

KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kondrosit Hücrelerinin Poli(hidroksietil metakrilat) Temelli
Disulfide ile Çapraz Bağlanmış Makro Gözenekli Hidrojeller Üzerinde Kültürü

Elif AYDOĞDU

HAZİRAN 2011

Biyoloji Anabilim Dalında Elif AYDOĞDU tarafından hazırlanan "Kondrosit Hücrelerinin Poli (hidroksietil metakrilat) Temelli Disulfide ile Çapraz Bağlanmış Makro Gözenekli Hidrojeller Üzerinde Kültürü" adlı Yüksek Lisans Tezinin Anabilim Dalı standartlarına uygun olduğunu onaylarım.

Bu tezi okuduğumu ve tezin **Yüksek Lisans Tezi** olarak bütün gereklilikleri yerine getirdiğini onaylarım.

Jüri Üyeleri

Başkan : Doç. Dr. Siyami KARAHAN
Üye (Danışman): Yrd. Doç. Dr. Mustafa TÜRK
Üye : Yrd. Doç. Dr. Lokman UZUN

21.06.2011

Bu tez ile Kırıkkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu Yüksek Lisans derecesini onaylamıştır.

Prof.Dr. İhsan ULUER
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ÖZET

Kondrosit Hücrelerinin Poli(hidroksietil metakrilat) Temelli Disulfide ile Çapraz Bağlanmış Makro Gözenekli Hidrojeller Üzerinde Kültürü

AYDOĞDU, Elif

Kırıkkale Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Mustafa Türk

Haziran 2011, 75 Sayfa

Artrit dünyada fiziksel sakatlığın önde gelen nedenlerindedir. Tıp bilimindeki gelişmeler hastalarda kayıp fonksiyonların yeniden kazandırılmasını sağlamıştır. Bu terapiler hastaların yaşamını değiştirmiş ya da kurtarmış olsa da eksik çözümlerdir. Son yıllarda, doku mühendisliği yaklaşımları osteoartrit gibi dejeneratif eklem hastalıklarının tedavisinde uygulanmıştır.

Bu tezde, kondrositleri kriyojel üzerinde kültüre ettik ve onların morfolojik, biyokimyasal ve moleküler biyolojik özelliklerini inceledik.

Çeşitli tedavi metotları olmasına rağmen kesin çözüm henüz yoktur. Bu tedavi metotlarından biri de doku mühendisliği yaklaşımıdır. Yapılan bu tez çalışmasında kondrositler kriyojeller üzerinde kültüre edilerek morfolojik, biyokimyasal ve moleküler biyolojik özellikleri araştırılmıştır.

Monomerlerin sulu çözeltilerinin şırınga kolon içerisinde -12°C ' de dondurulmasıyla gerçekleştirilen yığın polimerizasyonu ile poli (hidroksietil metakrilat) [poli (HEMA-MAH)] hazırlandı. Eridikten sonra, gözenek özelliği taramalı elektron mikroskopuyla (SEM), kondrositlerin kriyojel üzerindeki morfolojik özellikleri SEM mikroskopuyla; glikozaminoglikan (GAG) miktarı, hücre çoğalması, DNA miktarına bağlı olarak spektrofotometrik olarak

ölçüldü. Kollojen tip II miktarı PCR yöntemiyle tespit edildi. Toksisitesi WST metodu ve propodium iodit ile boyanarak tespit edildi.

Sonuç olarak kondrositlerin kriyojel üzerine tutunduğu, karakteristik özelliklerini gösterdiği tespit edilmiştir. Ancak uzun süreli inkübasyonlarda bu özelliklerini kaybettiği görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Kriyojel, doku mühendisliği, artrit

ABSTRACT

Poly(hydroxy ethyl methacrylate)-Based Disulfide Cross-Linked with the hydrogens on Macro Porous Culture of chondrocyte cells

AYDOĞDU, Elif

Kırıkkale University

Graduate school of Naturel and Applied Sciences

Department of Biology, MSc. Thesis

Supervisor: Assistant Prof. Dr. Mustafa Türk

June 2011, 75 Pages

Arthritis is the leading cause of physical disability in the world. Advances in the medical science have enabled doctors to restore loss functions in their patients. Although these therapies have saved or improved the live of patients, they remain imperfect solutions. In last years, tissue engineering approaches have been applied in the treatment of degenerative joint diseases such as osteoarthritis.

