



**PLA/PCL/CoO KARDİYAK YAMALARIN ÜRETİMİ VE
KARAKTERİZASYONU**

GÜLŞEN ŞAHİN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BIYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI

DR. ÖĞR. ÜYESİ ÖZLEM EĞRİ

**Ocak - 2020
Her hakkı saklıdır**

T.C.
TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

PLA/PCL/CoO KARDİYAK YAMALARIN ÜRETİMİ VE
KARAKTERİZASYONU

GÜLŞEN ŞAHİN

TOKAT
Ocak - 2020

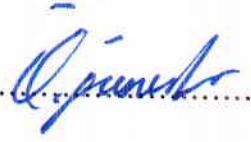
Her hakkı saklıdır

Gülşen ŞAHİN tarafından hazırlanan “**PLA/PCL/CoO Kardiyak Yamaların Hazırlanması ve Karakterizasyonu**” adlı tez çalışmasının savunma sınavı 02.03.2020 tarihinde yapılmış olup aşağıda belirtilen jüri üyeleri tarafından Oy Birliği ile Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

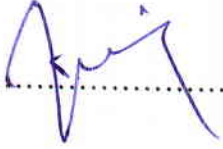
Jüri Üyeleri

İmza


Dr. Öğr. Üyesi Özlem EĞRİ



Doç. Dr. Fikret GEVREK



Doç. Dr. Ali ÖZER



ONAY



Prof. Dr. Çetin ÇEKİÇ

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

05/03/2020

TEZ BEYANI

Tez yazım kuralları uygun olarak hazırlanan bu tezin yazılmasında bilimsel ahlak kurallarına uyulduğunu, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlar uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezin içerdiği yenilik ve sonuçların başka bir yerden alınmadığını, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, tezin herhangi bir kısmının bu üniversite veya başka bir üniversitedeki başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

GÜLŞEN ŞAHİN

02 MART 2020

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

PLA/PCL/CoO KARDİYAK YAMALARIN HAZIRLANMASI VE KARAKTERİZASYONU

GÜLŞEN ŞAHİN

TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BIYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI

(TEZ DANIŞMANI: DR. ÖĞR. ÜYESİ ÖZLEM EĞRİ)

Kalp krizi sonrası kalp kaslarının hasar görmesine bağlı olarak hastalar hayati risk taşımaktadır. Bu nedenle hasarlı kalp dokusunu iyileştirmeye yönelik tedaviler giderek önem kazanmaktadır. Hasara uğramış olan miyokardın işlevselliğini geri kazandırmak amacıyla çeşitli ameliyatlarda yapılmakta ve/veya ilaç tedavileri uygulanmaktadır. Bununla birlikte hasarlı kalp dokusunu fonksiyonel olarak desteklemek ve/veya tedavi etmek amacı ile sentetik ya da biyolojik polimerden üretilmiş kardiyak yamalar kullanılmaktadır. Sunulan çalışmada biyobozunur, biyoyumlu, elastik, iletken kardiyak yamalar elektro-eğirme yöntemi kullanılarak üretilmiştir. Bu teknikle üretilen gözenekli fibröz yapı, hücre dışı matriksi (ECM) taklit edebilmesi ve yamaların mekanik dayanımının yüksek olmasını sağlaması nedeniyle son yıllarda farklı doku mühendisliği uygulamalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Tez çalışmasında kardiyak yamalar biyoyumlu ve biyobozunur polimerler olan Polilaktad (PLA) ve Polikaprolakton (PCL) polimer çözeltilerinin eş-zamanlı ve karşılıklı elektro-eğirilmesiyle üretilmiştir. Elektriksel iletkenliği sağlamak amacıyla kobalt oksit (CoO) nanopartikülleri belirli oranlarda polimer çözeltisi içerisine ilave edilerek membran yapısına dahil edilmiştir. Kardiyak yamaların yoğunluğu ve gözenekliliği hesaplanmış, membran morfolojisi SEM görüntüleri alınarak incelenmiştir. Kimyasal yapı analizi polimerlerin ve yamaların ayrı ayrı FTIR spektrumları alınarak yapılmıştır. Kardiyak yamaların mekanik dayanımları standart çekme testleri uygulanarak değerlendirilmiştir. *In-vitro* koşullarda şişme testleri yapılarak su alma kapasiteleri hesaplanmıştır. Yamaların zamanla kütle kaybı ve yamalardan CoO nanopartikül salımı 3 ay boyunca *in-vitro* koşullarda değerlendirilmiştir. Yama iletkenliği dört nokta prob tekniği kullanılarak ölçülmüştür. İnsan Kariyomiyosit Hücreleri (İKH) üzerindeki olası toksik etkileri MTT hücre canlılığı testi yapılarak ve apoptotik/nekrotik etkileri ikili boyama yöntemi uygulanarak değerlendirilmiştir. Ayrıca kardiyak yamaların yüzeyindeki yama-hücre etkileşimleri SEM görüntüleri alınarak incelenmiştir. Yapılan karakterizasyonu çalışmaları neticesinde PLA/PCL/CoO kardiyak yamaların *in-vivo* biyomedikal uygulamalarda kullanım potansiyeli olduğu düşünülmektedir.

2020, 100 SAYFA

ANAHTAR KELİMELELER: Kardiyak yama, Kobalt oksit (CoO), Polilaktad (PLA), Polikaprolakton (PCL), İkili elektro-eğirme

ABSTRACT

MASTER THESIS

PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF PLA/PCL/CoO CARDIAC PATCHES

GÜLŞEN ŞAHİN

TOKAT GAZIOSMANPASA UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

DEPARTMENT OF BIOENGINEERING

(SUPERVISOR: ASST. PROF. DR. ÖZLEM EĞRİ)

Patients carry the life threatening risk due to damaged heart muscles after heart attack. For this reason, therapies intended to heal damaged heart tissues come into prominence. Various surgeries and/or medications conducted for recovery of the functionality of the deteriorated myocardia. However, cardiac patches made of synthetic or biopolymers are used with the aim of supporting the functionality and/or therapy of the damaged heart tissues. In this study, biodegradable, biocompatible, elastic, conductive patches were produced by electrospinning technique. Recently, porous and fibrous structure produced by this technique is widely in tissue engineering applications because of its ability to mimic the extracellular matrix (ECM) and high mechanical strength. Cardiac patches were produced by concurrent and reciprocal electrospinning of Polylactide (PLA) and Polycaprolactone (PCL) solutions. Cobalt oxide (CoO) nanoparticles were included in the membrane structure by addition into polymer solutions in order to provide electrical conductivity. Density and the porosity of the cardiac patches were calculated and membrane morphology was investigated with SEM images. Chemical structure analysis was conducted by taking the FTIR spectra of polymers and the cardiac patches separately. Mechanical strength of membranes have been characterized by standard tensile test. Swelling tests of membranes were performed under appropriate conditions. Mass loss in time and release of CoO from cardiac patches were evaluated under *in vitro* conditions for 3 months period. Conductivities of the patches were measured by four point probe method. Possible cytotoxic effect on human cardiomyocyte cells (HCM) was evaluated by MTT test and apoptotic/necrotic effect was evaluated by double staining. Besides, cell interactions with the surface of the cardiac patches were investigated using SEM images. As a result of characterization studies it has been concluded that PLA/PCL/CoO cardiac patches have the potential to be used in *in-vivo* biomedical applications.

2020, 100 PAGES

KEY WORDS: Cardiac patches, Cobalt oxide (CoO), Polylactide (PLA), Polycaprolactone (PCL), co-electrospinning

ÖNSÖZ

Yüksek Lisans eğitimin boyunca tez konumun belirlenmesinde, çalışmalarımın gerçekleştirilmesi ve başarılı bir şekilde ilerlemesi için tüm laboratuvar imkanlarını sunan ve tezin sonuçlandırılıp, değerlendirilmesi konusunda desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, bunun yanı sıra bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan sayın danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Özlem EĞRİ'ye,

Tez çalışmam sürecinde bilgi ve tecrübelerini benimle her zaman paylaşan Genetik ve Biyomühendislik Bölümü Öğretim Üyelerine,

Yüksek Lisansa başladığım yıl içerisinde tanışma imkanı bulduğum ve her zaman desteğini hissettiğim, her konuda yardımcı olan sevgili arkadaşım Name ERDEMİR'e,

Beni bu günlere getiren ve yaşıntım boyunca her zaman bana destek olan, bana olan güvenlerini her zaman hissettiren, sabır ve anlayış çerçevesinde her daim yanımda bulunan annem Fadime ŞAHİN'e, babam Refik ŞAHİN'e,

Desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen halam Gülsüm ŞAHİN'e, kardeşlerim Hüseyin ŞAHİN, Seda Nur ŞAHİN, Nursen ŞAHİN'e ve yengem Semra ŞAHİN'e

Varlıkları ile beni her zaman mutlu eden ve sevginin farklı halini bana hissettirdikleri için yiğenlerim Ela ŞAHİN'e ve Yiğithan ŞAHİN'e

Her koşulda desteğini hep hissettiğim varlığı ile bile mutluluk veren arkadaşım Murat Can KILINÇARSLAN'a, sevgi ve desteklerii esirgemeyen ailesine,

İçinde bulunduğum zor durumlarda ve mutlu anlarımda her zaman yanımda olan kuzenlerim Melike ÖNAL'a ve Şermin ŞAHİN'e arkadaşlarım Büşra KÖKSAL'a ve Hatice KARADAĞ'a teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	v
ABSTRACT.....	vi
ÖNSÖZ	vii
İÇİNDEKİLER	viii
ŞEKİL LİSTESİ.....	x
ÇİZELGE LİSTESİ.....	xii
SİMGELER ve KISALTMALAR.....	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİ.....	4
2.1. Kalp.....	4
2.2. Kalbin Yapısı.....	4
2.3. Kalbin Anatomisi	5
2.4. Kalbin Histolojisi	7
2.5. Kas Sistemi ve Tipleri.....	8
2.5.1. Düz kaslar	9
2.5.2. İskelet kası	9
2.5.3. Kalp kası	9
2.6. Kalbin Fizyolojisi	10
2.6.1. Kalbin kasılma mekanizması.....	10
2.6.2. Kalbin uyarı ve iletim sistemi	11
2.7. Kalp Krizi	11
2.8. Kalp Kası Hasarlarında Önerilen Tedaviler	12
2.9. Kardiyak Yama.....	13
2.9.1. Nitelikli kardiyak yamalarda aranan polimerik iskele özellikleri	13
2.9.2. Kardiyak yama yapımında kullanılan polimerik malzemeler.....	14
2.10. Fiberler	16
2.10.1. Fiber üretim teknikleri.....	17
2.11. Elektro-Eğirme Tekniği	21
2.11.1. Tekniğin tarihçesi	21
2.11.2. Tekniğin uygulanması	21

2.11.3. Teknikte kullanılan düzenekler	23
2.11.4. Tekniğe etki eden parametreler.....	25
2.12. Kobalt ve Kobalt Bileşiklerinin Kullanım Alanları ve İnsan Vücuduna Etkileri	28
3. MATERYAL ve YÖNTEM	29
3.1. Materyal.....	29
3.2. Yöntem.....	30
3.2.1. PLA sentezi ve molekül ağırlığı tayini	30
3.2.2. PLA/PCL/CoO kardiyak yama üretimi.....	31
3.2.3. PLA/PCL/CoO kardiyak yamaların karakterizasyonu	32
4. BULGULAR ve TARTIŞMA	43
4.1. Kimyasal Yapı Analizi (FTIR).....	43
4.2. Yüzey Morfolojisi (SEM)	45
4.3. Yoğunluk ve Gözeneklilik	49
4.4. İslanabilirlik (% şişme oranları)	51
4.5. Zamana Bağlı Kütle Kaybı	52
4.6. Kontrollü Salım Çalışmaları.....	54
4.7. Sitotoksosite /MTT testi	57
4.8. Apoptotik ve Nekrotik Etkiler (İkili Boyama Testi).....	58
4.10. Kardiyak Yamaların İnsan Kardiyomiyosit (HCM) Hücreleri ile Etkileşimi	66
4.11. Elastikiyet/Çekme-Uzama Testleri.....	68
4.12. CoO/PLA/PCL Yamaların İletkenliği	70
5. SONUÇLAR	72
KAYNAKLAR	80
ÖZGEÇMİŞ	85

ŞEKİL LİSTESİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. Kalbin tabakaları	5
Şekil 2.2. Kalbin iç yapısı.....	6
Şekil 2.3. Kalbin dış görünümü ve damarları.....	7
Şekil 2.4. Kalp duvarını oluşturan katmanlar.....	8
Şekil 2.5. Kalp kası.....	10
Şekil 2.6. Eriyik şişirilmiş tekniği ile lif üretim sistemi.....	18
Şekil 2.7. Çekme tekniği ile fiber üretimi.....	19
Şekil 2.8. Elektro-eğirme düzeneği.....	22
Şekil 2.9. Whipping kararsızlığı.....	23
Şekil 2.10. Besleme ünitesi.....	24
Şekil 2.11. Güç kaynağı.....	24
Şekil 2.12. Çeşitli toplayıcı plakalar.....	25
Şekil 3.1. İkili elektro-eğirme düzeneği şematik gösterimi.....	31
Şekil 3.2. Üretilen PLA-PCL kardiyak yamalar.....	32
Şekil 3.3. Mekanik test için hazırlanan yama şeritleri. A: kesit boy, B: kesit en.	41
Şekil 3.4. Çekme test cihazı aşamaları.....	41
Şekil 4.1. PLA ve PCL polimerleri, farklı oranlarda (%0.00, %0.03, %0.06, %0.19 a/a) CoO içeren PLA/PCL kardiyak yamalar ve CoO nanopartikülüne ait FTIR spektrumları.....	43
Şekil 4.2. CoO içermeyen PLA/PCL kardiyak yamaların SEM görüntüleri (ölçek sırasıyla 100 µm, 20 µm, 10 µm, 5 µm).....	45
Şekil 4.3. % 0.03 (a/a) CoO nanopartikül içeren CoO/PLA/PCL kardiyak yamaların SEM görüntüleri (ölçek sırasıyla 100 µm, 20 µm, 10 µm, 5 µm).....	47
Şekil 4.4. % 0.06 (a/a) CoO nanopartikül içeren CoO/PLA/PCL kardiyak yamaların SEM görüntüleri (ölçek sırasıyla 100 µm, 20 µm, 10 µm, 5 µm).....	48
Şekil 4.5. % 0.19 (a/a) CoO nanopartikül içeren CoO/PLA/PCL kardiyak yamaların SEM görüntüleri (ölçek sırasıyla 100 µm, 20 µm, 10 µm, 5 µm).....	49
Şekil 4.6. Ağırlıkça (a/a) farklı oranlarda CoO nanopartikülü içeren kardiyak yamaların (%0.00, %0.03, %0.06, %0.19) zamana bağlı % şişme oranları.....	52

Şekil 4.7. Ağırlıkça (w/w) farklı oranlarda CoO nanopartikülü içeren kardiyak yamalardan (%0.00, %0.03, %0.06, %0.19) zamanla (%) kalan kütle miktarları verilmiştir.....	54
Şekil 4.8. Belirlenen CoO nanopartikülü konsantrasyonlarına (g/ml) karşı alınan absorbans değerleri yardımıyla oluşturulan doğrusal kalibrasyon grafiği.....	55
Şekil 4.9. Ağırlıkça farklı oranlarda (%0.03, %0.06, %0.19 w/w) CoO içeren kardiyak yamalardan zamana bağlı CoO nanopartikülü salım grafiği (3 hafta).....	55
Şekil 4.10. Ağırlıkça farklı oranlarda (%0.03, %0.06, %0.19 w/w) CoO içeren kardiyak yamalardan zamana bağlı CoO nanopartikülü salım grafiği (3 ay).....	56
Şekil 4.11. Pozitif (DMSO) ve negatif (sadece hücreler) kontrol grupları ile ağırlıkça farklı oranlarda %0.00, %0.03, %0.06, %0.19 CoO nanopartikül içeren PLA/PCL kardiyak yamaların sırasıyla kardiyak yama 0, 1, 2, 3 olarak % hücre canlılığı, % apoptoz ve % nekroz grafikleri.....	60
Şekil 4.12. Negatif ve pozitif kontrol gruplarını temsil eden HCM hücrelerinden ikili boyama sonrası alınan floresan mikroskop görüntüleri (ölçek 200 µm).	61
Şekil 4.13. CoO nanopartikülü içermeyen PLA/PCL kardiyak yamalar ile etkileştirilen HCM hücrelerinin ikili boyama sonrası floresan mikroskop görüntüleri (ölçek 200 µm).	62
Şekil 4.14. Ağırlıkça %0.03 oranında CoO içeren kardiyak yamalar ile etkileştirilen HCM hücrelerinin ikili boyama sonrası floresan mikroskop görüntüleri (ölçek 200 µm).	63
Şekil 4.15. Ağırlıkça %0.06 oranında CoO içeren kardiyak yamalar ile etkileştirilen HCM hücrelerinin ikili boyama sonrası floresan mikroskop görüntüleri (ölçek 200 µm).	64
Şekil 4.16. Ağırlıkça %0.19 oranında CoO içeren kardiyak yamalar ile etkileştirilen HCM hücrelerinin ikili boyama sonrası floresan mikroskop görüntüleri (ölçek 200 µm).	65
Şekil 4.17. CoO nanopartikülü içermeyen PLA/PCL kardiyak yamalardan (kardiyak yama 0) HCM hücreleri ile inkübasyonun ardından alınan farklı büyütme ölçeklerindeki (200X, 600X, 800X, 1000X) SEM görüntüleri.	66
Şekil 4.18. Ağırlıkça farklı oranlarda %0.03, %0.06, %0.19 CoO nanopartikülü içeren PLA/PCL kardiyak yamaların (sırasıyla kardiyak yama 1, 2, 3) HCM hücreleri ile inkübasyonun ardından alınan SEM görüntüleri.	67
Şekil 4.19. Esnek CoO/PLA/PCL kardiyak yama kesitleri.	68

ÇİZELGE LİSTESİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1. Doğal polimerlerden üretilmiş çapıtli kardiyak doku iskelesi çalışmaları..	15
Çizelge 2.2. Doğal ve sentetik yapıda polimerler veya bunların kombinasyonları kullanılarak üretilmiş doku iskeleleri ile ilgili bazı çalışmalar.....	16
Çizelge 2.3. Elektro-eğirme tekniğine etki eden parametreler .	26
Çizelge 2.4. Elektro-eğirme tekniğine etki eden parametrelerin lif morfolojisine etkisi .	27
Çizelge 3.1. Sentezlenen PLA polimerinin ortalama moleköl ağırlığı.	31
Çizelge 4.1. Ağırlıkça %0.00, %0.03, %0.06, %0.19 CoO nanopartiköl içeren PLA/PCL kardiyak yamaların sırasıyla yama 0, 1, 2, 3 olarak ağırlıkça bileşen yüzdeleri (% a/a), yoğunlukları (g/cm ³), spesifik hacimleri (cm ³ /g) ve gözeneklilik (%) değerleri.....	51
Çizelge 4.2. Pozitif (DMSO) ve negatif (sadece hücreler) kontrol grupları ile ağırlıkça farklı oranlarda %0.00, %0.03, %0.06, %0.19 CoO nanopartiköl içeren PLA/PCL kardiyak yamaların sırasıyla kardiyak yama 0, 1, 2, 3 olarak % hücre canlılığı, % apoptoz ve % nekroz değerleri.....	59
Çizelge 4.3. Ağırlıkça farklı oranlarda %0.00, %0.03, %0.06, %0.19 CoO nanopartiköl içeren PLA/PCL kardiyak yamaların sırasıyla kardiyak yama 0, 1, 2, 3 olarak mekanik test sonuçları.	70
Çizelge 4.4. Ağırlıkça farklı oranlarda %0.00, %0.03, %0.06, %0.19 CoO nanopartiköl içeren PLA/PCL kardiyak yamaların sırasıyla kardiyak yama 0, 1, 2, 3 olarak ölçülen iletkenlik değerleri (S/m).	71

SİMGELER ve KISALTMALAR

Kısaltma	Açıklama
CoO	Kobalt Oksit
DMEM	Dulbecco Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetil sülfoksit
ECM	Ekstraselüler matriks
FBS	Fetal Bovine Serum
FDA	Food and Drug Administration
FTIR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
HCM	İnsan Kardiyomiyosit Hücresi
LVAD	Sol Ventrikül Destek Cihazı
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid
MI	Miyokard İnfarktüsü
PBS	Phosphate Buffered Saine
PCL	Polikaprolakton
PLA	Polilaktik asit
PI	Propidyum iyodür
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu

1. GİRİŞ

Kalp, konumu itibari ile göğüs kafesi boşluğu içerisinde akciğerler arasında sola yakın bölgede bulunan, kardiyovasküler sistemi oluşturan venler ve arterler yardımı ile kanı vücuda pompalamak ile görevli musküler yapıdaki organımızdır. Kalp kası farklı kalınlıklara sahip üç katmandan meydana gelmektedir (Kaynak Bayrak, 2019). Zamanla kalp üzerinde çeşitli sebeplere bağlı olarak hasarlar oluşmaktadır. Her yıl orta yaşlı yetişkin ve yaşlı milyonlarca insanın aktivitesini sınırlandıran kardiyovasküler hastalıklar, insanın yaşam kalitesini düşürmektedir. 2010 yılında yapılan bir çalışmada Dünya genelinde ölümlerin %26,6'sının kardiyovasküler hastalıklarla ilişkili olduğu belirtilmiştir (Lozano ve ark., 2012). Kardiyovasküler hastalıkların yarısını akut miyokard enfarktüsü (kalp krizi) ve kronik kalp yetmezliğine yol açan iskemik kardiyomyopati oluşturmaktadır (Reed ve ark., 2016). Her iki durumunda görülme riski, sağlıksız beslenme, sigara kullanımı, yüksek kan basıncı, kolesterol, stres, obezite gibi etkenlere bağlı olarak her geçen gün ülkemizde ve dünyada artış göstermektedir. Kalp krizi vakalarının yarısından fazlası kalp hasarı ile yaşamlarına devam etmektedir (Bhaarathy ve ark., 2014).

Kalp krizi sonrası, kalp kaslarının hasar görmesine bağlı olarak hastalar hayati risk taşımaktadır. Kronik veya akut kalp hasarlarındaki en büyük problem, hasar gören bölgede yetişkin kardiyomyositlerin bölünme yeteneklerini kaybetmeleri ve onarım için yeterli sayıya ulaşamamalarıdır. Bundan dolayı hasar gören bölgede yara (skar) dokusu ya da ölü doku oluşmaktadır. Bu nedenle kalp görevi olan kasılma fonksiyonunu doğru şekilde gerçekleştirememektedir. Bu gibi durumlarda oluşan yara dokusunun ortadan kaldırılması veya dokunun fonksiyonel olarak başka sağlıklı dokular ile değiştirilmesi gerekmektedir (Curtis ve Russel, 2009; Kaynak Bayrak, 2019). Bu nedenle hasarlı kalp dokusunu iyileştirmeye yönelik tedaviler giderek önem kazanmaktadır. Hasara uğramış miyokardın işlevselliğini geri kazandırmak amacı ile çeşitli ameliyatlarda yapılmakta ve/veya ilaç tedavileri uygulanmaktadır (Arumugam ve ark., 2018). Hasarlı bölgeye sağlıklı hücrelerin enjeksiyonu şeklinde uygulanan klinik uygulamalar bulunmaktadır. Fakat bu uygulamalarda hücrelerin iyileştirilmeye çalışılan hasarlı bölgede stabil kalmaması ve/veya canlılığını yitirmesine bağlı olarak uygulanan tedavi başarısız olabilmektedir. Uygulanan başka bir tedavi ise hasarlı bölgenin onarılması veya yeni bir doku ile değiştirilmesidir (Kaynak Bayrak, 2019). Bu

çalışmaların yanı sıra kalp dokusunu fonksiyonel olarak desteklemek ve/veya tedavi etmek amacı ile sentetik ya da biyolojik polimerlerden üretilmiş, biyoyumlu kardiyak yamalar ile yapılan çalışmaların sayısı son yıllarda artmaya başlamıştır (Boffito ve ark., 2013; Kitsara ve ark., 2017).

Sunulan tez çalışmasında; kalp hastalıkları sonucu kalp üzerinde meydana gelen hasarı tedavi etmek, iyileşme sürecini desteklemek, oluşacak hücre iletim ağını sağlamak ve kalpte iletimi desteklemek amacı ile CoO nanopartikülleri içeren polimerik kardiyak yamalar üretilerek karakterize edilmiştir. Karakterizasyon çalışmaları sonucunda elde edilen veriler ışığında kardiyak yamaların *in-vitro* koşullar altında performansı değerlendirilmiştir. Üretilen polimerik kardiyak yamalar içiçe geçmiş örgüsüz polimerik fiberlerinden oluşan tek tabakalı tasarıma sahiptir. Yama üretiminde Polikaprolakton (PCL) ve Polilaktik asit (PLA) polimerleri kullanılmıştır. Her iki polimer FDA (Food and Drug Administration) onaylı, biyobozunur, biyoyumlu, kolay işlenebilen doku mühendisliği uygulamalarında yaygın olarak kullanılan polimerlerdir (Kim ve ark., 2009; Aghdam ve ark., 2014). PCL polimeri güçlü mekanik özellikleri, özellikle elastikiyeti sebebiyle kardiyak yamaların mekanik dayanımını sağlamaktadır. PLA polimerinin elastikiyeti PCL polimerine kıyasla daha zayıftır. Ancak PCL polimerinin hidrofobik karakteri sebebiyle yüzeyine hücre tutunması (afinite) zayıftır (Şimşek, 2014). PLA polimeri yapısı gereği taşıdığı hidroksil (-OH) ve karboksil (-COOH) grupları nedeniyle PCL polimerine kıyasla daha hidrofildir. PLA polimeri yamaların biyoyumluluğunu artırmak ve mekanik dayanımını desteklemek amacıyla kullanılmıştır. PLA ve PCL polimer çözeltileri içerisine yamaların iletkenliğini artırmak amacıyla CoO nanopartikülleri ilave edilerek CoO içeren polimerik fiberler üretilmiştir. Elektro-eğirme koşulları ayarlanarak fiberler mekanik dayanımı artırmak ve kas yapısını taklit etmek amacıyla yönlendirilmiştir. Elektro-eğirme yöntemi, sağladığı birçok avantaj bakımından yeni nesil polimerik membranların ya da yamaların üretiminde yaygın olarak kullanılan bir tekniktir (Bhushani ve Anandharamakrishnan, 2014). Bu teknik üretimi gerçekleştirilen yamalarda, yüksek gözenekliliğe, küçük gözenek boyutlarına, hafif membran üretimine ve yüksek yüzey/hacim oranına sahip yamaların üretilmesini sağlar (Zahedi ve ark., 2010). Bu özelliklerden dolayı ekstraselüler matriksin (ECM), ağsı nanofibröz yapısını taklit etmek mümkündür (Kim ve Yoon, 2008; Han ve Gouma, 2006). Kardiyak yamaların elektro-eğirme tekniği kullanılarak üretimi aşamasında PLA ve PCL polimerleri uygun çözücülerde çözülerek, iletken

çözeltileri hazırlanır. Hazırlanan polimer çözeltileri farklı şırıngalar içerisine konur. Polimer çözeltisi içeren şırıngalar mikropompa cihazına yerleştirilerek şırınga pistonunun belirlenen sabit akış hızı ile toplam akış süresi boyunca itilmesi, böylece polimer çözeltisinin şırınga iğnesi ucundan belirli bir debi ile akması sağlanır. Şırınga iğnesi ucundan akan iletken polimer çözeltisi oluşturulan elektrik alan yardımıyla toplayıcıya doğru eğilerek hareket eder. Bu esnada çözücünün büyük bir kısmı buharlaşır ve oluşan polimer fiberler dönen bir rulman toplayıcı üzerinde sarılarak birikir.

Sunulan tez çalışmasında nitelikli bir polimerik kardiyak yama materyalinden beklenen özelliklere sahip (biyouyumlu, elastik, biyobozunur, iletken, iyileşmeyi destekleyen) kardiyak yamalar üretilmesi hedeflenmiştir. Bu hedefler doğrultusunda üretilen kardiyak yamaların kimyasal yapısı (FTIR), yüzey morfolojisi (SEM), yoğunluğu /gözenekliliği, ıslanabilirliği, CoO salımı olup olmadığı, zamanla kütle kaybı, mekanik dayanımı, iletkenliği, biyouyumluğu, apoptotik/nekrotik etkileri ve HCM hücrelerinin kardiyak yamalar üzerine adhezyonu gerekli karakterizasyon çalışmaları yapılarak incelenmiş ve üretilen polimerik membranların kardiyak yama materyali olarak kullanım potansiyeli değerlendirilmiştir.

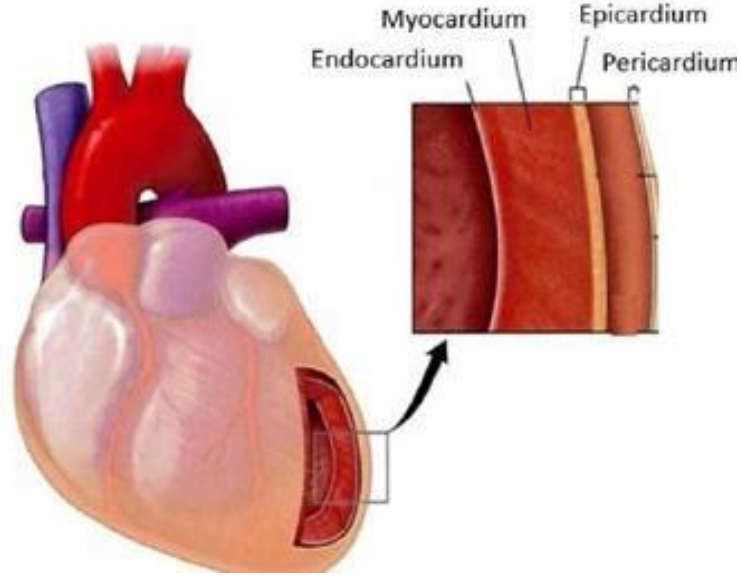
2. GENEL BİLGİ

2.1. Kalp

Dolaşım sisteminin merkezi olan kalp; vücutta pompa görevi gören, içi boşluklu, musküler yapıda, kanın vücutta taşınmasını sağlayan bir organdır (Ayyıldız, 2014). Kanın süreklilik halinde kesintiye uğramadan taşınmasını sağlayan kalp, canlılığın devamı için gerekli olan tüm maddesel yapıları vücudun tüm bölgelerine arterler ve venler aracılığı ile taşır (Kasap, 2013).

2.2. Kalbin Yapısı

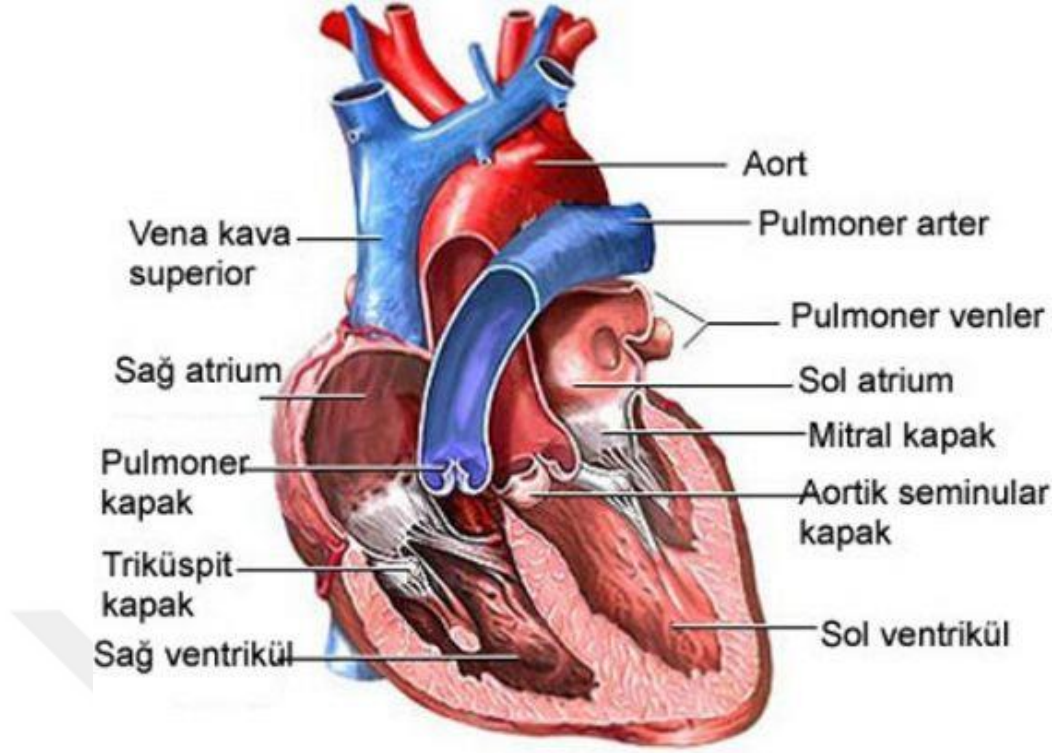
Kalp yapısı gereği üç tabakadan meydana gelmektedir (Şekil 2.1). Kalbi oluşturan bu sıralı tabakalar dıştan içe doğru epikardiyum, miyokardiyum ve endokardiyum tabakalarıdır (Ayyıldız, 2014). Kalbin en dış tabakası olan epikardiyum, kalp kas tabakasını, kalbe giren damarların ve kalpten çıkan damarların köklerini sıkıca saran tabakadır. Epikardiyumdan sonra gelen ikinci tabaka ise miyokardiyum tabakasıdır. Bu tabaka kalp duvarının kas tabakası olup, genel özelliği bakımından düz kaslara ve iskelet kaslarına benzemektedir. Bir diğer tabaka ise endokardiyum tabakasıdır. Endokardiyum, kalbin iç yüz boşluklarını, boşluklardaki anatomik oluşumları tamamen kaplayan düz ve parlak bir zardır. Kalınlığı tüm yüzeylerde aynı olmayan bu tabaka, kanın duvarlar üzerindeki sürtünmesinin fazla olduğu yerlerde kalın, sürtünmenin az olduğu yerlerde ise ince bir oluşum göstermektedir (Ayyıldız, 2014).



Şekil 2.1. Kalbin tabakaları (Anonim, 2019).

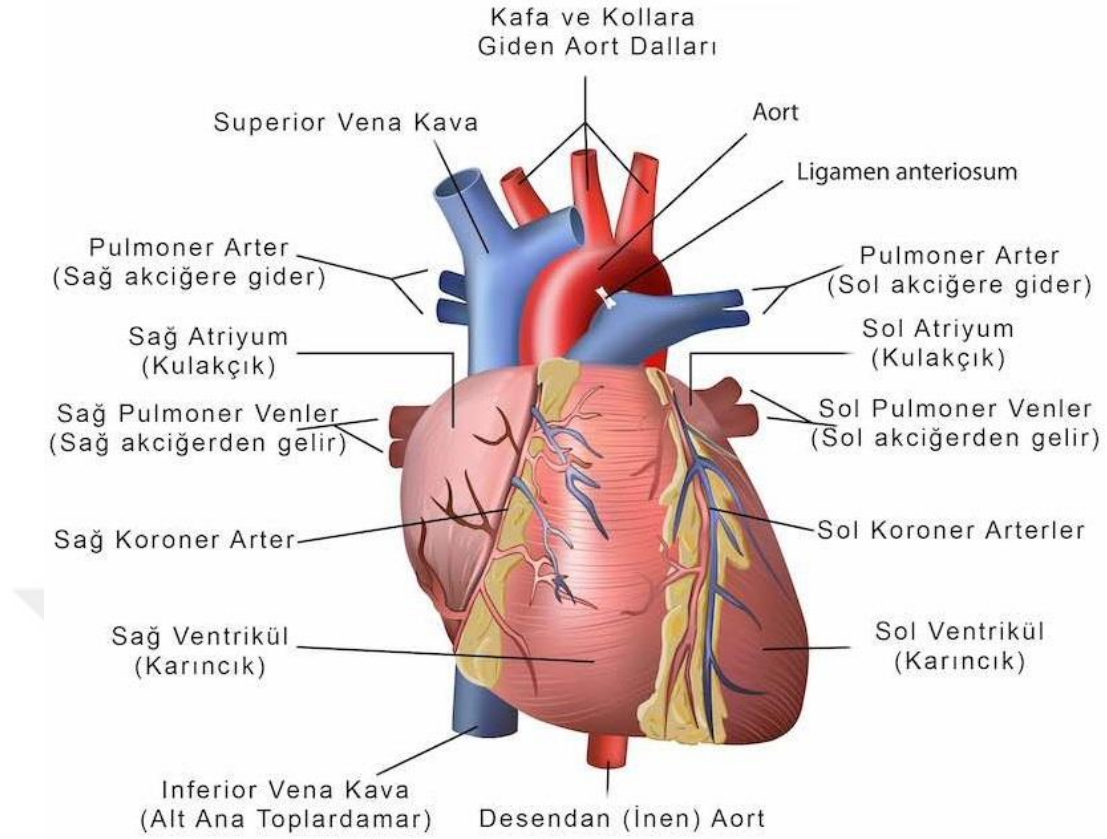
2.3. Kalbin Anatomisi

Kalp, dört bölmeye ayrılmış septum adı verilen endokardiyum ve miyokardiyum uzantılardan meydana gelmektedir. Alt kısımda sağ ve sol ventriküller, üst kısımda sağ ve sol atriyumlar bulunmaktadır (Hascek ve ark., 2010). Septumlar Bu kısımları birbirinden ayırmaktadır. Her iki ventrikülü birbirinden ayıran bölme interventriküler septum, her iki atriyumu birbirinden ayıran bölme interatriyal septumdur. Atriyum ve ventrikülleri birbirinden ayıran bölme ise atriyovenriküler septum olarak bilinir (Kaynak Bayrak, 2019). Kalpte dört kapakçık mevcuttur ve bu kapakçıklar kan akışının vücutta tek yönde ilerlemesi sağlar, kanın geriye doğru akışını engeller (Doğan, 2011). Şekil 2.2'de kalbin iç yapısı temsili olarak gösterilmektedir. Kalpte bulunan dört kapak kendi anülüslerine veya kapak ringlerine yapışık bulunmaktadır. Fibröz yapıda bulunan bu ringler (halkalar) kalbin tabanında bileşerek kalbin fibröz yapısını oluşturmaktadır. Kalpte bulunan fibröz kardiyak iskelet, her iki ventrikülü her iki atriyumdan hem fonksiyonel olarak ayırmakta hem de elektriksel olarak izole etmektedir (Doğan, 2011).



