



In vitro recellularization and characterization of sheep pulmonary valves after decellularization for preclinical studies

Müslüm Süleyman İnal¹ , Cihan Darcan² , Ali Akpek^{3*}

¹Department of Molecular Biology and Genetics, Institute of Science, Bilecik Seyh Edebali University, 11230, Bilecik, Türkiye

²Department of Molecular Biology and Genetics, Faculty of Science, Bilecik Seyh Edebali University, 11230, Bilecik, Türkiye

³Department of Biomedical Engineering, Faculty of Electrical and Electronics, Yıldız Technical University, 34220, İstanbul, Türkiye

Highlights:

- Heart valves of merino sheep can be completely decellularized with SD and SDS
- Regenerative human valves can be produced from decellularized sheep heart valves
- Decellularized sheep heart valve has potential for use in biomedical engineering or tissue engineering

Keywords:

- Tissue engineering
- pulmonary valve
- decellularization
- xenograft, regeneration
- biomaterial

Article Info:

Research Article

Received: 04.03.2023

Accepted: 04.05.2024

DOI:

10.17341/gazimmfd.1259974

Correspondence:

Author: Ali Akpek

e-mail:

aliakpek@yildiz.edu.tr

phone: +90 530 016 2669

Graphical/Tabular Abstract

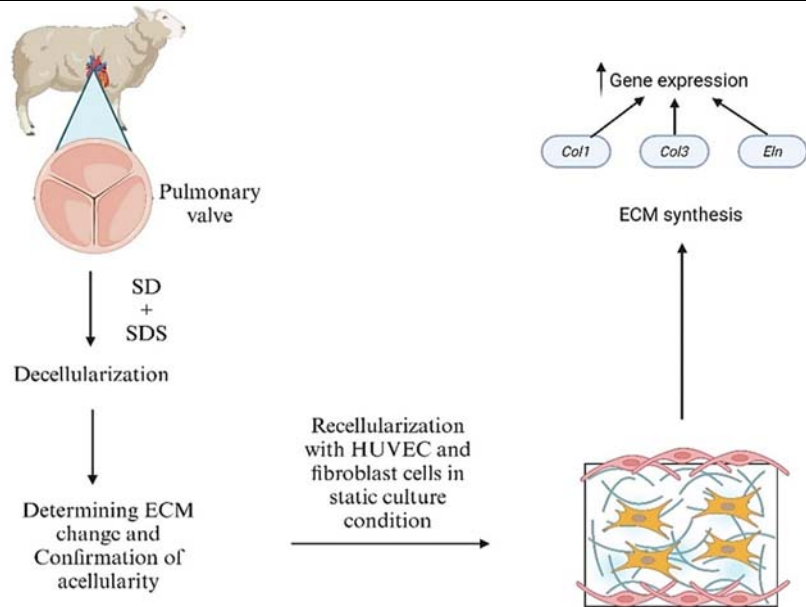


Figure A. Decellularization and *in vitro* recellularization steps of sheep pulmonary heart valve

Purpose: In this study, the pulmonary heart valves of Merino sheep, which are abundant in Turkey, were decellularized with SD and SDS. Various characterizations have been made to determine the decellularized scaffold's potential for heart valve tissue engineering. They were then seeded with HUVEC and human dermal fibroblast cells. Regenerative potential was evaluated after 7 days of static culture condition. The general flow chart of the study is given in Figure A.

Theory and Methods: Pulmonary heart valves of a Merino sheep were decellularized with SD and low-density SDS for 24 hours. For characterization studies, H&E stain were performed in histological studies, the amount of residual DNA was determined by nanodrop, SEM imaging was performed to observe endothelial layers on the surface. Metabolic activity (MTT assay) was measured to determine cell proliferation on days 1, 3 and 7 in the recellularized scaffolds. H&E and DAPI/Phalloidin staining were then performed to visualize cell adhesion and cells penetrating into the scaffold. Additionally, the samples were imaged with SEM to observe reendothelialization. Finally, the gene expressions of collagen type I, collagen type III and elastin, which are indicators of new ECM synthesis, were determined by real-time PCR.

Results: H&E and Movat's pentachrome images showed that there was no change in the amount and organization of collagen and the 3-layer leaflet structure was preserved. As a result of DNA quantification, it was observed that the decellularization process cleared approximately 98% of DNA. Cell density has increased day by day. Histological findings showed that HUVECs covered the scaffold surface. An increase in Col1, Col3 and Eln gene expression was observed in cells transplanted to the artery wall, and new ECM began to be synthesized.

Conclusion: As a result, decellularized pulmonary valves of Merino sheep and differentiated human cells expressed regenerative markers. This shows that it is possible to obtain a living, biocompatible heart valve for tissue engineering. These results seem promising for clinical studies.



Koyun pulmoner kalp kapakçıklarının hücreleştirilmesi sonrası prelinik çalışmalar için *in vitro* olarak yeniden hücrelendirilmesi ve karakterizasyonu

Müslüm Süleyman İnal¹, Cihan Darcan², Ali Akpek^{3*}

¹Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, 11230, Bilecik, Türkiye

²Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, 11230, Bilecik, Türkiye

³Yıldız Teknik Üniversitesi, Elektrik Elektronik Fakültesi, Biyomedikal Mühendisliği, 34220, İstanbul, Türkiye

ÖNEÇİK ANLAR

- Sodyum deoksikolat ve sodyum dodesil sülfat ile tam hücreleştirme sağlanabilir
- Korunmuş ECM histomimarisi elde edilebilir
- İnsan dermal fibroblastları hücreleştirilmiş koyun pulmoner kapakçığında yeni ECM üretimini gerçekleştirebilir

Makale Bilgileri

Araştırma Makalesi

Geliş: 04.03.2023

Kabul: 04.05.2024

DOI:

10.17341/gazimmfd.1259974

Anahtar Kelimeler:

Doku mühendisliği,
pulmoner kapakçık,
hücreleştirme,
ksenograft, rejenerasyon,
biyomateryal

ÖZ

Doku mühendisliğinde hücreleştirilmiş greftler umut verici sonuçlar göstermiştir. Hücreleştirmenin amacı immünojenik bileşenlerin olmadığı, doğal doku mimarisine sahip ve yeniden hücreliliği sağlayabilecek bir iskele oluşturmaktır. Çalışmamızın amacı, hücreleştirilmiş genç koyunların pulmoner kalp kapakçıkları üzerinde HUVEC ve insan dermal fibroblast hücrelerinin kokültürü ile birlikte canlı/rejeneratif bir kapak elde etmek ve ardından klinik çalışmalara uygunluğunu belirlemek için *in vitro* karakterizasyonlarını gerçekleştirmektir. Deterjan tabanlı metodla hücreleştirilen koyun pulmoner kalp kapakçıklarına çeşitli karakterizasyon testleri uygulanmıştır. HUVEC ve dermal fibroblast hücreleri iskele üzerine ekildi ve canlılıkları MTT analiziyle, adezyonu SEM ile, hücre sızması histolojik boyama ile belirlendi. Son olarak elde edilen canlı kapağın rejeneratif kabiliyetini belirlemek için kollajen tip I (Col1), kollajen tip III (Col3), elastin (Eln) gen ifadeleri PCR ile analiz edildi. Sonuçlar, hücre çoğalmasının iskele üzerinde gün geçtikçe arttığını göstermiştir. Histolojik bulgularda özellikle arter duvarı örneklerinde yeniden hücreliliğin neredeyse tamamen sağlandığı gözlenmiştir. PCR bulgularına göre arter duvarı örneklerinde Col1, Col3 ve Eln gen ifadelerinde önemli bir artış gözlenmiştir. Bu çalışma ile birlikte literatürde ilk defa hücreleştirilmiş koyun kalp kapakçıkları üzerinde farklılaşmış insan hücrelerinin rejenerasyon potansiyeli olduğu gözlenmiş ve yeni ECM üretimi ile ilgili belirteçler analiz edilmiştir. Sonuç olarak genç koyunların hücreleştirilmiş kalp kapakçıklarının, doku mühendisliği çalışmalarında başlangıç matrisi olarak kullanılabilirliğini, klinik araştırmalara ihtiyaç olduğunu öneriyoruz.

In vitro recellularization and characterization of sheep pulmonary valves after decellularization for preclinical studies

HIGHLIGHTS

- With sodium deoxycolate and sodium dodesil sulfate, full decellularization can be achieved
- Protected ECM histoarchitecture can be obtained
- Human dermal fibroblasts can generate new ECM in decellularized sheep pulmonary valve

Article Info

Research Article

Received: 04.03.2023

Accepted: 04.05.2024

DOI:

10.17341/gazimmfd.1259974

Keywords:

Tissue engineering,
pulmonary valve,
decellularization,
xenograft, regeneration,
biomaterial

ABSTRACT

Decellularized grafts have shown promising results in tissue engineering. The aim of decellularization is to create a scaffold that is devoid of immunogenic components, has natural tissue architecture, and can provide cellularity again. The aim of our study is to obtain a living/regenerative valve by coculture of HUVEC and human dermal fibroblast cells on the pulmonary heart valves of decellularized young sheep and subsequently perform their *in vitro* characterization to determine its suitability for clinical studies. Various characterization tests were applied to sheep pulmonary heart valves decellularized by the detergent-based method. HUVEC and dermal fibroblast cells were seeded on the scaffold, and their viability was determined by MTT analysis, adhesion by SEM, and cell infiltration by histological staining. Finally, to determine the regenerative ability of the resulting live cap, collagen type I (Col1), collagen type III (Col3), and elastin (Eln) gene expressions were analyzed by PCR. The results showed that cell proliferation increased day by day on the scaffold. In histological findings, it was observed that cellular regeneration was almost completely achieved, especially in arterial wall samples. According to PCR findings, a significant increase in Col1, Col3, and Eln gene expressions was observed in arterial wall samples. In this study, for the first time in the literature, the regeneration potential of differentiated human cells on decellularized sheep heart valves was observed, and markers related to new ECM production were analyzed. In conclusion, we suggest that the decellularized heart valves of young sheep can be used as a starting matrix in tissue engineering studies, and clinical studies are needed.

*Sorumlu Yazar/Yazarlar / Corresponding Author/Authors : muslumsuleyman@hotmail.com, cihan.darcan@bilecik.edu.tr,

*aliakpek@yildiz.edu.tr / Tel: +90 530 016 2669

1. Giriş (Introduction)

Kardiyovasküler hastalıklar (KVH) dünya çapında önde gelen ölüm nedenlerinden biridir [1]. Kalp kapakçık hastalıkları en sık görülen KVH'ler arasındadır ve temelde yetersizlik (regürjitasyon) veya darlık (stenoz) olmak üzere iki farklı şekilde gelişmektedir [2]. Bu iki sorun konjenital kusurlar, romatizmal ateş, enfektif endokardit ve kalp kapakçığı kalsifikasyonu gibi farklı hastalıklar sonucu ortaya çıkmaktadır [3]. Dünya çapında yeni doğanların yaklaşık %1'inde konjenital kalp kapakçığı kusurları olduğu ve yalnızca ABD'de toplam nüfusun yaklaşık %2,5'ini etkilediği bildirilmiştir [4, 5]. Kalp kapakçığı hastalıklarının tedavisinde ilaçlar yetersiz geldiğinde kapakçık değişimi (replasmanı) yapılmaktadır. Tedavilerde kullanılan replasmanlar; büyüme özelliği olmayan, ömür boyu antikoagülan ilaç kullanma zorunluluğu getiren mekanik kalp kapakçığı ve hastalarda immün yanıt oluşturabilen, kısa ömürlü biyoprotetik kapakçıklar olmak üzere iki sınıfa ayrılmaktadır [6]. Mevcut tedavi yöntemlerinin bu dezavantajlarını gidermek üzere kalp kapakçığı doku mühendisliği umut vaat etmektedir [7].

