



HÜCRE BİLEŞENİ VE BIYOMALZEME İLE VASKÜLER DOKU ÜRETİMİ

VASCULAR TISSUE PRODUCTION BY USING CELL COMPONENT AND BIOMATERIAL

Dilek Sönmezer^{1,2} Fatma Latifoğlu¹, İ. Alper İşoğlu³, Ayhan Düzler⁴, Güler Toprak⁵, Dilek Kaan Ceylan⁵

¹Biyomedikal Mühendisliği Bölümü
Erciyes Üniversitesi, Kayseri
flatifoglu@erciyes.edu.tr

²Biyomedikal Mühendisliği Bölümü
Çukurova Üniversitesi, Adana
dsonmezer@cu.edu.tr

³Malzeme Bilimi ve Nanoteknoloji Bölümü Abdullah
Gül Üniversitesi, Kayseri
alper.isoglu@agu.edu.tr

⁴Anatomi Bölümü
Erciyes Üniversitesi, Kayseri
duzler@erciyes.edu.tr

⁵Genom ve Kök Hücre Merkezi (GenKök)
Erciyes Üniversitesi, Kayseri
gulertoprak@erciyes.edu.tr, dceylan@erciyes.edu.tr

Özetçe

Günümüzde, doku uyumsuzluğu ve organ nakli için bekleyen hasta sayısının giderek artmasından dolayı hastanın kendi vücut dokusu kullanılarak yapay organ üretimi üzerinde çalışılan önemli konulardan biridir. Bu çalışma kapsamında yapay organa giden yolda damar üretimi için temel olarak gerekli araçlar ve işlem adımları ortaya konacaktır. Yapay damar üretimi için sentetik polimerden elde edilen üç boyutlu doku iskelesi (scaffold) ve bu üç boyutlu yapı üzerinde damar dokusunu oluşturacak hücrelerin kültürünün yapılması çalışmanın temel işlem adımları olarak belirlenmiştir. Bu amaçla kullanılacak hücre hatları ticari olarak temin edilmesi planlanmaktadır. Rutin hücre kültürü çalışmalarında besi yeri desteği olarak kullanılan fetal sığır serumuna alternatif olarak sığırda elde edilecek perikard sıvısı çeşitli yüzdelerde kullanılacaktır. Böylece, perikard sıvısının ve üç boyutlu doku iskelesinin damarlaşmaya olan etkisinin incelenmesi ve analizi yapılmış olacaktır.

Anahtar Kelimeler: *Biyomalzeme, PCL, Vasküler doku mühendisliği*

Abstract

Recently, the production of artificial organs by using patients' own body tissues is one of the hot topic research due to increasing number of patients waiting for organ transplants and tissue incompatibility. In the context of this study, basic tools and process steps required for the production of a vessel will be clarified on the road to artificial organs. The three-dimensional scaffold obtained from the synthetic polymers and the cell culture study will use as basic steps for the fabrication of the artificial blood vessel. Cell lines used in this study are commercially available. Bovine pericardial fluid will be used in various percentages as an alternative to fetal bovine serum, which routinely used in cell culture studies. Thus, it will be possible to evaluate the effect of pericardial

fluid and a three dimensional scaffold structure to vascularization.