Şekil 2.2. Kalbin iç yapısı.

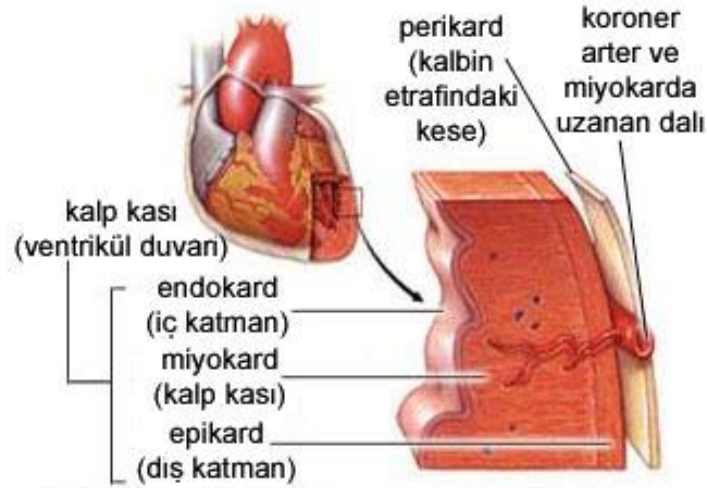
Yaşam boyu aktivite gösteren kalbi oluşturan hücreler (kardiyomiyositler) vücutta bulunan diğer hücrelere göre daha fazla enerjiye ihtiyaç duymaktadır. Bu enerji ihtiyacından dolayı vücutta kan dolaşımına en fazla ihtiyaç duyan organımız kalptir. Kalpte gerçekleşen kan dolaşımına koroner sirkülasyonu da denir. Bu sirkülasyon koroner venler ve koroner arterler yardımı ile gerçekleşmektedir. Kalbin yapısında bulunan damarlar Şekil 2.3'te temsili olarak gösterilmektedir. Sol ventrikülün kasılması ile pompalanan kan aort damarından geçerek dokularımızı besleyen arteriyollere kadar iletilir. Arteriyoller, arterlerden yani atar damarlardan gelen temiz kanı dokulara ileten kılcal damarlardır. Böylece kılcal damarlar ve dokular arasında besin ve gaz alışverişi gerçekleşir. Karbondioksit bakımından zengin kan, tekrar venoller aracılığıyla dokulardan toplanır. Venoller, venlere yani toplardamarlara kirli kanı toplayarak ileten kılcal damarlardır. Venlerde toplanan kan akciğerlere gönderilir. Akciğerlerde oksijen bakımından zenginleştirilen kan tekrar kalbe ve oradan tüm vücudumuza taşınır.



Şekil 2.3. Kalbin dış görünümü ve damarları.

2.4. Kalbin Histolojisi

Kalp perikardiyum kesesi içine yerleşik bir şekilde, kendisine ait büyük damar duvarlarına ve diyaframa yapışık olarak bulunmaktadır. Perikardiyum tabakası elastik fiberlerden meydana gelmektedir. Ayrıca bu tabaka iki katmandan oluşmaktadır. Bu katmanlar içte bulunan seröz perikardiyum tabaka ile dışta bulunan fibröz perikardiyum tabakadır. Bu tabakalardan olan fibröz perikardiyum tabakası, kalbi dış etmenlere karşı koruyan sert, yoğun bağ dokusuna sahip, elastik, kollajen fiberler içeren ve kalbin göğüs kafesi içerisindeki pozisyonunu sağlayan tabakadır. Bir diğer tabaka olan seröz tabakası ise daha hassas bir tabakadır. Kendi içinde iki tabakadan oluşur ve bu tabakalar arasında bir sıvı mevcuttur (Hoit, 2017).



Şekil 2.4. Kalp duvarını oluşturan katmanlar.

Kalp duvarının enine kesiti göz önüne alındığında, kalbin farklı kalınlıklarda üç katmandan oluştuğu görülür. Şekil 2.4'te görüldüğü gibi katmanlar içten dışa doğru endokardiyum, miyokardiyum ve epikardiyum olarak sıralanır. Kardiyomiyositlerin çoğunlukla bulunduğu tabaka orta tabaka olan miyokardiyum tabakasıdır. Bu katman içerisinde kalbi besleyen kan damarları, kalbi düzenleyen sinir fiberleri ve kollajen fiberler mevcuttur (Van Vleet ve ark., 2002; Anatomy and Physiology, 2013; Kaynak Bayrak, 2019). Kalp temel yapısı gereği fibroblastları, endotel hücreleri, kardiyomiyositleri, perisitleri, düz kas hücrelerini bünyesinde barındıran hücresel bileşenlerden ve hücre dışı matrinden (ECM) meydana gelmektedir. Kalbin fonksiyonel olarak kasılabilen temel hücreleri kardiyomiyosit hücreleridir. Fibroblast hücreleri ise hücreler arası matriks (ECM) bileşenlerinin üretilmesini sağlamaktadır (Kaynak Bayrak, 2019).

2.5. Kas Sistemi ve Tipleri

Vücut hareketlerini gerçekleştirebilmek için eklemlerin, iskelet sistemi ve kas sistemi ile bir bütün halinde hareket etmesi gerekir. Vücutta musküler hareketliliği sinir sistemi sağlamaktadır. Beyin ve omurilikteki sinir hücreleri kaslara uyarı verir ve hareketi başlatılır, devam ettirir. Vücutta bulunan 600'den fazla kas; fiziksel olarak uyarılabilme, esneyebilme, kasılabilme ve uyarıları iletebilme özelliklerine sahiptir. İnsan vücudu içerisinde üç tip kas bulunmaktadır. İskelet kasları veya diğer adı ile çizgili kaslar, bilinçli olarak (istemli) kontrol edilebilen kaslardır. Düz kaslar veya çizgisiz kaslar

kontrolleri bilinçli olarak yapılamayan (istemsiz) kaslardır. Diğer kas grubu ise kalbin özelleşmiş kas dokusudur (Anonim, 2007).

2.5.1. Düz kaslar

Damarların ve iç organların duvarlarında bulunan kas sistemidir. Diğer kas sistemlerine benzer şekilde aktin ve miyozin filamentler bulunmaktadır. Miyoflamentler diğer kas sistemlerine göre burada daha düzenli bir yerleşim göstermektedir. Kasılma fonksiyonu sürekli ve ritmiktir (Aras, 2015).

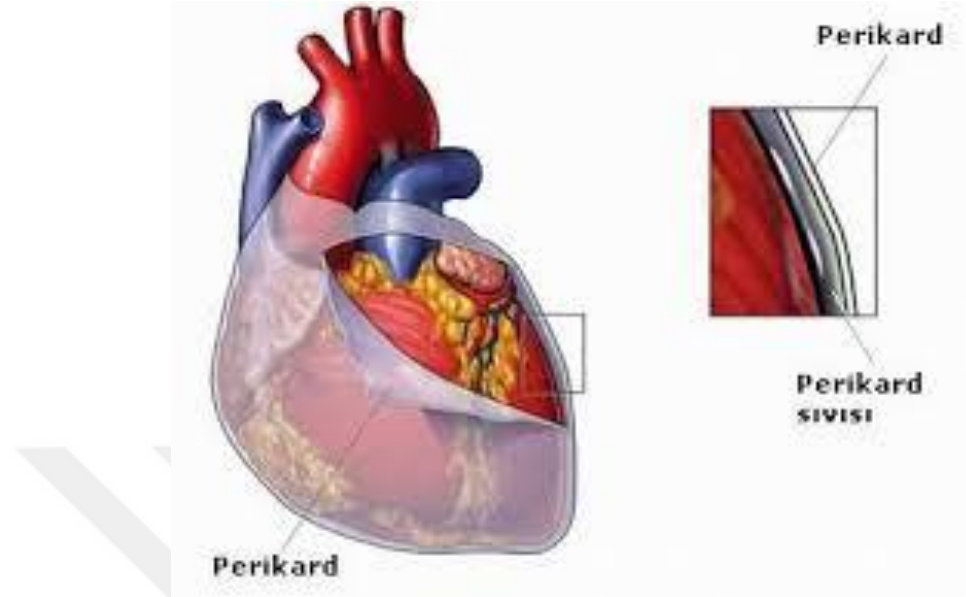
2.5.2. İskelet kası

İstemli olarak çalışan bu kas grubu iskelet sistemine yapışıktır. İskelet yapılı kaslar, enine çizgi oluşumunu sağlayan kas hücreleri ve hücreler arasındaki bağ dokusundan meydana gelmektedir. Vücudumuzda istenilen hareketin yapılmasını sağlayan kas grubudur. Vücutta göz, dudak, kol, bacak, dışkılama ve solunum gibi hareketler bu kas grubu sayesinde gerçekleşmektedir (Anonim, 2007).

2.5.3. Kalp kası

Kardiyovasküler sistemi oluşturan temelde üç fonksiyon bulunmaktadır. Bu fonksiyonlar; oksijenin ve diğer elementer yapıların hücrelere taşınması, hormon ve benzeri maddesel yapıların taşınması, metabolik atıkların hücrelerden uzaklaştırılmasıdır. Bu fonksiyonların gerçekleştirilmesinde kalp kasının kendine özgü yapısı önemli rol oynamaktadır. Kalp kası, atriyum kası, ventrikül kası ve özelleşmiş uyarıcı ve iletici kas liflerini oluşturan kas gruplarını bünyesinde barındırmaktadır. Kalp kası yapısal olarak bölünebilen, bir araya gelip oluşum sağlayan veya tekrar ayrılabilen kalp kası liflerinden meydana gelir. Kalp kası, iskelet kası gibi çizgili kas özelliğine sahip olup, miyofibrilleri iskelet kasındakilerle neredeyse aynı olan miyozin ve aktin filamentleri içerir. İç içe geçmiş yapıdaki bu filamentler, kasılma esnasında birbirleri üzerine kaymaktadır. Kalp kası her ne kadar genel olarak iskelet kasına benzer olsa da iskelet kaslarından bir takım farklılıklar göstermektedir. Bunlar; tek tip lif içermesi, kalpte fonksiyonel bir bütünlük oluşturmak amacıyla kalp kası hücrelerinin interkale diskler ile birbirine bağlı olması, yapısı gereği sinirsel bir bağlantısı olmaksızın uyarı

oluşturabilmesi ve bu uyarıyı bütün kalp hücrelerine iletebilen özel bir ileti sistemine sahip olmasıdır (Aksun, 2019).



Şekil 2.5. Kalp kası.

Kalbin üzerinde kasılmayı ve iletkenliği sağlayan iki farklı miyosit hücresi bulunur. İletken hücreler kalbin aksiyon potansiyelinin iletiminden sorumlu olan yapılardır. Kasılmadan sorumlu olan hücreler ise atriyum ve ventriküllerin yaklaşık %99'unu oluşturmaktadır. Kalp kası hücrelerinin en önemli özellikleri birbirlerine yan kollar ile bağlı olmalarıdır. Kalp bu kollar sayesinde senkronize bir şekilde kasılma olayını gerçekleştirebilmektedir. Bu bağlantı bölgeleri 'interkalar diskler' olarak adlandırılır. Ayrıca bu interkalar disklerin yapısında hücreler arasında iyon geçişini sağlayarak uyarının iletilmesini gerçekleştiren aralık bağlantı bölgeleri, kasılma sırasında kalp hücrelerinin ayrılmasını engelleyen desmozomlar ve hücreleri hücreler arası matris ile birbirine sıkı bağlayan bağlantılar mevcuttur (Ackermann ve ark., 2012; Kaynak Bayrak, 2019).

2.6. Kalbin Fizyolojisi

2.6.1. Kalbin kasılma mekanizması

Kalp temel fonksiyonu gereği kasılma hareketi ile kanın pompalanmasını sağlayan organımızdır. Kalpte gerçekleşen kasılma mekanizması temel yapısı gereği kasta

bulunan ince filamentlerin kalın filamentler üzerine kayması ile birlikte sarkomer boyunda meydana gelen kısalma ile gerçekleşir (Kaynak Bayrak, 2019).

2.6.2. Kalbin uyarı ve iletim sistemi

Otonom sinir sistemi sayesinde kalp boşlukları belirli bir düzen içerisinde, ritmik olarak daralıp gevşeyebilmektedir. Fakat bu sistemin etkisi azalsa bile kalbin kendi kendini bir süre daha çalıştırdığı bilinmektedir. Kalbin kendisine özgü bazı uyarı sistemleri ile oluşturduğu bu uyarılar kalp kasına yani miyokardiyuma iletilir (Ayyıldız, 2014). Kalbin ileti sistemi sinoatriyal düğüm, his demetleri, atriyoventriküler düğüm ve purkinje hücrelerinden meydana gelmektedir. Kalpte oluşan kardiyak ritim, sağ atriyum duvarı üzerindeki sinoatriyal düğümde bulunan iletken miyokardiyal hücreleri ile oluşturulur. Bu olayın gerçekleştiği bölge kalp pili olarak isimlendirilir. Oluşumu sağlanan uyarı atriyoventriküler düğümüne ön, orta, arka yolaklar üzerinde kasılan hücreler ile iletilir. Gerçekleşen depolarizasyon ile uyarılmış olan hücreler, iletim yolu boyunca yukarıdan aşağıya doğru kasılma işlemini gerçekleştirir. Bu şekilde kanın atriyumdan ventriküllere pompalanması sağlanır. Sağ atriyumdan sol atriyuma uyarının iletilmesi ise özel bir yolak olan Bachmann demeti ile gerçekleşir. Bir dizi yolak ile uyarılar kardiyomiyosit hücrelerine iletilir ve depolarizasyon ile kasılma sağlanır. Böylece kan ventriküllerden akciğerlere veya aort ile vücuda pompalanır (Anatomy and Physiology, 2013; Kaynak Bayrak, 2019).

2.7. Kalp Krizi

Günümüzde sağlıksız beslenme, sigara kullanımı, yüksek kan basıncı, kolesterol, stres, obezite, diyabet vb. nedenlere bağlı olarak kalp krizi görülme sıklığı ülkemizde ve dünyada her geçen gün artmaktadır. Ülkemizde yılda ortalama 300 bin kalp krizi vakası meydana gelmekte ve vakaların yarısından fazlası kalp hasarı ile yaşamlarına devam etmektedir (Boffito ve ark., 2013). Miyokard infarktüsü (kalp krizi), kalbi besleyen koroner arterlerin, belli başlı sebeplere bağlı olarak tıkanması sonucu kalp kasının yeterince kanlanamamasıdır. Buradaki koroner arterlerin tıkanması ya da daralması sonucu kalp kası, oksijen ve kan yönünden beslenemez ve hasar görür. Bunun sonucu olarak kalp dokusunda nekroz meydana gelir. Hasar gören bölge kasılma yetisini kaybeder ve kalp krizine neden olur (Bulduk ve ark., 2017). Kalp krizi sonucu hasar

görmüş olan kalp kasında skar doku oluşur ve kalbin kasılma gücünü etkileyerek, bozulmasına sebebiyet verir. Kalbin hatalı çalışması kalp yetmezliği ve ölümleri meydana getirir. Kalp kası üzerinde oluşan skar doku, sağlıklı olan kalp kasının tersine, kalbin pompalama esnasındaki elektrik sinyal iletimini gerçekleştirmez. Bunun sonucunda kardiyomiyositlerin proliferasyonu (çoğalması) gerçekleşmez ya da dış uyaranlara tepki verilemediğinden dolayı başka çözüm yolları aranır (Senyo ve ark., 2014).

2.8. Kalp Kası Hasarlarında Önerilen Tedaviler

Çeşitli sebeplere bağlı olarak meydana gelen akut miyokard infarktüsü (MI) hasarlarında, hasar şiddetine göre farklı çözüm yolları mevcuttur. Hasar oluşumu görülen bölgede immünolojik aktivite pasifleşmektedir. İmmünolojik aktiviteyi geri kazandırmak için bazı inhibitör ajanların çeşitli farmakolojik formlarda hasarlı bölgeye verilmesi söz konusudur. Fakat yalnızca ilaç tedavisi uygulamak hasarlı bölgenin iyileşmesi konusunda etkin bir tedavi sağlayamayabilir. Bundan dolayı hastaların durumlarına göre kalp nakli ve/veya kalpte sol ventrikülü destekler nitelikte cihazların (Left Ventricular Assist Device, LVAD) kullanımı bulunmaktadır (Bhaarathy ve ark., 2014). Sol ventrikül destek cihazları (LVAD), hastaya aktif bir yaşam imkanı sunmak ve yatağa bağımlı olarak yaşamasını önlemek amacı ile kalbin işlevsel yükünü azaltmak için üretilmiş cihazlardır. Ayrıca bu cihazlar, hastalar için gerekli olan transplantasyon imkanı sağlanıncaya kadar kalp yetmezliği sonucu hastanın organları ve sistemleri üzerindeki olumsuz etkileri düzenler ve yaşamını sürdürmesinin sağlar (Vural ve Öz, 1997). Bu gibi uygulamalar hastalara destek olur ancak maliyet ve hasarlı dokunun tedavisi bakımından sınırlıdır. Bu nedenle ilgili literatürde farklı yöntemler geliştirilmek üzerine yapılan araştırma ve geliştirme çalışmaları her geçen gün artmaktadır. Hasar gören kalp dokusunu fonksiyonel olarak desteklemek ve/veya tedavi etmek amacı ile sentetik veya biyolojik polimerlerden üretilmiş kardiyak yamalar giderek önem kazanan araştırma konularından biridir (Boffito ve ark., 2013). Bununla birlikte hasarlı bölgeye biyomateryal enjeksiyonu, farklı hücre tipleri kullanarak hücre tedavisi, 3D yapı implantasyonu ve biyoreaktörlerde büyütülen implantlar da çalışma konuları arasındadır (Bhaarathy ve ark., 2014).

2.9. Kardiyak Yama

Kardiyak yama, farklı sebeplerden dolayı hasar görmüş olan kalp kasının kaybedilen fonksiyonunu geri kazandırmak ve hasarlı bölgede yeni kardiyomiyositlerin oluşumuna yardımcı olmak için üretilen bir doku iskelesi türüdür. Bu yamalar biyoyumlu polimerlerden ve/veya kompozit yapılardan üretilmektedir. Kardiyak yamalar, kalpte bulunan kas yapısına uygun olarak, belirli bir mekanik özelliğe, gözenekliliğe, konakçı hücre ve implante edilecek kök hücrelerin yapışmasına, çoğalmasına ve ayrılmasına elverişli bir yapıda olmalı ve hücrel oluşum gösteren bu ortamda elektrik sinyallerini iletmek üzere tasarlanmalıdır (Arumugan ve ark., 2019).

2.9.1. Nitelikli kardiyak yamalarda aranan polimerik iskele özellikleri

Kardiyak yama iskelesi yapımı için malzemeyi oluşturacak bileşenler, biyoyumluluk, yüzey karakteristiği, mekanik özellikler, hücre adhezyonu ve proliferasyonunu destekleyici unsurlar, iletkenlik, biyobozunurluk, üretim koşulları, maliyet vb. belirli kriterlerin önceden hedeflenmesi yama tasarımı için oldukça önemlidir (Kitsara ve ark., 2017). Kalpte bulunan miyokardiyal doku, hem hücreler arası matriksin farklı proteinleri hem de kollajen lifleri varlığında hizalanmış fibröz hücrelerden oluşmaktadır (Macchiarelli ve ark., 2002; Engelmayer ve ark., 2008). Bundan dolayı oluşturulacak lifli yapıdaki iskele modeli, hücrelerin organizasyonu, hayatta kalmaları ve ekilen kalp hücrelerinin fonksiyonelliği açısından önem taşımaktadır. Literatürde hizalanmış yüzey varlığının kardiyomiyosit hücrelerinin düzenlenmesini ve yönlenmesini desteklediğini gösterir çalışmalar mevcuttur (Kim ve ark., 2013; Li ve ark., 2014). Hücre göçünün sağlanması ve vaskülerizasyonun gerçekleşmesi için kardiyak iskelelerde yüzey hacim oranı ve gözeneklilik önemlidir. Kardiyak hücrelerin kalp kası boyunca iletilen elektrik sinyallerini kullanarak bir atım gerçekleştirdiği göz önüne alındığında, oluşturulacak iskelenin iletken olması da istenir. Yapılan bazı çalışmalarda, elektriksel uyarıların yüzey yüklerini kontrol etmesi ile yüzey özelliklerini, hücrelerin bağlanmasını, çoğalmasını ve farklılaşmasını kontrol ettiği bilinmektedir. (Pedrotty, 2004; Nelson ve Kim, 2012). Kardiyak yama tasarımında seçilen malzemelerin ortamda uygun hücrel aktivitenin sağlanması ve yeni dokuların oluşmasını desteklemesi amacı ile biyolojik olarak biyoyumlu ve biyobozunur olmaları beklenir. Kalp dokusunun yenilenmesi için iskele yapımında kullanılacak olan biyomateryallerin, kalbin doğal dokusuna uygun

olması ve implantasyon sonrası inflamatuvar yanıt oluşturmayacak şekilde hücreler ile teması önemlidir. Doğal polimerlerin (kollajen, polisakkaritler, fibrin) biyouyumluluk potansiyelleri yüksektir. Fakat doğal polimerlerin çoğu zayıf mekanik özellik göstermesi bakımından dezavantajlıdır. Bundan dolayı sentetik yapıları polimerler de dezavantajları ortadan kaldırmak için kullanılmaktadır. Bunlarla birlikte kardiyak yamalarda, hücre ekiminin verimi ve uzun süreli olarak greft yapının fonksiyonelliğini iyileştirmek için çeşitli hücre ekim teknikleri de geliştirilmiştir. Her teknik kendine göre farklı avantajlar sunmaktadır. Uygun olan yöntemin belirlenmesi kullanılan polimer ve yamanın üretim tekniği ile uyumlu olmalıdır (Kitsara ve ark., 2017).

2.9.2. Kardiyak yama yapımında kullanılan polimerik malzemeler

Hücre dışı matriks; hücre çoğalma döngüsü, farklılaşması ve hücrelerin göçünde önemli bir role sahiptir. Bu yapılar göz önüne alındığında yapılması planlanan iskelelerin hücre çoğalması ve farklılaşmasını desteklemesi, kalbin doğal fiziksel ve mekanik özelliklerine benzer özellikler sergilemesi oldukça önemlidir. Bunların yanı sıra içsel hücre göçünü sağlaması, damarlaşmayı desteklemesi, ventriküler doku ile elektro mekanik bir entegrasyon sağlaması da beklenir. İskelelerde mekanik özellikler, kullanılan materyal ve üretim tekniğine bağlı olarak farklılık gösterebilmektedir. İskelelerde fibrin, kollajen, aljinat, ipek gibi doğal polimerler ve poligliserol sebakat (PGS), polilaktik asit (PLA), poligliserol sebakat (PGS), polikaprolakton (PCL), poliüretan gibi sentetik polimerlerin iskele materyali olarak kullanımı yaygındır (Kaynak Bayrak, 2019). İlgili literatür, kardiyak doku iskelelerinin pek çok özelliğe sahip olması ve beklentilerin birçoğunu bir arada sunabilmesi gerekliliği farklı üretim yöntemleri ve farklı malzemelerin kullanımı açısından oldukça çeşitlidir. Kullanılan üretim yöntemleri arasında öne çıkan elektro-eğirme tekniği nanofiber yapıları iskelelerin üretilmesinde hücreler arası matriksin fibröz yapısını taklit eden fibröz iskeleler üretilmesine imkan vermesi bakımından avantajlıdır (Huang ve ark., 2003; Xie ve ark., 2008). Bu teknik ile oluşturulan nanolifler farklı mekanik ve biyokimyasal özelliklere sahip çeşitli doğal ve sentetik polimerlerden düşük maliyette üretilmektedir. Doğal polimerler, hücrelerin çoğalması için gerekli biyokimyasal ortamı sağlamaktadır. Ayrıca bozdukları zaman ürünleri toksik değildir ve doku ile temaslarında düşük inflamatuvar yanıtı sebep olurlar. Sentetik polimerler ise kontrolü kolay ve standart ürünler elde edilebilen üretim süreçlerine sahip olmaları nedeniyle doğal polimerlere göre daha düşük

maliyetlidirler ve mekanik özellikleri daha iyidir. Ancak biyokimyasal açıdan in-vivo koşullar ile uyum sağlaması doğal polimerlere göre zayıftır. Kardiyak doku mühendisliğinde doğal polimerler kullanılarak yapılmış çeşitli çalışmalarda yaygın olarak fibrinojenler, kollajenler, kitosan, jelatin, ipek ve elastin kullanılmıştır. Çizelge 2.1'de çeşitli çalışmalar mevcuttur (Kitsara ve ark., 2017).

Çizelge 2.1. Doğal polimerlerden üretilmiş çeşitli kardiyak doku iskelesi çalışmaları.

Malzeme	Lif morfolojisi	Ekilen hücreler	Yıl	Referans No
Fibrinojen	Rasgele	Sıçan neonatal kardiyak fibroblastlar	2007	66
İpek fibroin/ PEO	Rasgele	İnsan aortik endotel hücreleri (hAEC) ve insan koroner arter düz kas hücreleri (hCASMC)	2008	71
Kitosan	Rasgele	Yenidoğan sıçanlarından izole edilmiş ventriküler kardiyomiyositler ve fibroblast hücreleri ile kokültür	2013	68
Fibrinojen/ jelatin	Rasgele	Kardiyomiyositler	2013	72
Albümin	Rasgele ve hizalanmış	Yenidoğan sıçanlarından izole edilmiş kardiyomiyositler	2014	73
Kollajen	Rasgele	H9c2	2015	63

Kardiyak doku mühendisliğinde elektro-eğrilmiş iskeleleri imal ederken sentetik polimerler, sadece bir polimer ile değil aynı zamanda doğal ve sentetik polimerlerin kombinasyonu şeklinde de üretilebilmektedir. Polimer kombinasyonlarının kullanılması sadece doğal polimerlerin kullanıldığı duruma göre maliyet açısından daha avantajlıdır. Ancak biyoyumluluklarının artırılması için yüzey modifikasyonları gerekebilmektedir.

Literatürde birçok farklı polimerden oluşturulmuş iskele mevcuttur. Poli (ϵ -kaprolakton) tabanlı iskeleler, PLLA, PLGA ve bunların kopolimerlerinden üretilmiş iskeleler, Poliüretan tabanlı iskeleler bunlardan bazılarıdır. Literatürde doğal ve sentetik yapıda polimerler veya bunların kombinasyonları kullanılarak üretilmiş doku iskeleleri ile ilgili bazı çalışmalar Çizelge 2.2'de verilmiştir.

Çizelge 2.2. Doğal ve sentetik yapıda polimerler veya bunların kombinasyonları kullanılarak üretilmiş doku iskeleleri ile ilgili bazı çalışmalar.

Malzeme	Lif Morfolojisi	Ekilen Hücreler	Yayın Yılı	Referans No
PGS/ jelatin	Hızalı	Yenidoğan sıçan kardiyak fibroblast hücreleri ve Kardiyomiyositler	2013	110
PGS-PLLA	Rastgele	Kardiyomiyositlere Farklılaştırılmış Pluripotent Embriyonik Kök Hücreler	2013	112
PLGA-Kolajen	Rastgele	Kardiyomiyositlere Farklılaştırılmış Pluripotent Embriyonik Kök Hücreler	2014	93
PCL-PGA	Rastgele	Kardiyak Progenitör Hücreler	2014	95
Jelatin ile kaplanmış PCL	Rastgele	Fare iPSC	2015	83
PLGA	Hızalı	hipscs	2015	92
POCS/Fibrinojen	Rastgele	İnsan Kardiyomiyositleri	2015	118

2.10. Fiberler

Fiberler ipliksi bir görünüme sahip olan yapılardır. Lif olarak da adlandırılırlar. Oluşturulan herhangi bir lif, lif çapı göz önüne alınarak mikro ya da nano ön eki ile adlandırılır (Celep, 2007). İnce liflerden oluşan yapılara ise fibröz yapılar denir. Çapı

bir mikron altındaki fiberler mikrofiber, çapı 100 nm'nin altında olan fiberler ise nanofiber olarak adlandırılır. Nanofiber olarak adlandırılan bu yapılar, gelişmiş elektron mikroskopları ile görülebilirler. Birim kütlede daha fazla yüzey ve hacim oluşturulabilmesi, daha az malzeme ve enerji kullanımına imkan vermesi, daha hafif ve dayanıklı yapılar üretilebilmesi, farklı çaplarda fiberlerden oluşan çok katmanlı kararlı yapıların tasarlanabilmesi, tekstil gibi alanlarda malzemelerin su geçirmezlik, kırılmazlık, yanmazlık, leke tutmazlık vb. performanslarının iyileştirilebilmesi gibi farklı uygulamalarda farklı katkılar sağlama fibröz malzemelerin çok çeşitli alanlarda uygulama sahası bulmasını sağlamıştır (cilt bakım ürünleri, yara örtüleri, ultrafiltrasyon vb.). Nanofiberlerin geniş yüzey alanına sahip olmaları, iyonların, fonksiyonel grupların, nano seviyedeki partikülleri tutma ya da yayma özelliklerinin yüksek olmasını sağlar (Celep 2007). Fibröz malzemelerde gözeneklilik, yüzey morfolojisi vb. değiştiği için optik (ışığı yansıtma açısı, optik geçirgenlik vb.) ve elektronik (iletkenlik vb.) özellikler de değişmektedir. Üretim tekniklerinden kaynaklı olarak moleküler oryantasyonlarının daha düzenli olması, moleküler dizilimlerden kaynaklı yapısal kusurlarının daha az olmasını sağlar. Böylece herhangi bir malzemenin lifli yapıda üretilebilmesi mekanik özelliklerini iyileştirir.

2.10.1. Fiber üretim teknikleri

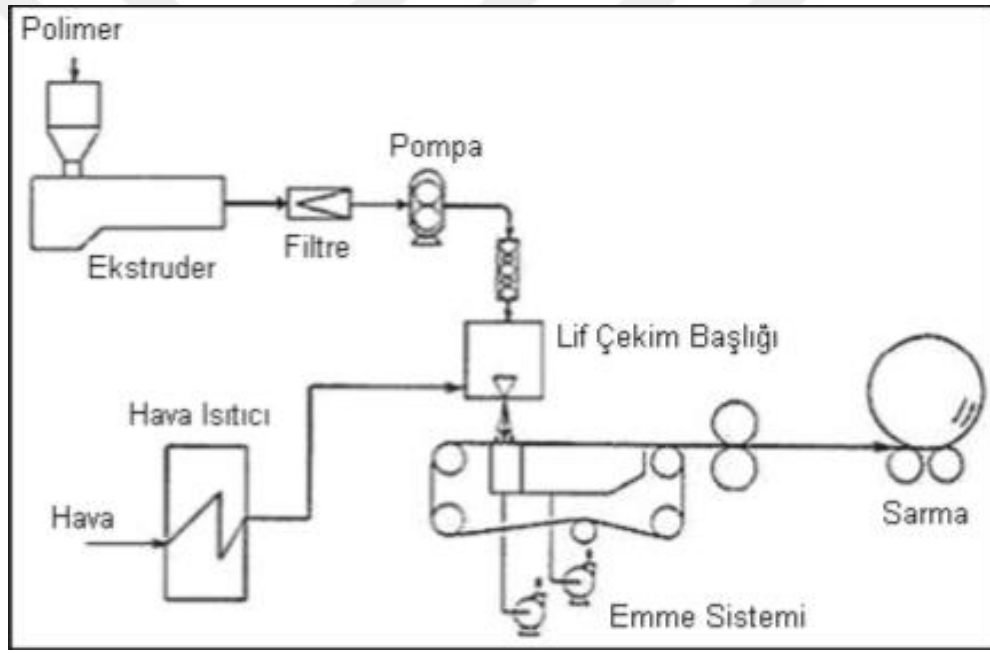
Malzemenin ısıtılarak eriyik hale getirilmesi ya da uygun çözücülerde çözünerek belirli düzeneklerden geçirildikten sonra soğutulularak ya da çözücüsü buharlaştırılarak son şeklinin verilmesi yaygın olarak kullanılan ekonomik lif üretim tekniklerindedir. Ancak konvansiyonel tekniklerle kullanılan düze çaplarının çok fazla küçültülememesinde dolayı nanofiber üretmek pek mümkün değildir (Seventekin ve ark, 2006). Günümüzde mikro ya da nanofiber üretimi için geliştirilmiş çeşitli teknikler kullanılmaktadır. Bikomponent, meltblown, fibrilasyon, çekme, kalıp, kendi kendine toplama ve elektro-eğirme yaygın olarak kullanılan lif üretim teknikleridir.

Bikomponent Tekniği ile Fiber Üretimi

Bu teknikte, farklı iki polimerin aynı besleme ünitesinden çekilmesiyle bikomponent (iki bileşenli) lifler üretilebilmektedir. Polimerlerin yan yana, iç içe, pasta dilimi ya da adacıklar şeklinde hizalandığı farklı fiber kesitlerine sahip bikomponent fiberler

üretilebilmektedir. Uzun yıllardır, Dünya genelinde en yaygın olarak kullanılan deniz adacık modeli ile bikomponent lif üretim tekniğidir (Altaş, 2009). Bu teknik ile elde edilen filament iplikler 20 yılı aşkın süredir, özellikle Asya'da üretilmektedir (Celep, 2007). Deniz adacık modeli ile lif üretimi; iki farklı polimerin özel yapılmış olan besleme ünitesi içerisinde geçirilerek, iç yapıdaki polimerin fibrilli bir şekilde dış katmandaki polimerin içerisine yerleştirilmesidir. Ancak üretilen bikomponent lifler uniform olmamakta ve kesitleri homojen dağılım göstermemektedir (Celep, 2007). Bu modelle üretilen fiberler filtrasyon malzemelerinde, sentetik damarlarda ve daha farklı birçok uygulama alanında kullanılmaktadır (Altaş, 2009).

