T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SIĞIR PERİKARDINDAN ELDE EDİLEN EKSTRASELÜLER MATRİKSİN KARDİYAK DOKU MÜHENDİSLİĞİ UYGULAMALARI İÇİN DESELÜLERİZASYONU VE KARAKTERİZASYONU

Ayşenur ATAK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

Danışman

Prof. Dr. Banu MANSUROĞLU

Eş Danışman

Dr. Yüksel ÇETİN

Ağustos, 2025

T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SIĞIR PERİKARDINDAN ELDE EDİLEN EKSTRASELÜLER MATRİKSİN KARDİYAK DOKU MÜHENDİSLİĞİ UYGULAMALARI İÇİN DESELÜLERİZASYONU VE KARAKTERİZASYONU

Ayşenur ATAK tarafından hazırlanan tez çalışması 06.08.2025 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Banu MANSUROĞLU Yıldız Teknik Üniversitesi Danışman	Dr. Yüksel ÇETİN TÜBİTAK MAM Başkan Yardımcılığı Yaşam Bilimleri Eş-Danışman

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Banu MANSUROĞLU, Danışman
Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Dr. Öğr. Üyesi Günseli KURT GÜR, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Dr. Öğr. Üyesi Samet UÇAK, Üye
İstanbul Aydın Üniversitesi _____

Danışmanım Prof. Dr. Banu MANSUROĞLU ve eş danışmanım Dr. Yüksel Çetin sorumluluğunda tarafımca hazırlanan "Sığır Perikardından Elde Edilen Ekstraselüler Matriksin Kardiyak Doku Mühendisliği Uygulamaları İçin Deselülerizasyonu ve Karakterizasyonu" başlıklı çalışmada veri toplama ve veri kullanımında gerekli yasal izinleri aldığımı, diğer kaynaklardan aldığım bilgileri ana metin ve referanslarda eksiksiz gösterdiğimi, araştırma verilerine ve sonuçlarına ilişkin çarpıtma ve/veya sahtecilik yapmadığımı, çalışmam süresince bilimsel araştırma ve etik ilkelerine uygun davrandığımı beyan ederim. Beyanımın aksinin ispatı halinde her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Ayşenur ATAK

İmza

Bu çalışma, “TÜSEB tarafından 33390” numaralı projesi ile desteklenmiştir.

Aileme

ve

tüm sevdiklerime

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca her adımımda bilgi ve tecrübeleriyle yolumau aydınlatan danışmanım Prof. Dr. Banu MANSUROĞLU'na destekleri için teşekkür ederim.

Bu süreçte ilgisini, bilgisini hiçbir zaman esirgemeyen, tez dönemimdeki en büyük şanslarımdan birisi olan Eş danışmanın Dr. Yüksel Çetin'e çok teşekkür ederim.

Her deneyime benimle beraber canla başla koşan, bu süreçteki diğer en büyük şanslarım akademik ablalarım Gülşah ÇETİN ve Ayşen GÜNGÖR'e teşekkür ederim.

Hayatı paylaşmaktan keyif aldığım ve beraber büyüdüğüm arkadaşlarım Ayşenur KURŞUNLU'ya, Samet Can MEMİŞOĞLU'na, Eren Can KILIÇ'a, Hazal İlayda Çelikler'e Rabia KIRCI'ya, Didem Karaduman'a ve Sude Nur AFACAN'a teşekkür ederim.

Hayatımın en büyük şansları olan canım babam Atakan Atak'a, canım annem Emine ATAK'a ve kız kardeşim Semanur ATAK'a beni her daim destekledikleri ve sevgileriyle sarmaladıkları için çok teşekkür ederim.

Sadece bu süreçte değil hayatımın her anında sevgisiyle, desteğiyle bana güç veren sevgilim Cem YILMAZ'a teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim boyunca TÜBİTAK 2210-A Yurt İçi Genel Yüksek Lisans Burs Programı tarafından desteklendiğim için TÜBİTAK'a teşekkürlerimi sunarım.

Ayşenur ATAK

İÇİNDEKİLER

SİMGE LİSTESİ viii

KISALTMA LİSTESİ ix

ŞEKİL LİSTESİ xi

TABLO LİSTESİ xiii

ÖZET xiv

ABSTRACT xvi

1 GİRİŞ 1

1.1 Literatür Özeti 1

1.2 Tezin Amacı 3

1.3 Hipotez 4

2 GENEL BİLGİLER 5

2.1 Kardiyak Doku Mühendisliği: Mevcut Durum, İhtiyaçlar ve Zorluklar 5

2.2 Kardiyak Doku Mühendisliğinde Kullanılan Biyomalzemeler 6

2.3 ECM Yapısı ve Görevleri 8

2.4 dECM Kaynakları, Formları ve Uygulamaları 10

2.5 dECM'nin Kardiyak Doku Mühendisliğinde Uygulamaları ve Klinik Kullanımı.. 13

2.5.1 Sığır Perikardı Kaynaklı dECM 15

2.6 Deselülerizasyon 16

2.6.1 Fiziksel Deselülerizasyon Yöntemleri 18

2.6.2 Kimyasal Deselülerizasyon Yöntemleri 23

2.6.3 Enzimatik Deselülerizasyon Yöntemleri.....29

2.6.4 Alternatif Deselülerizasyon Yöntemleri.....32

2.6.5 dECM'nin Sterilizasyonu.....35

2.6.6 dECM' nin Moleküler ve Yapısal Karakterizasyonu.....35

3 MATERYAL VE METOD **38**

3.1 Materyal ve Laboratuvar Ekipmanları.....38

3.1.1 Tez Çalışmasında Kullanılan Kimyasallar ve Materyaller.....38

3.1.2 Tez Çalışmasında Kullanılan Laboratuvar Ekipmanları.....40

3.1.3 Tez Çalışmasında Kullanılan Sarf Malzemeler.....41

3.1.4 Tez Çalışmasında Kullanılan Solüsyonların Hazırlanması.....42

3.2 Metod.....47

3.2.1 Sığır Perikardlarının Temini, Hazırlanması ve Saklanması.....47

3.2.2 Deselülerizasyon Yönteminin Optimizasyonu.....48

3.2.3 dECM'nin Moleküler Karakterizasyonu.....52

3.2.4 dECM'nin Yapısal Karakterizasyonu……..…….58

4 SONUÇ **62**

4.1 dECM'nin Moleküler ve Yapısal Özelliklerinin Değerlendirilmesi.....62

4.1.1 dECM'nin Moleküler Karakterizasyonu…….……..62

4.1.2 dECM'nin Yapısal Karakterizasyonu……..…….75

4.2 Öneriler ve Tartışma.....78

KAYNAKÇA **84**

SİMGE LİSTESİ

rpm	Dakikada Dönüş Hızı
g	Gram
pH	Hidrojen Gücü
kHz	Kilohertz
lt	Litre
MPa	Megapaskal
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
mg	Miligram
ml	Mililitre
M	Molar
ng	Nanogram
N	Normal
^{o}C	Santigrat
U	Ünite
xg	Yerçekiminin Katı

KISALTMA LİSTESİ

3B	Üç Boyutlu
ATCC	Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu
ASB-14	Amidosülfobetain-14
CHAPS	3-[(3-kolamidopropil) dimetilamonyum]-1-propansülfonat
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
dECM	Deselülerize Ekstraselüler Matriks
DMMB	1,9-dimethylmethylene blue
DNaz	Deoksiribonükleaz
dsDNA	Çift iplikli DNA
ECM	Ekstraselüler Matriks
EDTA	Etilendiamintetraasetik Asit
FBS	Fetal Bovine Serum
GAG	Glikozaminoglikan
H&E	Hematoksilen ve Eozin
HCl	Hidroklorik Asit
hMSC	İnsan Mezenkimal Kök Hücresi
IPSC	İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücre
KVH	Kardiyovasküler Hastalık
L929	Fare Fibroblast Hücre Hattı
MEM	Minimum Esansiyel Medium
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür
NaOH	Amonyum Hidroksit
NTIRE	Termal Olmayan Geri Dönüşümsüz Elektroporasyon
PANI	Polianilin
PBS	Fosfat Tamponlu Su Çözeltisi
PCL	Polikaprolakton
PEDOT	Poli(3,4-etilendioksitiyofen)
PEG	Polietilen Glikol

PEST	Penisilin-Streptomisin
PGS	Poli(gliserol sebakat)
PINIPAM	Poli(N-izopropilakrilamid)
PLGA	Poli(laktik-ko-glikolik asit)
PMSF	Fenilmetilsülfonil Florür
PPy	Polipirol
RNaz	Ribonükleaz
SDC	Sodyum Deoksikolat
SDS	Sodyum Dodeasil Sülfat
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
TEM	Transmisyon Elektron Mikroskobu
WST-1	Suda Çözünen Tetrazolyum Tuzu 1

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1 Kardiyak doku mühendisliğinde kullanılan biyomalzemeler. ……..8

Şekil 2.2 ECM yapısı ve kompoziasyonu……. 10

Şekil 2.3 dECM bazlı biyomateryal uygulamaları……..…….…..…...11

Şekil 2.4 dECM kaynakları ve deselülerizasyon yöntemleri……...……13

Şekil 2.5 Doku ve organ deselülerizasyonunda uygulanan farklı yaklaşımlar……17

Şekil 3.1 Yağdan arındırılmış perikard dokularının fibröz ve seröz yüzleri……..48

Şekil 3.2 Kandan arındırılmış, yıkama sonrasında kesilen perikard dokular…....48

Şekil 3.3 Sığır perikardının deselülerizasyon metodlarının akış şeması…….……51

Şekil 3.4 Deselülerizasyon metodunda kullanılan 2 cm x 3 cm sığır perikardları..52

Şekil 3.5 0,2 cm x 0,2 cm kesilmiş perikard parçaları……52

Şekil 3.6 Manyetik karıştırıcı içerisindeki sığır perikardları……..52

Şekil 3.7 A) Kolajen analizinde 24 saatlik proteinaz K sindirimi öncesi ve B) Proteinaz K sindirimi sonrası örnekler…….…..54

Şekil 3.8 dECM parçalarının GAG analizi için liyofilizasyonu…….…55

Şekil 3.9 A) Kolajen analizinde 24 saatlik papain sindirimi öncesi ve B) Papain sindirimi sonrası çözünmüş örnekler……..56

Şekil 3.10 A) Histolojik analizlerde kullanılan örnekler ve B) Dokuların fiksasyon ve dehidrasyon süreci…….…59

Şekil 4.1 A) M1 B) M2 C) M3 D) M4 E) M5 için deselülerizasyon işlemi süresince ortama salınan DNA kinetiği ……...….64

Şekil 4.2 A) M1 B) M2 C) M3 D) M4 E) M5 için deselülerizasyon işlemi süresince ortama salınan protein kinetiği……...…….……...65

Şekil 4.3 PK ve dECM örneklerine ait DNA analizi sonuçları (n=3, p <0,001)…..66

Şekil 4.4 A) Hidroksiprolin standard grafiği B) PK ve dECM örneklerine ait kolajen analizi sonuçları (n=3, (p < 0,001))……....69

Şekil 4.5 A) Kondoritin Sülfat A stadart grafiği B) PK ve dECM örneklerine ait GAG analizi sonuçları (n=3, (p<0,001)……..71

Şekil 4.6 PK ve dECM iskelelerinin L929 hücreleri üzerindeki etkisi……..73

Şekil 4.7 dECM iskele ekstraktlarının L929 hücre canlılığı üzerine etkilerinin MTT hücre canlılığı analizi (n=3, p <0,001)…….……...74

Şekil 4.8 Farklı deselülerizasyon metodlarının genetik materyal uzaklaştırılması ve ECM korunumuna etkilerini değerlendirmek amacıyla A) H & E, B) Alcian blue, C) Fast green ve D) Safranin O boyamaları gerçekleştirilmiştir (Büyütme 40x). ……....76

Şekil 4.9 PK (Büyütme 2000X) ve dECM (Büyütme 500X ve 2000X) SEM görüntüleri……..…77

TABLOLAR

Tablo 2.1 Kardiyak doku mühendisliğinde deselülerize patentli ürünler……...15

Tablo 2.2 Fiziksel deselülerizasyon yöntemleri……..……..22

Tablo 2.3 Kimyasal deselülerizasyon yöntemleri…….….27

Tablo 2.4 Enzimatik deselülerizasyon yöntemleri...……..31

Tablo 2.5 Deselülerizasyonda alternatif yöntemler……...……34

Tablo 3.1 Deselülerizasyon işlemlerinde kullanılan perikard dokuların elde edildiği sığırlara ait bilgiler……..……47

Tablo 3.2 Hidroksiprolin analizinde kullanılan örnek miktarları……..54

Tablo 3.3 Liyofilizasyon öncesi ve sonrası örneklerin ağırlıkları…….……55

Tablo 4.1 Farklı metodlarda kullanılan örneklerin deselülerizasyon öncesi ve sonrası ağırlıkları……..……..72

ÖZET

Sığır Perikardından Elde Edilen Ekstraselüler Matriksin Kardiyak Doku Mühendisliği Uygulamaları İçin Deselülerizasyonu ve Karakterizasyonu

Ayşenur ATAK

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Prof. Dr. Banu MANSUROĞLU

Eş-Danışman: Dr. Yüksel ÇETİN

Uygun donör eksikliğine bağlı olarak organ/doku talebinin artması ve immün reddi ya da biyouyumluluk konusundaki sınırlamalar, hasarlı dokunun rejenerasyonu ve yeniden yapılanmasını mümkün kılan biyomimetik, anti-immünojenik ve fonksiyonel 3B organoidlerin geliştirilmesine yol açmıştır. Bu çalışmanın amacı, kardiyak rejenerasyonu ve yeniden yapılanmayı desteklemek amacıyla, biyouyumlu, anti-immünojenik, dayanıklı ve biyomimetik mikroçevre bileşenleri içeren deselülerize sığır perikardından (dECM) oluşan bir biyomalzeme geliştirmektir. Sığır perikardının deselülerizasyon yöntemi; mekanik, fiziksel ve kimyasal yöntemler kullanılarak optimize edilmiştir. dECM'nin karakterizasyonu için hücresel kalıntıların uzaklaştırılmasını değerlendirmede hematoksilen-eozin boyası, proteoglikanları belirlemede safranin O boyası, kolajen için fast green boyası ve glikozaminoglikanlar için alcian blue boyaları kullanılmıştır. dECM, morfolojik olarak SEM görüntüleme ile, biyokimyasal olarak ise DNA, RNA ve GAG analizleriyle değerlendirilmiştir. Perikard yapısından immünojenik hücresel

bileşenlerin uzaklaştırılması hedeflenirken, mekanik destek, yapısal bütünlük, esneklik ve hidrasyon sağlayan biyomimetik bileşenlerin korunması amaçlanmıştır.

Elde edilen bulgular, deselülerize sığır perikardının kardiyak doku mühendisliği için umut verici bir iskele materyali olma potansiyelini ortaya koymaktadır. dECM'nin yapısal ve moleküler karakterizasyonu, doğal ekstrasellüler matriksi taklit etme yeteneğini ve miyokardiyal doku onarımı için uygun bir rejeneratif uygulama adayı haline getirmektedir. Ayrıca bu karakterizasyon süreci, dECM bazlı biyomürekkeplerin geliştirilmesi için değerli bir kaynak sunmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Deselülerizasyon, dECM, Sığır Perikardı, Biyouyumluluk, Kardiyak Doku Mühendisliği

ABSTRACT

Decellularization and Characterization of Bovine Pericardium Derived Extracellular Matrix for Cardiac Tissue Engineering Applications

Ayşenur ATAK

Department of Molecular Biology and Genetics
Master of Science

Supervisor: Prof. Dr. Banu MANSUROĞLU
Co-supervisor: Dr. Yüksel ÇETİN

The increasing demand for organ/tissue due to the shortage of suitable donors, and the limitations of immune rejection or biocompatibility have led to the development of biomimetic, anti-immunogenic, functional 3D organoids that enable regeneration and reconstruction of damaged tissue. The aim of this study was to develop a biomaterial composed of decellularized bovine pericardium (dECM) which was biocompatible, anti-immunogenic, durable, and contains biomimetic microenvironment components to support cardiac regeneration and reconstruction. The decellularization method of bovine pericardium was optimized using mechanical, physical, and chemical methods. For characterization of the dECM, hematoxylin and eosin staining for cellular removal; safranin O staining for proteoglycans, fast green staining for collagen, and alcian blue staining for glycosaminoglycans were used to evaluate structural composition. dECM was morphologically analyzed with SEM imaging, and biochemically through DNA, RNA, and GAG analysis. While removing immunogenic cellular materials from the pericardial structure, the aim was to preserve biomimetic components, which provide mechanical support, structural integrity, elasticity, and hydration.

The obtained findings revealed the potential of decellularized bovine pericardium as a promising scaffold material for cardiac tissue engineering. The comprehensive characterization of the dECM highlights its ability to mimic the native extracellular matrix, making it a suitable candidate for myocardial tissue repair as a regenerative application. Moreover, this characterization process provides a valuable foundation for the development of dECM-based bioinks.

Keywords: Decellularization, dECM, Bovine Pericard, Biocompatibility, Cardiac Tissue Engineering

1
GİRİŞ

1.1 Literatür Özeti

Kardiyovasküler hastalıklar (KVH), günümüzde dünya genelinde morbidite ve mortalitenin başlıca nedenlerinden biri olup, her yıl yaklaşık 17,9 milyon kişinin ölümüne yol açarak tüm ölümlerin %32'sini oluşturmaktadır. Türkiye'de ise KVH, erişkin nüfusta en yaygın görülen kronik hastalık olarak öne çıkmakta ve özellikle ileri yaş grubunda önemli bir halk sağlığı sorunu teşkil etmektedir. Stres, hipertansiyon, sigara, alkol tüketimi, beslenme alışkanlıkları, yaşam tarzı, yaş ve genetik faktörler KVH ortaya çıkmasının sebepleri olarak söylenebilir [1]. KVH'nın tedavisi için ilaçların kullanımında ve cerrahi uygulamalarda meydana gelen dezavantajların üstesinden gelmek amacıyla daha güncel ve etkili tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesi gerekmektedir [2], [3].

Kardiyak doku mühendisliği, kalpte meydana gelen hasarı onarmak ve kalp dokusunun rejenerasyonunu ve rekonstrüksiyonunu sağlamak amacıyla biyomalzeme ve hücre temelli yaklaşımları birarada kullanan multidisipliner bir alandır [4], [5]. Kardiyak rejenerasyonunun sağlanmasında ve hücresel davranışların düzenlenmesinde 3 boyutlu (3B) iskele yapılar oldukça dikkat çekmektedir. Kardiyak hücrelerinin sahip olduğu sınırlı rejenerasyon yeteneği, kardiyak doku mühendisliğinde karşılaşılan en büyük problemdir. Uygun iskelenin kullanımı, hücreler ve biyosinyaller, kardiyak rejenerasyonu sürecinin kilit noktasıdır [6]. Kardiyak doku mühendisliği alanında yapılan çalışmaların esas hedefi, biyolojik işlevselliğe sahip biyouyumlu malzemelerin kalbin yapısal ve mekanik özelliklerini mimik ederek veya destekleyerek farklı tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesidir [5], [7]. Bu amaçla çeşitli doğal ve sentetik malzemeler, kardiyak doku mühendisliği çalışmalarında değerlendirilmektedir.

Canlı dokulardan elde edilen veya biyolojik olarak sentezlenen biyomalzemeler, doğal ekstraselüler matriks (ECM) yapısını ve mekanik özelliklerini içerdiğinden başarılı sonuçlar vermektedir. Bu amaçla sıklıkla kolajen, fibrin, aljinat ve deselülerize ekstraselüler matriks (dECM) gibi biyomalzemeler kullanılmaktadır [2], [3], [4], [5], [7]. Hücre yapışması, göçü ve proliferasyonunda etkili olan biyolojik sinyalleri sağlamanın yanı sıra biyouyumlu ve biyobozunur özelliğe sahiptirler [2], [3], [4], [5], [7]. Fakat doğal biyomalzemelerin mekanik dayanıklılıkların zayıf oluşu, kalbin ritmik hareketleri ve mevcut gerilim altında yetersiz kalmalarına sebep olmaktadır. Biyomalzemeler, aynı veya farklı türden donörlerden elde edilebildiklerinden, immünojenik tepkilerin oluşmasına da sebep olmaktadırlar. Sentetik biyomalzemeler, laboratuvar ortamında kontrollü şartlar altında üretilen polimerlerdir [2], [3], [4], [5], [7]. Üretim parametreleri değiştirilerek bu biyomalzemelerin yüzeyleri, bozunma süreleri ve oranları, mekanik özellikleri modifiye edilebilmektedir. Polietilen glikol, polilaktik ko-glikolik asit, polikaprolakton, poli N-izopropilakrilamid, polipirol, poligliserol sebakat, polialanin ve poli 3,4-etilendioksitiyofen sıklıkla çalışılan sentetik biyomalzemelerdir [2], [3], [4], [5], [7]. Bu biyomalzemeler, doğal biyomalzemelerden farklı olarak hücresel aktiviteyi düzenleyecek herhangi bir biyolojik sinyal içermemektedirler. Aynı zamanda bozunduklarında ortaya çıkan ürünler, toksik etki gösterebilmektedir [2], [3], [4], [5], [7].

Deselülerizasyon, hücresel ve nükleer bileşenlerin uzaklaştırılırken ECM yapısının korunması amaçlayan bir yöntemdir. Son zamanlarda çeşitli dokuların veya organların deselülerizasyonu yoluyla elde edilen dECM iskeleleri, kardiyak doku mühendisliği çalışmalarında oldukça dikkat çekmektedir [8]. Deselülerizasyon işlemlerinde kullanılan donma-çözme, hidrostatik basınç ve elektroporasyon gibi uygulamalar hücre zarlarının mekanik olarak parçalanmasını sağlamaktadır. Deterjan, hipertonik/hipotonik çözücüler ve asit/baz uygulamaları ise hücre zarlarının parçalanmasıyla hücre içeriğinin dış ortama geçişine aracılık etmektedir. Deselülerizasyon işlemlerinde oldukça önemli olan enzimatik uygulamalar ise özellikle genetik materyalin parçalanmasında oldukça önemlidir. Vakum destekli deselülerizasyon, apoptoz desteekli deselülerizasyon ve süper kritik akışkanlar deselülerizasyon işlemlerinde kullanılan daha yeni ve alternatif yaklaşımlardır. Deselülerizasyon işlemi süresince fiziksel, kimyasal ve enzimatik metodlar yaygın

olarak kullanılmakta ancak hedef dokunun biyolojik kompozisyonu ve yapısal bütünlüğü göz önünde bulundurularak yöntem titizlikle belirlenmelidir [9].

Sığır perikardı, biyolojik olarak tolere edilebilirlik, trombojenik etki göstermeme, homojen doku parçası sağlama ve yüksek miktarda elde edilebilirlik özellikleri sayesinde kardiyak doku mühendisliği çalışmalarında sıklıkla tercih edilen biyomalzemedir. Sığır perikardının deselülerizasyonu ile elde edilen dECM iskeleleri, yama şeklinde, liyofilize halde, hidrojel formda ve kalp dokusu üretimi için biyomürekkep haline getirilerek kardiyak doku mühendisliği uygulamalarında kullanılabilmektedir [10], [11], [12]. Perikard kaynaklı dECM üretiminde karşılaşılan esas zorluk, hücresel bileşenlerin etkin bir şekilde uzaklaştırılmasını sağlarken dokuya özgü yapısal bütünlüğü koruyacak uygun deselülerizasyon metodunun belirlenmesidir. Deselülerizasyon işleminde, hücresel ve nükleer bileşenlerin yeterli miktarda uzaklaştırılamaması immün reaksiyon riskini artırmakta, diğer yandan kolajen ve glikozaminoglikan (GAG) gibi ECM yapısal bileşenleri sıklıkla zarar görmektedir. Bu durum, elde edilen dECM iskele yapının mekanik dayanıklılığını ve biyolojik işlevselliğini olumsuz yönde etkilemektedir. Yapılan literatür taramasında, sığır perikardının deselülerizasyonu çeşitli metodolojik yaklaşımlarla gerçekleştirilmiştir ancak henüz yapısal bütünlük korunurken tamamen deselülerizasyonun sağlanamadığı görülmüştür [10], [13], [14].

Bu tez çalışmasında, kardiyak doku hasarında kullanılmak amacıyla sığır perikardının deselülerizasyonunda hücresel ve nükleer bileşenler etkili olarak uzaklaştırılırken, ECM'ye ait yapısal bütünlüğün korunması amacıyla beş farklı metod uygunlanarak, en başarılı sonucu sağlayan yöntemin belirlenmesi hedeflenmiştir. Sığır perikardının deselülerizasyonu ve ECM yapısının karakterizasyonu, dECM'nin histolojik analizleri, SEM ile yüzey morfolojisi, DNA miktarı, kolajen miktarı, GAG miktarı ve biyouyumluluğu belirlenerek etkinliği değerlendirilmiştir [10], [13], [14].

1.2 Tezin Amacı

Sığır perikardı, kardiyak doku mühendisliği çalışmalarında kullanılan önemli bir kaynaktır. Sığır perikardının deselülerizasyonuyla elde edilen dECM iskeleleri, mekanik destek ve hücresel süreçlerin düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır.

Sığır perikardının deselülerizasyon başarısı, maksimum oranda hücresel ve nükleer bileşenlerin uzaklaştırılmasının yanı sıra kolajen ve GAG gibi ECM yapısal moleküllerinin korunmasıyla ilişkilidir.

Bu tez çalışmasında, kardiyak doku hasarında kullanılmak amacıyla sığır perikardının deselülerizasyonu ile hücresel ve nükleer bileşenler etkili olarak uzaklaştırılırken, ECM'ye ait yapısal bütünlüğün korunması amacıyla deselülerizasyon metodunun optimizasyonu ve karakterizasyonu amaçlanmıştır.

1.3 Hipotez

Bu çalışmada, literatürde mevcut deselülerizasyon metodunun optimize edilmesi ve elde edilen dECM iskele yapısının karakterize edilmesi amaçlanmıştır. Literatürde çeşitli deselülerizasyon yöntemleri olmasına rağmen, bu yöntemlerin sahip olduğu sınırlamalar mevcuttur. Deselülerizasyon yöntemlerinin optimize edilmesiyle sığır perikardından elde edilen dECM'nin, kardiyak doku mühendisliği çalışmalarında biyomürekkep hazırlığı için hammadde ve 3B biyobaskı uygulamaları için değerli bir biyomalzeme olarak işlev görebileceği düşünülmektedir.

2
GENEL BİLGİLER

2.1 Kardiyak Doku Mühendisliği: Mevcut Durum, İhtiyaçlar ve Zorluklar

KVH, günümüzde oldukça sık görülen bir sağlık sorunudur. KVH oluşumunda hipertansiyon, obezite, sigara kullanımı, hareketsiz yaşam tarzı, alkol tüketimi, yetersiz beslenme, cinsiyet, ırk, gentik yatkınlık ve yaş gibi faktörler etkili olmaktadır [15]. Doku mühendisliği ve rejeneratif tıp alanındaki gelişmelere rağmen, KVH hayat kalitesinin azalmasına ve dünya çapında yüksek oranda ölümlere sebep olmaktadır. 2011 yılında Birleşmiş Milletler'in KVH'leri küresel sağlık açısından büyük bir problem olarak tanımlaması, bu alanda yapılan çalışmaların hız kazanmasına sebep olmuştur. Dünya Sağlık Örgütü Raporunda 2021 yılı itibariyle dünya çapında yaklaşık 500 milyon kişinin KVH olduğu ve 2023 yılı içerisinde 20,5 milyon kişinin KVH sebebiyle hayatını yitirdiği açıklanmıştır [1].

Kardiyak doku mühendisliğinde, kalp yetmezliği, miyokard enfarktüsü, konjenital kalp defektleri gibi KVH'lerin sebep olduğu hasarların tedavisi için çeşitli stratejiler ve tedaviler geliştirilmektedir [2], [3], [4], [5], [7]. KVH tedavisinde kullanılan cerrahi, farmakolojik ve kalp nakli gibi geleneksel yöntemler, cerrahi riskler, ilaçların sebep olduğu yan etkiler ve nakil kaynaklı immünolojik reaksiyonlar gibi dezavantajlara sahiptir [2], [3], [4], [5], [7]. Geleneksel tedavi yöntemlerinin yetersiz kalması, kalp kasının geri dönüşümsüz hasarı, kapakçıklardaki fonksiyon bozuklukları gibi KVH'lerin sebep olduğu mevcut zorlukların üstesinden gelmek için çeşitli araştırmalar yapılmalıdır [2], [3], [4], [5], [7].

Yetişkin insan kalbinin kendini yenileme kapasitesinin sınırlı olması, hasar görmüş kalp dokularının onarımı amacıyla rejeneratif tedavi stratejileri ve doku mühendisliği yaklaşımlarının geliştirilmesini gerekli kılmaktadır [16]. Rejeneratif tıbbın amaçlarından birisi kişinin kendi hücrelerinden köken alan yapay kalplerin oluşturulmasıdır. Fakat organ üretim süreci oldukça komplikedir ve üretilen yapı tam olarak fonksiyonellik gösterememektedir. Bu yüzden KVH'lerin tedavisinde rejenerasyon potansiyelini artırmak ve fonksiyonu düzenlemek amacıyla biyouyumlu 3B iskelelerin üretimi son zamanlarda oldukça dikkat çeken bir yaklaşım olarak görülmektedir. Kardiyak rejenerasyonunun etkin bir şekilde gerçekleşmesinde uygun iskele varlığı, hücreler ve biyosinyaller kilit rol oynamaktadır [17]. Kardiyak doku mühendisliği, kalp rahatsızlıkları ve organ bağışında yetersiz donör sorununu çözmek amacıyla miyokardın yapısal, işlevsel özelliklerini ve fonksiyonunu taklit edebilen, kardiyak hücrelerin rejenerasyonunu ve farklılaşmasını teşvik eden iskelelerin üretilmesini amaçlamaktadır. İskele yapı üretimi için çeşitli sentetik ve doğal malzemeler bu amaçla geliştirilmektedir [18]. Sentetik yapılar, kalbin karmaşık yapısını ve işlevini taklit etmekte yetersiz kaldığından son araştırmalar altertatif doğal biyomalzeme kaynaklarının değerlendirilmesine odaklanmıştır [17].

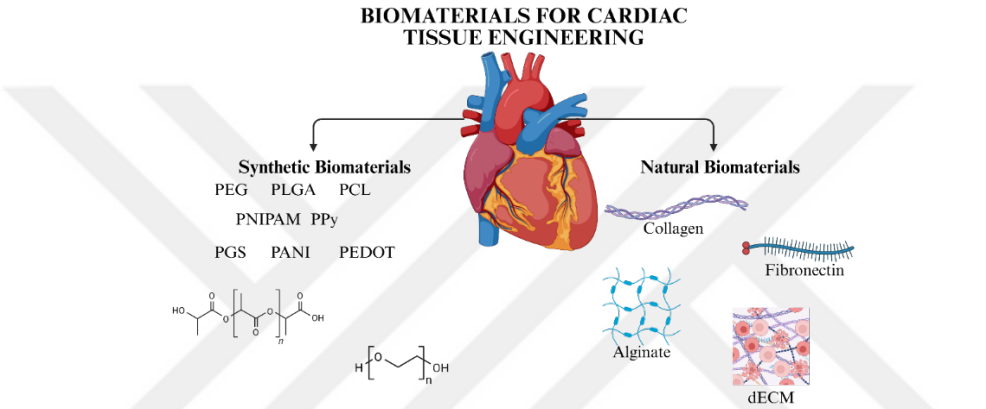
2.2 Kardiyak Doku Mühendisliğinde Kullanılan Biyomalzemeler

Kardiyak doku mühendisliği çalışmaları, biyolojik işlevsellik gösteren biyouyumlu ve anti-immunojenik malzemeleri, kalbin yapısal, işlevsel ve mekanik özelliklerini taklit edebilecek veya destekleyebilecek şekilde geliştirmeyi amaçlamaktadır. Kardiyak hücrelerin sınırlı rejenerasyon yeteneği, bu süreçte karşılaşılan en büyük problemlerden biridir [2], [3], [4], [5], [7]. Biyomalzemelerin sağladığı yapısal destek ve doku mühendisliği stratejileriyle kalp dokusunun yenilenmesi veya organ transplantasyonu için uygun kaynak ve cihazların geliştirilmesi sağlanabilir. Bu yaklaşımlar ışığında, hastalara daha güvenli, etkili ve sürdürülebilir tedavilerin uygulanmasıyla yaşam kalitesinin artması hedeflenmiştir [2], [3], [4], [5], [7] Son yıllarda multidisipliner yaklaşımlarla geliştirilen biyomalzemeler, hasar görmüş kardiyak dokunun onarılmasında çeşitli hücre büyüme faktörlerinin taşınmasıyla hücre tutunması, proliferasyonu ve kardiyomiyosit entegrasyonunun desteklemesiyle fonksiyonel ve aynı zamanda biyomimetik ECM yapısal

bütünlüğüyle mekanik destek sağlayarak tedavilerin geliştirilmesinde büyük önem kazanmaktadır [2], [3], [4], [5], [7].

Kardiyak doku mühendisliğinde kullanılan biyomalzemeler (Şekil 2.1), doğal kaynaklı biyomalzemeler ve sentetik biyomalzemeler olarak iki kategoride incelenmektedir. Doğal biyomalzemeler, doğadan veya çeşitli organizmalardan elde edilmektedirler [2]. Bu malzemeler biyolojik olarak parçalanabilirliğin yanı sıra biyouyumludurlar. Sentetik biyomalzemeler ise çeşitli kimyasal yöntemlerin kullanımı ve mühendislik teknikleriyle üretilmektedirler [4]. Üretim süreçlerinin adım adım kontrol edilebilmesi, sentetik biyomalzemelerin mekanik özelliklerinin ve yapılarının kullanım amacına göre modifiye edilmesine olanak sağlamaktadır [3]. Kardiyak doku mühendisliğinde kullanılan yaygın sentetik biyomalzemeler iletkenlik, biyobozunurluk ve biyouyumluluk açısından farklılık göstermektedir. İletken olmayan polietilen glikol (PEG) bazlı kopolimerler, poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA), polikaprolakton (PCL), poli(N-izopropilakrilamid) (PNIPAM) ve polipirol (PPy), poli(gliserol sebakat) (PGS), polianilin (PANI) ve poli(3,4-etilendioksitiyofen) (PEDOT) gibi iletken polimer sentetik malzemeler, kardiyak doku mühendisliğinde yaygın olarak iskelele üretmek üzere tek tek ve çeşitli kombinasyonlarda kullanılmaktadır. Fibrinojen, kolajen, aljinat, ve dECM kardiyak doku mühendisliğinde yaygın olarak kullanılan doğal biyomalzemelerdir [4]. Aljinat, hidrojel gibi gözenekli yapıların üretilmesinde olduça etkili bir biyomalzemedir ve yüksek yoğunlukta hücre yapışmasını ve proliferasyonunu desteklemektedir [2]. Kolajen ve jelatin, biyouyumluluklarının yanı sıra biyobozunur özellikleri sebebiyle kardiyak yama yapısında sıklıkla kullanılmaktadırlar [2]. Fibrin, biyouyumlu yapısı, işlenmesinin ve modifikasyonunun kolay oluşu, enjekte edilebilirlik özellikleri sebebiyle iskele ve hidrojel üretiminde sıklıkla kullanılan bir diğer biyomalzemedir [2], [5]. Deselülerize doku ve organlardan elde edilen ECM iskele yapılar, nispeten kardiyak doku mühendisliğinde diğer biyomalzemelere kıyasla daha yeni bir yaklaşımdır [2], [3], [4], [5], [7]. Deselülerizasyon yöntemiyle dokudan maksimum oranda hücrelerin uzaklaştırılmasına ek olarak yüksek oranda ECM yapısnın korunmasıyla elde edilen dECM iskeleler, hasarlı kardiyovasküler dokuları onarmak amacıyla klinikte kullanılabilmektedir [2], [3], [4], [5], [7]. Özellikle dokuların karmaşık mimarileri göz önüne alındığında, doku mimarisini en iyi şekilde temsil edecek ve

hücresel mekanizmaların gerçekleşmesiyle doku onarımına katkıda bulunacak stratejilerin geliştirilebilmesi için son dönemlerde dECM tabanlı biyomürekkep ve 3B biyoyazdırma stratejileri dikkat çekmektedir [2], [3], [4], [5], [7]. 3B biyoyazdırma stratejisiyle hücre içeren yapılar üretilebilmekte, doğal doku ve organların yapısal ve fonksiyonel özelliklerine sahip yapılar üretilmektedir. Fakat kullanılan biyomürekkebin viskozite, bozunma hızı ve biyouyumluluğu biyoyazdırma sürecini sınırlandırmaktadır. Bu yüzden KVH'lerin tedavisinde ve sağlık alanında kullanılmak üzere biyomürekkep materyallerinin optimizasyonuna ihtiyaç vardır [18].