Key words: *Biomaterial, PCL, Vascular tissue engineering*

1- Giriş

Günümüzde en önemli sağlık sorunlarının başında kalp ve damar hastalıkları gelmektedir. Kalbi besleyen damarlar olan koroner arterlerde meydana gelen tıkanıklık, damar duvarında lipid (yağ) parçacıklarının birikmesiyle oluşmaktadır. Bu durumda damarlar boşluklarının tıkanmasıyla normal kan akışı engellenerek, kalp kasının beslenmesi bozulmakta ve Koroner Arter Hastalığı (KAH) ortaya çıkmaktadır. Koroner arterlerin duvarında lipid birikmesiyle oluşan plaklar başka bir ifade ile damar sertliği (ateroskleroz) nedeni ile farklı sayı ve derecelerde olmak üzere damar duvarında daralmalar ortaya çıkabilmektedir. Daralmış ya da tıkanmış damarın tedavisinde ise ilaç, balon anjioplasti, stent takılması veya baypas ameliyatı gibi yöntemlere başvurulmaktadır. Baypas ameliyatı, duvarında plak oluşmuş yani sertlik olan damarda tıkanıklık geliştiğinde tercih edilen tedavi yöntemidir. Bu yöntemde kalbi besleyen koroner arterlerde oluşan plağın yeri tespit edilerek hastanın vücudunun başka bir yerinden alınan sağlıklı arter veya ven, koroner arterin uç kısmına anastomoz edilir yani dikilir. Böylece tıkanıklık nedeni ile kan akışında meydana gelen bozulma düzeltilerek koroner dolaşım normal hale getirilir. Baypas ameliyatında vücudun başka bir yerinden sağlıklı arter/ven alınmadığı durumlarda veya hastanın sağlık durumu otogreft elverişli olmadığı durumlarda koroner arterdeki tıkanıklığın giderilmesi için sentetik malzemelerden üretilen damar grefti kullanılır. Geniş çaplı damarlar için sentetik graft (PET, Dacron) kullanılmakla birlikte baypas ameliyatında kullanılacak küçük çaplı damarlar için (inner diameter; ID>6mm) anevrizma, intimal hiperplazi, kalsifikasyon, tromboz ve enfeksiyon gibi komplikasyonlar oluşturmaktadır [1-3]. Bu çalışmanın amacı ise yukarıda bahsedilen problemlere vasküler doku mühendisliği ile çözüm sunmaktır.



Biyomalzeme 1

2. Gün / 28 Ekim 2016, Cuma

Yeni bir doku/organın üretiminde yaygın olarak kullanılan yöntem, kontrollü kültür koşulları altında üç boyutlu doku iskelesi üzerinde büyüme için hastadan biyopsiyle birlikte hücrelerin izole edilmesi ve daha sonra üç boyutlu yapının zamanla bozulabilen doku iskelesi içine ekilmesi ve son olarak da yeni doku oluşumu amacıyla istenilen bölgeye yerleştirilmesidir. Hücreyi gerçek bir dokuya götürmek için taslak vazifesi görecektir skafold yani 'doku iskelesi' ekstraselüler matriksi (ECM; hücre dışı madde) taklit edecek biçimde tasarlanan yapay bir hücre dışı matriks görevini üstlenecektir. Doku iskeleleri, hücreler için uygun yapıya yüzeyi oluşturmalarının yanı sıra, mekanik dayanım sağlamakta, fizyolojik ve biyolojik değişikliklere cevap vermek için çevre doku ile etkileşimin kurulmasına yardımcı olmakta; ayrıca gerçek hücre dışı matriksin yeniden oluşumuna da katkıda bulunmaktadır.

Doku mühendisliğinde hücrelerin istenen dokuyu oluşturmak için vücut içindeki ECM'in yerini tutabilecek doku iskelesi üretiminin sağlanması gerekmektedir. Doku mühendisliği ile yapay bir doku/organın üretilmesinde önemli olan canlı vücut yapısının iyi anlaşılması ile olacaktır. Canlı yapı incelendiğinde dokular hücrelerden ve hücre dışı matris (ECM) den oluşmaktadır.

Bu çalışmada, yapay organ üretimine giden yolda önemli bir adım olan doku ve organlara besin ve oksijenin taşınması için gerekli olan damar üretimi anlatılmaktadır. Damar üç boyutlu yapısının oluşması için sentetik bir polimer olan PCL (Poli(ϵ -kaprolakton)) elektro eğirme yöntemi ile üretimi ve üretilen skafold üzerine damar dokuyu oluşturan hücrelerin ko-kültürü ve besi yeri desteği olarak da çeşitli yüzdelerde perikard sıvısının kültürü ile sağlanmaktadır.

2. Materyal ve Metot

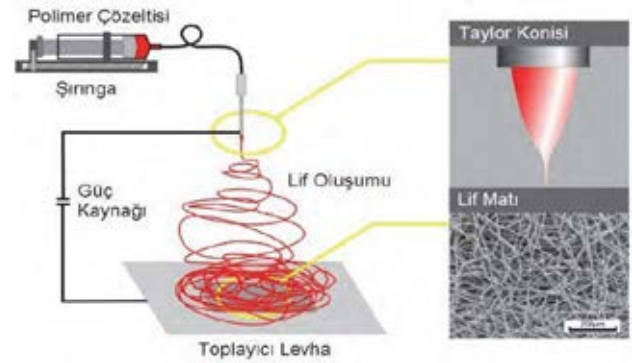
Tasarlanan çalışma; elektro eğirme yöntemi ile üç boyutlu yapı olan skafold üretimi yapılarak, bilinen besi yeri kaynaklarına alternatif olarak kullanılacak perikard sıvısı ile vasküler dokunun üretilmesinden oluşmaktadır. Kullanılacak hücre hatları ticari olarak temin edilecektir.