2.10.1.2. Eriyik Şişirilmiş Tekniği ile Fiber Üretimi



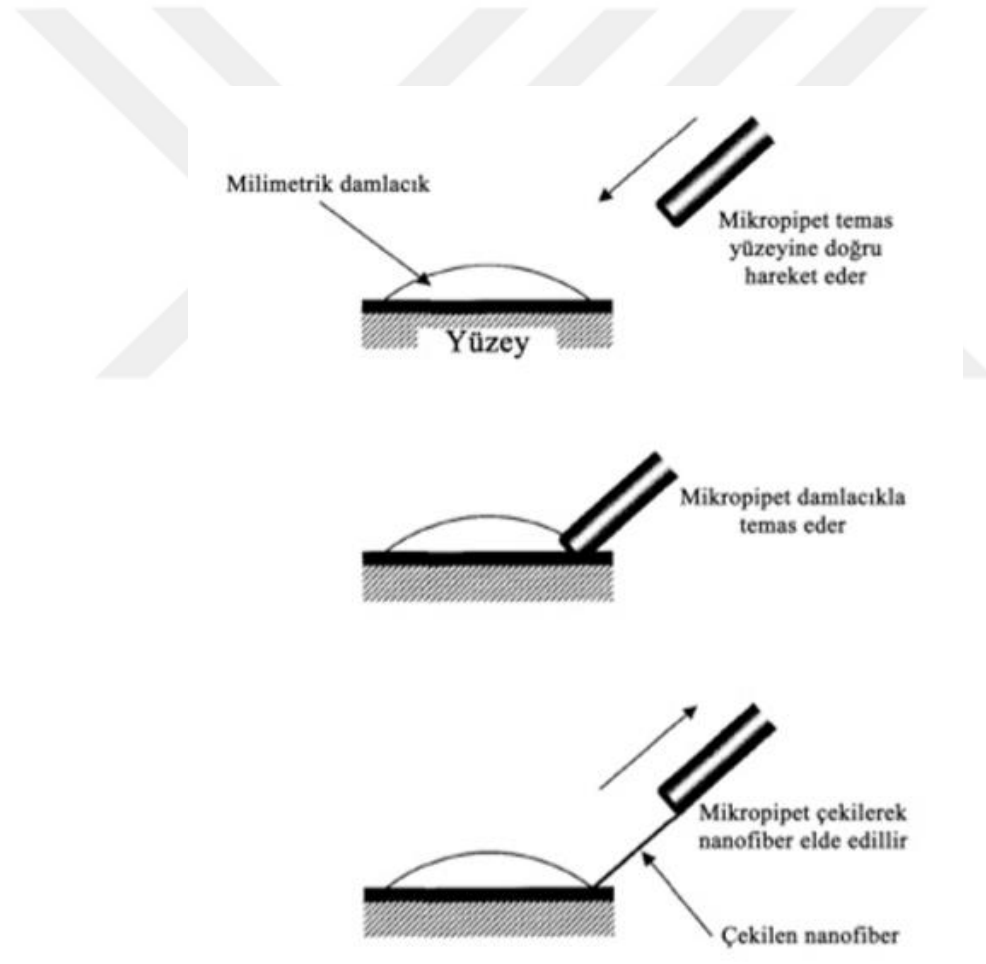
Şekil 2.6. Eriyik şişirilmiş tekniği ile lif üretim sistemi (Altaş, 2009).

Küçük çaplı fiberler üretebilmek için kullanılan bir yöntem olan meltblown tekniği ile düşük maliyetle termoplastik polimerlerden mikron çaplı fiberler üretilmektedir. (Celep, 2007). Yaygın olarak kullanılan polimerler polipropilen (PP), polietilenteraftalat (PET), poliamid 6 (nylon 6)'dır. Bu yöntemle eriyik hale getirilen sıvı polimer sistem içerisinde çeşitli filtreleme işlemlerinden geçirilir, pompa yardımı ile karıştırıcı bölmeye aktarılır. Besleme ünitesine gelen polimere yüksek basınçta sıcak hava üflenir. Havanın etkisi ile hareketli bant üzerine dökülen polimer silindirlerden geçerek yuvarlak bir yüzeye sahip toplayıcı etrafına sarılır (Altaş, 2009).

Fibrilasyon Tekniği ile Fiber Üretimi

Bu teknik selüloz gibi doğrusal ve hücresele yapıya sahip fiberlerin, daha ince fiberler şeklinde üretilmesi için kullanılmaktadır (Altaş, 2009). Fibrilasyon işlemi uygulanmış selülozik liflerden, ince, hidrofilik, mikro gözenekli fibröz yapılar üretilmektedir. Bu yapılar özellikle mikrobiyoloji alanında kullanılmaktadır.(Celep, 2007). Bu yöntem dondurma, çözünme, jelleşme, farklı çözücüler kullanarak üretim yapma işlemlerinin yanı sıra nano gözenekli köpük oluşturacak şekilde kurutma işlemini de içermektedir (Altaş, 2009).

Çekme Tekniği ile Fiber Üretimi



Şekil 2.7. Çekme tekniği ile fiber üretimi.

Bu teknikte birkaç mikrometre çapında olan bir mikropipetin düz bir zemin üzerinde bulunan sıvıya daldırılması ve mikromanipülatör yardımıyla belirli bir hızla sıvı damlasından uzaklaştırılmasıyla fiber üretilmektedir. Yaklaşık olarak mikropipetin sıvıdan çekilme hızı 1×10^{-4} m/s'dir. Bu işlem her damlacıkta defalarca tekrar edilir ve

çekilen fiberler bir yüzeyde toplanarak belirli miktarda fiber üretilir. Mikropipetin sıvıya temas ettiği noktalarda buharlaşma olacağı için o noktalarda viskozite artar (Çakmak, 2011).

Kalıp Tekniği ile Fiber Üretimi

Kalıp içerisine yerleştirilen polimer çözeltisinin kalıpta yüzey üzerine uygulanan basınçlı su ile çözeltinin kalıbın içerisinde bulunan nanogözeneklerden akması sonucu, fiberlerin özel bir sıvı içerisinde katılaşması ile kararlı yapıda ince fiberlerin oluşum yöntemidir. Burada fiberlerin çaplarını kalıp içerisinde bulunan nanogözenekli yapıların gözenek boyutları belirler (Altaş, 2009; Çakmak, 2011).

Kendi Kendine Toplama Yöntemi ile Fiber Üretimi

Küçük yapılı moleküllerin basit bloklar halinde kullanılması ile fiberler elde edilmektedir. Burada ana mekanizma küçük moleküllerin aynı merkezli yapılar şeklinde düzenlenmesi sonucu iç moleküler kuvvetler ile makro moleküllerin fiber yapıda şekil almasıdır (Altaş, 2009).

Elektro-Eğirme Üretim Tekniği ile Fiber Üretimi

Elektro-eğirme üretim tekniği polimer çözeltisi ya da polimer eriğinden elektrik alan içerisinde bir jet boyunca fiber yapıların oluşumudur. Diğer üretim yöntemleri arasında basit, çok yönlü ve avantajlı olduğu için son yıllarda ön plana çıkmıştır (Altaş, 2009). Bu yöntemde kullanılacak olan polimer uygun bir çözücüde çözülür ya da ısı yardımı ile eritilir, ardından çözelti uygun bir şırınga içerisine alınır. Şırınga ucu ile toplayıcı levha arasındaki alana yüksek gerilimin uygulanması sonucu oluşan polimer jeti toplayıcı bir yüzey üzerinde biriktirilir ya da döner bir toplayıcı üzerine sarılır. Bu yöntemde 30 nm'den 1 mikron'a kadar değişiklik gösteren çaplarda mikro/nano fiberler üretilmektedir. (Çakmak, 2011). Tez çalışması kapsamında elektro-eğirme tekniği ile fibröz yapıda polimerik membranlar üretildiği için bu teknik hakkındaki teorik bilgiler Bölüm 2.11'de "Elektro-eğirme" başlığı altında kapsamlı olarak ele alınmıştır.

2.11. Elektro-Eğirme Tekniği

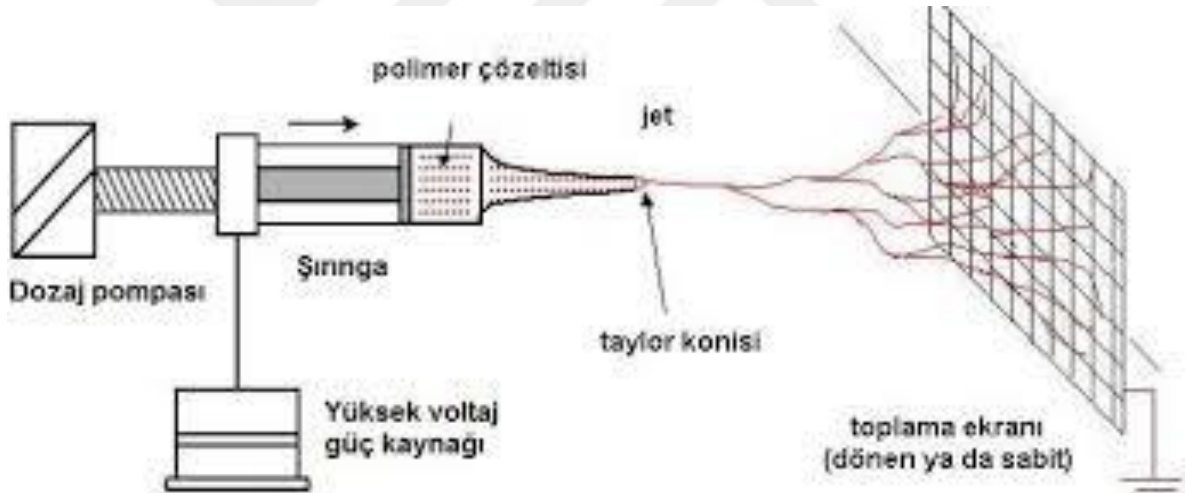
2.11.1. Tekniğin tarihçesi

William Gilbert'in 1600'lü yıllarda manyetizma üzerine çalışmalarını sürdürken tesadüfi şekilde elektro manyetizmanın sıvılar üzerine etkisini görmesi ile temelleri atılmıştır. Sonrasında yaptığı çalışmalarda bir sıvı damlasının kuru bir yüzeyden elektriksel olarak, belli bir mesafeden koni şeklinde çekildiğini gözlemlemiştir. Bu olayın gerçekteşmesi elektro-eğirme tekniğinin başlangıç noktası olarak kabul edilmiştir (Çakmak, 2011). Lord Rayleigh ise 1882'de elektrik yüküne sahip damlaların elektro-eğirme esnasında gösterdiği kararsızlık üzerine çalışmalar yaparak, kesintisiz akış için gerekli olan yük miktarını hesaplamıştır (Çakmak, 2011; Çaydamlı, 2012). Yapılan bu çalışma sonucunda Rayleigh, damlanın üzerine etki eden iki kuvvetin olduğunu söylemiştir. Bu kuvvetler elektrik kuvveti ve elektrik kuvvetine zıt yönde damlayı etkileyen yüzey gerilimi kuvvetidir. Elektrik kuvveti yüzey gerilim kuvvetine baskın geldiği esnada damla ince jetlere ayrılarak akamaya başlar (Çakmak, 2011). 1934 yılında elektro-eğirme adına ilk patent Anton Formhals tarafından alınmıştır. Formhals yaptığı sistemde alkol-aseton karışımı kullanarak selüloz lif üretimini gerçekteşirmiştir. Bu zamana kadar yapılan çalışmaların yanı sıra elektro-eğirme tekniğinin anlaşılmasında en önemli katkılardan birini de Taylor ortaya koymuştur. Taylor mekanizma içerisinde jetin oluşumunu detaylı bir şekilde modelleyerek, polimer damlasının elektrik alan içerisinde nasıl hareket ettiğini 1969 yılında açıklamıştır. Bu çalışma yüzey gerilimi ile elektrostatik kuvvetlerin dengelendiği anda iğne ucunda oluşan konik yapıdaki damlayı açıklar ve 'Taylor Konisi' adını verir. 1971 yılında ise Baumgarten, işlem ve çözelti parametrelerinin oluşan lifin yapısal özellikleri üzerine etkisini araştırmış ve lif çapı-elektrik alan şiddeti ve lif çapı-viskozite ilişkilerini açıklamıştır (Çaydamlı, 2012).

2.11.2. Tekniğin uygulanması

Elektro-eğirme tekniğinin teorik alt yapısı ve uygulanması polimer kimyası, akışkanlar mekaniği, elektrik fiziği, temel fizik, makine, malzeme mühendisliği vb. birçok disiplini bünyesinde barındıran multi disiplinler bir tekniktir. Bu üretim tekniğini oluşturan düzenekler temelde 3 ana parçadan meydana gelir. Bunlar; yüksek voltaj güç kaynağı,

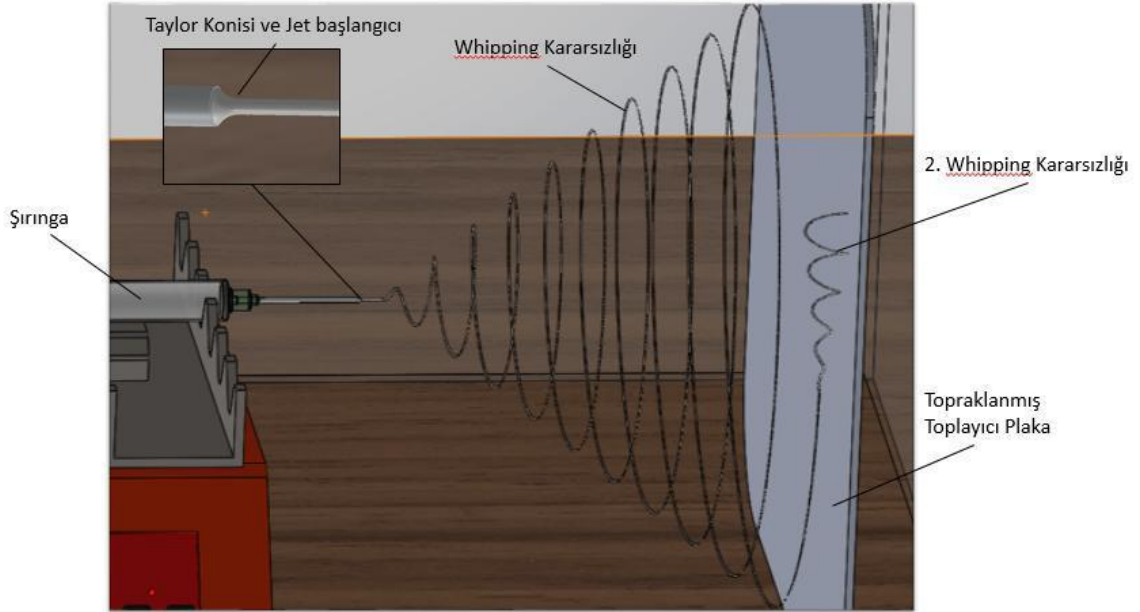
besleme ünitesi (pipet, metal iğne, şırınga, vb.) ve toplayıcıdır (döner silindir, iletken plaka, vb.) Yöntem prensip olarak, uygun bir şırınga içerisine konulmuş bir polimer çözeltisinin veya polimer eriğinin elektriksel olarak yüklenmesiyle şırınga iğnesi ucundan jet oluşturarak çıkması ve toplayıcı yüzeyinde biriktirilmesi ya da döner bir toplayıcı üzerine sarılmasıdır. Güç kaynağından gelen elektrotların bağlanması sonucu, iğne ile toplayıcı plaka arasında oluşturulan elektrik alan şiddetine bağlı olarak oluşan polimer jetinin çekilmesiyle fiberler oluşturulur. Polimer jetin elektrik alanda çekilmesi esnasında polimer eriği soğur ya da polimer çözeltisinin çözücüsü buharlaşır ve toplayıcı üzerinde katı polimerik fiberler birikir. Elektrik alan kuvveti, polimerin türü, polimer çözeltisi ya da eriğinin viskozitesi ve iletkenliği, şırınga ucu ile toplayıcı arasındaki mesafe, şırıngadan polimer çözeltisi ya da eriğinin akış hızı vb. pek çok parametreye bağlı olarak mikro'dan nano'ya farklı çaplarda polimerik fiberler üretmek mümkündür (Altaş, 2009; Çakmak, 2011; Çaydamlı, 2012).



Şekil 2.8. Elektro-eğirme düzeneği.

Uygulanan gerilim ile birlikte iğne ucunda toplanan polimer damlası, voltajın artırılması ile birlikte polimer jetini oluşturur. Polimer jeti elektrik alan tarafından çekilmeye başlar. Polimer jeti bir süre kararsızlık gösterir. 2001 yılında Shin ve arkadaşları oluşan bu kararsızlık halini matematiksel olarak modelleyip 3 farklı kararsızlık durumu olduğunu açıklamışlardır. Jet üzerinde yüklerin birbirini karşılıklı olarak itmesinden kaynaklanan jet kararsızlığını 'Whipping' kararsızlığı olarak tanımlamışlardır. Whipping kararsızlığının jet oluşumunda en fazla görülen kararsızlık olduğunu belirtmişlerdir. Jetin toplayıcı yüzeye yaklaşması ile ana jetten ayrılarak

küçük jetlerin oluşumunu açıkladıkları kararsızlık durumunu da 2. Whipping kararsızlığı olarak tanımlamışlardır (Altaş, 2009).



Şekil 2.9. Whipping kararsızlığı.

2.11.3. Teknikte kullanılan düzenekler

Bu üretim tekniğini oluşturan düzenekler temelde 3 ana bileşenden meydana gelir. Bunlar; yüksek voltaj güç kaynağı, besleme ünitesi ve toplayıcıdır. Elektro-eğirme yönteminde istenilen amaca yönelik olarak düzeneği oluşturan bileşenler üzerinde çeşitli modifikasyonlar yapılabilmektedir. Uygulanan modifikasyonlar oluşturulan fiber yapıda farklılıklar meydana getirir. Teknikte çalışma için uygun olan düzenekler ve/veya modifikasyonlar kullanılmalıdır (Altaş, 2009).

Besleme Ünitesi: Polimer çözeltisi uygun bir şırınga içerisine konarak bir mikropompaya yerleştirilir. Daha sonra polimer eriyiği ya da çözeltisinin şırınga ucundan akış hızı ve akış süresi ayarlanır. Bu elektro-eğirme sisteminin besleme ünitesidir. Besleme üniteleri tek ya da ikili olmakla birlikte endüstriyel uygulamalarda üretim hızını artırmak amacıyla çoklu olacak şekilde de tasarlanabilmektedir. Çoklu besleme ünitelerinde farklı özellik ve konsantrasyonlarda polimer çözeltileri kullanılabilir (Altaş, 2009).



Şekil 2.10. Besleme ünitesi.

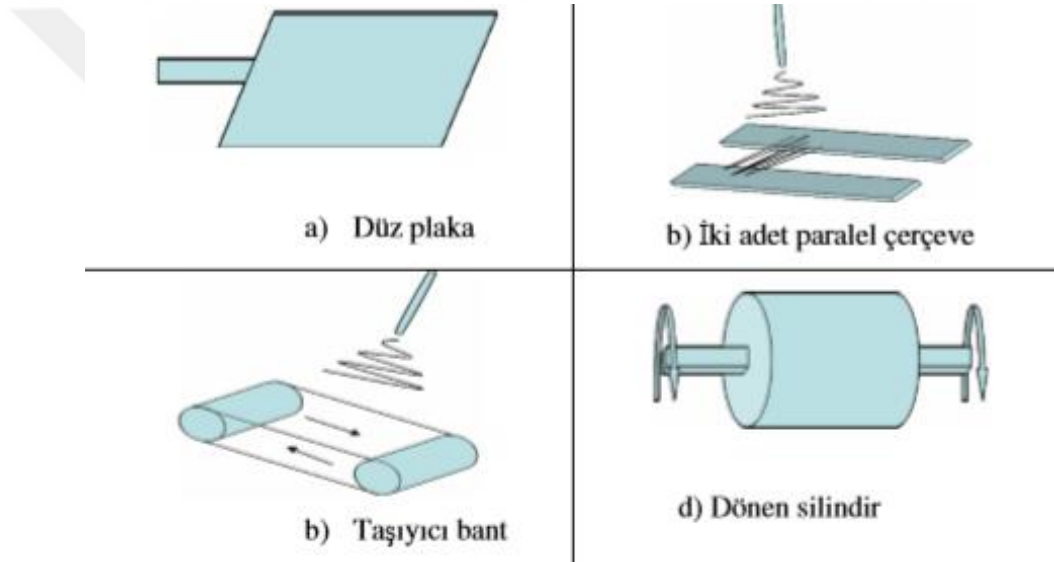
Güç Kaynağı: Düzeneğin temel ana parçalarından biridir. Çalışmanın amacına göre voltajın doğru akım ya da alternatif akım olarak verilmesini sağlar. Besleme ünitesinde olduğu gibi ek modifikasyonlar kullanılarak elektrik alanın niteliğini arttırmak mümkündür. Yardımcı modifikasyonların kullanılması daha düzgün fiberlerin elde edilmesini sağlar. 1987 yılında Bornat bu amaçla elektrik alanın modifikasyonu ile ilgili çalışmalar yapmıştır (Altaş, 2009).



Şekil 2.11. Güç kaynağı.

Toplayıcı Plaka: Şırınga iğnesi ucundaki polimer çözeltisi ya da eriyiği damlasının elektrik alan yardımıyla çekilerek eğrilmesi ile oluşturulan fiberlerin üzerinde biriktirildiği ya da üzerine sarıldığı düzeneklerdir. Toplayıcı plakalar üretmek istenilen fiber yapıya göre çeşitlilik gösterebilmektedir. Genellikle döner silindir, düz plaka ya da çerçeve toplayıcılar kullanılmaktadır (Altaş, 2009). Döner silindir ya da taşıyıcı bant şeklinde tasarlanmış hareketli toplayıcılar fiberleri üzerlerine sararak topladıkları için fiberlerin daha düzenli şekilde hizalanarak biriktirilmesini sağladıkları için mekanik

dayanımı daha yüksek fibröz yapıların üretilmesini sağlarlar. Toplama esnasında polimer çözeltisi ya da eriğiyinin akış hızı fazla ve toplayıcı ünitenin hareket hızı yavaş olacak şekilde ayarlandıysa fiberler çekerek değil birikerek sarılacağından yönlenme daha az olur. İyi bir hizalanma isteniyorsa hareketli toplayıcının hareket hızı ile birlikte diğer bürün elektro-eğirme parametrelerinin uygun şekilde ayarlanması gerekmektedir. Polimerin türüne ve çözücüsüne, polimer çözeltisi ya da eriğiyinin iletkenliğine göre çalışmaya özgün gerekli optimizasyon çalışmaları yapılmalıdır. Toplayıcı üzerinde uzun süre fiber biriktirmesi yapılırsa fibröz malzemenin kalınlığı artar. İstenilen kalınlıkta fibröz malzemeler yapılabilmesi için polimer jetinin akış hızı ve süresine bağlı olarak toplayıcı yüzeyinde belirli bir süre fiber biriktirilmelidir.



Şekil 2.12. Çeşitli toplayıcı plakalar.

2.11.4. Tekniğe etki eden parametreler

Elektro-eğirme tekniğine etki eden pek çok parametre vardır. Tekniğe etki eden parametreler değiştirilerek farklı şekil ve çaplarda fiberlerden oluşan farklı yoğunluk, gözeneklilik ve morfolojilerde fibröz yapılar elde etmek mümkündür. Çalışmaya uygun olarak istenilen ürünün elde edilebilmesi için bu parametrelerin kontrol edilmesi gerekir. Bu parametreler genel olarak işlem, çözelti ve ortam parametreleri olarak üç ana başlıkta kategorize edilebilir (Altaş, 2009). İşlem, çözelti ve ortam parametreleri ile ilgili detaylı bilgiler Çizelge 2.3 ve Çizelge 2.4'te verilmiştir.

Çizelge 2.3. Elektro-eğirme tekniğine etki eden parametreler (Dinç, 2013).

İşlem parametreleri	Çözelti parametreleri	Ortam parametreleri
Çözelti sıcaklığı	Yüzey gerilimi	Nem
Uygulanan voltaj	Elektrik iletkenliği	Basınç
Çözelti besleme hızı	Dielektrik sabiti	Sıcaklık
Toplayıcı-iğne arası mesafe	Moleküler ağırlık ve viskozite	Atmosfer cinsi

Çizelge 2.4. Elektro-eğirme tekniğine etki eden parametrelerin lif morfolojisine etkisi (Çaydamlı, 2012).

Parametreler	Lif morfolojisine etkisi
İşlem parametreleri	
Uygulanan voltaj	Gerilimin artması ilk olarak lif çapında azalmaya sebep olsa da sonrasında lif çapında artışa neden olur. Gerilimin çok fazla yüksek olması lifler üzerinde boncuklu yapıların oluşumuna sebep olur.
Çözelti besleme hızı	Polimer çözeltisinin akış hızının artması lif çapında artışa sebep olur. Daha hızlı akış hızları boncuk oluşumu etkiler.
Toplayıcı-iğne arası mesafe	Mesafe arttıkça lif çapı azalır. Mesafenin optimizasyonu önemlidir. Boncuk oluşumunu etkiler.
Çözelti parametreleri	
Viskozite	Viskozite artışı lif çapını artırır ve var olan boncuk oluşumunu azaltır.
Polimer derişimi	Derişimin artması lif çapını artırır.
Çözelti iletkenliği	İletkenliğin artması lif çapını daraltır.
Polimerin moleköl ağırlığı	Molekül ağırlığındaki artış damlacık ve boncuk oluşumunu azaltır.
Yüzey gerilimi	Yüzey geriliminin yüksek olması iğne ucunda oluşan polimer jetinde kararsızlıklara neden olur.
Ortam parametreleri	
Sıcaklık	Sıcaklık artışı lif çapında azalmaya neden olur.
Bağıl nem	Bağıl nemdeki artış lif yüzeyinde gözenek oluşumunu artırır.

2.12. Kobalt ve Kobalt Bileşiklerinin Kullanım Alanları ve İnsan Vücuduna Etkileri

Kobalt (Co) element olarak 1742 yılında İsveçli bilim insanı George Brandth tarafından yeni bir metal olarak bulunmuş ve 1780 yılında Torbern Bergman tarafından element olarak tanımlanmıştır (Kartal ve ark., 2004; Boğa, 2007). Kobalt yeryüzünde en az sıklıkla bulunan elementlerden biridir (25 mg/ton). Daha çok endüstriyel uygulamalar ve askeri alanda kullanılmaktadır. Malzemeye manyetik özellik kazandırma, mekanik özellikleri iyileştirme, korozyona karşı koruma vb. amaçlarla alaşımda ve farklı uygulamalarda alaşım elementi olarak kullanılmaktadır (Kartal ve ark., 2004). Ayrıca kobalt izotopu kanser tedavisinde kullanılmaktadır (Boğa, 2007).

Kobalt kırmızı kan hücrelerinin üretiminde ve sinir hücrelerinin düzenlenmesinde kullanılan B₁₂ vitamininin merkez yapı taşı olup günlük besin ihtiyacımızda bir yer teşkil etmektedir (Mertz, 1987; Kendrick ve ark., 1992). Kobalt en etkili biyokatalizör olarak bilinir. Vücudumuzdaki normal miktarı 80-300 µg ve günlük kobalt ihtiyacımız ise 5 µg'dır. Kırmızı kan ücreleri, dalak, böbrek, karaciğer ve pankreasta depolanan kobalt, midye, et, süt, balık gibi besinlerde ve düşük miktarlarda da olsa ıspanak, lahana, salata, pancar gibi sebzelerde de bulunmaktadır (Kartal ve ark., 2004; Boğa, 2007). Bununla birlikte vücudumuza yüksek dozlarda kobalt alımı çeşitli sorunlara neden olur. Havada toz halinde bulunan kobaltın solunması veya kobalt tuzlarına deri ile temas edilmesi sonucunda kobalt zehirlenmeleri olabilmektedir. Hava yolu ile alınan toz yapıdaki kobalt (Co) elementi akciğerlerde çözünerek kana ve idrara karışır. Bununla birlikte suda çözünürlüğü olmayan kobaltoksit (Co₃O₄) solunum yolu ile vücuda girdiği zaman vücut tarafından emilir ve birkaç gün içerisinde hücreler tarafından çözünerek kana karışır. Fakat suda çözünebilir kobalt bileşikleri vücuda girdiği zaman, % 75 oranında itrah edilir ve geri kalanı kan, akciğer, böbrek, bağırsak ve karaciğerde toplanır (Kartal ve ark., 2004). Vücudun yüksek dozlarda kobalta maruz kalma süresi uzadığı zaman alerjik reaksiyonlara ve kronik bronşite neden olabilir ancak kobalt kaynaklı hastalıklar çok nadir görülmektedir (Habashi, 1997). Kobalt bileşiklerinin kanserojen madde olduklarına dair risk teşkil ettikleri öne sürülmektedir (Kartal ve ark., 2004). Ancak kobalt ve kobalt bileşiklerinin insanlar üzerinde kansere neden olduğuna dair kesin bulgular bulunmamaktadır.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

Sunulan tez çalışmasında; kalp hastalıkları sonucu kalp üzerinde meydana gelen hasarı tedavi etmek, iyileşme sürecini desteklemek, oluşacak hücre iletim ağını sağlamak ve kalpte iletimi desteklemek amacı ile CoO nanopartikülleri içeren PLA/PCL/CoO polimerik kardiyak yamalar üretilerek karakterize edilmiştir. Kardiyak yamaların yoğunluğu ve gözenekliliği hesaplanmış, membran morfolojisi SEM görüntüleri alınarak incelenmiştir. Kimyasal yapı analizi polimerlerin ve yamaların ayrı ayrı FTIR spektrumları alınarak yapılmıştır. Kardiyak yamaların mekanik dayanımları standart çekme testleri uygulanarak değerlendirilmiştir. *In-vitro* koşullarda şişme testleri yapılarak su alma kapasiteleri hesaplanmıştır. Yamaların zamanla kütle kaybı ve yamalardan CoO nanopartikül salımı 3 hafta ve 3 ay boyunca *in-vitro* koşullarda değerlendirilmiştir. Yama iletkenliği dört nokta prob tekniği kullanılarak ölçülmüştür. Biyouyumluluk standart sitotoksitesite testi (MTT) yapılarak değerlendirilmiş ve yamaların hücreler ile etkileşiminde apoptotik/nekrotik etkileri incelenmiştir.

3.1. Materyal

%99.8 saflıktaki CoO nanotozu (40-50 nm) Ege Nanotek (Türkiye) ve PCL (80 kDa) polimeri Sigma-Aldrich (İngiltere) firmalarından satın alınmıştır. PLA polimeri, L-Laktat (L-LA) (Purac, Hollanda) dimerinden halka açılımı polimerizasyonu ile sentezlenmiştir. Katalizör olarak kalay oktoat (SnOct_2) (Sigma Aldrich, ABD) kullanılmıştır. Kloroform (Merck, Germany) ve Metanol (Merck, Germany) karışımı çözücü olarak kullanılmıştır. Polimerik yamalar ile etkileştirilmiş insan kardiyomiyosit hücrelerinin canlılığını dolayısı ile *in-vitro* koşullarda yamaların biyouyumluluğunu değerlendirmek amacıyla standart sitotoksitesite testi (MTT) yapılmıştır. Test için kullanılan MTT [3-(4,5-dimetiltiyazol-2-yl)-2,5difeniltetrazolyum-bromür] tuzu Serva firmasından temin edilmiştir ve çalışmalarda insan kardiyomiyosit (HCM) hücre hattı (Promocell, C12811, Almanya) kullanılmıştır. Polimerik yamalar 11. pasaj sayısındaki HCM hücreleri ile etkileştirilerek biyomalzemenin hücreler üzerindeki olası sitotoksitesitesi ve apoptotik/nekrotik etkileri değerlendirilmiştir. Besiyeri (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), %10 Fetal Bovine Serum (FBS), %1 1-glutamin, %1 antibiyotik (penisilin/streptomisin), tripsin-EDTA, Hoechst 33342, propidyum iyodür

(PI) ve ribonükleaz A (RNase A) satın alınarak (Biological Industries Ltd. Kibbutz Beit Haemek, İsrail) hücre kültürü çalışmalarında kullanılmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. PLA sentezi ve molekül ağırlığı tayini

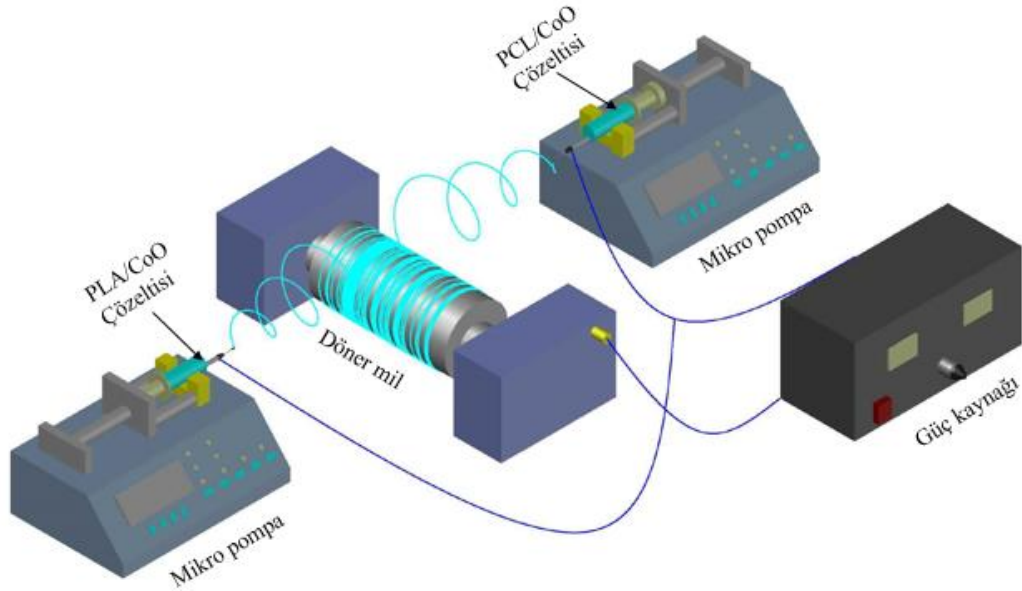
Tezde kullanılacak olan PLA polimeri L-laktat dimerinin halka açılımı polimerizasyonu yöntemi ile katalizör varlığında (SnOct_2) sentezlenmiştir. Monomer/katalizör oranı 1000/1 olup 24 saat süre ile ısıya dayanıklı cam tüpler içerisinde 120°C sabit sıcaklığa ayarlanmış etüvde (JSR, Japonya) polimerizasyon reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. 24 saatin sonunda tüp reaktör etüvden alındı ve ısısı oda sıcaklığına gelene kadar soğumaya bırakıldı. Tüp içerisindeki polimer kloroform ile çözülüp, çözelti metanol içerisine yavaşça eklenerek polimeri çöktürme işlemi gerçekleştirildi. Polimer içerisinde kalmış olabilecek çözücünün ortamdan uzaklaştırılması için çöktürülen polimer desikatör içerisinde 2 gün boyunca kurutulmuştur. Sentezlenen PLA polimerinin molekül ağırlığı ve molekül ağırlığı dağılımı Jel Geçirgenlik Kromatografisi (GPC), (Shimadzu, Japonya) cihazı kullanılarak tayin edilmiştir. GPC yöntemi molekülleri tanecik boyutuna göre ayırıştırıcı kromatografik bir yöntemdir. Polimerik partiküller, paketlenmiş sabit bir fazdan hareketli (mobil) faz içerisinde çözünmüş olarak geçer. Burada farklı zincir uzunluklarına sahip polimerler sahip oldukları molekül ağırlıklarına göre farklı sürelerde sistem içerisinden geçerler. Polimer çözeltilerinin kolon içerisinde alıkonma süreleri ölçülür ve molekül ağırlığı bilinen standart çözeltiler için ölçülen alıkonma süreleriyle karşılaştırılır. Bu prensipten yararlanan GPC yöntemi ile standart olarak kabul edilen polimerlerin çözünmesiyle hazırlanmış çözeltiler için ölçümler alınarak molekül ağırlığına karşı alıkonma süreleri ölçülerek doğrusal bir kalibrasyon grafiği elde edilir. Grafik yardımıyla molekül ağırlığı bilinmeyen bir polimer için ölçülen alıkonma süreleri kullanılarak bağıl molekül ağırlığı ve molekül ağırlığı dağılımı (polydispersity index) tayini yapılır. Günümüzde cihaz yazılımları standartlar için kalibrasyon grafikleri oluşturarak sayıca (M_n) ve ağırlıkça (M_w) ortalama molekül ağırlığı tayini yapmaktadır. Kalibrasyon işlemi için geniş bir aralıkta farklı molekül ağırlıklarına (500, 2000, 10000, 30000, 70000, 150000 kDa) ve dar bir molekül ağırlığı dağılımına sahip polistiren standartlar kullanılmıştır. Kolonun sıcaklığı 25°C ve mobil fazı akış hızı 1.0 ml/dk'dır.

Çizelge 3.1. Sentezlenen PLA polimerinin ortalama molekül ağırlığı.

Sayıca ortalama molekül ağırlığı (M_n)	Ağırlıkça ortalama molekül ağırlığı (M_w)	Polidispersite indeksi (PDI) (M_w/M_n)
259.339	689.761	2.65

3.2.2. PLA/PCL/CoO kardiyak yama üretimi

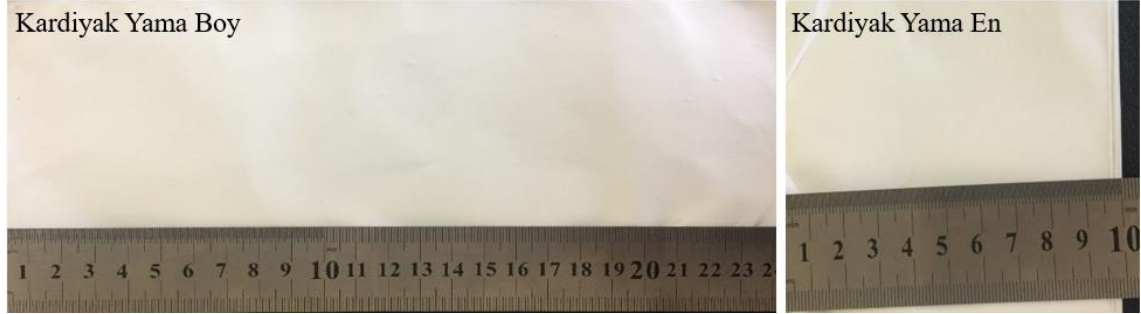
Çalışmada Şekil 3.1’de temsili olarak çizilen ikili elektro-eğirme (co-spinning) düzeneği kullanılarak boş ve farklı oranlarda (%0,03 w/w, %0,06 w/w, %0,19 w/w) CoO nanopartikülü içeren PLA/PCL yamalar (Şekil 3.2) üretilmiştir. PCL ve PLA çözeltileri eş-zamanlı ve karşılıklı elektro-eğrilerek rulman toplayıcı üzerine sarılan bir alüminyum folyo yüzeyinde biriktirilmiştir. CoO nanopartikülleri her iki çözelti içerisine ilave edilmiş ve çözeltiler şırınga içerisine alınmadan önce iyice karıştırılmıştır. Böylece içerisinde CoO nanopartikülleri bulunan iç içe geçmiş (non-woven) ve kısmen yönlendirilmiş PCL ve PLA fiberlerden oluşan polimerik membran yamalar üretilmiştir.