In this thesis, chondrocytes were cultured on the cryogels and their morphological, biochemical and molecular biological characteristics were investigated.

Poly(hydroxy ethyl methacrylate) [poly (HEMA- MAH)] were prepared bulk polymerization that proceeds in aqueous solutions of monomers at -12°C frozen inside in the syringe column. After melt, pore properties of cryogels and condrocytes cultured cryogels were showed by SEM microscope, glycosaminoglycan (GAG) content was measured spectrophotometrically, cell proliferation on cryogels was determined by fluorescen tspectrophotometer depending on the amount of DNA. The amount of

collagen type II was detected by PCR. Toxic effect of cryogels to chondrocytes was detected with WST method and by staining propodium iodide.

As a result, the chondrocytes attached cryogels, the characteristic features have been identified. However, these properties were lost at cultures after long-term.

Key Words: cryogels, tissue engineering, arthritis

TEŞEKKÜR

Tezimin deneysel aŐamalarındaki zorlukları gidermemi sağlayan, laboratuvarlarını ačan, maddi ve manevi yardımlarını esirgemeyen Hacettepe Üniversitesi, Kimya Bölüm Başkanı Sayın Prof. Dr. Adil DENİZLİ' ye teşekkür ederim.

Tez çalışmam sırasında bilgi ve desteği ile yanımda olan yardımını esirgemeyen hocam Yrd. Doç. Dr. Mustafa TÜRK' e teşekkür ederim.

Tez çalışmam sırasında bilgi ve desteği ile yanımda olan yardımını esirgemeyen hocam Doç. Dr. Siyami KARAHAN' a teşekkür ederim.

Polimer sentezinde yanımda olan ve bilgilerinden faydalandığım AraŐ. Gör. Nilay BERELİ' ye, laboratuvar çalışmalarımda yardımını esirgemeyen Siyami KARAHAN' a ve Gökçe ÇELİK' e teşekkür ederim.

Tezimin tamamlanmasında yardımlarını ve desteğini esirgemeyen arkadaşım Rabia ÇALI ve kader arkadaşım Mesut YILDIRIM' a teşekkür ederim.

Aileme, her zaman maddi manevi desteğini hissettiğim annem Kadriye AYDOĞDU ve annem kadar sevdiğim Ayten DENİZLİ' ye Őükranlarımı sunarım.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vi
KISALTMALAR DİZİNİ	ix
SİMGELER DİZİNİ	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kriyojeller	3
2.2. Artrit	4
2.3. Artrit Çeşitleri.....	5
2.4. Osteoartrit	6
2.5. Romatoid Artrit	7
2.6. Doku Mühendisliği.....	8
2.7. Kıkırdak Onarımında Doku Mühendisliği Uygulamaları	10
2.8. Eklem Kıkırdağının Yapısı Ve Doku Mühendisliğindeki Önemi	12
2.9. Kıkırdak Doku Mühendisliği.....	13

2.10. Hücrenin Kökeni.....	13
2.11. Kondrositler Ve Kondroblastlar.....	14
3. MATERYAL VE YÖNTEM	16
3.1. MATERYAL.....	16
3.1.1 Kriyojellerin Hazırlanışı Ve Karakterizasyonu.....	17
3.1.1.1. N-Metakroil-(L)-Histidin Metil Ester (MAH) Monomerinin Sentezlenmesi.....	18
3.1.1.2. Poli(HEMA-MAH) Kriyojel Kolonun Hazırlanması.....	19
3.2. Karakterizasyon Çalışmaları	20
3.2.1. Denge Şişme Oranının Belirlenmesi	20
3.2.2. Elementel Analiz	20
3.2.3. FTIR ile Yapı Analizi.....	20
3.2.4. NMR Çalışmaları	21
3.3. YÖNTEM.....	21
3.3.1. Hücre Kültürü	21
3.3.1.1. Primer Kondrosit Kültürü	21
3.3.1.2. Üç Boyutlu Makrokürelere Tutunan Hücre Sayısının Tespiti İçin Kondrosit Kültürü.....	22
3.3.1.3. Kriyojellerde Kültüre Edilmiş Kondrositlerin Taramalı Elektron Mikroskop (SEM) İncelemesi.....	23
3.3.1.4. Glikozaminoglikan (GAG) Miktarının Belirlenmesi.....	23
3.3.1.5. DNA Miktarının Belirlenmesi.....	24