Şekil 2.1 Kardiyak doku mühendisliğinde kullanılan biyomalzemeler. (BioRender)

2.3 ECM Yapısı ve Görevleri

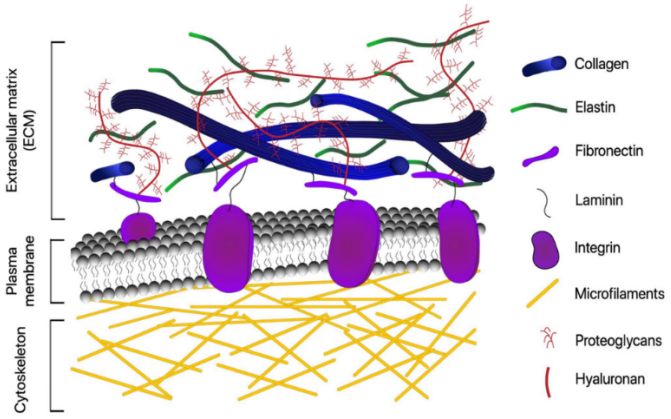
ECM, birçok makromolekülün bir araya gelmesiyle oluşan ve dokunun mekanik özelliklerinin sürdürülmesine katkı sağlayan 3B ağ yapıdır. ECM, hücre yapışması, göçü, çoğalma, farklılaşma ve apoptoz gibi temel süreçleri modüle etme yeteneğine sahip çeşitli protein, büyüme faktörü ve biyoaktif molekülleri yapısında bulundurmaktadır [19]. ECM, bulunduğu dokunun fiziksel, kimyasal ve biyolojik özelliklerini etkilemektedir [20]. ECM yapısı ve mekanik özellikleri, pH ve CO_2 konsantrasyonu gibi mikroçevre koşullarına ek olarak doku fonksiyonundan da doğrudan etkilenmektedir, bu sebeple her doku için ECM kompozisyonu farklılık göstermektedir [21]. Tüm hücreler, çeşitli sinyallerin varlığında ECM yapısında bulunan makromolekülleri sentezlemekte ve ECM ile etkileşerek gelişimsel ve fizyolojik süreçlerde önemli rol oynamaktadır [22].

ECM, yapısında bol miktarda kolajenle birlikte elastin, fibronektin, laminin, glikoproteinler, proteoglikanlar ve GAG gibi proteinleri, polisakkaritleri ve su moleküllerini barındırmaktadır (Şekil 2.2) [22]. Kolajen ve elastin, yapısal fibröz proteinler, fibronektin, laminin, tenascin, vitronektin ve integrin yapıştırıcı proteinler olarak ECM yapısında bulunmaktadır. Kolajenin, üçlü sarmal yapıdan oluşan monomer yapısı glisin, prolin ve hidroksiprolinden oluşan spesifik dizilime sahiptir, bağ dokusu hücreleri tarafından sentezlenir ve eksositoz aracılığıyla ECM'ye salgılanır. Memelilerde oldukça bol miktarda bulunmakla birlikte sahip olduğu çekme mukavemeti sebebiyle hücre adezyonu ve dokunun gelişimini etkilemektedir [23]. Fibril oluşturan kolajen tip I ve kıkırdak kolajen tip II, dokuların çoğunda ECM'nin ana bileşeni olarak yer almaktadır. Kolajen tip I ve kolajen tip II, diğer ECM proteinleriyle ve proteoglikanlarla kurdukları etkileşim sayesinde büyük fibriler yapıların oluşumunu sağlamaktadırlar [24].

Proteoglikanlar, aynı veya farklı türde bir veya birkaç GAG zincirinin kovalet etkileşimiyle çekirdek proteine bağlanmasıyla oluşan yapıdır ve dokudaki önemli biyomoleküller arasında yer almaktadır. GAG'lar, negatif yüklü ve uzun zincirli karbonhidrat molekülleridir [13]. Kondoritin sülfat, dermatan sülfat, heparan sülfat, heparin, keratan sülfat ve hyaluronan olmak üzere 6 gruba ayrılmaktadırlar. GAG yapısında sülfat gruplarının yerleşimi, molekülün yapısı ve uzunluğu, GAG moleküllerinin kendine has özellikler kazanmasını sağlamaktadır [23]. Proteoglikanlar ve GAG'lar, hücre sinyal iletiminde rol oynamanın yanı sıra büyüme faktörleri, sitokinler ve kemokinler gibi yapıların yüzey reseptörleriyle etkileşerek hücrelere uygun sinyallerin iletilmesine aracılık etmektedirler. Ek olarak hücre göçü, farklılaşması, hücrenin ECM'ye yerleşimi ve doku organizasyonu süreçlerinde de rol oynamaktadırlar [24]. Fibronektin ve laminin yapışkan glikoproteinlerdir, integrinlerle etkileşim kurarak hücre-ECM iletişiminde rol oynamakta, hücre yapışması, göçü ve çoğalması gibi hücresel süreçleri etkilemektedir [13]. Elastin ise, dokuya esneklik sağlayan hidrofobik proteindir. Elastin özellikle akciğer, elastik kıkırdak ve damar yapılarında bol miktarda bulunmaktadır. Düz kas hücreleri ve sınırlı miktarda fibroblastlar tarafından elastinler salgılanabilmektedir [23].

Doğal dokunun karmaşık mikroçevresi göz önüne alındığında, biyomalzemelerle mimik edilmesi oldukça zordur, bu nedenle, doğal dokulardan elde edilen dECM,

dokulara özgü özellikleri taşıdığından kardiyak doku mühendisliği ve rejeneratif tıp alanındaki uygulamalarda başarı potansiyelini artırmaktadır [13].

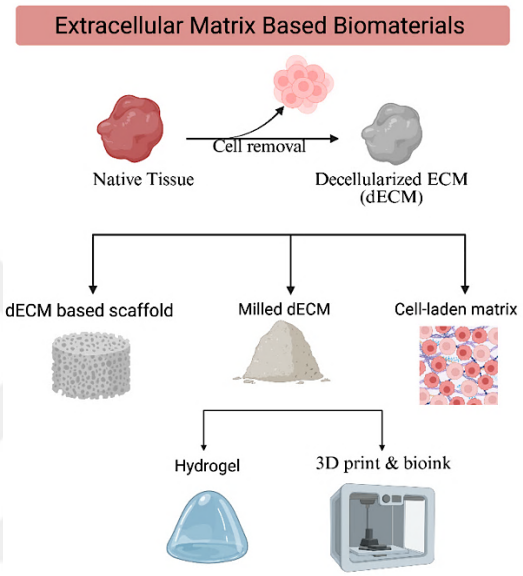


Şekil 2.2 ECM yapısı ve kompozisyonu [25].

2.4 dECM Kaynakları, Formları ve Uygulamaları

dECM, köken aldığı kaynağa göre minor farklar göstermesine rağmen temelde kolajen ve elastin içeren fibriler protein ve proteoglikan, fibronektin, laminin gibi glikoproteinlerden oluşmaktadır [7]. dECM, iskelele, dECM tozları, hidrojeller, dECM biyomürekkepleri ve 3B biyoyazdırma gibi çalışmanın içeriğine ve amacına yönelik olarak farklı formlarda kullanılabilmektedir (Şekil 2.3). Dondurarak kurutmanın ardından dokuların toz haline gelmesiyle üretilen dECM tozları doku mühendisliği çalışmalarında oldukça sık kullanılmaktadır. Dondurarak kurutma sürecinde parçacık boyutu, çözünürlük gibi parametrelere dikkat edilmelidir. dECM tozlarının hidrojlellere dönüştürülmesi, enjekte edilebilir ve 3B yazdırılabilir matrislerin oluşturulmasına da katkıda bulunmaktadır. Hidrojeller, su tutabilme kapasiteleri, esneklik sağlama özelliklerinin yanı sıra dokuya özgü biyokimyasal özellikleri de korumaktadır [26], [27]. dECM bazlı biyomürekkepler, dokuya özgü mikroçevreyi yansıtmanın yanı sıra, çeşitli hücrelerin 3B ortama uygun şekilde aktarılmalarına da aracılık etmektedirler. dECM mürekkeplerinin kullanımındaki esas zorluk, deselülerizasyon işlemi süresince ECM yapısındaki proteinlerin kaybına bağlı olarak gelişen düşük viskozitedir. Bu dezavantajın üstesinden gelmek amacıyla genellikle aljinat, ipek proteinleri, kolajen, fibrin, hyaluronik asit, jelatin gibi doğal biyomalzemelerin yanı sıra çeşitli sentetik biyomalzemelerin biyomürekkep yapısına eklenmesi, sıklıkla tercih edilen bir stratejidir [26], [27]. Karşılaşılan bir diğer zorluk, deselülerizasyonun yetersiz olmasından kaynaklanan

immün reaksiyonların tetiklenmesi ve dECM mikroçevresinin değişmesiyle doku rejenerasyonunun ve rekonstrüksiyonunun sağlanmasında dECM iskelenin yetersiz kalmasıdır. Diğer yönden deselülerizasyon ve biyomürekkep üretimi işlemlerinin dECM 3B iskele yapının mekanik özelliklerini etkilemesidir. Bu nedenle yöntemlerinin optimizasyonu, dECM tabanlı biyomürekkeplerin biyolojik ve mekanik özelliklerinin korunmasına katkıda bulunabilir [10], [11].

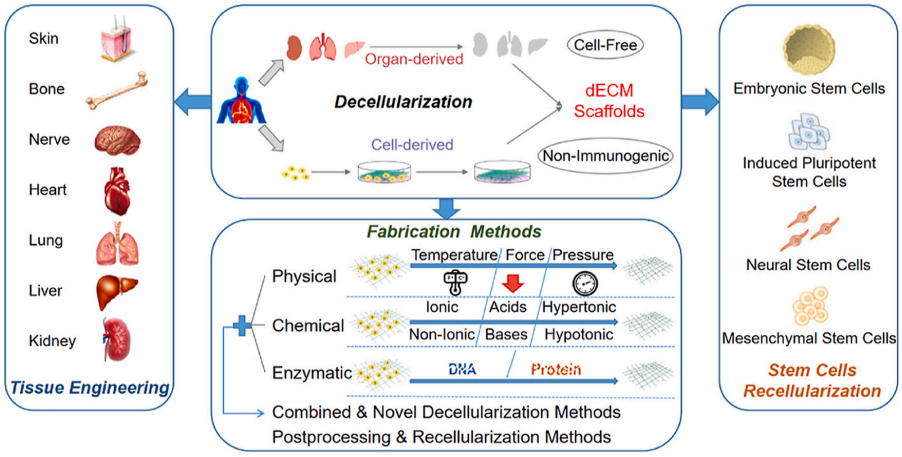


Şekil 2.3 dECM bazlı biyomateryal uygulamaları. (BioRender)

Yüksek oranda deselülerizasyonun gerçekleşmesi ve 3B yapısal mimarinin korunmasıyla elde edilen kardiyak doku orjinli dECM, klinik uygulamalarda umut vaad eden biyomalzemedir. Organ veya dokuların deselülerizasyonu sonucu elde edilen iskeleler, kardiyak dokuda meydana gelen hasarın onarılması için hücrelere uygun ortam sağlamaktadır. dECM iskeleleri greft olarak işlev görebilir, belirli hücreler bu greftlerin üzerine yeniden ekilip çoğaltılabilir. Hasar almış veya kısmen işlevini kaybetmiş dokuların rejenerasyonu dECM iskeleleri yapısındaki biyoaktif moleküller sayesinde ve hücre-matriks etkileşiminde rol almaları sebebiyle dokunun farklılaşmasının yanı sıra hücre yapışması ve çoğalması gibi süreçlerde aktif rol oynar [19]. dECM iskeleleri, ECM kökenine göre otojen dECM, allojenik dECM ve ksenojenik dECM olarak 3 sınıfta incelenebilir. Otojen dECM kullanımında immün tepki görülmemesine rağmen, kişinin kendi dokularından elde edildiğinden dokunun eldesi sürecinde oluşabilecek cerrahi komplikasyonlar, doku

kaynağı ve miktarının sınırlı olması gibi zorluklar mevcuttur. Bu durum, dECM iskelesi olarak ksenojenik veya allojenik kaynakların değerlendirilmesini gerektirmiştir. Allojenik veya ksenojenik dokulardan dECM eldesi, donörde sağlık problemlerine sebep olabilir, donör dokunun yapısı farklılık gösterebilir ve deselülerizasyon işleminin yetersiz olması halinde dECM'de kalan nükleer bileşenlerle birlikte proteinler immün tepkilerin oluşmasına sebep olabilir [27]. İnsan doku veya organlarından köken alan dECM'ler, hayvansal kaynaklardan türetilen dECM'lere kıyasla daha az immünojenik olsa da kadavralardan, hasarlı doku veya organlardan elde edilebilmektedirler. dECM iskele üretiminde otolog veya allojenik kaynakların sınırlı olduğundan, hayvansal kaynaklı doku veya organların kullanımını içeren ksentransplantasyon uygulamaları da alternatif olarak görülmektedir. dECM'nin köken aldığı hayvansal kaynağın türü, dECM'nin kimyasal bileşimini, biyouyumluluğunu, biyobozunurluğunu ve mekanik özelliklerini etkilemektedir. Sığır ve domuz perikardları kolay ulaşılabilirlikleri sebebiyle, dECM iskele üretiminde yaygın olarak kullanılsa da, otolog uygulamalar için bağışıklık rekasiyonlarını, kalsifikasyonu ve sitotoksik etkileri azaltmak amacıyla çeşitli uygulamalara ihtiyaç duyulmaktadır [19].

Doku hasarının onarımını sağlamak için dECM'lerde hücreler kültürlenerek yüksek miktarda ve dokuya özgü ECM'nin eldesini sağlamaktadırlar. Hücrelerin kültürlenmesi ve başkalaşımı ile türetilen ECM'ler, organ/doku kaynaklı ECM'lere kıyasla daha az karmaşık doğal ve biyouyumlu greftlerin üretimine olanak sağlamaktadırlar. Bu amaçla kültürlenmiş hücrelerin kullanımı bağışıklık tepkisi, donor eksikliği ve patojen transferi gibi sınırlamaların üstesinden gelmenin yanı sıra büyük ölçekli üretim ve modelleme olanağı sağlamaktadır [6]. Fakat organ/doku türevli ECM'ler, gözenek yapısı, kolajen liflerinin düzenlenişi gibi ECM'ye ait komplike yapısal ve mekanik özellikleri hücre kaynaklı ECM'lere göre daha iyi koruyabildiklerinden doğal ECM yapısını daha iyi temsil etmektedirler [27]. Farklı doku mühendisliği uygulamaları için dECM kaynakları ve deselülerizasyon yöntemleri Şekil 2.4'te özetlenmiştir.



Şekil 2.4 dECM kaynakları ve deselülerizasyon yöntemleri [27].

2.5 dECM'nin Kardiyak Doku Mühendisliğinde Uygulamaları ve Klinik Kullanımı

dECM iskeleler, kardiyak doku mühendisliği uygulamalarında kalp kapakçıklarının yerini alacak şekilde, kalp dokusundaki hasarlı bölgeleri onarmak ve kardiyak rejenerasyonunu indüklemek amacıyla kalp yamaları olarak, hasarlı damarların onarımı veya yeni damar oluşumunu teşvik etmek amacıyla kan damarı greftleri olarak kullanım potansiyeline sahiptirler [28], [29]. Çeşitli çalışmalarda dECM iskeleleri, yeniden hücrelendirme içeren ve içermeyen uygulamalarla kalp kapakçıklarının yerini alma, kan damar grefti üretme, kalp yaması ve ileriki aşamada kalp naklinde kullanılma potansiyelleri bakımından değerlendirilmiştir [17].

Wang ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, yeni doğmuş fare kalbinden elde edilen dECM, hidrojel formunda miyokard enfarktüsü olan farelere enjekte edildiğinde kardiyak fonksiyonunun iyileştiği, damar oluşumunun arttığı, kalpteki şekil bozulması ve infalamasyonun azaldığı görülmüştür [30]. Yapılan bir başka çalışmada ise miyokard enfarktüsü sıçan modellerinde, domuz kalp kasından elde edilen deselülerize dECM'den oluşan yama uygulamasının ardından kalbin pompalama gücünde ve kasılma yeteneğinde artış olduğu, ek olarak yamanın yeni damar oluşumunu indüklediği gözlemlenmiştir [31].

dECM iskeleleri üzerine çeşitli hücrelerin ekiminini içeren pekçok çalışma literatürde yer almaktadır. Embriyonik kök hücreler (ESC), mezenkimal kök hücreler (MSC) ve indüklenmiş pluripotent kök hücreler (IPSC) dECM üzerine

ekilerek yeniden hücrelendirme yaklaşımlarıyla bu hücrelerin kalp hücrelerine farklılaşma yeteneklerini araştıran çalışmalar mevcuttur [17]. 2016 yılında yapılan bir çalışmada deselülerize kalp matriksi iskele olarak kullanılmış ve insan IPSC'lerinin yapıya dahil edilmesiyle kardiyak yama oluşturulmuştur. Sıçanlara yapılan implantasyon sonucunda tasarlanmış yamanın kalp fonksiyonlarında iyileşme sağladığı gözlemlenmiştir [32]. Yapılan bir başka çalışma ise iki farklı kaynaktan gelen kardiyak greftlerinin karşılaştırılması ve yeniden hücrelendirilmesi süreçlerini içermektedir. 2018 yılında yapılan çalışmada domuz miyokardı ve insan perikardından elde edilen dECM'ler kullanılarak tasarlanan greftler, domuz yağ dokusu mezenkimal kök hücreleri (pATMSC) ile yeniden hücrelendirilmiştir. Perikardiyal dokudan köken alan greftin hücre göçü, dağılımı açısından miyokardiyal dECM greftine göre daha başarılı olduğu ve perikardiyal dECM greftinin kalp fonksiyonlarını desteklediği sonucuna ulaşılmıştır [33].

Kardiyak doku mühendisliği uygulamaları için deselülerizasyon işlemiyle nükleer bileşenlerin etkili şekilde uzaklaştırılmasına ilaveten ECM'nin bileşimi ve yapısının maksimum oranda korunduğu metodlar oluşturulmalıdır [34]. Hücresel materyalin etkili bir şekilde uzaklaştırılması immünojenisiteyi azaltırken, biyokimyasal ve biyomekanik özelliklerin korunması ise hücre-dECM iskele arasında uygun etkileşimin kurulmasında kilit rol oynamaktadır. Deselülerizasyon başarısının yetersiz olmasından kaynaklı genetik materyalin elde edilen dECM yapısındaki varlığı, özellikle in vivo implantasyon uygulamalarda bağışıklık sisteminin aktivasyonu ile enflamasyon, doku reddi veya fibrozisi gibi istenmeyen durumların oluşmasına sebep olabilmektedir [35]. Kardiyak doku mühendisliğindeki zorluklardan birisi de, kardiyak dECM'nin yeniden hücrelendirilmesi hedefidir. Bu süreçte kök hücrelerin perfüzyonu, doğrudan ekimi veya her iki yaklaşımın kombine uygulanması tercih edilebilmektedir [36]. İn vitro kardiyak dokuların üretimi ise kardiyak doku mühendisliğinde karşılaşılan bir diğer zorluktur. Tasarlanmış kardiyak dokuların aslına uygun şekilde üretilebilmesi için iskelelerin, hücrelerin ve üretim sürecini module eden biyofiziksel-biyokimyasal sinyallerin optimum şekilde bir araya gelmesi gerekmektedir [36].

Henüz kardiyak doku mühendisliği uygulamalarında tam işlevsellik gösteren insan kalplerinin üretimi sağlanamamış olsa da hasarlı miyokard yapısının onarılmasında kullanılabilecek dECM tabanlı kardiyak yamaların üretimi için çeşitli çalışmalar

mevcuttur (Tablo 2.1). Ksenogreftlerin yukarıdaki bölümlerde tartışıldığı üzere kardiyak doku mühendisliği uygulamalarında sıklıkla kullanılması, immünojenik etkiler sebebiyle çeşitli endişeler barındırsa da yapılan in vivo çalışmalar, araştırmacıların çeşitli stratejilerle daha az bağışıklık tepkisine sebep olan ksenograftların üretimini sağlayabildiğini göstermiştir. Sonuç olarak dECM'lerin kardiyak doku mühendisliği alanında klinik kullanımlarının yaygınlaştırılması noktasında daha çok çalışmaya ihtiyaç vardır.

Tablo 2.1 Kardiyak doku mühendisliğinde deselülerize patentli ürünler.

Ürün adı	**Üretici**	**Doku kaynağı**	**İşlemler**	**Referans**
Matrix Patch	Auto Tissue Berlin GmbH	At perikardı	Deselülerize	[37]
PhotoFix	CryoLife Kennesaw,Georgia,USA	Sığır perikardı	Deselülerize ve fotooksidasyonlu	[37]
dCELL vascular patch	Tissue Regenix Group PLC	Domuz perikardı	SDS ve proteaz inhibitörleriyle deselülerize	[37]

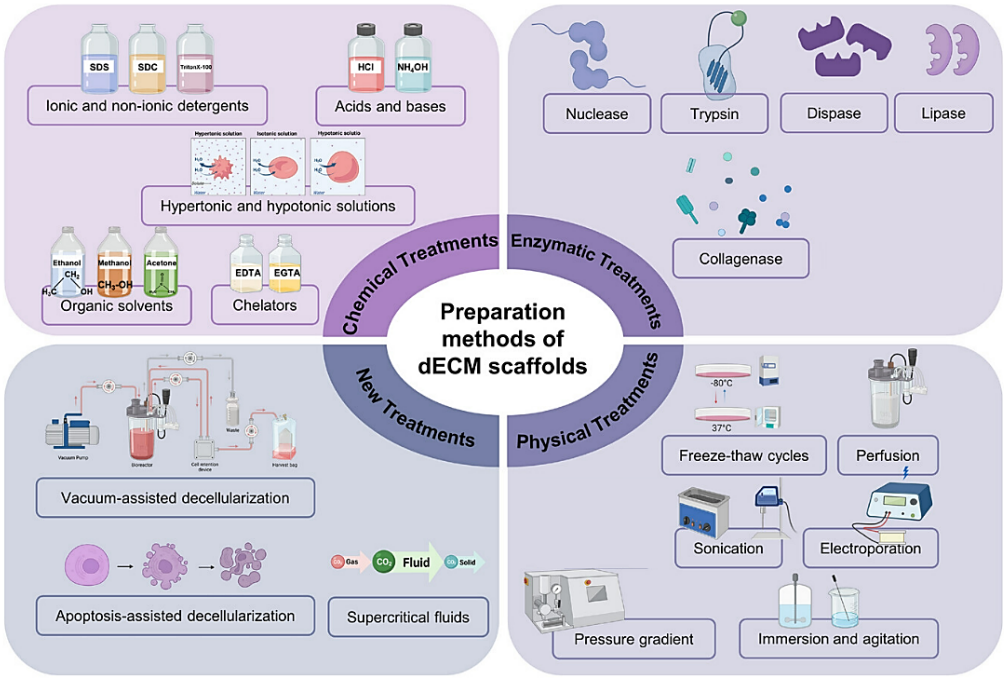
2.5.1 Sığır Perikardı Kaynaklı dECM

Kalbi saran fibroseröz zar olan sığır perikardı içten dışa doğru seröz, fibröz, epiperikardiyal tabakalardan oluşmaktadır [12] Sığır perikardının seröz yüzeyinde mezotelyal hücreler yer alırken yapının esnekliğinde rol oynayan ve kolajen-elastin içeren fibröz katmanda fibroblastlar bulunmaktadır. Tüm bu yapı, dışarıdan epiperiardiyal katman ile sarılmıştır ve ECM moleküllerinden oluşmaktadır [38]. Sığır perikardının yapısında kolajen tip I, oldukça bol miktarda bulunmaktadır. Ek olarak çeşitli glikoproteinler ve glikozaminoglikanlar da sığır perikadının yapısında yer almaktadır. Sığır perikardının yapısındaki kolajen liflerinin sıkı düzenlenişi, dokunun sertliğinin ve dayanıklılığının ana sebebidir [39]. Buna ilave olarak, biyolojik olarak tolere edilebilirliği, non trombojenik özelliği, deselülerizasyon için homojen doku parçası eldesine olanak sağlama ve yüksek miktarlarda elde edilebilme gibi avantajlara sahiptir. Uygun deselülerizasyon metodlarının kullanımıyla dECM üretimi için sığır perikardı çok değerli bir kaynak olarak

görülmektedir. Sığır perikardının sahip olduğu histolojik ve mekanik özellikler, kalp-damar cerrahisi ve kardiyak doku mühendisliği alanında dECM temelli iskelelerin oluşturulmasında önemli bir potansiyele sahiptir [40], [42]. Perikardın deselülerizasyonu süreciyle elde edilen dECM iskelesi, kardiyak progenitor hücrelerin hücresel bağlanma, çoğalma, göç ve farklılaşma süreçlerini etkilemektedir. dECM iskele, mekanik destek sağlamanın yanı sıra rejeneratif hücrelerin ve biyoaktif moleküllerin taşınmasında da kullanım potansiyeline sahiptir. Kardiyak doku mühendisliği çalışmalarında çeşitli dokuların deselülerizasyonu yoluyla üretilen ECM iskeleleri, biyoprotez kalp kapakçıkları ve yama üretimi sürecinde büyük potansiyel vaat etmektedir [41] .

2.6 Deselülerizasyon

Deselülerizasyonda amaç, ECM'ye ait biyokimyasal ve biyomekanik özelliklerin korunmasının yanı sıra doku veya organlardan hücresel ve nükleer bileşenlerin uzaklaştırılmasıdır [42]. Bu süreçte doku veya organın özelliklerinin korunması oldukça önemlidir. Deselülerizasyon işlemiyle elde edilen dECM, kolajen, elastin, fibronektin, laminin gibi yapıları içermektedir. Bu yapılar, doğal mimarinin korunmasının yanı sıra hücrelerin bağlanması, etkileşimi, fonksiyonu ve çoğalması için uygun mikroçevrenin oluşturulmasına katkı sağlamaktadır. dECM iskelelerin sahip olduğu fizikokimyasal sinyaller ve biyoljik özelliklerin korunması, bu iskelelerin mekanik destek işlevi görmelerinin yanı sıra çeşitli hücrelerin taşınmasına da aracılık edebilmektedir [27].



Şekil 2.5 Doku ve organ deselülerizasyonunda uygulanan farklı yaklaşımlar [27]**.**

Deselülerizasyon işleminin başarısı, elde edilen dECM iskele yapısının uygun deselülerizasyon yöntemi ile elde edilmesine dayanmaktadır. Doku veya organın deselülerizasyonu sürecinde kullanılan deselülerizasyon ajanı, yoğunluk, lipit içeriği, kalınlık gibi pekçok parametre göz önüne alınarak seçilmelidir. Bu süreçte kullanılan kimyasal-biyolojik ajanlar, ECM yapı ve bileşimini değiştirmenin yanı sıra, ECM ultra yapısının bozulmasına da yol açabilmektedir [43]. Deselülerizasyon işleminde kullanılan kimyasal ajanların büyük ölçüde hücresel bileşenleri uzaklaştırmadaki etkinliği bilinse de bu ajanlar kullanım süreleri ve konsantrasyonları göz önüne alındığında oldukça agresif uygulamalar olarak değerlendirilmektedir. Bu noktada en sık karşılaşılan problemlerden birisi çeşitli kimyasal deselülerizasyon ajanlarının yüksek konsantrasyonda ve uzun süreli kullanımına bağlı olarak kolajen liflerinin parçalanması ve ECM'nin mekanik özelliklerinin zayıflamasıdır. Bir diğer zorluk ise kimyasal ajanların kullanımına bağlı olarak elastin liflerinin zarar görmesiyle mevcut elastikiyetin kaybedilmesi ve yapının esnekliğinin azalmasıdır [43], [44]. Ek olarak GAG miktarı ve yapısı da, deselülerizasyon süreçlerinde azalmakta ve zarar görmektedir. Tüm bu olumsuzluklar göz önüne alındığında deselülerize edilen ECM iskelenin hangi amaçla kullanılacağının iyi anlaşılması, uygun deselülerizasyon ajanı ve metodlarının belirlenmesi ve optimize edilmesi oldukça önemlidir [43], [44].

ECM yapısı, yoğunluğu, morfolojisi ve kalınlığı doku orjinine veya organa bağlı olarak değişebildiğinden, uygulanan deselülerizasyon metodları da dECM'nin klinik uygulamasında hedeflenen doku veya organ tipine göre optimize edilmelidir [20]. Deselülerizasyon işlemi temelde fiziksel, kimyasal, enzimatik ve/veya kombinasyonları uygulanarak birkaç gün veya birkaç hafta sürebilmektedir [14]. Yaygın olarak kullanılan çeşitli deselülerizasyon yöntemleri (Şekil 2.5) aşağıda açıklanmıştır.

2.6.1 Fiziksel Deselülerizasyon Yöntemleri

Tekrarlanan donma-çözme döngüleri, hidrostatik basınç, elektroporasyon, perfüzyon, mekanik çalkalama, sonikasyon gibi fiziksel yöntemler, yaygın olarak kullanılan fiziksel deselülerizasyon yöntemleridir (Tablo 2.2). Fakat fiziksel deselülerizasyon yöntemleri, hücresel materyallerin uzaklaştırılmasında tek başlarına yeterli olamamaktadır ve bu nedenle kimyasal veya enzimatik yöntemlerle birlikte uygulanarak deselülerizasyon verimi artırılmaktadır [9].

Tekrarlanan Donma-Çözme Döngüleri: Donma çözme yöntemi, hücre içerisindeki suyun donarak buz kristali oluşturması ve tekrarlanan döngüler şeklinde uygulandığında hücre zarının zarar görmesi ve hücre lizisi oluşumuna dayanmaktadır [21]. Bu yaklaşım, organ/doku veya hücre temelli dECM iskelesi üretiminde kullanılmakta, böylece kimyasal kalıntı riskini azaltmanın yanı sıra biyokimyasal yapının daha az zarar görmesi sağlamaktadır. Bu yöntemde donma-çözme hızı, işlem süresi ve tekrarlanan döngüler, deselülerizasyon verimliliğini doğrudan etkilemektedir. Donma-çözme yöntemi, aynı zamanda gözenekli yapının oluşmasına katkı sağlayarak deselülerizasyon işlemi süresince kimyasal yöntemlerin ECM üzerindeki etkisini artırmaktadır [27]. Donma işleminin hızlı şekilde gerçekleşmesi, ECM'nin yapısal özelliklerine zarar verebilmektedir. ECM yapısının korunması ve aynı zamanda hücre lizisinin yüksek verimlilikle gerçekleşebilmesi için trehaloz gibi çeşitli kriyoprotektanların kullanımı tercih edilebilmektedir [6]. Donma-çözme döngülerinin tek başına uygulanması, genetik materyali uzaklaştırmada oldukça yetersizdir, bu yüzden çeşitli yöntemlerin kombinasyonu gerektirmektedir [9]. Bu uygulama, ECM ultra yapısına büyük oranda zarar vermese de tekrarlayan döngüler ECM yapısında hasar oluşmasına sebep olabilmektedir [21]. Bunu engellemek amacıyla donma-çözme döngü

sıcaklıkları kontrollü bir şekilde değiştirilmelidir [45]. 2019 yılında yapılan bir çalışmada, sığır perikardının deselülerizasyonu için donma-çözme yöntemiyle birlikte %1 Triton X-100 (h/h) ve %0,5 Sodyum Deoksikolat (SDC) (a/h) uygulaması yapılmıştır. Donma-çözme döngüsünün çözme sürecinin ardından yapılan deiyonize su yıkamasının hücresel bileşenlerin uzaklaştırılmasında etkili olduğu ve deselülerizasyon işleminin sonunda ECM yapısının korunurken genetik materyalin etkili bir şekilde uzaklaştırıldığı belirtilmiştir [46]. 2015 yılında yapılan farklı bir çalışmada sığır perikardının deselülerizasyonu için donma-çözme döngülerine ek olarak nükleaz uygulaması gerçekleştirilmiş, ardından Triton X-100 ve SDC yıkaması yapılmıştır. Donma çözme döngüleri, enzimatik sindirimi kolaylaştırmış ve deterjanların dokuya nüfuz etmesini artırmıştır. Deselülerizasyon sonucunda kolajen ve elastin miktarının ve yapısının yüksek oranda korunduğu, %90'ın üzerinde DNA'nın ve RNA'nın uzaklaştırıldığı sonucuna ulaşılmıştır [47].

Hidrostatik Basınç: Doku içerisindeki hücrelerin, yüksek hidrostatik basınç altında parçalanması ve hücresel bileşenlerin serbest kalması, fiziksel deselülerizasyon yöntemlerindeki bir diğer yaklaşımdır [6]. Bu yöntemde uygulama süresinin uzunluğu ve hidrostatik basıncın yüksekliği, ECM yapısal proteinlerinin denatürasyonuna sebep olarak elde edilen dECM iskelenin mekanik özelliklerinin zayıflamasına yol açabilmektedir [9], [50]. Bu yöntem, kontaminasyona oldukça açıktır ve hücresel bileşenlerin etkili şekilde uzaklaştırılması için uzun süreli yıkama ve durulama adımları gerektirebilmektedir [48]. Hidrostatik basınç uygulamasının kimyasal veya enzimatik yaklaşımlarla birlikte uygulanması, hücresel materyallerin daha etkili bir şekilde uzaklaştırılmasını sağlamaktadır [42]. 2022 yılında yapılan bir çalışmada seröz domuz perikardının deselülerizasyonu 1000 MPa hidrostatik basınç 10 dakika uygulandıktan sonra enzim uygulaması yapılmıştır. Deselülerizasyon sonucunda dokunun yapısının ve mekanik özelliklerinin korunduğu ve hücre çekirdeklerinin uzaklaştırıldığı belirlenmiştir [49]. 2021 yılında yapılan bir başka çalışmada, sığır dorsalis pedis arterleri 1000 MPa basınçta 10 dakika deselülerize edilmiş ve ardından enzimatik uygulama gerçekleştirildiğinde %99 oranında DNA uzaklaştırıldığı ve mekanik özelliklerin korunduğu kaydedilmiştir [50].