Doku mühendisliğinde 3B biyoyazım, stereolitografi, elektroegirme gibi baskı yöntemleriyle genellikle kollajen, hyalüronik asit, aljinat veya jelatin gibi doğal polimerler, polikaprolakton, poliglaktolik asit, poli L-laktik asit gibi sentetik polimerler kullanılarak doku mühendisliği kullanılan kalp kapakçıkları üretilmeye çalışılmıştır [8, 9]. Fakat kullanılan polimerlerin ikincil yapı değişikliği, partiden partiyeye büyük değişiklik ve yetersiz mekanik özellikleri gibi kusurlarından dolayı elde edilen yapay kalp kapakçıklarının gerek işlevsel gerekse biyodayanımı açısından yeterli verimi gösteremediği bildirilmiştir [10, 11]. Bu yüzden doku mühendisliği alanında başlangıç matrisi olarak kullanılabilir nitelikte iskele elde etmek için biyolojik kökenli greftlerin hücreleştirme çalışmaları gerçekleştirilmektedir. Biyoprotetik kapaklar doğal ECM mimarisine sahip olmasının yanısıra immünojenik özellikte olduğundan dolayı hücreleştirme uygulamaları ile bünyesindeki hücreler uzaklaştırılmakta ve geriye hücresiz, porlu yapıda iskele kalmaktadır [12]. Kalp kapakçığı doku mühendisliğinde ksenogreft (farklı türden elde edilen greft) veya allogreft (aynı türün farklı bireylerinden elde edilen greft) olmak üzere iki farklı kaynaktan yararlanılabilmektedir. İnsana özgü kalp kapakçığı tasarlanırken kaynak olarak allogreftlerin kullanımı sadece kadavra veya organ bağışçıları ile sınırlıdır. Bu yüzden kaynak sorunu olmayan ksenogreftler daha cazip görünmektedir. Fakat ksenogreftlerde de hücreleştirme sonrası ECM'de bulunan ve insanlarda immün yanıt oluşturan ksenoantijenlerin varlığı, greft başarısını olumsuz etkileyebilmektedir [13]. Bu yüzden hücreleştirme metodu, yoğunluğu ve sonrasında karakterizasyon işlemleri hayati önem arz etmektedir.

Kalp kapakçığı doku mühendisliğinin hücreleştirme çalışmalarında donör olarak genellikle domuzlar kullanılmıştır. Bunun sebepleri arasında biyomekanik özelliklerin iyi olması, anatomisinin insan kapakçıklarıyla benzer olması söylenebilir [14]. Fakat domuz kalp kapakçıklarından domuz endojen retrovirüs (PERV) enfeksiyon riski [15], sabitleyici ajan olarak sitotoksik etkisi olan gluteraldehit kullanımı [16] ve klinik bulgulara göre neredeyse tüm çalışmalarda immünojenik etkisinin bulunduğu [17–19] göz önüne alındığında domuzlara alternatif olarak farklı bir ksenograft kaynağının bulunması gerekmektedir. Hücreleştirilmiş koyun kalp kapakçıkları koyun, domuz, tavşan gibi *in vivo* implant modellerinde denenmiştir [20, 21]. Hayvan denemelerinde hücreleştirilmiş koyun kalp kapakçıklarının inflamatuvar yanıtı sebep olmadığı, reselülerizasyonun gerçekleştiği gözlenmiştir [22, 23]. Ancak hücreleştirilmiş koyun kalp kapakçıklarının klinikte denendiği bir çalışmaya rastlanmamıştır. Hücreleştirilmiş domuz kalp

kapakçıklarında hemen hemen tüm karakterizasyonlar gerçekleştirilmiş, *in vivo* denemeleri yapılmış, klinikte birçok kez denenmiş ve hatta ticari ürünler oluşturulmuştur [24–26].

Hücreleştirilmiş koyun kalp kapakçıklarıyla ilgili literatürdeki az sayıdaki çalışmada; koyun kalp kapakçıklarının hücreleştirildikten sonra ayrıntılı karakterizasyon işlemleri yapılmadan *in vitro* reselülerizasyonu denemeleri, çeşitli implant modellerinde kalsifikasyon eğilimleri ve immünojenisitetleri araştırılmıştır [27–29]. Tudorache vd. yaptıkları çalışmada koyun kalp kapakçıklarını hücreleştirilmiş, ardından da yine koyunlara implante edilerek işlevi ve morfolojik değişikliklerini araştırmıştır [30]. Bu çalışmada hücreleştirme işlemi için deterjan tabanlı metot ve ayrıca kriyoprezervasyon işlemleri uygulanmış ve etkinliklerini değerlendirmek için koyunlara transplantasyon ardından karakterizasyonlar gerçekleştirilmiştir. Transplantasyon sonrası hücreleştirilmiş grubun erken vadede etkinliğinin iyi olduğu vurgulanmış fakat kriyoprezerve örneklerinin kalsifikasyona ve immün yanıtı sebep olduğu bildirilmiştir. Halbuki kalp kapakçığı doku mühendisliğinde temel amaç insana özgü kapak tasarlamaktır. İmplant modeli olarak koyun kullanımı aslında allogreft etkinliğini belirlemek adına yapılmıştır. Theodoridis vd. yaptıkları çalışmada hücreleştirilmiş koyun kalp kapakçıklarının, transplantasyon modeli olarak yaşlı koyunlarda matris kılavuzluğunda doku rejenerasyonu potansiyeli araştırılmıştır [29]. Bu çalışmada da allogreftler kullanıldığı için hücreleştirme sonrası insana yönelik olarak ayrıntılı karakterizasyon işlemleri gerçekleştirilmemiştir. Converse vd. yayınlanan bir çalışmalarında koyun aort kalp kapakçığı deterjan tabanlı hücreleştirme ile işledikten sonra karakterizasyon işlemleri yapılmadan biyoreaktör koşullarında insan mezenkimal kök hücreleriyle yeniden hücrelendirmeyi denemiş ve tam bir hücresellik sağlayamadıklarını bildirmişlerdir [27]. Bunlara ek olarak hücreleştirilmiş koyun kalp kapakçıklarının klinik araştırmaları henüz yapılmamıştır. Bu yüzden prelinik çalışmalara ağırlık verilmesi gerekmektedir.

Bu çalışmadaki amacımız, henüz klinik denemelere hazır hale gelmemiş olan koyun kalp kapakçıklarının deterjan bazlı kimyasal metot ile hücreleştirildikten sonra farklılaşmış HUVEC ve insan dermal fibroblast hücreleriyle yeniden hücrelendirilmesini takiben canlı ve rejeneratif bir kapakçık elde etmektir. Başlangıçta 4-6 aylık merinos cinsi koyunların pulmoner kalp kapakçıkları SD ve düşük yoğunlukta SDS gibi iyonik deterjanlar kullanılarak hücreleştirilmiştir. Hücreleştiriminin etkinliği kalıntı DNA miktarının belirlenmesi, H&E boyama, taramalı elektron mikroskopu (SEM) ile belirlenmiştir. Ardından HUVEC ve fibroblast hücrelerinin bu iskele üzerinde kokültürü ile birlikte 1, 3 ve 7. günlerde hücre proliferasyonu MTT analizi ile belirlenmiştir. Daha sonra hücre adezyonunu belirlemek için SEM, iskelelerin iç katmanlarının hücreliliğini belirlemek için H&E ve DAPI/Phalloidin boyama gerçekleştirilmiştir. Ek olarak rejenerasyon potansiyelini belirlemek adına yeni ECM sentezinin belirteçleri olan kollajen tip 1, kollajen tip 3 ve elastin proteinlerini kodlayan gen ifadeleri gerçek zamanlı PCR ile belirlenmiştir.

2. Deneysel Metot (Experimental Method)

2.1. Hücreleştirme ve Karakterizasyon (Decellularization and Characterization)

Hücreleştirme metodu daha önce yayınlanmış bir çalışmamızda ayrıntılı şekilde belirtilmiştir [31]. Kısaça yerel bir mezbahadan 4-6 aylık merinos koyunlarının kesiminden sonra toplanan kalpler soğuk tuzlu su (kütülecce %0,9) çözeltisi içinde laboratuvara getirildi. Steril ortamda pulmoner kapakçıklar kalplerden izole edildi ve dış bağ

dokusu ve yağ dokularından temizlendi. Ardından 24 saat boyunca 37°C sıcaklıkta kütlece %0,8 SD (Sigma, 30970) ve %0,2 SDS (Sigma, 71725) içeren 1X'lik PBS (Sigma, 524650) çözeltisi içinde çalkalandı. Ardından herbiri 12 saat olmak üzere 6 defa streptomisin ve penisilin (100 IU/ml) (Gibco, 15140-122) içeren PBS ile yıkandı. Devamında iskeleler DNaz I (200 µg/mL- Biomatik, A2442) ve RNaz A (50 µg/mL- Biomatik, A3806) çözeltileri ile 24 saat muamele edildi. Bu süre sonunda birkaç tur ultra saf su ile yıkandı. Yıkama işleminin ardından dekontaminasyon (hacimce %70 etanol) işlemi uygulandı. Karakterizasyon işlemleri tamamlanana kadar streptomisin ve penisilin (100 IU/ml) içeren PBS çözeltisinde 4°C'de bekletildi.

Hücreleştirilmesinin ardından kalıntı DNA miktarını belirlemek için manuel DNA izolasyonu yapıldı (Ghatak vd., 2013). Daha sonra DNA miktarları nanodrop (SHIMADZU, BioSpec-nano) ile çift zincirli DNA miktarı (260/280 nm) ölçümleri yapıldı ve hücreleştirilmemiş kontrol grubuyla karşılaştırıldı. Veriler ng/µl cinsinden bulundu ve DNA giderimi % olarak hesaplandı.

Hücreleştirme işleminin pulmoner yaprakçık ve arter kısımlarındaki etkilerini gözlemlemek ve hücrelerin yeterli çıkarımının olduğunu gözlemleyebilmek için H&E boyama daha önce yayınlanmış çalışmadaki prosedüre göre gerçekleştirildi [31]. Boyama işlemini takiben floresan mikroskobu (Olympus, BX53) ile gözlenip fotoğrafları kaydedildi. Hücreleştirilmiş pulmoner yaprakçık ve arter örneklerinin yüzey morfolojisini gözlemlemek için taramalı elektron mikroskobu (SEM) (Zeiss EVO, LS10) kullanıldı.

2.2. Hücre Kültürü Çalışmaları (Cell Culture Studies)

HUVEC (PCS-100-010) ve sünnet derisi fibroblastları primer kültürüne ait hücreler ayrı şekilde %10 FBS (CAPRICORN) + %1 penisilin/streptomisin (Gibco, 15140122) içeren DMEM (CAPRICORN) besiyerinde 75 cm²'lik kültür plağında konfluent hale gelene kadar CO₂ inkübatöründe (ESCO, CCL-170B-8) inkübe edildi. Her 2 günde bir besiyeri tazeyle değiştirildi. Konfluent hale gelen hücreler 1. pasajlama için tripsin/EDTA (Multicell, 325-542-EL) ile kaldırıldı ve yeni kültür plağına aktarıldı. Tüm bu işlemler steril kültür kabininde (ESCO, Sentinel™ Platinum Class II Type A2) gerçekleştirildi. Hücreleştirilmiş iskelelere ekimi yapılacak hücreler 1. pasajdan alındı.