2.1. Elektro Eğirme Yöntemi:

Elektrik alan kuvvetlerinin bir sıvı üzerine etki ettirilerek lif oluşturulabileceği ilk olarak Formhals tarafından 1934'te ifade edilmiştir [4]. Bu yöntem Norton tarafından geliştirilmiş ve bu yöntemle dayalı olarak çalışan ilk cihaz tasarımı yapmıştır [5]. Elektrostatik kuvvetler yardımıyla lif çekilmesi esasına dayanan bu yöntemde, polimer çözeltileri binlerce volt elektrik akımı ile yüklenerek nano seviyede çapa sahip liflerden oluşan yüzeyler üretilebilmektedir. Üretilen liflerin çapı genellikle 40–2000 nm arasında değişmektedir [6-8]. Bu teknikte çok farklı doğal ve yapay polimerden lif çekimi yapılmakta ve elde edilen nanolifler nanolif yapıları 3 boyutlu doku iskelelerinin üretiminde kullanılmaktadır. Bu amaçla çok çeşitli (Poli(ϵ -kaprolakton) (PCL), Poli(lactic acid) (PLA), Poli(glycolic acid) (PGA), ve kopolimer poly(lactide-co-glycolide) (PLGA)) biyoçözünür polimer kullanılmaktadır.

Elektrostatik eğirme, doku mühendisliğine uygun nanoyapılı iskelelerin üretiminde kolay uygulanabilir ve ekonomik bir yöntemdir [9]. Elektriksel yöntemle lif üretimi sırasında

öncelikle polimer çözeltisi veya eriyiği yüksek voltajla (5-30kv) yüklenerek elektrik alanı oluşturulur. Başlangıçta, polimer çözeltisi kapilar uçta yüzey gerilimi sayesinde bir damla olarak durmaktadır. Gerilim yükseltildikçe, damlaya elektriksel yükler de etki etmeye başlar ve bu elektriksel kuvvetler yüzey gerilimini yenecek büyüklüğe ulaştığında, yüklü polimer çözeltisi veya eriyiği, kapilar uçtan topraklanmış levhaya doğru harekete başlar, Polimer çözeltisi veya eriyiğinin harekete başladığı noktada "Taylor konisi" olarak adlandırılan bir şekil oluşur. Polimer jetinin levhaya doğru hareketi sırasında, çözgenin buharlaşmasıyla polimer jeti katılaşır ve topraklanmış levha üzerinde nano liflerden oluşan bir tülbent elde edilir. Bu yöntemin en önemli avantajlarından biri de üretimin tek adımda gerçekleşmesidir. Elektro eğirme yöntemi kullanılarak membran üretimini açıklayan şema aşağıdaki şekilde verilmiştir (Şekil 1).



Şekil 1. Elektrik alan ile lif çekim yöntemi ve nanolif üretimi [10]