Termal Olmayan Geri Dönüşümsüz Elektroporasyon (NTIRE): Doku deselülerizasyonu yöntemi, mikrosaniyede dokuya uygulanan elektrik şoklarının

hücre zarı boyunca elektrik potansiyelini değiştirmesiyle oluşan mikrogözeneklerin hücrenin homeostazisini bozarak hücre ölümüne sebep olması prensibine dayanmaktadır. Bu yöntemde kullanılan prob boyutunun küçük olması, uygulamada kullanılacak doku boyutunu sınırlandırmaktadır [51]. Bu yöntem, hücre zarının geçirgenliğinin artmasına sebep olan gözenekler yardımıyla DNA, RNA ve proteinler gibi moleküllerin hücre apoptozunu indüklemesine sebep olmaktadır [9]. Böylece, hücre ölümüne yol açmasının yanı sıra ECM bütünlüğünün korunmasını sağlamaktadır [48]. Bu yaklaşım, diğer fiziksel deselülerizasyon yaklaşılarına kıyasla oldukça yenidir ve optimize edilmesi gerektirmektedir [42]. 2016 yılında rat kalbinin sol ventrikül miyokardiyal bölgesinin deselülerizasyonunda NTIRE uygulanarak hücre zarının geçirgenliği artırılmış ve hücresel içeriğin uzaklaştırılması sağlanmıştır, sonuçta ECM yapısının korunduğu ve hücresel içeriğin etkili bir şekilde uzaklaştırıldığı belirlenmiştir [52].

Perfüzyon: ECM'nin köken aldığı organın yüksek oranda deselülerizasyonunu ve bunun yanı sıra 3B yapının korunmasını sağlayan fiziksel deselülerizasyon yöntemlerinden biridir. Bu yöntemde, vasküler yapı aracılığıyla, deselülerizasyonda kullanılan ajanlar hücrelere nüfus ederek hücresel materyal dokudan uzaklaştırılır [51]. Yapılan bir çalışmada, sıçan kalbine ait aort, 3B iskele yapı oluşturmak amacıyla 15 dakika adenozinli heparinize fosfat tamponlu su çözeltisi (PBS) uygulaması ardından 12 saat %1 Sodyum Dodeasil Sülfat (SDS) (a/h) ve 30 dakika %1 Triton X-100 (h/h) perfüzyonunun ardından 124 saat boyunca antibiyotik içeren PBS ile perfüzyon ve her aşamada deiyonize su ile yıkama yapılarak deselülerize edilmiştir. Perfüzyonla deselülerizasyonun sonucunda aort dokusunun yarı saydam hale geldiği görülmüş ve deterjan uygulamalarına rağmen ECM yapısnın korunduğu belirtilmiştir [53]. 2009 yılında yapılan başka bir çalışmada, domuz kalbinden dECM üretiminde minimum ECM hasarı elde etmek amacıyla hipertonik-hipotonik solüsyonlar, tripsin enzimi, Triton X-100 ve perasetik asit-etanol solüsyonları perfüzyon aracılığıyla uygulanmıştır. Metod, 10 saatten kısa bir süre içerisinde tamamlanmış ve elde edilen dECM yapısının büyük ölçüde korunduğu, DNA'nın yüksek oranda uzaklaştırıldığı gözlemlenmiştir [54].

Mekanik Çalkalama ve Daldırma: Bu fiziksel yöntem, mekanik hareketlerle deselülerizasyon ajanının dokuyla etkileşimini artırmakta ve genellikle yapısında vasküler ağ içermeyen daha küçük dokular için tercih edilmektedir. Perfüzyon yöntemine kıyasla daha basit bir yöntem olmasına rağmen difüzyon miktarı sınırlıdır. Çalkalama parametreleri, deselülerize edilecek dokunun özellikleri göz önüne alınarak belirlenmelidir [48]. Daldırma ile birlikte tercih edilen manyetik çalkalama uygulaması, hücre lizisine yol açmasına rağmen asıl kullanım amacı, deselülerizasyonun ilerleyen aşamalarında kullanılan çeşitli kimyasalların penetrasyonunu artırmaktır. Bu yöntemin çeşitli kimyasal ve enzimatik yöntemlerle birleştirilmesi, deselülerizasyon verimini artırmanın yanı sıra deselülerizasyon işleminin hızlandırılmasına ve kalıntıların uzaklaştırılmasına da katkı sağlamaktadır [21].

Sonikasyon: Mekanik aşındırma, ultrasonik dalgaların dokulara doğrudan basınç uygulamasıyla birlikte hücrelerin uzaklaştırılmasını sağlamaktadır. Bu uygulama, genellikle daha az yoğun ECM yapısına sahip dokuların deselülerizasyonunda tercih edilmektedir [48]. Bu yöntemde sıvı ortamda oluşan gaz kabarcıklarının patlamasıyla ifade edilen kavitasyon, hücre zarının parçalanmasını kolaylaştırır, deterjanların dokuya penetrasyonunu artırarak hücrelerin dokudan uzaklaştırılmasına katkıda bulunur [55]. Fakat uygulama esnasında frekansın düşük veya parametrelerin kontrolsüz olması, dokunun mekanik özelliklerini ve yapısal bütünlüğünü tehlikeye sokmaktadır [56]. Yapılan bir çalışmada, aort damarlarının 10 saat boyunca %0,1 ve %0,2 SDS (a/h) çözeltisi içerisinde 170 kHz ultrasonikasyon frekansında deselülerizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Son aşamada SDS kalıntılarını dECM iskele yapısından uzaklaştırmak amacıyla 5 gün boyunca PBS yıkama yapılmıştır. Elde edilen dECM yapısında kolajen ağı ve elastin liflerinin korunduğu ve yüksek oranda hücrenin uzaklaştırıldığı bildirilmiştir [56]. 2021 yılında yapılan bir başka çalışmada ise küçük çaplı damar hastalıklarının tedavisinde kullanılabilecek damar greftlerinin üretimi için insan umbilical arterin deselülerizasyonu optimize edilmiştir. Deterjan maruziyetini kısaltmak ve oluşturulan greftin biyouyumluluğunu artırmak amacıyla sonikasyon destekli deselülerizasyon gerçekleştirilmiştir. Böylece çalışmada %2 SDS (a/h) kullanımı 4 saate düşürüldüğünde bile %90 oranında genetik materyalin uzaklaştırıldığı ve ECM yapısının korunduğu sonucuna ulaşılmıştır [55].

Tablo 2.2 Fiziksel deselülerizasyon yöntemleri.

Yöntem	Mekanizma	Dezavantaj	Kaynak
Donma-Çözme	Buz kristallerinin oluşumuyla hücre zarlarının parçalanması	dECM yapısında mekanik hasar Hücresel kalıntıların yetersiz uzaklaşması	[57]
Hidrostatik Basınç	Hücre membranının fiziksel parçalanması	Uygulamaya bağlı olarak ECM yapısında hasar oluşması Maaliyetli olması Kontaminasyona açık Uzun süreli yıkama gerektirmesi	[58],[59]
NTIRE	Hücre zarında mikrogözenek oluşumuyla hücre lizisi ECM'de hasar oluşmaması	Uygulama parametrelerinin optimizasyon gerektirmesi	[59]
Perfüzyon	Damar sistemindeki hücresel bileşenlerin ve kalıntıların uzaklaştırılması Homojen uygulama Damar yapısının korunması Büyük organlar için uygun olması	Yüksek miktarda deselülerizasyon ajanı kullanımı gerektirmesi	[61],[57]
Mekanik Çalkalama ve Daldırma	Doku ve hücrelerin parçalanması Kullanılan ekipmanların erişilebilir olması	Ajanların dokuya nüfuz yeteneğinin sınırlı olması Hücre kalıntısı olması immunojenik reaksiyonlar	[58]

Tablo 2.2 Fiziksel deselülerizasyon yöntemleri (devamı).

	Diğer yöntemlerle kombine edilebilmesi		
Sonikasyon	Hücre membranının kavitasyon oluşumuyla hızlı bozulması Kimyasal deselülerizasyon ajanı kullanımını azaltması	dECM'nin lifli yapısına hasar vermesi	[57]

2.6.2 Kimyasal Deselülerizasyon Yöntemleri

Kimyasal deselülerizasyon yöntemleri (Tablo 2.3), hücreler arası bağlantıları zayıflatmak ve hücrelerin uzaklaştırılması için çeşitli yüzey aktif maddelerin ve reaktiflerin kullanımını içermektedir [21].

Sürfaktanlar/Yüzey aktif maddeler: Yüzey aktif maddeler, membranın fosfolipit çift katmanlarını parçalayarak hücrelerin zarar görmesini, DNA ve proteinlerin ayrılmasını sağlayarak hücresel bileşenlerin dokudan uzaklaşmasını sağlamaktadır [60]. Deselülerizasyon işleminde, yüzey aktif maddenin türü ve konsantrasyonu, doku tipi, deselülerizasyon etkisi, deselülerizasyonun amacı ve ECM üzerindeki etkisi değerlendirilerek optimize edilmelidir [9]. Kullanılan yüzey aktif maddeler iyonik, iyonik olmayan ve zwitteryonik olmak üzere 3 başlıkta incelenebilir [21].

İyonik olmayan deterjanlar, lipit-lipit etkileşimlerini ve lipit-protein etkileşimlerini bozabilirken protein-protein etkileşimlerine zarar vermediğinden proteinlerin işlev gösterebilmesi açıklanabilmektedir [61]. Triton X-100, iyonik deterjanlara kıyasla daha az agresif bir deterjan olduğundan deselülerizasyonda ECM ultra yapısı yüksek oranda korunurken hücresel kalıntıların uzaklaştırılması yetersiz kalmaktadır [6], [64]. Ancak Triton X-100'ün yüksek konsantrasyonlarda kullanımı, ECM'nin kısmi lizisine ve GAG, fibronektin ve laminin gibi ECM bileşenlerinin degredasyonuna sebep olmakta ve ECM yapısını etkilemektedir [44]. 2020 yılında sığır perikardının deselülerizasyonunda SDS, SDC ve Triton X-100 deterjanlarının etkinliklerini değerlendirmek amacıyla bir çalışma yapılmıştır. %0,5

SDS (a/h), %1 SDC (a/h) ve %1 Triton X-100 (h/h) uygulamalarının her biri ayrı ve kombine olarak 4 farklı metod uygulanmıştır. Deterjanların tek tek uygulandığı metodlarda SDS ve SDC uygulamalarının Triton X-100 uygulamasına kıyasla ECM yapısına büyük ölçüde zarar verdiği, hiçbir uygulamanın hedeflenen DNA eliminasyonunu sağlayamadığı fakat bu noktada en başarısız uygulamanın Triton X-100 olduğu belirlenmiştir. Kombine deterjan uygulandığında sinerjik etki sayesinde yüksek oranda DNA eliminasyonu gerçekleşirken ECM yapısının minimum düzeyde etkilendiği ve bunun polar özelliğe sahip anyonik deterjan olan SDC ile SDS'in birlikte kullanımıyla net yük farkı oluşmasından kaynaklandığı vurgulanmıştır [62]. 2021 yılında insan miyokardının deselülerizasyonunda farklı metodlar uygulanmış ve %1 SDS (a/h) ve %1 Triton X-100 (h/h) içeren uygulamanın %93 oranında genetik materyalin uzaklaştırıldığı fakat sGAG ve kolajen miktarında azalma olduğu görülmüştür [63]. İyonik deterjanlar, farklı olarak hem sitoplazmik hem de nükleer hücre zarlarını etkileyerek protein-protein etkileşimini bozarak proteinlerin denatürasyonuna sebep olabilmektedirler. SDS, SDC ve Triton X-200, deselülerizasyonda yaygın olarak kullanılan iyonik deterjanlardır [64]. SDS, hücreleri uzaklaştırmak amacıyla molekül içi ve moleküller arası hidrojen bağlarını kırabilen, çeşitli moleküllerin ve proteinlerin denetrasyonuna sebep olabilen anyonik yüzey aktif maddedir [65]. SDS, organ deselülerizasyonu ve doku ultra yapısının korunmasında oldukça etkili olmasının yanı sıra nükleer kalıntıların ve sitoplazmik proteinlerin uzaklaştırılmasında oldukça etkilidir. Fakat SDS, kolajen fiberlerinin yapısal bütünlüğüne zarar verebilmekte, GAG miktarının önemli ölçüde azalmasına sebep olabilmekte ve böylelikle doğal doku yapısı bozulabilmektedir. SDS, her ne kadar kolajen yapısına zarar verme eğiliminde olsa da dokudan kolajeni uzaklaştırmamıştır [64]. Doku yapısını korumak amacıyla kombine bir yaklaşım olarak genellikle SDS uygulamasının ardından Triton X-100 gibi iyonik olmayan deterjan uygulaması yapılmaktadır. Ek olarak SDS toksiktir ve SDS'in dECM yapısından uzaklaştırılması için çeşitli yıkama adımları gerekmektedir [66]. 2021 yılında yapılan çalışmada sıçan kalbinden dECM üretmek amacıyla %1 SDS (a/h) çözeltisi perfüzyon işlemiyle birlikte uygulanmıştır. Sıçan kalplerin yarısına aynı zamanda elektrik akımı uygulanarak SDS'in penetrasyonunu artırmak amaçlanmıştır. Perfüzyon sistemi uygulaması yapılırken solüsyondan düzenli olarak örnek alınarak nanodrop aracılığıyla DNA ve protein miktarları analiz edilmiştir. Yapılan

histolojik analizler aracılığıyla ECM yapısının korunduğu sonucuna varılmıştır [67]. Sığır perikardının deselülerizasyonunda 2012 yılında yapılan bir çalışmada %0,5 SDS (a/h) ve %0,5 deoksikolik asit (h/h) kullanılmış ve aynı çalışmada %0,05 tripsin ve %0,2 etilendiamintetraasetik asit (EDTA) içeren ikinci bir metod uygulanmıştır. Her 2 metodun DNA eliminasyonu açısından başarılı olduğu fakat %0,5 SDS ve %0,5 deoksikolik asit uygulamasının daha yüksek oranda DNA uzaklaştırılmasını sağladığı belirlenmiştir [68]. Yapılan başka bir çalışmada ise domuz kalpleri perfüzyon sistemi kullanılarak %4'lük SDS (a/h) ile deselülerize edilmiş ve hücre içi bileşenlerin etkili bir şekilde uzaklaştırıldığı, kolajen, proteoglikan ve elastin gibi ECM yapısında yer alan moleküllerin ve ECM mekanik yapısının korunduğu bildirilmiştir [69]. Bir diğer iyonik deterjan olan SDC, hücresel kalıntıların uzaklaştırılmasında oldukça etkili olmasına rağmen SDS ile kıyaslandığında ECM yapısına daha çok zarar vermektedir [64]. SDC, genellikle iyonik ve iyonik olmayan deterjanlarla kombine uygulanmaktadır. SDC, hücre uzaklaştırılmasında oldukça etkili olduğundan dECM iskele yapının biyouyumluluğunun artmasına katkıda bulunmakta fakat DNA agregasyonuna sebep olabilmektedir. Bu nedenle SDC, Deoksiribonükleaz (DNaz) I enzimiyle birlikte kullanıldığında deselülerizasyon veriminin arttığı görülmüştür [70]. 2024 yılında yapılan bir çalışmada donma-çözme döngülerinin ardından %0,1 SDC (a/h) uygulandığında sığır perikardı %85,7 oranında deselülerize edilmiştir. ECM yapısındaki mevcut hasarın da donma çözme döngülerine bağlı olarak geliştiği sonucuna ulaşılmıştır [71]. Bir başka çalışmada, sığır perikardının deselülerizasyonu 3 farklı metod uygulanarak araştırılmıştır. İlk metodda %0,5 Triton X-100 (h/h), %0,5 SDC (a/h) ile birlikte DNaz ve Ribobükleaz (RNaz), ikinci metodda %0,25 tripsin (h/h) ve 0,02 M EDTA ve son metodda %1 Triton X-100 (h/h) ve %1 SDC (a/h) uygulanmıştır. Her üç metodda da hücre kalıntıları yüksek oranda uzaklaştırılsa da doku yapısı ve mekanik özelliklerin korunması açısından ciddi farklılık görülmemiştir. İlk metod, diğer metodlara kıyasla kolajen lif yapısının korunması açısından daha başarılı olmuştur [72].

Hem iyonik hem de iyonik olmayan deterjanların özelliklerini gösteren zwitteryonik deterjanlar, deselülerizasyon ve ECM yapısının korunmasında iyonik deterjanlardan daha etkilidir. Deselülerizasyon işleminde sülfobetain-10, sülfobetain-16, Tri (n-bütil)fosfat ve 3-[(3-kolamidopropil) dimetilamonyum]-1-

propansülfonat (CHAPS), amidosülfobetain-14 (ASB-14) yaygın olarak kullanılan zwitteryonik deterjanlardır [73]. CHAPS, matris proteinlerini ve doku mimarisini iyonik deterjanlara kıyasla daha yüksek oranda korusa da nükleer materyalin uzaklaştırılmasında yetersiz olabilmektedir [74]. Tri (n-bütil) fosfat ise dokulardan lipitlerin uzaklaştırılmasını sağlamaktadır [9]. 2016 yılında sığır perikardının deselülerizasyonu için yapılan çalışmada %1 a/h ASB-14, DNaz ve RNaz kullanılarak deselülerize edilen dokunun insan mezenkimal kök hücrelerin (hMSC) adhere olması, proliferasyonu ve çoğalmasını desteklediği belirlenmiştir [75].

Asitler ve Bazlar: Deselülerizasyon işleminde asidik veya alkali çözeltiler, çözeltinin pH değerini değiştirerek hidrojen iyon konsantrasyonunu etkilerler böylece hücre zarlarında ve hücre içi yapılarda hasara yol açarak sitoplazmik bileşenlerin degredasyonuna, DNA ve RNA gibi nükleik asit moleküllerin uzaklaştırılmasına olanak sağlarlar [9], [44]. Asitler, deselülerizasyon işleminde sitoplazmik bileşenlerin çözünmesi ve nükleik asitlerin parçalanması vasıtasıyla nükleer materyalin ECM'den ayrılmasını ve eliminasyonunu gerçekleştirir [76]. Bu amaçla asetik asit, hidroklorik asit (HCl) ve sülfürik asit deselülerizasyon işleminde kullanılabilmektedir [64]. Asit uygulaması, GAG ve kolajen moleküllerinin denatürasyonuna [6], [46] diğer yandan ECM yapısının büzülmesine de sebep olabilmektedir [77]. Bazlar, yüksek pH değerleri sayesinde deselülerizasyon işlemlerinde çeşitli deterjanlarla kombine edilerek kullanılabilmektedir. Bu amaçla deselülerizasyon işleminde sodyum sülfür, amonyum hidroksit (NaOH), kalsiyum hidroksit ve sodyum hidroksit gibi bazlar kullanılabilmektedir. Yapılan bazı çalışmalarda CHAPS'ın pH değerinin artırılmasında bazlar kullanıldığında hücre ve protein etkileşiminin daha etkili bir şekilde bozulduğunu fakat dECM mekanik yapısını da bozduğu belirtilmiştir [21]. Alkali koşullara uzun süreli maruziyet, büyüme faktörleri, kolajen ve GAG yapısına zarar verebilmektedir [19]. Asitler ve bazlar dECM iskele hazırlanmasında önemli rol oynayan deselülerizasyon ajanları olsalar da ECM yapısının ve işlevinin hasar görrmemesi, üretilen iskelenin biyouyumlu olabilmesi için asit ve baz kullanım koşulları dikkatli bir şekilde belirlenmelidir [45].

Alkoller (Organik Çözücüler): İzopropanol, etanol ve metanol, lipit ekstraksiyonu, hücre zarının bütünlüğünün bozulması ve hücresel materyalin uzaklaştırılması amacıyla deselülerizasyon işleminde kullanılan organik çözücülerdir. Bu

çözücüler, hücre dehidratasyonu yoluyla membran bütünlüğüne zarar verir ve böylece hücre lizisine neden olurlar. Proteinleri çöktürebilmeleri vasıtasıyla hücresel bileşenlerin uzaklaştırılmasında rol oynasalar da ECM'nin 3B yapısına zarar verebilmektedirler. Özellikle organik çözücülerin protein-protein etkileşimlerini module ederek kolajenler arası çapraz bağlantıları artırması, deselülerizasyon işleminde elde edilen iskele yapının esnekliğini azaltmaktadır. Bu durum özellikle yeniden hücrelendirme uygulamalarında, hücrelerin iskelenin iç kısmına göçünü olumsuz etkilemektedir. Bu yüzden organik çözücüler tek başlarına deselülerizasyon işleminde kullanılmamakla birlikte, özellikle deterjanlarla kombine edilerek uygulanmaktadırlar [51], [64].

Hipotonik-hipertonik Solüsyonlar: Hipertonik ve hipotonik solüsyonlar, ozmotik etki yaratarak hücresel bileşenlerin uzaklaştırılmasını sağlamaktadırlar [6]. Hipotonik solüsyonlar, hücrelerin şişmesini sağlarken hipertonik solüsyonlar DNA'nın proteinlerden ayrılmasında rol oynamaktadır [42]. Bu yaklaşım, ECM proteinlerine veya yapısına diğer uygulamalara kıyasla daha az oranda zarar vermektedir ve genellikle kimyasal yaklaşımlarla birlikte uygulanmaktadır [21].

Tablo 2.3 Kimyasal deselülerizasyon yöntemleri.

Yöntem	Ajan	Mekanizma	Dezavantaj	Kaynak
İyonik deterjanlar	SDS, SDC, Triton X-200	Sitoplazmik ve nükleer zarların çözünmesi, nükleik asitlerin çözünmesi, DNA'nın proteinden ayrılması	ECM yapısı ve kolajen düzenlenişine zarar vermesi, GAG miktarının azalması	[57]
İyonik olmayan deterjanlar	Triton X-100	Hücre zarlarının çözünmesi, Protein-protein etkileşimlerine zarar vermeden DNA'nın	ECM yapısının değişmesi, Hücresel materyalin yetersiz	[59]

Tablo 2.3 Kimyasal deselülerizasyon yöntemleri (devamı).

		proteinlerden ayrılması	uzaklaştırılması	
Zwiteryonik deterjanlar	CHAPS, SB-10, SB-16, SB-14	DNA-protein, lipit-lipit, lipit-protein etkileşimlerine zarar vererek hücre zarını çözme ve DNA'yı proteinden ayırma	ECM protein yapısına zarar vermesi, Yetersiz hücresel materyal uzaklaştırılması	[58],[59]
Asit	Hidroklorik asit, Perasetik asit	Hücre zarını parçalayarak sitoplazmik organelleri çözdürme, Protein denatürasyonuna sebep olma	ECM yapısına zarar vermesi	[58]
Baz	Amonyum hidroksit	Sitoplazmik bileşenleri çözdürme, nükelik asitleri parçalama,biyomoleküllerin hidrolitik bozunmasnı sağlama	GAG, kolajen ve büyüme faktörlerinin zarar görmesine sebep olması, Mekanik özellikleri değiştirmesi	[59]
Hipertonik çözelti	Sodyum klorür	Hücre zarlarının parçalanması ve hücrelerin ozmotik şokla patlatılması	DNA kalıntılarını uzaklaştırmanın zor olması	[59]

Tablo 2.3 Kimyasal deselülerizasyon yöntemleri (devamı).

Hipotonik çözelti	Tris-HCl	Hücre lizisi ve DNA'nın proteinlerden ayrılması	DNA kalıntılarını uzaklaştırma zorluğu	[57],[60]
Organik çözücüler	Etanol, Metanol	ECM lipit yapısına zarar vermesi, Doku dehidratasyonu yoluyla hücre zarlarının çözünmesi ve hücre lizisine yol açması	Proteinlerin çapraz bağlanma aracılığıyla çökmesine sebep olması	[59]
Şelatörler	EDTA	İki değerlikli metal iyonlarını bağlayarak hücrelerin ECM'den ayrılmasını sağlaması	Protein-protein etkileşimini bozması, ECM proteinlerinin denatürasyonuna sebep olması	[58]

2.6.3 Enzimatik Deselülerizasyon Yöntemleri

Deselülerizasyon işlemlerinde proteaz sindirimi, şelatörler ve nükleazlar yaygın olarak kullanılmaktadır (Tablo 2.4) [44]. Tripsin, arjinin ve lizin aminoasitlerin karboksil ucundaki bağlantıları hedef almakta ve genellikle hücre-matriks etkileşimlerini bozan şelatör EDTA ile bilikte kullanılmaktadır. EDTA, ECM ile hücreler arasındaki bağlantının stabilizasyonunda görev alan Ca^{+2} ve Mg^{+2} iyonlarını bağlayarak ortamdan uzaklaştırmakta ve hücreler arası bağlantıları ve

hücrenin matriksle etkileşimini zayıflatmaktadır. Tripsin-EDTA uygulaması, uygulama süresine bağlı olarak laminin kaybına ve GAG hasarına neden olarak matriks yapısının değişimine ve mekanik özelliklerde hasara yol açabilmektedir. Genellikle tripsin uygulaması, yoğun dokuların deselülerizasyonunda tercih edilmektedir [78]. Tripsinin tek başına deselülerizasyon ajanı olarak kullanımı, DNA'nın düşük oranda uzaklaştırılması ve ECM yapısının hasar görmesiyle sonuçlandığından genellikle kimyasal ajanlarla birlikte ve kimyasal ajanların kullanımından önceki adımda tercih edilmektedir. Tripsin, konsantrasyon ve uygulama süresine bağlı olarak ECM hasarına sebep olmaktadır [79].

Dispazlar, bazal membran proteinleri olan kollajen IV ve fibronektin gibi proteinlerin parçalanmasını sağlayarak etki gösteren nötr proteaz enzimleridir [79]. Dispazların kullanımıyla epitel ve endotel hücrelerin birbirinden ayrılması sağlanır ve genellikle kornea ve akciğer gibi ince dokuların deselülerizasyon işleminde tercih edilen ajanlardır. Fakat dispazların kullanımı, bazal membranda hasara sebep olduğundan ECM bütünlüğünü tehlikeye atmaktadır [80].

DNaz ve RNaz, deselülerizasyon işleminde sıklıkla kullanılan enzimatik ajanlardır. Nükleaz uygulamaları, genellikle fiziksel ve kimyasal deselülerizasyon aşamalarından sonra uygulanmaktadır. Hücre lizisin indüklenmesinin ardından nükleaz uygulamaları, ECM yapısından nükleotitleri uzaklaştırmak amacıyla seçici olarak ilgili nükleik asitlerin parçalanmasını sağlamaktadır. Nükleaz kullanımı hücresel kalıntılarda bulunan DNA ve RNA'nın hidolizini sağlayarak immünojenik reaksiyonların azalmasını sağlamaktadırlar. DNaz ve RNaz kullanımını içeren uygulamalarda, yıkama aşamaları oldukça önemlidir. Çünkü bu enzimlerin etkili şekilde uzaklaştırılamaması, yeniden hücrelendirme aşamasını olumsuz etkilemektedir [81]. Nükleazların özellikle kimyasal ajanlarla kombine şekilde kullanılması, toplam deselülerizasyon işlemini kısalttığından kimyasal ajanların sebep olduğu olumsuz etkileri azaltmaya yardımcı olmaktadır. Nükleazları kullanımıyla deselülerizasyon işlem süresinin kısalması, mekanik stabiliteyi artırıcı etki sağlayabilmektedir [79].

Kolojenazlar, genellikle kıkırdak ve kemik doku gibi yoğun bağ dokuların deselülerizasyonu için tercih edilen enzimatik ajanlardır. Kolojenaz, kolajen I, II ve III'ün parçalanmasını sağlamaktadır. Yapıdaki kolajenlerin parçalanması, doku içerisindeki hücrelerin salınmasına katkıda bulunmaktadır. Fakat kolajen yapısının

zarar görmesi, doğrudan ECM'in mekanik özelliklerini olumsuz etkilemekte ve yapının dayanıklılığını azaltmaktadır [57], [84].

Esteraz olan fosfolipaz A, hücrelerdeki fosfolipitlerin hidrolizini sağlamanın yanı sıra kolajen veya proteoglikan içeriğini etkilemediğinden ECM yapısına minimum hasar veren bir deselülerizasyon ajanı olarak değerlendirilmektedir. Fakat fosfolipaz A, GAG içeriğinde ciddi bir azalmaya sebep olmaktadır. Fosfolipaz kullanımı, hücre zarındaki fosfolipitlerin hidrolizine sebep olarak hücre içeriğinin dışarı salınmasına aracılık etmekte ama dokudan hücresel bileşenlerin uzaklaştırılmasında yeterli olmamaktadır. Bu nedenle diğer biyolojik yaklaşımlar gibi fosfolipazlar da çeşitli kimyasal deselülerizasyon yaklaşımlarla birlikte kullanılmaktadır [82].

Agresif bir proteaz olan pepsin, miğdede bol miktarda bulunmaktadır. Tripsin enzimine benzer şekilde peptitler arası bağlantılara zarar vermekte öte yandan uygulama süresine bağlı olarak ECM proteinlerinin hasar görmesine sebep olabilmektedir [83]. Enzimatik uygulamalar deselülerizasyon işlemi için önemli ajanlar olmasına rağmen, kullanıldıkları uygulamalara bağlı olarak kullanım miktarları ve süreleri optimize edilmelidir.

Tablo 2.4 Enzimatik deselülerizasyon yöntemleri.

Yöntem	Mekanizma	Dezavantaj	Referans
Tripsin	Arjinin ve lizinin karboksil ucundaki peptit bağlarının kesilmesi	Elastin ve kolajen yapısına zarar vermesi, EDTA kullanımı gerektirmesi	[57]
Dispaz	Bazal membrandaki kolajen IV ve fibronektini spesifik olarak parçalaması	Bazal membran ve ECM yapısına zarar vermesi	[59]

Tablo 2.4 Enzimatik deselülerizasyon yöntemleri (devamı).

Nükleaz	RNA ve DNA'nın hidrolizi	ECM yapısında bozulmaya sebep olması, Nüklear yapıları uzaklaştırılma zorluğu, Yetersiz uzaklaştırıma immün tepkiye sebep olması, Tek başına kullanımının yetersiz olması	[57],[60]
Kolojenaz	Kolajen I, II, II'ün parçalanması aracılığıyla dokudan hücresel bileşenlerin salınması	Kolajen yapısının hasar görmesi, ECM yapısı ve mekanik özelliklerinin olumsuz etkilenmesi	[58]
Fosfolipaz	Fosfolipitlerin hidrolizinin gerçekleşmesi, Hücrelerin lizinin sağlanması	GAG içeriğinde azalmaya sebep olması	[59]
Pepsin	Peptitler arası bağların bozulması	ECM proteinlerinin zarar görmesi	[58],[61]

2.6.4 Alternatif Deselülerizasyon Yöntemleri

Vakum destekli deselülerizasyon, apoptoz destekli deselülerizasyon ve süperkritik akışkanlar deselülerizasyon işleminde kullanılan alternatif yöntemlerdir (Tablo 2.5) [48].

Vakum Destekli Deselülerizasyon: Bu yöntem, dokuya uygulanan negatif basınç etkisiyle deselülerizasyon işleminde kullanılan çeşitli kimyasal ve enzimatik ajanların dokuya daha hızlı nüfuz etmesini sağlamakta ve deselülerizasyon etkinliğini önemli ölçüde artırmaktadır. Deselülerizasyon ajanlarının penetrasyonunu artırdığından, işlem süresinin kısalmasını sağlamakta fakat hassas dokularda kolajen demetlerinin bozulmasının yanı sıra gözenek boyutunun genişlemesine yol açtığından yapısal bozulmalar meydana gelebilmekte, bu durum da mekanik dayanıklılığın olumsuz etkilenmesine sebep olabilmektedir [84]. 2020 yılında yapılan bir çalışmada sığır perikardının deselülerizasyonunda %1 SDS (a/h) uygulaması sonucunda %87-%92 oranında DNA'nın uzaklaştırıldığı ama GAG oranında belirgin bir kayıp olduğu belirlenmiştir. Fakat bu durumun vakum uygulanmasından değil SDS kullanımından kaynaklandığı, diğer taraftan kolajen miktarının kontrol dokuya kıyasla %16 oranında azalmasının vakum uygulamasının kolajen fibrillerinin ayrılmasına sebep olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Çalışmanın sonucunda ECM yapısının korunduğu ve DNA içeriğinin yüksek oranda uzaklaştırıldığı gösterilmiştir [85]. Yapılan diğer bir çalışmada sığır perikardının %1 SDS (a/h) kullanılarak deselülerizasyonunun ardından SDS kalıntılarını uzaklaştırmak amacıyla vakumlu yıkama yöntemi kullanılmıştır. Atık sudaki SDS miktarı ölçüldüğünde etkili bir şekilde SDS kalıntısının uzaklaştırıldığı ve böylece insan endotel hücreleri üzerinde toksisitenin azaldığı kaydedilmiştir [86]

Apoptoz Destekli Deselülerizasyon: Bu yaklaşımda, programlanmış hücre ölümünün (apoptoz) teşvik edilmesiyle hücreler parçalanmakta ve hücresel bileşenler dış ortama salınmaktadır. Vinblastine ve kamptotesin gibi apoptozu indükleyen ajanlar kullanılabilmekte ve bu yaklaşım sinir dokularının özelliklerinin maksimum oranda korumasını sağlamaktadır. Fakat işlem süresinin uzun olması, apoptozu indükleyen ajanların etkilerinin dokulara göre değişmesi gibi etkiler göz önüne alındığında yaygın olarak kullanılabilmesi için optimizasyona ihtiyaç olduğu açıktır [84], [87]. 2020 yılında yapılan bir çalışmada sıçan akciğer dokusunun deselülerizasyonu için kamptotesin, amidosülfobetain-10 zwiteryonik deterjanı ve DNaz kullanılmıştır. Uygulama sonucunda DNA içeriğinin önemli oranda azaldığı, kolajen miktarı korunurken GAG miktarının azaldığı belirtilmiştir [88].