Şekil 3.1. İkili elektro-eğirme düzeneği şematik gösterimi.

PCL (%15 w/v) ve PLA (%7 w/v) çözeltilerinin elektro-eğirme koşulları ilgili literatür ışığında yapılan birçok seri deneme sonucu optimize edilmiştir (Dapeng Li, 2006; Augustine ve ark., 2015; Zhou ve ark., 2017). Çözücü olarak kloroform/metanol (4/1)

karışımı kullanılmıştır. Çözeltilerin akış hızları 2 ml/saat olup toplayıcı ile şırınga ucu mesafesi 15 cm ve potansiyel fark 16 kV olarak ayarlanmıştır. Üretilen yamalar çözücünün uzaklaşması için 3 gün vakum desikatörde beklemiştir. Stabilize edilen kardiyak yamalar etiketlenip paketlenerek +4°C'de saklanmıştır.



Şekil 3.2. Üretilen PLA-PCL kardiyak yamalar.

3.2.3. PLA/PCL/CoO kardiyak yamaların karakterizasyonu

Kimyasal Yapı Analizi (FTIR)

Üretilen kardiyak yamaların kimyasal yapı analizi FTIR-ATR (Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi - Zayıflatılmış Toplam Yansımaya, Jasco, FT-IR/4700) spektroskopisi ile yapılmıştır. Yama üretiminde kullanılan polimerlerin (PLA ve PCL), CoO nanopartiküllerin ve ağırlıkça farklı oranlarda CoO içeren (%0.00, %0.03, %0.06, %0.19) PLA/PCL/CoO kardiyak yamaların ayrı ayrı FTIR spektrumları alınarak polimerlerin elektro-eğirme esnasında yüksek voltaj altında çözücü ile etkileşimleri sonucu kimyasal yapılarında herhangi bir değişim olup olmadığı karşılaştırmalı olarak incelenmiştir (Şekil 4.1). Yamalar, 1-2 mm çapındaki elmas disk üzerine basınçla sabitlenip, yüzeye gönderilen kızılötesi (Infrared/IR) ışının malzeme tarafından soğurulması ve kristalden yansıyan IR yoğunluğunun kaydedilmesi ile 500-4000 cm⁻¹ dalga sayısı aralığında ölçümler alınmıştır.

Yüzey Morfolojisi (SEM)

Polimerik fibröz kardiyak yamaların yüzey morfolojisi (SEM) görüntüleri alınarak incelenmiştir. SEM incelenecek olan malzemenin yüzey özelliklerini belirlemek amacıyla cihaz tarafından gönderilen elektron demetlerinin örnek numune yüzeyindeki

elektronlar ile etkileşime girmesi sonucu yapının yüzey topografyası hakkında bilgi veren bir cihazdır (Anonim, 2018). 5 mm x 5 mm kare kardiyak yama kesitleri alınarak SEM numune platformuna sabitlenmiştir. Örnek yüzeylerinin iletken hale getirilmesi amacıyla kesitler 10 dk boyunca vakum altında altın (Au) iyonları ile kaplanmıştır. Kaplama işlemi kaplama cihazı (Quorum K150RS, İngiltere) içerisinde vakum ortamda gerçekleştirilmiştir. Sonrasında yamaların farklı büyütmelelerdeki SEM (Tescan Mira3 XMU, Çekya) görüntüleri alınarak (Şekil 4.2, Şekil 4.3, Şekil 4.4, Şekil 4.5) fibröz yapı ve yüzey morfolojisi incelenmiştir.

Yoğunluk ve Gözeneklilik

Elektro-eğirme tekniği yüksek yüzey/hacim oranı ve gözeneklilik açısından malzemeye önemli avantajlar sağlamaktadır (Zahedi ve ark., 2010). Nanofibröz membranlarda gözenekli yapı, terapötik, antibakteriyel, antifungal, antioksidan vb. farklı ajanların membran yapıdan salım özelliklerini, su tutma kapasitesini vb. etkiler. Gözeneklilik ve gözenek boyutları bu gibi özelliklerin kontrol edilebilmesine imkan vermektedir. Elektro-eğirme tekniği ile üretilen kardiyak yamaların gözeneklilik (%) değerleri aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{Gözeneklilik (\%)} = [(V_m - V_o) / V_m] \times 100 \quad (3.1)$$

Formülde V_o polimerik saf film için spesifik hacim (cm^3/g), V_m ise elektro-spun fibröz polimerik membranlar için spesifik hacim (cm^3/g) değerlerini temsil etmektedir (Gupta ve ark., 2011). 2 x 2 cm boyutlarında hazırlanmış 10'ar tane kare kesit için, ağırlık (g) ve hacim (cm^3) değerleri kullanılarak yamaların yoğunluğu (ρ) ve ortalama spesifik hacimleri (cm^3/g) ve gözeneklilik (%) değerleri hesaplanmıştır (Çizelge 4.1).

Islanabilirlik (% Şişme oranları)

Kardiyak yamaların (%0.00, %0.03, %0.06, %0.19) su alma kapasiteleri (ıslanabilirlik) 7.5 mm çaplı dairesel yama kesitleri fosfat tampon çözeltisi (pH 7.4) içerisinde belirli sürelerde (3, 5, 6, 9, 10, 12, 15, 20, 25, 30, 45, 60, 75, 90, 110, 130, 150, 180 dakika) 37°C'deki etüvde bekletilerek değerlendirilmiştir. Her bir yama için 10 farklı kesit alınarak, kesitlerin tampon çözelti (PBS) içerisine konmadan önce kuru ve tampon

çözelti (PBS) içerisinde alındıktan sonra ıslak ağırlıkları (g) tartılmıştır. % şişme oranları aşağıda verilen formül kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Şişme Oranı} = [(W_t - W_o) / W_o] \times 100 \quad (3.2)$$

Formülde verilen W_o ve W_t sırası ile yamaların kuru ve ıslak ağırlıklarını ifade etmektedir (Sinha ve ark., 2013). Kardiyak yamaların (%0.00, %0.03, %0.06, %0.19) elirlenen sürelerdeki şişme oranları (%) hesaplanarak grafiğe aktarılmış (Şekil 4.6) ve şişme (%) profili değerlendirilmiştir. Böylece yamaların maksimum su alma kapasiteleri ve maksimum şişme (%) değerine ulaştığı süreler belirlenmiştir.

Zamana Bağlı Kütle Kaybı

Kardiyak yamaların yapısında bulunan polimerler biyobozunur olup, belirli bir süre sonra ikinci bir cerrahi operasyon gerektirmeden vücut tarafından emilir. Kalp krizi sonrası hasar görmüş kalp kasının rejenerasyonu oldukça yavaştır. O nedenle kalp kasını desteklemek amacıyla uzun bir süre kalp yamalarının bozunması istenmez. Bozunma polimerik membran yamalarda kütle kaybına neden olur. Dolayısı ile kütle kayıp hızı ile bozunma hızı orantılıdır. Polimerlerin türü, yapısı, molekül ağırlığı ve çevresel faktörler bozunma hızını etkiler. Erken dönemde kalp yamalarının bozunmaya başlayıp başlamadığı *in-vitro* koşullarda değerlendirilmiştir. Bu amaçla ilk üç ay için yama kesitleri (2cm x 2cm) PBS çözeltisi (pH 7.4, 37°C) içerisinde bekletilerek % kalan kütle değerleri aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Kalan Kütle} = (W_i / W_s) * 100 \quad (3.3)$$

Formülde verilen W_i ve W_s sırası ile kardiyak yama kesitlerinin deney öncesi ve sonrası kuru ağırlıklarını ifade etmektedir (Sinha ve ark., 2013). Deneyler her bir yama için 10 farklı kesit kullanılarak yapılmıştır. 12 haftalık süreçte her bir yama için her hafta % kalan kütle değerleri hesaplanmıştır (Şekil 4.7).

Kontrollü Salım Çalışmaları

Kardiyak yamaların fibröz yapısını oluşturan fiberlerin içerisine iletkenliği sağlamak amacıyla belirli konsantrasyonlarda (%0.03, %0.06, %0.19 w/w) CoO nanopartiküller ilave edilmiştir. Partiküller polimerik fiberler içerisine hapsedilmiştir. Ancak fiberlerin yüzeyindeki ve yüzeye yakın yerlerdeki CoO partiküllerin ortama salınıp salınmadığı üç haftalık ve üç aylık *in-vitro* salım çalışmaları yapılarak incelenmiştir. 7.5 mm çaplı dairesel yama kesitleri 37°C'de PBS çözeltisi içerisinde (pH 7.4) bekletilmiş ve 21 günlük süreçte her gün 12 haftalık süreçte ise her hafta belirlenen zaman dilimine ait kesitler tampon çözelti (PBS) içerisinden alınarak çözelti içerisinde CoO nanopartikül varlığı çözeltilerin UV görünür bölge spektrofotometresinde (PG Instruments T60, United Kingdom) absorbanları alınarak değerlendirilmiştir. UV bölgede 200-600 nm dalga boyu aralığında bir seri deneme yapılarak CoO nanopartikülünün maksimum değerinde absorban verdiği dalga boyunun 320 nm olduğu tespit edilmiştir. Belirlenen dalga boyunda bilinen konsantrasyonlarda CoO nanopartikül içeren PBS çözeltilerinin absorban değerleri alınarak doğrusal bir kalibrasyon grafiği oluşturulmuş (Şekil 4.8) böylece bilinmeyen konsantrasyonlarda CoO partikülü içermesi olasılığı olan PBS çözeltilerinin absorbanları alınarak kalibrasyon grafiği yardımıyla çözelti konsantrasyonları hesaplanmıştır. Üç haftalık (Şekil 4.9) ve üç aylık (Şekil 4.10) süreler için zamana karşı CoO nanopartikül konsantrasyonu grafikleri oluşturularak polimerik yamalardan CoO salımı olup olmadığı değerlendirilmiştir.

Sitotoksikite Testi / MTT

Kardiyak yamaların biyoyumluluğu sitotoksikite testi yapılarak değerlendirilmiştir. Sitotoksikite testleri direkt veya indirekt metodlar ile yapılabilmektedir. Hücreler ile materyalin doğrudan temas halinde olduğu metodlar direkt, hücreler ile materyal arasında doğrudan bir etkileşimin bulunmadığı metodlar ise indirekt metodlardır (Uzun ve Bayındır, 2011). Çalışmada direkt sitotoksikite yöntemlerinden biri olan MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid] testi ile ISO 10993-5 (2009) standartlarına uygun olarak yapılmıştır (Anonim, 2017). MTT testi hücre canlılığını metabolik aktivitenin tayinine yönelik reaktifler kullanarak tespit eden ve yaygın olarak kullanılan sitotoksikite testlerinden biridir. MTT tuzu sarı renklidir, elektron alarak indirgenir ve mor renkli formazan kristallerine dönüşür. İndirgenme sadece

mitokondriyal redüktaz enzimlerinin aktif olduğu canlı hücrelerde gerçekleşir. Dolayısıyla yalnızca canlı hücrelerin olduğu ortamda renk değişimi gerçekleşir ve hücre canlılığı kolorimetrik olarak incelenebilir (Mossman, 1983, Riss ve Moravec, 2006). Yamalar ilk olarak kalp kası hücreleri olan insan kardiyak miyosit (HCM) hücreleri (Promocell, 500.000 cryopreserved cells, C-12810, Almanya) ile etkileştirilmiştir. Laboratuvarında rutin hücre çözdürme ve çoğaltma prosedürü uygulanmıştır. Hücreler uygun besi ortamı (%1 penisilin, % 20 Fetal Bovine Serum, DMEM) 37°C sıcaklıkta %5 CO₂ ve %6 O₂ içeren nemli ortamda etüv içerisinde inkübe edilmiştir. İnkübasyon işleminin ardından flask kabı yüzeyinde çoğalarak konflüent hale gelen hücrelerin içerisinde bulunduğu besiyeri ortamdaki uzaklaştırılmış ve fosfat tampon çözeltisi (PBS) uygulanarak ortam yıkanmıştır. İnsan hücreleri çoğalabilmek için bir yüzeye tutunmaya (adhezyon) ihtiyaç duyarlar. Flask yüzeyine tutunan hücreleri yüzeyden kaldırmak için hücre adhezyonunu sağlayan glikoprotein yapıları parçalayan peptidaz bir enzim (tripsin) kullanılması gerekmektedir. Enzimin aktive olması için besiyeri ortamı uzaklaştırılarak tampon çözelti ile yıkanmış ve ortama tripsin-EDTA (% 0.25 Tripsin, % 0.02 EDTA) eklenerek 4 dakika etüvde hücreler ile enzim etkileştirilmiştir. Sonrasında enzim aktivitesini durdurmak amacıyla tekrar besiyeri ilave edilmiştir. Böylece hücre canlılığını (canlı hücre sayısını) tespit etmek üzere hücreler yüzeyden kaldırılarak süspanse hale getirilmiştir. Süspanse hücrelere belirli miktarda tripan mavisi (trypan blue) eklenmiş ve karışım hücre sayım kaseti (EVE cell counting slide) içerisine konularak kasetler hücre sayım cihazına (Invitrogen Countess Automated Cell Counter, Kore) yerleştirilmiştir. Hücre sayımı cihaz tarafından otomatik olarak yapılmıştır. Tripan mavisi negatif yüklü bir azo boyadır. Canlı hücrelerde sağlam seçici geçirgen hücre zarından hücre içine giremez. Ancak membran bütünlüğü bozulmuş dolayısı ise seçici geçirgenlik kabiliyetini kaybetmiş ölü hücrelere girebilir. Sadece ölü hücreleri maviye boyayabildiği için bu boya ölü hücrelerin ayırt edilmesini sağlayarak canlı hücrelerin sayılabilmesini sağlar. MTT testi 96 kuyucuklu plakalarda (96-well plates) gerçekleştirilmiştir. Çözdürülüp çoğaltılan 11. pasaj sayısındaki hücreler her bir kuyucukta 5×10^5 hücre olacak şekilde kuyucuklara ekilmiştir. Hücrelerin kuyucuklarda tutunması ve çoğalması için tekrar 24 saat 37°C sıcaklıkta %5 CO₂ ve %6 O₂ içeren nemli ortamda etüv içerisinde inkübe edilmiştir. Sonrasında hücre vasatı atılarak 0.75 cm çaplı dairesel steril yama kesitleri kuyucuklara tek tek yerleştirilmiştir. Yama kesitleri her iki yüzeyi 10'ar dakika UV ışınına maruz bırakılarak sterilize edilmiştir. Yama kesitlerinin yerleştirilmesinin ardından her kuyucuğa tekrar 200 µl besiyeri

eklenerek bir gece daha 37°C sıcaklıkta %5 CO₂ ve %6 O₂ içeren nemli ortamda etüv içerisinde inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından kuyucuklardan kardiyak yamalar alınmış ve hücre vasatı atılarak her bir kuyucuğa 50 µl MTT boyası [3-(4,5-dimetiltiyazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum-bromür] ilave edilmiştir. MTT tuzunun eklenmesinin ardından 96 kuyucuklu tabaka alüminyum folyoya sarılarak tekrar 2 saat etüvde bekletildi. MTT boyası ışığa duyarlı olduğu için testin karanlık ortamda gerçekleştirilmesi gerekmektedir bu nedenle 96 kuyucuklu plaka alüminyum folyoya sarılmıştır. Aynı plakada eş zamanlı olarak farklı kuyucuklarda sadece hücreler (negatif kontrol) ve DMSO ile muamele edilen hücreler (pozitif kontrol) için de MTT testi uygulanmıştır. 2 saat inkübasyonun ardından tekrar hücre vasatı atılmış ve kuyucuklara 100 µl izopropanol eklenmiştir. Eklenen alkolün hücresel aktiviteyi dolayısı ile MTT tuzunun indirgenme reaksiyonunu durdurması için 5 dakika beklenmiş ve tuzun indirgenmesine bağlı olarak sarı rengin mor renge dönüşümü ELISA plak okuyucu (BioTek Power-Wave XS2, Amerika) yardımıyla kolorimetrik olarak ölçülmüştür. Ölçümler 570 nm dalga boyunda kuyucuklardan absorbans alınarak yapılmıştır. Sadece hücrelerin olduğu (steril yama kesitleri ya da DMSO ile etkileştirilmemiş) negatif kontrol grubunda belirlenen optik yoğunluk (OD) değerinin %100 hücre canlılığını temsil ettiği kabul edilerek (referans alınarak) diğer kuyucuklardaki % canlılık değerleri formül 3.4 yardımıyla hesaplanmıştır. Formül 3.4'te belirtilen OD_{ölçülen} ve OD_{negatif kontrol} ifadeleri sırasıyla % hücre canlılığı değeri hesaplanmak istenen kuyucuğun optik yoğunluk değeri ile negatif kontrol grubuna ait kuyucuğun optik yoğunluk değerlerini temsil etmektedir. Ölçümler her bir grup için 10 farklı kuyucukta tekrar edilerek hesaplanan % canlılık değerleri standart sapmaları ile birlikte Çizelge 4.2 ve Şekil 4.11'de verilmiştir.

$$\text{Canlılık değeri (\%)} = (\text{OD}_{\text{ölçülen}} / \text{OD}_{\text{negatif kontrol}}) \times 100 \quad (3.4)$$

Apoptotik-Nekrotik Etkilerin Değerlendirilmesi

Apoptoz, çok hücreli canlılarda bölünme ile artan hücre sayısını dengelemek için devreye giren programlı ve kontrollü fizyolojik bir süreçtir. Hücre topluluğunun bulunduğu ortamda bir hücreye artık ihtiyaç duyulmuyor ise hücreler arası biyokimyasal haberleşme mekanizması ile hücrenin kontrollü ölüm süreci başlamaktadır. Fakat hücre geri dönüşü olmayacak ölçüde hasar görmüşse ani hücre

ölümü gerçekleşir. Bu sürece ise nekroz adı verilmektedir. Apoptoz sinyali alındıktan sonra hücrelerde çeşitli biyokimyasal ve morfolojik değişimler meydana gelir. Ortamda bulunan apoptotik ve nekrotik hücreler spesifik değişiklikleri temel alan bazı teknikler kullanılarak birbirlerinden ayırt edilebilmektedir (Güler ve Eren, 2008; Polat, 2013). İkili boyama tekniği (Double Stain) aynı ortamda bulunan apoptotik ve nekrotik hücrelerin ayrı ayrı tespit edilmesinde kullanılan bir yöntemdir. Çalışmada apoptotik ve nekrotik hücreler, double stain yöntemi (%1 Propidyum iyodür, %1 Ribonükleaz A, %5 Hoechst) ile tespit edilmiştir. Hoechst ortamda bulunan canlı ve apoptotik hücre çekirdeklerini maviye boyar. Apoptotik hücrelerde renk yoğunluğu fazladır. PI ise nekrotik hücre çekirdeklerini kırmızı renge boyar (Güleş ve Eren, 2008). Bu boyalar hücrelerdeki DNA'ya bağlanarak floresan mikroskopunda farklı dalga boyları altında (Hoechst:350 nm, PI:535 nm) incelenmektedir (Polat, 2013). İkili boyama karışımında bulunan Ribonükleaz A ise sitoplazmik RNA'yı parçalayan enzimdir. Hücre ortamında spesifik olmayan Hoechst-RNA ve PI-RNA etkileşimlerini engellemek amacı ile kullanılır. Çalışmada kardiyak yamalar ile belirli bir süre etkileştirilen insan kardiyomiyosit hücreleri (Promocell, C-12810, Almanya) ikili boyama tekniği ile boyanarak malzemenin hücreler üzerindeki apoptotik/nekrotik etkileri incelenmiştir. İlk olarak insan kardiyomiyosit hücreleri uygun besi yeri ortamında (%1 penisilin, %20 Fetal Bovine Serum (FBS) ve DMEM) 37°C sıcaklıkta % 5CO₂ ve % 6 O₂ ortamında etüv içerisinde inkübe edilerek çoğaltılmıştır. Çalışmada 48 kuyucuklu plaka (48-well plate) kullanılmış ve her bir kuyucuğa 1x10⁵ hücre gelecek şekilde hücre ekimi yapılmıştır. Hücrelerin kuyucuklarda tutunması ve çoğalması için tekrar 24 saat 37°C sıcaklıkta %5 CO₂ ve %6 O₂ içeren nemli ortamda etüv içerisinde inkübe edilmiştir. Sonrasında hücre vasatı atılarak 0.75 cm çaplı dairesel steril yama kesitleri kuyucuklara tek tek yerleştirilmiştir. Yama kesitleri her iki yüzeyi 10'ar dakika UV ışınına maruz bırakılarak sterilize edilmiştir. Yama kesitlerinin yerleştirilmesinin ardından her kuyucuğa tekrar 200 µl besiyeri eklenerek bir gece daha 37°C sıcaklıkta %5 CO₂ ve %6 O₂ içeren nemli ortamda etüv içerisinde inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından kuyucuklarda bulunan hücre vasatı alınarak yüzeye tutunmuş olan hücreler ikili boyama tekniği ile boyanmıştır. Deneyde kullanılan boya ışığa duyarlı olduğu için çalışma karanlık ortamda gerçekleşmiştir. Kuyucuklardaki hücreler üzerine 70 µl Double Stain boyası ilave edilmiş ve boya damlatıldıktan sonra 48 kuyucuklu plaka alüminyum folyoya sarılarak hücreler boya ile etüv içerisinde 15 dakika etkileştirilmiştir. İnkübasyonun ardından steril yama kesitlerinin hücreler üzerindeki apoptotik/ nekrotik

etkilerini incelemek üzere kuyucuklardaki hücreler 20x floresan mikroskobu (Inverted Microscope, Leica DM6000B, Almanya) altında fotoğraflanmıştır (Şekil 4.13, Şekil 4.14, Şekil 4.15, Şekil 4.16). Aynı plakada eş zamanlı olarak farklı kuyucuklarda sadece hücreler (negatif kontrol) ve DMSO ile muamele edilen hücreler (pozitif kontrol) için de ikili boyama yapılarak hücreler 20x floresan mikroskop altında fotoğraflanmıştır (Şekil 4.12). Kuyucuklardan alınan floresan mikroskop fotoğraflarından sağlıklı, apoptotik ve nekrotik hücreler sayılarak % apoptoz ve % nekroz değerleri hesaplanmıştır (Çizelge 4.2, Şekil 4.11).

Kardiyak Yama-Hücre Etkileşimlerinin İncelenmesi

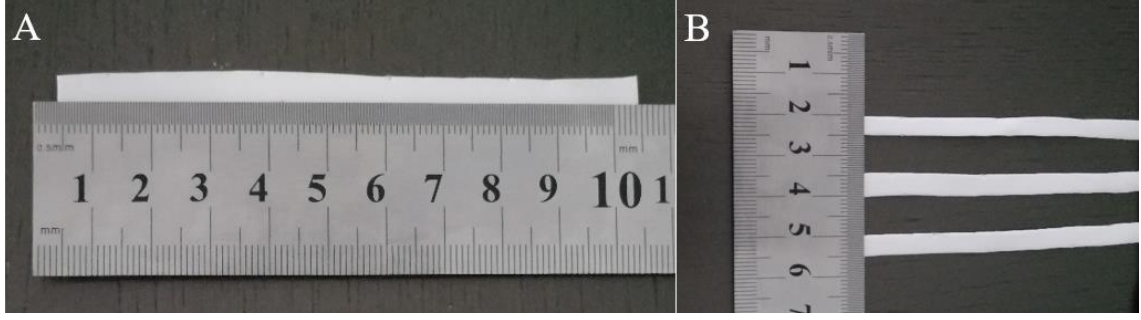
Çalışma kapsamında üretilen kardiyak yamaların (%0.00, %0.03, %0.06, %0.19) yüzeylerine insan kardiyomiyosit hücrelerinin adhezyonu, yama yüzeylerine hücre ekimi gerçekleştirilerek hücreler ile yamaların inkübasyonu sonrasında yama yüzeylerinden SEM (JEOL JSM-5600 SEM, İngiltere) görüntüleri alınarak incelenmiştir (Şekil 2.17, Şekil 2.18). İlk olarak hücreler uygun besi ortamı (%1 penisilin, % 20 Fetal Bovine Serum, DMEM) içerisinde 37°C sıcaklıkta %5 CO₂ ve %6 O₂ içeren nemli ortamda etüv içerisinde inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından kültür kabındaki hücre vasatı atılarak ortam tampon çözelti ile (PBS) yıkanmıştır. Sonrasında hücreler tripsin-EDTA (% 0.25 Tripsin, % 0.02 EDTA) ile muamele edilerek yüzeyden kaldırılmıştır. Süspansiyon haline gelen hücreler tripan mavisi ile boyanarak hücre-boya karışımı hücre sayım kaseti (EVE cell counting slide) içerisine alınarak hücre sayım cihazına (Invitrogen Countess Automated Cell Counter, Kore) yerleştirilmiş ve otomatik hücre sayımı yapılmıştır. Hücreler çoğaltıldıktan sonra 24 kuyucuklu plakaya (24-well plate) her bir kuyucukta 5×10^5 hücre olacak şekilde ekilmiştir. Hücrelerin kuyucuklarda tutunması ve çoğalması için tekrar 24 saat 37°C sıcaklıkta %5 CO₂ ve %6 O₂ içeren nemli ortamda etüv içerisinde inkübe edilmiştir. Sonrasında hücre vasatı atılarak 0.75 cm çaplı dairesel steril yama kesitleri kuyucuklara tek tek yerleştirilmiştir. Yama kesitleri her iki yüzeyi 10'ar dakika UV ışınına maruz bırakılarak sterilize edilmiştir. Yama kesitlerinin yerleştirilmesinin ardından her kuyucuğa tekrar 200 µl besiyeri eklenerek 48 saat 37°C sıcaklıkta %5 CO₂ ve %6 O₂ içeren nemli ortamda etüv içerisinde inkübe edilmiştir. 2 günlük inkübasyon süresi sonunda 48 kuyucuklu plaka etüvden alındı ve kuyucuklardaki hücre vasatı atıldı. Kardiyak yama kesitlerinin SEM görüntülerinin alınabilmesi için kardiyak yamalar 48

kuyucuklu plaka içerisinde kurumaya bırakıldı. Kurutulan yama kesitlerinden küçük parçalar kesilerek SEM platformuna sabitlendi ve 15 dakika boyunca kaplama cihazında (Polaron, Sputter Coater, ABD) vakum altında paladyum ile kaplandı. Kaplanan yama parçalarının yüzeylerinden taramalı elektron mikroskobu (JEOL JSM-5600 SEM, İngiltere) ile farklı büyütme oranlarında görüntüler alınarak yama yüzeylerindeki hücreler incelenmiştir (Şekil 2.17, Şekil 2.18).

Mekanik Dayanıklılık

Kalbimiz üç boyutlu bir yapıya sahiptir dolayısıyla kalbi oluşturan kasların kalp krizi sonrası hasar görmesine bağlı olarak hasarlı bölgeye implante edilmek üzere tasarlanan bir destek malzemesinin, kalbin o bölgedeki yüzeyel şeklini alabilmesi ve atım esnasında kalbin boşalması ve tekrar kanla dolmasıyla kasılıp gevşeyen kasların esnekliğini taklit edebilmesi önemlidir. Bu nedenle üretilen kalp yamalarının esnekliği (elastikiyet modülü) standart çekme-uzama testleri yapılarak değerlendirilmiştir. Malzemelerin elastikiyeti, çekmeye karşı gösterdiği birimsel uzamanın bir sonucudur ve elastik uzamanın uygulanan çekme kuvvetiyle malzemenin deformasyona uğramaya başladığı ana kadar olduğu bilinmektedir (Zahedi ve ark., 2010).

Üretilen kardiyak yamalardan (%0.00, %0.03, %0.06, %0.19 w/w) standart boyutlarda (5 mm x 10 cm) şeritler alınarak (Şekil 3.6) çekme test cihazında (CellScale, Kanada) (Şekil 3.7) 50 mm/dakika hızda oda sıcaklığında 50 N kuvvet uygulanmış ve uygulanan çekme kuvvetine (stress) karşı % uzama miktarları (strain) ölçülerek, yamaların kopma uzaması (elongation at break), kopma dayanıklılığı (ultimate tensile stress), esneklik sınırı (yield point) ve elastisite modülü (Young's Modulus) hesaplanmıştır (Çizelge 4.3). Polimerik yamaların kalınlığı ~0.4 mm'dir. Her bir yama için 3 farklı şerite çekme-uzama testi yapılarak ortalama değerler hesaplanmıştır.



Şekil 3.3. Mekanik test için hazırlanan yama şeritleri. A: kesit boy, B: kesit en.



Şekil 3.4. Çekme test cihazı aşamaları.

Kardiyak Yamaların İletkenlik Ölçümü

Kardiyak kalp kası hücreleri (kardiyomiyositler) kalp kası (miyokard) boyunca elektrik sinyallerini kullanarak bir atım gerçekleştirir. Sağlıklı bir yetişkin kalbinden her atımda 1.25 Hz frekansa sahip 5V/cm değerinde bir akım geçer. O nedenle kalp krizi sonrası hasar görmüş kalp kaslarına destek olmak üzere tasarlanan kardiyak doku iskelelerinin kalbin üzerinden geçen akımı ileterek kalp kasına fonksiyonel açıdan benzemesi (biyomimetik) istenir. Dolayısı ile kardiyak yama iskelelerinde aranan bir diğer özellik ise malzemenin iletkenliğidir (Kitsara ve ark., 2017). Üretilen kardiyak yamaların (%0.00, %0.03, %0.06, %0.19) iletkenlik değerleri 4 nokta prob tekniği kullanılarak ölçülmüştür (Baei ve ark., 2016). Bu teknik temel olarak uzun ve ince film şeklindeki malzemelerin elektriksel direncini ölçmektedir. Elektriksel direnç iletkenliğin tersidir ($R=1/L$). Malzeme yüzeyine yerleştirilen 4 farklı elektrot vardır. Bu elektrotlardan ikisi malzeme yüzeyinden geçen akımı (I) diğer ikisi de malzeme üzerinde seçilen iki nokta arasındaki potansiyel farkı (V) ölçmek için kullanılır. Böylece potansiyel fark (V) akıma (I) oranlanarak malzemenin yüzey direnci $\rho=(\pi/\ln 2) \times (V/I)=4.53(V/I)$ hesaplanabilir. Malzeme direnci (R), yüzey direncinin (ρ) ölçüm alınan iki nokta arasındaki mesafeye (L) çarpılıp malzeme kalınlığı (t) ve genişliğinin (W) çarpımına

bölünmesiyle hesaplanabilir $[R=(\rho \times L)/(t \times W)]$. Hem kuru hem de ıslak yamaların iletkenlik değerleri (S/m) oda sıcaklığında ölçülmüştür (Çizelge 4.4). Kardiyak yamaların yaş ölçümlerinde ıslatma ortamı olarak fosfat tampon çözeltisi (PBS, pH 7.4) kullanılmıştır.

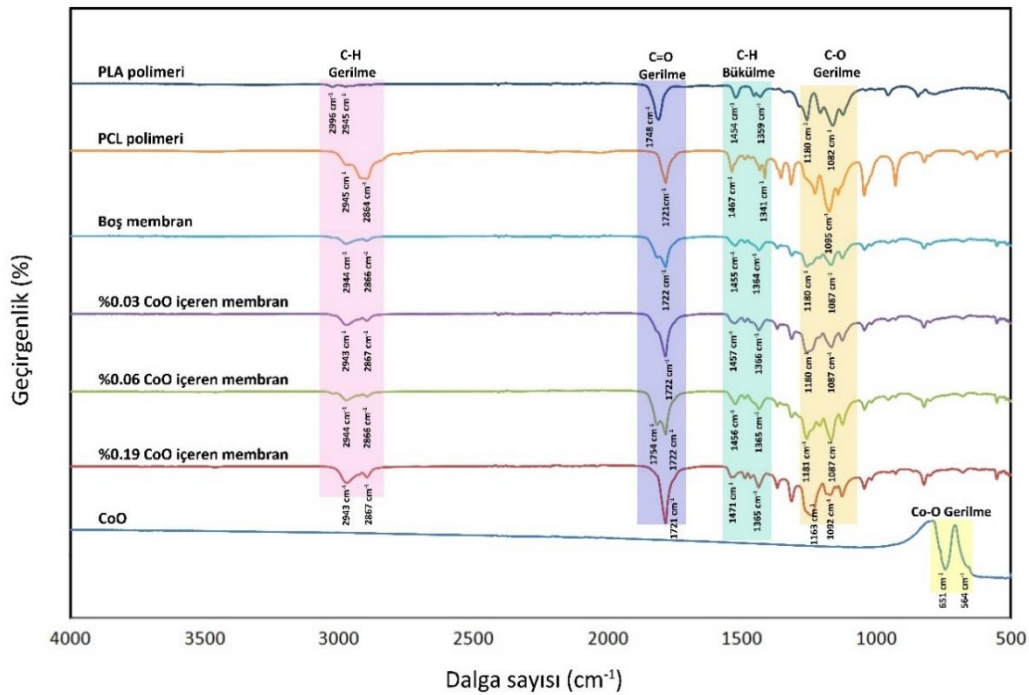


4. BULGULAR ve TARTIŞMA

Sunulan tez çalışması kapsamında üretilen PLA/PCL/CoO kardiyak yamaların (%0.00, %0.03, %0.06, %0.19) kimyasal yapısı, yüzey morfolojisi, yoğunluğu, gözenekliliği, ıslanabilirliği, zamana bağlı kütle kaybı, yamalardan CoO salımı, elastikiyeti, insan kardiyomiyosit (HCM) hücreleri üzerindeki olası toksik, apoptotik, nekrotik etkileri, HCM hücreleri ile etkileşimi ve iletkenliği çeşitli *in vitro* testler ile karakterize edilerek, elde edilen bulgular literatür ışığında değerlendirilmiştir.

4.1. Kimyasal Yapı Analizi (FTIR)

Yama üretiminde kullanılan polimerlerin (PLA ve PCL), CoO nanopartiküllerin ve ağırlıkça farklı oranlarda CoO içeren (%0.00, %0.03, %0.06, %0.19) PLA/PCL/CoO kardiyak yamaların ayrı ayrı FTIR spektrumları alınarak polimerlerin elektro-eğirme esnasında yüksek voltaj altında çözücü ile etkileşimleri sonucu kimyasal yapılarında herhangi bir değişim olup olmadığı karşılaştırmalı olarak incelenmiştir (Şekil 4.1).



