering. *Biores Open Access* 4, 288–297.
- Le Page, M.** (2022). Virus found in pig heart recipient. *New Sci (1956)* 254, 10.
- Lehr, E.J. vd.** (2011). Decellularization reduces immunogenicity of sheep pulmonary artery vascular patches. *J Thorac Cardiovasc Surg* 141, 1056–1062.
- Leyh, R.G. vd.** (2003). In vivo repopulation of xenogeneic and allogeneic acellular valve matrix conduits in the pulmonary circulation. *Ann Thorac Surg* 75, 1457–1463.

- Lichtenberg, A. vd.** (2006). In vitro re-endothelialization of detergent decellularized heart valves under simulated physiological dynamic conditions. *Biomaterials* 27, 4221–4229.
- Lila, N. vd.** (2010). Gal knockout pig pericardium: New source of material for heart valve bioprotheses. *The Journal of Heart and Lung Transplantation* 29, 538–543.
- Liu, A. C., Joag, V. R., & Gotlieb, A.I.** (2007). The Emerging Role of Valve Interstitial Cell Phenotypes in Regulating Heart Valve Pathobiology. *Am J Pathol* 171, 1407–1418.
- Liu, C. vd.** (2020). A riboflavin–ultraviolet light A-crosslinked decellularized heart valve for improved biomechanical properties, stability, and biocompatibility. *Biomater Sci* 8, 2549–2563.
- Lovekamp, J.J. vd.** (2006). Stability and function of glycosaminoglycans in porcine bioprosthetic heart valves. *Biomaterials* 27, 1507–1518.
- Luo, J.** (2014). Development and Characterization of Acellular Porcine Pulmonary Valve Scaffolds for Tissue Engineering. *Tissue Eng Part A* 20, 2963–2974.
- Maruyama, S. vd.** (2000). α -Galactosyl epitopes on glycoproteins of porcine renal extracellular matrix. *Kidney Int* 57, 655–663.
- Mazine, A. vd.** (2018). Ross Procedure in Adults for Cardiologists and Cardiac Surgeons. *J Am Coll Cardiol* 72, 2761–2777.
- McCrary, M.W. vd.** (2020). Novel Sodium Deoxycholate-Based Chemical Decellularization Method for Peripheral Nerve. *Tissue Eng Part C Methods* 26, 23–36.
- Merryman, W.D. vd.** (2009). Viscoelastic Properties of the Aortic Valve Interstitial Cell. *J Biomech Eng* 131..
- Meyer, S.R. vd.** (2006). Comparison of aortic valve allograft decellularization techniques in the rat. *J Biomed Mater Res A* 79A, 254–262.
- Michelena, H.I. vd.** (2008). Natural History of Asymptomatic Patients With Normally Functioning or Minimally Dysfunctional Bicuspid Aortic Valve in the Community. *Circulation* 117, 2776–2784.
- Miyagawa, S. vd.** (2010). Complement regulation in the GalT KO era. *Xenotransplantation* 17, 11–25.
- Mosala Nezhad, Z. vd.** (2017). Calcific Degeneration of CorMatrix 4 Years After Bicuspidization of Unicuspid Aortic Valve. *Ann Thorac Surg* 104, e431–e433.

- Mozaffarian, D. vd.** (2016). Heart Disease and Stroke Statistics—2016 Update. *Circulation* 133.
- Naso, F., & Gandaglia, A.** (2018). Different approaches to heart valve decellularization: A comprehensive overview of the past 30 years. *Xenotransplantation* 25, e12354.
- Naso, F. vd.** (2011). First quantitative assay of alpha-Gal in soft tissues: Presence and distribution of the epitope before and after cell removal from xenogeneic heart valves. *Acta Biomater* 7, 1728–1734.
- Navarro, F.B. vd.** (2010). Avaliação do comportamento biológico de homoenxertos valvares pulmonares descelularizados: estudo experimental em ovinos. *Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular* 25, 377–387.
- Ota, T. vd.** (2007). Novel Method of Decellularization of Porcine Valves Using Polyethylene Glycol and Gamma Irradiation. *Ann Thorac Surg* 83, 1501–1507.
- Oxenham, H.** (2003). Twenty year comparison of a Bjork-Shiley mechanical heart valve with porcine bioprotheses. *Heart* 89, 715–721.
- Paniagua Gutierrez, J.R. vd.** (2015). Regenerative Potential of Low-Concentration SDS-Decellularized Porcine Aortic Valved Conduits *In Vivo*. *Tissue Eng Part A* 21, 332–342.
- Perri, G. vd.** (2012). Early and late failure of tissue-engineered pulmonary valve conduits used for right ventricular outflow tract reconstruction in patients with congenital heart disease. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery* 41, 1320–1325.
- Qiao, W. vd.** (2018). Sequential hydrophile and lipophile solubilization as an efficient method for decellularization of porcine aortic valve leaflets: Structure, mechanical property and biocompatibility study. *J Tissue Eng Regen Med* 12.
- Quinn, R.W. vd.** (2016). Performance of allogeneic bioengineered replacement pulmonary valves in rapidly growing young lambs. *J Thorac Cardiovasc Surg* 152, 1156-1165.e4.
- Quinn, R.W. vd.** (2011). Performance and Morphology of Decellularized Pulmonary Valves Implanted in Juvenile Sheep. *Ann Thorac Surg* 92, 131–137.
- Quinn, R.W. vd.** (2012). Enhanced Autologous Re-endothelialization of Decellularized and Extracellular Matrix Conditioned Allografts Implanted Into the Right Ventricular Outflow Tracts of Juvenile Sheep. *Cardiovasc Eng Technol* 3, 217–227.