2.3. Yeniden Hücrelendirme (Recellularization)

Hücreleştirilmiş pulmoner yaprakçık ve arter duvarı kısımlarından 0,5 cm²'lik kesitler alındı ve hücre ekiminden önce bir gece hacimce %70'lik etil alkolde steril edildi. Daha sonra steril kabin içine yerleştirilip her iki yüzeyi UV ışığı altında 15 dk boyunca steril edildi. Sterilizasyon işlemlerinden sonra 96 kuyucuklu kültür kabı içine yerleştirilen numunelerin üstüne besiyeri eklendi ve ekim yapılarına kadar CO₂ inkübatörüne yerleştirildi. Öncelikle steril kültür kabininde fibroblast hücreleri tripsinizasyonla kültür kabından ayrıldıktan sonra santrifüjle (Nüve, NF 800R) çöktürüldü ve hücre pelleti 1 ml besiyerinde çözündürüldü. Hücre sayımı için hemositometre kullanıldı ve yaprakçıkların fibrosa katmanına, duvar örneklerinin intima katmanına 10⁴ yoğunlukta ekim gerçekleştirildi. İki saatlik statik kültürden sonra aynı numunelere 10⁵ yoğunlukta HUVEC'lerin ekimi gerçekleştirildi. Aynı sayıda direkt kültür kabına ekilen hücreler kontrol grubu olarak belirlendi ve tüm örnekler inkübatörde statik olarak kültürlendi. Tüm analizler 7 gün statik olarak kültürlenen örneklerde gerçekleştirilirken, sadece MTT analizi 1, 3 ve 7. günlerde gerçekleştirildi.

2.4. Histolojik Çalışmalar (Histological Studies)

7 gün boyunca yeniden hücrelendirilen kapakçıklardaki hücre adezyonu ve iskele içini doldurabilen hücreleri gözlemleyebilmek için

H&E boyama yapılmış ve SEM kullanıldı. Prosedür daha önce tarif edildiği gibi uygulandı. Ek olarak DAPI (Invitrogen, NucBlue™)/Phalloidin (Cell Signaling Technology, Alexa Fluor 488) floresan boyaları kullanılarak hücreler işaretlendi. Kısaca kesitleri alınan örnekler Phalloidin ile 15 dk boyunca karanlık ortamda oda sıcaklığında inkübe edildi ve fazla boya lamdan uzaklaştırıldı. Ardından kesitlerin üstüne DAPI içeren kapatma medyumu eklendi ve lamel ile kesitler kapatıldı. Preparatlar 1 gece +4°C'de bekletildikten sonra lazer taramalı konfokal mikroskop (ZEISS LSM 800) ile görüntüldü.

2.5. MTT Analizi (MTT Assay)

1., 3. ve 7. günlerde kontrol grubu, yaprakçık ve arter duvarı numunelerinin bulunduğu kuyucuklardan besiyeri uzaklaştırıldı ve örnekler PBS (CAPRICORN) ile yıkandı. Daha sonra örnek başına, serum içermeyen 180 µl DMEM ve 20 µl MTT (Solarbio Life Sciences, M8180) reaktifi eklenerek kültür koşullarında 4 saat inkübe edildi. Bu süre sonunda çözelti ortamdan uzaklaştırıldı ve örneklerin üstüne 200 µl MTT çözücüsü eklendi. Ardından pipetaj yapıldıktan sonra kuyucukların içindeki mor renkli çözelti 96 kuyucuklu plakaya aktarıldı ve ELISA'da (Thermo Scientific, Multiskan GO) 570 nm dalga boyunda absorbanları ölçüldü. Blank olarak MTT çözücüsü kullanıldı ve kontrol gruplarına kıyasla iskelelerdeki hücre proliferasyonu belirlendi.

2.6. RNA İzolasyonu ve cDNA Eldesi (RNA Isolation and cDNA Obtaining)

7. güne ait örneklerin RNA izolasyonu için Trizol eşleniği olan Trigent (Nucleogene, NGE023) kullanıldı ve üreticinin talimatına göre manuel ekstraksiyon gerçekleştirildi. Prosedür kısaca, yaklaşık 50-100 mg doku örneklerinin üstüne 1 ml Trigent ilave edildi ve homojenizatörde öğütüldü. Santrifüj tüpü içerisine aktarılan homojenatın üzerine kloroform ilave edildi ve tüpler alt üst edildikten sonra santrifüjlendi. Süpernatant kısım yeni tüplere aktarılıp üzerine izopropanol eklendi ve nazikçe alt üst edildi. Yeniden santrifüjlemenin ardından süpernatant kısım uzaklaştırıldı ve şeffaf pellet hacimce %75'lik etanol ile yıkandı. Tüpler bir kez daha santrifüjlendi ve etanol uzaklaştırıldıktan sonra tüpler kurumak üzere steril kabinde bekletildi. RNA örnekleri kuruduktan sonra 50 µl nükleaz içermeyen steril sui le çözündürüldü. Daha sonra RNA örnekleri -80°C'de muhafaza edildi.

Total RNA'dan komplementer DNA (cDNA) çevrimi için abm OneScript Plus cDNA sentez kiti kullanıldı. Üretici talimatlarına göre 10 µl RNA içeren toplam 20 µl'lik reaksiyon kuruldu. Örnekler PCR (Applied Biosystems, 2720) cihazına yerleştirildikten sonra 1 döngü 15 dk 55°C, 1 döngü 5 dk 85°C'de ters transkripsiyon reaksiyonunun gerçekleşmesi sağlandı. Bu sürenin sonunda örnekler -20°C'de muhafaza edildi.

2.7. Temel ECM Proteinlerinin Gen İfadelerinin Belirlenmesi (Determination of Gene Expressions of Essential ECM Proteins)

Temel ECM proteinlerinden olan kollajen tip I (*Col1*), kollajen tip III (*Col3*), elastin (*Elm*) genlerinin ifadesi, FluoCycle II™ SYBR® Master Mix kullanılarak gerçek zamanlı PCR (Agilent, AriaMx) ile belirlendi. Üretici talimatına göre bir örneklik reaksiyon için 1 µl cDNA kullanıldı ve total reaksiyon hacmi 20 µl olacak şekilde ayarlandı. Reaksiyon için kullanılan primer listesi ve dizileri Tablo 1'de verilmiştir. Daha sonra tüpler cihaza yerleştirildi ve termal profil 1 döngü 95°C'de 5 dk ön denatürasyon, 45 döngü 95°C'de 15 sn ve ardından 60°C'de 1 dk olacak şekilde ayarlandı. Sonuçların analizleri için ΔΔCt metodu kullanıldı. *GAPDH*, referans gen olarak analize dahil edildi.

2.8. İstatistiksel analiz (Statistical Analysis)

Analiz her grup için 3 tekrarlı şekilde gerçekleştirilmiştir. Veriler ortalama \pm standart sapma olarak verilmiştir. İstatistiksel analiz için IBM SPSS Statistics (Version 23) yazılımı kullanılmıştır. İki grubun ortalamasını karşılaştırmak için Student's t testi, ikiden fazla olan grupların ortalamalarını karşılaştırmak için tek yönlü varyans analizi (one way ANOVA) testi uygulanmıştır. $p < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

3. Sonuçlar ve Tartışmalar (Results and Discussions)

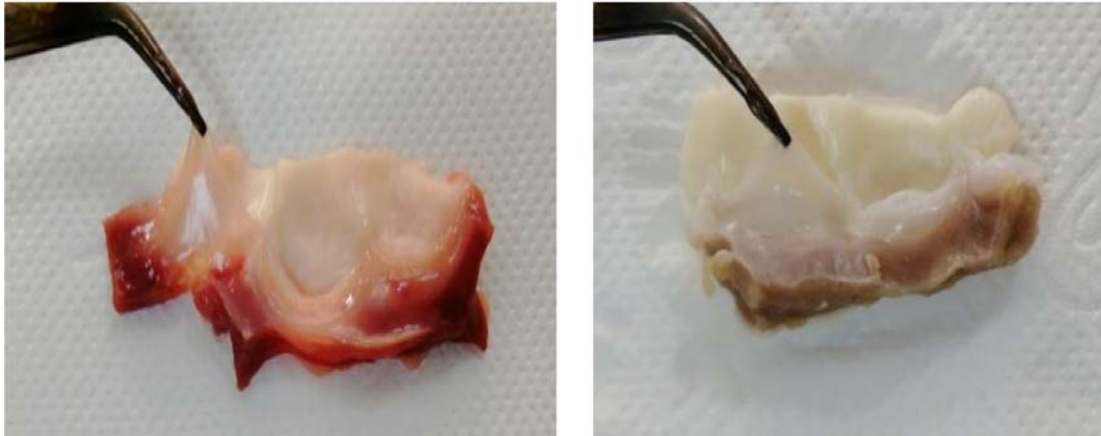
Koyun kalp kapakçıkları SD ve SDS kullanılarak hücresizleştirilmiş ve işlemin sonunda makroskobik gözlemlerde Şekil 1'deki gibi özelliklerle

saydam olan yaprakçık kısımlarının mat renge, pulmoner kök kısmındaki kasla ilişkili bölgenin kırmızıdan açık kahverengiye döndüğü gözlenmiştir.

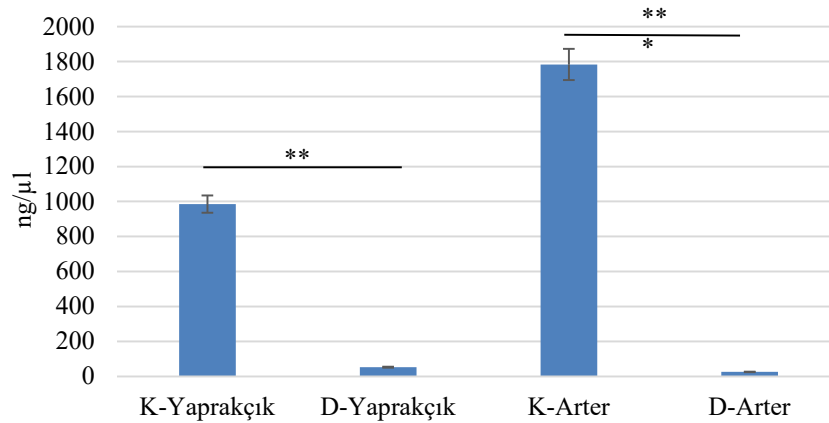
DNA miktarının belirlenmesi amacıyla DNA izolasyonu gerçekleştirilmiş ve nanodrop ile $\text{ng}/\mu\text{l}$ cinsinden ölçüm sonuçları alınmıştır. Nanodrop ölçüm sonuçlarına göre kontrol grubu yaprakçık örneklerinin DNA miktarı $982 \pm 131,3 \text{ ng}/\mu\text{l}$, arter grubu $1783,3 \pm 110,4 \text{ ng}/\mu\text{l}$ olarak belirlenmiştir. Hücresizleştirme sonrası yaprakçık örneklerindeki çift zincirli DNA miktarı $54,22 \pm 9 \text{ ng}/\mu\text{l}$ ve arter örneklerindeki DNA miktarı da $26,04 \pm 13 \text{ ng}/\mu\text{l}$ 'ye düşmüştür (Şekil 2). Kontrol gruplarına göre DNA giderimi yaprakçık ve arter kısımlarında sırasıyla %94 ve %98'dir. Literatürde yer alan çalışmaların çoğunda hücresizleştirme ile DNA yaklaşık %95