3.3.1.6. Polimeraz Zincirleme Reaksiyonu (PCR) ile Kondrosit Fenotipi Belirlenmesi	24
3.3.1.7. İkili Boyama Metodu ile Apoptozun ve Nekrozun Belirlenmesi.....	30
3.3.1.8. WST-1 Metodu ile Sitotoksitenin Belirlenmesi	31
3.4. Hidrodinamik Özellikler.....	32
3.5. Gözenek Özelliklerinin Kontrolü	32
4. DENEYSEL SONUÇLAR	35
4.1. Şişme Özellikleri.....	35
4.2. Elementel Analiz	35
4.3. FTIR Çalışmaları	35
4.4. ¹ H-NMR Çalışması	37
4.5. Kriyojellerde kültüre edilmiş kondrositlerin taramalı elektron mikroskop (SEM) incelemesi sonuçları.....	38
4.6. Glikoz aminoglikan (GAG) miktarının belirlenmesi sonucu.....	39
4.7. DNA miktarının belirlenmesi sonucu	42
4.8. Polimer zincir reaksiyonu (PZR) kondrosit fenotipinin belirlenmesinden elde edilen sonuçlar	43
4.9. Kriyojel ekstraktının toksisitesinin ve nekrotik etkisinin belirlenmesi Sonucu	46
5.SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	49
KAYNAKLAR	51

KISALTMALAR DİZİNİ

pAAM	poliakrilamid
PHEMA	polihidroksietil metakrilat
PEG	polietilenglikol
PVA	polivinilalkol
RA	Romatoid artrit
TBS	tris buffer solusyonu
H ₂ O ₂	hidrojenperoksit
FBS	fötal sıgır serumu
EDTA	Etilendiamintetraasetat
PBS	fosfat tampon tuzlu
DMB	dimetilen mavisi
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
PCR = PZR	polimeraz zincirleme reaksiyonu
UV	ultraviyole
pAA	poliakrilik asit
MAH	Maleik anhidrid
NaOH	sodyum hidroksit
HEMA	2- hidroksietil metakrilat
APS	amonyum persülfat
TEMED	N,N,N',-tetrametilendiamin
MBAAm	N,N',-metilen-bis(akrilamid)
FCS	fetal buzağı serum
DMEM	dulbecco minimal esantial medium
SEM	taramalı elektron mikroskop
GAG	glikozaminoglikan
NaCl	sodyumklorür
TNE	Tampon (Tris, NaCl, EDTA)
OD	optik yoğunluk

cDNA	tamamlayıcı deoksiribonükleikasit
RNA	ribonükleik asit
m-RNA	mitokondrial ribonükleik asit
dT	d timin nükleotid
MgCl ₂	magnezyum klorür
TAE	Tris asetat tampon
SD	standart sapma

SİMGELER DİZİNİ

μm	mikrometre
%	yüzde
mL	mililitre
mg	miligram
gr	gram
w/v	ağırlık /hacim
cm	santimetre
$^{\circ}\text{C}$	santigrad derece
mm	milimetre
mM	milimolar
μl	mikrolitre
nm	nanometre
U/mL	unit/mililitre
Rpm	dakikadaki dönüş sayısı
Dk	dakika
Sn	saniye
$\mu\text{g/ml}$	mikrogram/mililitre
$\mu\text{l/ml}$	mikrolitre/mililitre
$\mu\text{l/well}$	mikrolite/kuyucuk
M	molar
=	eşittir
\pm	artı-eksi

\geq

büyük eşit

\approx

yaklaşık

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>ÇİZELGE</u>	<u>Sayfa</u>
3.1. Rneasy Mini Kit (Qiagen Katalog No: 74104 (50 reaksiyonluk)) içinde Bulunanlar.....	26
3.2. First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche 1596 594 (10x250unit)) içinde Bulunanlar.....	28
3.3. PCR Tüplerinde Master-Mix hazırlanışı	28
3. 4. cDNA için Pipetleme planı.....	29
4.1. Poli(HEMA-MAH) kriyojelin şişme davranışı	35
4.2. İkili boya ile elde edilen nekrotik indeks (%) oranları.....	48