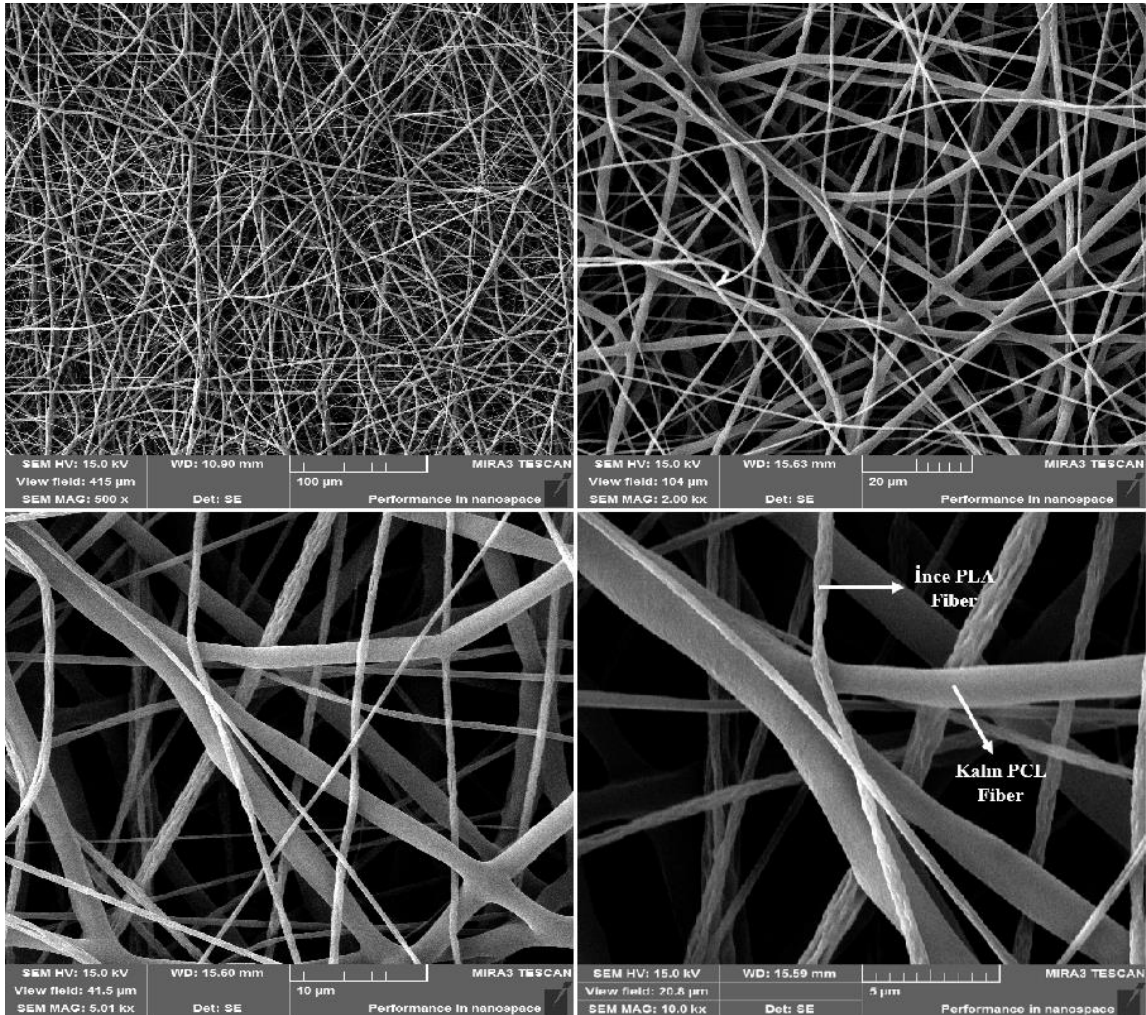
Şekil 4.1. PLA ve PCL polimerleri, farklı oranlarda (%0.00, %0.03, %0.06, %0.19 a/a) CoO içeren PLA/PCL kardiyak yamalar ve CoO nanopartikülüne ait FTIR spektrumları.

Şekil 4.1'de PLA polimerine ait FTIR spektrumu incelendiğinde C-H gerilme pikleri 2996 cm^{-1} ve 2945 cm^{-1} dalga sayılarında, C-H bükülme pikleri ise 1454 cm^{-1} ve 1359 cm^{-1} dalga sayılarında görülmektedir. 1180 cm^{-1} ve 1082 cm^{-1} dalga sayılarında ise PLA polimerine ait C-O gerilme pikleri görülmektedir. PLA polimerinin yapısında bulunan karbonil gruplarından kaynaklı polimere spesifik C=O gerilme piki ise 1748 cm^{-1} dalga sayısında tek ve şiddetli bir pik vermiştir. Şekil 4.1'de PCL polimerine ait FTIR spektrumu incelendiğinde C-H gerilme pikleri 2945 cm^{-1} ve 2864 cm^{-1} dalga sayılarında, C-H bükülme pikleri ise 1467 cm^{-1} ve 1341 cm^{-1} dalga sayılarında görülmektedir. 1095 cm^{-1} dalga sayısı civarında görülen pikler ise PCL polimerine ait C-O gerilme pikleridir. PCL polimerinin yapısında bulunan karbonil gruplarından kaynaklı polimere spesifik C=O gerilme piki ise 1721 cm^{-1} dalga sayısında tek ve şiddetli bir pik olarak görülmektedir. PLA ve PCL polimerine ait C-H gerilme, C-H bükülme ve C-O gerilme titreşimlerinin FTIR spektrumlarında birbirine yakın farklı dalga sayılarında farklı pikler vermesi ve pik yarılmaları, farklı C-H ve C-O gruplarının yapı içerisinde farklı karbonlara bağlı olmasından dolayı farklı titreşmelerinden kaynaklanmaktadır. Şekil 4.1'de CoO nanopartikülü içermeyen PLA/PCL membranlara ait FTIR spektrumları incelendiğinde PLA ve PCL polimerine ait spesifik pikler benzer dalga sayılarında görülmektedir. Özellikle C=O gerilme pikinin iki polimere ait FTIR spektrumlarında farklı dalga sayılarında görünmesi nedeniyle bu polimerlerin bir arada bulunduğu kardiyak yamalara ait FTIR spektrumlarında C=O gerilme piki tek bir pik yerine 1722 cm^{-1} dalga sayısı civarında ikiye yarılmış geniş bir pik şeklinde görülmektedir. Ağırlıkça %0.00, %0.03 ve %0.06 oranında CoO içeren PLA/PCL kardiyak yamalarda PLA ve PCL polimerlerine spesifik C=O gerilme pikleri yarılmış geniş bir pik şeklinde görülürken, ağırlıkça %0.19 oranında CoO nanopartikülü içeren yamada aksine bu pikler üst üste gelerek daha şiddetli tek bir pik oluşmasına neden olmuşlardır. Şekil 4.1'de sadece CoO nanopartikülü için alınan FTIR spektrumu incelendiğinde Co-O gerilme pikleri 651 cm^{-1} ve 654 cm^{-1} dalga sayısında görülmektedir. CoO içeren yamalardan alınan FTIR spektrumlarında bu dalga sayılarında belirgin pikler görülmemesinin nedeni CoO nanopartikülünün kardiyak yama yapısında ağırlıkça oldukça küçük yüzdelerde (%0.03, %0.06, %0.19) bulunmasından kaynaklanmaktadır. PLA ve PCL polimerine ait şiddetli spesifik pikler Co-O gerilme piklerinin bağıl olarak çok küçük olmasına dolayısı ile CoO/PLA/PCL yamaların FTIR spektrumlarında görülememektedir.. Sonuç olarak PLA ve PCL

polimerlerinin çözücü ile etkileşimleri ve çözeltilerinin yüksek voltaj altında elektro-eğirilmesi kimyasal yapılarında herhangi bir değişikliğe neden olmamıştır.

4.2. Yüzey Morfolojisi (SEM)

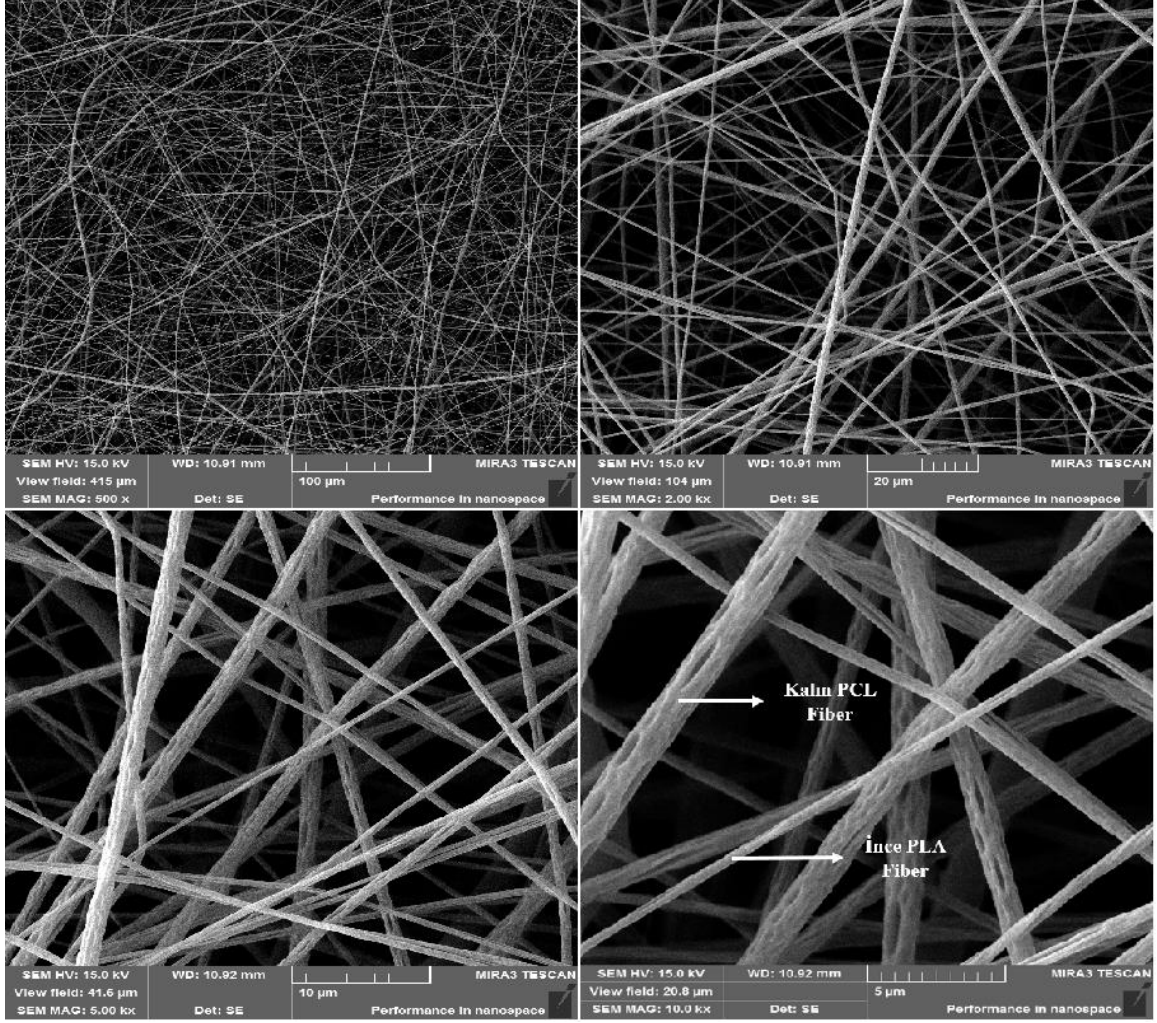
Sunulan tez çalışması kapsamında üretilen polimerik kardiyak yamaların yüzey morfolojisi ve fibröz yapısı farklı büyütmelerde (100 μm , 20 μm , 10 μm , 5 μm) taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüleri alınarak incelenmiştir. Ağırlıkça %0.00, %0.03, %0.06, %0.19 oranlarında CoO nanopartikül içeren kardiyak yamalara ait SEM görüntüleri sırasıyla Şekil 4.2, Şekil 4.3, Şekil 4.4 ve Şekil 4.5'te verilmiştir.



Şekil 4.2. CoO içermeyen PLA/PCL kardiyak yamaların SEM görüntüleri (ölçek sırasıyla 100 μm , 20 μm , 10 μm , 5 μm).

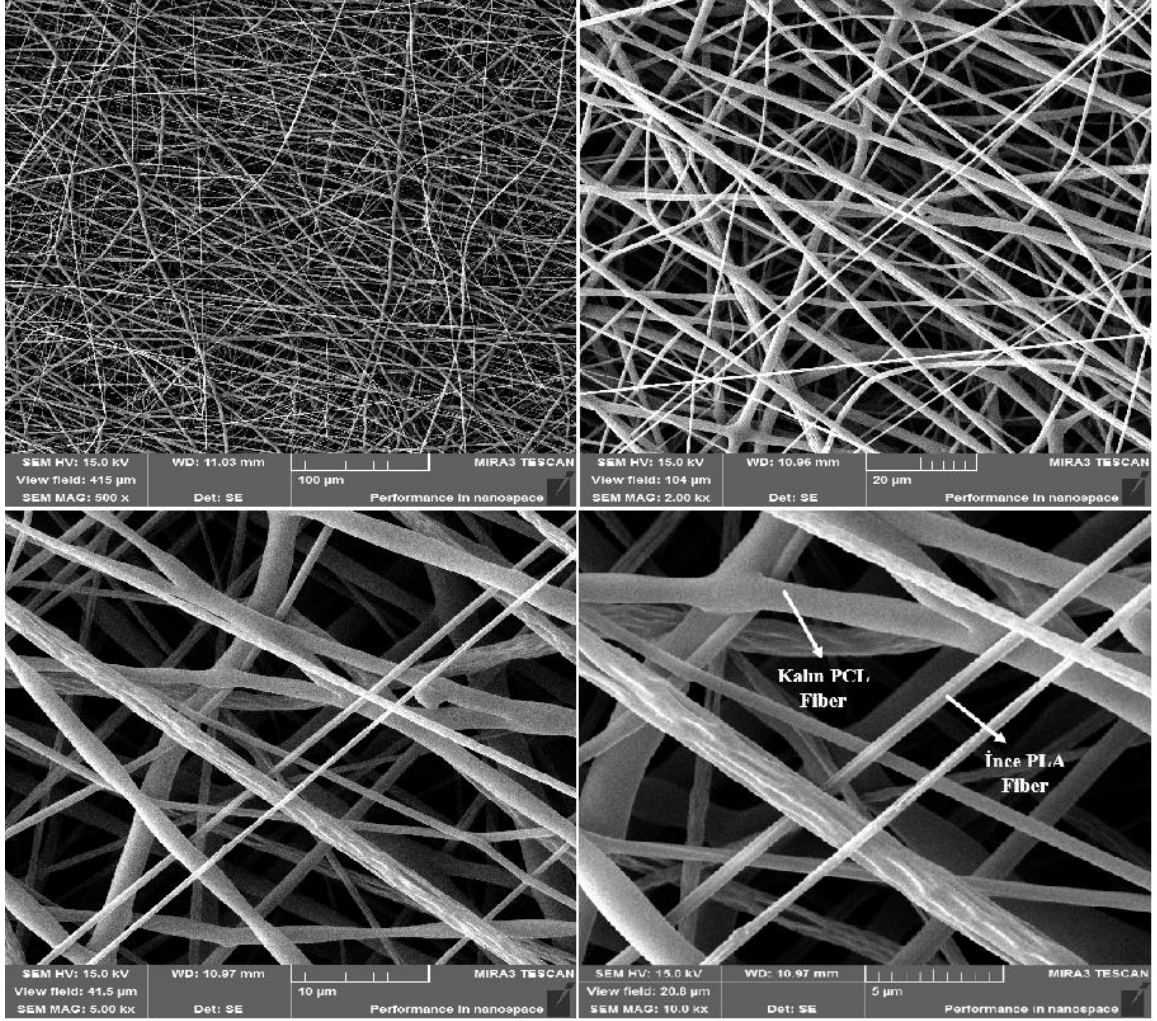
Şekil 4.2'de CoO nanopartikülleri içermeyen PLA/PCL kardiyak yamaların kısmen yönlendirilmiş fiberlerden oluşan farklı büyütmelerdeki SEM görüntüleri verilmiştir. Düşük

akış hızlarında fiberler toplayıcı yüzeyinde birikerek çoğalır. Çalışmada akış hızı ve döner toplayıcının açılma hızı fiberlerin birikmeden sarılarak toplanmasını sağlayacak şekilde bir seri denemeler yapılarak ayarlanmıştır. Bunun nedeni hem mekanik özellikleri iyileştirmek hem de kalp kasının fibröz yapısını taklit etmek amacıyla fiberleri yönlendirmektir. Karşılıklı eğirmede fiberler birbirleri ile henüz toplayıcıya ulaşmadan havada çarpışabilmekte ve toplayıcı üzerinde benzer çözücülerde çözünebildikleri için çözücünün hemen tam uçmaması sebebiyle temas noktalarında bağlantılar kurabilmektedirler. Bu durum mekanik özellikleri iyileştirir ve hücreler arası matriksin taklit edilebilmesini kolaylaştırır. Ancak fiberlerin tam olarak belirli bir doğrultuda yönlendirilmesini zorlaştırır. Çalışmada karşılıklı eğirmenin yarattığı zorluklara rağmen fiberlerin genel olarak doğrusal olmaları ve toplayıcı yüzeyinde birikim yapmadan belirgin bir doğrultuda olmasa da kısmen yönlendirilmeleri sağlanabilmiştir. 5 µm ölçekli SEM görüntüsünde ise PCL fiberlerin PLA fiberlere göre daha kalın olduğu görülmektedir. Polimer çözeltisinin akış hızının artması lif çapında artışa neden olur. Aynı zamanda çözeltinin konsantrasyonu ve viskozitesi arttıkça fiber çapı da artmaktadır. Bununla birlikte polimer çözeltisinin iletkenliğinin ve toplayıcı ile iğne ucu arasındaki mesafenin artması fiber çapını daraltır. PLA ve PCL fiberlerin farklı kalınlıklarda olması PLA ve PCL polimer çözeltilerinin ayrı ayrı şırıngalardan karşılıklı olarak farklılıklar gösteren elektro-eğirme koşullarında eğirilmelerinden kaynaklanmaktadır. Yine PLA ve PCL polimerlerinin kimyasal yapılarının farklı olması çözeltilerinin de iletkenlik, akışkanlık vb. özelliklerinin farklı olmasına neden olur. Bu nedenle aynı potansiyel fark altında, aynı sıcaklık ve neme sahip ortamda, yakın akış hızlarında, eş-zamanlı eğirilmelerine rağmen fiberlerin yüzey özelliklerinde farklı olmasına sebep olmuştur. Biyomalzemelerin pürüzlü yüzeylere sahip olması hücre adhezyonunu kolaylaştırmaktadır. Ayrıca fiberler arasında kalan boşlukların mikron seviyelerde olması yine mikron boyutlarda olan HCM hücrelerinin fiberler arasına girerek biyomalzeme ile etkileşimini kolaylaştırmıştır. Tez çalışması kapsamında yapılan *in-vitro* hücre kültür çalışmalarında hücreler ile inkübe edilen yamalarından inkübasyon sonrası yüzeylerinden alınana SEM görüntülerinde HCM hücrelerinin 48 saat gibi kısa bir sürede fiberler arasına yerleştiklerini göstermektedir (Şekil 4.18, Şekil 4.19).



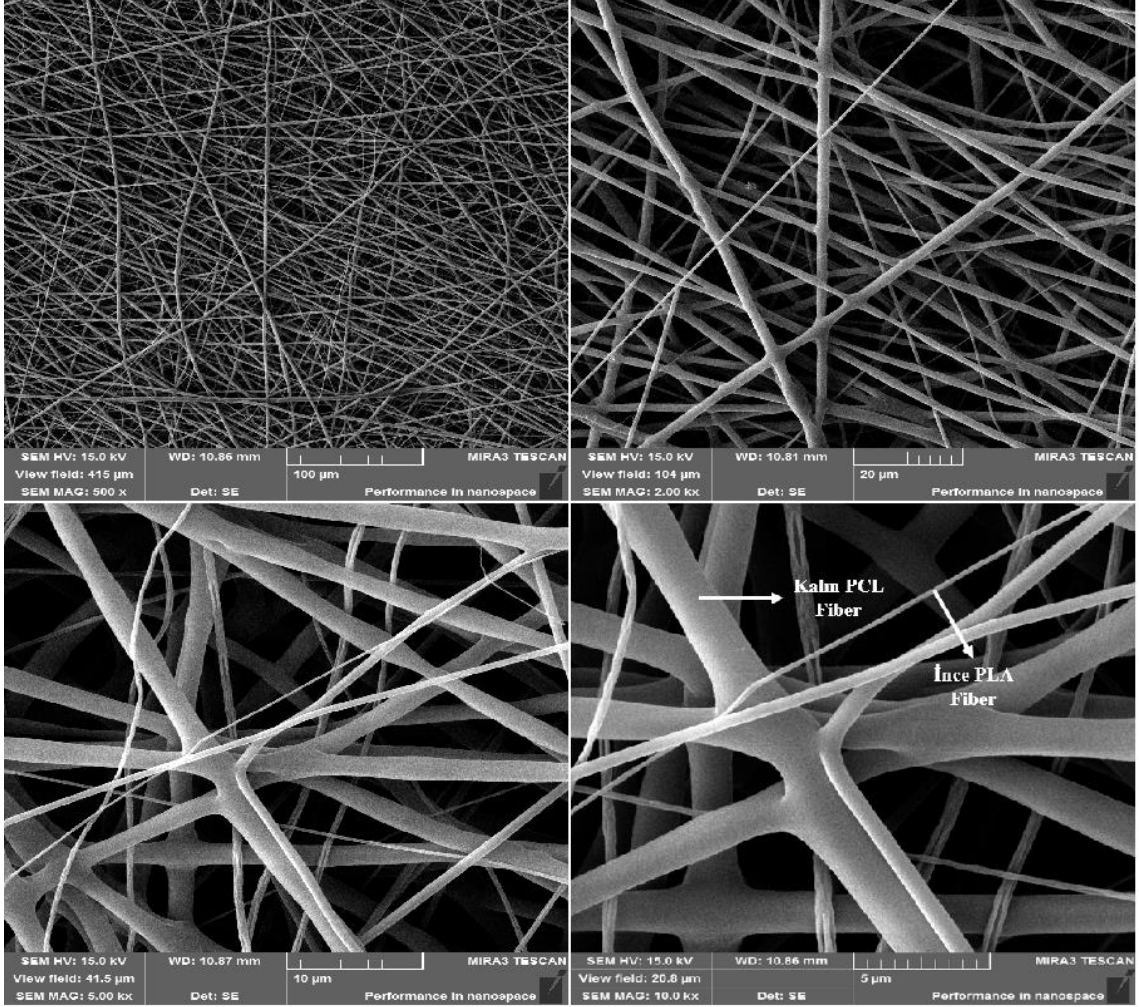
Şekil 4.3. % 0.03 (a/a) CoO nanopartikül içeren CoO/PLA/PCL kardiyak yamaların SEM görüntüleri (ölçek sırasıyla 100 µm, 20 µm, 10 µm, 5 µm).

Şekil 4.3'deki SEM görüntüleri incelendiğinde 100 µm ölçekli görüntüde ağırlıkça % 0.03 oranında CoO nanopartikülleri içeren CoO/PLA/PCL kardiyak yamaların fibröz yapısı genel olarak görülmektedir. Genel görüntü Şekil 4.2 ile benzerdir ancak 5 µm ölçekli görüntüde Şekil 4.2'den farklı olarak polimerik yama yapısına CoO nanopartiküllerin dahil edilmesiyle birlikte kalın PCL fiberlerinde yüzey pürüzlülüğünün belirgin şekilde arttığı görülmektedir. CoO nanopartikülleri polimer çözeltilerinin iletkenliğini ve akışkanlığını etkilemiştir. Bu etkilerin sonucu olarak fiber morfolojisi ve yüzey pürüzlülüğü biraz değişmiştir. Ancak yapıya CoO nanopartiküllerinin ağırlıkça %0.03 oranında eklenmesi genel olarak fiberlerin toplayıcı yüzeyine sarınmasını engellememiş, yığılarak toplayıcı yüzeyinde birikmesine neden olmamıştır.



Şekil 4.4. % 0.06 (a/a) CoO nanopartikül içeren CoO/PLA/PCL kardiyak yamaların SEM görüntüleri (ölçek sırasıyla 100 µm, 20 µm, 10 µm, 5 µm).

Şekil 4.4'deki SEM görüntüleri incelendiğinde de 100 µm ölçekli görüntüde ağırlıkça % 0.06 oranında CoO nanopartikülleri içeren CoO/PLA/PCL kardiyak yamaların fibröz yapısı genel olarak görülmektedir. Genel görüntü Şekil 4.2 ve Şekil 4.3 ile benzerdir. Ancak fiberlerin toplayıcı yüzeyinde biraz daha hizalı biriktiği, kısmi yönlenmenin daha iyi olduğu söylenebilir. 5 µm ölçekli SEM görüntüsü incelendiğinde Şekil 4.3 ile benzer şekilde fiber yüzeylerinde belirgin pürüzlülükler olmakla birlikte PCL fiberlerde bu pürüzlülüğün çok az azaldığı söylenebilir.



Şekil 4.5. % 0.19 (a/a) CoO nanopartikül içeren CoO/PLA/PCL kardiyak yamaların SEM görüntüleri (ölçek sırasıyla 100 μ m, 20 μ m, 10 μ m, 5 μ m).

Şekil 4.5'de CoO nanopartikülleri içermeyen PLA/PCL kardiyak yamaların farklı büyütme ölçeklerindeki SEM görüntüleri verilmiştir. 100 μ m ölçekli genel görüntü Şekil 4.2, Şekil 4.3 ve Şekil 4.4'deki 100 μ m ölçekli genel görüntü ile benzerdir. Ancak 5 μ m ölçekli görüntü incelendiğinde PLA ve PCL fiberlerin temas noktalarında daha belirgin bağlantılar oluşturduğu görülmektedir.

4.3. Yoğunluk ve Gözeneklilik

Elektro-eğirme tekniğinin sağladığı en önemli avantajlardan biri, gözenekli yapı ve yüksek yüzey/hacim oranıdır. Membran yapısını oluşturan bileşenlerin miktarı ve yapısı, elektro-eğirme çözeltisinin konsantrasyonu, akışkanlığı, iletkenliği, akış hızı, uygulanan potansiyel fark, şırınga ucu ile toplayıcı arasındaki mesafe, ortam nemi ve sıcaklığı, toplayıcı türü ve hareketli bir toplayıcı ise açılma hızı vb. oluşturulan fiberlerin

kalınlığını, morfolojisini, yoğunluğunu, yüzey pürüzlülüğünü, hizalanmasını, toplayıcı yüzeyindeki birikim şeklini (yığılma, sarılma vb.) etkilemektedir. Dolayısı ise elektro-eğirilmiş fibröz yapıdaki membranların yoğunluğu, spesifik hacmi ve gözenekliliği, membranı oluşturan bileşenler ve fiber morfolojisi ile doğrudan ilişkilidir. Membranlarda oluşturulan gözenekli yapı, membranların şişme (su alma) kapasitelerini, membrandan bir takım ajanların (terapötikler, antibakteriyel ajanlar vb.) salım profilini, hücrelerin membrana tutunma (adhezyon) ve malzeme yüzeyinde çoğalma eğilimini (proliferasyon), mekanik dayanımını, hidrofilik/hidrofobik karakteri etkilemektedir.

Çizelge 4.1'de ağırlıkça %0.00, %0.03, %0.06, %0.19 CoO nanopartikül içeren PLA/PCL kardiyak yamaların sırasıyla yama 0, 1, 2, 3 olarak bileşen yüzdeleri (% a/a), yoğunlukları (g/cm^3), spesifik hacimleri (cm^3/g) ve gözeneklilik (%) değerleri verilmiştir. Ağırlıkça %0.00, %0.03, %0.06, %0.19 CoO nanopartikül içeren PLA/PCL kardiyak yamaların yoğunluk değerleri sırasıyla 0.3083 g/cm^3 , 0.3050 g/cm^3 , 0.3166 g/cm^3 ve 0.3283 g/cm^3 ve spesifik hacim değerleri sırasıyla $3.2435 \text{ cm}^3/\text{g}$, $3.2787 \text{ cm}^3/\text{g}$, $3.1585 \text{ cm}^3/\text{g}$ ve $3.0460 \text{ cm}^3/\text{g}$ 'dir. Membran gözenekliliği ise ağırlıkça %0.00, %0.03, %0.06, %0.19 CoO nanopartikül içeren PLA/PCL kardiyak yamalar için sırasıyla %73.76, %74.10, %73.16 ve %72.40 olarak hesaplanmıştır. CoO içermeyen kardiyak yamanın (yama 0) yoğunluğu düşük dolayısı ile gözenekliliği oldukça yüksektir. Bu elektro-eğirme tekniğinin biyomalzeme üretiminde sunduğu bir avantajdır. Metal oksitin yoğunluğunun polimerlerden çok daha yüksek olmasına rağmen PLA/PCL membran yapısına CoO nanopartiküllerinin ilave edilmesi, hem nanoboyutta olmaları (~50 nm) hem de ağırlıkça çok az yüzdelerde yapıya dahil edilmeleri nedeniyle yoğunluğu, spesifik hacmi ve gözenekliliği neredeyse etkilememiştir. İhmal edilebilir değişimler söz konusudur. SEM görüntülerinde de membran yapısına farklı oranlarda (%0.03, %0.06, %0.19) CoO nanopartikülleri dahil edilmesinin fiberlerin kalınlığını, morfolojisini ve hizalanmasını da minimal seviyelerde etkilediği görülmüştür.

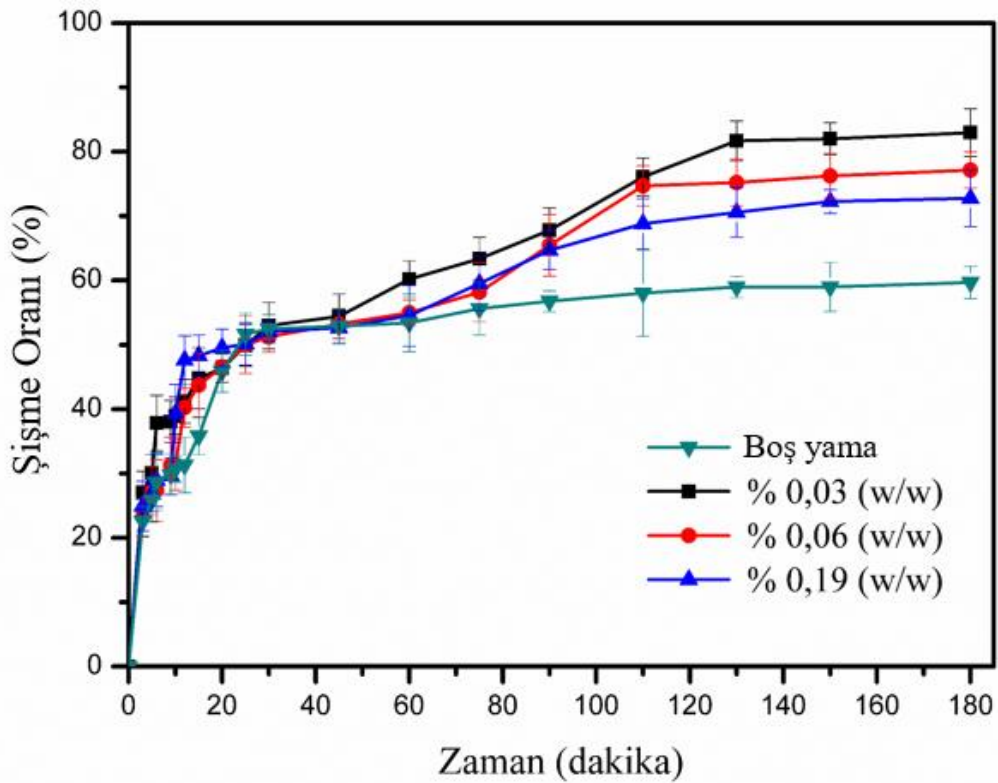
Çizelge 4.1. Ağırlıkça %0.00, %0.03, %0.06, %0.19 CoO nanopartikül içeren PLA/PCL kardiyak yamaların sırasıyla yama 0, 1, 2, 3 olarak ağırlıkça bileşen yüzdeleri (% a/a), yoğunlukları (g/cm³), spesifik hacimleri (cm³/g) ve gözeneklilik (%) değerleri.

Yama	PCL %	PLA %	CoO %	Yoğunluk (g/cm ³)	Spesifik	Spesifik	Gözeneklilik (%)
					Hacim (V ₀) (cm ³ /g)	Hacim (V _m) (cm ³ /g)	
0	68.18	31.82	0.00	0.3083	0.8508	3.2435	73.76
1	68.16	31.81	0.03	0.3050	0.8492	3.2787	74.10
2	68.14	31.80	0.06	0.3166	0.8476	3.1585	73.16
3	68.05	31.76	0.19	0.3283	0.8404	3.0460	72.40

4.4. İslanabilirlik (% şişme oranları)

Kardiyak yamaların kalp dokusu ile bütünleşmesi ve ortama uyum sağlaması açısından ortam sıvılarının emiliminin sağlaması gerekmektedir. Bu nedenle biyomalzemelerin ıslanabilirliği yani su alma kapasitesi *in-vivo* ortamlardaki biyoyumluluğu açısından önemli parametrelerden biridir. Kardiyak yamalardan alınan 7.5 mm çaplı dairesel kesitler (%0.00, %0.03, %0.06, %0.19 a/a) fosfat tampon çözeltisi (37°C, pH 7.4) içerisinde belirli sürelerde bekletilerek % şişme oranları hesaplanmış ve su alma kapasiteleri (ıslanabilirlik) değerlendirilmiştir. Şekil 4.6'da ağırlıkça farklı oranlarda CoO nanopartikülü içeren kardiyak yamaların (%0.00, %0.03, %0.06, %0.19 a/a) zamana bağlı (%) şişme oranları verilmiştir. Yamalar ilk 30 dakika içerisinde hızlı ve benzer bir şişme profili göstermiş ve 30. dakikada ~%50 şişme oranına ulaşmışlardır. CoO nanopartikülü içermeyen kardiyak yama 110. dakikada maksimum su alma kapasitesine ulaşmıştır. Maksimum su alma kapasitesi ~%58'dir. Gözenekli olduğu için kapiler etkiler yardımıyla ağırlığının yarısından fazla sıvı absorblayabilmiştir. Ağırlıkça (w/w) farklı oranlarda (%0.03, %0.06, %0.19) CoO nanopartikülü içeren kardiyak yamalar 150. dakikada maksimum su alma kapasitesi değerlerine ulaşmışlardır, (%)

şişme oranları ise sırasıyla ~%82, ~%76 ve ~%72'dir. CoO nanopartikülü kullanımı ile elektro-spun PLA/PCL yamaların ıslanabilirliği belirgin şekilde artmıştır. Kardiyak yama yapısına CoO nanopartikülünün katılması ile birlikte membran gözenekliliği çok fazla değişmemiştir (Çizelge 4.1). Bu durum genel olarak CoO nanopartikül kullanımıyla beraber fiber yüzeylerinde artan pürüzlülük ile alakalı olabilir. Pürüzlülüğün artması kapiler etkileri iyileştirmiş ve yapı içerisine daha fazla sıvı alınabilmesini sağlamış olabilir. CoO nanopartikülü içeren yamaların maksimum su alma kapasiteleri birbirine oldukça yakın olmakla birlikte yapı içerisinde artan CoO miktarı ile birlikte gözenekliliğin bir miktar değişmesinden kaynaklı olarak kısmen azalmıştır.

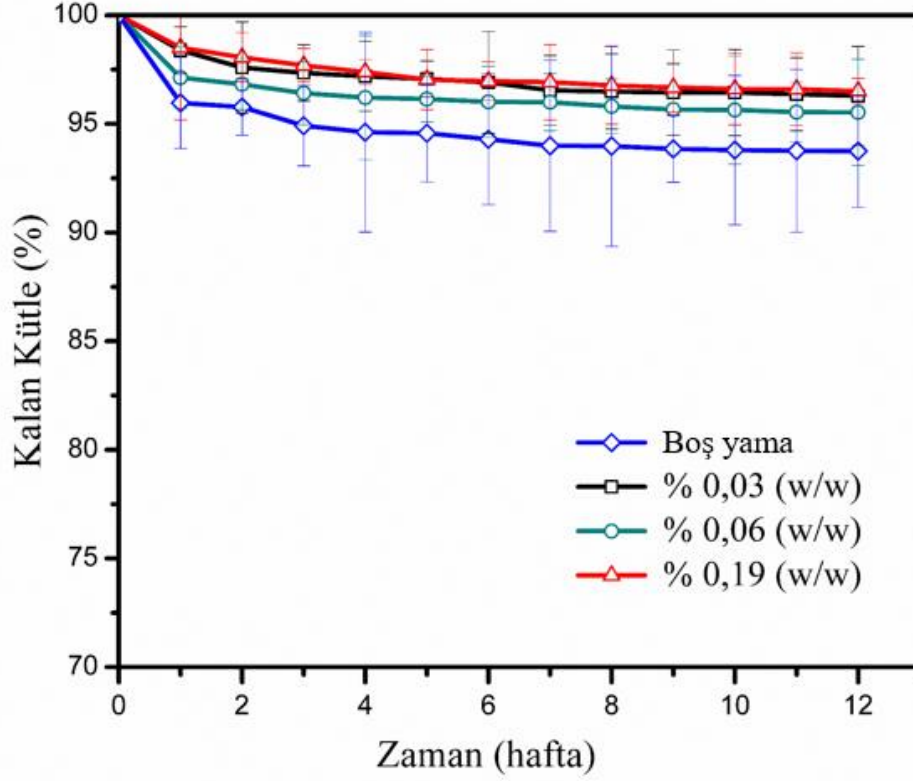


Şekil 4.6. Ağırlıkça (a/a) farklı oranlarda CoO nanopartikülü içeren kardiyak yamaların (%0.00, %0.03, %0.06, %0.19) zamana bağlı % şişme oranları.