Tablo 1. Gerçek zamanlı PCR reaksiyonunda kullanılan primer dizi listesi. (Primer sequence list used in real-time PCR reaction)

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



Şekil 1. Koyun pulmoner kalp kapakçığının doğal ve hücresizleştirilmiş hali (Native and decellularized sheep pulmonary heart valve)



Şekil 2. Kontrol grubu ve hücresizleştirilmiş yaprakçık/arter numunelerinden elde edilen DNA'ların nanodrop ölçüm sonuçları ($\text{ng}/\mu\text{l}$). *** $p < 0,001$ istatistiksel olarak anlamlıdır (Nanodrop measurement results of DNA obtained from control group and decellularized leaflet/artery samples ($\text{ng}/\mu\text{l}$). *** $p < 0.001$ statistically significant)

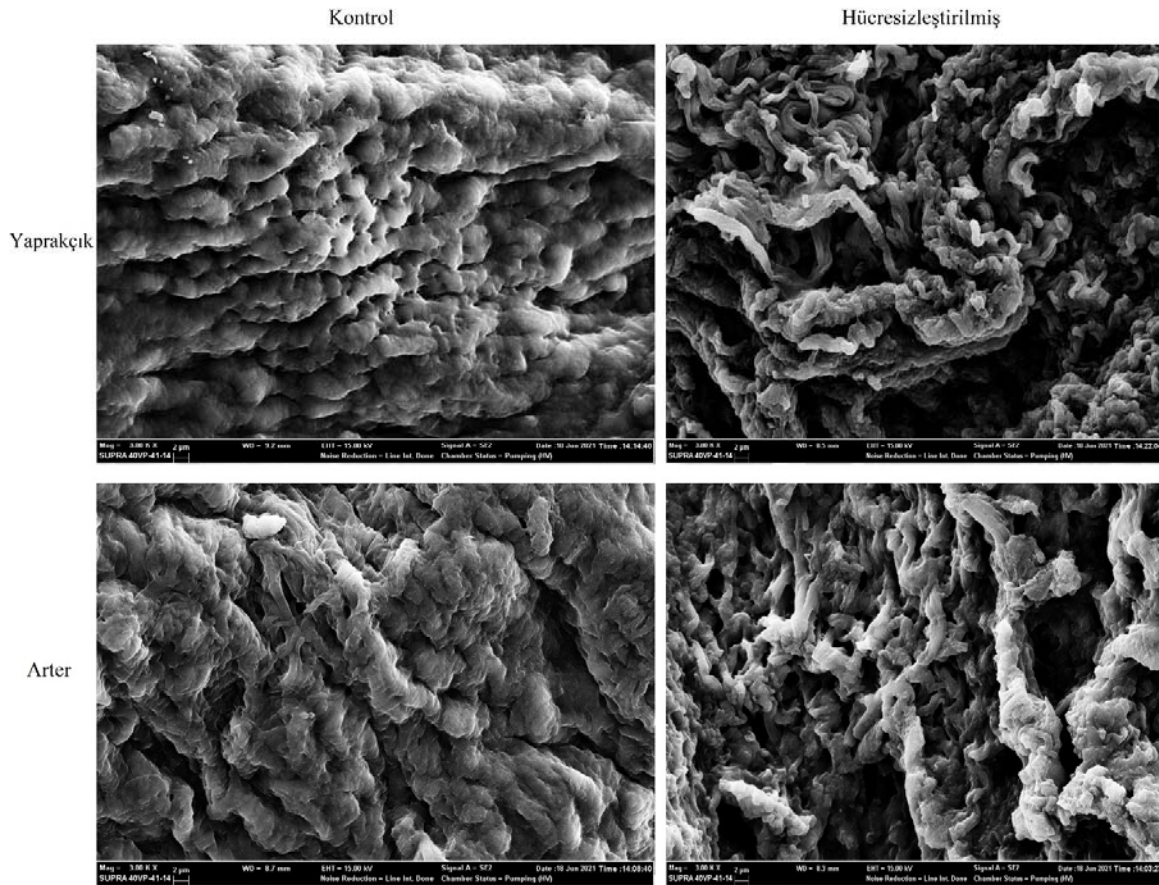
oranında temizlenmektedir [32, 33]. Yaptığımız çalışmada DNA giderimi literatür verileri ile benzerlik göstermiş ve en az %94 oranında DNA giderimi ile deterjan tabanlı hücresizleştirme işlemi koyun kalp kapakçıklarında etkin hücresizleştirmeyi sağlamıştır.

SEM görüntüleri, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında hücresizleştirilmiş örneklerin yüzeylerindeki endotelial tabakanın yok olduğunu ve kollajen fibrillerin açığa çıktığını göstermiştir (Şekil 3). Ayrıca hücresizleştirme sonrası subendotelial yapının korunduğunu da ortaya çıkarmıştır.

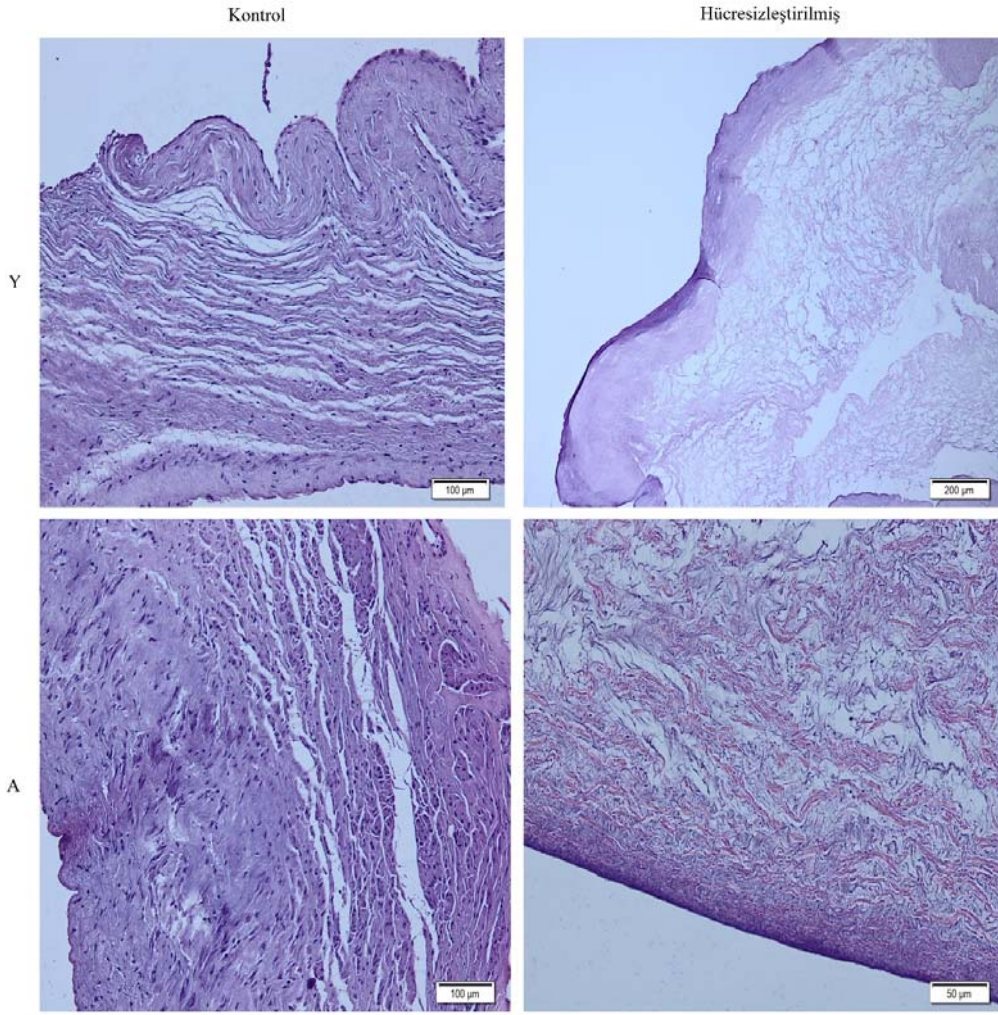
Yaprakçıklar sırasıyla fibrosa, spongiosa ve ventrikularis olmak üzere 3 katmanlı yapıdan meydana gelmektedir. Fibrosa katmanında kollajenler, spongiosa katmanında glikozaminoglikanlar ve ventrikularis kısmında elastinler ağırlıklı olarak konumlanmıştır. Hücresizleştirme sürecinde kullanılan metoda bağlı olarak bu 3 katmanlı yapıdaki temel ECM bileşenleri az da olsa etkilenmektedir. Bu hasarı belirlemek için H&E boyama yapılmış ve Şekil 4. de yaprakçıkların fibrosa katmanında kollajen miktarı ve yönelimlerinde farklılık olmadığı gösterilmiştir. H&E boyama sonucunda elde edilen görüntülerde boyanmış hiçbir çekirdeğe veya hücre kalıntısına rastlanmamıştır. SEM görüntüleri de yüzeyde endoteliumun olmadığını doğruladığından SD ve düşük yoğunlukta SDS ile hücresizleştirilmiş pulmoner yaprakçık ve arter kısımlarında hücre çıkarımı başarıyla gerçekleştirilmiştir. Hücre kültürü ile HUVEC ve insan dermal fibroblast hücreleri 1. Pasaja kadar kültür plağında çoğaltılmıştır.

Hücresizleştirilmiş yaprakçık ve arter duvarı üzerine ekilen hücrelerin proliferasyonunu ve olası sitotoksiteyi belirlemek için MTT analizi yapılmıştır. Kontrol grubu olarak 96 kuyucuklu plakaya ekilen hücreler kullanılmıştır. Analiz verilerine göre ekimden 1 gün sonra canlı hücre yoğunluğunun en çok olduğu grup kontrol grubu iken, hücresizleştirilmiş arter duvarı örneklerine ekilen hücrelerin canlılığı kontrol grubunun yaklaşık %50'si, hücresizleştirilmiş yaprakçık örneklerine ekilen hücre canlılığı kontrol grubunun yaklaşık %70'i düzeyindedir. Ekimden 3 gün sonra kontrol grubuna kıyasla hücre canlılığı arter duvarı örneklerinde %90'a, yaprakçık örneklerinde ise yaklaşık %98'e ulaşmıştır. 7. günde ise hücre canlılığı en yüksek olan grup neredeyse %115'lik bir oranla yaprakçık örnekleri olurken arter duvarlarındaki hücre canlılığı yaklaşık %105'lik bir oranla kontrol grubundan daha yüksek bir metabolik aktivite sergilemiştir (Şekil 5).