Elektriksel lif çekim yöntemiyle üretilen liflerin istenilen özellikte olabilmesi elektriksel lif çekim parametreleri ile belirlenmektedir. Lif özelliklerine etki eden en önemli parametreler; polimer çözeltisinin dielektrik özellikleri, konsantrasyon, viskozite, yüzey gerilimi ve kılcal uç ile toplayıcı levha arasındaki mesafe, uygulanan elektriksel gerilim çözelti besleme debisi gibi üretim parametreleridir. Konsantrasyonun çok düşük olması liflerde boncukların oluşmasına sebep olurken, çok yüksek konsantrasyonlarda yapılan üretim lif düzgünlüğüyle sonuçlanmaktadır. Kılcal uç ile toplayıcı levha arasındaki mesafe arttıkça lif çapı azalmakta, lif çapı değişkenliği de azalmakta ve ayrıca liflerdeki boncuk boyutu azalmaktadır. Polimer eriyiğine ya da çözeltisine uygulanan elektriksel gerilimin artması polimer jeti üzerindeki elektriksel ivme kuvvetini ve life uygulanan çekimi artırarak, lif çapının azalmasına neden olmaktadır. Ancak uygulanan voltaj kritik bir değeri geçtiğinde stabil bir polimer jeti elde edilebilmektedir. Uygulanan elektrik alanı çok güçlü olduğunda stabilite azalmakta ve lif düzgünlüğü artmaktadır. Sabit gerilim, konsantrasyon ve kılcal uç-toplayıcı levha mesafesinde polimer besleme debisi arttıkça lif çapı da artmaktadır. Ancak, besleme debisinin çok artması lif düzgünlüklerine sebebiyet vermektedir. Bunun nedeni, liflerin topraklanmış levhaya ulaşmadan önce kurumalarının zor olmasıdır. Polimer besleme debisi çok düşük olduğunda ise, lif çapları çok geniş bir dağılım göstermektedir [6-8]. Vasküler doku üretimi için biyobozunur sentetik polimerlerden poli(ϵ -kaprolakton) (PCL) yaygın olarak kullanılmaktadır. Doku iskelesinin olmazsa olmaz

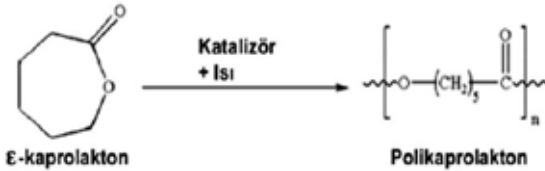


Biyomalzeme 1

2. Gün / 28 Ekim 2016, Cuma

özelliklerinden olan biyobozunma süresinin uygulama alanına uygunluğu açısından PCL ticari olarak elde edileceği gibi, istenilen biyobozunma süresinin eldesi için elektro eğirme yöntemi ile sentezlenebilmektedir. PCL sentezi, ilk olarak kalay oktoat katalizörülüğünde düşük ve yüksek molekül ağırlıklarında poli(ϵ -kaprolakton) (PCL) sentezlenecektir. Sentezlenen PCL'lerden, çözücü olarak kloroform ve dimetilformamid (DMF) karışımı kullanılarak polimerik karışımlar hazırlanacak, söz konusu karışımlar elektro-eğirme yöntemi ile proses edilerek örgüsüz nanofiber yapıda mikro gözenekli membranlar hazırlanacaktır. Daha sonra bu membranlar kullanılarak, 3 boyutlu doku iskeleleri hazırlanacaktır [11-13].

Polimer sentezi amacıyla ϵ -kaprolakton (ϵ -CL) (Aldrich, Almanya) monomeri, katalizör olarak kalay oktoat (Sigma, ABD) kullanılacaktır. (ϵ -CL) monomeri kullanılmadan önce 24 saat boyunca kurutulacaktır. Farklı molekül ağırlığına sahip (10-85 kDa) polimerler sentezlenecek, daha sonra farklı oranlarda karıştırılarak istenilen özelliklere sahip membranın eldesi için elektro-eğirme yönteminde kullanılacaktır. ϵ -kaprolakton polimerizasyonu, bir cam reaktörde (balonda) vakum altında azot atmosferinde 120°C sıcaklıkta ve 24 saat sürede etüv içerisinde gerçekleştirilecektir. Düşük molekül ağırlığa sahip polimer için monomer/katalizör oranı: 1700/3 (mol/mol), yüksek molekül ağırlığa sahip polimer için monomer/katalizör oranı: 1700/1 olarak seçilmiştir. Polimerizasyon sonrası reaktör etüvden çıkarılarak oda sıcaklığında soğutulacak, reaksiyona girmeyen monomerlerin uzaklaştırılması için sentezlenen polimerler kloroformda çözülüp, soğuk metanolde çöktürülecektir. Elde edilen polimerler daha sonra vakum altında etüvde kurutulacaktır.