- Rahman, S. vd.** (2018). Optimising the decellularization of human elastic cartilage with trypsin for future use in ear reconstruction. *Sci Rep* 8, 3097.
- Ramm, R. vd.** (2021). Immunological and functional features of decellularized xenogeneic heart valves after transplantation into GGTA1-KO pigs. *Regen Biomater* 8.
- Ramm, R. vd.** (2016). Decellularized GGTA1-KO pig heart valves do not bind preformed human xenoantibodies. *Basic Res Cardiol* 111, 39.
- Rana, D. vd.** (2017). Development of decellularized scaffolds for stem cell-driven tissue engineering. *J Tissue Eng Regen Med* 11, 942–965.
- Reing, J.E. vd.** (2010). The effects of processing methods upon mechanical and biologic properties of porcine dermal extracellular matrix scaffolds. *Biomaterials* 31, 8626–8633.
- Rieder, E. vd.** (2005). Tissue Engineering of Heart Valves. *Circulation* 111, 2792–2797.
- Rüffer, A. vd.** (2010). Early failure of xenogenous de-cellularised pulmonary valve conduits — a word of caution!☆. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery* 38, 78–85.
- Russo, M. vd.** (2020). Isolated tricuspid valve regurgitation: old concepts, new insights and innovation. *Journal of Cardiovascular Medicine* 21, 406–414.
- Rutkovskiy, A. vd.** (2017). Valve Interstitial Cells: The Key to Understanding the Pathophysiology of Heart Valve Calcification. *J Am Heart Assoc* 6.
- Sacks, M.S., Schoen, F. J., & Mayer, J. E.** (2009). Bioengineering Challenges for Heart Valve Tissue Engineering. *Annu Rev Biomed Eng* 11, 289–313.
- Saleeb, S.F. vd.** (2019). Aortic Valve Replacement With Bovine Pericardial Tissue Valve in Children and Young Adults. *Circulation* 139, 983–985.
- Sands, M.P. vd.** (1969). An Anatomical Comparison of Human, Pig, Calf, and Sheep Aortic Valves. *Ann Thorac Surg* 8, 407–414.
- Sanz-Garcia, A. vd.** (2015). Heart valve tissue engineering: how far is the bedside from the bench? *Expert Rev Mol Med* 17, e16.
- Sarathchandra, P. vd.** (2012). Impact of γ -Irradiation on Extracellular Matrix of Porcine Pulmonary Valves. *Journal of Surgical Research* 176, 376–385.