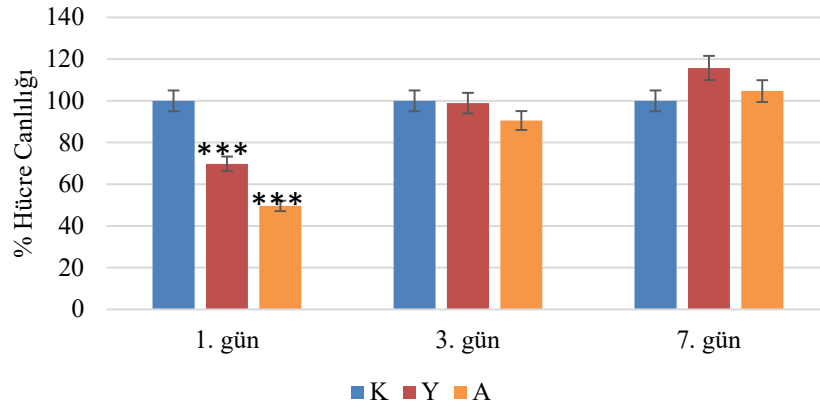
Yeniden hücrelendirme sonrası arter duvarı ve yaprakçıklardaki hücre adezyonunu belirlemek amacıyla H&E boyama yapılmıştır. Yaprakçık örneklerinin görüntülerinde fibrosa ve ventrikularis tabakasında konumlanmış hücre çekirdekleri görünmektedir (Şekil 6). Fakat daha iç kısımda yer alan spongiosa tabakasında boyanmış hücreye rastlanmamış ve 3 katmanlı yaprakçık yapısının tamamen yeniden hücrelendirilmesi gerçekleşmemiştir. Arter duvarı örneklerinde ise gerek yüzeye yakın bölgeler gerekse daha iç katmanlar dahil olmak üzere hücre çekirdekleri gözlenmiş ve neredeyse tamamen yeniden hücrelendirme başarılı olmuştur (Şekil 7).



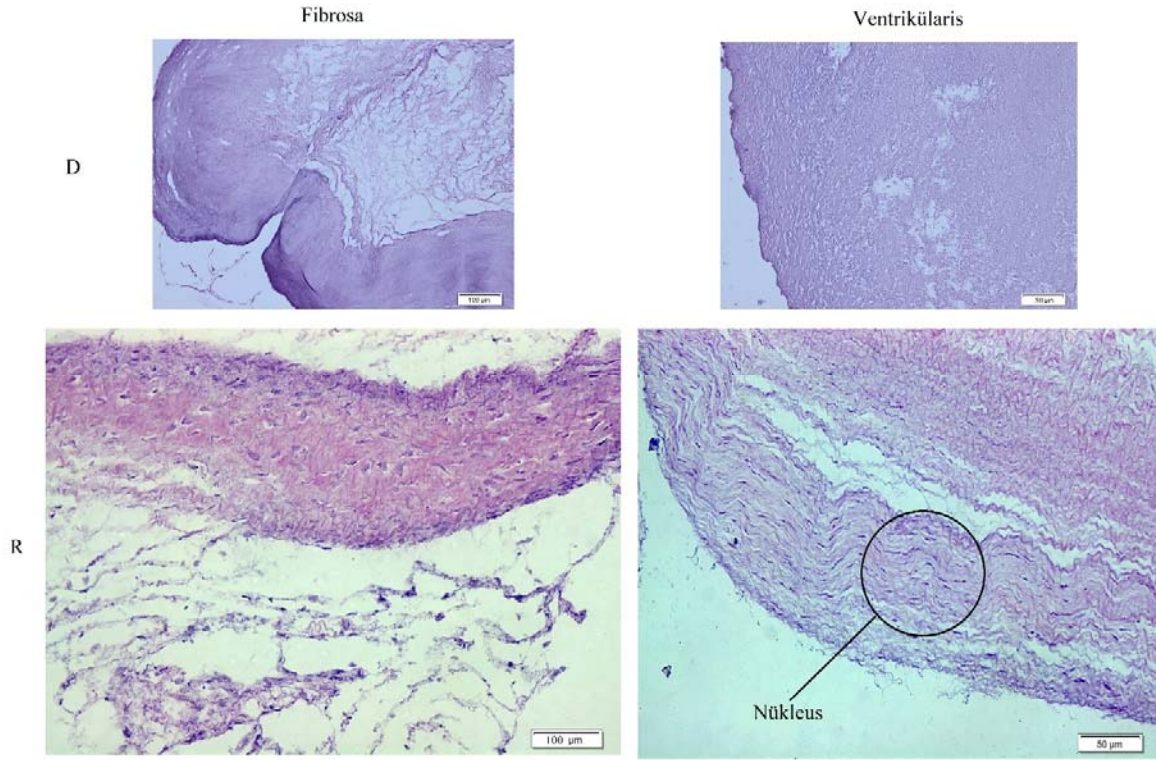
Şekil 3. Kontrol grubu ve hücresizleştirilmiş yaprakçık/arter numunelerinin SEM görüntüsü (3000X). Kontrol gruplarında pürüzsüz endotelium yüzeyi gözlenirken, hücresizleştirilmiş örneklerde endoteliumun çıkarıldığı ve fibrillerin açığa çıktığı, porlu bir yüzey görülmektedir (SEM image (3000X) of control and decellularized leaflet/artery samples. An almost smooth endothelial surface was observed in the control groups, whereas decellularized samples showed a porous surface where the endothelium was removed and fibrils were exposed)



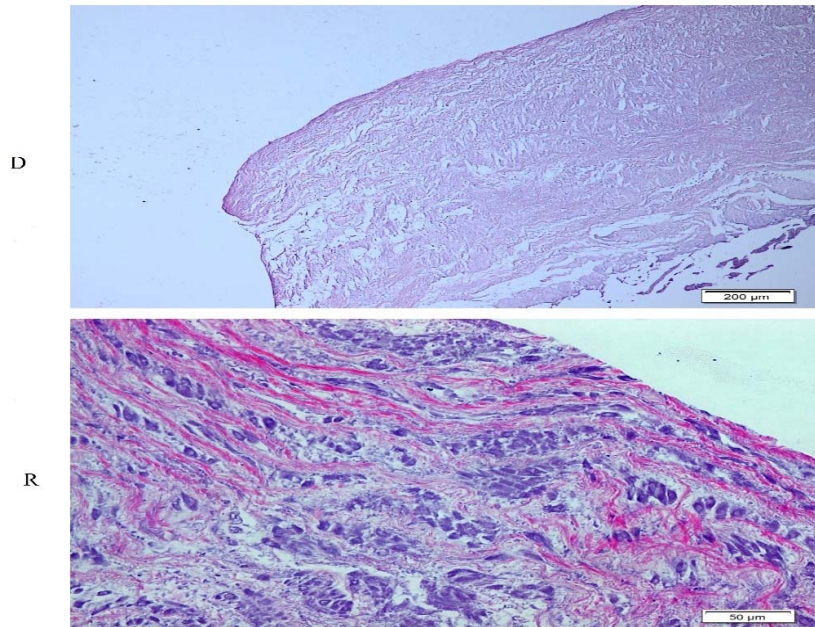
Şekil 4. H&E ile boyanmış kontrol grubu ve hüresizleştirilmiş yaprakçık (Y)/arter (A) görüntüleri. Kontrol gruplarında siyah renge boyanmış nükleuslar gözlenirken, hüresizleştirme sonrası örneklerde hiçbir nükleusa rastlanmadı (H&E stained control and decellularized leaflet (Y)/artery (A) image. While black-stained nuclei were observed in the control groups, no nuclei were found in the samples after decellularization)



Şekil 5. Yeniden hücrelendirilmiş kapakçık dokularının MTT analizi sonuçları (K: kontrol, Y: yaprakçık, A: arter duvarı) ***p <0,001 istatistiksel olarak anlamlıdır (MTT assay results of recellularized valve tissues (K: control, Y: leaflet, A: artery wall) ***p <0.001 statistically significant)



Şekil 6. H&E ile boyanmış yeniden hücrelendirilmiş yaprakçık örneğinin (R) fibrosa ve ventrikularis tabakalarında konumlanmış hücrelerin ışık mikroskopundaki görüntüsü (40X'lik objektif) D: Hücesizleştirilmiş grup, R: yeniden hücrelendirilmiş grup (Light microscope image (40X objective) of cells located in the fibrosa and ventricularis layers of the recellularized leaflet sample (R) stained with H&E. D: Decellularized group, R: recellularized group)



Şekil 7. H&E ile boyanmış yeniden hücrelendirilmiş arter duvarı örneğinin (R) ışık mikroskopundaki görüntüsü. D: Hücesizleştirilmiş grup, R: yeniden hücrelendirilmiş grup (Light microscope image of a sample of recellularized arterial wall stained with H&E. D: Decellularized group, R: recellularized group.)

DAPI/Phalloidin ile floresan olarak işaretlenen örneklerde H&E boyanmış örneklerle benzer şekilde, özellikle arter duvarı örneklerinin iç katmanlarına kadar hücrelerin sızdığı net bir şekilde görülürken, yaprakçık örneklerindeki yeniden hücrelenme arter duvarı örneklerine göre çok düşük seviyede ve yaprakçık yüzeyine yakın bölgelerle sınırlı kalmıştır (Şekil 8).

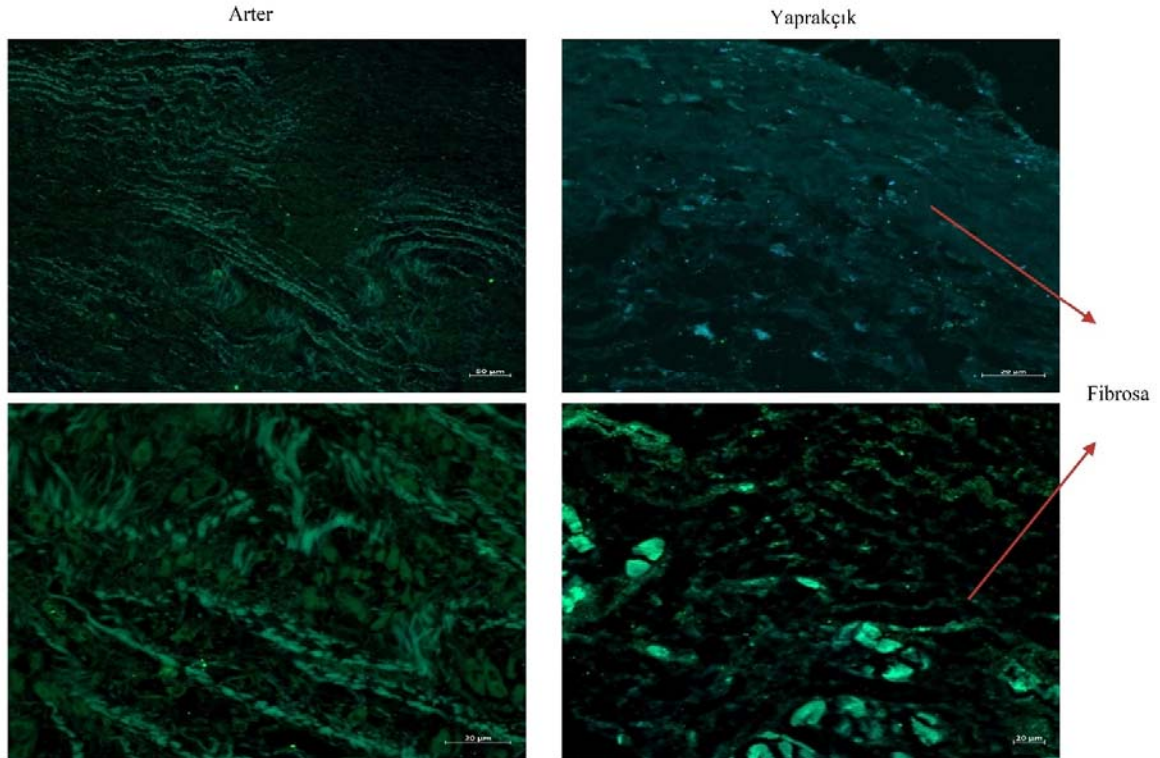
Yeniden hücrelendirme sonrası arter duvarı ve yaprakçıklardaki hücre adezyonunu ve endotelizasyonu belirlemek amacıyla SEM görüntüleri çekilmiştir. Yaprakçık örneklerinin yüzeyinde hücreler net bir şekilde görünmekle birlikte 7 günlük kültürde endotelizasyon bütünüyle sağlanmasa da hücrelerin bulunduğu bölgelerde tek katlı endotelium oluşmaya başlamıştır. Arter duvarı örneklerinde ise hücrelerin daha geniş alana yayılımı ve tek katlı endoteliumun daha büyük boyutlarda, yaprakçık örneklerine göre daha kesintisiz olduğu görülmektedir (Şekil 9).