Şekil 2. Isı ve katalizör varlığında poli(ϵ -kaprolakton) polimerizasyon reaksiyonu

2.2. Elektro-eğirme Yöntemi ile Membran Eldesi:

Elektro-eğirme sistemi üç temel birimden oluşmaktadır. İlk birim, doğru akımla 500 μ A ve maksimum 50 kV gerilim elde edilen yüksek güç kaynağıdır. İkinci birim, polimer çözeltisinin bulunduğu ince bir tüptür. Tüpün ucu düzgün püskürmeyi sağlamak üzere dar olarak seçilmiştir. Tüpün içine sistemdeki elektrotlardan biri takılmıştır. Bu elektroda güç kaynağından yüksek gerilim uygulanır. Son birim ise toplayıcıdır. Sözü geçen birim metalden yapılmış, üzeri alüminyum folyo ile kaplanmıştır. Toplayıcı birimi tüpün içine yerleştirilen elektrotun zıttı yüklü elektrot görevini üstlenir ve topraklanmıştır.

Gerilimin istenen ölçüde sisteme uygulanmasıyla polimer çözeltisi tüpün ucundan buhar jeti şeklinde zıt yüklü elektroda yani toplayıcıya doğru püskürür. Çözücünün yol boyunca buharlaşmasıyla katılan polimer toplayıcıya nanofiber şeklinde ulaşır ve membran oluşturacak şekilde birikir. Fiberler toplayıcı yüzeyinde birikirken birbirlerine

dokundukları noktada yapışır ve bir film şeklinde örgüsüz fibröz bir yapı oluşturur.

Tasarlanan çalışma kapsamında vasküler doku üretimi için kullanılmak üzere elektro-eğirme yöntemi ile ortalama 1 mm kalınlığında membranlar hazırlanacaktır. Literatür özetine ve proje sahiplerinin önceki tecrübelerine istinaden elektro-eğirme çözeltisi, ağırlıkça % 80 düşük, %20 yüksek molekül ağırlığında 40 g/100 ml PCL içerecek şekilde kloroform ve dimetilformamid karışımında, DMF oranı hacimce %50 olacak şekilde hazırlanacaktır. Pipet ucu-toplayıcı arası uzaklık 10-15 cm ve uygulanacak gerilim 10-15kV arasında olacak şekilde optimum koşulların bulunması sağlanacaktır. Ancak, polimer çözeltisinden elektro-eğirme ile nanofiber üretiminde; çözeltinin iletkenliği, viskozitesi, dielektrik sabiti ve yüzey gerilimi, yapının kimyasal ve fiziksel özelliklerini doğrudan etkileyen birçok parametre olduğundan, elde edilen membranlar bu parametreler göz önünde bulundurularak karakterize edilecek ve optimum elektro-eğirme koşulları modifiye edilecektir.

Elde edilen membranların, molekül ağırlıkları GPC (Jel Geçirgenlik Kromatografisi), kimyasal ve yapısal analizleri FTIR (Fourier Transform Infrared Spektrofotometresi) ve ¹H-NMR (Proton Nükleer Manyetik Rezonans), termal davranışları ise DSC (Diferansiyel Taramalı Kalorimetre) ile incelenmiş, yüzey morfolojileri ise SEM (Taramalı Elektron Mikroskopu) kullanılarak gösterilecektir. Membranların in vitro bozunma deneyleri, Ringer çözeltisi içinde vücut sıcaklığı olan 37°C'da sürekli çalkalamalı sistemde molekül ağırlığı azalması izlenerek gerçekleştirilecektir.

2.3. Sığır perikard sıvısının elde edilmesi:

Perikardial sıvı (liquor pericardi), kesimhaneye getirilen 2-3 yaşında, 350-450 kg canlı ağırlığa sahip, sağlıklı erkek, Montafon ırkı sığırlardan kesim sırasında alınacaktır. Kesim işlemini takip eden ilk 5-10 dakika içerisinde göğüs boşluğu içerisinde pericardium'un zarar görmemesine dikkat edilerek toraks açılacaktır. Organlar yerinden çıkarılmaksızın cavum pericardi'ye kalbin apex'ine yakın bölümünden iğne ile girilerek 50 ml'lik 5-6 ml serum fizyolojik çözelti içeren steril bir enjektör yardımıyla perikardial sıvı (liquor pericardi) aspire edilecektir. Pericardial sıvı miktarı 50-75 ml olabilmektedir. Ancak perikardial sıvının bir kısmı kalp ve perikard yüzeyine sıvanmış olarak bulunduğundan aspire edilebilecek miktar daha az olmaktadır. Pericardial sıvı enjektörden falkon tüpüne aktarılarak soğuk zincirde laboratuara iletilecektir. Çalışmada kullanılacak sığır sayısı 20 olarak belirlenmekle birlikte sıvı miktarı azlığı veya kontaminasyon kaynaklı sıkıntılara göre bu sayı artırılabilir.