Süper Kritik Akışkanlar: Süperkritik CO_2, hücre zarlarının çözünmesi vasıtasıyla hücresel bileşenlerin uzaklatırılmasını sağlamaktadır. Yüzey geriliminin düşük

olması sayesinde ECM yapısının ve mekanik özelliklerinin zarar görmemesi, uygulama sonrasında herhangi bir kimyasal kalıntı kalmaması açısından oldukça avantajlıdır [84], [89]. Diğer yaklaşımlardan farklı olarak süperkritik CO_2, bakterisidal ajan ve viral inaktivatör görevi gördüğünden deselülerizasyon sonrası sterilizasyon gereksinimini ortadan kaldırmaktadır [90]. Fakat süperkritik akışkan uygulaması yüksek basınç ve sıcaklığın yanı sıra pahalı bir ekipman gerektiğinden uygulanabilirliği sınırlıdır [84], [89]. 2018 yılında yapılan bir çalışmada sığır perikardının deselülerizasyonunda hidrojen peroksit, NaOH, fosforik asit ardından 35 ^oC'de 100 MPa basınçta 1 saat boyunca süperkritik CO_2 uygulanmıştır. Yapılan çalışma sonucunda deselülerizasyonun başarılı olduğu ve mekanik özelliklerin korunduğu belirtilmiştir [91].

Tablo 2.5 Deselülerizasyonda alternatif yöntemler.

Yöntem	**Mekanizma**	**Dezavantaj**	**Kaynak**
Vakum destekli deselülerizasyon	Negatif basınç altında deterjan ve yıkama solüsyonlarının kullanılmasıyla dokudan hücresel materyallerin uzaklaştırılması	Vakum süresinin uzun olması, ECM mekanik yapısına zarar vermesi	[48],[61]
Apoptozis destekli deselülerizasyon	Hücre ölümünü indükleyen ajanlar ile apoptozun başlatılması	İşlem süresinin uzun olması, Uzun süreli yıkama gerektirmesi	[48],[60]
Süper kritik akışkanlar	Kimyasal maruziyeti kolaylaştıratak hücrelerin uzaklaştırılması	Kullanımının yaygın olmaması	[48],[61]

2.6.5 dECM'nin Sterilizasyonu

Deselülerizasyon sonucunda elde edilen dECM'nin klinik uygulamalarından önce tüm mikroorganizmaların öldürülmesi için sterilize edilmesi gereklidir, dECM iskelesinin özellikleri göz önüne alınarak sterilizasyon yöntemi belirlenmelidir [94]. Fiziksel ve kimyasal sterilizasyon olmak üzere çeşitli yöntemler mevcuttur. Fiziksel bir sterilizasyon yöntemi olan gama ışınlaması, yüksek penetrasyona sahip olması sebebiyle dokularda toksik etkiye sebep olmadan gerçekleştirilebilmekte fakat dokunun mekanik özelliklerinde değişikliğe sebep olabilmektedir. Bir diğer yöntem, UV, yüzey dezenfeksiyonunda oldukça etkili olmasına rağmen penetrasyon yeteneğinin düşük olması sebebiyle derin dokularda yeterli sterilizasyonu sağlayamamaktadır. CO_2 lazer uygulaması ise bakterilerin etkili şekilde yok edilmesini sağladığından dECM dezenfeksiyonunda kullanılma potansiyeli yüksektir [92].

Sterilizasyon için etilen oksit, alkoller, süperkritik CO_2 gibi kimyasal yöntemler de kullanılabilmektedir. Etilen oksit, mikroorganizmaların yapısındaki DNA ve protein yapılarının hasarına yol açarak sterilizasyon sağlamakta toksik etkiye sebep olmaması ve güçlü penetrasyon yeteneği sayesinde tercih edilmektedir. Mikroorganizmalara ait proteinleri yok ederken sporlar üzerinde etkili olmayan alkoller, doku yapısına zarar vermemeleri sebebiyle kimyasal sterilizasyon yöntemleri içerisinde en sık tercih edilen yöntemlerden birisidir. Deselülerizasyon işleminde kullanılan alternatif ajanlardan birisi olan süperkritik CO_2, sterilizasyon için oldukça etkili bir yöntem olmasına rağmen, diğer sterilizasyon yöntemlerine kıyasla daha az kullanılmaktadır [92].

dECM'lerin dekontaminasyonunda yaygın olarak kullanılan antibiyotik uygulamaları genellikle penisilin, sterptomisin ve amfoterisin B'den oluşan anitibyotik çözeltilerinin kullanımına dayanmaktadır. Antibiyotik kullanımı sterilizasyon için değil dekontaminasyon amacıyla, deselülerizasyon öncesinde veya deselülerizasyon işlemi tamamlandıktan sonra analizlerden önce kısa bür süre saklanacaksa tercih edilmektedir [93].

2.6.6 dECM' nin Moleküler ve Yapısal Karakterizasyonu

Nükleik asitlerle birlikte hücresel bileşenlerin dECM iskelesinden etkili şekilde uzaklaştırılamaması, iskele biyouyumluluğunun azalmasına, bağışıklık tepkilerinin

açığa çıkmasına ve greft reddine sebep olabilmektedir. Bu sebeple deselülerizasyon işleminin etkinliğini belirlemek amacıyla dECM'nin moleküler ve yapısal açıdan karakterizasyonu zorunludur [94]. DNA/RNA kalıntısı analizi, pikogreen DNA testi ve Nanodrop spektrofotometresi ile analiz edilmektedir. 2011 yılında Crapo ve arkadaşları, deselülerizasyonun etkinliğini belirlemek için çift iplikli DNA (dsDNA)'nın mg başına 50 ng DNA parçasının kabul edilebilir olduğunu ve moleküler analizlerde çekirdek görülmemesinin başarılı bir deselülerizasyon işlemine işaret edebileceğini belirtmişlerdir [51]. Protein ve ECM analizinde, western blotting (kollajen tipleri (I, III, IV), laminin, fibronektin gibi ECM proteinleri), ELISA (spesifik proteinlerin kantitatif ölçümü), SDS-PAGE (protein profili analizi), immunohistokimya (ECM proteinlerinin dokudaki lokalizasyonu) ve immünofloresan boyama (ECM antijen tespiti) uygulanmaktadır. GAG analizinde Dimethylmethylene Blue (DMMB) ve kollajen analizinde Hydroxyproline testleri gerçekleştirilmektedir [95], [98]. Elde edilen dECM iskele yapının biouyumluluğunun belirlenmesi oldukça önemlidir. dECM iskele yapının klinik uygulamalarda kullanılabilmesi için sitotoksisite, irritasyon, sensitizasyon, sistemik toksisite, immünotoksisite ve implantasyon gibi bir seri biyouyumluluk testlerinin uluslararası standartlara göre gerçekleştirilmesi gereklidir (ISO 10993). dECM yapısının hücre yapışması, proliferasyonu ve canlılığı üzerine etkisini belirlemek için canlı hücrenin metabolik aktivitesini ölçmek amacıyla 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) tuzunun mitokondriyal dehidrojenaz enzimleri tarafından formazana indirmesi prensibine dayanan MTT testi uygulanmaktadır. Suda çözünen tetrazolyum tuzu-1 (WST-1) testi ise bir diğer tetrazolyum tuzu olan WST-1'in NADPH bağımlı enzimler tarafından metabolize edilmesiyle hücrenin metabolik aktivitesinin ölçülmesinde kullanılmaktadır [96], [97]. Ek olarak canlı ve ölü hücrelerin ayrımı için hücre zar bütünlüğü bozulmuş hücrelerin floresan boyayla tespitine dayanan live and dead testi de uygulanmaktadır [98], [50]. Deselülerizasyon işleminde moleküler karakterizasyonun yanı sıra ECM yapısındaki biyomoleküllerin, ECM'nin mikro ve ultra yapısının karakterizasyonu da oldukça önemlidir. Histolojik analizlerle hücre içeriğine ek olarak dECM'nin yapısal bileşenlerinin değerlendirilmesi yapılabilmektedir. Hematoksilen ve Eozin (H&E) boyamaları ile hücre çekirdeklerinin görselleştirilmesi ve dECM'deki hücre kalıntıları belirlenebilmektedir. dECM yapıda nükleik asit kalıntılarını belirlemek için 4',6-

diamidino-2-fenilindol (DAPI) boyaması tercih edilebilmektedir. Histolojik analizlerde bu boyamalara ek olarak Safranin O, Movat Pentakromu, Masson Trikomu, Alcian Blue, Fast Green gibi çeşitli boyamalar dECM iskele yapısındaki genetik materyalin, sitoplazmik ve hücresel bileşenlerin görüntülenmesinde kullanılmaktadır [8], [96]. İmmünofloresan, elektroforez veya polimeraz zincir reaksiyonu gibi daha ileri analizler DNA varlığının nicel olarak değerlendirilmesinde kullanılabilmektedir [94].

dECM iskelenin 3B yapısının korunması, deselüleriazsyon yötemlerinin hedeflerinden birisidir. dECM iskelenin ultra yapısının değerlendirilmesinde taramalı elektron mikroskobu (SEM) yüzey özelliklerinin değerlendirilmesinde, transmisyon elektron mikroskobu (TEM) kolajen fibril düzenlenişi, elastin fiber yapısı, ve hücresel yapıların değerlendirilmesinde kullanılmaktadır [94], [99]. Elektron mikroskoplarının kullanımı, ECM yapısındaki hasarın tespitine ek olarak hücresel bileşenlerin görüntülenmesine de katkıda bulunmaktadır, [100], [101].

Deselülerizasyon etkinliğinin ve dECM yapısının değerlendirilmesinin ardından deselülerizasyon işleminin ECM'nin mekanik özellikleri üzerine etkisini araştırmak amacıyla ileri testlerin yapılması gerekmektedir. Bu amaçla çekme/gerilme testleri, young modülü ve basma testleri gibi mekanik testler ECM'nin mekanik özelliklerinin değerlendirilmesinde kullanılmaktadır [98].

3
MATERYAL VE METOD

Bu tez çalışması temel olarak üç bölümden oluşmaktadır; i) sığır perikardının deselülerizasyonu ii) dECM'nin moleküler karakterizasyonu ve iii) dECM'nin yapısal karakterizasyonu. İlk olarak literatürde yer alan deselülerizasyon metodların başarı potansiyelleri değerlendirilerek 5 farklı metod modifiye edilerek sığır perikardının deselülerizasyonu gerçekleştirilmiştir. İkinci aşamada deselülerize sığır perikardının ECM yapısı, DNA, kolajen ve sGAG içeriği bakımından pozitif kontrolle kıyaslanarak deselülerizasyonun nicel başarısı değerlendirilmiştir. Üçüncü aşamada, dECM yapısının kalitatif analizi H&E, Alcian Blue, Safranin O ve Fast Green boyamaları ile histolojik olarak ve dECM'nin ultra yapısı SEM ile mikroskobik olarak değerlendirilmiştir. Son olarak dECM'nin klinik uygulamalarda biyouyumluluğunu, hücre adhezyonu, proliferasyonu ve canlılığını belirlemek amacıyla fare fibroblast hücre hattı (L929) kullanılarak hücre canlılığı testi gerçekleştirilmiştir.

3.1 Materyal ve Laboratuvar Ekipmanları

3.1.1 Tez Çalışmasında Kullanılan Kimyasallar ve Materyaller

- Penisilin-Streptomisin (PEST) (Kat # 15750-037, Gibco, Thermo Fisher)
- Antibiyotik-antimikotik solüsyonu (10 U/ml penisilin, 10 µg/mL streptomisin, 25 µg/mL Amfoterisin B) (Kat # 15240062, Gibco, Thermo Fisher)
- Sodyum deoksikolat (Kat # GD5695, Glentham)
- Etilendiamintetraasetik asit (Kat # E5134, Sigma)
- Fenilmetilsülfonil florür (PMSF) (Kat #GE4342, Glentham)
- DNaz (Kat # 11284932001, Roche)
- RNaz (Kat # 10109134001, Glentham)

- Magnezyum klorür ($MgCl_2$) (Kat # 8.14733.0500, Merck)
- Sığır serum albumini (BSA) (Kat # A2153, Sigma)
- Tris hidroklorür (Tris-HCl) (Kat # T5941, Sigma)
- 'Pefabloc' (Kat # 11429868001, Sigma)
- Ditiotreitol (DTT) (Kat # 43815, Sigma)
- Potansyum klorür (KCl) (Kat # 7447-40-7, Sigma)
- ASB-14 (Kat # sd-252390, Santacruz)
- Sodyum klorür (NaCl) (Kat # 13423, Sigma)
- Gentamisin (Kat # 15750-037, Gibco)
- Trizma baz (Kat # T1503, Sigma)
- Sodyum dodeasil sülfat (Kat # L4390, Sigma)
- Triton X-100 (Kat #93443, Sigma)
- HCl, %37 (Kat # 7647-01-0, Carlo Erba Reagent)
- NaOH (Kat # 06203, Sigma)
- Proteinaz K (Kat # P6556, Sigma)
- Sodyum fosfat dibazik (Na_2HPO_4) (Kat # S7907-500, Sigma)
- Sodyum dihidrojen fosfat (NaH_2PO_4) (Kat # 567545, Calbiochem)
- Papain (Kat # P4762, Sigma)
- L-sistein HCl (Kat # C7477, Sigma)
- Potasyum fosfat monobazik (KH_2PO_4) (Kat # 795488, Sigma)
- İzoprapanol (Kat # 563935, Sigma)
- Optimal kesim sıcaklığı bileşiği (OCT) (Kat # 4583, Tissue Tek)
- Etanol (Kat # 920.026.2500, Isolab)
- Dimetil sülfoksit (DMSO) (Kat # 1.16743.1000, Merck)
- Paraformaldehit (PFA) (Kat # 923.015, İsolab)
- Asetik Asit (Kat # 27225, Sigma)
- Metanol (Kat # 24229, Sigma)
- Kondoritin sülfat sodyum tuzu (Kat # C9819, Sigma)
- Hematoksilen (Kat # 05-06002/L, Bio Optica)
- Eozin (Kat # 05-1003/L, Bio Optica)
- Fast Green FCF (Kat # F-7252, Sigma)
- Safranin O (Kat # S2255, Sigma)

- Alcian Blue 8GX (Kat # A5268, Sigma)
- DMMB (Kat # 341088, Sigma)
- Glisin (Kat # A1067, AppliChem Panreac)
- Quick-DNA Miniprep Plus Kit (50 prep) (Kat # D4068, Zymo Research)
- Quick-RNA Miniprep Plus Kit (50 prep) (Kat # R1057, Zymo Research)
- Hidroksiprolin Kolorimetrik Test Kiti (Kat # Mak463, Sigma)
- Fetal Bovine Serum (FBS) (Kat # 10500064, Thermo Fischer Gibco)
- Minimum Esansiyel Medium (MEM) (Kat # 31095029, Thermo Fischer Gibco)
- Tripsin-EDTA (Kat # 25200056, Thermo Fischer Gibco)
- MTT (Kat #5655, Sigma)
- Minimum Esansiyel Medium (Kat # 31095029, Thermo Fischer Gibco)

3.1.2 Tez Çalışmasında Kullanılan Laboratuvar Ekipmanları

- Derin dondurucu (Altus, ABD)
- Buzdolabı (Bosch, Türkiye)
- Sıvı azot tankı (Thermo Scientfic, ABD)
- CO_2 inkübatörü (PHCBI,Singapur)
- Çoklu kanallı manuel otomatik pipet (Eppendorf, Almanya)
- Manyetik karıştırıcı (PMC, Amerika)
- Hassas terazi (Sartorius, Almanya)
- Ters ışık mikroskobu (Zeiss, Almanya)
- Soğutmalı mikroantrifüj (DLab, Malezya)
- pH metre (Mettler Toledo, Almanya)
- Mikropipet (Eppendorf, Almanya)
- Çoklu okuyucu ve hücre görüntüleme cihazı Cytation 7 (Biotek, Almanya)
- Saf su cihazı (Milipore Sigma, Fransa)
- Biyogüvenlik klas II (BSL 2) kabini (Mikroteast, Türkiye)
- Santrifüj (Hettich, Almanya)
- Vorteks (Heidolph, Almanya)
- Nanodrop spektrofotometresi (Thermo Scientfic, ABD)
- ELISA plaka okuyucu (BioTek, Almanya)

- Plaka çalkalayıcı (Heidolph, Almanya)
- Kuru blok ısıtıcı (Techne, İngiltere)
- Kriyostat (Leica, Almanya)
- Serolojik pipetör (Eppendorf, Almanya)
- Mikroplaka çalkalaycı (Heidolph, Almanya)
- Su banyosu (Techne, Almanya)
- Otoklav (Haier,China)
- Liyofilizatör (CHRIST Alpha 1-2 LDplus, Martin Christ, Almanya)
- SEM (Zeiss EVO LS 10, Almanya)

3.1.3 Tez Çalışmasında Kullanılan Sarf Malzemeler

- 96 kuyulu düz steril plaka (Kat # 655161, Greiner)
- Beher (Kat # 0.26.03.025, İsolab)
- 15 ml steril falkon tüpler (Kat # 62547254, Sarstedt)
- 50 ml steril falkon tüpler (Kat # 625545502, Sarstedt)
- İnce uçlu pense (Kat # 048.01.105, İsolab)
- Kryotüp (Kat # 89020, TPP)
- Slayt (Kat # 165014, Patolab)
- Parafilm (Kat # PM-996, Bemix)
- Serolojik pipetler (Kat #4488, #4487, Costar)
- Şırınga (Kat # 5S3022138, Inject)
- Cam şişe (Kat # 061.01.901C)
- 1,5 ml ependorf tüpler (Kat # MCT150-C, Axygen)
- Hücre süzgeci (Kat # 3523050, Falcon)
- ‘Kim wipes’ (Kat # Kim 4203, Mc Scientific)
- Alüminyum folyo (Kat # 058.04.001, İsolab)
- Cerrahi makas (Kat # 048.22.130, İsolab)
- Mikrotom bıçağı (Kat # 11810537, Leica)
- Cetvel
- Bistüri (Kat # 12110, Broche)
- Mikrosantrifüj tüpü (Kat # 078.03.001, İsolab)
- Mezür (Kat # 016.01.010, İsolab)

- Spatül (Kat # 047.05.001, İsolab)
- Koyu renkli cam şişe (Kat # 061.47.050, İsolab)
- 0,22 µm gözenekli steril şırınga filtresi (Kat # 99722, TPP)
- 12 kuyucuklu plaka (Kat # 92012, TPP)
- Rezervuar (Kat # 89094664, VWR)
- Pens (Kat # 048.03.115)
- 75 cm^2'lik stelil hücre kültürü flask (Kat # 90076, TPP)
- Thoma Lamı (Kat # I.075.03.001.001, İsolab)
- Mr. Frosty dondurma kabı (Kat # 5100-0050, Thermo Scientific)

3.1.4 Tez Çalışmasında Kullanılan Solüsyonların Hazırlanması

3.1.4.1 Sığır Perikardiyum Temininde Kullanılan Solüsyonlar

- 1 X PBS Çözeltisi (pH 7,4): Hassas tartıda 40 g NaCl, 1 g KCl, 7,2 g Na_2HPO_4, 1,225 g KH_2PO_4 tartıldıktan sonra 4 litrelik distile su içerisine eklenerek çözünmüştür. Çözeltiye 5 lt distile su eklendikten sonra pH'sı NaOH ile 7,4'e ayarlanmış ve +4 ºC'de soğuk odada saklanmıştır.
- %1 Pen/Strep ve 200 µg/ml Gentamisin İçeren 1 X PBS Çözeltisi: 4 lt 1 X PBS çözeltisine 100 ml Gentamisin (10 mg/ml) ve 50 ml Pen/Strep (10 U/ml penisilin, 10 µg/mL streptomisin) eklenmiştir. 1 X PBS kullanılarak son hacim 5 lt tamamlanmıştır. Çözelti kullanılana kadar soğuk odada saklanmıştır.

3.1.4.2 Deselülerizasyon İşleminde Kullanılan Solüsyonlar

- 10 X PBS Çözeltisi: Öncelikle 10,9 g Na_2HPO_4, 3,2 g NaH_2PO_4 ve 90 g NaCl tartılmıştır. Yaklaşık 800 ml distile su içerisinde kimyasallar sırayla çözünmüş ve son hacim distile su ekleyerek 1 lt'ye tamamlanmıştır. 10 X PBS, deneylerde kullanılana kadar +4 ºC'de saklanmıştır ve kullanım öncesinde pH'ı 7,6'ya ayarlanmıştır.
- 0,001 mM PMSF Çözeltisi: 10 X PBS'ten 0,5 ml alınarak 49,5 ml distile su eklenmiştir. Hassas terazide 1,74 mg PMSF tartılmış ve 1ml izoprapanol içerisinde çözünerek 10 mM konsantrasyonunda stok hazırlanmıştır. 40 ml 0,1 X PBS su içerisine 5 ml DMSO ve 50 µl PMSF eklendikten sonra hacim 0,1 X PBS ile 50 ml'ye tamamlanmıştır. Çözelti, PMSF'in aktivite kaybından dolayı her uygulama öncesinde taze olarak hazırlanmıştır.

- 10 mM Askorbik Asit Çözeltisi: 10 X PBS'ten 0,5 ml alınarak 49,5 ml distile su ile üzeri tamamlanmış ve 0,1 X PBS hazırlanmıştır. 20 ml 0,1 X PBS içerisine 0,0881 g askorbik asit eklenmiş ve çözünmesi sağlanmıştır. Ardından 5 ml DMSO eklendikten sonra 0,1 X PBS ile son hacim 50 ml'ye tamamlanmıştır.
- %1 Triton X-100 (h/h) Çözeltisi: 10 X PBS'ten 0,5 ml alınarak 49,5 ml distile su ile üzeri tamamlanmış ve 0,1 X PBS hazırlanmıştır. 49,5 ml 0,1 X PBS içerisine 0,5 ml Triton X-100 eklenmiştir.
- 0,5 M NaCl (a/h) Çözeltisi: 40 ml distile su içerisine 5 ml 10 X PBS eklenmiştir. Ardından 1,461 g NaCl distile suya eklenmiş ve tamamen çözündükten sonra distile su kullanılarak 50 ml'ye tamamlanmıştır.
- 10 mM SDC Çözeltisi: 10 X PBS'ten 0,5 ml alınarak 49,5 ml distile su eklenerek 0,1 X PBS hazırlanmıştır. 0,207 g SD hassas terazide tartılmış ve 40 ml 0,1 X PBS içerisine eklendikten sonra 0,1 X PBS kullanılarak 50 ml'ye tamamlanmıştır.
- 100 U/ml DNaz ve 2 U/ml RNaz Çözeltisi: 1 ml 10 X PBS'in üzeri 9 ml distile su ile tamamlanarak 1 X PBS hazırlanmıştır. 10 mg DNaz ve 0,5 mg RNaz hassas terazi yardımıyla tartılmış ve 5 ml 1 X PBS içerisinde çözdürüldükten sonra son hacim 0,1 X PBS ile 10 ml'ye tamamlanmıştır.
- %1 SDS (a/h) Çözeltisi: 10 X PBS çözeltisinden 5 ml alınarak üzeri 45 ml distile su ile tamamlanmış ve 1 X PBS hazırlanmıştır. 0,5 g SDS hassas terazi ile tartılmış ve 40 ml 1 X PBS içerisine eklenmiştir. SDS çözündükten sonra son hacim 1 X PBS ile 50 ml'ye tamamlanmıştır.
- %0,1 SDC (a/h), %0,1 EDTA (a/h) ve 0,01 mM PMSF Çözeltisi: 0,05 g SD, 0,05 g EDTA ve 1,74 mg PMSF tartılmış ve 1 ml izoprapanol içerisinde çözünerek 10 mM PMSF stok solüsyonu hazırlanmıştır. 30 ml 0,1 X PBS çözeltisine 0,05 g EDTA eklenerek çözündükten sonra sırasıyla 0,05 g SD ve PMSF stok çözeltisinden 50 µl alınarak çözeltiye eklenmiş ve hacim 50 ml'ye 0,1 X PBS ile tamamlanmıştır. Çözelti, PMSF'in aktivite kaybından dolayı her uygulama öncesinde taze olarak hazırlanmıştır.
- 50 U/ml DNaz, 1 U/ml RNaz, 10 mM $MgCl_2$ ve 50 µg BSA İçeren 0,1 X PBS Çözeltisi: Öncelikle 9,522 mg $MgCl_2$, 0,5 mg BSA ve kullanılan DNaz ve RNaz enzimlerin etkinlikleri göz önüne alınarak 5 mg DNaz ve 0,025 mg RNaz

tartılmıştır. 10 X PBS stok solüsyonundan 0,1 ml alınarak üzeri 9,9 ml distile su ile tamamlanarak 0,1 X PBS hazırlanmıştır. Ardından sırasıyla tartılan $MgCl_2$ ve BSA 0,1 X PBS çözeltisine eklenmiştir. DNaz ve RNaz eklendikten sonra enzimlerin aktivitelerinde azalma olmaması için vorteks işleminden kaçınılmıştır ve enzimler yavaşça pipetajlanarak çözünmüştür. Nükleik asit sindirim solüsyonu, kullanım öncesi taze olarak hazırlanmıştır.

- 0,5 mM 'Pefabloc', 100 mM DTT, 100 mM KCl ve 2 mM $MgCl_2$ İçeren 10 mM Tris HCl Çözeltisi (pH 8): Hassas terazide 31,52 mg Tris HCl, 149,12 mg KCl, 3,808 mg $MgCl_2$, 2,39 mg 'Pefabloc' ve 308,5 mg DTT tartılmıştır. Tartılan Tris HCl, 15 ml distile su içerisinde çözündükten sonra NaOH ile pH 8'e ayarlandıktan sonra tartılmış olan kimyasallar tek tek eklenmiş ve solüsyonun hacmi distile su ile 20 ml'ye tamamlanmıştır. DTT ve 'pefabloc' sıcaklığa duyarlı olduğundan, kullanım öncesi çözelti her seferinde taze olarak hazırlanmıştır.
- %1 ASB-14 (a/h), 0,5 mM 'Pefabloc', 100 mM DTT, 100 mM KCl ve 2 mM $MgCl_2$ İçeren 10 mM Tris HCl Çözeltisi: Hassas terazide 15,76 mg Tris HCl, 74,56 mg KCl, 1,904 mg $MgCl_2$, 1,198 mg 'pefabloc', 154,25 mg DTT ve 0,1 g ASB-14 tartılmıştır. Yaklaşık 7 ml içerisinde yukarıda anlatıldığı şekilde solüsyon hazırlandıktan sonra ASB-14 solüsyona eklenmiştir ve hacim distile su ile 10 ml'ye tamamlanmıştır. ASB-14 zwitteriyonik bir deterjan olduğundan çözeltinin köpürmesini engellemek amacıyla pipetaj yapılarak çözünmesi sağlanmıştır. Çözelti, uygulama öncesinde her seferinde taze olarak hazırlanmıştır.
- 150 mM NaCl, 5 mM $MgCl_2$, 100 U/ml DNaz, 2 U/ml RNaz içeren 10 mM Tris HCl Çözeltisi: Hassas terazide 15,76 mg Tris HCl, 87,66 mg NaCl, 4,76 mg $MgCl_2$, 10 mg DNaz ve 0,5 mg RNaz tartılıp 8 ml distile su içerisine kimyasallar tek tek eklenerek çözünmüştür. DNaz ve RNaz enzimleri son aşamada çözeltiye eklendikten sonra pipetaj yapılarak çözündükten sonra hacim distile su ile 10 ml'ye tamamlanmıştır. Kullanım öncesinde çözelti taze olarak hazırlanmıştır.
- 1 X TBS (pH 7,4): Hassas terazide 121 mg Tris-HCl ve 438 mg NaCl tartılmış ve 40 ml distile su içerisine eklendikten sonra pH 7,4'e ayarlanarak distile su eklenerek 50 ml'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan çözelti oda sıcaklığında saklanmıştır.

- 0,5 mM ‘Pefabloc’, %1 Antibiyotik-Antimikotik (h/h) İçeren %10 TBS Çözeltisi: Hassas terazide 2,39 mg ‘pefabloc’ tartıldıktan sonra 15 ml 0,1 X TBS içerisinde çözündürülüp ardından antibiyotik-antimikotik 100 X stok solüsyonundan 200 µl alınarak çözeltiye eklenmiştir. Çözeltinin hacmi 0,1 X TBS eklenerek 20 ml’ye tamamlanmıştır. Kullanım öncesinde her seferinde çözelti taze olarak hazırlanmıştır.
- 10 mM Tris Tamponu (pH 7,6): Öncelikle hassas terazide 48,46 mg Trizma bazı tartılarak 30 ml distile su içerisinde çözündükten sonra HCl ile pH 7,6’ya ayarlanıp hacim distile su eklenerek 40 ml’ye tamamlanmıştır.
- %0,5 SDS (a/h), %1 Triton X-100 (h/h) İçeren 10 mM Tris Solüsyonu (pH 7,6): 60,57 mg Trizma bazı hassas terazide tartılarak 40 ml distile su içerisinde çözündükten sonra HCl ile pH 7,6’ya ayarlanmış ve 25 mg SDS eklenmiştir. Ardından 0,5 ml Triton X-100 çözeltiye eklenip hacim distile su ilave edilerek 50 ml’ye tamamlanmıştır.

3.1.4.3 Deselülerize ECM Karakterizasyonunda Kullanılan Solüsyonlar

- Proteinaz K Sindirim Solüsyonu: Proteinaz K sindirim solüsyonu 1000 µl olacak şekilde hazırlanmış, uygulama öncesi solüsyondan uygun hacim çekilerek 20 mg/ml Proteinaz K enzimi içeren son hacimi 200 µl olan proteinaz K sindirim çözeltisi hazırlanmıştır. 121,14 mg Tris HCl, 100 mg SDS, 292,2 mg NaCl ve 186,2 mg EDTA tartıldıktan sonra 800 µl distile su içerisinde çözünmüştür. SDS çözünürken köpürmeyi engellemek amacıyla vorteks kullanılmamış, kuru blok ısıtıcı kullanılarak çözünmesi sağlandıktan sonra distile su ile 1 ml’ye tamamlanmıştır. 4 mg Proteinaz K hazırlanan sindirim çözeltisinden 200 µl alınarak içerisinde çözünmüştür.
- 10 N NaOH Çözeltisi: 40 g NaOH tartıldıktan sonra 50 ml distile su eklenmiş ve ekzotermik reaksiyon gerçekleştiğinden cam şişe akan musluk suyu altına tutulmuştur, ardından manyetik karıştırıcıda NaOH tamamen çözündükten sonra hacim distile su ile 100 ml’ye tamamlanmıştır.
- 10 N HCl Çözeltisi: Cam şişe içerisine yaklaşık 1 ml distile su eklendikten sonra 8,26 ml %37’lik HCl, damla damla üzerine eklenmiş ve çözelti soğuduktan sonra hacim distile su ile 10 ml’ye tamamlanmıştır.
- 5 mM L-sistein HCl 0,125 mg/ml Papain İçeren 20 mM Sodyum Fosfat Tamponu (pH 6,6): 0,103 g NaH_2PO_4 ve 0,019 g Na_2HPO_4 tartıldıktan sonra

40 ml distile su içerisinde manyetik karıştırıcıda çözünmüş ve pH 6,6'ya ayarlanarak hacim 50 ml'ye tamamlanmıştır. L-sistein HCl, 50 mg/ml, ve papain 10 mg/ml olacak şekilde hazırlanmıştır. sGAG analizi öncesinde dokuların papain sindirimi için 500 µl sodyum fosfat tamponuna 10 mg/ml papain ana stoğundan 12,5 µl ve 50 mg/ml L-sistein HCl ana stoğundan 12 µl eklendikten sonra hacim sodyum fosfat tamponu ile 1 ml'ye tamamlanmıştır.

- DMMB Boyası (pH 3): 3,04 g glisin, ve 2,375 g NaCl tartıldıktan sonra 400 ml distile suya sırasıyla eklenerek manyetik karıştırıcıda çözünmüştür. Ardından 95 ml asetik asit ve 16 mg DMMB solüsyona eklendikten sonra pH 3'e ayarlanmış ve hacim 1 lt'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan boya, oda sıcaklığında ve karanlıkta saklanmıştır.

3.1.4.4 Histolojik Analizlerde Kullanılan Solüsyonlar

- Fiksatif %4 PFA Çözeltisinin Hazırlanması: 4 g PFA, cam şişedeki 80 ml 1 X PBS solüsyonuna eklenerek 60 ^{o}C sıcaklıkta manyetik karıştırıcıda 5 N NaOH damla damla eklenerek çözünmüş ve filtrelendikten sonra hacmi 1X PBS ile 100 ml'ye tamamlanarak +4 ^{o}C'de saklanmıştır.
- Alcian Blue Boyasının Hazırlanması: 0,5 g Alcian Blue 40 ml %3 Asetik asit çözeltisine eklenerek çözünmüş ve hacim %3 asetik asit kullanılarak 50 ml'ye tamamlandıktan sonra 0,22 µm'lik filtreden geçirilerek koyu renkli şişeye aktarılıp oda sıcaklığında saklanmıştır.
- %0,1 Safranin O Boyasının Hazırlanması: %0,1 Safranin O boyası hazırlamak için hassas terazide 0,05 g Safranin O boyası tartıldıktan sonra 40 ml distile su içerisine eklenerek çözünmüş, hacim distile su ile 50 ml'ye tamamlandıktan sonra boya koyu renkli şişede oda sıcaklığında saklanmıştır.
- %0,08 Fast Green Boyasının Hazırlanması: 0,04 g Fast Green boyası 40 ml distile su içerisine eklendikten sonra karıştırılarak çözünmüş ve hacmi distile su ile 50 ml'ye tamamlanmış boya koyu renkli şişede oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

3.2 Metod

3.2.1 Sığır Perikardlarının Temini, Hazırlanması ve Saklanması

Deselülerizasyon işleminde kullanılacak sığır perikardları İstanbul Esenyurt ilçesinde bulunan Narmanlar Özel Et ve Kesimhanesi'nden Veteriner Hekim Seyfi Özdemir kontrolünde temin edilmiştir. Perikardlar alınırken hayvanların cinsiyetlerinin, yaşlarının ve ağırlıklarının birbirine benzer olmasına dikkat edilmiştir (Tablo 3.1). Hayvanların kesilmesini takiben 3 adet Holstein-SA cins sığırdan elde edilen 3 adet perikard %1Pen/Strep ve 200 µg/ml Gentamisin içeren 1 X PBS solüsyonu içerisine konduktan sonra TÜBİTAK Marmara Araştırma Merkezine getirilmiştir.

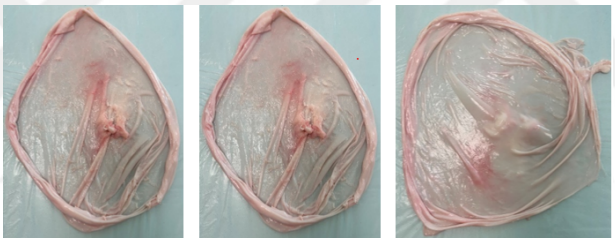
Tablo 3.1 Deselülerizasyon işlemlerinde kullanılan perikard dokuların elde edildiği sığırlara ait bilgiler.

	Sıra No				
	1	**2**	**3**	**4**	**5**
Çıkış İşletmesi	TR5900009 22343	TR5900009 22343	TR5900009 22343	TR5900009 22343	TR5900009 22343
Küpe No	TR3900012 85339	TR3900013 11731	TR3900013 11760	TR3900013 11763	TR5900012 19489
Tür	Sığır	Sığır	Sığır	Sığır	Sığır
Irk	Holstein-SA	Holstein-SA	Holstein-SA	Holstein-SA	Holstein-SA
Cinsiyet	Erkek	Erkek	Erkek	Erkek	Erkek
Doğum Tarihi	23.05.23	18.04.23	12.05.23	14.05.23	17.03.23
Kesimhaneye Varış Tarihi	04.10.24	04.10.24	04.10.24	04.10.24	04.10.24

Tablo 3.1. (Devamı).