- Schaefer, L., & Schaefer, R. M.** (2010). Proteoglycans: from structural compounds to signaling molecules. *Cell Tissue Res* 339, 237–246.
- Schenke-Layland, K.** (2003). Complete dynamic repopulation of decellularized heart valves by application of defined physical signals—an in vitro study. *Cardiovasc Res* 60, 497–509.
- Schoen, F.J.** (2008). Evolving Concepts of Cardiac Valve Dynamics. *Circulation* 118, 1864–1880.
- Schoen, F.J. vd.** (1994). Onset and progression of calcification in porcine aortic bioprosthetic valves implanted as orthotopic mitral valve replacements in juvenile sheep. *J Thorac Cardiovasc Surg* 108, 880–7.
- Schoen, F.J., & Levy, R. J.** (2005). Calcification of Tissue Heart Valve Substitutes: Progress Toward Understanding and Prevention. *Ann Thorac Surg* 79, 1072–1080.
- Seyrek, A., Günal, G., & Aydin, H. M.** (2022). Development of Antithrombogenic ECM-Based Nanocomposite Heart Valve Leaflets. *ACS Appl Bio Mater* 5, 3883–3895.
- Shapiro, J.R., & Sponseller, P. D.** (2009). Osteogenesis imperfecta: questions and answers. *Curr Opin Pediatr* 21, 709–716.
- Siddiqui, R.F., Abraham, J. R., & Butany, J.** (2009). Bioprosthetic heart valves: modes of failure. *Histopathology* 55, 135–144.
- Sierad, L.N. vd.** (2015). Functional Heart Valve Scaffolds Obtained by Complete Decellularization of Porcine Aortic Roots in a Novel Differential Pressure Gradient Perfusion System. *Tissue Eng Part C Methods* 21, 1284–1296.
- Simon, P.** (2003). Early failure of the tissue engineered porcine heart valve SYNERGRAFT™ in pediatric patients. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery* 23, 1002–1006.
- Somers, P. vd.** (2008). Genipin blues: an alternative non-toxic crosslinker for heart valves? *J Heart Valve Dis* 17, 682–8.
- Somers, P. vd.** (2012). Decellularization of Heart Valve Matrices: Search for the Ideal Balance. *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology* 40, 151–162.
- Spina, M. vd.** (2014). Biocompatibility Issues of Next Generation Decellularized Bioprosthetic Devices. *Conference Papers in Science* 2014, 1–6.

- Spina, M. vd.** (2003). Isolation of intact aortic valve scaffolds for heart-valve bioprotheses: Extracellular matrix structure, prevention from calcification, and cell repopulation features. *J Biomed Mater Res A* 67A, 1338–1350.
- Srokowski, E.M., & Woodhouse, K. A.** (2017). “2.20 Decellularized Scaffolds,” in *Comprehensive Biomaterials II* (Elsevier), 452–470.
- Stamm, C. vd.** (2004). Biomatrix/Polymer Composite Material for Heart Valve Tissue Engineering. *Ann Thorac Surg* 78, 2084–2093.
- Steinberg, Z.L. vd.** (2017). Maternal and Fetal Outcomes of Anticoagulation in Pregnant Women With Mechanical Heart Valves. *J Am Coll Cardiol* 69, 2681–2691.
- Steinhoff, G. vd.** (2000). Tissue engineering of pulmonary heart valves on allogenic acellular matrix conduits: in vivo restoration of valve tissue. *Circulation* 102, III50-5.
- Stella, J.A., & Sacks, M. S.** (2007). The Digital Leaflet: Quantitative Image Analysis and 3-D Digital Reconstruction of the Aortic Valve Leaflet. in *ASME 2007 Summer Bioengineering Conference* (American Society of Mechanical Engineers), 233–234.
- Stewart, B.F. vd.** (1997). Clinical Factors Associated With Calcific Aortic Valve Disease. *J Am Coll Cardiol* 29, 630–634.
- Stock, U.A. vd.** (2000). Tissue-engineered valved conduits in the pulmonary circulation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 119, 732–740.
- Syedain, Z.H. vd.** (2013). Decellularized Tissue-Engineered Heart Valve Leaflets with Recellularization Potential. *Tissue Eng Part A* 19, 759–769.
- Takagi, K. vd.** (2006). In Vivo Recellularization of Plain Decellularized Xenografts With Specific Cell Characterization in the Systemic Circulation: Histological and Immunohistochemical Study. *Artif Organs* 30, 233–241.
- Tao, G., Kotick, J. D., & Lincoln, J.** (2012). “Heart Valve Development, Maintenance, and Disease,” in, 203–232.
- Theodoridis, K. vd.** (2015). Successful matrix guided tissue regeneration of decellularized pulmonary heart valve allografts in elderly sheep. *Biomaterials* 52, 221–228.
- Tominaga, Y. vd.** (2022). Clinical significance of diastolic dysfunction on outcomes of pulmonary valve replacement for pulmonary insufficiency. *J Thorac Cardiovasc Surg* 164, 1156–1164.