Yeniden hücrelendirilmiş yaprakçık ve arter duvarı örneklerinde yeni ECM sentezini belirleyebilmek için, temel ECM proteinlerini ifade eden genlerin ifade oranları gerçek zamanlı PCR ile belirlenmiştir (Şekil 10). Elde edilen sonuçlara göre arter duvarındaki Col1 gen ifadesi kontrol grubuna göre 1,56 katlık önemli bir artış gösterirken, yaprakçık örneklerindeki Col1 gen ifadesinde kontrol grubuna göre yaklaşık 0,4 katlık önemli bir azalma meydana gelmiştir. Benzer şekilde Col3 gen ifadesinde kontrol grubuna göre arter duvarı örneklerinde 1,6 katlık bir artış gözlenirken yaprakçık örneklerinde yaklaşık 0,4 katlık önemli bir azalma meydana gelmiştir. Eln gen ifadesi de hemen hemen aynı sonuçlar vererek arter duvarında kontrol grubuna göre 1,57 katlık bir artış, yaprakçık örneklerinde yaklaşık 0,7 katlık bir azalış gözlenmiştir.

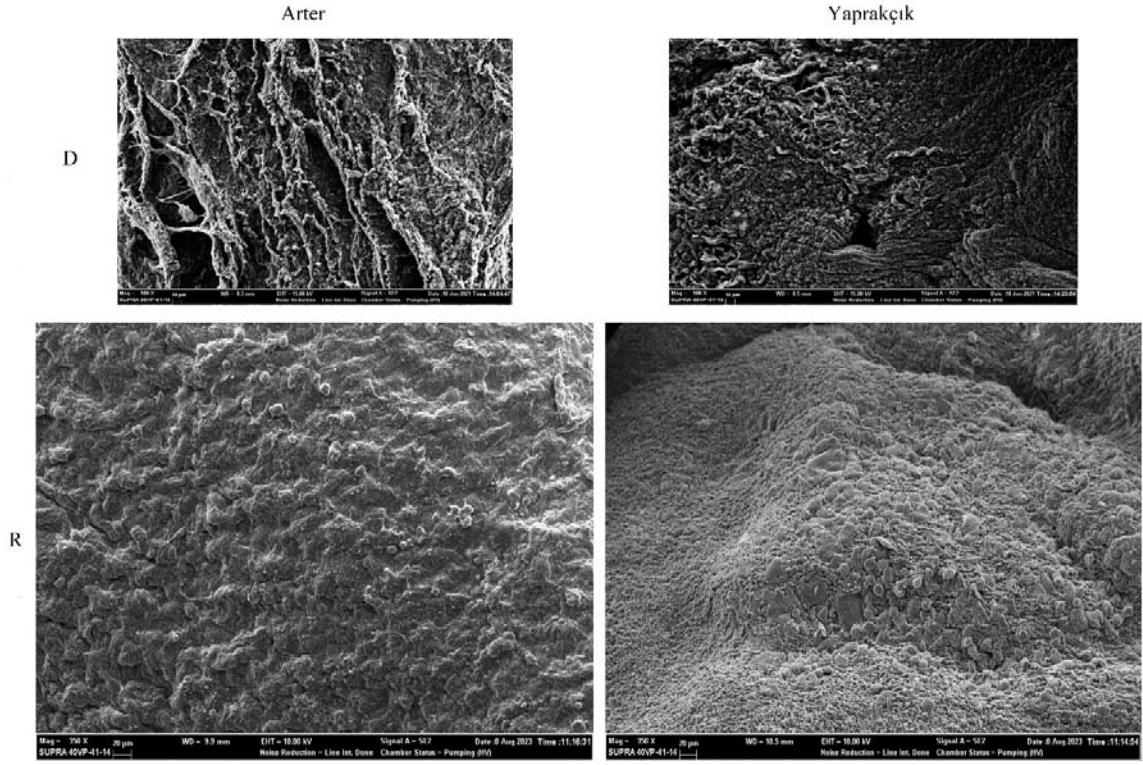
Doku mühendisliği ile üretilmiş canlı bir kapak elde etmek için hücreleştirilmiş kapakçıkların, doğal kapak hücre popülasyonunu

taklit edebilmesi adına valvüler endotelial hücreler (VEC) ve valvüler interstisyel hücrelerden (VIC) oluşan karışık hücre grubuyla tohumlanması gerekmektedir. VEC'ler kapak yüzeyi üzerinde trombotik olmayan bir tek tabaka sağlar ve kapak hemodinamiklerinde önemli bir rol oynar [34]. VIC'ler kapağın ECM'sinin yeniden şekillenmesinde aktif olup hem doku dayanıklılığını hem de büyüme özelliklerini sağlar [35]. Ortak kültürde VEC'ler VIC'leri daha doğal bir fenotipe doğru düzenlediği için, iki hücre tipi arasında güçlü bir ilişki bulunmaktadır [34]. Doku mühendislikli kapakları üretmenin temel zorluklarından biri bu iki hücre grubunun birlikte ekilmesidir. VEC'ler tarafından re-endotelizasyon tüm kapak yüzeylerinde meydana gelirken, VIC'ler tarafından interstisyel yeniden hücreleme arter duvarı ve sinüs ile sınırlı kalmaktadır. Bu nedenle asıl zorluk yaprakçık interstisyumunun VIC benzeri hücrelerle yeniden doldurulmasında yatmaktadır [36–40]. Bu çalışmada HUVEC ve fibroblast hücreleri, hücresiz kapakçığa birlikte ekilerek 7 güne kadar statik olarak kültürlenmiştir. Bu süre zarfında 1, 3 ve 7 günlük periyotlarda hücre proliferasyonu ve olası deterjan kalıntısına karşı sitotoksite MTT analiziyle belirlenmiştir. MTT bulgularına göre kontrol grubu ile karşılaştırıldığında günden güne artan metabolik aktivite, SD ve düşük yoğunluklu SDS ile hücreleştirme işleminden sonra etkili yıkamanın gerçekleştirildiği ve sitotoksitye sebep olabilecek düzeyde bir deterjan kalıntısının olmadığını göstermektedir. Bunun yanında ekilen hücrelerinin, hücreleştirilmiş koyun kalp kapakçığına tutunabildiği ve sorunsuz bir şekilde çoğalabildiği sonucuna varılmaktadır.

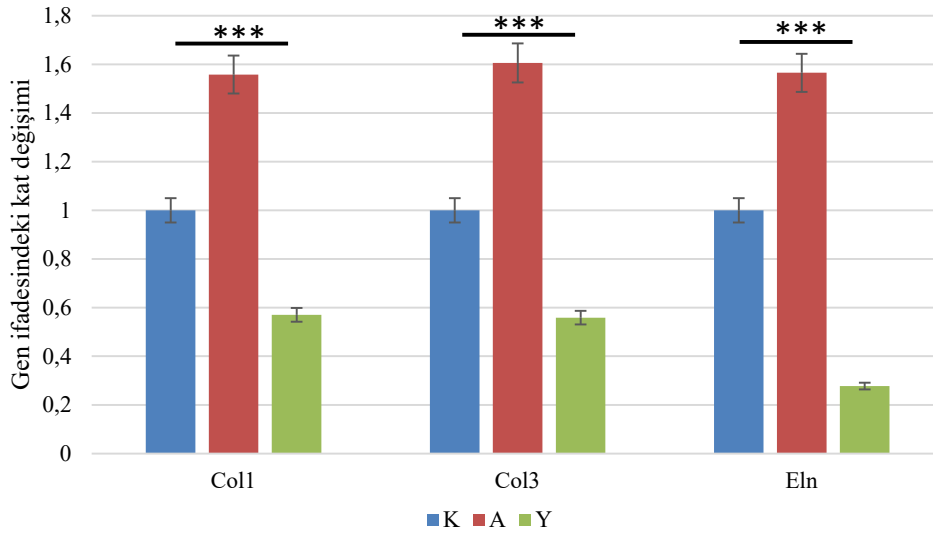
SEM mikrografları incelendiğinde arter duvarı ve yaprakçıklarda HUVEC'lerin iskelelere tutunduğu ve geniş alana yayıldıkları görülmektedir. İki grupta da tek tabakalı hücre katmanı oluşmaya başlamış fakat arter duvarında daha kesintisiz ve geniş şekilde olurken



Şekil 8. DAPI/Phalloidin floresan boyalar ile boyanmış yeniden hücrelendirilmiş arter duvarı ve yaprakçık örneklerinin konfokal mikroskop görüntüsü (Confocal microscope image of recellularized arterial wall and leaflet samples stained with DAPI/Phalloidin fluorescent dyes)



Şekil 9. Yeniden hücrelendirilmiş arter duvarı ve yaprakçık örneklerinin SEM mikrografı. D: Hücesizleştirilmiş grup, R: yeniden hücrelendirilmiş grup (SEM micrograph of recellularized arterial wall and leaflet samples. D: Decellularized group, R: recellularized group)



Şekil 10. Yeniden hücrelendirilmiş arter duvarı ve yaprakçık örneklerindeki temel ECM proteinleri gen ifadelerindeki değişim. Sonuçlar kontrol grubuna göre normalize edilmiştir (K: Kontrol, Y: Yaprakçık, A: Arter duvarı) ***p < 0,001 istatistiksel olarak anlamlıdır (Change in essential ECM proteins gene expressions in recellularized arterial wall and leaflet samples. Results are normalized to the control group (K: Control, Y: Leaflet, A: Arterial wall) ***p < 0.001 is statistically significant)

yaprakçıklarda kesintili ve özellikle kıvrımların olduğu yüzeylerde gerçekleşmiştir. Genel olarak reendotelizasyon hücesizleştirilmiş koyun kapakçıklarında 7 gün gibi kısa sürede önemli sayılabilecek düzeyde gerçekleşmiştir. Fakat histolojik bulgularımız literatürdeki

diğer çalışmalara paralel olarak özellikle yaprakçıkların iç katmanlarına çok sınırlı fibroblast hücre infiltrasyonu göstermiştir. Benzer şekilde hücesizleştirilmiş insan kalp kapakçığına ekilen kardiyak mezenkimal stromal hücreler (CStC) yaprakçık yüzeyine

yapıyarak orijinal hücre yoğunluğunun %90'ını korumuş ancak iç katmanlara sızma konusunda verimsiz olduğu bildirilmiştir [41]. Çalışmamızda arter duvarında yaprakçıklara nispeten daha yoğun infiltrasyon gözlenmektedir. Kalp kapakçığı doku mühendisliğinde zaten var olan bu sorunu çözmek için statik kültürden ziyade hücre ekiminden sonra mekanik veya kimyasal koşullandırma uygulamalarıyla daha yoğun bir hücre popülasyonu elde edilmeye çalışılmıştır. Hücreleştirilmiş pulmoner kapakçık koyun miyofibroblast ve endotel hücreleriyle ekildikten sonra biyoreaktörde fizyolojik pulmoner koşullar altında kültürlenmiştir [42]. Bunun sonucunda yaprakçıkların iç katmanlarında neredeyse doğal dokuyla aynı derecede hücrelilik elde edilmiştir. Başka bir mekanik koşullandırmanın hücre infiltrasyonu üzerine etkisini inceleyen bir çalışmada hücreleştirilmiş koyun aort kapakçıkları biyoreaktör sisteminde insan MSC'leri ile ekilmiş ve negatif-pozitif basınç koşulları altında yeniden hücrelendirme araştırılmıştır [43]. Mekanik koşullandırma uygulanmayan statik kültürlenmiş dokuda yaprakçık iç dokularına hücre sızıntısı olmazken koşullandırılmış yaprakçıkların iç katmanlarına hücreler sızabilmiş fakat tam bir hücrelilik gözlenmemiştir. Kimyasal modifikasyonda fenotipe özgü hücresel bağlanmayı desteklemek, kapakçık mekaniğini desteklemek ve hücre farklılaşmasını yönlendirmek için sitokinler, kemokinler, büyüme faktörleri, antikorlar ve polimerler kullanılmaktadır [3]. Fakat kimyasal koşullandırma ile yaprakçık iç katmanlarının yeniden hücrelendirme oranı, mekanik koşullandırmaya göre daha düşük bulunmuştur [44–46]. Dolayısıyla in vitro yeniden hücrelendirmenin tam olarak sağlanabilmesi için daha etkin hücre ekim metodlarına ve fizyolojik koşullandırma altında popülasyonun geliştirilmesine ihtiyaç vardır.