Kesim Tarihi	04.10.24	04.10.24	04.10.24	04.10.24	04.10.24
Karkas Ağırlığı (kg)	302,50	312,40	311,20	305,60	306,80

Perikard dokulardan, cerrahi makasla doku üzerinde kalan yağ kazınarak uzaklaştırılmıştır (Şekil 3.1). Perikard dokudaki kanlar %1Pen/Strep ve 200 µg/ml Gentamisin içeren 1 X PBS solüsyonunda yarım saat oda sıcaklığında yıkanarak temizlenmiştir (Şekil 3.2). Yağ dokusundan ve kandan arındırılmış sığır perikardları 5 cm x 5 cm büyüklüğünde kesildikten sonra alüminyum folyoların arasına tek tabaka olacak şekilde yerleştirilerek deselülerizasyon işlemi için -80 ^{o}C'de saklanmıştır [99].



Şekil 3.1 Yağdan arındırılmış sığır perikard dokularının fibröz ve seröz yüzleri.



Şekil 3.2 Kandan arındırılmış, yıkama sonrasında kesilen perikard dokular.

3.2.2 Deselülerizasyon Yönteminin Optimizasyonu

Bu çalışmada, literatürde yer alan çeşitli deselülerizasyon yöntemleri olmasına rağmen, bu yöntemlerin sahip olduğu sınırlamalar göz önüne alınarak deselülerizasyon yöntemini optimize etmek amacıyla 5 farklı metod uygulanmıştır (Şekil 3.3). Öncelikle hazırlanmış olan temiz perikard dokular -80^{o}C'den çıkarıldıktan sonra oda sıcaklığında 15 dakika bekletilip 2 cm x 3 cm parçalara

kesilmiş, tartılmış ve ardından metodlar gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.4). Deselülerizasyon sonunda metodların başarı potansiyelleri deselülerize edilmemiş (pozitif kontrol) ve edilmiş perikardların moleküler ve yapısal özellikleri birbirleri ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

Metod 1: Kimyasal ve enzimatik deselülerizasyon yöntemleriyle birlikte proteaz inhibitörlerinin kullanılmasını içerdiğinden ECM'ye ait protein kalitesinin korunması bakımından umut vaat etmektedir. Perikard parçalarının (0,377 g/parça) yüzey alanı artırarak kimyasal ve enzimatik solüsyonların perikard dokuya daha yüksek oranda nüfuz etmesi amaçlanmıştır (Şekil 3.5). %10 DMSO (h/h) ve 0,01 mM PMSF içeren 50 ml 0,1 X PBS içerisinde dokular 8 saat inkübe edildikten sonra solüsyon uzaklaştırılmış ve %10 DMSO (h/h) ve 10 mM askorbik asit içeren 50 ml 0,1 X PBS içerisinde dokular 16 saat inkübe edilmiştir. Bu uygulamanın ardından perikard parçaları % 1 Triton X-100 (h/h) içeren 50 ml 0,1 X PBS eklenerek 8 saat ve 16 saat bırakılmıştır. Ardından dokular 8 saat boyunca 0,5 M NaCl içeren 50 ml 1 X PBS içerisinde yıkanmış daha sonra 10 mM SDC içeren 50 ml 0,1 X PBS içinde dokular 32 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra enzimatik uygulamada 100 U/ml DNaz ve 2 U/ml RNaz solüsyonu içerisinde 24 saat bırakılmış ve 0,1 X PBS solüsyonunda 48 saat yıkanmıştır. Son yıkama kontaminasyonu engellemek amacıyla %1 Pen/Strep ve 200 µg/ml Gentamisin içeren 200 ml 1 X PBS solüsyonunda 24 saat gerçekleştirilmiştir. Deselülerizasyon işlemi boyunca her solüsyon değişikliğinde nanodrop analizleri için örnekler alınmıştır. Tüm deselülerizasyon işlemleri manyetik karıştırıcı üzerinde (Şekil 3.6) 200 rpm'de oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir [99].

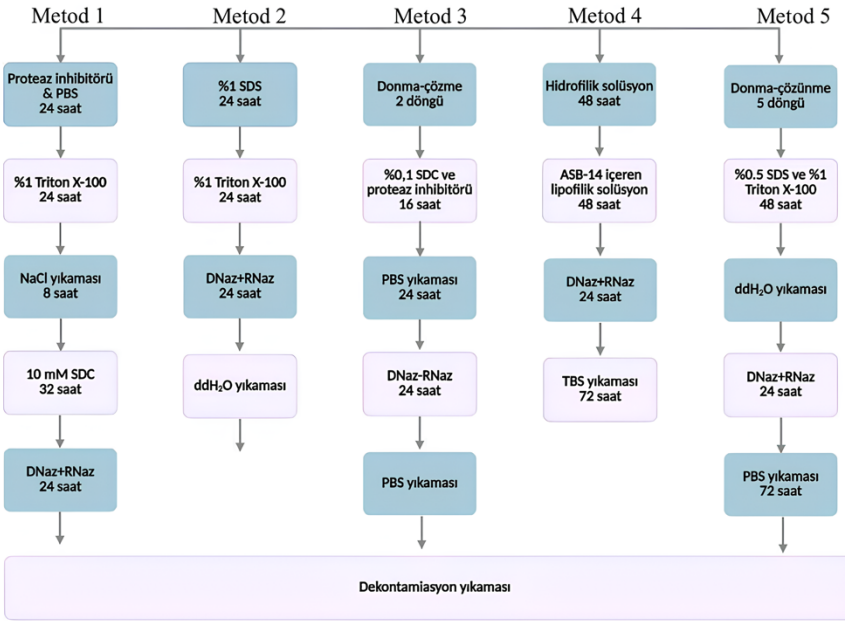
Metod 2: Deselülerizasyon işleminde kimyasal ve enzimatik ajanlar birlikte kullanılmıştır. Dokular (0,3635 g/parça), 24 saat boyunca %1 SDS (a/h) solüsyonunda inkübe edildikten sonra değiştirilerek %1 Triton X-100 (h/h) solüsyonu eklenmiş ve 24 saat dokular inkübe edilmiştir. Deterjan uygulamalarını takiben 100 U/ml DNaz, 2 U/ml RNaz solüsyonu eklenerek 24 saat boyunca nükleik asit sindirimi gerçekleştirilmiştir. Ardından dokular 200 ml distile su içerisinde ve %1 Pen/Strep ve 200 µg/ml Gentamisin içeren 200 ml 1 X PBS solüsyonunda 24'er saat yıkanmıştır. Deselülerizasyon işleminde her solüsyon değişikliğinde nanodrop analizleri için örnekler ayrılmıştır. Tüm süreçler manyetik karıştırıcı üzerinde 200 rpm'de ve oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir [100].

Metod 3: Temel olarak fiziksel, kimyasal ve enzimatik yöntemlerin birarada kullanıldığı deselülerizasyon metodudur. Kesilen dokular (0,475 g/parça), alüminyum folyo üzerine yerleştirilerek 2 saat süresince -80 ºC'ye konmuştur. Ardından perikardlar 3 saat oda sıcaklığında çözdürülmeye bırakılmıştır. Bu işlem iki defa uygulanmıştır. Çözdürülen perikardlar, %0,1 SD (a/h), %0,1 EDTA (a/h) ve 0,01 mM PMSF içeren 50 ml 0,1 X PBS içerisinde 16 saat boyunca manyetik karıştırıcı üzerinde inkübe edilmiştir. Ardından perikardlar 8 saat ve 16 saat boyunca 200 ml 0,1X PBS içerisinde yıkamaya bırakılmıştır. 50 U/ml DNaz, 1 U/ml RNaz, 10 mM $MgCl_2$, 50 µg BSA içeren 10 ml 0,1 X PBS çözeltisi içerisinde 37 ºC'de 3 saat perikardlara enzimatik işlem uygulanmıştır. 200 ml 1 X PBS ve ardından %1 Pen/Strep ve 200 µg/ml Gentamisin içeren 200 ml 1 X PBS solüsyonunda perikardlar 24'er saat yıkanmıştır. Deselülerizasyon işlemi boyunca her solüsyon değişikliğinde nanodrop analizleri için örnek ayrılmıştır. Tüm süreçler manyetik karıştırıcı üzerinde 200 rpm'de oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir [99].

Metod 4: Zwitteryonik deterjan ASB-14 ile DNaz, RNaz enzimleri kombinasyonu uygulanmıştır. Kesilen dokular (0,423 g/parça), 0,5 mM 'Pefabloc', 10 mM DTT, 100 mM KCl ve 2 mM $MgCl_2$ içeren 20 ml 10 mM Tris HCl (pH 8)'den oluşan hidrofil tampon içerisinde 8. ve 16. saatlerde solüsyon değiştirilerek 48 saat boyunca inkübe edilmiştir. Ardından perikardlar 10 ml lipofilik tampon (%1 ASB-14 (a/h) içeren hidrofil tampon) içerisinde solüsyon belirli aralıklarla değiştirilerek 48 saat boyunca inkübe edilmiştir. Daha sonra dokular, 150 mM NaCl, 5 mM $MgCl_2$, 100 U/ml DNaz, 2 U/ml RNaz ve 10 mM Tris HCl içeren 10 ml nükleaz sindirim solüsyonunda 12. saatte solüsyon değiştirilerek 24 saat 37 ºC'de inkübe edilmiştir. Ardından dokular 20 ml 0,5 mM 'pefabloc', %1 antibiyotik-antimikotik (h/h) içeren %10 TBS (h/h) içerisinde solüsyon 8. ve 16. saatlerde değiştirilerek 72 saat yıkanmıştır. Deselülerizasyon işleminde her solüsyon değişikliğinde nanodrop analizleri için örnekler ayrılmıştır. Tüm süreçler manyetik karıştırıcı üzerinde 200 rpm'de oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir [101].

Metod 5: Donma çözme döngüleri, anyonik deterjan SDS, non-iyonik deterjan Triton X-100 ve enzim kombinasyonu uygulanmıştır. Kesilen perikard parçaları (0,495 g/parça), kriyotüpe yerleştirilerek 10 dakika sıvı azot içerisine konmuş ve ardından 37 ºC'de 40 ml 10 mM Tris tamponunda (pH 7,6) çözdürülmüştür. Donma – çözme işlemi 5 defa tekrarlandıktan sonra dokular 37 ºC'de 40 ml distile su

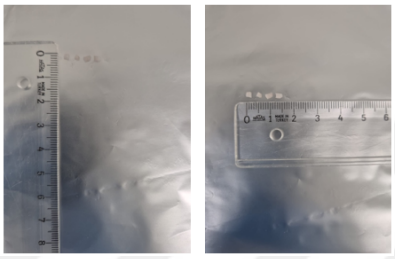
içerisinde yıkanmıştır. Dokular 50 ml %0,5 SDS (a/h), %1 Triton X-100 (h/h) içeren 10 mM Tris solüsyonu (pH 7,6) içerisinde 8. ve 16. saatlerde solüsyon değiştirilerek 48 saat boyunca 40 ºC'de inkübe edilmiştir. Deterjan uygulamalarının ardından dokular 200 ml distile su içerisinde 8. ve 16. saatlerde solüsyon değiştirilerek 24 saat boyunca 5 ºC'de yıkanmıştır. Perikard parçaları, 10 ml olan 150 mM NaCl, 5 mM $MgCl_2$, 100 U/ml DNaz, 2 U/ml RNaz ve 10 mM Tris HCl'den oluşan nükleaz sindirim solüsyonu içerisinde 16. saatte solüsyon değiştirilerek 24 saat boyunca 37 ºC'de enzimatik uygulama yapılmıştır. Ardından dokular 200 ml 0,1 X PBS içerisinde 8. ve 16. saatlerde solüsyon değiştirilerek 72 saat boyunca yıkamaya bırakılmıştır. Son aşamada perikard parçalarda kontaminasyonu engellemek amacıyla %1 Pen/Strep ve 200 µg/ml Gentamisin içeren 200 ml 1 X PBS solüsyonunda 16. saatte solüsyon değiştirilerek 24 saat boyunca oda sıcaklığında yıkanmıştır. Her solüsyon değişikliğinde nanodrop analizleri için örnekler ayrılmıştır. Tüm süreçler manyetik karıştırıcı üzerinde 200 rpm'de oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir [102]. Tüm uygulamaların bitişinde dokuların fazla suyu 'kim wipes' ile kurulanmış ve falkon içerisine düz bir şekilde tek tek yapıştırıldıktan sonra tartılmıştır. İleriki analizlere kadar dokular -80 ºC'ye kaldırılarak saklanmıştır. Şekil 3.3'te deselülerizasyon optimizasyonunda uygulanan farklı metodlar özetlenmiştir.



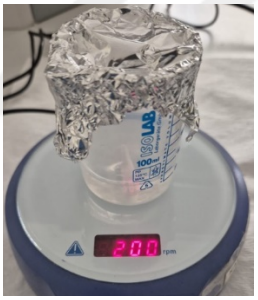
Şekil 3.3 Sığır perikardının deselülerizasyon metodlarının akış şeması**.** (BioRender)



Şekil 3.4 Deselülerizasyon metodunda kullanılan 2 cm x 3 cm sığır perikardları.



Şekil 3.5 0,2 cm x 0,2 cm kesilmiş perikard parçaları.



Şekil 3.6 Manyetik karıştırıcı içerisindeki sığır perikardları.

3.2.3 dECM'nin Moleküler Karakterizasyonu

3.2.3.1 DNA Analizi

5 farklı metod ile deselülerize edilmiş sığır perikardları ve hiçbir işlem görmemiş pozitif kontrol örneklerindeki DNA miktar analizi, 'Quick-DNA Miniprep Plus' Kitinde önerilen yönergeler takip edilerek gerçekleştirilmiştir. Kısaca yaklaşık 25 mg doku tartıldıktan sonra 1 gece boyunca 55 ºC'de ısı bloğunda kitteki yönergelere göre hazırlanan 95 µl katı doku solüsyonu, 95 µl nükleaz içermeyen su ve10 µl proteinaz K içeren karışım içerisinde sindirilmiştir. Çözünen doku 15 saniye vortekslendikten sonra santrifüjlenmiştir ve çözünmeyen debrisin ayrılması sağlanmıştır. Süpernatant temiz mikrosantrifüj tüpüne aktarıldıktan sonra elde

edilen süpernatantın 2 katı hacminde genomik bağlanma solüsyonu süpernatanta eklendikten sonra karışım 15 saniye vortekslenmiştir. Elde edilen karışım kolona aktarıldıktan sonra santrifüjlenmiştir. Akış sıvısı atıldıktan sonra kolona sıra ile 400 µl, 700 µl ve 200 µl DNA ön yıkama solüsyonu eklenerek her defasında santrifüjlenmiştir. Kolon, temiz mikrosantrifüj tüpüne aktarıldıktan sonra kolona 50 µl elüsyon solüsyonu eklenerek 5 dakika boyunca oda sıcaklığında bekletilmiştir. Ardından 20.000 xg'de 1 dakika santrifüjlenmiştir. Aksi belirtilmediği sürece tüm santrifüj basamakları 12.000 xg ve 1 dakika şeklinde uygulanmıştır. İzole edilen DNA'nın, 2 µl olacak şekilde Nanodrop spektrofotometrede 260 nm dalga boyunda absorbans değeri ölçülmüştür. Hesaplanan DNA konsantrasyonu, her bir deselülerizasyon metodu ve pozitif kontrol için kuru doku ağırlığı başına nanogram (ng/mg) şeklinde ifade edilmiştir.

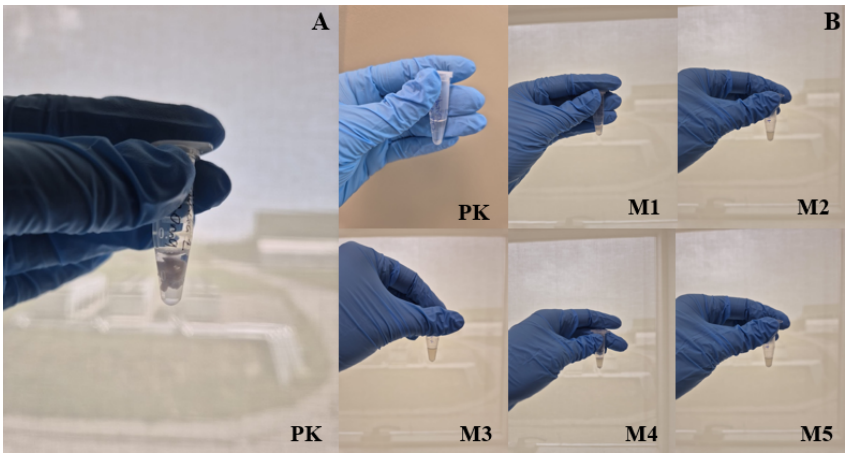
3.2.3.2 Kolajen Analizi

Modifiye bir aminoasit olan hidroksiprolin, kolajende bol miktarda bulunduğundan kolajen miktarının kantitatif olarak değerlendirilmesinde 'Mak 463 hidroksiprolin' analiz kiti kullanılmıştır. Başlangıç aşamasında sığır perikardının hidroliz edilmesiyle hidroksiprolin açığa çıkmaktadır [103]. Analiz kiti, hidroksiprolinin pirol halkasına oksitlenmesinin ardından boya reaktifi ile reaksiyona girmesi ile oluşan pembe renkli bileşiğin 560 nm dalga boyunda analiz edilmesi prensibine dayanmaktadır. Elde edilen hidroksiprolin konsantrasyonu, kolajen miktarıyla ilişkilendirilmektedir. Analiz, birkaç modifikasyonla kitte belirtilen yönergeler takip edilerek gerçekleştirilmiştir. Kısaca, %10 SDS (a/h), 1mol/L Tris HCl, 5 mol/L NaCl, 0,5 mol/L EDTA içeren 200 µl Proteinaz K sindirim solüsyonu içerisine 20 mg/ml Proteinaz K eklendikten sonra ve tartılan yaklaşık 80 mg örnek (Şekil 3.7) 1 gece boyunca 65 ^{o}C'de ısıtıcı blokta inbübe edilmiştir [104]. Ardından kit yönergesinde önerildiği gibi örnekler (Tablo 3.2) 15 saniye vortekslendikten sonra 14.000 xg'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant, temiz mikrosantrifüj tüpüne aktarıldıktan sonra 50 µl örnek üzerine 50 µl 10 N NaOH eklenerek 100 ^{o}C'de ısıtıcı blokta 1 saat boyunca örnekler hidrolize edilmiştir. Ardından -20 ^{o}C'den çıkartılan metal rak üzerinde 2-3 dakika bekleterek soğutulduktan sonra örneklerin üzerine 50 µl 10 N HCl eklenerek nötralize edilmiştir. Sonrasında dilüsyon oranına uygun miktarda distile su eklenerek seyreltilmiş ve 14.000 xg'de örnekler 5 dakika boyunca santrifüjlendikten sonra süpernatant temiz

mikrosantrifüj tüpüne aktarılmıştır. 50, 30, 15 µg/ml konsantrasylarında hazırlanan hidroksiprolin standartları ve örnekler 20 µl olacak şekilde 96 kuyulu plakalara konduktan sonra 90 µl reaksiyon karışımı kuyulara eklenmiş ve plaka 10 dakika oda sıcaklığında karanlıkta inkübe edilmiştir. Ardından her bir kuyuya 90 µl reaktif B eklendikten sonra plaka 90 dakika 37 ºC'de çalkalamalı inkübatörde bırakılmış ve mikroplaka okuyucuda 560 nm dalga boyunda absorbans değeri ölçülmüştür. Her deselülerizasyon metodu ve pozitif kontrolün analizi için test 3 tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

Tablo 3.2 Hidroksiprolin analizinde kullanılan örnek miktarları.

Metod No	Doku (mg)	Sindirim solüsyonu (µl)	Hidroliz edilen örnek (µl)	Yaklaşık doku (mg)
Pozitif Kontrol	80,00	200	50	20,00
1	80,70	200	50	20,18
2	80,40	200	50	20,10
3	80,80	200	50	20,20
4	80,30	200	50	20,08
6	80,60	200	50	20,15



Şekil 3.7 A) Kolajen analizinde 24 saatlik proteinaz K sindirimi öncesi ve B) Proteinaz K sindirimi sonrası örnekler.

3.2.3.3 sGAG Analizi

dECM Liyofilizasyonu: Pozitif kontrol ve dECM'ler, sGAG analizi için Alpha 1-2 LDplus liyofilizatör kullanılarak 24 saat cihaz parametreleri sabit tutularak liyofilize edilmiştir (Şekil 3.8). Başlangıç vakum basıncı 0,14 mbar ve kondensatör sıcaklığı -60 ºC olarak kaydedilirken, liyofilizasyon sonlandığında vakum basıncı 0,069 ve kondensatör -58 ºC olarak kaydedilmiştir. Liyofilize edilen örneklere ait başlangıç ağırlıkları ve liyofilizasyon sonrası kuru ağırlık miktarları Tablo 3.3'te yer almaktadır.

Tablo 3.3 Liyofilizasyon öncesi ve sonrası örneklerin ağırlıkları.

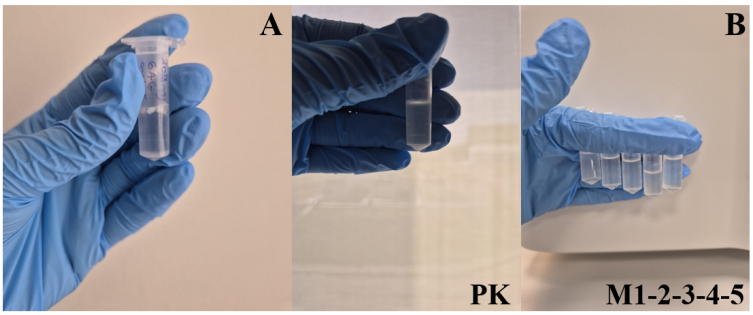
	Pozitif Kontrol	M1	M2	M3	M4	M5
Yaş ağırlık (mg)	208,4	204,2	208,5	118,5	96,4	105,0
Kuru ağırlık (mg)	82,6	39,8	14,2	31,5	33,7	30,0



Şekil 3.8 dECM parçalarının GAG analizi için liyofilizasyonu.

Pozitif kontrol ve liyofilize dECM örneklerinden sırasıyla 20,3 mg pozitif kontrol, 20,6 mg metod 1, 14,1 mg metod 2, 20,1 mg metod 3, 20,6 mg metod 4 ve 20,4 mg metod 5'ten tartılmış, 5 mM L-sistein HCl ve 0,125 mg papain içeren 1 ml 20 mM Sodyum fosfat tampon çözeltisi içerisinde 24 saat sindirime bırakıldıktan sonra 15 saniye vortekslenmiş ve 14.000 xg'de 1 dakika santrifüjlendikten sonra süpernatant

temiz bir mikrosantrifüj tüpüne aktarılmıştır (Şekil 3.9). Kondoritin Sülfat A standartları (0,5 mg/ml, 1,0 mg/ml, 1,5 mg/ml, 2 mg/ml) ve örnekler, 20 µl olacak şekilde 96 kuyucuklu plakaya aktarıldıktan sonra kuyulara 200 µl DMMB boyası eklenerek, 10 saniye plaka karıştırıcıda örneklerle boyanın etkileşime girmesi sağlanmıştır. Mikroplaka okuyucu ile 525 nm'de absorbans değerleri okunmuştur. Her deselülerizasyon metodu örnekleri ve pozitif kontrolün analizi için test 3 tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.9 A) Kolajen analizinde 24 saatlik papain sindirimi öncesi ve B) Papain sindirimi sonrası çözünmüş örnekler.

3.2.3.4 dECM İskelelerinin Biyouyumluluk Analizi

Hücre Kültürü Koşulları, Hücre Pasajlama ve Dondurma: L929 hücre hattının besiyeri olarak %10 FBS ve %1 antibiyotik-antimikotik içeren MEM kullanılmıştır. Hücre hattı, -80 ºC'deki dondurucudan çıkarılarak 37 ºC'deki su banyosunda çözülmüştür. Hücre süspansiyonu, 4 ml MEM besiyeri ile karıştırılarak 1300 rpm'de 5 dk santrifüj edildikten sonra süpernatant aspire edilerek hücre peleti üzerine MEM besiyeri eklenmiş hücre süspansiyonu elde edilmiştir. Hücre süspansiyonu, 75 cm^2'lik flask içerisine ekilerek 37 °C ve %5 CO_2 koşullarında inkübe edilmiştir. Ters ışık mikroskobu yardımıyla hücre hattı incelenerek flask yüzeyini %80 oranında kapladığında pasajlama işlemi gerçekleştirilmiştir. Pasajlama işleminde, önce besiyeri aspire edilmiş, ardından 10 ml PBS ile flask yüzeyi yıkanmış ve 2 ml Tripsin flaska eklenerek hücreler 5-10 dakika inkübatörde bekletilmiştir. Ters ışık mikroskobu yardımıyla hücrelerin flask yüzeyinden ayrıldığı gözlemlendiğinde besiyeri eklenerek flasktaki hücreler toplanmış ve 15 ml steril falkona aktarılarak 1300 rpm'de 5 dk boyunca santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda süpernatant aspire edilmiş, MEM besiyeriyle pipetaj yapılarak homojen hücre süspansiyonu elde edilmiştir. Hücre süspansiyonundan 10 µl alınarak

‘Thoma’ lamına yüklenmiş ve hücre sayımı yapılmıştır. Hücreler, deney sonlanana kadar pasajlama oranına göre yeni flasklara aktarılarak aynı kültür koşullarında inkübe edilmiştir. Hücrelerin büyümesi ve çoğalması, günlük olarak ters ışık mikroskobu yardımıyla takip edilmiştir. Deney bitiminde L929 hücre hattı, ileriki çalışmalarda kullanılmak üzere dondurulmuş ve sıvı azot tankında muhafaza edilmiştir. Kriyoprotektan özelliği sebebiyle dondurma işleminde DMSO içeren dondurma solüsyonu (%5 DMSO, %10-20 FBS içeren besiyeri) hazırlanarak hücre pelleti dondurma solüsyonunda pipetajlanmış, elde edilen hücre süspansiyonu 1 ml olacak şekilde kryotüplere aktarılmıştır. Hücrelerin kademeli donması için kriyotüpler ‘Mr. Frosty’ dondurma kaplarına yerleştirilmiş ve -80 ˚C’de 1 gün bekletildikten sonra kryotüpler sıvı azot tankına yerleştirilmiştir.

dECM İskelelerinin Biyouyumluluğunun Kalitatif Analizi: Farklı deselülerizasyon yöntemleriyle elde edilen liyofilize dECM iskelelerinin hücre adhezyonu, proliferasyonu ve canlılığı üzerindeki etkileri, Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonundan (ATCC) alınan L929 hücreleri ile kantitatif olarak değerlendirilmiştir. Sterilize edilen dECM iskelele örnekleri ve deselülerize edilmemiş perikard üzerine (PK) 12×10^3 L929 hücreleri ekilmiş ve 37 °C sıcaklıkta, %5 CO_2 atmosferinde 24 saat süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda, hücre görüntüleme cihazı kullanılarak L929 hücrelerinin dECM iskele yapıları üzerindeki adhezyonu, proliferasyonu ve canlılığı 20X objektifle görüntülenmiş ve dECM iskelelerinin biyouyumluluğu kalitatif olarak değerlendirilmiştir.

dECM iskelelerinin Biyouyumluluğunun Kantitatif Analizi: dECM ekstraktlarının hazırlanmasının ardından MTT hücre canlılığı testiyle dECM iskelelerinin biyouyumluluğu kantitatif olarak değerlendirilmiştir.

dECM Ekstraktlarının Hazırlanması: 5 farklı deselülerizasyon metodundan elde edilen liyofilize dECM’lerin her iki yüzü 20’şer dakika UV altında sterilize edilmiştir. Liyofilize dECM’ler her biri 5 saniye olacak şekilde sırasıyla MEM besiyeri, etanol ve MEM besiyeri içerisinde daldırılmıştır. dECM örnekleri 0,1 g/ml oranında MEM besiyeri ile ekstrakt edilmek için ependorflara aktarılmış ve 37 °C’de 180 rpm’de çalkalayıcıda 24 saat bırakılmıştır.

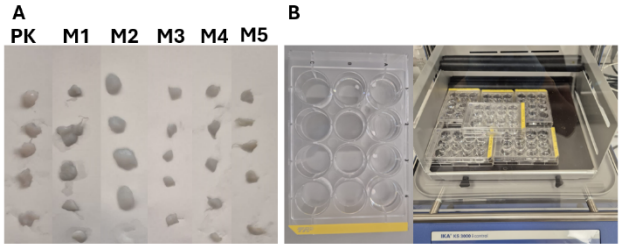
MTT Hücre Canlılığı Testi: Deselülerize ECM'lerin biyouyumluluğu, hücre adhezyonu, proliferasyonu ve hücre canlılığı üzerine etkileri L929 hücre hattı kullanılarak ISO 10993-5 standartlarına uygun şekilde kolorimetrik MTT testiyle değerlendirilmiştir [105]. 96 kuyulu steril plakaya 12 x 10^3 hücre/kuyu L929 hücreleri ekilerek 24 saat 37 °C ve %5 CO_2 koşullarında inkübe edilmiştir. Ardından kuyulardan besiyerleri aspire edilerek, örneklere ve kontrole (hiçbir işlem uygulanmamış besiyeri) ait ekstraklardan kuyulara 85 µl eklenerek 24 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra, 5 mg/ml PBS'te hazırlanmış MTT çözeltisinden %10 oranında kuyulara eklenmiş ve 37 °C, %5 CO_2'de 4 saat inkübe edildikten sonra oluşan formazan kristalleri ters mikroskop altında incelenmiştir. MTT uygulama çözeltisi aspire edildikten sonra formazan kristallerini çözmek için kuyulara100 µl DMSO eklenmiş ve plaka oda sıcaklığında 120 rpm'de 2 saat çalkalayıcıda bırakılmıştır. Kuyularda canlı hücre sayısına bağlı olarak oluşan mor rengin yoğunluğu ELISA okuyucuda 570 nm ve 650 nm dalgaboyunda ölçülmüş ve dalga boylarına ait absorbans değerlerinin farkı alınmış, elde edilen değerler kontrole göre normalize edilerek 3.1 eşitliği yardımıyla % canlılık değerleri hesaplanmıştır. Her deselülerizasyon metodu için test 3 tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

$$\% \text{ Canlılık} = OD_{570\text{-}650}\,(\text{dECM ekstrakt}) / OD_{570\text{-}650}\,(\text{kontrol}) \times 100 \quad \textbf{(3.1)}$$

3.2.4 dECM'nin Yapısal Karakterizasyonu

3.2.4.1 dECM Yapısının Histolojik Analizi

dECM Fiksasyonu: Deselülerize edilen örnekler ve pozitif kontrol olarak kullanılacak perikard -80 ºC'den çıkartıldıktan sonra oda sıcaklığında çözülmüş (Şekil 3.10 A) ve 'kim wipes' ile kurulanarak fazla su uzaklaştırılmıştır. 12 kuyulu plaka içerisine dokular düz bir şekilde pens yardımıyla yerleştirildikten sonra örneklerin üzerine 2'şer ml %4'lük PFA eklenmiş ve 1 saat boyunca oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Sertleşen örnekler, yeni kuyulara aktarıldıktan sonra 2'şer ml distile su eklendikten sonra her 15 dakikada distile su değiştirilerek 2 kez örnekler yıkanmıştır. Ardından örneklerin dehidrasyonu için sırayla 20'şer dakika %70, %80, %90 ve %100 alkol uygulaması yapılmıştır (Şekil 3.10 B). Tüm uygulamalar 2 ml hacimde ve mikroplaka çalkalayıcısı üzerinde gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.10 A) Histolojik analizlerde kullanılan örnekler, B) Dokuların fiksasyon ve dehidrasyon süreci.

dECM Kesit Alınması: 12 kuyulu plaka içerisine 0,5 ml OCT konduktan sonra, 'kim wipes' ile iyice kurutulan örnekler OCT üzerine düz olarak yerleştirilmiş ve üzerine ince tabaka şeklinde OCT eklenmiştir. Bu aşamada herhangi bir baloncuk oluşmamasına dikkat edilmiş, oluşan baloncuklar iğne ile uzaklaştırılmıştır. OCT'ye gömülen örnekler, -80 ^{o}C'de saklanmıştır. Daha sonra -20 ^{o}C'ye soğutulmuş kriyostat ile OCT'ye gömülü örneklerden 5 µm kalınlığında kesitler alınarak slaytlara konmuştur.

Kesitlerin Fiksasyonu ve Rehidrasyonu: Kriyostat ile alınan kesitler yaklaşık 10-15 dakika oda sıcaklığında kurumaya bırakıldıktan sonra kesitlerin üzerine şırınga yardımıyla 2 damla soğuk metanol eklenerek 5 dakika bekletilmiş ve kuruyan slaytlardan OCT'yi uzaklaştırmak amacıyla kesitler şırınga yardımıyla PBS ile yıkanmıştır. Kesitlerinin üzerine şırınga yardımıyla 2'şer damla sırasıyla %100, %90, %80 ve %70 etanol çözeltileri eklenerek su bazlı boyalarla boyanabilirliğini artırmak amacıyla rehidrasyon yapılmıştır. Etanol çözeltisi eklendiğinde, diğer çözelti eklenmeden önce etanolün uçması, slaytın kuruması beklenmiştir. Son aşamada doku kesitlerinin üzerine 1'er damla distile su eklenerek rehidrasyon işlemi tamamlanmıştır. dECM kesitleri önce 5-10 dakika oda sıcaklığında, sonra 40 ^{o}C'de çalkalayıcı içerisinde kurutulduktan sonra üzerine 2 damla %4 PFA eklenerek 40 ^{o}C'de kesitlrin kuruması ve fiksasyonu sağlanmıştır.

H&E Boyama: Hematoksilen, nükleer bileşenler gibi asidik boyaları mavi/mor renkte boyarken eosin, sitoplazmik bileşenler gibi bazik yapıları pembe/kırmızı renkte boyamaktadır. Oluşan kontrast farkı, yapıların ışık mikroskobu altında birbirinden ayırt edilmesini sağlamaktadır. Yukarıda açıklandığı şekilde kesitler H&E boyaması için hazırlandıktan sonra kesitlerin üzerine şırınga yardımıyla Hematoksilen boyası eklenerek 1 dakika bekletilmiş ardından fazla boya musluk

suyuyla uzaklaştırılmıştır. Çeşme suyuyla kesitler yıkandıktan sonra üzerine şırınga yardımıyla eosin boyası eklenmiş ve 20-30 saniye bekletildikten sonra %90 etanol ve %100 etanol ile yıkama yapılarak fazla boyanın uzaklaştırılması sağlanmıştır.