4.5. Zamana Bağlı Kütle Kaybı

Kardiyak yamaların yapısında bulunan polimerler biyobozunur olup, belirli bir süre sonra ikinci bir cerrahi operasyon gerektirmeden vücut tarafından emilir. Kalp krizi sonrası hasar görmüş kalp kasının kendini yenileyebilme (rejenerasyon) hızı oldukça

yavaştır. O nedenle kalp kasını desteklemek amacıyla uzun bir süre kalp yamalarının bozunması istenmez. Bozunma polimerik membran yamalarda kütle kaybına neden olur. Dolayısı ile kütle kayıp hızı ile bozunma hızı orantılıdır. Polimerlerin türü, yapısı, molekül ağırlığı ve çevresel faktörler bozunma hızını etkiler. Erken dönemde kalp yamalarının bozunma hızı *in-vitro* koşullarda değerlendirilmiştir. Bu amaçla ilk üç ay için yama kesitleri (2cm x 2cm) PBS çözeltisi (pH 7.4, 37°C) içerisinde bekletilerek % kalan kütle değerleri hesaplanmıştır. Şekil 4.7'de ağırlıkça farklı oranlarda (w/w) CoO nanopartikülü içeren kardiyak yamalardan (%0.00, %0.03, %0.06, %0.19) zamanla (%) kalan kütle miktarları verilmiştir. İlk hafta 3 haftalık sürecin tamamına kıyasla bozunma daha hızlıdır. Ağırlıkça %0.00, %0.03, %0.06, %0.19 CoO nanopartikül içeren PLA/PCL kardiyak yamalar için ilk haftanın sonundaki (%) kalan kütle miktarları sırasıyla %95.96, %98.38, %97.12 ve %98.51'dir. Ancak genel olarak membranlardan kütle kaybı oldukça yavaştır. İlk haftadan sonra membranlar neredeyse sabit bir hızda yavaş yavaş bozunmaktadır. Üç haftanın sonunda ağırlıkça %0.00, %0.03, %0.06, %0.19 CoO nanopartikülü içeren PLA/PCL kardiyak yamalar için (%) kalan kütle miktarları sırasıyla %94.92, %97.34, %96.41, %97.69 ve kaybedilen toplam kütle miktarları sırasıyla % 6,26, % 3,72, % 4,47 ve % 3,49'dur. PCL ve PLA'nın yapısı ve yüksek molekül ağırlıkları (PCL ~80 kDa ve PLA ~260 kDa) nedeniyle beklendiği şekilde erken dönemde polimerik yamaların bozunma profili oldukça yavaştır. Uzun süreli bozunmanın da benzer şekilde çok yavaş olacağı düşünülmektedir.

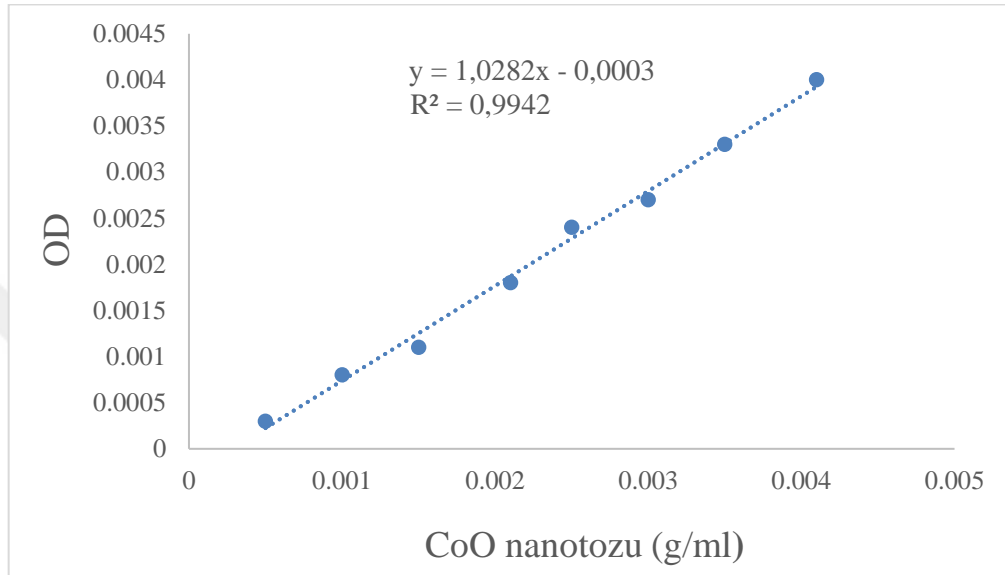


Şekil 4.7. Ağırlıkça (w/w) farklı oranlarda CoO nanopartikülü içeren kardiyak yamalardan (%0.00, %0.03, %0.06, %0.19) zamanla (%) kalan kütle miktarları verilmiştir.

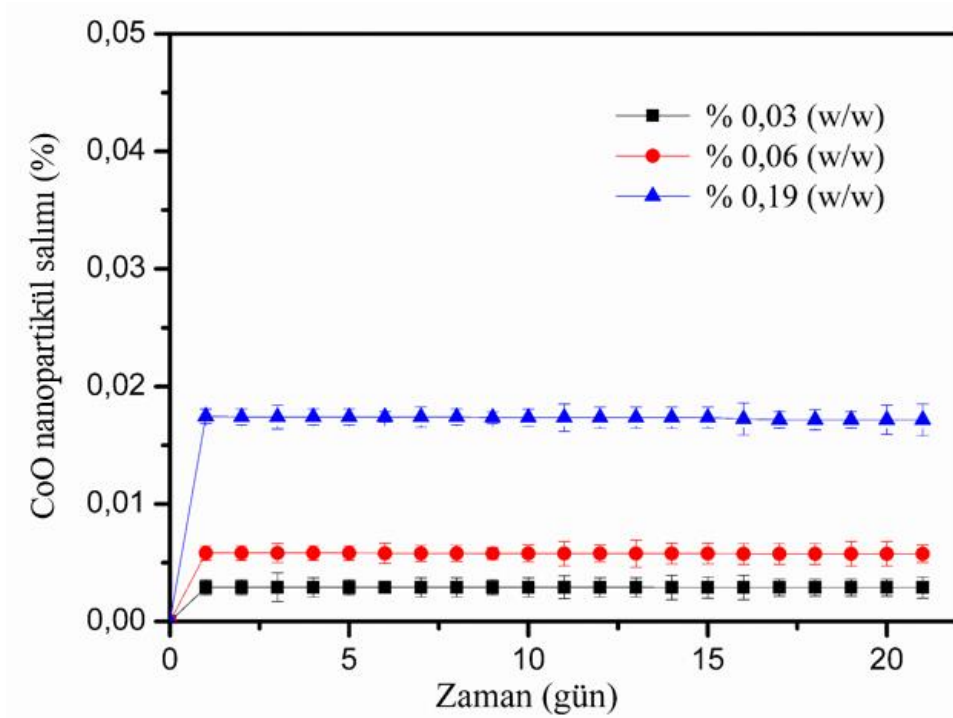
4.6. Kontrollü Salım Çalışmaları

Kardiyak yamaların fibröz yapısını oluşturan fiberlerin içerisine iletkenliği sağlamak amacıyla belirli konsantrasyonlarda (%0.03, %0.06, %0.19 w/w) CoO nanopartikülleri ilave edilmiştir. Partiküller polimerik fiberler içerisine hapsedilmiştir. Fiberlerin yüzeyindeki ve yüzeye yakın yerlerdeki CoO partiküllerinin ortama salınıp salınmadığı üç haftalık ve üç aylık *in-vitro* salım çalışmaları yapılarak değerlendirilmiştir. 7.5 mm çaplı dairesel yama kesitleri 37°C'de PBS çözeltisi içerisinde (pH 7.4) bekletilmiş ve belirli sürelerde kesitler tampon çözelti (PBS) içerisinden alınarak çözelti içerisinde CoO nanopartikülünün varlığı çözeltilerin UV görünür bölge spektrofotometresinde 320 nm dalga boyunda absorbanları alınarak değerlendirilmiştir. İlk olarak belirli konsantrasyonlarda hazırlanmış CoO nanopartikülü içeren PBS çözeltilerinin absorban değerleri alınmıştır. CoO nanopartikülü konsantrasyonlarına (g/ml) karşı alınan absorban değerleri yardımıyla doğrusal bir kalibrasyon grafiği oluşturulmuştur (Şekil 4.8) Daha sonra bilinmeyen konsantrasyonlarda CoO nanopartikülü içermesi olası olan kardiyak yama kesitlerinin belirli sürelerde içerisinde bekletildiği PBS

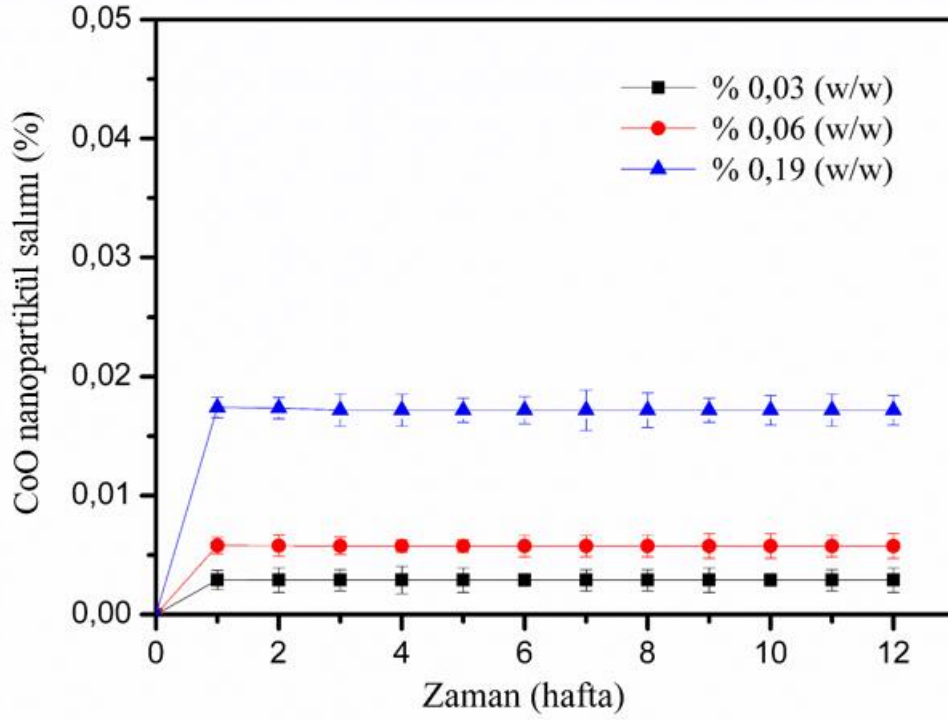
çözeltilerinin absorbasları alınmıştır. Kalibrasyon grafiğinin doğru denklemi $[OD=1.0282 \text{ (Konsantrasyon)}-0.0003]$ kullanılarak çözelti konsantrasyonları hesaplanmıştır. Üç haftalık (Şekil 4.9) ve üç aylık (Şekil 4.10) süreler için zamana karşı CoO nanopartikül konsantrasyonu grafikleri oluşturularak polimerik yamalardan CoO salımı olup olmadığı değerlendirilmiştir.



Şekil 4.8. Belirlenen CoO nanopartikülü konsantrasyonlarına (g/ml) karşı alınan absorbans değerleri yardımıyla oluşturulan doğrusal kalibrasyon grafiği.



Şekil 4.9. Ağırlıkça farklı oranlarda (%0.03, %0.06, %0.19 w/w) CoO içeren kardiyak yamalardan zamana bağlı CoO nanopartikülü salım grafiği (3 hafta).



Şekil 4.10. Ağırlıkça farklı oranlarda (%0.03, %0.06, %0.19 w/w) CoO içeren kardiyak yamalardan zamana bağlı CoO nanopartikülü salım grafiği (3 ay).

21 günlük (Şekil 4.9) ve 12 haftalık (Şekil 4.10) CoO salım grafikleri incelendiğinde membranlardan başlangıçta eser miktarlarda (%0.00-%0.002) salım olduğu söylenebilir. Ancak sonrasında salım grafiklerinin değişmediği dolayısı ile herhangi bir CoO nanopartikülü salımı olmadığı görülmektedir. Eser miktarda salım olduğu durumda yavaş da olsa CoO nanopartikülü salımının devam etmesi beklenirdi. O nedenle hesaplanan eser miktarlardaki CoO nanopartiküllerinin membran yapısından yani hapsedildiği polimerik fiberlerin içerisinden serbestleşerek PBS ortamına salınmadığı düşünülmektedir. CoO/PLA/PCL membranların yüzeyinde eser miktarda CoO nanopartikülü kalmış olabileceği düşünülmektedir. Bu nedenle ilk ölçümlerde çok zayıf absorbanslar alınmış olabilir. Sonuç olarak ilk 3 hafta ve 3 aylık süreçte genel olarak membran yapısından belirgin bir CoO salımının söz konusu olmadığını söylemek mümkündür. Şekil 4.7'deki membranların kütle kaybı grafikleri incelendiğinde polimerik membran yapıdaki bozunmanın da oldukça yavaş olduğu görülmektedir. Kardiyak yamaların olası *in-vivo* kullanımlarında bozunmaya bağlı olarak elbette CoO nanopartikülleri fiber yapıdan serbestleşeceklerdir. Ancak bu salım oldukça yavaş ve eser miktarlarda olacağı için CoO nanopartiküllerinin *in-vivo* toksik etkileri olmayacağı düşünülmektedir. Sunulan tez çalışmasında CoO nanopartikülü içeren kardiyak

yamaların insan kardiyomiyosit hücreleri üzerindeki olası sitotoksik etkileri de *in-vitro* koşullarda değerlendirilmiş ve yamaların hücreler üzerinde her hangi bir sitotoksik, apoptotik, nekrotik etkisi olmadığı görülmüştür (Çizelge 4.2, Şekil 4.11).

4.7. Sitotoksisite /MTT testi

Kardiyak yamaların insan kardiyomiyosit hücreleri (HCM) üzerindeki olası sitotoksik etkileri MTT [3-(4,5-dimethyliazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid] testi yapılarak değerlendirilmiştir. % Çizelge 4.2 ve Şekil 4.11'de pozitif (DMSO) ve negatif (sadece hücreler) kontrol grupları ile ağırlıkça farklı oranlarda %0.00, %0.03, %0.06, %0.19 CoO nanopartikül içeren PLA/PCL kardiyak yamaların sırasıyla kardiyak yama 0, 1, 2, 3 olarak % hücre canlılığı değerleri verilmiştir. Sadece hücrelerin olduğu negatif kontrol grubunun hücre canlılık değeri %100 kabul edilerek diğer gruplar için referans alınmıştır. Hücreler üzerinde toksik etkisi olduğu bilinen DMSO ile mamele edilen grup pozitif kontrol grubu olup hücre canlılığını %20'lere düşürmüştür. Hücre canlılığı herhangi bir faktöre bağlı olarak %50'nin altına düşerse o faktörün sitotoksik olduğu kabul edilir (Demirpolat ve Yerer Aycan, 2016).

CoO nanopartikülü içermeyen (%0.00) PLA/PCL kardiyak yamalar için negatif kontrol grubu referans alınarak hesaplanan hücre canlılık değeri 107.9 ± 7.4 'tür. Dolayısı ile boş polimerik yamaların toksik olmamakla birlikte az da olsa hücre proliferasyonunu desteklediği söylenebilir. Ağırlıkça %0.03, %0.06, %0.19 oranında CoO nanopartikülü içeren CoO/PLA/PCL kardiyak yamalar için ise hesaplanan % hücre canlılığı değerleri sırasıyla 103.4 ± 6.5 , 85.24 ± 5.64 ve 80.76 ± 4.15 'dir (Çizelge 4.2, Şekil 4.11). PLA/PCL kardiyak yamaların yapısına ağırlıkça %0.03 oranında CoO nanopartikülü dahil edilmesi % hücre canlılığını etkilememiştir. Ağırlıkça %0.06, %0.19 oranında CoO nanopartikülü içeren CoO/PLA/PCL kardiyak yamalar için ise hesaplanan % hücre canlılığı değerleri CoO içermeyen yamaya kıyasla bir miktar düşmüştür. Ancak %0.19 oranında CoO içeren kardiyak yama için hesaplanan en düşük % hücre canlılık değeri 80.76 ± 4.15 olup bu değer sitotoksisite sınırı olarak kabul edilen %50'nin oldukça üzerindedir. Dolayısı ile genel olarak üretilen yamaların insan kardiyomiyosit hücreleri üzerinde herhangi bir sitotoksik etkisi olmadığı bununla birlikte %0.00 ve %0.03 oranında CoO nanopartikülü içeren PLA/PCL kardiyak yamaların % hücre canlılığını bir miktar artırarak kısmen proliferatif etki gösterdiği söylenebilir.

4.8. Apoptotik ve Nekrotik Etkiler (İkili Boyama Testi)

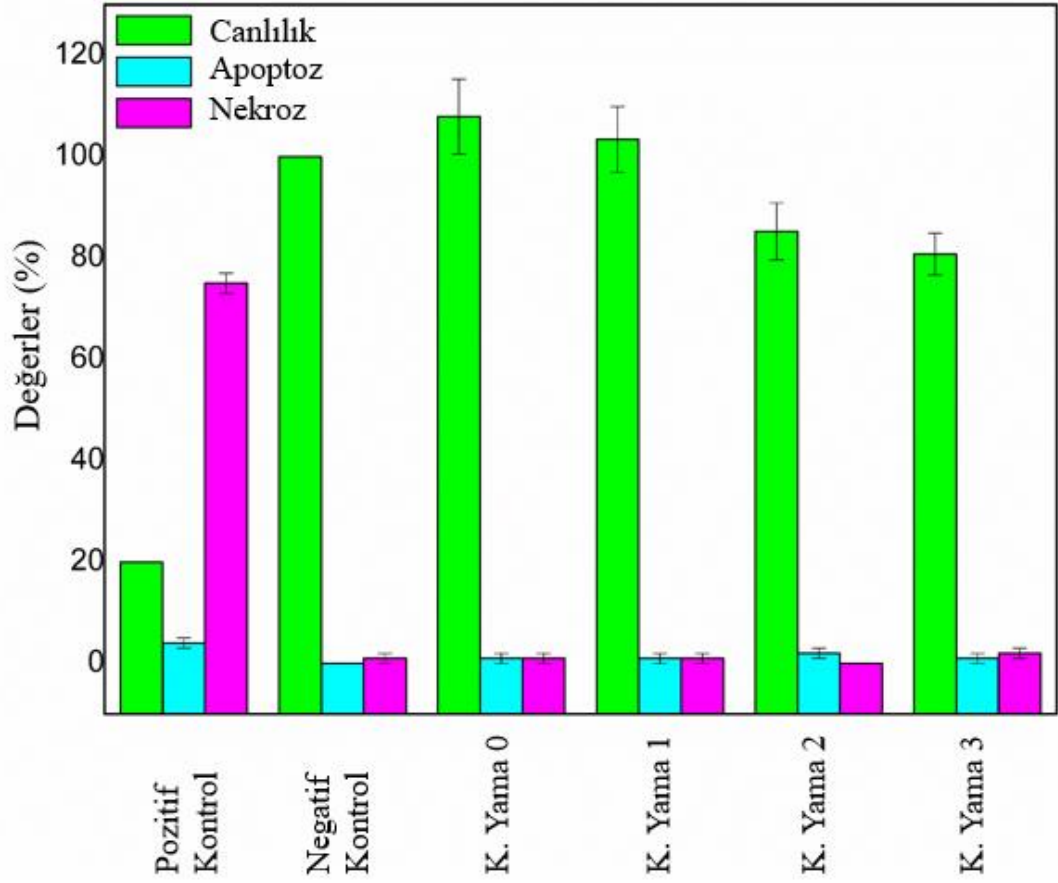
Çalışmada kardiyak yamalar ile belirli bir süre etkileştirilen insan kardiyomyosit hücreleri (HCM) ikili boyama (Hoechst-PI) tekniği ile boyanarak malzemenin hücreler üzerindeki apoptotik/nekrotik etkileri incelenmiştir. İkili boyama tekniği (Double Stain) aynı ortamda bulunan apoptotik ve nekrotik hücrelerin ayrı ayrı tespit edilmesinde kullanılan bir yöntemdir. Hoechst ortamda bulunan canlı ve apoptotik hücre çekirdeklerini maviye boyar. Apoptotik hücrelerde hücre zarının seçici geçirgenliğini kaybetmeye başlamasından dolayı renk yoğunluğu daha fazladır ve parlak mavi görünürler. PI ise nekrotik hücre çekirdeklerini kırmızı renge boyar. İnsan kardiyomyosit hücreleri ile inkübasyonun ardından steril yama kesitlerinin hücreler üzerindeki apoptotik ve nekrotik etkilerini incelemek üzere hücrelerin 20x floresan mikroskobu (Inverted Microscope, Leica DM6000B, Almanya) altında fotoğraflanmıştır. Ağırlıkça farklı oranlarda (%0.00, %0.03, %0.06, %0.19) CoO nanopartikülü içeren PLA/PCL kardiyak yamaların floresan mikroskop görüntüleri sırasıyla Şekil 4.13, Şekil 4.14, Şekil 4.15 ve Şekil 4.16'da verilmiştir. Şekillerde parlak mavi renge boyanmış olan hücreler apoptotik ve koyu kırmızı renge boyanmış hücreler ise nekrotik hücreleri temsil etmektedir.

Sadece hücreler (negatif kontrol) ve DMSO ile muamele edilen hücreler (pozitif kontrol) için de ikili boyama yapılarak hücreler 20x floresan mikroskop altında fotoğraflanmıştır (Şekil 4.12). Kuyucuklardan alınan floresan mikroskop fotoğraflarından sağlıklı, apoptotik ve nekrotik hücreler sayılarak % apoptoz ve % nekroz değerleri hesaplanmıştır (Çizelge 4.2, Şekil 4.11).

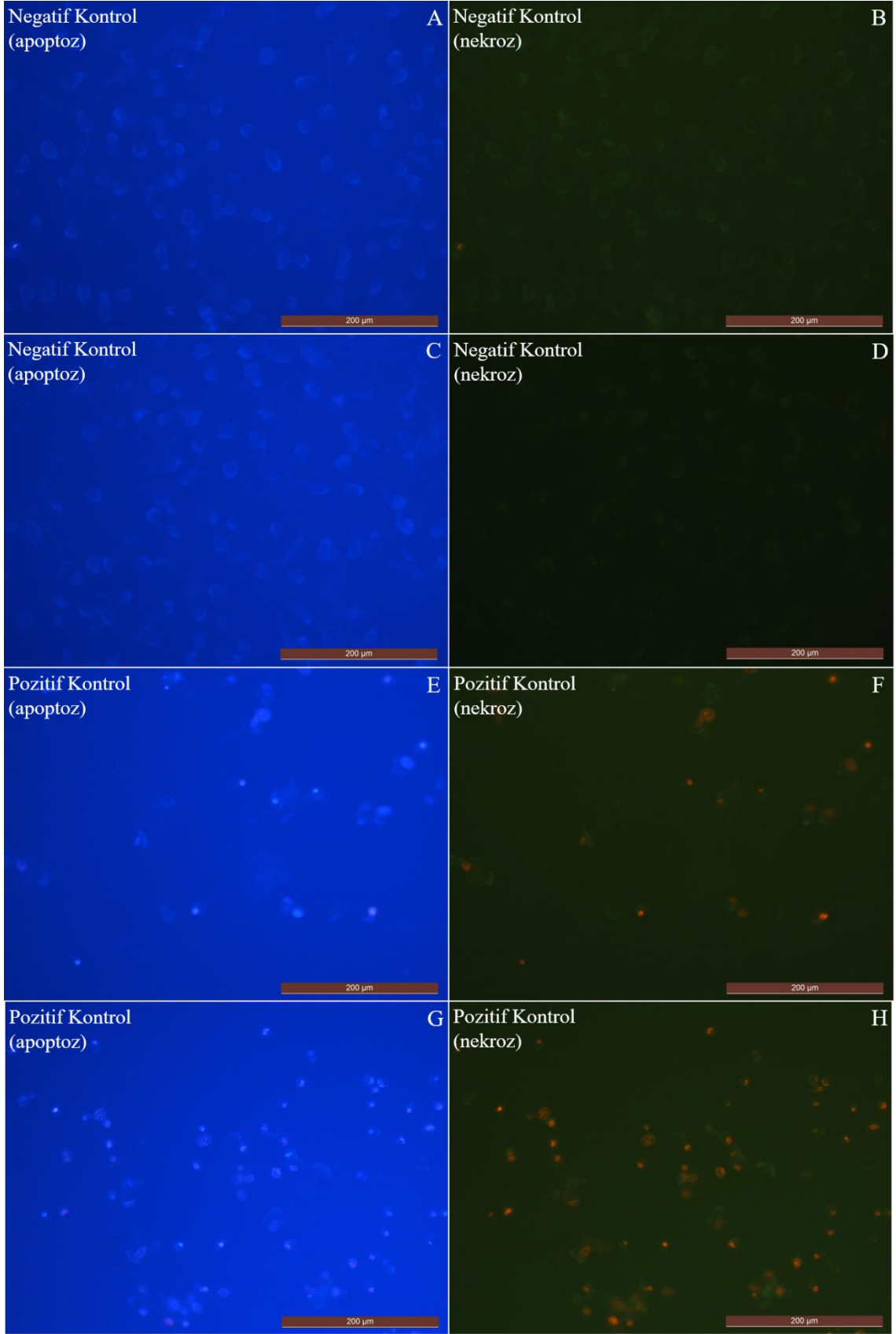
Çizelge 4.2. Pozitif (DMSO) ve negatif (sadece hücreler) kontrol grupları ile ağırlıkça farklı oranlarda %0.00, %0.03, %0.06, %0.19 CoO nanopartikül içeren PLA/PCL kardiyak yamaların sırasıyla kardiyak yama 0, 1, 2, 3 olarak % hücre canlılığı, % apoptoz ve % nekroz değerleri.

Deney Grupları	Hücre Canlılığı %	Apoptoz %	Nekroz %
Sadece Hücreler (Negatif Kontrol)	100	0	1±1
DMSO (pozitif Kontrol)	20	4±1	75±2
Kardiyak yama 0 (%0.00 CoO)	107,9±7,41	1±1	1±1
Kardiyak yama 1 (%0.03 CoO)	103,4±6,5	1±1	1±1
Kardiyak yama 2 (%0.06 CoO)	85,24±5,64	2±1	0
Kardiyak yama 3 (%0.19 CoO)	80,76±4,15	1±1	2±1

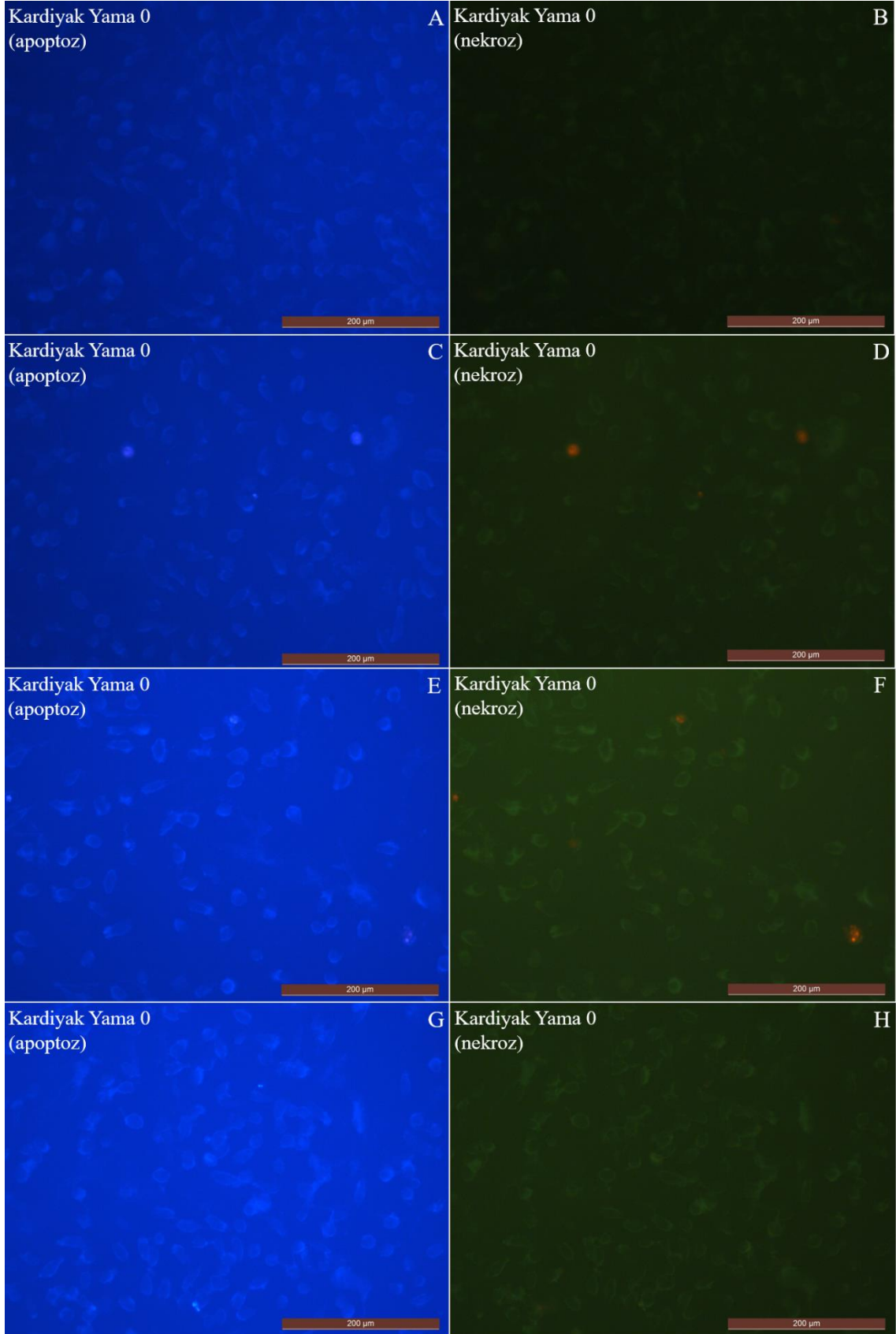
Sadece hücrelerin olduğu negatif kontrol grubunda % apoptoz 0 ve % nekroz 1±1'dir. Hücreler üzerinde toksik etkisi olduğu bilinen DMSO ile etkileştirilmiş pozitif kontrol grubunda ise beklendiği şekilde % apoptoz 4 ve % nekroz 75±2'dir. Ağırlıkça farklı oranlarda CoO nanopartikülü içeren PLA/PCL kardiyak yamaların insan kardiyomiyosit hücreleri (HCM) üzerindeki % apoptoz değerleri genel olarak 1±1 olup, %0.06 oranında CoO içeren yama için bu değer 2±1'dir. Benzer şekilde ağırlıkça farklı oranlarda CoO nanopartikülü içeren PLA/PCL kardiyak yamaların insan kardiyomiyosit (HCM) hücreleri üzerindeki % nekroz değerleri genel olarak 1±1 olup, ağırlıkça %0.06 ve %0.19 oranında CoO içeren kardiyak yamalar için bu değer sırasıyla 0 ve 2±1'dir. Dolayısı ile PLA/PCL kardiyak yamaların HCM hücreleri üzerinde herhangi bir apoptotik ve nekrotik etkisinin olmadığı söylenebilir. Polimerik yama yapısına ağırlıkça %0.03, %0.06, %0.19 oranında CoO nanopartikülü ilave edilmesi yamalar için hesaplanan % apoptoz ve % nekroz değerlerini pozitif kontrol grubu ile kıyaslandığında neredeyse hiç etkilememiştir.



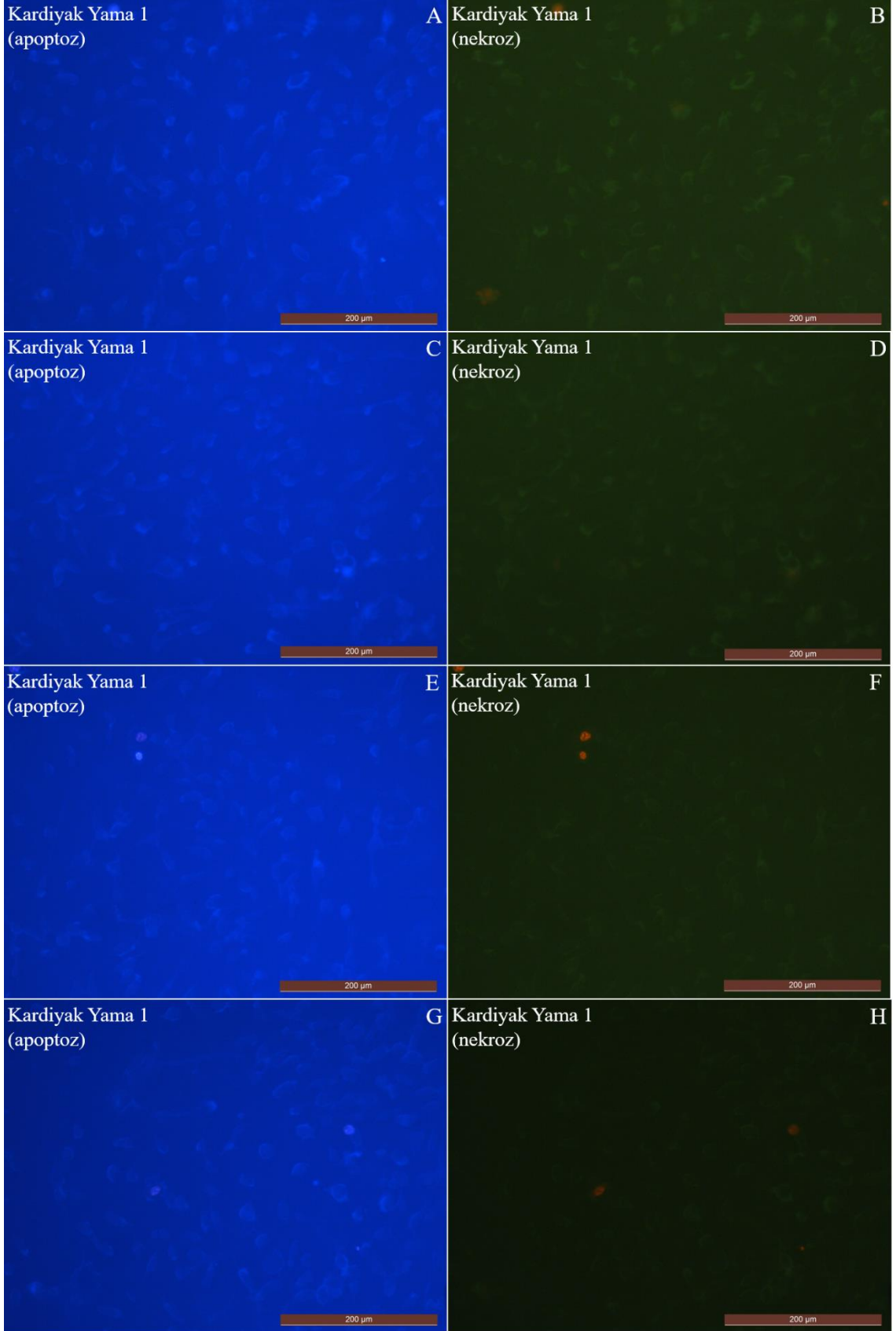
Şekil 4.11. Pozitif (DMSO) ve negatif (sadece hücreler) kontrol grupları ile ağırlıkça farklı oranlarda %0.00, %0.03, %0.06, %0.19 CoO nanopartikül içeren PLA/PCL kardiyak yamaların sırasıyla kardiyak yama 0, 1, 2, 3 olarak % hücre canlılığı, % apoptoz ve % nekroz grafikleri.