Tüm bu araştırmaların aksine hücreleştirilmiş kapakçıklara in vitroda hücre ekilmesine gerek olmadığını, implant modellerinde otolog hücreler tarafından hücresiz iskelelerin istila edildiğini bildiren çalışmalar da mevcuttur. Örnek olarak hücreleştirilmiş domuz ve koyun kapakçıkları, koyunlara implante edildikten sonra arter duvarlarının yeniden hücrelendirildiği, yaprakçık iç katmanlarına ise minimal hücre sızıntısı gerçekleştiği rapor edilmiştir [37,47]. Yaprakçıkların iç katmanlarına hücre infiltrasyonunun neden bu kadar zor olduğunun kesin sebebi henüz açıklanamamıştır. Fakat hücreleştirme uygulamalarıyla özellikle fibrosa katmanında meydana gelen açıklık ve bozulmalar, hücrelerin orta katmana kadar göçünü ve tutunmasını engelliyor olabilir. Bunların yanında yapı itibarıyla arter duvar yüzeyinin yaprakçıklara göre daha düz olduğu ve yaprakçıkların kıvrımlı yapısı göz önünde bulundurulursa, özellikle VIC'lerin kıvrımlı bölgelerde kümelenmeye başladığı ve düzgün bir yayılım sağlayamadığı ihtimali de ortaya çıkabilir.

Yeniden hücrelendirilen iskelelerde yeni ECM sentezinin gerçekleşip gerçekleşmediğini belirlemek adına temel ECM proteinlerinden olan kollajen tip I, tip III ve elastinleri kodlayan genlerin ifadeleri Real Time PCR ile gerçekleştirilmiştir. Elde ettiğimiz bulgulara göre arter duvarlarında araştırılan 3 genin ifadesinde kontrol grubuna göre önemli artışlar gözlenmiştir. Dolayısıyla iskele içine sızabilmiş hücreler hücreleştirilmiş koyun kalp kapakçıklarında yeni ECM bileşenlerini sentezlemeye başlamışlardır. Fakat yaprakçıklarda aksi şekilde kontrol grubuna göre bu gen ifade seviyelerinde kritik düşüşler gözlenmiştir. Bunun sebebi histolojik bulgularda görüldüğü üzere yaprakçık iç katmanlarının çok yetersiz veya hiç hücrelenmemesidir. Theodoridis vd. yaptıkları bir çalışmada koyun pulmoner kapakçıklarını hücreleştirilmiş, otolog koyun endotel hücreleriyle in vitroda yeniden hücrelendirip koyunlara 12 ay kalacak şekilde implante etmişler ve doku rejenerasyonunu araştırmışlardır [48]. Elde ettikleri bulgulara göre arter duvarına yoğun konakçı VIC sızıntısı gerçekleşirken yaprakçıkların sadece yüzeyine yakın bölgede minimal VIC gözlenmiştir. Bunun yanı sıra kollajen öncüsü olan ve içsel kollajeni gösteren prokollajen tip I antikoruyla immünofloresan

olarak işaretlenmiş örneklerde pozitif boyama ve dolayısıyla doku rejenerasyonunun gerçekleşmeye başladığı gözlenmiştir. Fakat bulgularımıza benzer şekilde yaprakçık iç katmanlarına ilerleyemeyen VIC'ler arter duvarı ile karşılaştırıldığında çok az pozitif boyama göstermiştir. Benzer durum domuz kapakçıklarında da meydana gelmiştir; hücreleştirilmiş domuz kalp kapağı allogreftlerinin 15 aylık implantasyonun ardından herhangi bir koşullandırma olmaksızın yeniden hücrelendiği ve yapılan mikroarray analizine göre özellikle arter duvarlarında kollajen, elastin gibi ECM proteinlerinin aktif olarak sentezlendiği bildirilmiştir [40]. Elde ettiğimiz gen ifadeleri verileri literatür verileriyle benzerlik göstermektedir. Bu çalışma ile literatürde ilk defa deterjan bazlı metotla hücreleştirilmiş koyun pulmoner kalp kapakçıklarının farklılaşmış insan hücreleri ile rejeneratif özellik kazandığı gösterilmiştir.

3. Sonuçlar (Conclusions)

Bu çalışmada, kalp kapakçığı doku mühendisliğindeki uygulamalar için uygun bir başlangıç matrisi elde etmek üzere koyun pulmoner kalp kapakçığı SD ve düşük yoğunluklu SDS kullanarak hücreleştirilmiştir. Hücreleştirilmeyi takiben bu işlemin etkinliğini belirlemek ve örneklerde meydana gelen değişimleri belirlemek adına elde edilen iskeleleri çeşitli karakterizasyonlara tabii tutulmuştur. Bunlara ek olarak hücreleştirilmiş koyun pulmoner kapakçığı üzerine HUVEC ve insan dermal fibroblast hücreleri ekilmiştir. Ardından Temel ECM proteinleri sentezleyen genlerin ifadeleri araştırılmıştır. Histolojik görüntüler ve kalıntı DNA analiz sonuçları bize tamamen hücresiz bir iskele elde ettiğimizi, SEM ve histolojik görüntüler doğal mimarinin ve 3 katmanlı yaprakçık yapısının korunduğunu göstermiştir. Ayrıca farklılaşmış insan hücreleriyle yeniden hücrelendirilen hücreleştirilmiş koyun kalp kapakçıklarında yeniden yapılanmaya dair belirteçlerin ifade edildiği gösterilmiştir. Ayrıca yeniden hücrelendirilmenin kapak yüzeyleri boyunca başarılı bir şekilde sağlanması, hücreleştirilmiş koyun kalp kapakçıklarının biyoyoumlu olduğunun göstergesidir. Dolayısıyla bulgularımızdan yola çıkarak insanlara yönelik tasarlanacak olan kalp kapakçığı implantlarında hücreleştirilmiş koyun kalp kapakçıklarının kullanılabileceği öngörülmektedir. Bu yüzden hücreleştirilmiş koyun kalp kapakçıklarının klinik çalışmalarda değerlendirilmesine mutlak surette ihtiyaç vardır.

Teşekkür (Acknowledgement)

Bu çalışma Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeleri tarafından FCD-2024-6116 nolu proje ile desteklenmiştir. Bu makale Müslüm Süleyman İNAL'ın doktora tez çalışmasından türetilmiştir.

Kaynaklar (References)

1. Kodigepalli, K.M., Thatcher, K., West, T., Howsmon, D.P., Schoen, F.J., Sacks, M.S., Breuer, C.K., Lincoln, J., Biology and Biomechanics of the Heart Valve Extracellular Matrix, *J Cardiovasc Dev Dis*, 7, 57, 2020.
2. Copeland, K.M., Wang, B., Shi, X., Simionescu, D.T., Hong, Y., Bajona, P., Sacks, M.S., Liao, J. Decellularization in Heart Valve Tissue Engineering. In *Advances in Heart Valve Biomechanics*, Springer International Publishing: Cham, 289–317, 2018.
3. VeDeppo, M.C., Detamore, M.S., Hopkins, R.A., Converse, G.L. Recellularization of Decellularized Heart Valves: Progress toward the Tissue-Engineered Heart Valve. *J Tissue Eng*, 8, 2017.
4. Mozaffarian, D., Benjamin, E.J., Go, A.S., Arnett, D.K., Blaha, M.J., Cushman, M., Das, S.R., de Ferranti, S., Després, J.-P., Fullerton, H.J., et al., Heart Disease and Stroke Statistics-2016 Update. *Circulation*, 133, 2016.
5. Ibrahim, D.M., Kakarougkas, A., Allam, N.K., Recent Advances on Electrospun Scaffolds as Matrices for Tissue-Engineered Heart Valves. *Mater Today Chem*, 5, 11–23, 2017.