Hematoksilen & Alcian Blue Boyama: GAG içeriğini ve yapısını belirlemek amacıyla Alcian Blue boyası ve nükleer bileşenleri incelemek amacıyla Hematoksilen boyası kombine edilerek uygulanmıştır [106]. Yukarıda açıklandığı şekilde hazırlanan kesitlerin üzerine 1 damla %3 asetik asit eklenerek 3 dakika bekletilip ardından şırınga yardımıyla kesitlerin üzerini kaplayacak kadar Alcian Blue boyası eklenmiş ve 20 dakika bekletilmiştir. Fazla boya distile su ile yıkanmış ve 40 ^{o}C'de çalkalayıcı içerisinde kurutulduktan sonra kestilerin üzerine hematoksilen boyası eklenmiştir. 1 dakika bekletildikten sonra fazla boya musluk suyu ile yıkanmış ve son aşamada %90 ve %100 etanol yıkamaları yapılmıştır.

Safranin O & Hematoksilen Boyama: Safranin O boyası, GAG gibi asidik bileşenleri boyamaktadır [14], [107]. Kesitlerin üzerine şırınga yardımıyla örnekte kalan nükleer bileşenleri belirlemek amacıyla hematoksilen boyası eklenerek 1 dakika bekletildikten sonra fazla boya şırınga yardımıyla çeşme suyuyla uzaklaştırılmıştır. Ardından Safranin O boyası şırınga yardımıyla damlatıldıktan sonra 10 dakika bekletilip fazla boya distile su ile uzaklaştırılmıştır.

Fast Green & Hematoksilen Boyama: Fast Green boyası, kolajen ve bağ doku bileşenlerini boyamaktadır. İlk aşamada nükleer bileşenlerin varlığını göstermek amacıyla hematoksilen boyası slayta eklenerek 1 dakika bekletilmiş ve ardından fazla boya şırınga yardımıyla musluk suyuyla uzaklaştırılmıştır. Sonrasında, Fast green boyası kesitlerin üzerine eklenmiş ve 3 dakika bekletildikten sonra fazla boyayı uzaklaştırmak için distile su yıkaması yapılmıştır. Ardından %90 ve %100 etanol yıkaması yapılarak dehidre edilmiştir. Yukarıda bahsedilen tüm aşamalarda, yıkama ve boyama adımları arasındaki geçişlerde fazla boyalar/yıkamada kullanılan çözeltiler dikkatlice 'kim wipes' ile silinmiştir.

3.2.4.2 dECM'nin Ultra Yapısının SEM Analizi

Deselülerize iskelelerin yapısı ve morfolojisi, doku mühendisliği çalışmalarında oldukça önemlidir [108]. dECM iskelele örneklerinin ve pozitif kontrol perikardın yapısal özellikleri SEM ile analiz edilmiştir. SEM görüntülemesi öncesinde, örnekler liyofilize edilmiş ve sterilize edilmiştir. Yalıtkan karakterdeki numunelere

14 mA akım ve 10,8 Pa basınç altında VPSE G3 sistemi kullanılarak paladyum kaplama işlemi uygulanmıştır. Görüntüleme işlemleri, SEM cihazında 10.00 kV ivme voltajı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

4
SONUÇ

4.1 dECM'nin Moleküler ve Yapısal Özelliklerinin Değerlendirilmesi

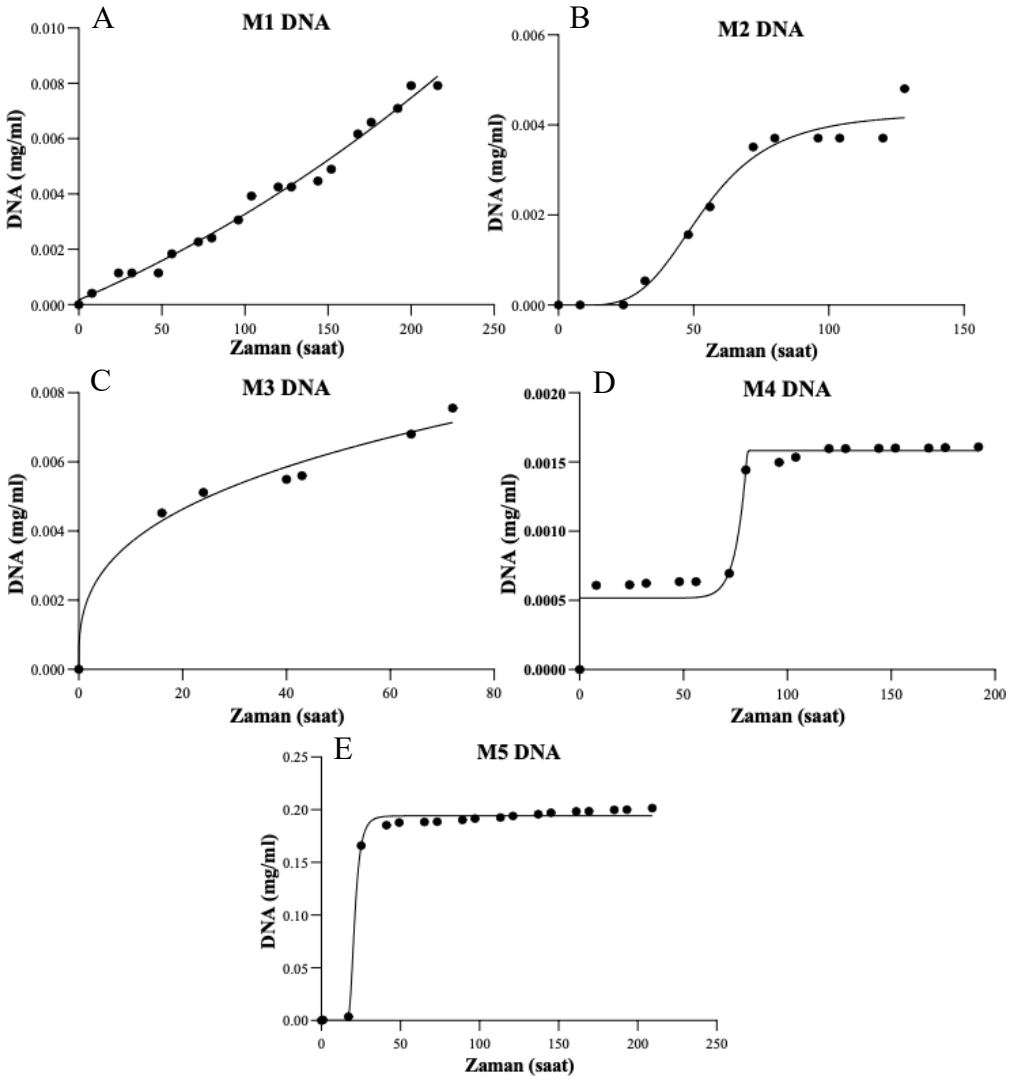
Etkili deselülerizasyon stratejisi, yüksek oranda hücresel materyalin uzaklaştırılması ve ECM'nin yapısal ve işlevsel özelliklerinin korunmasını içeren metodların kullanımına bağlıdır. Tez çalışmasında sığır perikardının deselülerizasyonu için beş farklı metod uygulanmıştır. Deselülerizasyon metodunun optimizasyonu, elde edilen dECM'lerin moleküler ve yapısal özelliklerinin değerlendirilmesiyle belirlenmiştir.

4.1.1 dECM'nin Moleküler Karakterizasyonu

4.1.1.1 Perikardların Deselülerizasyon Kinetiği

Tez çalışmasında, deselülerizasyon işlemlerinin etkinliğini değerlendirmek amacıyla nanodrop cihazı ile absorbans ölçümleri yapılmıştır. Yapılan ölçümler, kullanılan çözeltilere geçiş yapan moleküllerin takip edilmesini sağlamıştır. Böylece deselülerizasyon metodlarının her birinde kimyasal, fiziksel veya enzimatik uygulamaların hücresel bileşenleri ve proteinleri uzaklaştırma kapasitesi ayrı ayrı değerlendirilmiştir. M1'de mevcut uygulamalara bakıldığında genetik materyalin yavaş yavaş uzaklaştırldığı görülmektedir. M1'de uygulanan tüm yöntemler, genetik materyalin uzaklaştırılmasına katkıda bulunsa da deselülerizasyon işleminin son basamaklarında plato fazının bulunmaması, hala uzaklaşmamış genetik materyal olduğu şeklinde yorumlanmıştır. İlk 24 saatte kullanılan çözeltilerin içerisinde DMSO bulunması, hücre zarlarını geçirgen hale getirmiş, kullanılan deterjanların ve enzimlerin penetrasyonunu artırmıştır (Şekil 4.1 A). M2'de ilk 24 saatteki SDS ve Triton X-100 uygulamaları hücresel ve

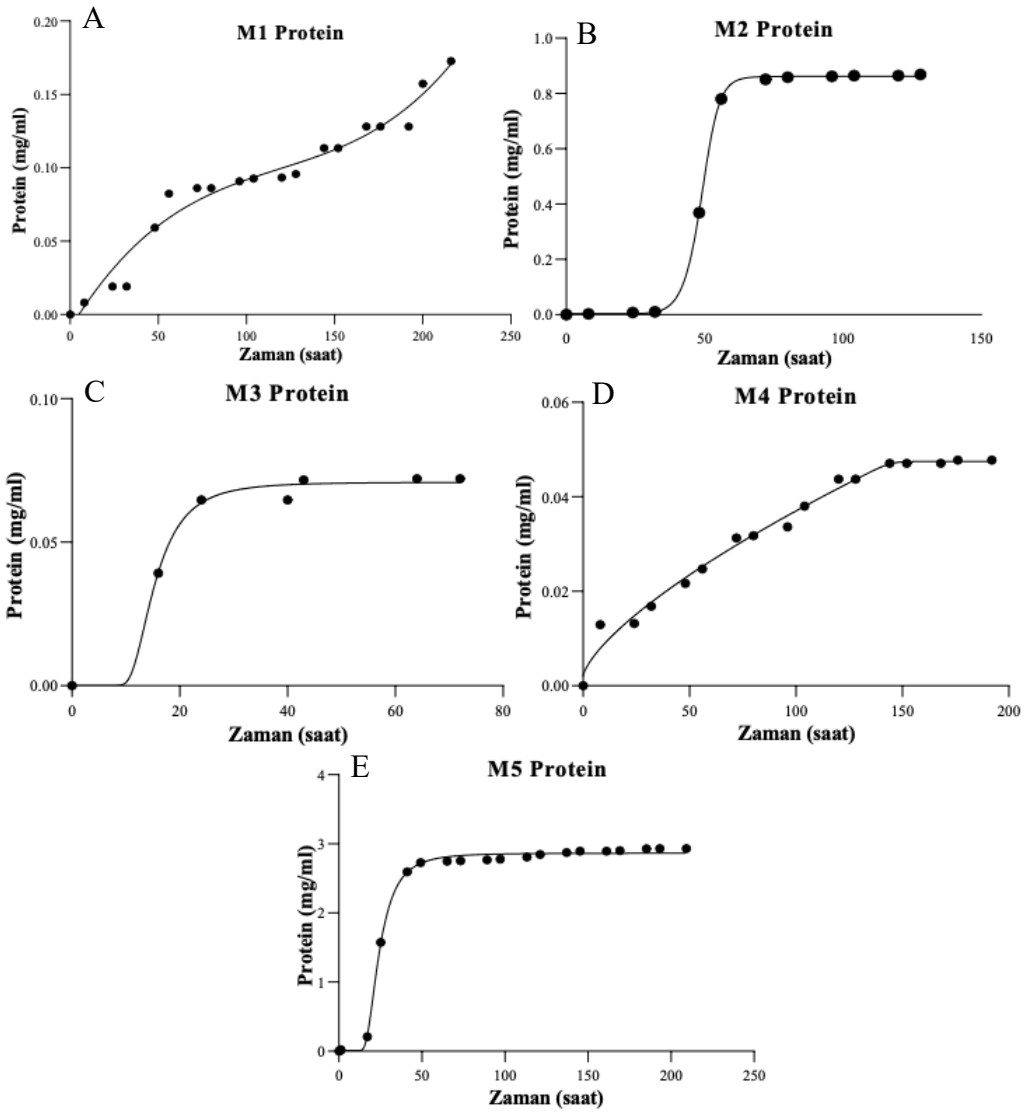
nükleer membranların çözünmesini sağlamış ve enzim uygulamasıyla birlikte genetik materyalin hızlı bir şekilde uzaklaştığı görülmüştür. Ardından dekontaminasyon yıkamasıyla birlikte plato fazının görülmesi genetik materyalin etkili şekilde uzaklaştırıldığını göstermektedir (Şekil 4.1 B). M3'te 2 döngü şeklinde uygulanan donma – çözme işlemi hücrelerin lizisine yol açmıştır. 16 saatlik %0,1 SDC uygulaması DNA salınımını artırsa da SDC konsantrasyonun düşük olması, uzaklaşan DNA miktarının az olmasını açıklamaktadır. 24 saat süren PBS yıkamaları kimyasal kalıntıları uzaklaştırmanın yanında düşük oranda DNA uzaklaştırması sağlamıştır. 40-43. saatler arasında enzimatik uygulama olmasına rağmen uzaklaşan DNA miktarı oldukça düşüktür. Bu durum M3 'te diğer metodlardan daha düşük miktarda enzim kullanımıyla ilişkilendirilmiştir. 21 saatlik 1 X PBS yıkaması ve dekontaminasyon için yapılan son yıkama sonucunda az miktarda DNA tespit edilmiştir. M3 için en etkili genetik materyal uzaklaştırılmasının donma-çözme döngülerini takiben SDC inkübasyonuyla gerçekleştiği sonucuna ulaşılmıştır (Şekil 4.1 C). M4'te ise 48. saat sonrasında ASB-14 uygulaması ve enzimatik uygulamayla birlikte hızlı bir şekilde genetik materyalin uzaklaştırılması sağlanmıştır. Son aşamada dekontaminasyon için yapılan yıkamalarda genetik materyalin uzaklaşma hızının azaldığı görülmüştür (Şekil 4.1 D). M5'te ise 5 döngü şeklinde uygulanan donma- çözme döngüsünün ardından yapılan distile su yıkaması ve deterjan uygulaması genetik materyalin uzaklaştırılmasında oldukça etkili olmuştur. (Şekil 4.1 E). Bu durum, uygulanan deterjanların etkili bir şekilde nüfuz etmesi ve genetik materyalin etkili şekilde uzaklaştığı şeklinde yorumlanmıştır. Her bir basamakta perikarddan uzaklaşan DNA kinetiği Şekil 4.1'de gösterilmiştir.



Şekil 4.1 A) M1 B) M2 C) M3 D) M4 E) M5 için deselülerizasyon işlemi süresince ortama salınan DNA kinetiği.

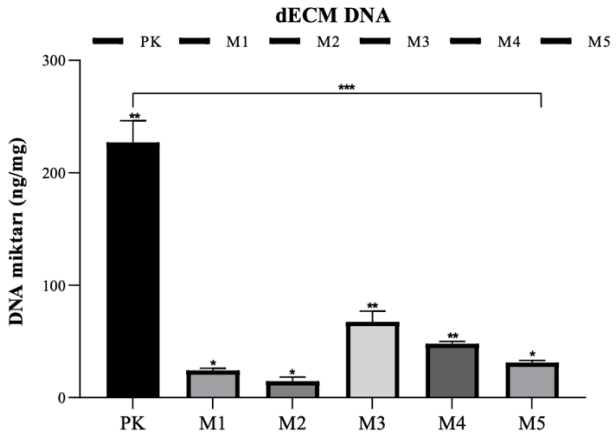
Etkili bir deselülerizasyon işlemi, genetik materyalin uzaklaştırılmasının yanı sıra ECM'nin yapısal bütünlüğünde rol oynayan bileşenlerin korunmasını sağlamalıdır. Deselülerizasyon işlemleri boyunca çözeltiye geçen protein miktarlarının nanodrop ile ölçülmesi, uygulanan adımların protein kaybına etkisinin anlaşılmasını sağlamıştır (Şekil 4.2). M1'de çözeltiye yavaş ama sürekli protein geçişi görülmüştür. Bu durum deselülerizasyon işleminin kontrollü bir şekilde gerçekleştiğine işaret etmektedir (Şekil 4.2 A). M2'de ise SDS uygulamasıyla birlikte hücre zarlarının ve proteinlerin çözünmesiyle birlikte çözeltiye geçen protein miktarı artmıştır (Şekil 4.2 B). M3'te ise SDS uygulamasıyla birlikte çözeltiye geçen protein miktarının arttığı, sonraki uygulamalarda ise çözeltiye

geçen protein miktarının git gide azaldığı görülmüştür (Şekil 4.2 C). M4 te ise hidrofilik tampon uygulaması dahil olmak üzere ASB-14 içeren lipofilik tampon ve enzimatik uygulamalar, çözeltiye yüksek oranda protein geçişine sebep olmuştur (Şekil 4.2 D). M5'te ise donma- çözme döngüsünün yüksek oranda protein kaybına sebep olmadığı fakat SDS ve Triton X-100 uygulamasının yüksek oranda çözeltiye protein geçişine sebep olduğu görülmüştür (Şekil 4.2 E). Enzimatik uygulamalar ve dekontaminasyon dahil olmak üzere yapılan PBS yıkamalarında çözeltiye geçen protein miktarı oldukça düşüktür.



Şekil 4.2 A) M1 B) M2 C) M3 D) M4 E) M5 için deselülerizasyon işlemi süresince ortama salınan protein kinetiği.

4.1.1.3 dECM DNA Analizi



Şekil 4.3 PK ve dECM örneklerine ait DNA analizi sonuçları (n=3, $p < 0,001$).

Literatürde sığır perikardının deselülerizasyonunda hipotonik ve hipertonik tamponlar, deterjanlar, nükleaz uygulaması ve/veya kombinasyonlarına, alkali işlem, asit yıkamasına veya enzimatik sindirime dayanan metodlar bulunmaktadır [62]. Tez çalışmasında sığır perikardının deselülerizasyonu işleminde 5 farklı metod uygulanmış ve elde edilen örnekler karşılaştırılmıştır (Şekil 4.3). M1 deterjanlarla ilişkili ozmotik şok ve enzim, M2 kimyasal ve enzimatik, M3 fiziksel, kimyasal ve enzimatik, M4 zwitteryonik deterjan ve enzimatik, M5 ise donma – çözme döngüleri, deterjan ve enzimatik uygulamalara dayanmaktadır. Uygulanan her metodda kullanılan reaktiflerin konsantrasyonu, kombinasyonu ve uygulama süreleri optimize edilmiştir. Yapılan DNA analizinde pozitif kontrolde 227,04 ± 19,38 ng/mg DNA olduğu tespit edilmiştir. Genetik materyalin uzaklaştırılması açısından metodlar en yüksek başarılı sonuca göre yani en az DNA miktarı içermesine göre M2 (14,73 ± 3,66 ng/mg) > M1 (24,19 ± 2,02 ng/mg) > M5 (31,13 ± 1,99 ng/mg) > M4 (48,01 ± 1,99 ng/mg) > M3 (67,39 ± 9,54 ng/mg) olarak sonuçlanmıştır. Pozitif kontrole kıyasla metodların genetik materyali uzaklaştırma yüzdesi denklem 4.1 yardımıyla %89,34 M1, %91,73 M2, %70,38 M3, %78,85 M4 ve %86,28 M5 şeklinde hesaplanmıştır.

$$\%\text{Genetik materyal uzaklaştırma} = (\text{PK DNA} - \text{Metod DNA}) / \text{PK DNA} \times 100 \quad \textbf{(4.1)}$$

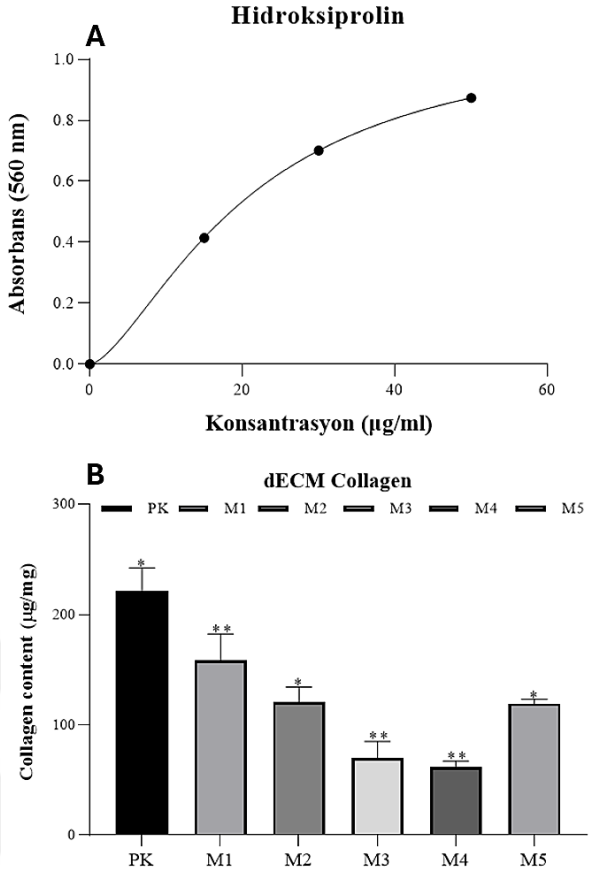
Tüm deselülerizasyon metodlarının sonucunda elde edilen dECM örnekleri pozitif kontrole kıyasla önemli derecede anlamlı bulunmuştur ($p < 0,001$). M1 ve M2 uygulandığında perikardtan uzaklaştırılan nüklear materyaller arasında anlamlı bir

fark bulunmazken, her ikisinin de diğer metodlardan elde edilen dECM'lerden önemli derecede daha az nüklear materyal içerdiği belirlenmiştir ($p < 0,001$). M2'de kullanılan güçlü bir iyonik deterjan olan SDS hücre zarının parçalanmasında, Triton X-100 ise sitoplazmik zarların çözünmesi ve hücresel içeriğin salınmasını, enzimatik ajanlar ise nükleik asit gibi hücre içi materyallerin etkili bir şekilde uzaklaştırılmasını sağlamıştır. Diğer metodlara kıyasla M3 hariç tüm metodlarda uygulanan nükleaz miktarı ve uygulama süresi eşit tutulmuştur. Fakat diğer metodlara kıyasla M2'de kullanılan deterjanların konsantrasyonu daha yüksektir, bu durum enzimatik uygulamalarla birlikte kimyasal ajanların doğru konsantrasyonunun deselülerizasyon etkinliğini artırdığını göstermektedir. En başarılı ikinci düzeyde M1 deselülerizasyon metodunda, hipotonik ve hipertonik solüsyonların kullanımıyla hücre zarlarının geçirgenliğinin artması, kimyasal ve enzimatik ajanların penetrasyonunu artırmıştır. Hipotonik/hipertonik uygulamaların birden fazla adımda uygulanmasının ozmotik etkiyi artırdığı bilinmektedir [51]. M1'de kimyasal ajanların ve enzimatik ajanların uygulanmasında hipotonik solüsyonların kullanılması ve deselülerizasyon ajanlarınının uygulanmasından önceki basamaklarda hipertonik/hipotonik solüsyonların kullanılmasıyla ozmotik etki sayesinde hücre zarlarının zarar gördüğü, kimyasal ve enzimatik ajanların penetrasyonunu artıığı şeklinde yorumlanabilir. M3 metodundan elde edilen örnekler, diğer metodlara kıyasla genetik materyalin uzaklaştırılmasında oldukça yetersiz kalmıştır. Literatürde, sığır perikardının deselülerizasyonunda fiziksel, kimyasal ve enzimatik yöntemlerin kombinasyonunun etkili deselülerizasyonla sonuçlandığı bilinmektedir [27]. M3'ün deselülerizasyondaki başarısızlığı kullanılan kimyasalların ve enzimlerin konsantrasyonu ve tercih edilen uygulamaların süreleriyle ilişkilendirilmiştir. Donma – çözme uygulaması genelde 3-5 tekrar olarak uygulanmaktadır, bu metodda donma – çözmenin 2 döngü şeklinde uygulanması, hücre zarında yetersiz mekanik hasara sebep olması olarak yorumlanmıştır [109], [112]. Literatürde genellikle %0,5 - %1 oranında SDC kullanımı tercih edilmektedir [99], [65]. Bu metodda uzun süreli deterjan uygulamasına rağmen kullanılan %0,1 SDC konsantrasyonunun düşük olması, deselülerizasyon işleminin diğer metodlara kıyasla başarısız olmasına sebep olduğu şeklinde yorumlanabilir. M5'te ise 5 döngü şekilde donma – çözme uygulamasının ardından SDS ve Triton X-100 uygulamaları yapılmıştır. Deselülerizasyon işleminde kullanılan deterjanlar sinerjik etkiye sebep

olmaktadır. Özellikle SDS ve SDC gibi deselülerizasyonda oldukça etkili olan fakat ECM yapısına zarar verebilen deterjanların daha düşük konsantrasyonda kullanımı, Triton X-100 gibi non – iyonik deterjanlara kombine edildiklerinde mümkün olmaktadır. Kullanılan deterjanların hedeflerinin farklı olması, deselülerizasyon etkinliğinin artmasını sağlayabilir. Fakat sıcaklık, uygulama süresi ve deterjan konsantrasyonu sinerjik etkinin sağlanması için önemlidir [62]. Buradan yola çıkılarak M5'te SDS ve Triton X-100 kombine edilerek diğer metodlardan farklı olarak 40 ^{o}C'de uygulanmıştır. %0,5 SDS ve %1 Triton X-100 konsantrasyon olarak literatürle uyumludur ve genetik materyalin uzaklaştırılması, deterjanların sinerjik etkisiyle ilişkilendirilmştir. M4, diğer metodlara kıyasla daha yumuşak bir deterjan olan ve daha az ECM yapısına zarar veren ASB-14 deterjanı kullanılmıştır. Literatürde, ASB-14 ile deselülerizasyon sonucu yeniden hücrelendirme sürecinde toksik etkinin gözlemlenmediği, ASB-14 kullanılarak oluşturulan dECM'lerin hücre bağlanması, büyümesi ve göçünü teşvik ettiği belirtilmiştir. Fakat ASB-14, hücre zarını ve nükleer zarı parçalamada iyonik deterjanlardan oldukça başarısızdır [110]. Bu metodda hücre zarının etkili şekilde parçalanamamış olması, genetik materyalin yapıda kalmasına sebep olmuş olabilir. Tüm bu bulgular aşığında genetik materyalin uzaklaştırılmasında M1 ve M2 metodlarının diğer metodlara kıyasla önemli ölçüde genetik materyal uzaklaştırmada başarılı olduğu söylenebilir.

4.1.1.4 dECM Kolajen Analizi

Kolajen, ECM yapısında oldukça bol bulunan mekanik destek ve esneklikte önemli rol oynayan yapısal proteindir. Deselülerizasyon işleminde kolajen liflerinin organizasyonu ve kolajen miktarının korunması oldukça önemlidir çünkü kolajen mekanik destek sağlamanın yanı sıra hücre tutunması, sinyal iletimi ve yeniden hücrelendirme süreçlerinde önemli rol oynamaktadır [24]. Tez çalışmasında uygulanan 5 farklı metod karşılaştırıldığında kolajen miktarının korunma düzeyi en yüksekten en düşüğe doğru M1 (158 ± 23,82 µg/mg) > M2 (120,89 ± 13,42 µg/mg) > M5 (119,31 ± 4,12 µg/mg) > M3 (69,83 ± 15,13 µg/mg) > M4 (61,44 ± 5,77 µg/mg) olarak belirlenmiştir. Pozitif kontrol 221,30 ± 21,06 µg/mg olarak belirlenmiştir ve tüm metodlardan önemli derecede farklı bulunmuştur ($p < 0,001$). Kolajen analizine ait sonuçlar Şekil 4.4'te gösterilmiştir.



Şekil 4.4 A) Hidroksiprolin standard grafiği B) PK ve dECM örneklerine ait kolajen analizi sonuçları (n=3, $p < 0,001$).

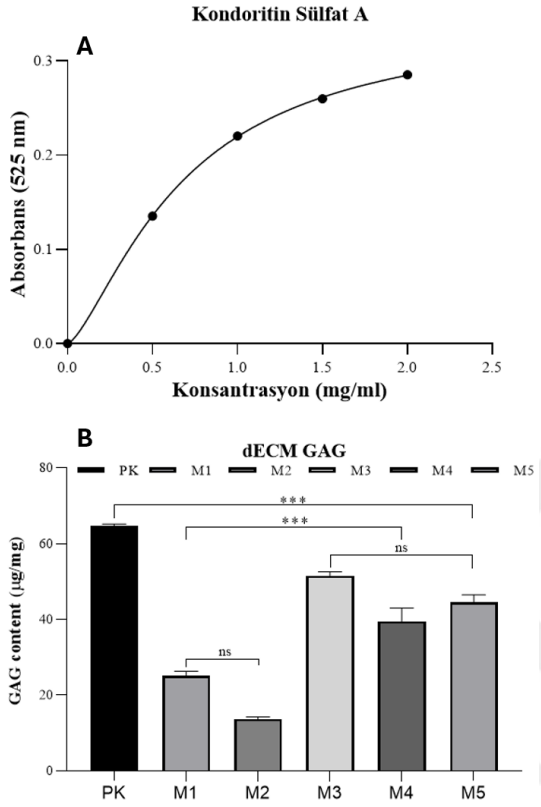
İyonik bir deterjan olan SDS'in, kolajen liflerini denatüre ettiği ve SDS'in uzun süre yüksek konsantrasyonda uygulanmasının, kolajen miktarında azalmaya sebep olarak ECM'nin mekanik özelliklerini olumsuz etkilediği bilinmektedir. Deselülerizasyon işleminde SDC uygulanması, SDS'e kıyasla kolajen yapısında daha az bozulmaya sebep olduğu belirtilirken öte yandan kolajen yapısına en az hasar veren deterjanın Triton X-100 olduğu kaydedilmiştir [57], [80]. Triton X-100, deselülerizasyon işleminde tek başına genetik materyalin uzaklaştırılmasında yetersiz olduğundan genellikle diğer deterjanlarla birlikte kullanıldığında genetik materyal etkili şekilde uzaklaşırken kolajenin korunması sağlanmaktadır. dECM örneklerinde kolajen miktarının korunması açısından M1 ve M2 arasında önemli bir fark görülmezken ($p > 0,001$), M1 uygulamasında elde edilen dECM örneklerinde tüm metodlara kıyasla önemli derecede kolajen miktarı korunmuştur ($p < 0,001$). Uygulanan tüm metodlar kıyaslandığında, M3 ve M4'ün kolajen korunması açısından birbirlerinden önemli derecede farklı olmadığı ve en başarısız

metodlar olduğu görülmüştür ($p > 0,001$). Deselülerizasyon işleminde lizise bağlı olarak ortama salınan proteaz enzimleri, kolajen dahil diğer ECM proteinlerinin yapısına zarar verebilmektedir [111]. M1'de serin proteaz inhibitörü olan PMSF kullanılması, deselülerizasyon işleminde kolajenin korunmasını sağlamıştır. Literatürde belirtildiği gibi askorbik asit, deselülerizasyon işleminde açığa çıkan reaktif oksijen türlerini temizleyerek M1'de kolajenin korunmasına katkıda bulunmuştur [112]. M2'de uygulanan işlemlerin hepsinin oda sıcaklığında gerçekleştirilmesi, SDS ile birlikte Triton X-100 kullanılması ve diğer metodlara kıyasla daha kısa sürede gerçekleştirilmesi, dECM örneklerinde kolajenin korunmasında etkili olabildiği şeklinde yorumlanmıştır. M5 ve M3'te uygulanan donma-çözme döngüleri, kolajen yapısının zarar görmesine sebep olduğu yönünde değerlendirilmiştir. M3 için SDC uygulama süresi veya PMSF'in deselülerizasyon işlemi süresince stabilitesinin azalması kolajen miktarının zarar görmesinde rol oynayan diğer sebepler olarak yorumlanmıştır. M4'te kolajen miktarını korumak amacıyla proteaz inhibitörü olarak 'Pefabloc' kullanılmıştır. 'Pefabloc' konsantrasyonunun yetersiz olması, lipofilik ve hidrofilik işlemlerin çok uzun olması kolajen miktarının etkili şekilde korunamamasının muhtemel sebebidir. İlaveten hidrofil tampon içerisinde yer alan DTT, kolajen yapısındaki çapraz bağların çözünmesini sağlayarak uzun süren yıkama aşamalarında kolajenin degredasyonuna sebep olduğu değerlendirilmiştir.

4.1.1.5 dECM GAG Analizi

GAG, büyüme faktörlerinin, sitokinlerin ve kemokinlerin yüzey reseptörleriyle etkileşerek hücrelere uygun sinyallerin iletilmesinde rol almaktadır [24]. Tez çalışmasında 5 farklı deselülerizasyon metodu kıyaslandığında GAG miktarının korunma düzeyi en yüksekten en düşüğe M3 ($51,50 \pm 1,05$ µg/mg) > M5 ($44,44 \pm 2,03$ µg/mg) > M4 ($39,51 \pm 3,49$ µg/mg) > M1 ($25,14 \pm 1,13$ µg/mg) > M2 ($13,66 \pm 0,57$ µg/mg) şeklinde belirlenmiştir. PK örneklerinde GAG miktarı $64,80 \pm 0,38$ µg/mg olarak belirlenmiş ve uygulanan tüm metodlardan elde edilen dECM örneklerinde GAG miktarı PK örneklerine kıyasla önemli derecede azalmıştır ($p < 0,001$). GAG miktarlarının korunumu açısından M3, M4 ve M5 arasında önemli derecede fark bulunmazken, M1 ve M2 arasında da önemli derecede fark bulunmamıştır ($p > 0,001$). Fakat M3, M4 ve M5 metodundan elde edilen dECM

örneklerinde GAG miktarının korunması açısından M1 ve M2'den önemli derecede farklı olduğu belirlenmiştir ($p < 0,001$) (Şekil 4.5).



Şekil 4.5 A) Kondoritin Sülfat A stadart grafiği B) PK ve dECM örneklerine ait GAG analizi sonuçları ($n=3$, $p < 0,001$).

SDS'in yüksek konsantrasyonlarının ECM yapısındaki GAG'lara ve proteinlere zarar verdiği bilinmektedir [113]. M2'de %1 SDS ve %1 Triton X-100 kullanılması, GAG'ların degredasyonuna ve miktarının azalmasına sebep olmuştur. M1'de ise Triton X-100 ile birlikte 10 mM SDC kullanılmıştır. Triton X-100, GAG yapısındaki iyonik bağları kıramadığından diğer kimyasal uygulamalara kıyasla GAG miktarına ve yapısına daha az zarar vermiştir. Fakat Triton X-100'ün deselülerizasyonda diğer deterjanlarla birlikte uygulanması, GAG miktarında azalmaya sebep olabilmektedir [114]. M3'te düşük konsantrasyonda ve kısa süreli SDC uygulaması, elde edilen dECM örneklerinde GAG miktarının korunmasını sağladığı değerlendirilmiştir. Zwitteryonik deterjanların iyonik deterjanlara kıyasla ECM yapısındaki biyomoleküllere daha az zarar verdiği fakat deselülerizasyonda iyonik deterjanlar kadar başarılı olmadığı bilinmektedir [58]. M4'ün GAG

miktarının korunmasında başarılı olma sebebi, Zwitteryonik deterjan olan ASB-14'ün tercih edilmesidir. M2'de %1 Triton X-100 ve %1 SDS kullanılırken M5'te ise %0,5 Triton X-100 ve %0,5 SDS kullanılmıştır. M5'te GAG miktarının daha iyi korunmuş olması, kullanılan deterjanın konsantrasyonuyla ilişkilendirilebilir.