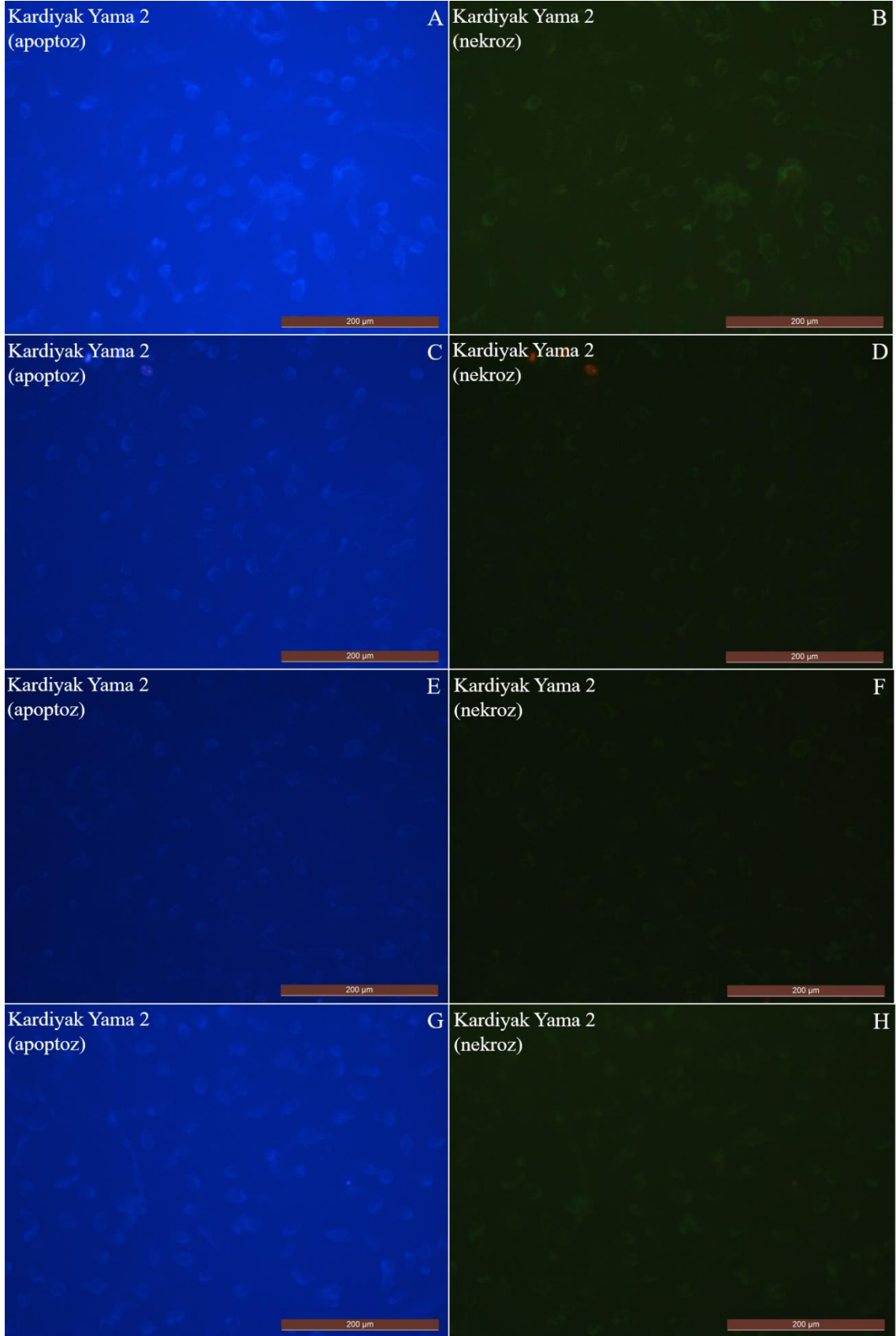
Şekil 4.12. Negatif ve pozitif kontrol gruplarını temsil eden HCM hücrelerinden ikili boyama sonrası alınan floresan mikroskop görüntüleri (ölçek 200 µm).



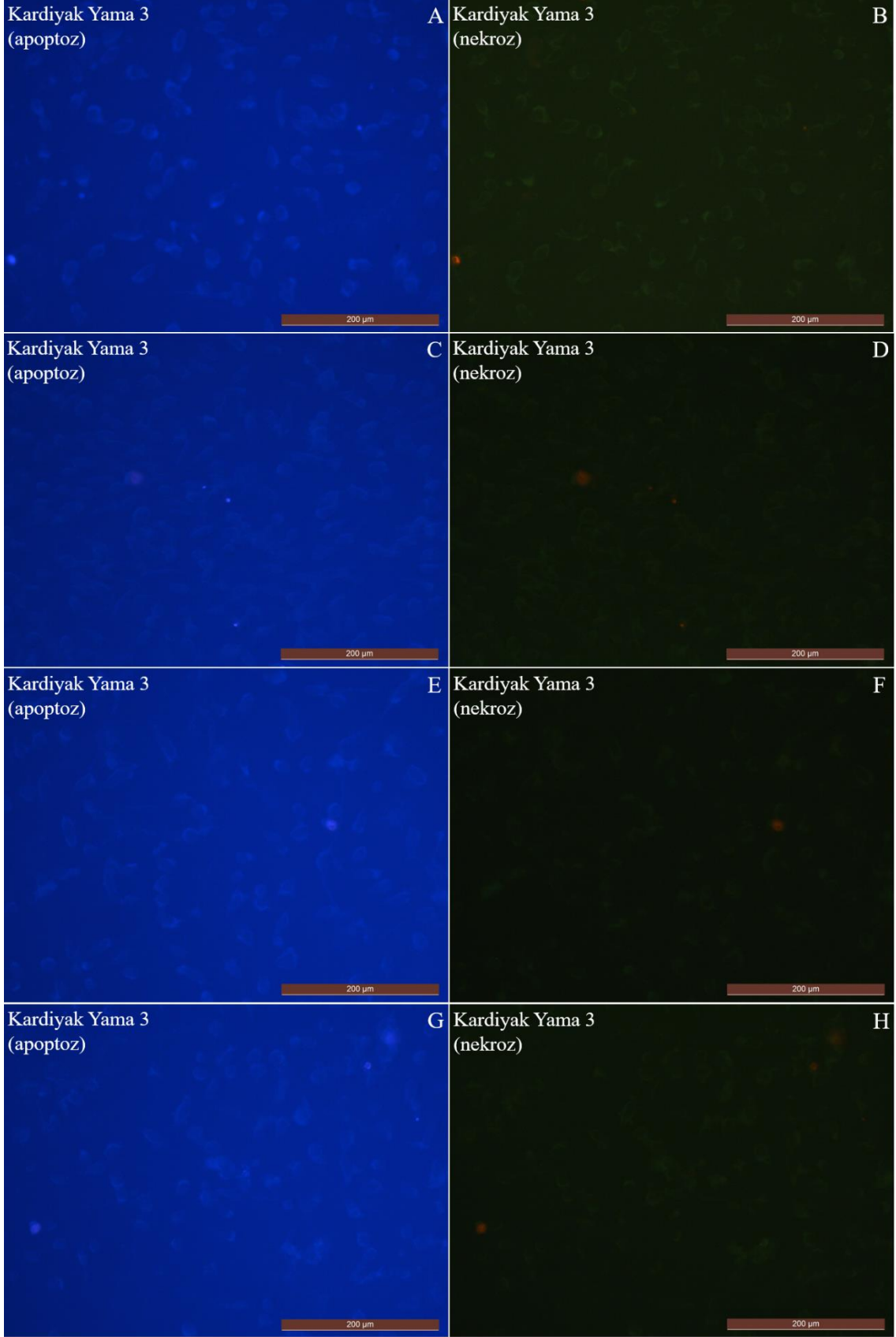
Şekil 4.13. CoO nanopartikülü içermeyen PLA/PCL kardiyak yamalar ile etkileştirilen HCM hücrelerinin ikili boyama sonrası floresan mikroskop görüntüleri (ölçek 200 µm).



Şekil 4.14. Ağırlıkça %0.03 oranında CoO içeren kardiyak yamalar ile etkileştirilen HCM hücrelerinin ikili boyama sonrası floresan mikroskop görüntüleri (ölçek 200 µm).



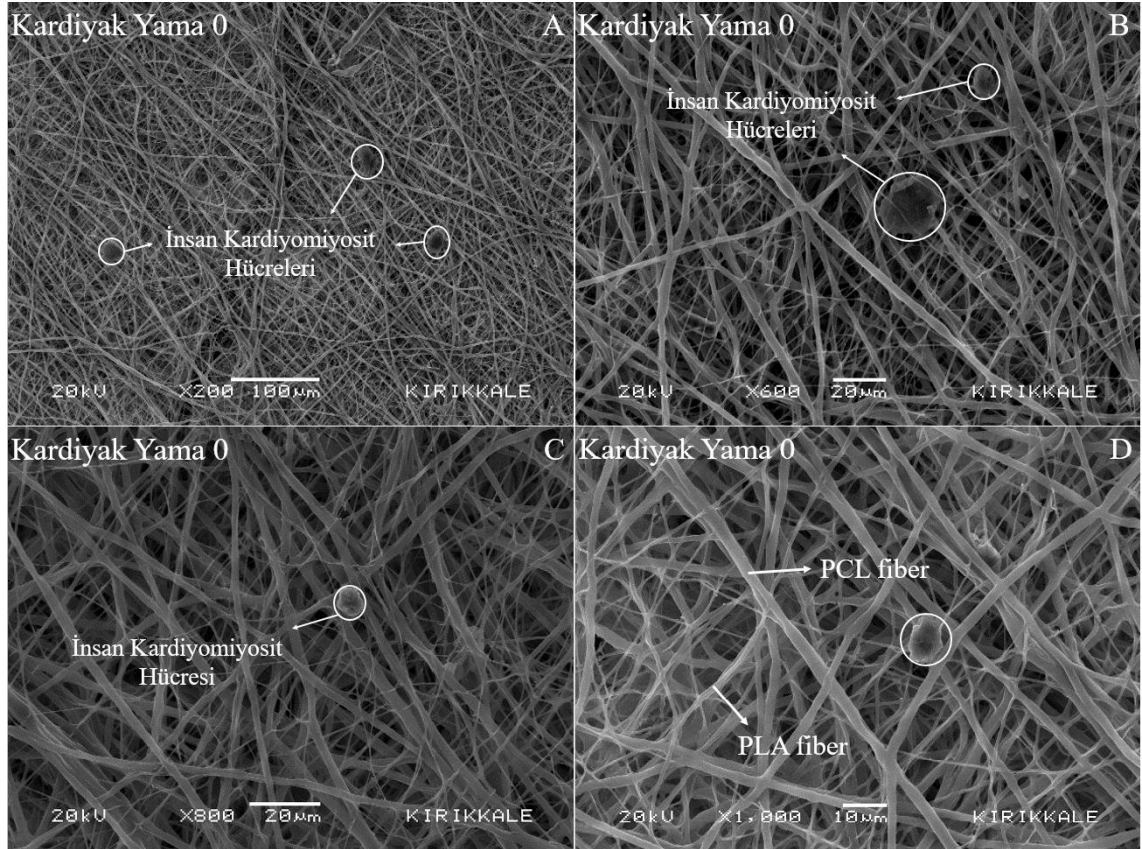
Şekil 4.15. Ağırlıkça %0.06 oranında CoO içeren kardiyak yamalar ile etkileştirilen HCM hücrelerinin ikili boyama sonrası floresan mikroskop görüntüleri (ölçek 200 µm).



Şekil 4.16. Ağırlıkça %0.19 oranında CoO içeren kardiyak yamalar ile etkileştirilen HCM hücrelerinin ikili boyama sonrası floresan mikroskop görüntüleri (ölçek 200 µm).

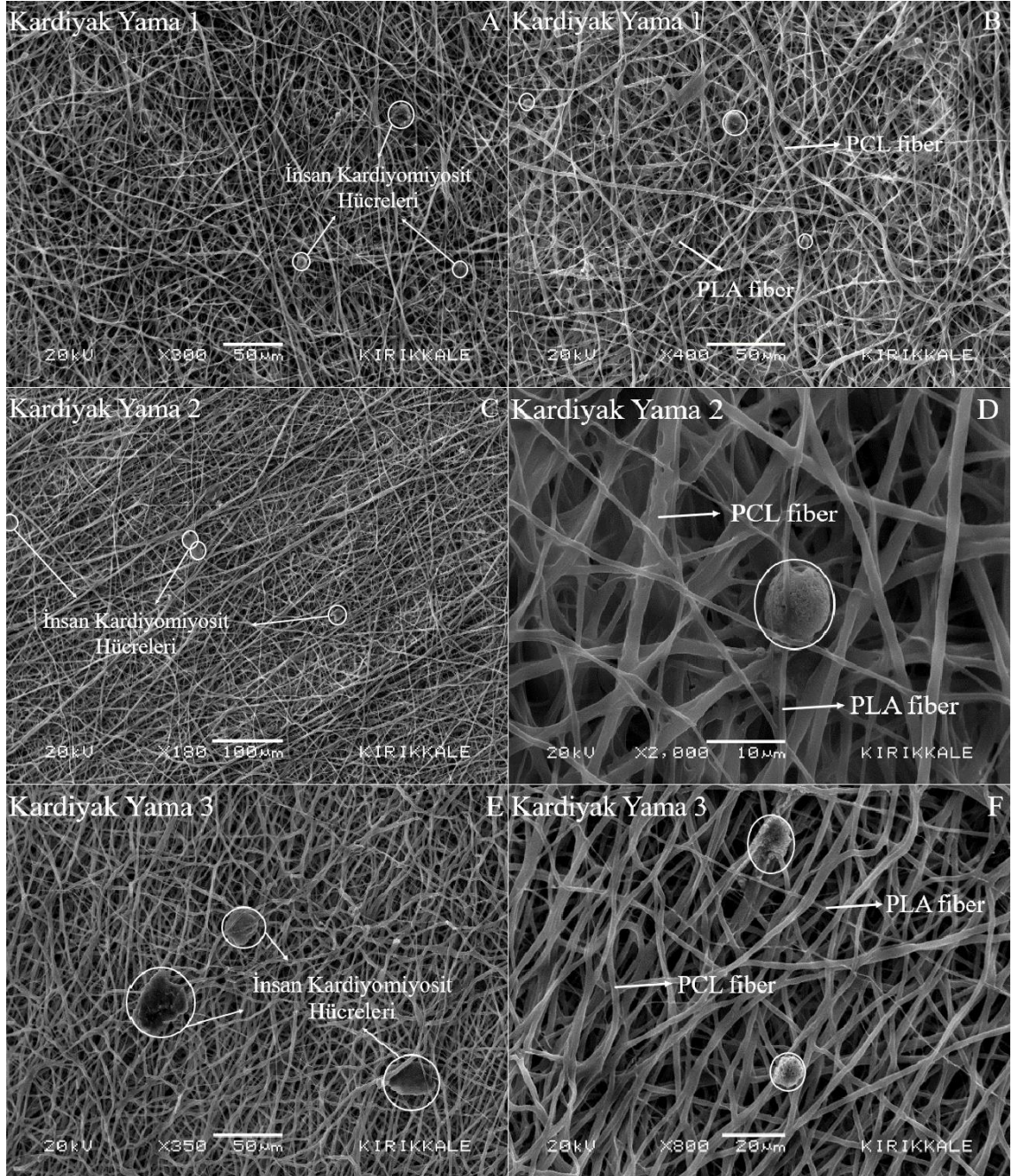
4.10. Kardiyak Yamaların İnsan Kardiyomiyosit (HCM) Hücreleri ile Etkileşimi

Kardiyak yamaların insan kardiyomiyosit hücreleri (HCM) ile etkileşimleri, *in-vitro* hücre kültür koşullarında hücreler ile yamaların 48 saat inkübasyonu sonrasında yama yüzeylerinden SEM görüntüleri alınarak incelenmiştir (Şekil 4.17, Şekil 4.18).



Şekil 4.17. CoO nanopartikülü içermeyen PLA/PCL kardiyak yamalardan (kardiyak yama 0) HCM hücreleri ile inkübasyonun ardından alınan farklı büyütmelelerdeki (200X, 600X, 800X, 1000X) SEM görüntüleri.

Şekil 4.17 incelendiğinde fibröz yapıdaki polimerik kardiyak yama yüzeylerinde HCM hücrelerinin varlığı görülmektedir. HCM hücrelerinin rejenerasyon hızlarının oldukça yavaş olmasına rağmen 2 günlük inkübasyon süresine rağmen hücreler fiber yüzeylerine tutunabilmişlerdir. Hatta fibröz yapının hücreler arası matrikse (HCM) benzerliği ve membran yüzeyinde mikron boyutlarda boşlukların olması nedeniyle bazı hücreler yüzeydeki fiberlerin altına girerek buralarda tutunabilmişlerdir (Şekil 4.17-B).



Şekil 4.18. Ağırlıkça farklı oranlarda %0.03, %0.06, %0.19 CoO nanopartikülü içeren PLA/PCL kardiyak yamaların (sırasıyla kardiyak yama 1, 2, 3) HCM hücreleri ile inkübasyonun ardından alınan SEM görüntüleri.

Şekil 4.18 incelendiğinde Şekil 4.17'dekine benzer şekilde fibröz yapıdaki polimerik kardiyak yama yüzeylerinde HCM hücrelerinin varlığı ve fiberler arasındaki boşluklara girerek buralara tutundukları görülebilmektedir. Kardiyak yamaların kalp kasını ve hücreler arası matriksi taklit edecek şekilde tasarlanması, biyouyumlu polimerlerden üretilmesi ve insan kardiyomiyosit hücreleri üzerinde sitotoksik, apoptotik ve nekrotik etkilerinin olmaması nedeniyle ikilenme süreleri uzun olan HCM hücrelerinin yamalarla

2 günlük kısa bir süre için etkileştirilmiş olmalarına rağmen kardiyak yamaları yabancı bir malzeme olarak algılamadıklarını ve malzeme yüzeyine tutunma eğilimi gösterdiklerini söyleyebiliriz.

4.11. Elastikiyet/Çekme-Uzama Testleri



Şekil 4.19. Esnek CoO/PLA/PCL kardiyak yama kesitleri.

Kalbimiz üç boyutlu bir yapıya sahiptir dolayısı ile kalbi oluşturan kasların kalp krizi sonrası hasar görmesine bağlı olarak hasarlı bölgeye implante edilmek üzere tasarlanan bir destek malzemesinin, kalbin o bölgedeki yüzeyel şeklini alabilmesi ve atım esnasında kalbin boşalması ve tekrar kanla dolmasıyla kasılıp gevşeyen kasların esnekliğini taklit edebilmesi önemlidir. Kardiyak yamaların esnekliğini tespit etmek amacıyla her bir yama için ayrı ayrı çekme-uzama testleri yapılmıştır. Malzeme belirli oranlarda artan kuvvetler altında çekilirken boyu uzamaya başlar. Fakat bir noktadan sonra uygulanan çekme kuvvetinde herhangi bir artış olmasa bile malzemenin boyu uzamaya devam eder. Bu noktaya akma noktası (yield point), akma gerilmesi ya da akma dayanımı denir. Bu noktadan sonra malzemenin elastik şekil değiştirmesi biter ve elastik olmayan şekil değişimi başlar. Yani malzeme geri dönüşü olmayacak şekilde deformasyona uğrar. Bu nedenle akma noktasına aynı zamanda esneklik sınırı da denir. Bu noktaya gelene kadar malzeme elastik olarak şekil değiştirmiştir yani malzeme üzerindeki kuvvet kaldırıldığında malzeme tekrar eski haline dönebilir. Fakat bu noktadan sonra malzeme elastik olmayan şekil değişimine uğramıştır ve üzerindeki kuvvet kaldırılrsa bile eski haline dönemez. Bu nedenle malzemelerin dayanma sınırı akma gerilmesi ile ifade edilir ($\sigma=F/A$). Elastisite modülü (Young's Modulus) malzemenin dayanımının (mukavemetinin) bir ölçüsüdür. Malzemenin elastisite modülünün büyük olması o malzemenin dayanıklı olduğunu gösterir. Dayanıklılık

malzemenin şekil değiştirmeye gösterdiği dirençtir ve birim uzama başına oluşan gerilme miktarını gösterir. Normal gerilmenin (σ) birim uzamaya (ϵ) oranı elastisite modülünü (E) verir. Malzemenin kopuncaya veya kırılıncaya kadar dayanabildiği en yüksek gerilim maksimum çekme gerilmesi ya da maksimum çekme dayanımı olarak ifade edilir. Test sırasında malzemede meydana gelen toplam uzama kopma uzamasıdır. Kopma uzaması malzemenin sünekliğinin bir ölçüsüdür.

Üretilen kalp yamalarının esnekliği Ağırlıkça farklı oranlarda %0.00, %0.03, %0.06, %0.19 CoO nanopartikül içeren PLA/PCL kardiyak yamaların sırasıyla kardiyak yama 0, 1, 2, 3 olarak kopma uzaması (elongation at break), kopma dayanıklılığı (ultimate tensile stress), esneklik sınırı (yield point) ve elastisite modülü (young's modulus) değerleri Çizelge 4.3'te verilmiştir. CoO nanopartikülü içermeyen PLA/PCL kardiyak yamaların kopma uzaması 44.686 mm, maksimum çekme gerilmesi 1.05 N/mm², akma sınırı 0.58 N/mm² ve elastisite modülü 10.289 ± 0.78 MPa'dır. Ağırlıkça %0.03, %0.06, %0.19 oranında CoO nanopartikülü içeren PLA/PCL yamaların kopma uzaması değerleri sırasıyla 47.603mm, 48.843mm, 46.304mm, maksimum çekme gerilmeleri sırasıyla 0.91 N/mm², 1.21 N/mm², 1.36 N/mm², akma sınırı değerleri sırasıyla 0.53 N/mm², 0.63 N/mm², 0.82 N/mm², elastisite modülü değerleri ise sırasıyla 10.908 ± 0.62 MPa, 9.288 ± 0.56 MPa ve 10.291 ± 1.98 MPa'dır.

Yama yapısına ağırlıkça %0.03, %0.06, %0.19 oranlarında CoO nanopartikülü ilave edilmesi mekanik test sonuçlarını çok fazla etkilememiştir. Polimerik yamaların akma sınırı ve elastisite modülü değerlerinde belirgin değişimler olmamıştır. CoO nanopartiküllerinin fiber morfolojisi ve yama gözenekliliğini çok fazla etkilememiş olmasının kardiyak yamaların dayanıklılık ve esnekliğini değiştirmedeği düşünülmektedir. Genel olarak yamaların kopma uzamaları çok fazla değildir. Kardiyak yamalar kuvvet altında şekil değiştirmeye karşı direçli dolayısı ile dayanıklıdırlar. Dayanabildikleri maksimum çekme gerilmesi değerleri de yüksektir. Elastisite modülü değerleri yani yama elastikiyeti ise ilgili literatür ile karşılaştırıldığında oldukça iyidir (Kapnisi ve Mansfield, 2018). Üretilen CoO/PLA/PCL yamaların kardiyak yamalardan beklenen mekanik özellikleri fazlasıyla taşıdığı düşünülmektedir.

Çizelge 4.3. Ağırlıkça farklı oranlarda %0.00, %0.03, %0.06, %0.19 CoO nanopartikül içeren PLA/PCL kardiyak yamaların sırasıyla kardiyak yama 0, 1, 2, 3 olarak mekanik test sonuçları.

Kardiyak Yamalar	Kopma Uzaması (mm)	Maksimum Çekme Gerilmesi (N/mm ²)	Yield Point ($\sigma: F/A$) (N/mm ²)	Elastisite Modülü ($E: \sigma/\epsilon$) (MPa)
0	44.686	1.05	0.58	10.289 ± 0.78
1	47.603	0.91	0.53	10.908 ± 0.62
2	48.843	1.21	0.63	9.288 ± 0.56
3	46.304	1.36	0.82	10.291 ± 1.98

4.12. CoO/PLA/PCL Yamaların İletkenliği

Kardiyak kalp kası hücreleri (kardiyomiyositler) kalp kası (miyokard) boyunca elektrik sinyallerini kullanarak bir atım gerçekleştirir. Sağlıklı bir yetişkin kalbinden her atımda 1.25 Hz frekansa sahip 5V/cm değerinde bir akım geçer. O nedenle kalp krizi sonrası hasar görmüş kalp kaslarına destek olmak üzere tasarlanan kardiyak doku iskelelerinin kalbin üzerinden geçen akımı ileterek kalp kasına fonksiyonel açıdan benzemesi (biyomimetik) istenir. Dolayısı ile kardiyak yama iskelelerinde aranan bir diğer özellik ise malzemenin iletkenliğidir.

Üretilen kardiyak yamaların (%0.00, %0.03, %0.06, %0.19) hem kuru hem de ıslak iletkenlik değerleri (S/m) oda sıcaklığında 4 nokta prob tekniği kullanılarak ölçülmüştür (Çizelge 4.4). Kardiyak yamaların yaş ölçümlerinde ıslatma ortamı olarak fosfat tampon çözeltisi (PBS, pH 7.4) kullanılmıştır. Ağırlıkça farklı oranlarda %0.00, %0.03, %0.06, %0.19 CoO nanopartikül içeren kuru PLA/PCL kardiyak yamaların iletkenlik değerleri sırasıyla 5.05×10^{-7} S/m, 5.49×10^{-6} S/m, 4.00×10^{-5} S/m ve 5.33×10^{-4} S/m olarak ölçülmüştür. Ağırlıkça farklı oranlarda %0.00, %0.03, %0.06, %0.19 CoO nanopartikül içeren ıslak PLA/PCL kardiyak yamaların iletkenlik değerleri ise sırasıyla 6.62×10^{-6} S/m, 7.00×10^{-5} S/m, 2.57×10^{-4} S/m ve 3.77×10^{-4} S/m olarak ölçülmüştür. Genel olarak katkısız ve kompozit yapıda olmayan polimerler yarı iletken veya yalıtıkandırlar. Yarı

iletken polimerlerin iletkenlik değerleri 10^{-2} S/m ile 10^{-6} S/m arasındadır (Mehrabi ve ark, 2019). CoO içermeyen PLA/PCL kardiyak yamaların kuru (5.05×10^{-7}) ve ıslak (6.62×10^{-6}) iletkenlik değerlerine bakıldığında yarı iletken oldukları söylenebilir. CoO nanopartiküllerinin fiberler içerisine farklı oranlarda yerleştirilmesi malzemenin iletkenliğini artırmıştır. İletkenlik değerleri artan CoO oranıyla birlikte artmıştır. Hatta ağırlıkça %0.06 ve %0.19 oranında CoO içeren CoO/PLA/PCL yamaların iletkenlik değerleri yarı iletkenlik üst sınırı olan 10^{-6} S/m değerinden büyük olduğu için bu yamaların iletken olduğunu söyleyebiliriz. Ayrıca ıslak yamaların iletkenlik değerleri suyun iletken olması nedeniyle kuru hallerine kıyasla on kat kadar artmıştır. CoO iletken değildir (Kaplan ve ark., 2011). CoO nanopartikülleri yüksek yüzey alanına sahip oldukları için çözelti ortamında çözelti polimerizasyonu ile iletken Co^{+2} iyonlarına dönüşerek polimerik yama iletkenliğini arttırmış olabilir.

Çizelge 4.4. Ağırlıkça farklı oranlarda %0.00, %0.03, %0.06, %0.19 CoO nanopartikül içeren PLA/PCL kardiyak yamaların sırasıyla kardiyak yama 0, 1, 2, 3 olarak ölçülen iletkenlik değerleri (S/m).

Kardiyak Yamalar	İletkenlik Değerleri (S/m)	
	Kuru	Islak
0	5.05×10^{-7}	6.62×10^{-6}
1	5.49×10^{-6}	7.00×10^{-5}
2	4.00×10^{-5}	2.57×10^{-4}
3	5.33×10^{-4}	3.77×10^{-4}

5. SONUÇLAR

Sunulan tez çalışması kapsamında üretilen PLA/PCL/CoO kardiyak yamaların (%0.00, %0.03, %0.06, %0.19) kimyasal yapısı, yüzey morfolojisi, yoğunluğu, gözenekliliği, ıslanabilirliği, zamana bağlı kütle kaybı, yamalardan CoO salımı, elastikiyeti, insan kardiyomyosit (HCM) hücreleri üzerindeki olası toksik, apoptotik, nekrotik etkileri, HCM hücreleri ile etkileşimi ve iletkenliği çeşitli *in vitro* testler ile karakterize edilerek, elde edilen bulgular literatür ışığında değerlendirilmiştir.

Yama üretiminde kullanılan polimerlerin (PLA ve PCL), CoO nanopartiküllerin ve ağırlıkça farklı oranlarda CoO içeren (%0.00, %0.03, %0.06, %0.19) PLA/PCL/CoO kardiyak yamaların ayrı ayrı FTIR spektrumları alınarak polimerlerin elektro-eğirilmesi esnasında yüksek voltaj altında çözücü ile etkileşimleri sonucu kimyasal yapılarında herhangi bir değişim olup olmadığı karşılaştırmalı olarak incelenmiştir (Şekil 4.1). FTIR spektrumları incelendiğinde PLA ve PCL polimerlerinin çözücü ile etkileşimleri ve çözeltilerinin yüksek voltaj altında elektro-eğirilmesi sonucu kimyasal yapılarında herhangi bir değişim olmadığı görülmüştür.

Sunulan tez çalışması kapsamında üretilen polimerik kardiyak yamaların yüzey morfolojisi ve fibröz yapısı farklı büyütme ölçeklerinde (100 µm, 20 µm, 10 µm, 5 µm) taramalı elektron mikroskopu (SEM) görüntüleri alınarak incelenmiştir. Ağırlıkça %0.00, %0.03, %0.06, %0.19 oranlarında CoO nanopartikül içeren kardiyak yamalara ait SEM görüntüleri sırasıyla Şekil 4.2, Şekil 4.3, Şekil 4.4 ve Şekil 4.5'te verilmiştir. Şekil 4.2'de CoO nanopartikülleri içermeyen PLA/PCL kardiyak yamaların kısmen yönlendirilmiş fiberlerden oluşan farklı büyütme ölçeklerindeki SEM görüntüleri verilmiştir. Çalışmada karşılıklı eğirmenin yarattığı zorluklara rağmen fiberlerin genel olarak doğrusal olmaları ve toplayıcı yüzeyinde birikim yapmadan belirgin bir doğrultuda olmasa da kısmen yönlendirilebilmeleri sağlanabilmiştir. Polimerik yama yapısına CoO nanopartiküllerinin dahil edilmesiyle birlikte PLA ve PCL fiberlerin kalınlığı, morfolojisi ve hizalanması etkilenmemiştir. Ancak fiber yüzeylerinde pürüzlülüğü artmıştır. Biyomalzemelerin pürüzlü yüzeylere sahip olması hücre adhezyonunu kolaylaştırmaktadır. Ayrıca fiberler arasında kalan boşlukların mikron seviyelerde olması yine mikron boyutlarda olan HCM hücrelerinin fiberler arasına girerek biyomalzeme ile etkileşimini kolaylaştırmıştır.

Elektro-eğirme tekniğinin sağladığı en önemli avantajlardan biri, gözenekli yapı ve yüksek yüzey/hacim oranıdır. Membranlarda oluşturulan gözenekli yapı, membranların şişme (su alma) kapasitelerini, membrandan bir takım ajanların (terapötikler, antibakteriyel ajanlar vb.) salım profilini, hücrelerin membrana tutunma (adhezyon) ve malzeme yüzeyinde çoğalma eğilimini (proliferasyon), mekanik dayanımını, hidrofilik/hidrofobik karakteri etkilemektedir. Çizelge 4.1'de ağırlıkça %0.00, %0.03, %0.06, %0.19 CoO nanopartikül içeren PLA/PCL kardiyak yamaların sırasıyla yama 0, 1, 2, 3 olarak bileşen yüzdeleri (% a/a), yoğunlukları (g/cm^3), spesifik hacimleri (cm^3/g) ve gözeneklilik (%) değerleri verilmiştir. Ağırlıkça %0.00, %0.03, %0.06, %0.19 CoO nanopartikül içeren PLA/PCL kardiyak yamaların yoğunluk değerleri sırasıyla $0.3083 \text{ g}/\text{cm}^3$, $0.3050 \text{ g}/\text{cm}^3$, $0.3166 \text{ g}/\text{cm}^3$ ve $0.3283 \text{ g}/\text{cm}^3$ ve spesifik hacim değerleri sırasıyla $3.2435 \text{ cm}^3/\text{g}$, $3.2787 \text{ cm}^3/\text{g}$, $3.1585 \text{ cm}^3/\text{g}$ ve $3.0460 \text{ cm}^3/\text{g}$ 'dir. Membran gözenekliliği ise ağırlıkça %0.00, %0.03, %0.06, %0.19 CoO nanopartikül içeren PLA/PCL kardiyak yamalar için sırasıyla %73.76, %74.10, %73.16 ve %72.40 olarak hesaplanmıştır. CoO içermeyen kardiyak yamanın (yama 0) yoğunluğu düşük dolayısı ile gözenekliliği oldukça yüksektir. Metal oksitin yoğunluğunun polimerlerden çok daha yüksek olmasına rağmen PLA/PCL membran yapısına CoO nanopartiküllerinin ilave edilmesi, hem nanoboyutta olmaları (~50 nm) hem de ağırlıkça çok az yüzdelerde yapıya dahil edilmeleri nedeniyle yoğunluğu, spesifik hacmi ve gözenekliliği neredeyse etkilememiştir.

Kardiyak yamaların kalp dokusu ile bütünleşmesi ve ortama uyum sağlaması açısından ortam sıvılarının emiliminin sağlaması gerekmektedir. Bu nedenle biyomalzemelerin ıslanabilirliği yani su alma kapasitesi *in-vivo* ortamlardaki biyouyumluluğu açısından önemli parametrelerden biridir. Kardiyak yamalardan alınan 7.5 mm çaplı dairesel kesitler (%0.00, %0.03, %0.06, %0.19 a/a) fosfat tampon çözeltisi (37°C, pH 7.4) içerisinde belirli sürelerde bekletilerek % şişme oranları hesaplanmış ve su alma kapasiteleri (ıslanabilirlik) değerlendirilmiştir. Şekil 4.6'da ağırlıkça farklı oranlarda CoO nanopartikülü içeren kardiyak yamaların (%0.00, %0.03, %0.06, %0.19 a/a) zamana bağlı (%) şişme oranları verilmiştir. Yamalar ilk 30 dakika içerisinde hızlı ve benzer bir şişme profili göstermiş ve 30. dakikada ~%50 şişme oranına ulaşmışlardır. CoO nanopartikülü içermeyen kardiyak yama 110. dakikada maksimum su alma kapasitesine ulaşmıştır. Maksimum su alma kapasitesi ~%58'dir. Gözenekli olduğu için kapiler etkiler yardımıyla ağırlığının yarısından fazla sıvı absorblayabilmiştir. Ağırlıkça

(w/w) farklı oranlarda (%0.03, %0.06, %0.19) CoO nanopartikülü içeren kardiyak yamalar 150. dakikada maksimum su alma kapasitesi değerlerine ulaşmışlardır, (%) şişme oranları ise sırasıyla ~%82, ~%76 ve ~%72'dir. CoO nanopartikülü kullanımı ile elektro-spun PLA/PCL yamaların ıslanabilirliği belirgin şekilde artmıştır. Bu durum genel olarak CoO nanopartikül kullanımıyla beraber fiber yüzeylerinde artan pürüzlülük ile alakalı olabilir. Pürüzlülüğün artması kapiler etkileri iyileştirmiş ve yapı içerisine daha fazla sıvı alınabilmesini sağlamış olabilir.

Tez çalışmasında üretilen kardiyak yamaların yapısında bulunan polimerler biyobozunur olup, belirli bir süre sonra ikinci bir cerrahi operasyon gerektirmeden vücut tarafından emilir. Kalp krizi sonrası hasar görmüş kalp kasının kendini yenileyebilme (rejenerasyon) hızı oldukça yavaştır. O nedenle kalp kasını desteklemek amacıyla uzun bir süre kalp yamalarının bozunması istenmez. Erken dönemde kalp yamalarının bozunma hızı *in-vitro* koşullarda değerlendirilmiştir. Şekil 4.7'de ağırlıkça farklı oranlarda (w/w) CoO nanopartikülü içeren kardiyak yamalardan (%0.00, %0.03, %0.06, %0.19) zamanla (%) kalan kütle miktarları verilmiştir. İlk hafta 3 haftalık sürecin tamamına kıyasla bozunma daha hızlıdır. Ağırlıkça %0.00, %0.03, %0.06, %0.19 CoO nanopartikül içeren PLA/PCL kardiyak yamalar için ilk haftanın sonundaki (%) kalan kütle miktarları sırasıyla %95.96, %98.38, %97.12 ve %98.51'dir. Üç haftanın sonunda ise ağırlıkça %0.00, %0.03, %0.06, %0.19 CoO nanopartikülü içeren PLA/PCL kardiyak yamalar için (%) kalan kütle miktarları sırasıyla %94.92, %97.34, %96.41, %97.69 ve kaybedilen toplam kütle miktarları sırasıyla % 6,26, % 3,72, % 4,47 ve % 3,49'dur. PCL ve PLA'nın yapısı ve yüksek molekül ağırlıkları (PCL ~80 kDa ve PLA ~260 kDa) nedeniyle beklendiği şekilde erken dönemde polimerik yamalardan kütle kaybı oldukça yavaştır.