2.4. Hücre kültürü ve vasküler doku üretimi

Laboratuvara getirilen perikard sıvısı santrifüj edilerek üstte kalan sıvı kısmı (süpernatant), damar dokusunu oluşturacak olan Human CD34⁺ Progenitor Cells from Cord Blood (H34+PC) ve düz kas (HAoSMC) hücrelerinin ko-kültüründe besi yeri desteği olarak kullanılacaktır.

Düz kas hücreleri kültür işleminde; Smooth Muscle Cell Growth Medium 2 (PromoCell), 2mmol L⁻¹ glutamin, 100 μ g mL⁻¹ penicilin, 100 μ g mL⁻¹ streptomycin ile 75 cm² kültür flaskalarda standart koşullarda inkübe edilecektir. Hücreler 8x10⁶ sayısına ulaşıncaya tripsinize edilerek skafold



Biyomalzeme 1

2. Gün / 28 Ekim 2016, Cuma

çalışmalarında kullanılacaktır [14]. Hücre sayım için Muse® Count & Viability Assay Kit (Millipore, Merck) üretici firmanın önerdiği şekilde kullanılacaktır.

H34+PC kültür işlemlerinde; %5 FBS, %1 L-glutamin, 20 µg/mL gentamycin, 50 µg/mL askorbik asit, 0.001 µg/mL human epidermal growth factor (EGF), 0.002 µg/mL human basic fibroblast growth factor (bFGF), 0.002 µg/mL insulin-like growth factor 1, 0.001 µg/mL VEGF ve 1 µg/mL hydrocortisone içeren Hematopoietic Progenitor Expansion Medium DXF-Cytokine Mix E (PromoCell) içinde kültüre edilecektir. Konflüense ulaşan H34+PC hücrelerin sayımı için Muse® Count & Viability Assay Kit kullanılacaktır.

Tüm skafoldlar için MTT boyaması yapılacak ve hücre canlılığı kontrol edilecektir. Kısaca MTT boyama şu şekilde yürütülecektir. Skafold üzerine konsantrasyonu 1 mg/mL olacak şekilde MTT solüsyonu eklenecek ve plakeler en az 4 saat inkübe edilecektir. Süre sonunda MTT karışımı uzaklaştırılacak meydana gelen kristaller DMSO ile çözülecektir. Glomax Elisa Reader (Omega) spektrofotometre ile 560nm ve 750nm olmak üzere çift dalga boyunda absorbans ölçülecektir [15].

2.5.Damarlaşma Gözlenen Skafoldların SEM ile İncelenmesi:

Damarlaşmış skafolddan üst/aşağı/90° lik açılı olacak şekilde kesitler alınacaktır. Alınan kesitler PBS ile yıkanıp, %2,5 glutaraldehide ile fikse edilecek ve PBS içinde 1 gece bekletilecektir. PBS (3x20mL) ile yıkandıktan sonra dehidrasyon için PBS-Ethanol banyosundan geçirilip (25, 30, 50, 70, 80 ve 90 ethanol) %100 ethanolde ise 3 defa 20 şer dk bekletilecektir [16].

2.6.Skafoldların Histolojik olarak Değerlendirilmesi

Hücrelerin ekildiği skafoldlar PBS ile yıkanarak %10 nötral formalin tamponunda bekletilir. Skafold üst/alt/90° lik açıyla kesitler alınarak hematoksilin-eosin (H&E), alsiyan mavisi ile boyanarak ışık mikroskopuyla doku farklılaşması izlenecektir [14].