Tablo 4.1 Farklı metodlarda kullanılan örneklerin deselülerizasyon öncesi ve sonrası ağırlıkları.

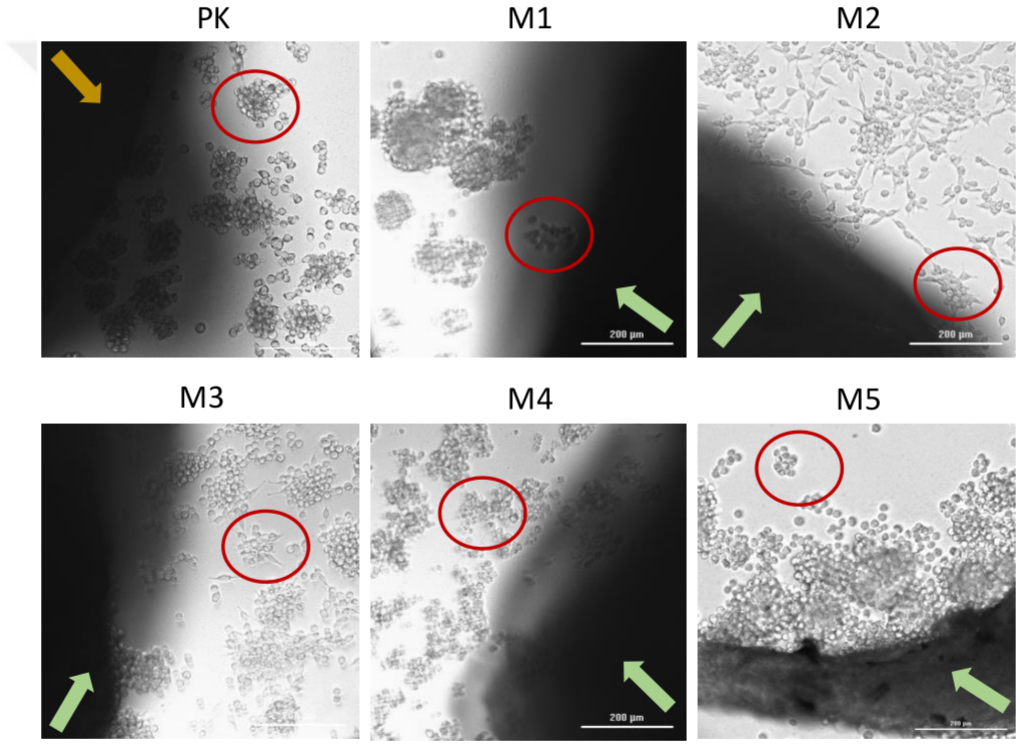
Metod No	Deselülerize Edilen Örnek Ağırlığı (g)	Deselülerizasyon Sonrası Örnek Ağırlığı (g)
1	0,377	0,474
2	0,363	0,446
3	0,475	0,444
4	0,423	0,308
5	0,495	0,419

Farklı metodlarda kullanılan örneklerin deselülerizasyon öncesi ve sonrasındaki ağırlıklarına bakıldığında (Tablo 4.1) M1 ve M2'nin ağırlığının arttığı, M3, M4 ve M5'in ağırlığının azaldığı görülmektedir. Örneklerdeki ağırlık artışı hidrofilik dECM bileşenlerinin su tutma kapasitesi veya deselülerizasyon işleminde kullanılan çözeltilerin boşluklara sızmasından kaynaklandığı şeklinde yorumlanmıştır. Aşırı hidrasyon, mekanik özelliklerin ve hücre tutunmasının olumsuz etkilenmesine sebep olmaktadır [115]. Optimum deselülerizasyon metodu belirlenirken bu kriter de göz önüne alınmalıdır.

4.1.1.6 dECM İskelelerinin Biyouyumluluğunun Kalitatif Analizi

dECM iskelelerinin biyouyumluluğunun kalitatif analizi L929 hücrelerinin deselülerize edilmemiş perikard (PK) ve beş farklı deselülerizasyon metoduyla elde edilen dECM iskeleleri üzerindeki adhezyonu, proliferasyonunu ve hücre canlılığı üzerindeki etkilerinin morfolojik olarak değerlendirilmesiyle gerçekleştirilmiştir.

Şekil 4.6'da PK, M3, M4 ve M5 kullanılarak elde edilen dECM'lerin üzerinde ve etrafında L929 hücrelerinin karakteristik fibroblast morfolojisinin bozulduğu ve ölü hücrelerin çoğunlukta olduğu gözlemlenmiştir. Bu durum PK ve söz konusu dECM iskelelerinin toksik etki gösterdiği şeklinde yorumlanmıştır. Buna karşılık M1 metodu kullanılarak elde edilen dECM iskelelerinin üzerinde ve çevresinde bulunan L929 hücrelerinin fibroblastlara özgü doğal morfolojilerini kısmen koruduğu gözlemlenmiştir. Diğer iskelelere kıyasla dECM-2 iskelesinde hücre tutunması ve yayılımının daha düzenli olduğu görülmüştür. Kalitatif analiz verilerine dayanarak M1 ile M2 metodlarıyla elde edilen dECM iskelelerinin yüksek biyouyumluluk sağladığı sonucuna ulaşılmıştır.

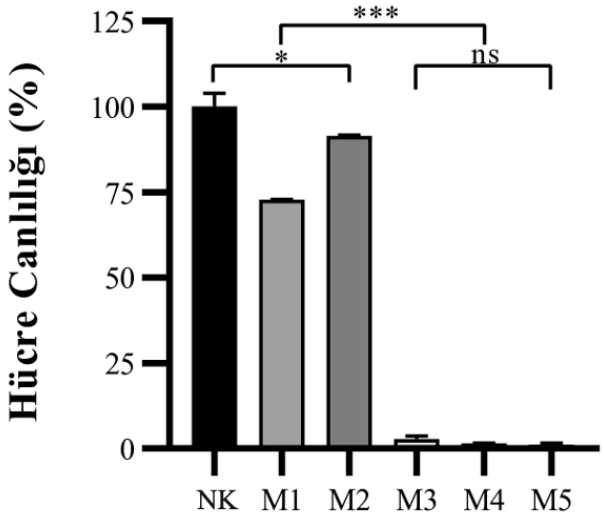


Şekil 4.6 PK ve dECM iskelelerinin L929 hücreleri üzerindeki etkisi. (Şekilde kahverengi ok PK'yı, yeşil ok dECM iskelesini ve kırmızı çember L929 hücrelerinin morfolojisini göstermektedir.) (Büyütme 20X)

4.1.1.7 dECM İskelelerinin Biyouyumluluğunun Kantitatif Analizi

dECM iskelelerinin biyouyumluluğu, dECM iskelelerinin ekstraktları kullanılarak MTT analiziyle değerlendirilmiştir (Şekil 4.7). Negatif kontrol grubunda hücre canlılık oranı %100 ± 3,97 olarak belirlenmiştir. Elde edilen veriler doğrultusunda hücre canlılığı, M2 (%91,41 ± 0,24) > M1 (%72,72 ± 0,24) > M3 (%2,80 ± 0,84) >

M4 (% 1,49 ± 0,18) > M5 (% 1,10 ± 0,48) şeklinde sonuçlanmıştır. M3, M4 ve M5 metodlarıyla elde edilen dECM ekstraktlarına ait hücre canlılık oranları, diğer gruplara kıyasla önemli derecede anlamlı bulunmuştur ($p < 0,001$). M1 ve M2 metodlarıyla elde edilen dECM ekstraktlarına ait hücre canlılık oranları arasında anlamlı fark gözlemlenmezken ($p > 0,001$), NK'ya kıyasla hücre canlılık oranı önemli derecede farklı bulunmuştur ($p < 0,001$). ISO 10993-5:2009 standartlarına göre, hücre canlılığının %70'in altında olması analiz edilen materyalin sitotoksik olarak değerlendirilmesine neden olmaktadır [2]. M2 ve M1 metodları ile elde edilen dECM ekstraktlarının, hücre canlılığı açısından %70'in üzerinde değer göstermesi, bu iki grubun sitotoksik etki göstermediğini ve biyouyumlu olduklarını ortaya koymuştur. Buna karşılık, M3, M4 ve M5 gruplarında hücre canlılığının %3'ten az olması, bu metodlarla elde edilen dECM ekstraktlarının ciddi düzeyde sitotoksik etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Elde edilen bulgular ışığında, M1 ve M2 metodları ile elde edilen dECM iskelelerinin biyouyumlu olduğu sonucuna varılmıştır. Özellikle M2 kullanılarak elde edilen dECM-2 ekstraktının negatif kontrole yakın hücre canlılığı değerine sahip olması, bu metodun diğer metodlara kıyasla daha uyumlu dECM iskelesinin elde edilmesini sağladığı şeklinde yorumlanmıştır. Elde edilen bu bulguların, dECM iskelelerinin biyouyumluluğunun kalitatif analiziyle tutarlı olduğu görülmüştür. Analiz sonucunda kardiyak doku mühendisliği uygulamaları için M2 metoduyla hazırlanan dECM iskelelerinin biyolojik olarak uyumlu olabileceği sonucuna varılmıştır.

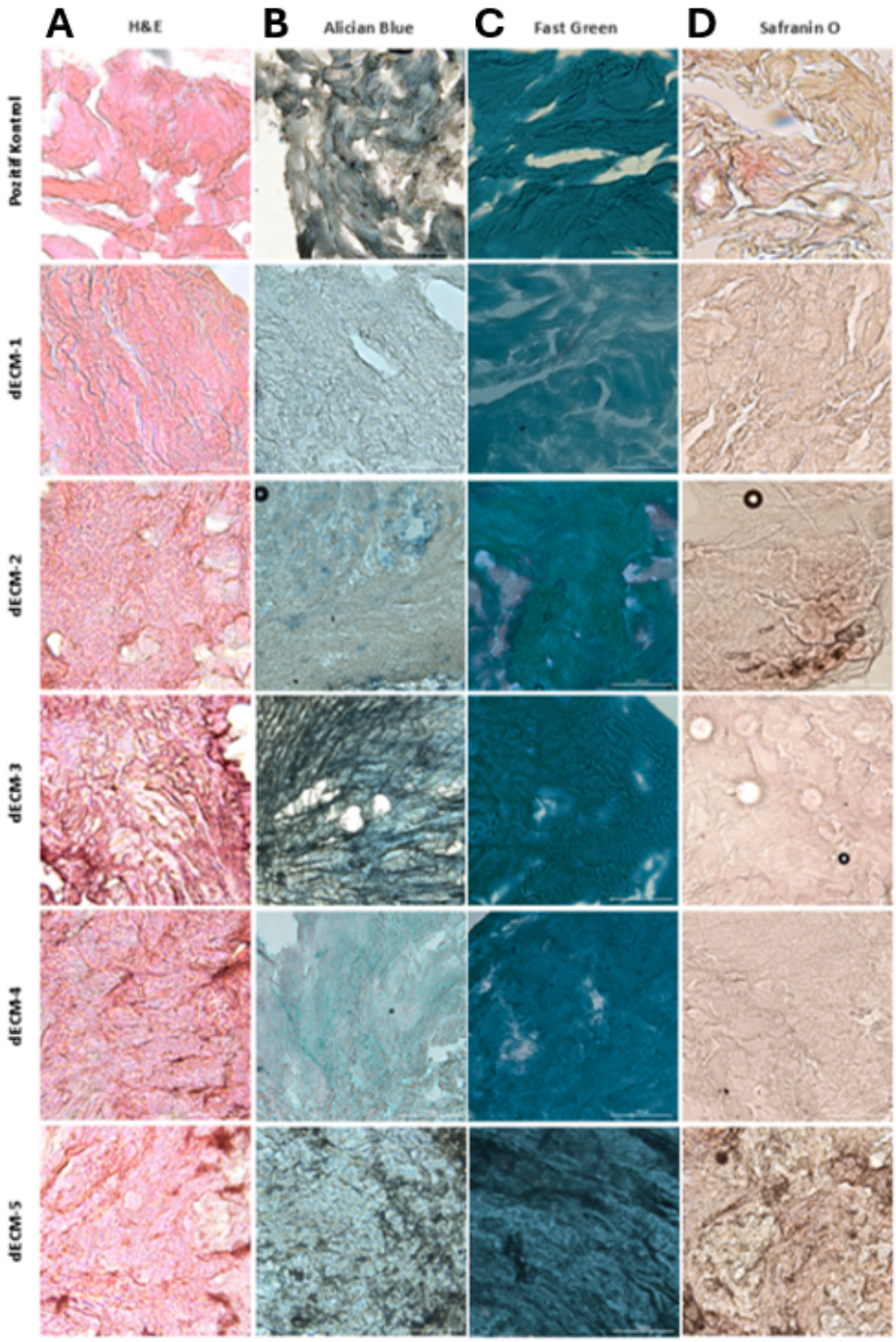


Şekil 4.7 dECM iskele ekstraktlarının L929 hücre canlılığı üzerine etkilerinin MTT hücre canlılığı analizi (n=3, $p < 0,001$).

4.1.2 dECM'nin Yapısal Karakterizasyonu

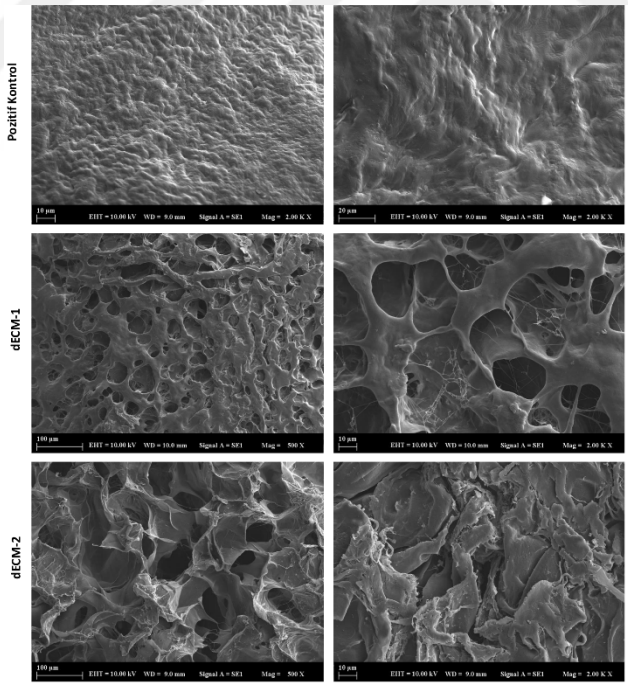
Deselülerizasyon işlemlerinin sonrasında yapısal özelliklerin değerlendirilmesi için yapılan histolojik boyamalar, deselülerizasyon sonrası elde edilen dECM'nin yapısal bütünlüğünü, hücresel kalıntı varlığını ve ECM bileşenlerinin dağılımını değerlendirmek bakımından önemli veriler sunmaktadır. Genetik materyal ve doku organizasyonunu incelemek amacıyla uygulanan H&E boyamasında, pozitif kontrol örneğinde düzenli pembe sitoplazmik yapılarla birlikte yoğun mor çekirdekler görülmüştür (Şekil 4.8 A). dECM-1 ve dECM-2 örneklerinde çekirdek yapılarının büyük ölçüde uzaklaştırıldığı ve fibril düzeninin korunduğu görülmüştür. dECM-3, dECM-4 ve dECM-5 örneklerinde diğer örneklere kıyasla daha yoğun miktarda çekirdek kalıntılarına ek olarak bozulmuş doku organizasyonu görülmüştür. Alcian Blue boyaması, GAG varlığını değerlendirmek amacıyla uygulanmıştır. Pozitif kontrolde görülen yoğun koyu mavi renk, GAG yapısının korunduğuna işaret etmektedir. dECM-3 ve dECM-5 örneklerinde görülen koyu mavi renkler GAG varlığına işaret etse de boyamaların düzensiz olması GAG organizasyonun bozulduğunu göstermektedir. dECM-1, dECM-2 ve dECM-4 örneklerinde görülen açık mavi renk, GAG'ların kısmi olarak korunduğunu göstermektedir (Şekil 4.8 B). Fast Green, deselülerizasyon sonrasında kolajen gibi yapısal proteinleri boyayarak yapısal bütünlüğün değerlendirilmesine katkıda bulunmaktadır. Pozitif kontrolde görülen homojen ve yoğun yeşil renk, sağlam ECM protein yapısına işaret etmektedir. dECM-1 ve dECM-2 örneklerinde görülen yeşil renk proteinlerin korunduğunu ve yapısal düzenin büyük ölçüde sürdürüldüğüne işaret etmektedir. dECM-5, dECM-4 ve dECM-3 örneklerinde diğerlerine kıyasla liflerin düzenlenişinde dolayısıyla yapısal organizasyonda bozulmalar olduğu görülmektedir (Şekil 4.8 C). Safranin O boyaması, deselülerizasyon işlemlerinin GAG organizasyonu üzerine etkisini değerlendirmek amacıyla yapılmıştır. Pozitif kontrolde gözlemlenen kahverengi-kırmızı renklenme, GAG organizasyonunun varlığını göstermektedir (Şekil 4.8 D). dECM-1 örneğinde renklenmenin azalmasıyla birlikte GAG dağılımının homojen olmadığı görülmüştür. dECM-2 'de ise daha yoğun ve homojen boyamanın görülmesi, mevcut GAG organizasyonunun korunduğu görülmektedir. dECM-3, dECM-4 ve dECM-5 örneklerinde ise boyamaların düzensiz oluşu, GAG'ların sayısal olarak

korunmuş olmasına rağmen dağılım düzenlerinin bozulduğunu göstermektedir. Yapılan tüm boyamalar şekil 4.8'de görülmektedir.

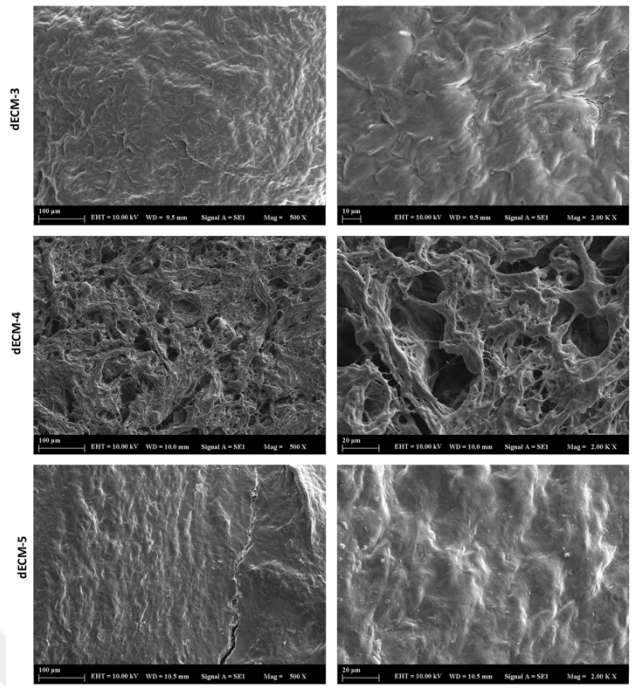


Şekil 4.8 Farklı deselülerizasyon metodlarının genetik materyal uzaklaştırılması ve ECM korunumuna etkilerini değerlendirmek amacıyla A) H & E, B) Alcian blue, C) Fast green ve D) Safranin O boyamaları gerçekleştirilmiştir. (Büyütme 40X)

Şekil 4.9'da, PK ve beş farklı deselülerizasyon metoduyla elde edilen dECM iskelelerine ait SEM görüntüleri yer almaktadır. PK'ya ait SEM görüntülerinde kompakt, düzenli ve hücresel yapıların hâlâ mevcut olduğu bir yüzey morfolojisi gözlemlenmiş, ayrıca ECM'in doğal mimarisinin korunduğu belirlenmiştir. Buna karşılık, dECM-1 ve dECM-2 iskelelerinde diğer iskelelere kıyasla belirgin şekilde daha homojen dağılmış ve açık gözenekli bir yapı gözlenmiştir. Bu durum, uygulanan metodların hücresel içeriğin etkin bir şekilde uzaklaştırılmasını sağladığını ve ECM'in üç boyutlu mimarisinin büyük ölçüde korunduğunu göstermektedir [3]. Öte yandan, dECM-3, dECM-4 ve dECM-5 gruplarında gözlenen yüzey morfolojisi, daha az gözenekli, düzensiz ve yapısal olarak kısmen bozulmuş bir ECM yapısına işaret etmektedir. Bu bulgular, söz konusu metodların hem yetersiz deselülerizasyon sağladığını hem de ECM'in yapısal bütünlüğüne kısmen zarar verdiğini göstermektedir. Tüm metodlarda belirli düzeyde yapısal bozulma meydana gelse de, dECM-1 ve dECM-2 örneklerinde deselülerizasyon açısından daha başarılı iskeleler elde edilmiştir.



Şekil 4.9 PK (Büyütme 2000X) ve dECM (Büyütme 500X ve 2000X) SEM görüntüleri.



Şekil 4.10 PK (Büyütme 2000X) ve dECM (Büyütme 500X ve 2000X) SEM görüntüleri. (Devamı)

4.2 Öneriler ve Tartışma

Kardiyak doku mühendisliği alanında çalışan pekçok araştırmacı, KVH'lerin tedavisinde kullanılmak üzere biyouyumlu, dayanıklı ve fonksiyonel biyomalzemeler geliştirmeyi hedeflemektedir. Günümüzde doğal dokuların deselülerizasyonuyla oluşturulan dECM temelli biyomalzemeler, mekanik dayanılıkları, doğal matriks içerikleri ve düşük immünojenisiteleri sayesinde dikkat çekmektedir. Etkili bir deselülerizasyon metodu, hücresel bileşenlerin yüksek oranda uzaklaştırılmasıyla immün yanıtın azalmasını sağlarken ECM'nin yapısal ve moleküler özelliklerinin korunmasını amaçlamaktadır [10]. Deselülerizasyon işleminin etkinliği, doku tipi, kullanılan deselülerizasyon ajanları, çözelti konsantrasyonları, işlem süresi, pH ve sıcaklık gibi faktörlere bağlı olarak değişmektedir. Bu bağlamda, fiziksel, kimyasal ve enzimatik yöntemlerin tek başına uygulanması çoğu zaman yeterli olmamakta; bu nedenle optimal deselülerizasyon, bu yöntemlerin kombine ve ardışık şekilde uygulanmasıyla sağlamaktadır. Bununla birlikte, deterjan veya enzim kalıntılarının doku içerisinde kalması, inflamatuar yanıt ve toksisite riskini artırarak biyouyumluluğu olumsuz etkileyebilmektedir. Deterjanların yük farklılıklarından kaynaklanan sinerjik etkiler

ise, deselülerizasyon verimliliğini artırmakta ve bu nedenle çok bileşenli yaklaşımlar tercih edilmektedir [116]. Literatürde sığır perikardının deselülerizasyonu için farklı metodlar yer almasına rağmen evrensel bir yöntem mevcut değildir. Bu tez çalışmasında sığır perikardiyumunun deselülerizasyonunun optimizasyonu için 5 farklı metod uygulanmıştır. DNA analizi sonuçlarına göre M1 (24,19 ± 2,02 ng/mg) %89,34 oranında ve M2 (14,73 ± 3,66 ng/mg) %91,37 oranında genetik materyal uzaklaştırıldığı belirlenmiştir. M1, Triton X-100 ve SDC kombinasyonunu içermektedir. Benzer şekilde 2019 yılında sığır perikardının deselülerizasyonunda Triton X-100 ve SDC kullanılarak etkili deselülerizasyon sağlanmıştır [102]. M2 ise SDS ve Triton X-100 kombinasyonunu içermektedir. 2021 yılında yapılan bir çalışmada insan miyokardının deselülerizasyonunda SDS ve Triton X-100 uygulamasının yüksek oranda geentik materyal uzaklaştırdığı bildirilmiştir. Literatüre bakıldığında mg başına 50 ng DNA varlığının etkili deselülerizasyon olarak değerlendirildiği görüldüğünden tez çalışması kapsamında M3 hariç tüm metodların bu şartı sağladığı görülmüştür fakat M1 ve M2 metodları genetik materyal uzaklaştırmada diğer metodlardan daha etkili olarak değerlendirilmiştir. Deselülerizasyon işleminde genetik materyalin uzaklaştırılması kadar ECM yapısının ve özelliklerinin korunması da oldukça önemlidir [9].

Ancak başarılı bir deselülerizasyon, yalnızca DNA uzaklaştırma ile sınırlı kalmamalı; aynı zamanda ECM'nin kritik bileşenlerinin korunması da sağlanmalıdır. Kolajenin ECM yapısına mekanik destek sağladığı GAG'ın ise hücresel sinyalleşmede önemli rol oynadığı bilinmektedir. Bu amaçla kolajen ve GAG miktarlarının korunumu değerlendirilmiştir. Bu çalışmada yapılan biyokimyasal analizler sonucunda, kolajenin korunması açısından en başarılı metodların M1 ($158 \pm 23{,}82\ \mu g/mg$) ve M2 ($120{,}89 \pm 13{,}42\ \mu g/mg$) olduğu belirlenmiştir. Triton X-100'ün iyonik olmayan yapısı, diğer deterjanlara göre kolajen fibril organizasyonuna daha az zarar verdiği için bu sonucu desteklemektedir [73]. Ayrıca, SDS ve Triton X-100 kombinasyonunun, DNA uzaklaştırma etkisinin yanı sıra kolajen yapısının korunmasına da katkı sağladığı görülmüştür. Triton X-100'ün SDC ve SDS gibi deterjanlarla birlikte kullanımı benzer şekilde genetik materyalin uzaklaştırılmasına ilaveten kolajen miktarının ve yapısının korunmasını sağlamıştır [21], [80].

Uygulanan metodlar arasında GAG içeriği açısından en yüksek korunma ise M3 ($51{,}50 \pm 1{,}05$ µg/mg) ve M5 ($44{,}44 \pm 2{,}03$ µg/mg) metodlarında gözlemlenmiştir. M3 metodunda kullanılan düşük konsantrasyonlu SDC'nin, ECM yapısını minimal düzeyde etkileyerek GAG bileşenlerinin korunmasına olanak sağladığı düşünülmektedir. Benzer şekilde, M5 metodunda SDS'nin daha düşük konsantrasyonlarda kullanılması ve Triton X-100 ile kombinasyonu sayesinde uygulanan işlemin daha az etki göstermesi, GAG yapısının korunmasına katkı sağladığı yönünde değerlendirilmiştir.

Deselülerizasyon işlemi süresince ortama salınan DNA ve protein miktarlarının nanodrop yardımıyla ölçülmesi, uygulanan metodların genetik materyal uzaklaştırılması ve ECM üzerine etkisini değerlendirmek için önemli bilgiler sunmaktadır. Bu verilerden yararlanılarak spesifik olarak uygulanılan işlemlerin deselülerizasyon kinetiğindeki etkileri belirlenebilir. Literatürde 2021 yılında sıçan kalbinin perfüzyon aracılığıyla deselülerizasyonunda benzer bir yaklaşım kullanılmıştır [67]. Fakat yapılan literatür taramasında perfüzyon dışında herhangi bir deselülerizasyon işlemi için bu kadar kapsamlı bir nanodrop ölçümüne rastlanmamıştır. Deselülerizasyon işlemi süresince ortama salınan DNA miktarının değerlendirilmesiyle kimyasal ve enzimatik uygulamaların yüksek oranda genetik materyali uzaklaştırmada oldukça etkin oldukları görülmüştür. Ortama salınan protein miktarının değerlendirilmesi sonucunda kimyasal ajanların protein salınımını artırdığı gözlemlenmiştir.

Deselülerizasyon sonrası örneklerin ağırlıklarındaki değişim de ECM kaybı ve sıvı tutulumu hakkında önemli bilgiler vermektedir. M1 ve M2 metodlarının uygulandığı örneklerde deselülerizasyon sonrası belirgin ağırlık artışı gözlenmiş, bu durum deterjanların dokuya nüfuz etmesiyle oluşan sıvı emilimine ve kolajen gibi hidrofilik ECM proteinlerinin korunmasıyla ilişkilendirilmiştir. Aşırı hidrasyonun, doku mekaniği ve hücre tutunması açısından olumsuz etkileri olabileceği bilinmektedir [58]. Bu yüzden elde edilen dECM'lerin hücre tutunması üzerine etkileri araştırılmalıdır. M3 ve M4 gruplarında ise ağırlıkta azalma gözlenmiş, bu durum da ECM kaybı ile ilişkilendirilmiştir.

Kardiyak doku mühendisliğine yönelik biyomateryal geliştirme süreçlerinde, elde edilen dECM iskelelerinin biyouyumluluğu, uygulama başarısını doğrudan etkileyen bir faktörlerdendir [4]. Bu çalışmada uygulanan kalitatif ve kantitatif

biyouyumluluk analizleri, M1 ve M2 metodları ile elde edilen dECM iskelelerinin sitotoksik etki göstermediğini ve hücre proliferasyonunu desteklediğini ortaya koymuştur. MTT analiz sonuçları, M1 ve M2 yöntemiyle elde edilen dECM iskelelerinin hücre canlılığına etkileri sırayla %72,72 ± 0,24 ve %91,41 ± 0,24 olduğunu göstermiştir. Her iki metod da hücre canlılığı üzerine sitotoksik etki göstermemiştir. Kalitatif analizlerde ise, L929 hücrelerinin karakteristik fibroblast morfolojisinin koruduğu ve homojen şekilde yayıldığı dECM-2 iskelelerinin, hücre yapışması ve proliferasyonu için uygun bir mikroçevre sağladığı görülmüştür. dECM-1 iskelelerinde ise bu durum daha az belirgin olsa da benzer bir etki gözlemlenmiştir. Özellikle dECM-2 iskelelerinde gözlemlenen düzenli ve yoğun hücre yayılımı, yüksek hücre canlılığı verisi ile uyumludur. ECM yapısının korunması, yeniden hücrelendirme süreçlerinde hücrelerin proliferasyonu için oldukça önemlidir [6]. Kolajen miktarının korunumu açısından en başarılı metodlar olan M1 ve M2'deki yüksek hücre canlılığı, ECM yapısının kolajen miktarının yüksek oranda korunmasıyla da ilişkilendirilebilir. Buna karşılık, M3, M4 ve M5 metodlarıyla elde edilen dECM iskelelerinin sitotoksik etki gösterdiği, hücre morfolojisinde bozulmaların meydana geldiği ve hücre canlılığı %3'ün altında olduğu gözlemlenmiştir. Bu durum, kullanılan deterjanların adsorpsiyonundan dolayı yetersiz uzaklaştırılması, toksik kalıntıların iskelelerde birikmesi ve deselülerizasyon veriminin düşük olması ile ilişkilendirilmiştir. M3 metodunda genetik materyalin yetersiz uzaklaştırılması, M4 metodunda kullanılan zwitteryonik deterjan ASB-14'ün yetersiz yıkama süresi sebebiyle kalıntı bırakabilme riski ve yetersiz deselülerizasyon, hücre canlılığını olumsuz etkileyen olası faktörler olarak değerlendirilmiştir [7]. M5 metodu, genetik material uzaklaştırma, kolajen ve sGAG korunumu açısından etkili bir metod olarak değerlendirilse de, kalitatif ve kantitatif biyouyumluluk testleri sonucu dECM-5'in sitotoksik etki gösterdiği sonucuna ulaşılmıştır [8]. İleriki çalışmalarda M5'in yıkama adımlarının optimize edilmesiyle dECM-5'in biyouyumluluğu arttırılabilir. Bu bulgular, deterjanın tipi, uygulama süresi ve yıkama adımlarının biyouyumluluğu doğrudan etkilediği şeklinde yorumlanmıştır.

Yüzey morfolojisinin incelendiği SEM analizlerinde ise, M1 ve M2 metodlarıyla elde edilen dECM iskelelerinde daha gözenekli, homojen ve yoğun bir yapı gözlemlenmiştir [3]. ECM üç boyutlu mimarisinin kısmen korunduğuna işaret eden

bu yapı, hücrelerin iskele üzerine daha iyi tutunmasını kolaylaştırdığı şeklinde yorumlanmıştır. Buna karşın, M3, M4 ve M5 metodlarında gözlemlenen gözenekliliğin az oluşu ve yüzey yapısının deselülerize edilmemiş perikarda benzer oluşu, yetersiz deselülerizasyon ve bundan kaynaklı ECM yapısal özelliklerinin korunmasıyla ilişkilendirilmiştir. Tüm bu veriler ışığında, M2 metodunun kontrole yakın hücre canlılığı, homojen hücre yayılımı ve kısmen korunmuş ECM yapısı, bu metodun diğer deselülerizasyon metodlarına kıyasla daha başarılı olduğunu göstermiştir.

Bu tez çalışmasında, tüm bu veriler birlikte değerlendirildiğinde, M2 metodu hem yüksek genetik materyal uzaklaştırma oranı, yüksek miktarda kolajen korunumu ve biyouyumluluk açısından en başarılı deselülerizasyon metodu olarak belirlenmiştir. Etkili genetik materyal uzaklaştırma ve yüksek oranda ECM yapısının korunmasına ek olarak bu çalışma literatürde yer alan çoğu deselülerizasyon metodundan daha kısa sürede tamamlanması sebebiyle oldukça önemlidir. Elde edilen dECM iskelelerin kardiyak doku mühendisliği çalışmalarında biyomürekkep hazırlığı için değerli bir kaynak olabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKÇA

[1] G. A. Roth *et al.*, “Global, Regional, and National Burden of Cardiovascular Diseases for 10 Causes, 1990 to 2015,” *J Am Coll Cardiol*, vol. 70, no. 1, pp. 1–25, Jul. 2017, doi: 10.1016/j.jacc.2017.04.052.

[2] A. Scafa Udriște *et al.*, “Progress in Biomaterials for Cardiac Tissue Engineering and Regeneration,” *Polymers (Basel)*, vol. 15, no. 5, p. 1177, Mar. 2023, doi: 10.3390/POLYM15051177.

[3] A. S. Theus *et al.*, “Biomaterial approaches for cardiovascular tissue engineering,” *Emergent Mater*, vol. 2, no. 2, pp. 193–207, Jun. 2019, doi: 10.1007/S42247-019-00039-3/FIGURES/2.

[4] D. Zhang, R. He, Y. Qu, C. He, and B. Chu, “Application of biomaterials in cardiac tissue engineering: Current status and prospects,” *MedComm - Biomaterials and Applications*, vol. 3, no. 4, p. e103, Dec. 2024, doi: 10.1002/MBA2.103;WGROUP:STRING:PUBLICATION.

[5] L. D. Huyer *et al.*, “Biomaterial based cardiac tissue engineering and its applications,” *Biomed Mater*, vol. 10, no. 3, p. 034004, Jun. 2015, doi: 10.1088/1748-6041/10/3/034004.

[6] G. I. Barbulescu, F. M. Bojin, V. L. Ordodi, I. D. Goje, A. S. Barbulescu, and V. Paunescu, “Decellularized Extracellular Matrix Scaffolds for Cardiovascular Tissue Engineering: Current Techniques and Challenges,” *International Journal of Molecular Sciences 2022, Vol. 23, Page 13040*, vol. 23, no. 21, p. 13040, Oct. 2022, doi: 10.3390/IJMS232113040.