Kardiyak yamaların fibröz yapısını oluşturan fiberlerin içerisine iletkenliği sağlamak amacıyla belirli konsantrasyonlarda (%0.03, %0.06, %0.19 w/w) CoO nanopartikülleri ilave edilmiştir. Partiküller polimerik fiberler içerisine hapsedilmiştir. Fiberlerin yüzeyindeki ve yüzeye yakın yerlerdeki CoO partiküllerinin ortama salınıp salınmadığı üç haftalık (Şekil 4.9) ve üç aylık *in-vitro* (Şekil 4.10) salım çalışmaları yapılarak değerlendirilmiştir. 21 günlük (Şekil 4.9) ve 12 haftalık (Şekil 4.10) CoO salım grafikleri incelendiğinde membranlardan başlangıçta eser miktarlarda (%0.00-%0.002) salım olduğu söylenebilir. Ancak sonrasında salım grafiklerinin değişmediği dolayısı ile

herhangi bir CoO nanopartikülü salımı olmadığı görülmektedir. Eser miktarda salım olduğu durumda yavaş da olsa CoO nanopartikülü salımının devam etmesi beklenirdi. O nedenle hesaplanan eser miktarlardaki CoO nanopartiküllerinin membran yapısından yani hapsedildiği polimerik fiberlerin içerisinden serbestleşerek PBS ortamına salınmadığı düşünülmektedir. CoO/PLA/PCL membranların yüzeyinde eser miktarda CoO nanopartikülü kalmış olabileceği düşünülmektedir. Bu nedenle ilk ölçümlerde çok zayıf absorbanslar alınmış olabilir. Sonuç olarak ilk 3 hafta ve 3 aylık süreçte genel olarak membran yapısından belirgin bir CoO salımının söz konusu olmadığını söylemek mümkündür. Şekil 4.7'deki membranların kütle kaybı grafikleri incelendiğinde polimerik membran yapıdaki bozunmanın da oldukça yavaş olduğu görülmektedir. Kardiyak yamaların olası *in-vivo* kullanımlarında bozunmaya bağlı olarak CoO nanopartikülleri fiber yapıdan serbestleşeceklerdir. Ancak bu salım oldukça yavaş ve eser miktarlarda olacağı için CoO nanopartiküllerinin *in-vivo* toksik etkileri olmayacağı düşünülmektedir.

Sunulan tez çalışmasında CoO nanopartikülü içeren kardiyak yamaların insan kardiyomyosit hücreleri üzerindeki olası sitotoksik etkileri de *in-vitro* koşullarda değerlendirilmiş ve yamaların hücreler üzerinde herhangi bir sitotoksik, apoptotik, nekrotik etkisi olmadığı görülmüştür (Çizelge 4.2, Şekil 4.11). Kardiyak yamaların insan kardiyomyosit hücreleri (HCM) üzerindeki olası sitotoksik etkileri MTT testi yapılarak değerlendirilmiştir. % Çizelge 4.2 ve Şekil 4.11'de pozitif (DMSO) ve negatif (sadece hücreler) kontrol grupları ile ağırlıkça farklı oranlarda %0.00, %0.03, %0.06, %0.19 CoO nanopartikülü içeren PLA/PCL kardiyak yamaların sırasıyla kardiyak yama 0, 1, 2, 3 olarak % hücre canlılığı değerleri verilmiştir. Sadece hücrelerin olduğu negatif kontrol grubunun hücre canlılık değeri %100 kabul edilerek diğer gruplar için referans alınmıştır. CoO nanopartikülü içermeyen (%0.00) PLA/PCL kardiyak yamalar için negatif kontrol grubu referans alınarak hesaplanan hücre canlılık değeri 107.9 ± 7.4 'tür. Dolayısı ile boş polimerik yamaların toksik olmamakla birlikte az da olsa hücre proliferasyonunu desteklediği söylenebilir. Ağırlıkça %0.03, %0.06, %0.19 oranında CoO nanopartikülü içeren CoO/PLA/PCL kardiyak yamalar için ise hesaplanan % hücre canlılığı değerleri sırasıyla 103.4 ± 6.5 , 85.24 ± 5.64 ve 80.76 ± 4.15 'dir (Çizelge 4.2, Şekil 4.11). PLA/PCL kardiyak yamaların yapısına ağırlıkça %0.03 oranında CoO nanopartikülü dahil edilmesi % hücre canlılığını etkilememiştir. Ağırlıkça %0.06, %0.19 oranında CoO nanopartikülü içeren CoO/PLA/PCL kardiyak yamalar için ise

hesaplanan % hücre canlılığı değerleri CoO içermeyen yamaya kıyasla bir miktar düşmüştür. Ancak %0.19 oranında CoO içeren kardiyak yama için hesaplanan en düşük % hücre canlılık değeri 80.76 ± 4.15 olup bu değer sitotoksosite sınırı olarak kabul edilen %50'nin oldukça üzerindedir. Dolayısı ile genel olarak üretilen yamaların insan kardiyomiyosit hücreleri üzerinde herhangi bir sitotoksik etkisi olmadığı bununla birlikte %0.00 ve %0.03 oranında CoO nanopartikülü içeren PLA/PCL kardiyak yamaların % hücre canlılığını bir miktar artırarak kısmen proliferatif etki gösterdiği söylenebilir.

Çalışmada kardiyak yamalar ile belirli bir süre etkileştirilen insan kardiyomiyosit hücreleri (HCM) ikili boyama (Hoechst-PI) tekniği ile boyanarak malzemenin hücreler üzerindeki apoptotik/nekrotik etkileri incelenmiştir. Ağırlıkça farklı oranlarda (%0.00, %0.03, %0.06, %0.19) CoO nanopartikülü içeren PLA/PCL kardiyak yamaların ikili boyama sonrası floresan mikroskop görüntüleri sırasıyla Şekil 4.13, Şekil 4.14, Şekil 4.15 ve Şekil 4.16'da verilmiştir. Şekillerde parlak mavi renge boyanmış olan hücreler apoptotik ve koyu kırmızı renge boyanmış hücreler ise nekrotik hücreleri temsil etmektedir. Sadece hücreler (negatif kontrol) ve DMSO ile muamele edilen hücreler (pozitif kontrol) için de ikili boyama yapılarak hücreler 20x floresan mikroskop altında fotoğraflanmıştır (Şekil 4.12). Sadece hücrelerin olduğu negatif kontrol grubunda % apoptoz 0 ve % nekroz 1 ± 1 'dir. Hücreler üzerinde toksik etkisi olduğu bilinen DMSO ile etkileştirilmiş pozitif kontrol grubunda ise beklendiği şekilde % apoptoz 4 ve % nekroz 75 ± 2 'dir. Ağırlıkça farklı oranlarda CoO nanopartikülü içeren PLA/PCL kardiyak yamaların insan kardiyomiyosit hücreleri (HCM) üzerindeki % apoptoz değerleri genel olarak 1 ± 1 olup, %0.06 oranında CoO içeren yama için bu değer 2 ± 1 'dir. Benzer şekilde ağırlıkça farklı oranlarda CoO nanopartikülü içeren PLA/PCL kardiyak yamaların insan kardiyomiyosit (HCM) hücreleri üzerindeki % nekroz değerleri genel olarak 1 ± 1 olup, ağırlıkça %0.06 ve %0.19 oranında CoO içeren kardiyak yamalar için bu değer sırasıyla 0 ve 2 ± 1 'dir. Dolayısı ile PLA/PCL kardiyak yamaların HCM hücreleri üzerinde herhangi bir apoptotik ve nekrotik etkisinin olmadığı söylenebilir. Polimerik yama yapısına ağırlıkça %0.03, %0.06, %0.19 oranında CoO nanopartikülü ilave edilmesi yamalar için hesaplanan % apoptoz ve % nekroz değerlerini pozitif kontrol grubu ile kıyaslandığında etkilememiştir.

Kardiyak yamaların insan kardiyomiyosit hücreleri (HCM) ile etkileşimleri, *in-vitro* hücre kültür koşullarında hücreler ile yamaların 48 saat inkübasyonu sonrasında yama yüzeylerinden SEM görüntüleri alınarak incelenmiştir (Şekil 4.17, Şekil 4.18). Şekil 4.17 ve Şekil 4.18 incelendiğinde fibröz yapıdaki polimerik kardiyak yama yüzeylerinde HCM hücrelerinin varlığı görülmektedir. kalp kasını ve hücreler arası matriksi taklit edecek şekilde tasarlanması, biyouyumlu polimerlerden üretilmesi ve insan kardiyomiyosit hücreleri üzerinde sitotoksik, apoptotik ve nekrotik etkilerinin olmaması nedeniyle ikilenme süreleri uzun olan HCM hücrelerinin yamalarla 2 günlük kısa bir süre için etkileştirilmiş olmalarına rağmen kardiyak yamaları yabancı bir malzeme olarak algılamadıklarını ve malzeme yüzeyine tutunma eğilimi gösterdiklerini söyleyebiliriz.

Kalbimiz üç boyutlu bir yapıya sahiptir dolayısı ile kalbi oluşturan kasların kalp krizi sonrası hasar görmesine bağlı olarak hasarlı bölgeye implante edilmek üzere tasarlanan bir destek malzemesinin, kalbin o bölgedeki yüzeyel şeklini alabilmesi ve atım esnasında kalbin boşalması ve tekrar kanla dolmasıyla kasılıp gevşeyen kasların esnekliğini taklit edebilmesi önemlidir. Kardiyak yamaların esnekliğini tespit etmek amacıyla her bir yama için ayrı ayrı çekme-uzama testleri yapılmıştır. Ağırlıkça farklı oranlarda %0.00, %0.03, %0.06, %0.19 CoO nanopartikül içeren PLA/PCL kardiyak yamaların sırasıyla kardiyak yama 0, 1, 2, 3 olarak kopma uzaması (elongation at break), kopma dayanıklılığı (ultimate tensile stress), esneklik sınırı (yield point) ve elastisite modülü (young's modulus) değerleri Çizelge 4.3'te verilmiştir. CoO nanopartikülü içermeyen PLA/PCL kardiyak yamaların kopma uzaması 44.686 mm, maksimum çekme gerilmesi 1.05 N/mm², akma sınırı 0.58 N/mm² ve elastisite modülü 10.289 ± 0.78 MPa'dır. Ağırlıkça %0.03, %0.06, %0.19 oranında CoO nanopartikülü içeren PLA/PCL yamaların kopma uzaması değerleri sırasıyla 47.603mm, 48.843mm, 46.304mm, maksimum çekme gerilmeleri sırasıya 0.91 N/mm², 1.21 N/mm², 1.36 N/mm², akma sınırı değerleri sırasıyla 0.53 N/mm², 0.63 N/mm², 0.82 N/mm², elastisite modülü değerleri ise sırasıyla 10.908 ± 0.62 MPa, 9.288 ± 0.56 MPa ve 10.291 ± 1.98 MPa'dır.

Yama yapısına ağırlıkça %0.03, %0.06, %0.19 oranlarında CoO nanopartikülü ilave edilmesi mekanik test sonuçlarını çok fazla etkilememiştir. CoO nanopartiküllerinin fiber morfolojisi ve yama gözenekliliğini çok fazla etkilememiş olmasının kardiyak

yamaların dayanıklılık ve esnekliğini deęiřtirmedięi dűřünűlmektedir. Genel olarak yamaların kopma uzamaları çok fazla deęildir. Kardiyak yamalar kuvvet altında Őekil deęiřtirmeye karřı direçli dolayısı ile dayanıklıdırlar. Dayanabildikleri maksimum çekme gerilmesi deęerleri de yűksektir. Elastisite modűlű deęerleri yani yama elastikiyeti ilgili literatűr ile karřılařtırıldıęında kardiyak yamalardan beklenen mekanik ۆzellikleri saęlamaktadır.

Kardiyak kalp kası hűcreleri (kardiyomiyositler) kalp kası (miyokard) boyunca elektrik sinyallerini kullanarak bir atım gerçekleřtirir. Saęlıklı bir yetiřkin kalbinden her atımda 1.25 Hz frekansa sahip 5V/cm deęerinde bir akım geçer. O nedenle kalp krizi sonrası hasar gűrműř kalp kaslarına destek olmak űzere tasarlanan kardiyak doku iskelelerinin kalbin űzerinden geçen akımı ileterek kalp kasına fonksiyonel açıdan benzemesi istenir. Dolayısı ile kardiyak yama iskelelerinde aranan bir dięer ۆzellik ise malzemenin iletkenlięidir. űretilen kardiyak yamaların (%0.00, %0.03, %0.06, %0.19) hem kuru hem de ıslak iletkenlik deęerleri (S/m) oda sıcaklıęında 4 nokta prob teknięi kullanılarak ۆlűlműřtűr (izelge 4.4). Aęırlıkça farklı oranlarda %0.00, %0.03, %0.06, %0.19 CoO nanopartikűl içeren kuru PLA/PCL kardiyak yamaların iletkenlik deęerleri sırasıyla 5.05×10^{-7} S/m, 5.49×10^{-6} S/m, 4.00×10^{-5} S/m ve 5.33×10^{-4} S/m olarak ۆlűlműřtűr. Aęırlıkça farklı oranlarda %0.00, %0.03, %0.06, %0.19 CoO nanopartikűl içeren ıslak PLA/PCL kardiyak yamaların iletkenlik deęerleri ise sırasıyla 6.62×10^{-6} S/m, 7.00×10^{-5} S/m, 2.57×10^{-4} S/m ve 3.77×10^{-4} S/m olarak ۆlűlműřtűr. Genel olarak katkısız ve kompozit yapıda olmayan polimerler yarı iletken veya yalıtıkandırlar. Yarı iletken polimerlerin iletkenlik deęerleri 10^{-2} S/m ile 10^{-6} S/m arasındadır. CoO içermeyen PLA/PCL kardiyak yamaların kuru (5.05×10^{-7}) ve ıslak (6.62×10^{-6}) iletkenlik deęerlerine bakıldıęında yarı iletken oldukları sűylenebilir. CoO nanopartikűllerinin fiberler içerisine farklı oranlarda yerleřtirilmesi malzemenin iletkenlięini artırmıřtır. İletkenlik deęerleri artan CoO oranıyla birlikte artmıřtır. Hatta aęırlıkça %0.06 ve %0.19 oranında CoO içeren CoO/PLA/PCL yamaların iletkenlik deęerleri yarı iletkenlik űst sınırı olan 10^{-6} S/m deęerinden bűyűk olduęu için bu yamaların iletken olduęunu sűyleyebiliriz. Ayrıca ıslak yamaların iletkenlik deęerleri suyun iletken olması nedeniyle kuru hallerine kıyasla on katı artmıřtır.

Sonuç olarak sunulan tez çalışması kapsamında kalp krizi sonrası kalp kaslarında oluşan hasar nedeniyle, hasarlı kalp kasını desteklemek amacıyla CoO/PLA/PCL kardiyak

yamalar tasarlanmıştır. Üretim sürecinde kardiyak yamaları oluşturan bileşenlerin kimyasal yapılarında herhangi bir değişim olmamıştır. Kardiyak yamaları oluşturan polimerik fiberlerin genel olarak doğrusal olmaları ve toplayıcı yüzeyinde birikim yapmadan belirgin bir doğrultuda olmasa da kısmen yönlendirilebilmeleri sağlanabilmiştir. Böylece kalp kasını ve ekstraselüler matriksi kısmen taklit edebilen gözenekli, ıslanabilir, elastik ve iletken kardiyak yamalar üretilebilmiştir. Kardiyak yamalar rejenerasyonu uzun süren kas dokusunu uzun süreli destekleyebilecek şekilde oldukça yavaş bozunmakta ve kalp kası hücreleri üzerinde herhangi bir sitotoksik, apoptotik, nekrotik etki göstermemektedir. Kısa süreli inkübasyon sonrasında kalp kası hücrelerinin gözenekli fibröz yama yüzeylerine tutunma (adhezyon) eğilimi gösterdikleri söylenebilir. Yapılan karakterizasyon çalışmaları neticesinde PLA/PCL/CoO kardiyak yamaların *in-vivo* biyomedikal uygulamalarda kullanım potansiyeli olduğu düşünülmektedir. Ancak biyomalzemenin *in-vivo* hayvan çalışmaları yapılarak medikal alanda kullanım potansiyeli kuvvetlendirilmelidir.

KAYNAKLAR

- Ackermann, M.A., Hu, L-Y.R. ve Kontrogianni-Konstantopoulos, A., 2012. in *Cardiomyopathies From Basic Research to Clinical Management*, Veselka, J. (Eds.), IntechOpen, Chapter 13.
- Aghdam, R.M., Shakhesi, S., Najarian, S., Mohammadi, M.M., Ahmadi Tafti, S.H. ve Mirzadeh, H., 2014. Fabrication of a nanofibrous scaffold for the in vitro culture of cardiac progenitor cells for myocardial regeneration. *Int. J. Polym. Mater. Polym. Biomater*, 63, 229-239.
- Aksun, M., 2019. Kalp Kası. (12.09.2019)
- Altaş Gözübüyük, A.N., 2009. Bor Katkılı Naylon 6 Nanofiberlerin Elektrosinleme Yöntemi ile Eldesi, (Yüksek Lisans Tezi), Selçuk Üniversitesi. Kimya Öğretmenliği Programı, Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya.
- Anatomy ve Physiology. OpenStax College. 25 Nisan 2013. <http://cnx.org/content/col11496/latest/> (24 Eylül 2018).
- Anonim, 2007. Anatomi, Milli Eğitim Bakanlığı, Güzellik ve Saç Bakım Hizmetleri Alanı, Ankara.
- Anonim, 2017. Biological evaluation of medical devices - Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity, International Organization for Standardization. <https://www.iso.org/standard/36406.html> (15.12.2019).
- Anonim, 2018. Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM), Metalurji ve Malzeme Mühendisliği. <https://www.metalurjik.net/taramali-elektron-mikroskobu-sem> (24.02.2020).
- Anonim, 2019. Yeni-Kimlik.com, <https://yeni-kimlik.com/kalp-organi.html> (06.01.2020).
- Aras, D., 2015. Kas (14.02.2019).
- Arumugam, R., Srinadhu E.S. ve Subramanian, B., 2019. B-PVDF based electrospun nanofibers – A promising material for developing cardiac patches. *Medical Hypotheses*, 122, 31-34.
- Augustine, R., Kalarikkal, N. ve Thomas, S. 2015. Electrospun PCL Membranes Incorporated with Biosynthesized Silver Nanoparticles as Antibacterial Wound Dressings, *Applied Nanoscience*, DOI 10.1007/s13204-015-0439-1.
- Ayyıldız, A., 2014. Genel Kalp Damar Sistemi. <http://www.tavsiyeeyorum.com> (16.04.2019).
- Baei, P., Jalili-Firoozinezhad, S., Rajabi-Zeleti, S., Tafazzoli-Shadpour, M., Baharvand, H. ve Aghdami, N., 2016. Electrically conductive gold nanoparticle-chitosan thermosensitive hydrogels for Cardiac tissue engineering. *Materials Science and Engineering C* 63;131-141.
- Balasubramanian, P., Prabhakaran, M.P., Kai, D. ve Ramakrishna, S., 2013. Human cardiomyocyte interaction with electrospun fibrinogen/gelatin nanofibers for myocardial regeneration, *J. Biomater. Science Polymer Ed.* 24;1660-1675.
- Bhaarathy, V., Venugopal, J., Gandhimathi, C., Ponpandian, N. , Mangalaraj, D. ve Ramakrishna, S., 2014. Biologically improved nanofibrous scaffolds for cardiac tissue engineering. *Materials Science and Engineering C*, 44, 268-277.
- Bhushani, J.A. ve Anandharamakrishnan, C., 2014. Electrospinning and Electrospinning Techniques: Potential Food Based Applications. *Trends in Food Science & Technology*, 38; 21-33.
- Boffito, M., Sartori, S., ve Ciardelli, G., 2013. Polymeric scaffolds for cardiac tissue engineering: requirements and fabrication Technologies. DOI 10.1002/pi.4608.

- Boğa, A., 2007. Ağır Metallerin Özellikleri ve Etki Yolları. Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, 16: 218, Adana.
- Bulduk, B., Aktaş, M.C. ve Bulduk, M., 2017. Akut Miyokard İnfarktüsü Sonrası Gelişen Ruhsal Bozukluklar. JAREN, 3(ek sayı), 24-27.
- Celep, Ş., 2007. Nanoteknoloji ve Tekstil Uygulama Alanları, (Yüksek Lisans Tezi), Çukurova Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- Chen, Y., Zeng, D., Ding, L., Li, X.L., Liu, X.T., Li, W.J., Wei, T., Yan, S., Xie, J.H., Wei, L. ve Zheng, Q.S., 2015. Three-dimensional poly-(ϵ -caprolactone) nanofibrous scaffolds directly promote the cardiomyocyte differentiation of murine-induced pluripotent stem Cells through Wnt/ β -catenin signaling, BMC Cell Biol. 16;22.
- Çakmak, S., 2011. Polimerik Nanofiber Üretim Yöntemleri, Aylık Nanoteknoloji ve Nanotıp Bilim Dergisi, Nanobülten, Sayı: Mayıs 2011, Hacettepe Üniversitesi, Ankara.
- Çaydamlı, Y., 2012. Elektrosinning Yöntemi ile Biyopolimer Esaslı Nanoyapıların Hazırlanması ve Karakterizasyonu, (Yüksek Lisans Tezi), Dokuz Eylül Üniversitesi. Tekstil Mühendisliği Bölümü, Tekstil Mühendisliği Anabilim Dalı, Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- Curtis, M.W. ve Russell, B., 2009. Journal of Cardiovascular Nursing, 24(2),87–92.
- Dapeng Li., Margaret W. Frey. ve Antje J. Baumner., 2006. Electrospun polylactic acid nanofiber membranes as substrates for biosensor assemblies. Journal of Membrane Science Volume 279, Issues 1-2, Pages 354-363.
- Demirpolat, E. ve Yerer Aycan, M.B., 2016. 6-Shogaol, 6-Gingerol ve Kurkumin' in A549 Hücrelerinde Canlılık Üzerine Etkileri. Sağlık Bilimleri Dergisi, 25(1);24-28.
- Dinç, H., 2013. Polivinil Borat Sentezi; Elektrosinning Yöntemiyle Nanofiber Hazırlanması ve Karakterizasyonu, (Yüksek Lisans Tezi), Selçuk Üniversitesi. Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı, Konya.
- Doğan, M.S., 2011. Koroner Arter Hastalığında Miyokardiyal İskeminin Kardiyak MR Perfüzyon Tetkiki ile Değerlendirilmesi: Kateter veya BT Anjiyografi Bulguları ile Karşılaştırma, (Uzmanlık Tezi), Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Radyoloji Anabilim Dalı, İzmir.
- Engelmayr, G.C., Cheng, M., Bettinger, C.J., Borenstein, J.T., Langer, R. ve Freed, L.E., 2008. Accordion-like honeycombs for tissue engineering of cardiac anisotropy. Nat. Mater, 7, 1003-1010.
- Fleischer, S., Shapira, A., Regev, O., Nseir, N., Zussman, E. ve Dvir, T., 2014. Albumin fiber scaffolds for engineering functional Cardiac tissues, Biotechnol. Bioeng. 111;1246-1257.
- Gupta, B. ve Saxena, S., 2011. Chitosan-Polyethylene Glycol Coated Cotton Membranes for Wound Dressing. Indian Journal of Fibre & Textile Research, 36, 272-280.
- Güleş, Ö., ve Eren, Ü., 2008. Apoptozun belirlenmesinde kullanılan yöntemler. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 19(2), 73-78.
- Habashi, F., 1997. Handbook of Extractive Metallurgy, Vol. 2, WILEY-VCH, Germany.
- Han D. ve Gouma P.I., 2006. Electrospun Bioscaffolds That Mimic The Topology of Extracellular Matrix. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, 2, 37– 41.

- Haschek W.M., Rousseaux C.G. ve Wallig M.A. In Fundamentals of Toxicologic Pathology, Haschek W.M., Rousseaux C.G. and Wallig M.A. (Eds.), 2nd Edition, Academic Press, Canada, Chapter 12, 2010.
- Hoit, B.D., Cardiology Clinics 35 (2017) 481–490.
- Huang, Z.M., Zhang, Y.Z., Kotaki, M. ve Ramakrishna, S., 2003. A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites, Compos. Science Technology 63;2223-2253.
- Hussain, A., Collins, G., Yip, D. ve Cho, C.H., 2013. Functional 3-D Cardiac co-culture model using bioactive chitosan nanofiber scaffolds, Biotechnol. Bioeng 110;637-647.
- Kaplan, M., Çelik, Ö. ve Bulduk, S., 2011. Co Katkılarının ZnO'in Mikroyapı ve İletkenlik Özelliklerine Etkileri. 6th International Advanced Technolgies Symposium, 16-18 Mayıs; 189-195.
- Kapnisi, M. ve Mansfield, C., 2018. Auxetic Cardiac Patches with Tunable Mechanical and Conductive Properties toward Treating Myocardial Infarction. Europe PMC Funders Group, Adv. Funct Mater. 28;21.
- Kartal, G., Güven, A., Kahvecioğlu, Ö. ve Timur, S., 2004. Metallerin Çevresel Etkileri – II. İstanbul Teknik Üniversitesi, Metalürji ve Malzeme Mühendisliği Bölümü, 137: 46-51.
- Kasap, H., 2013. Kalp Nedir. doktorsitesi.com, (05.02.2019).
- Kaynak Bayrak, G., 2019. Hücrelerinden Arındırılmış Miyokardiyal doku ile Hücre Tabakası Destekli Kalp Yaması Geliştirilmesi, (Doktora Tezi), Fen Bilimleri Enstitüsü, Hacettepe Üniversitesi. Biyomühendislik Anabilim dalı, Ankara.
- Khan, M., Xu, Y., Hua, S., Johnson, J., Belevych, A., Janssen, P.M.L., Gyorke, S., Guan, J. ve Angelos, M.G., 2015. Evaluation of changes in morphology and function of human induced pluripotent stem cell derived cardiomyocytes (hiPSC-CMs) cultured on an aligned-nanofiber Cardiac Patch, PLoS ONE 10;1-19.
- Kharaziha, M., Nikkhah, M., Shin, S.R., Annabi, N., Masoumi, N., Gaharwar, A.K., Camci-Unal, G. ve Khademhosseini, A., 2013. PGS: Gelatin nanofibrous scaffolds with tunable mechanical and structural properties for engineering Cardiac tissues, Biomaterials 34;6355-6366.
- Kim E. J., Yoon S. J., Yeo G.D., Pai C.M. ve Kang I. K., 2009. Preparation of biodegradable PLA/PLGA membranes with PGA mesh and their application for periodontal guided tissue regeneration. Biomedical Materials, Volume 4, Number 5.
- Kim G.H. ve Yoon H., 2008. A Direct-Electrospinnig Process by Combined Electric Field and Air-Blowing System for Nanofibrous Wound-Dressings. Applied Physics A Material Science&Processing, 90, 389-394.
- Kim, H.N., Jiao, A., Hwang, N.S., Kim, M.S., Kang, D.H., Kim, D.H. ve Suh, K.Y., 2013. Nanotopography-guided tissue engineering and regenerative medicine. dv. Drug Deliv. Rev., 65, 536-558.
- Kitsara, M., Agbulut, O., Kontziampasis, D., Chen, Y. ve Menasché, P. (2017). Fibers for hearts: a critical review on electrospinning for cardiac tissue engineering. Acta biomaterialia, 48, 20-40.
- Kitsara, M., Joanne, P., Boitard, S.E., Ben Dhiab, I., Poinard, B., Menasche, P., Gagnieu, C., Forest, P., Chen, Y. ve Agbulut, O., 2015. Fabrication of Cardiac Patch by using electrospun collagen fibers, Microelectron. Engineering 144;46-50.

- Li, Y., Huang, G., Zhang, X., Wang, L., Du, Y., Lu, T.J. ve Xu, F., 2014. Engineering cell alignment in vitro. *Biotechnol. Adv.*, 32, 347-365.
- Lozano, R., Naghavi, M., Foreman, K., Lim, S., Shibuya, K., Aboyans, V., ve AlMazroa, M. A., 2012. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *The lancet*, 380(9859), 2095-2128.
- Macchiarelli, G., Ohtani, O., Nottola, S.A., Stallone, T., Camboni, A., Prado, I.M. ve Motta, P.M., 2002. A micro-anatomical model of the distribution of myocardial endomysial collagen. *Histol. Histopathol*, 17, 699-706.
- McManus, M.C., Boland, E.D., Simpson, D.G., Barnes, C.P. ve Bowlin, G.L., 2007. Electrospun fibrinogen: feasibility as a tissue engineering scaffold in a rat cell culture model, *J. Biomed. Mater. Res. – Part A* 81;299-903.
- Mehrabi, A., Baheiraei, N., Adabi, M. ve Amirkhani, Z., 2019. Development of a Novel Electroactive Cardiac Patch Based on Carbon Nanofibers and Gelatin Encouraging Vascularization, *Applied Biochemistry and Biotechnology*. DOI: 10.1007/s12010-019-03135-6.
- Mertz, W. (1987). Trace elements in human and animal nutrition (Vol. 1). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/C2009-0-02859-1>, (06.10.2019).
- Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*, 65(1-2), 55-63.
- Özdoğan, E., Demir, A. ve Seventekin, N., 2006. Nanoteknoloji ve Tekstil Uygulamaları. *Tekstil ve Konfeksiyon*, 4, 225-229.
- Pedrotty, D.M., 2004. Engineering skeletal myoblasts: roles of three-dimensional culture and electrical simulation. *AJP Hear. Circ. Physiol*, 288, H162H1626.
- Polat, E., 2013. Polikaprolaktonun Elektostatik Eğirmesi ve RGD Yüzey Modifikasyonu ile Periferik Sinir İyileşme Kanalları Üretim ve Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı, Ankara.
- Prabhakaran, M.P., Mobarakeh, L.G., Kai, D., Karbalaie, K., Nasr-Esfahani, M.H. ve Ramakrishna, S., 2014. Differentiation of embryonic stem Cells to cardiomyocytes on electrospun nanofibrous substrates, *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater* 102;447-454.
- Reed, G.W., Rossi, J.E. ve Cannon, C.P., 2016. Acute myocardial infarction. *Seminars*, S0146736(16)30677-8.
- Riss, T. L. ve Moravec, R. A., 2006. Cell proliferation assays: improved homogeneous methods used to measure the number of cells in culture. In *Cell biology Academic Press* (pp. 25-31).
- Senyo, S.E., Lee, R.T. ve Kühn, B., 2014. Cardiac regeneration based on mechanisms of cardiomyocyte proliferation and differentiation. *Stem Cell Research*, Vol. 13, 532-541.
- Sigel, H. (1994). *Metals in biological systems: By Maureen J. Kendrick, Michael T. May, Martin J. Plishka and Kerry D. Robinson*, published by Ellis Horwood, New York, London, Toronto, Sydney, Tokyo, Singapore, 1992, ISBN 0-13-577727-5, 183 pp.
- Sinha, M., Banik, R.M., Haldar, C. ve Maiti, P., 2013. Development of Ciprofloxacinhydrochloride Loaded Poly(Ethylene Glycol)/Chitosan Scaffold as Wound Dressing. *Journal of Porous Materials*, 20, 799–807.

- Sireesha, M., Jagadeesh Bahu, V. ve Ramakrishna, S., 2015. Biocompatible and biodegradable elastomer/fibrinogen composite electrospun scaffolds for Cardiac tissue regeneration, *RSC Adv.* 5;103308-103314.
- Şimşek, M., 2014. Nanofiber-Desenli polimerik Membranlar: Yüzey Kimyası, Topografisi ve Hücrel Etkileşimler, (Doktora Tezi), Fen Bilimleri Enstitüsü, Hacettepe Üniversitesi, Biyomühendislik Anabilim Dalı, Ankara.
- Uzun, İ.H. ve Bayındır, F., 2011. Dental Materyallerin Biyouyumluluk Test Yöntemleri. *Gazi Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi*, 28 (2), 115-122.
- Van Vleet, J.F., Ferrans, V.J. ve Herman, E., 2002. in *Handbook of Toxicologic Pathology*, Haschek W.M., Rousseaux C.G. and Wallig M.A (Eds.), Second Edition, Volume 2, Academic Press.
- Vural, K. ve Öz, M.C., 1997. Kalıcı Amaçlı Sol İventrikül Destek Cihazları: TCI HEARTMATE, Cardioracic Surgery Department, College of physicians and Surgeons, New York, NY 10030, U.S.A.
- Zahedi, P., Rezaeian, I., Siadat, S.O., Jafari, S.H. ve Supaphol, P., 2010. A Review on Wound Dressings with An Emphasis on Electrospun Nanofibrous Polymeric Bandages. *Polymers Advanced Technologies*, 21,77–95.
- Zhang, X., Baughman, C.B. ve Kaplan, D.L., 2008. In vitro evaluation of electrospun silk fibroin scaffolds, *Front. Biosci.* 9;1422.
- Zhou, X., Wang, H., Zhang, J., Li, X., Wu, Y., Wei, Y., Ji, S., Kong, D. ve Zhao, Q., 2017. Functional Poly(ϵ -caprolactone)/Chitosan Dressings with Nitric Oxidoreleasing Property Improve Wound Healing. *Acta Biomaterialia*, 54, 128–137.
- Nelson, W.C. ve Kim, C-J., 2012. Droplet actuation by electrowetting-on-dielectric (EWOD); a review, *J. Adhes. Sci, Technol*, 26;1-25.
- Xie, J., Willerth, S.M., Li, X., Macewan, M.R., Rader, A., Sakiyama-elbert, S.E. ve Xia, Y., 2008. The differentiation of embryonic stem Cells seeded on electrospun nanofibers into neural lineages, *Biomaterials* 30;354-362.
- Xu, B., Li, Y., Fang, X. Thouas, G.A., Cook, W.D., Newgreen, D.F. ve Chen, Q., 2013. Mechaically tissue-like elastomeric polymers and their potential as a vehicle to deliver functional cardiomyocytes, *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 28;354-365.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı : Gülşen ŞAHİN
Doğum Tarihi / Yeri : 21/05/1994 - SAMSUN
Yabancı Dili : İngilizce
Medeni Durum : Bekar
TC Kimlik No : 69424009532
Tel No : 0 (507) 890 05 24
e-mail : gulsensahin5542@gmail.com

Eğitim Bilgileri

Derece	Eğitim Birimi	Başlangıç & Mezuniyet Tarihi
Lise	Samsun 19 Mayıs Lisesi (Samsun/İlkadım)	2008 – 2012
Lisans	Gümüşhane Üniversitesi - Genetik ve Biyomühendislik Bölümü (Gümüşhane)	2013 - 2017
Yüksek Lisans	Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Biyomühendislik Anabilim Dalı (Tokat)	2017- 2020
Staj Deneyimi	1- Samsun 19 Mayıs Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Genetik Laboratuvarı 2- Samsun ADEKA İlaç Sanayi ve Ticaret A.Ş.	2015 (20 gün) 2016 (20 gün)

Görev Aldığı Projeler

1- Projedeki Görevi: Yürütücü, “Tıkanan Damarlardaki Akışın Hidrodinamik Olarak İncelenmesi”, Lisans Bitirme Tezi, 2017, Tamamlandı.

2- Projedeki Görevi: Yürütücü, “*Morus rubra* (Mordut) Meyvesinin Afa Glukozidaz ve Alfa Amilaz Testleri ile Antidiyabetik Özelliklerinin Araştırılması”, 2209-A Üniversite Öğrencileri Yurt İçi Araştırma Projeleri Destek Programı, 2016-1, Tamamlandı.

3-Projedeki Görevi: Yardımcı Araştırmacı, “Gümüşhane ve Çevresinde Bulunan Bazı Endemik Bitki Türlerinin Çiçek Kısımlarının Antioksidan Özelliklerinin Araştırılması” 2209-A Üniversite Öğrencileri Yurt İçi Araştırma Projeleri Destek Programı, 1919B011403632, Tamamlandı.

4- Projedeki Görevi: Bursiyer Öğrenci, “*Hypericum perforatum* Yağı Yüklenmiş Polimerik Membrnların Yanık Yara İyileşmesinde Skar Doku Oluşumuna Etkisinin İncelenmesi”, 3001- Başlangıç AR-GE, 1117S542, Tamamlandı.

5- Projedeki Görevi: Bursiyer Öğrenci, “Laparoskopik Apandektomi İçin Biyobozunur Kelepçe ve Uygulama Aparatının Üretimi”, 1005-Yeni Fikirler ve Ürünler, 217S533, Tamamlandı.

Bildiriler

1- Eğri, Ö., Şahin, G., (2019). “PLA/PCL/CoO Kardiyak Yamaların Üretimi ve Karakterizasyonu”. VII. ISMS International Symposium on Academic Studies in Science, Engineering and Architecture Sciences, Ankara (Sözlü Sunum).

2- Şahin, G., Turan, İ., (2017). “*Morus rubra* (Mordut) Meyvesinin Afa Glukozidaz ve Alfa Amilaz Testleri ile Antidiyabetik Özelliklerinin Araştırılması”. Teknoloji Transfer Ofisi 2017 Düşünden Gerçeğine Proje Pazarı (Poster Sunumu).

3- Şahin, G., Erdaoğan, A., Kaçıran, A., Artık, Y., Arslan, S., Turan, İ., (2016). “Gümüşhane ve Çevresinde Bulunan Bazı Endemik Bitki Türlerinin Çiçek Kısımlarının

Antioksidan Özelliklerinin Araştırılması". Fırat Üniversitesi IV. Biyomühendislik Öğrenci Kongresi, Kongre Tübitak Proje tarafından desteklenmiştir (1919B011403632) (Poster Sunumu).

Sertifikalar

Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası, Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi HADMEK, Ekim 2018.