6. Jahnavi, S., Kumary, T.V., Bhuvaneshwar, G.S., Natarajan, T.S., Verma, R.S., Engineering of a Polymer Layered Bio-Hybrid Heart Valve Scaffold. *Materials Science and Engineering: C*, 51, 263–273, 2015.
7. Fioretta, E.S., Motta, S.E., Lintas, V., Loerakker, S., Parker, K.K., Baaijens, F.P.T., Falk, V., Hoerstrup, S.P., Emmert, M.Y., Next-Generation Tissue-Engineered Heart Valves with Repair, Remodelling and Regeneration Capacity. *Nat Rev Cardiol*, 18, 92–116, 2021.
8. Ciolacu, D.E., Nicu, R., Ciolacu, F., Natural Polymers in Heart Valve Tissue Engineering: Strategies, Advances and Challenges. *Biomedicines*, 10, 1095, 2022.
9. Akpek A., Analysis of Biocompatibility Characteristics of Stereolithography Applied Three Dimensional (3D) Bioprinted Artificial Heart Valves, *Journal of the Faculty of Engineering and Architecture of Gazi University*, 33 (3), 929–938, 2018.
10. Mela, P., Hinderer, S., Kandail, H.S., Bouten, C.V.C., Smits, A.I.P.M., Tissue-Engineered Heart Valves. In *Principles of Heart Valve Engineering*, Elsevier, 123–176, 2019.
11. Boroumand, S., Asadpour, S., Akbarzadeh, A., Faridi-Majidi, R., Ghanbari, H., Heart Valve Tissue Engineering: An Overview of Heart Valve Decellularization Processes. *Regenerative Med*, 13, 41–54, 2018.
12. Simionescu, D., Harpa, M.M., Simionescu, A., Oprita, C., Movileanu, I., Tissue Engineering Heart Valves – a Review of More than Two Decades into Preclinical and Clinical Testing for Obtaining the Next Generation of Heart Valve Substitutes. *Romanian Journal of Cardiology*, 31, 501–510, 2021.
13. Ramm, R., Niemann, H., Petersen, B., Haverich, A., Hilfiker, A., Decellularized GGTA1-KO Pig Heart Valves Do Not Bind Preformed Human Xenobodies. *Basic Res Cardiol*, 111, 39, 2016.
14. Hopkins, R.A., Bert, A.A., Hilbert, S.L., Quinn, R.W., Brasky, K.M., Drake, W.B., Lofland, G.K., Bioengineered Human and Allogeneic Pulmonary Valve Conduits Chronically Implanted Orthotopically in Baboons: Hemodynamic Performance and Immunologic Consequences. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 145, 1098–1107, 2013.
15. Godehardt, A.W., Ramm, R., Gulich, B., Tönjes, R.R., Hilfiker, A., Decellularized Pig Pulmonary Heart Valves—Depletion of Nucleic Acids Measured by Proviral PERV Pol. *Xenotransplantation*, 27, 2020.
16. Schoen, F.J., Levy, R.J., Calcification of Tissue Heart Valve Substitutes: Progress Toward Understanding and Prevention. *Ann Thorac Surg*, 79, 1072–1080, 2005.
17. Christ, T., Paun, A.C., Grubitzsch, H., Holinski, S., Falk, V., Dushe, S., Long-Term Results after the Ross Procedure with the Decellularized AutoTissue Matrix P® Bioprosthesis Used for Pulmonary Valve Replacement. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*, 55, 885–892, 2019.
18. Cicha, I., Rüffer, A., Cesnjevar, R., Glöckler, M., Agaimy, A., Daniel, W.G., Garlichs, C.D., Dittrich, S., Early Obstruction of Decellularized Xenogenic Valves in Pediatric Patients: Involvement of Inflammatory and Fibroproliferative Processes. *Cardiovascular Pathology*, 20, 222–231, 2011.
19. Rüffer, A., Purbojo, A., Cicha, I., Glöckler, M., Potapov, S., Dittrich, S., Cesnjevar, R.A., Early Failure of Xenogenous De-Cellularised Pulmonary Valve Conduits- a Word of Caution. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*, 38, 78–85, 2010.
20. Abdolghafoorian, H., Farnia, P., Sajadi Nia, R.S., Bahrami, A., Dorudinia, A., Ghanavi, J., Effect of Heart Valve Decellularization on Xenograft Rejection. *Exp Clin Transplant*, 15, 329–336, 2017.
21. Ramm, R., Goecke, T., Köhler, P., Tudorache, I., Cebotari, S., Ciubotaru, A., Sarikouch, S., Höffler, K., Bothe, F., Petersen, B., et al., Immunological and Functional Features of Decellularized Xenogenic Heart Valves after Transplantation into GGTA1-KO Pigs. *Regen Biomater*, 8, 2021.
22. Baraki, H., Tudorache, I., Braun, M., Höffler, K., Görler, A., Lichtenberg, A., Bara, C., Calistru, A., Brandes, G., Hewicker-Trautwein, M., et al., Orthotopic Replacement of the Aortic Valve with Decellularized Allograft in a Sheep Model. *Biomaterials*, 30, 6240–6246, 2009.
23. Quinn, R.W., Hilbert, S.L., Converse, G.L., Bert, A.A., Buse, E., Drake, W.B., Armstrong, M., Moriarty, S.J., Lofland, G.K., Hopkins, R.A., Enhanced Autologous Re-Endothelialization of Decellularized and Extracellular Matrix Conditioned Allografts Implanted Into the Right Ventricular Outflow Tracts of Juvenile Sheep. *Cardiovasc Eng Technol*, 3, 217–227, 2012.
24. Qiao, W., Liu, P., Hu, D., Al Shirbini, M., Zhou, X., Dong, N., Sequential Hydrophile and Lipophile Solubilization as an Efficient Method for Decellularization of Porcine Aortic Valve Leaflets: Structure, Mechanical Property and Biocompatibility Study. *J Tissue Eng Regen Med*, 12, 2018.
25. van Steenberghe, M., Schubert, T., Gerelli, S., Bouzin, C., Guiot, Y., Xhema, D., Bollen, X., Abdelhamid, K., Gianello, P., Porcine Pulmonary Valve Decellularization with NaOH-Based vs Detergent Process: Preliminary in Vitro and in Vivo Assessments. *J Cardiothorac Surg*, 13, 34, 2018.
26. Chauvette, V., Bouhout, I., Tarabzoni, M., Pham, M., Wong, D., Whitlock, R., Chu, M.W.A., El-Hamamsy, I., Lefebvre, L., Poirier, N., et al., Pulmonary Homograft Dysfunction after the Ross Procedure Using Decellularized Homografts— a Multicenter Study. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 163, 1296–1305.e3, 2022.
27. Converse, G.L., Buse, E.E., Neill, K.R., McFall, C.R., Lewis, H.N., VeDepo, M.C., Quinn, R.W., Hopkins, R.A., Design and Efficacy of a Single-Use Bioreactor for Heart Valve Tissue Engineering. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 105, 249–259, 2017.
28. Quinn, R.W., Bert, A.A., Converse, G.L., Buse, E.E., Hilbert, S.L., Drake, W.B., Hopkins, R.A., Performance of Allogeneic Bioengineered Replacement Pulmonary Valves in Rapidly Growing Young Lambs. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 152, 1156–1165.e4, 2016.
29. Theodoridis, K., Tudorache, I., Calistru, A., Cebotari, S., Meyer, T., Sarikouch, S., Bara, C., Brehm, R., Haverich, A., Hilfiker, A., Successful Matrix Guided Tissue Regeneration of Decellularized Pulmonary Heart Valve Allografts in Elderly Sheep. *Biomaterials*, 52, 221–228, 2015.
30. Tudorache, I., Calistru, A., Baraki, H., Meyer, T., Höffler, K., Sarikouch, S., Bara, C., Görler, A., Hartung, D., Hilfiker, A., et al., Orthotopic Replacement of Aortic Heart Valves with Tissue-Engineered Grafts. *Tissue Eng Part A*, 19, 1686–1694, 2013.
31. İnal, M.S., Darcan, C., Akpek, A., Characterization of a Decellularized Sheep Pulmonary Heart Valves and Analysis of Their Capability as a Xenograft Initial Matrix Material in Heart Valve Tissue Engineering. *Bioengineering*, 10, 949, 2023.
32. Quinn, R.W., Hilbert, S.L., Bert, A.A., Drake, B.W., Bustamante, J.A., Fenton, J.E., Moriarty, S.J., Neighbors, S.L., Lofland, G.K., Hopkins, R.A., Performance and Morphology of Decellularized Pulmonary Valves Implanted in Juvenile Sheep. *Ann Thorac Surg*, 92, 131–137, 2011.
33. Lichtenberg, A., Tudorache, I., Cebotari, S., Ringes-Lichtenberg, S., Sturz, G., Hoeffler, K., Hurscheler, C., Brandes, G., Hilfiker, A., Haverich, A., In Vitro Re-Endothelialization of Detergent Decellularized Heart Valves under Simulated Physiological Dynamic Conditions. *Biomaterials*, 27, 4221–4229, 2006.
34. Butcher, J.T., Nerem, R.M., Valvular Endothelial Cells Regulate the Phenotype of Interstitial Cells in Co-Culture: Effects of Steady Shear Stress. *Tissue Eng*, 12, 905–915, 2006.
35. Liu, A.C., Joag, V.R., Gotlieb, A.I., The Emerging Role of Valve Interstitial Cell Phenotypes in Regulating Heart Valve Pathobiology. *Am J Pathol*, 171, 1407–1418, 2007.
36. Dohmen, P.M., Hauptmann, S., Terytze, A., Konertz, W.F., In-Vivo Repopularization of a Tissue-Engineered Heart Valve in a Human Subject. *J Heart Valve Dis*, 16, 447–449, 2007.
37. Baraki, H., Tudorache, I., Braun, M., Höffler, K., Görler, A., Lichtenberg, A., Bara, C., Calistru, A., Brandes, G., Hewicker-Trautwein, M., et al., Orthotopic Replacement of the Aortic Valve with Decellularized Allograft in a Sheep Model. *Biomaterials*, 30, 6240–6246, 2009.
38. da Costa, F.D.A., Costa, A.C.B.A., Prestes, R., Domanski, A.C., Balbi, E.M., Ferreira, A.D.A., Lopes, S.V., The Early and Midterm Function of Decellularized Aortic Valve Allografts. *Ann Thorac Surg*, 90, 1854–1860, 2010.
39. Quinn, R.W., Hilbert, S.L., Converse, G.L., Bert, A.A., Buse, E., Drake, W.B., Armstrong, M., Moriarty, S.J., Lofland, G.K., Hopkins, R.A., Enhanced Autologous Re-Endothelialization of Decellularized and Extracellular Matrix Conditioned Allografts Implanted Into the Right Ventricular Outflow Tracts of Juvenile Sheep. *Cardiovasc Eng Technol*, 3, 217–227, 2012.
40. Iop, L., Bonetti, A., Naso, F., Rizzo, S., Cagnin, S., Bianco, R., Lin, C.D., Martini, P., Poser, H., Franci, P., et al., Decellularized Allogeneic

- Heart Valves Demonstrate Self-Regeneration Potential after a Long-Term Preclinical Evaluation. *PLoS One*, 9, e99593, 2014.
41. Dainese, L., Guarino, A., Burba, I., Esposito, G., Pompilio, G., Polvani, G., Rossini, A., Heart Valve Engineering: Decellularized Aortic Homograft Seeded with Human Cardiac Stromal Cells. *J Heart Valve Dis*, 21, 125–134, 2012.
 42. Schenke-Layland, K., Complete Dynamic Repopulation of Decellularized Heart Valves by Application of Defined Physical Signals—an in Vitro Study. *Cardiovasc Res*, 60, 497–509, 2003.
 43. Converse, G.L., Buse, E.E., Neill, K.R., McFall, C.R., Lewis, H.N., VeDepo, M.C., Quinn, R.W., Hopkins, R.A., Design and Efficacy of a Single-use Bioreactor for Heart Valve Tissue Engineering. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 105, 249–259, 2017.
 44. Zhou, J., Nie, B., Zhu, Z., Ding, J., Yang, W., Shi, J., Dong, X., Xu, J., Dong, N., Promoting Endothelialization on Decellularized Porcine Aortic Valve by Immobilizing Branched Polyethylene Glycolmodified with Cyclic-RGD Peptide: An in Vitro Study. *Biomedical Materials*, 10, 065014, 2015.
 45. Zhou, J., Ye, X., Wang, Z., Liu, J., Zhang, B., Qiu, J., Sun, Y., Li, H., Zhao, Q., Development of Decellularized Aortic Valvular Conduit Coated by Heparin–SDF-1 α Multilayer. *Ann Thorac Surg*, 99, 612–618, 2015.
 46. Ye, X., Wang, H., Zhou, J., Li, H., Liu, J., Wang, Z., Chen, A., Zhao, Q., The Effect of Heparin-VEGF Multilayer on the Biocompatibility of Decellularized Aortic Valve with Platelet and Endothelial Progenitor Cells. *PLoS One*, 8, e54622, 2013.
 47. Paniagua Gutierrez, J.R., Berry, H., Korossis, S., Mirsadraee, S., Lopes, S.V., da Costa, F., Kearney, J., Watterson, K., Fisher, J., Ingham, E., Regenerative Potential of Low-Concentration SDS-Decellularized Porcine Aortic Valved Conduits In Vivo. *Tissue Eng Part A*, 21, 332–342, 2015.
 48. Theodoridis, K., Tudorache, I., Calistru, A., Cebotari, S., Meyer, T., Sarikouch, S., Bara, C., Brehm, R., Haverich, A., Hilfiker, A., Successful Matrix Guided Tissue Regeneration of Decellularized Pulmonary Heart Valve Allografts in Elderly Sheep. *Biomaterials*, 52, 221–228, 2015.