3. Sonuçlar

Tasarlanan yöntem çalışması biyomedikal mühendisliği, kimya mühendisliği ve anatomi bölümü olmak üzere hem disiplinler arası hem de multidisipliner bir çalışma olmaktadır. Dünya genelinde en fazla ölüm sebepleri arasında yer alan kardiyovasküler hastalıkların tedavisine yönelik çalışmalar öncelikli alanlar arasında yer almaktadır. Baypas ameliyatında hasta vücudunun başka bir yerinden alınan damarın kullanılmadığı durumlarda sentetik damar grefti kullanılmaktadır. Bununla birlikte koroner arter damar çapının uyumsuzluğu ve biyoyumluluk problemlerinin ortadan kaldırmak amacıyla doku mühendisliğine yönelim artmaktadır. Bu çalışmadan elde edilecek sonuçlara göre toplumda en sık ölüm nedenlerinin başında gelen kalp hastalıklarının hücre temelli tedavisine yönelik disiplinler arası alan olan doku mühendisliği alanına da katkı sağlamış olacaktır.

Teşekkür

Bu çalışma, Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi (BAP) tarafından 6692 no'lu Öncelikli Alan Araştırma Projesi (ÖNAP) kapsamında desteklenmektedir.

4. Kaynakça

- [1] L. Bordenave, P. Menu, and C. Baquey, "Developments towards tissue-engineered, small-diameter arterial substitutes," *Expert Review of Medical Devices*, vol. 5, no. 3, pp. 337-347, 2008.
- [2] A. Rathore, M. Cleary, Y. Naito, K. Rocco, and C. Breuer, "Development of tissue engineered vascular grafts and application of nanomedicine," *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, vol. 4, no. 3, pp. 257-272, 2012.
- [3] E.W. Dean, B. Udelsman, and C. K. Breuer, "Current advances in the translation of vascular tissue engineering to the treatment of pediatric congenital heart disease," *Yale Journal of Biology and Medicine*, vol. 85, no. 2, pp. 229-238, 2012.
- [4] Formhals A., (1934), Process and apparatus for preparing artificial threads, US patent, 1,975,504.
- [5] Norton C.L., (1936), Method of and apparatus for producing fibrous or filamentary material, US patent, 2,048,651.
- [6] Kim, S. J., Lim, J. Y., Kim, I. Y., Lee, S. H., Lee, T. S., Kim, S. I., 29 June 2005, "Optimum Parameters for Production of Nanofibres Based on poly(2 acrylamido-2-methyl- 1-propane-sulfonic acid) by electrospinning, *Smart Materials and Structures*", (14) 2005 N16-N20, Institute of Physics Publishing.
- [7] Süpüren, G., Çay, A., Kanat, E., Kırıcı, T., Gülümser, T., Tarakçıoğlu, I., 2007, "Nano Lifler (Bölüm 1)", *Tekstil ve Konfeksiyon*, Sayı 1, s. 15-17.
- [8] Süpüren, G., Çay, A., Kanat, E., Kırıcı, T., Gülümser, T., Tarakçıoğlu, I., 2007, "Nano Lifler (Bölüm 2)", *Tekstil ve Konfeksiyon*, Sayı 2, s. 83-89.
- [9] Smith, L. A., Ma, P. X., 2004, "Nano-fibrous Scaffolds For Tissue Engineering", *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, s. 125.
- [10] Ur11, <http://www.centropede.com/UKSB2006/ePoster/images/bacground/ElectrospinFigure.jpg>, 21.04.2014.
- [11] Ramakrishna S., Fujihara K., Teo W-E., Lim T-C., Ma Z., (2005), *An Introduction to Electrospinning and Nanofibers*, World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., Singapur.
- [12] Huang Z.M., Zhang Y.Z., Kotakic M., Ramakrishna S., (2003), *A Review on Polymer Nanofibers by Electrospinning and Their Applications in Nanocomposites*, *Composites Science and Technology*, 63, 15, 2223-2253.
- [13] Shin Y.M., Hohman M.M., Brenner M.P., Rutledge G.C., (2001), *Experimental Characterization of [14]. Electrospinning: The Electrically Forced Jet and Instabilities*, *Polymer*, 42, 25, 9955-9967. Shen, G., H. C. Tsung et al. 2003. *Tissue engineering of blood vessels with endothelial cells differentiated from mouse embryonic stem cells*. *Cell Res* 13(5):335-41
- [15] Denizot F, Lang R, 1986. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Methods*;89(2):271-7.
- [16] Pagliari S, Tirella A, Ahluwalia A, Duim S, Goumans M, Aoyagi T, Forte G, 2014. A multistep procedure to prepare pre-vascularized cardiac tissue constructs using adult stem cells, dynamic cell cultures, and porous scaffolds. *Front Physiol.*; 5: 2.