- Tudorache, I. vd.** (2013). Orthotopic Replacement of Aortic Heart Valves with Tissue-Engineered Grafts. *Tissue Eng Part A* 19, 1686–1694
- Tudorache, I. vd.** (2016). Decellularized aortic allografts versus pulmonary autografts for aortic valve replacement in the growing sheep model: haemodynamic and morphological results at 20 months after implantation. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery* 49, 1228–1238.
- Unger, P. vd.** (2011). Management of multiple valve disease. *Heart* 97, 272–277.
- Urciuolo, A., & De Coppi, P.** (2018). Decellularized Tissue for Muscle Regeneration. *Int J Mol Sci* 19, 2392.
- Vaduganathan, M. vd.** (2022). The Global Burden of Cardiovascular Diseases and Risk: A Compass for Future Health. *Journal of the American College of Cardiology* 80 (25), 2361-2371.
- Van Nooten, G.** (2006). Acellular porcine and kangaroo aortic valve scaffolds show more intense immune-mediated calcification than cross-linked Toronto SPV(R) valves in the sheep model. *Interact Cardiovasc Thorac Surg* 5, 544–549.
- van Steenberghe, M. vd.** (2018). Porcine pulmonary valve decellularization with NaOH-based vs detergent process: preliminary in vitro and in vivo assessments. *J Cardiothorac Surg* 13, 34.
- Vásquez-Rivera, A. vd.** (2019). Spectral fingerprinting of decellularized heart valve scaffolds. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 214, 95–102.
- VeDepo, M.C. vd.** (2017a). Recellularization of decellularized heart valves: Progress toward the tissue-engineered heart valve. *J Tissue Eng* 8, 204173141772632.
- VeDepo, M.C. vd.** (2017b). Species-specific effects of aortic valve decellularization. *Acta Biomater* 50, 249–258.
- Vesely, I., & Noseworthy, R.** (1992). Micromechanics of the fibrosa and the ventricularis in aortic valve leaflets. *J Biomech* 25, 101–113.
- Vincentelli, A. vd.** (2007). In vivo autologous recellularization of a tissue-engineered heart valve: Are bone marrow mesenchymal stem cells the best candidates? *J Thorac Cardiovasc Surg* 134, 424–432.

- Wilson, G.J. vd.** (1995). Acellular matrix: A biomaterials approach for coronary artery bypass and heart valve replacement. *Ann Thorac Surg* 60, S353–S358.
- Wollmann, L.C.F. vd.** (2011). Efeito da criopreservação e/ou da descellularização na matriz extracelular de condutos valvados porcinos. *Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular* 26, 490–496.
- World Health Organization** (2021). Cardiovascular diseases (CVDs). [Erişim: 04.07.2023, [https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds))].
- Xu, C.C., Chan, R. W., & Tirunagari, N.** (2007). A Biodegradable, Acellular Xenogeneic Scaffold for Regeneration of the Vocal Fold Lamina Propria. *Tissue Eng* 13, 551–566.
- Xu, H. vd.** (2014). Comparison of Decellularization Protocols for Preparing a Decellularized Porcine Annulus Fibrosus Scaffold. *PLoS One* 9, e86723.
- Ye, X. vd.** (2013). The Effect of Heparin-VEGF Multilayer on the Biocompatibility of Decellularized Aortic Valve with Platelet and Endothelial Progenitor Cells. *PLoS One* 8, e54622.
- Yesin, M.** (2015). Mekanik protez kalp kapağı olan hastalarda akut koroner sendromlara yaklaşım. (Yayınlanmış Tıpta Uzmanlık Tezi). İstanbul Kartal Koşuyolu Yüksek İhtisas Eğt. Ve Arş. Hastanesi, Kardiyoloji Ana Bilim Dalı, İstanbul.
- Yu, T. vd.** (2021). Nonglutaraldehyde treated porcine pericardium with good biocompatibility, reduced calcification and improved Anti-coagulation for bioprosthetic heart valve applications. *Chemical Engineering Journal* 414, 128900.
- Yu, Y. vd.** (2016). Decellularized scaffolds in regenerative medicine. *Oncotarget* 7, 58671–58683.
- Zhou, J. vd.** (2019). Surface biofunctionalization of the decellularized porcine aortic valve with VEGF-loaded nanoparticles for accelerating endothelialization. *Materials Science and Engineering: C* 97, 632–643.
- Zhou, J. vd.** (2010). Impact of heart valve decellularization on 3-D ultrastructure, immunogenicity and thrombogenicity. *Biomaterials* 31, 2549–2554.
- Zhou, J.** (2015a). Promoting endothelialization on decellularized porcine aortic valve by immobilizing branched polyethylene glycolmodified with cyclic-RGD peptide: an *in vitro* study. *Biomedical Materials* 10, 065014.

Zhou, J. vd. (2015b). Development of Decellularized Aortic Valvular Conduit Coated by Heparin–SDF-1 α Multilayer. *Ann Thorac Surg* 99, 612–618.