[7] A. A. Golebiowska, J. T. Intravaia, V. M. Sathe, S. G. Kumbar, and S. P. Nukavarapu, “Decellularized extracellular matrix biomaterials for regenerative therapies: Advances, challenges and clinical prospects,” *Bioact*

Mater, vol. 32, pp. 98–123, Feb. 2024, doi: 10.1016/J.BIOACTMAT.2023.09.017.

[8] M. Gadre, M. Kasturi, P. Agarwal, and K. S. Vasanthan, "Decellularization and Their Significance for Tissue Regeneration in the Era of 3D Bioprinting," *ACS Omega*, vol. 9, no. 7, p. 7375, 2024, doi: 10.1021/ACSOMEGA.3C08930.

[9] J. Zhao *et al.*, "Decellularization techniques pave the way for tissue engineering and regenerative medicine: a narrative review," *Regenerative Medicine Reports*, vol. 1, no. 2, pp. 117–130, Dec. 2024, doi: 10.4103/REGENMED.REGENMED-D-24-00016.

[10] H. Wan, J. Xiang, G. Mao, S. Pan, B. Li, and Y. Lu, "Recent Advances in the Application of 3D-Printing Bioinks Based on Decellularized Extracellular Matrix in Tissue Engineering," 2024, doi: 10.1021/acsomega.4c02847.

[11] H. Wan, J. Xiang, G. Mao, S. Pan, B. Li, and Y. Lu, "Recent Advances in the Application of 3D-Printing Bioinks Based on Decellularized Extracellular Matrix in Tissue Engineering," *ACS Omega*, vol. 9, no. 23, pp. 24219–24235, Jun. 2024, doi: 10.1021/ACSOMEGA.4C02847/ASSET/IMAGES/LARGE/AO4C02847_0006.JPEG.

[12] S. Gupta and R. Gupta, "Guided bone regeneration with Pericardium membranes," *IOSR Journal of Dental and Medical Sciences (IOSR-JDMS) e-ISSN*, vol. 13, no. 11, pp. 61–65, 2014, Accessed: Jun. 02, 2025. [Online]. Available: www.iosrjournals.orgwww.iosrjournals.org

[13] S. P. John and R. Nagarajan, "A Review on the Biomaterials Fabricated for Cardiac Tissue Engineering Using Decellularized Extracellular Matrix," *Regen Eng Transl Med*, vol. 11, no. 1, pp. 64–75, Apr. 2024, doi: 10.1007/S40883-024-00341-5/FIGURES/3.

[14] J. Liu *et al.*, "Bioactive scaffolds for tissue engineering: A review of decellularized extracellular matrix applications and innovations," *Exploration*, vol. 5, no. 1, Feb. 2024, doi: 10.1002/EXP.20230078,.

[15] E. S. Lisboa *et al.*, "Nanomaterials-combined methacrylated gelatin hydrogels (GelMA) for cardiac tissue constructs," *Journal of Controlled Release*, vol. 365, pp. 617–639, Jan. 2024, doi: 10.1016/J.JCONREL.2023.11.056.

[16] M. F. Tenreiro, A. F. Louro, P. M. Alves, and M. Serra, "Next generation of heart regenerative therapies: progress and promise of cardiac tissue engineering," *npj Regenerative Medicine 2021 6:1*, vol. 6, no. 1, pp. 1–17, Jun. 2021, doi: 10.1038/s41536-021-00140-4.

[17] G. I. Barbulescu, F. M. Bojin, V. L. Ordodi, I. D. Goje, A. S. Barbulescu, and V. Paunescu, "Decellularized Extracellular Matrix Scaffolds for Cardiovascular Tissue Engineering: Current Techniques and Challenges," *International Journal of Molecular Sciences 2022, Vol. 23, Page 13040*, vol. 23, no. 21, p. 13040, Oct. 2022, doi: 10.3390/IJMS232113040.

[18] M. Klak *et al.*, "Bioink based on the dECM for 3D bioprinting of bionic tissue, the first results obtained on murine model," *Bioprinting*, vol. 28, p. e00233, Dec. 2022, doi: 10.1016/J.BPRINT.2022.E00233.

[19] J. Liu *et al.*, "Bioactive scaffolds for tissue engineering: A review of decellularized extracellular matrix applications and innovations," *Exploration*, Feb. 2024, doi: 10.1002/EXP.20230078.

[20] I. Belviso *et al.*, "Cardiac-derived extracellular matrix: A decellularization protocol for heart regeneration," *PLoS One*, vol. 17, no. 10, p. e0276224, Oct. 2022, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0276224.

[21] A. Neishabouri, A. Soltani Khaboushan, F. Daghigh, A. M. Kajbafzadeh, and M. Majidi Zolbin, "Decellularization in Tissue Engineering and Regenerative Medicine: Evaluation, Modification, and Application Methods," *Front Bioeng Biotechnol*, vol. 10, p. 805299, Apr. 2022, doi: 10.3389/FBIOE.2022.805299.

[22] E. V. Isaeva, E. E. Beketov, N. V. Arguchinskaya, S. A. Ivanov, P. V. Shegay, and A. D. Kaprin, "Decellularized Extracellular Matrix for Tissue Engineering (Review)," *Modern Technologies in Medicine*, vol. 14, no. 3, p. 57, Jun. 2022, doi: 10.17691/STM2022.14.3.07.

[23] İ. Üçgül and S. Aras, “EKSTRASELÜLER MATRİS YAPISI VE GÖREVLERİ,” *Cilt*, vol. 23, 2018, doi: 10.17482/uumfd.327376.

[24] A. D. Theocharis, S. S. Skandalis, C. Gialeli, and N. K. Karamanos, “Extracellular matrix structure,” *Adv Drug Deliv Rev*, vol. 97, pp. 4–27, Feb. 2016, doi: 10.1016/J.ADDR.2015.11.001.

[25] J. J. A. Poole and L. B. Mostaço-guidolin, “Optical Microscopy and the Extracellular Matrix Structure: A Review,” *Cells 2021, Vol. 10, Page 1760*, vol. 10, no. 7, p. 1760, Jul. 2021, doi: 10.3390/CELLS10071760.

[26] J. Liu *et al.*, “Bioactive scaffolds for tissue engineering: A review of decellularized extracellular matrix applications and innovations,” *Exploration*, vol. 5, no. 1, p. 20230078, Feb. 2024, doi: 10.1002/EXP.20230078.

[27] X. Zhang, X. Chen, H. Hong, R. Hu, J. Liu, and C. Liu, “Decellularized extracellular matrix scaffolds: Recent trends and emerging strategies in tissue engineering,” *Bioact Mater*, vol. 10, pp. 15–31, Apr. 2022, doi: 10.1016/J.BIOACTMAT.2021.09.014.

[28] M. Assunção, D. Dehghan-Baniani, C. H. K. Yiu, T. Später, S. Beyer, and A. Blocki, “Cell-Derived Extracellular Matrix for Tissue Engineering and Regenerative Medicine,” *Front Bioeng Biotechnol*, vol. 8, p. 602009, Dec. 2020, doi: 10.3389/FBIOE.2020.602009/XML/NLM.

[29] D. A. Taylor, C. Hochman-Mendez, J. Huelsmann, A. Elgalad, and L. C. Sampaio, “Tissue-engineered cardiovascular products,” *Principles of Tissue Engineering*, pp. 1521–1536, Jan. 2020, doi: 10.1016/B978-0-12-818422-6.00084-8.

[30] Z. Wang, D. W. Long, Y. Huang, W. C. W. Chen, K. Kim, and Y. Wang, “Decellularized neonatal cardiac extracellular matrix prevents widespread ventricular remodeling in adult mammals after myocardial infarction,” *Acta Biomater*, vol. 87, pp. 140–151, Mar. 2019, doi: 10.1016/J.ACTBIO.2019.01.062.

[31] U. Sarig *et al.*, "Natural myocardial ECM patch drives cardiac progenitor based restoration even after scarring," *Acta Biomater*, vol. 44, pp. 209–220, Oct. 2016, doi: 10.1016/J.ACTBIO.2016.08.031.

[32] Q. Wang *et al.*, "Functional engineered human cardiac patches prepared from nature's platform improve heart function after acute myocardial infarction," *Biomaterials*, vol. 105, pp. 52–65, Oct. 2016, doi: 10.1016/J.BIOMATERIALS.2016.07.035.

[33] I. Perea-Gil *et al.*, "Head-to-head comparison of two engineered cardiac grafts for myocardial repair: From scaffold characterization to pre-clinical testing," *Scientific Reports 2018 8:1*, vol. 8, no. 1, pp. 1–13, Apr. 2018, doi: 10.1038/s41598-018-25115-2.

[34] R. Al-Hejailan, T. Weigel, S. Schürlein, C. Berger, F. Al-Mohanna, and J. Hansmann, "Decellularization of Full Heart—Optimizing the Classical Sodium-Dodecyl-Sulfate-Based Decellularization Protocol," *Bioengineering*, vol. 9, no. 4, p. 147, Apr. 2022, doi: 10.3390/BIOENGINEERING9040147/S1.

[35] A. Neishabouri, A. Soltani Khaboushan, F. Daghigh, A. M. Kajbafzadeh, and M. Majidi Zolbin, "Decellularization in Tissue Engineering and Regenerative Medicine: Evaluation, Modification, and Application Methods," *Front Bioeng Biotechnol*, vol. 10, p. 805299, Apr. 2022, doi: 10.3389/FBIOE.2022.805299/XML/NLM.

[36] G. I. Barbulescu, F. M. Bojin, V. L. Ordodi, I. D. Goje, A. S. Barbulescu, and V. Paunescu, "Decellularized Extracellular Matrix Scaffolds for Cardiovascular Tissue Engineering: Current Techniques and Challenges," *International Journal of Molecular Sciences 2022, Vol. 23, Page 13040*, vol. 23, no. 21, p. 13040, Oct. 2022, doi: 10.3390/IJMS232113040.

[37] L. Iop, T. Palmosi, E. D. Sasso, and G. Gerosa, "Bioengineered tissue solutions for repair, correction and reconstruction in cardiovascular surgery," *J Thorac Dis*, vol. 10, no. Suppl 20, p. S2390, Jul. 2018, doi: 10.21037/JTD.2018.04.27.

[38] C. Bosques *et al.*, "Profitability of Chemically Cross-Linked Collagen Scaffold Production Using Bovine Pericardium: Revaluing Waste from the

Meat Industry for Biomedical Applications," *Polymers 2023, Vol. 15, Page 2797*, vol. 15, no. 13, p. 2797, Jun. 2023, doi: 10.3390/POLYM15132797.

[39] K. H. Sizeland *et al.*, "Age dependent differences in collagen alignment of glutaraldehyde fixed Bovine pericardium," *Biomed Res Int*, vol. 2014, Sep. 2014, doi: 10.1155/2014/189197,.

[40] S. Zouhair *et al.*, "A Comprehensive Comparison of Bovine and Porcine Decellularized Pericardia: New Insights for Surgical Applications," *Biomolecules*, vol. 10, no. 3, p. 371, Mar. 2020, doi: 10.3390/BIOM10030371.

[41] A. Porzionato, E. Stocco, S. Barbon, F. Grandi, V. Macchi, and R. De Caro, "Tissue-Engineered Grafts from Human Decellularized Extracellular Matrices: A Systematic Review and Future Perspectives," *International Journal of Molecular Sciences 2018, Vol. 19, Page 4117*, vol. 19, no. 12, p. 4117, Dec. 2018, doi: 10.3390/IJMS19124117.

[42] M. Gadre, M. Kasturi, P. Agarwal, and K. S. Vasanthan, "Decellularization and Their Significance for Tissue Regeneration in the Era of 3D Bioprinting," *ACS Omega*, vol. 9, no. 7, p. 7375, 2024, doi: 10.1021/ACSOMEGA.3C08930.

[43] P. M. Crapo, T. W. Gilbert, and S. F. Badylak, "An overview of tissue and whole organ decellularization processes," *Biomaterials*, vol. 32, no. 12, pp. 3233–3243, Apr. 2011, doi: 10.1016/J.BIOMATERIALS.2011.01.057.

[44] T. W. Gilbert, T. L. Sellaro, and S. F. Badylak, "Decellularization of tissues and organs," *Biomaterials*, vol. 27, no. 19, pp. 3675–3683, Jul. 2006, doi: 10.1016/J.BIOMATERIALS.2006.02.014.

[45] J. Liu *et al.*, "Bioactive scaffolds for tissue engineering: A review of decellularized extracellular matrix applications and innovations," *Exploration*, vol. 5, no. 1, p. 20230078, Feb. 2024, doi: 10.1002/EXP.20230078.

[46] N. Li, Y. Li, D. Gong, C. Xia, X. Liu, and Z. Xu, "Efficient decellularization for bovine pericardium with extracellular matrix preservation and good

biocompatibility," *Interact Cardiovasc Thorac Surg*, vol. 26, no. 5, pp. 768–776, May 2018, doi: 10.1093/ICVTS/IVX416.

[47] C. Gardin *et al.*, "Decellularization and delipidation protocols of bovine bone and pericardium for bone grafting and guided bone regeneration procedures," *PLoS One*, vol. 10, no. 7, Jul. 2015, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0132344,.

[48] J. Liu *et al.*, "Bioactive scaffolds for tissue engineering: A review of decellularized extracellular matrix applications and innovations," *Exploration*, vol. 5, no. 1, p. 20230078, Feb. 2024, doi: 10.1002/EXP.20230078;JOURNAL:JOURNAL:27662098;REQUESTEDJOURNAL:JOURNAL:27662098;WGROUP:STRING:PUBLICATION.

[49] M. Suzuki *et al.*, "In Vitro Tissue Reconstruction Using Decellularized Pericardium Cultured with Cells for Ligament Regeneration," *Polymers 2022, Vol. 14, Page 2351*, vol. 14, no. 12, p. 2351, Jun. 2022, doi: 10.3390/POLYM14122351.

[50] S. Kurokawa *et al.*, "In vivo recellularization of xenogeneic vascular grafts decellularized with high hydrostatic pressure method in a porcine carotid arterial interpose model," *PLoS One*, vol. 16, no. 7, p. e0254160, Jul. 2021, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0254160.

[51] P. M. Crapo, T. W. Gilbert, and S. F. Badylak, "An overview of tissue and whole organ decellularization processes," *Biomaterials*, vol. 32, no. 12, pp. 3233–3243, Apr. 2011, doi: 10.1016/J.BIOMATERIALS.2011.01.057.

[52] Y. Zager, D. Kain, N. Landa, J. Leor, and E. Maor, "Optimization of Irreversible Electroporation Protocols for In-vivo Myocardial Decellularization," *PLoS One*, vol. 11, no. 11, p. e0165475, Nov. 2016, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0165475.

[53] H. C. Ott *et al.*, "Perfusion-decellularized matrix: Using nature's platform to engineer a bioartificial heart," *Nat Med*, vol. 14, no. 2, pp. 213–221, Feb. 2008, doi: 10.1038/NM1684;KWRD=BIOMEDICINE.

[54] J. M. Wainwright *et al.*, “Preparation of Cardiac Extracellular Matrix from an Intact Porcine Heart,” *Tissue Eng Part C Methods*, vol. 16, no. 3, p. 525, Jun. 2009, doi: 10.1089/TEN.TEC.2009.0392.

[55] C. H. Lin *et al.*, “Sonication-assisted method for decellularization of human umbilical artery for small-caliber vascular tissue engineering,” *Polymers (Basel)*, vol. 13, no. 11, p. 1699, Jun. 2021, doi: 10.3390/POLYM13111699/S1.

[56] A. Hazwani, M. Sha’Ban, and A. Azhim, “Characterization and in vivo study of decellularized aortic scaffolds using closed sonication system,” *Organogenesis*, vol. 15, no. 4, pp. 120–136, Oct. 2019, doi: 10.1080/15476278.2019.1656997;WEBSITE:WEBSITE:TFOPB;PAGEGROUP:STRING:PUBLICATION.

[57] A. Neishabouri, A. Soltani Khaboushan, F. Daghigh, A. M. Kajbafzadeh, and M. Majidi Zolbin, “Decellularization in Tissue Engineering and Regenerative Medicine: Evaluation, Modification, and Application Methods,” *Front Bioeng Biotechnol*, vol. 10, p. 805299, Apr. 2022, doi: 10.3389/FBIOE.2022.805299/XML/NLM.

[58] A. Gilpin and Y. Yang, “Decellularization Strategies for Regenerative Medicine: From Processing Techniques to Applications,” *Biomed Res Int*, vol. 2017, p. 9831534, 2017, doi: 10.1155/2017/9831534.

[59] U. Mendibil, R. Ruiz-Hernandez, S. Retegi-Carrion, N. Garcia-Urquia, B. Olalde-Graells, and A. Abarrategi, “Tissue-Specific Decellularization Methods: Rationale and Strategies to Achieve Regenerative Compounds,” *Int J Mol Sci*, vol. 21, no. 15, p. 5447, Aug. 2020, doi: 10.3390/IJMS21155447.

[60] Y. Andoh, S. Kitou, and S. Okazaki, “Difference in molecular mechanisms governing changes in membrane properties of phospholipid bilayers induced by addition of nonionic and zwitterionic surfactants,” *J Mol Liq*, vol. 271, pp. 933–941, Dec. 2018, doi: 10.1016/J.MOLLIQ.2018.09.018.

[61] A. M. Seddon, P. Curnow, and P. J. Booth, “Membrane proteins, lipids and detergents: not just a soap opera,” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) -*

Biomembranes, vol. 1666, no. 1–2, pp. 105–117, Nov. 2004, doi: 10.1016/J.BBAMEM.2004.04.011.

[62] L. Laker, P. M. Dohmen, and F. E. Smit, "Synergy in a detergent combination results in superior decellularized bovine pericardial extracellular matrix scaffolds," *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, vol. 108, no. 6, pp. 2571–2578, Aug. 2020, doi: 10.1002/JBM.B.34588;JOURNAL:JOURNAL:15524981;WGROUP:STRING:PUBLICATION.

[63] M. F. Tenreiro *et al.*, "Interindividual heterogeneity affects the outcome of human cardiac tissue decellularization," *Sci Rep*, vol. 11, no. 1, pp. 1–11, Dec. 2021, doi: 10.1038/S41598-021-00226-5;SUBJMETA=2035,2064,532,54,61,631;KWRD=BIOMATERIALS,PLURIPOTENT+STEM+CELLS,TISSUE+ENGINEERING.

[64] T. W. Gilbert, T. L. Sellaro, and S. F. Badylak, "Decellularization of tissues and organs," *Biomaterials*, vol. 27, no. 19, pp. 3675–3683, Jul. 2006, doi: 10.1016/J.BIOMATERIALS.2006.02.014.

[65] L. Y. Lim, S. S. L. Ding, P. Muthukumaran, S. H. Teoh, Y. Koh, and A. K. K. Teo, "Tissue engineering of decellularized pancreas scaffolds for regenerative medicine in diabetes," *Acta Biomater*, vol. 157, pp. 49–66, Feb. 2023, doi: 10.1016/J.ACTBIO.2022.11.032.

[66] J. Willemse *et al.*, "Fast, robust and effective decellularization of whole human livers using mild detergents and pressure controlled perfusion," *Materials Science and Engineering: C*, vol. 108, p. 110200, Mar. 2020, doi: 10.1016/J.MSEC.2019.110200.

[67] G. I. Barbulescu *et al.*, "Innovative Biotechnology for Generation of Cardiac Tissue," *Applied Sciences 2021, Vol. 11, Page 5603*, vol. 11, no. 12, p. 5603, Jun. 2021, doi: 10.3390/APP11125603.

[68] J. Hülsmann *et al.*, "Transplantation material bovine pericardium: biomechanical and immunogenic characteristics after decellularization vs. glutaraldehyde-fixing," *Xenotransplantation*, vol. 19, no. 5, pp. 286–297, Sep. 2012, doi: 10.1111/J.1399-3089.2012.00719.X.

[69] A. Weymann *et al.*, “Bioartificial Heart: A Human-Sized Porcine Model – The Way Ahead,” *PLoS One*, vol. 9, no. 11, p. e111591, Nov. 2014, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0111591.

[70] S. K. Gupta, N. C. Mishra, and A. Dhasmana, “Erratum to: Decellularization Methods for Scaffold Fabrication,” *Methods in Molecular Biology*, vol. 1577, pp. 337–337, 2017, doi: 10.1007/7651_2017_110.

[71] R. C. Giorgi Filho *et al.*, “Physicochemical Decellularization of Bovine Pericardium: Effects on DNA Elimination, Extracellular Matrix Preservation, and Biocompatibility,” *Waste Biomass Valorization*, vol. 15, no. 7, pp. 4405–4417, Jul. 2024, doi: 10.1007/S12649-024-02465-9/METRICS.

[72] M. Yang, C. Z. Chen, X. N. Wang, Y. Bin Zhu, and Y. J. Gu, “Favorable effects of the detergent and enzyme extraction method for preparing decellularized bovine pericardium scaffold for tissue engineered heart valves,” *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, vol. 91, no. 1, pp. 354–361, Oct. 2009, doi: 10.1002/JBM.B.31409;CTYPE:STRING:JOURNAL.

[73] A. Gilpin and Y. Yang, “Decellularization Strategies for Regenerative Medicine: From Processing Techniques to Applications,” *Biomed Res Int*, vol. 2017, no. 1, p. 9831534, Jan. 2017, doi: 10.1155/2017/9831534.

[74] F. Zhang *et al.*, “Biomedical Application of Decellularized Scaffolds,” *ACS Appl Bio Mater*, vol. 6, no. 12, pp. 5145–5168, Dec. 2023, doi: 10.1021/ACSABM.3C00778/ASSET/IMAGES/LARGE/MT3C00778_0004.JPEG.

[75] Z. Z. Liu, M. L. Wong, and L. G. Griffiths, “Effect of bovine pericardial extracellular matrix scaffold niche on seeded human mesenchymal stem cell function,” *Scientific Reports 2016 6:1*, vol. 6, no. 1, pp. 1–12, Nov. 2016, doi: 10.1038/srep37089.

[76] S. K. Gupta, N. C. Mishra, and A. Dhasmana, “Decellularization Methods for Scaffold Fabrication,” *Methods in Molecular Biology*, vol. 1577, pp. 1–10, 2017, doi: 10.1007/7651_2017_34.

[77] Y. Li, Y. Zhou, W. Qiao, J. Shi, X. Qiu, and N. Dong, "Application of decellularized vascular matrix in small-diameter vascular grafts," *Front Bioeng Biotechnol*, vol. 10, p. 1081233, Jan. 2023, doi: 10.3389/FBIOE.2022.1081233/FULL.

[78] U. Mendibil, R. Ruiz-Hernandez, S. Retegi-Carrion, N. Garcia-Urquia, B. Olalde-Graells, and A. Abarrategi, "Tissue-Specific Decellularization Methods: Rationale and Strategies to Achieve Regenerative Compounds," *International Journal of Molecular Sciences 2020, Vol. 21, Page 5447*, vol. 21, no. 15, p. 5447, Jul. 2020, doi: 10.3390/IJMS21155447.

[79] D. Moffat, K. Ye, and S. Jin, "Decellularization for the retention of tissue niches," *J Tissue Eng*, vol. 13, 2022, doi: 10.1177/20417314221101151,.

[80] A. Neishabouri, A. Soltani Khaboushan, F. Daghigh, A. M. Kajbafzadeh, and M. Majidi Zolbin, "Decellularization in Tissue Engineering and Regenerative Medicine: Evaluation, Modification, and Application Methods," *Front Bioeng Biotechnol*, vol. 10, p. 805299, Apr. 2022, doi: 10.3389/FBIOE.2022.805299/XML/NLM.

[81] E. V. Isaeva, E. E. Beketov, N. V. Arguchinskaya, S. A. Ivanov, P. V. Shegay, and A. D. Kaprin, "Decellularized Extracellular Matrix for Tissue Engineering (Review)," *Modern Technologies in Medicine*, vol. 14, no. 3, p. 57, Jun. 2022, doi: 10.17691/STM2022.14.3.07.

[82] D. Moffat, K. Ye, and S. Jin, "Decellularization for the retention of tissue niches," *J Tissue Eng*, vol. 13, 2022, doi: 10.1177/20417314221101151/ASSET/53194D1C-B190-4223-8469-0DDAA666DD82/ASSETS/IMAGES/LARGE/10.1177_20417314221101151-FIG2.JPG.

[83] U. Mendibil, R. Ruiz-Hernandez, S. Retegi-Carrion, N. Garcia-Urquia, B. Olalde-Graells, and A. Abarrategi, "Tissue-Specific Decellularization Methods: Rationale and Strategies to Achieve Regenerative Compounds," *International Journal of Molecular Sciences 2020, Vol. 21, Page 5447*, vol. 21, no. 15, p. 5447, Jul. 2020, doi: 10.3390/IJMS21155447.

[84] J. Liu *et al.*, "Bioactive scaffolds for tissue engineering: A review of decellularized extracellular matrix applications and innovations,"

Exploration, vol. 5, no. 1, p. 20230078, Feb. 2024, doi: 10.1002/EXP.20230078.

[85] M. Alizadeh, L. Rezakhani, M. khodaei, M. Soleimannejad, and A. Alizadeh, "Evaluating the effects of vacuum on the microstructure and biocompatibility of bovine decellularized pericardium," *J Tissue Eng Regen Med*, vol. 15, no. 2, pp. 116–128, Feb. 2021, doi: 10.1002/TERM.3150.

[86] M. Alizadeh, L. Rezakhani, M. Soleimannejad, E. Sharifi, M. Anjomshoa, and A. Alizadeh, "Evaluation of vacuum washing in the removal of SDS from decellularized bovine pericardium: method and device description," *Heliyon*, vol. 5, no. 8, p. e02253, Aug. 2019, doi: 10.1016/J.HELIYON.2019.E02253.

[87] R. C. Cornelison *et al.*, "Development of an apoptosis-assisted decellularization method for maximal preservation of nerve tissue structure," *Acta Biomater*, vol. 77, pp. 116–126, Sep. 2018, doi: 10.1016/J.ACTBIO.2018.07.009.

[88] Y. H. Song *et al.*, "Development of novel apoptosis-assisted lung tissue decellularization methods," *Biomater Sci*, vol. 9, no. 9, pp. 3485–3498, May 2021, doi: 10.1039/D1BM00032B,.

[89] B. S. Kim *et al.*, "Comparative analysis of supercritical fluid-based and chemical-based decellularization techniques for nerve tissue regeneration," *Biomater Sci*, vol. 12, no. 7, pp. 1847–1863, Mar. 2024, doi: 10.1039/D3BM02072J.

[90] G. I. Barbulescu, F. M. Bojin, V. L. Ordodi, I. D. Goje, A. S. Barbulescu, and V. Paunescu, "Decellularized Extracellular Matrix Scaffolds for Cardiovascular Tissue Engineering: Current Techniques and Challenges," *International Journal of Molecular Sciences 2022, Vol. 23, Page 13040*, vol. 23, no. 21, p. 13040, Oct. 2022, doi: 10.3390/IJMS232113040.

[91] F. R. Halfwerk, J. Rouwkema, J. A. Gossen, and J. G. Grandjean, "Supercritical carbon dioxide decellularised pericardium: Mechanical and structural characterisation for applications in cardio-thoracic surgery," *J Mech Behav Biomed Mater*, vol. 77, pp. 400–407, Jan. 2018, doi: 10.1016/J.JMBBM.2017.10.002.

[92] C. Fidalgo *et al.*, "A sterilization method for decellularized xenogeneic cardiovascular scaffolds," *Acta Biomater*, vol. 67, pp. 282–294, Feb. 2018, doi: 10.1016/J.ACTBIO.2017.11.035.

[93] T. Deepak and A. R. Babu, "A review of current approaches for decellularization, sterilization, and hemocompatibility testing on xenogeneic pericardium," *Mater Today Commun*, vol. 33, p. 104478, Dec. 2022, doi: 10.1016/J.MTCOMM.2022.104478.

[94] A. Neishabouri, A. Soltani Khaboushan, F. Daghigh, A. M. Kajbafzadeh, and M. Majidi Zolbin, "Decellularization in Tissue Engineering and Regenerative Medicine: Evaluation, Modification, and Application Methods," *Front Bioeng Biotechnol*, vol. 10, p. 805299, Apr. 2022, doi: 10.3389/FBIOE.2022.805299.

[95] J. Liu *et al.*, "Bioactive scaffolds for tissue engineering: A review of decellularized extracellular matrix applications and innovations," *Exploration*, vol. 5, no. 1, p. 20230078, Feb. 2024, doi: 10.1002/EXP.20230078;JOURNAL:JOURNAL:27662098;REQUESTEDJOURNAL:JOURNAL:27662098;WGROUP:STRING:PUBLICATION.

[96] O. Braissant, M. Astasov-Frauenhoffer, T. Waltimo, and G. Bonkat, "A Review of Methods to Determine Viability, Vitality, and Metabolic Rates in Microbiology," *Front Microbiol*, vol. 11, p. 547458, Nov. 2020, doi: 10.3389/FMICB.2020.547458/XML/NLM.

[97] T. L. Riss *et al.*, "Cell Viability Assays," *Assay Guidance Manual*, Jul. 2016, Accessed: Jun. 01, 2025. [Online]. Available: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/

[98] A. Neishabouri, A. Soltani Khaboushan, F. Daghigh, A. M. Kajbafzadeh, and M. Majidi Zolbin, "Decellularization in Tissue Engineering and Regenerative Medicine: Evaluation, Modification, and Application Methods," *Front Bioeng Biotechnol*, vol. 10, p. 805299, Apr. 2022, doi: 10.3389/FBIOE.2022.805299.

[99] C. Gardin *et al.*, "Decellularization and Delipidation Protocols of Bovine Bone and Pericardium for Bone Grafting and Guided Bone Regeneration

Procedures," *PLoS One*, vol. 10, no. 7, p. e0132344, Jul. 2015, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0132344.

[100] C. Prat-Vidal *et al.*, "Online monitoring of myocardial bioprosthesis for cardiac repair," *Int J Cardiol*, vol. 174, no. 3, pp. 654–661, Jul. 2014, doi: 10.1016/j.ijcard.2014.04.181.

[101] Z. Z. Liu, M. L. Wong, and L. G. Griffiths, "Effect of bovine pericardial extracellular matrix scaffold niche on seeded human mesenchymal stem cell function," *Scientific Reports 2016 6:1*, vol. 6, no. 1, pp. 1–12, Nov. 2016, doi: 10.1038/srep37089.

[102] N. Li, Y. Li, D. Gong, C. Xia, X. Liu, and Z. Xu, "Efficient decellularization for bovine pericardium with extracellular matrix preservation and good biocompatibility," *Interact Cardiovasc Thorac Surg*, vol. 26, no. 5, pp. 768–776, May 2018, doi: 10.1093/ICVTS/IVX416.

[103] "(PDF) VALIDATION OF TISSUE HYDROLYSIS METHODS FOR QUANTIFICATION OF COLLAGEN IN BOVINE PERICARDIUM." Accessed: May 19, 2025. [Online]. Available: https://www.researchgate.net/publication/319037924_VALIDATION_OF_TISSUE_HYDROLYSIS_METHODS_FOR_QUANTIFICATION_OF_COLLAGEN_IN_BOVINE_PERICARDIUM

[104] M. A. Heuschkel *et al.*, "In vitro evaluation of bovine pericardium after a soft decellularization approach for use in tissue engineering," *Xenotransplantation*, vol. 26, no. 2, p. e12464, Mar. 2019, doi: 10.1111/XEN.12464.

[105] "Biological evaluation of medical devices-16:45:28 MDT No reproduction or networking permitted without license from IHS COPYRIGHT PROTECTED DOCUMENT 16:45:28 MDT No reproduction or networking permitted without license from IHS," 2009.

[106] K. Adhitya, A. Adiputra, H. Soebroto, and I. Puruhito, "Comparative Analysis of Decellularization Methods on Bovine Pericardium Scaffolds for Cardiac Tissue Engineering," *Journal of Angiotherapy*, vol. 8, no. 8, pp. 1–7, Aug. 2024, doi: 10.25163/ANGIOTHERAPY.889833.

[107] J. Liu *et al.*, “Nonglutaraldehyde Fixation for off the Shelf Decellularized Bovine Pericardium in Anticalcification Cardiac Valve Applications,” *ACS Biomater Sci Eng*, vol. 5, no. 3, pp. 1452–1461, Mar. 2019, doi: 10.1021/ACSBIOMATERIALS.8B01311/ASSET/IMAGES/LARGE/AB-2018-01311B_0007.JPEG.

[108] J. Liu *et al.*, “Bioactive scaffolds for tissue engineering: A review of decellularized extracellular matrix applications and innovations,” *Exploration*, vol. 5, no. 1, p. 20230078, Feb. 2025, doi: 10.1002/EXP.20230078;JOURNAL:JOURNAL:27662098;REQUESTEDJOURNAL:JOURNAL:27662098;WGROUP:STRING:PUBLICATION.

[109] M. Suzuki, T. Kimura, Y. Hashimoto, and A. Kishida, “Application of decellularized tissue for soft-hard interregional regeneration,” *Front Bioeng Biotechnol*, vol. 13, p. 1394714, 2025, doi: 10.3389/FBIOE.2025.1394714.

[110] Z. Z. Liu, M. L. Wong, and L. G. Griffiths, “Effect of bovine pericardial extracellular matrix scaffold niche on seeded human mesenchymal stem cell function,” *Scientific Reports 2016 6:1*, vol. 6, no. 1, pp. 1–12, Nov. 2016, doi: 10.1038/SREP37089.

[111] J. Liu *et al.*, “Bioactive scaffolds for tissue engineering: A review of decellularized extracellular matrix applications and innovations,” *Exploration*, vol. 5, no. 1, p. 20230078, Feb. 2024, doi: 10.1002/EXP.20230078;JOURNAL:JOURNAL:27662098;REQUESTEDJOURNAL:JOURNAL:27662098;WGROUP:STRING:PUBLICATION.

[112] H. Zheng, Y. Xu, E. A. Liehn, and M. Rusu, “Vitamin C as Scavenger of Reactive Oxygen Species during Healing after Myocardial Infarction,” *International Journal of Molecular Sciences 2024, Vol. 25, Page 3114*, vol. 25, no. 6, p. 3114, Mar. 2024, doi: 10.3390/IJMS25063114.

[113] T. S. Tabatabai, M. Salehi, L. Rezakhani, Z. Arabpour, A. R. Djalilian, and M. Alizadeh, “Decellularization of various tissues and organs through chemical methods,” *Tissue Cell*, vol. 91, p. 102573, Dec. 2024, doi: 10.1016/J.TICE.2024.102573.

[114] P. M. Crapo, T. W. Gilbert, and S. F. Badylak, “An overview of tissue and whole organ decellularization processes,” *Biomaterials*, vol. 32, no. 12, pp. 3233–3243, Apr. 2011, doi: 10.1016/J.BIOMATERIALS.2011.01.057.

[115] A. Gilpin and Y. Yang, “Decellularization Strategies for Regenerative Medicine: From Processing Techniques to Applications,” *Biomed Res Int*, vol. 2017, p. 9831534, 2017, doi: 10.1155/2017/9831534.

[116] M. Andreea Daniela, “Decellularization methods for the realization of heart valves pericardium-based TESI DI LAUREA MAGISTRALE IN XXXXX ENGINEERING-INGEGNERIA XXXXX”.