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>ŞEKİL</u>	<u>Sayfa</u>
3.1. MAH monomerinin sentezi	19
4.1. p(HEMA-MAH) kriyojelin kimyasal yapısı	36
4.2. MAH monomerinin FTIR spektrumu	37
4.3. MAH monomerinin ¹ H-NMR spektrumu.....	38
4.4. Farklı zamanlarda kriyojel üzerinde kültüre edilen kondrosit hücrelerinin Ve kriyojelin taramalı elektron mikroskop fotoğrafları.....	39
a. Kriyojelin üstten görünüşü	39
b. Kriyojelinde alınan enine kesitten elde edilen fotoğraflar	39
c. 4 günlük kültürden elde edilen fotoğraf.....	39
d. 8 günlük kültürden elde edilen fotoğraf	39
4.5.a. Ticari olarak satılan kondrotin sülfattan hazırlanan standart Grafiği.....	41
b. Farklı zaman dilimlerinde kriyojel üzerinde kültüre edilen kondrosit Hücrelerinden elde edilen Glikoz amino glikan (GAG) miktarlarını gösteren Grafik.....	41
4.6.a. Ticari olarak satılan balık sperm DNA' sından elde edilen standart Grafik	43

b. Farklı sürelerde kriyojel üzerinde kültüre edilmiş kondrosit	
Hücrelerinden elde edilen DNA miktarındaki değişimi gösteren	
Grafik	43
4.7. Polimerik zincir reaksiyonu (PZR) sonucu elde edilen cDNA jel	
fotoğrafları. 1. birinci güne ait fotoğraf. 2. dördüncü güne ait fotoğraf, 3.	
sekizinci güne ait fotoğraf, 4. onikinci güne Ait fotoğraf, 5. onaltıncı güne	
ait fotoğraf. DF; DNA marker, K1; kollagen tip I, K2; Kollagen tip II ve β ;	
Betamiyogloblin c-DNA'sını ifade Etmektedir.....	45
4.8. WST metodu ile elde edilmiş toksisite sonuçları. Grafikte konsantrasyona	
Karşı 72 saat' lik inkübasyonda % canlılık oranları	
Verilmiştir	47
4.9. İkili boyama metodundan elde edilen Floresan mikroskop	
Fotoğraflar.....	47
4.9.a. Kondrosit hücrelerinin kontrol grubu.....	47
b. 120 μ L konsantrasyonda kriyojel ekstraktı uygulanmış Nekrotik ve	
Nekrotik olmayan kondrosit hücrelerin fotoğrafı. Fotoğraflar 200X	
büyütmede Leica DMI 6000 inverted mikroskopta çekilmiştir.	
Fotoğraflar FITC filtrede Çekilmiştir.....	47

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Osteoartrit özellikle ileri yaşlarda önemli oranda disabiliteye yol açan, sinoviyal eklemleri tutan kronik noninflamatuvar ve sıkça rastlanan romatizmal hastalıklardan biridir [1-3].

Eklem kıkırdağını koruyucu ve onarıcı çeşitli ajanlar üzerinde çalışmalar yapılmakta ve gelecek ileriki yıllarda osteoartrit tedavi yöntemlerinin değişeceği düşünülmektedir [4,5].

Günümüzde eklem kıkırdağının korunmasında hyaluranik asit preparatları gibi ajanlar kullanılsa da sadece ilaç tedavileri yeterli değildir [5-7].

Bu yüzden, temel olarak eğitim ve psikososyal destek, egzersiz programları, fiziksel ajanlar ile biyomekanik ve bazı cerrahi uygulamaları kapsayan rehabilitatif yaklaşımlar tedavide önemli yer tutar [8].

Romatoid artrit de (RA) eklemlerde ağrı, sertlik, şişme ve harekette güçlük gibi rahatsızlıklara neden olan kronik bir rahatsızlıktır. Aynı zamanda boşaltım organları, sinir sistemleri, solunum ve dolaşım organları, göz ve deri gibi diğer organlarda etkilidir [9].

Son dönemde RA hastalığı tedavisinde yeni metotlar kullanılır. 1980' lerle plazma değişimine alternatif olarak immünoadsorpsiyon metodu önerilmiştir [10]. İmmünoadsorpsiyon metodunda plazmadan sadece patojen antikolar uzaklaştırılmaktadır. Bu durumda plazma değişiminde karşılaşılan bazı sorunlar ortadan kalkmaktadır [11]. Monolitik kolonlar, kolon etkinliğinde herhangi bir azalma olmayan analitlerin yüksek hızda ayrılmasına olanak sağlayan yeni kromatografik ortamlar olarak adlandırılabilirler [12]. Süpermakrogözenekli monolitik kolonlar yarı donmuş ortamda oluşan radikalik polimerizasyon ile hazırlanmaktadır. Yarı donmuş ortamda oluşan buz kristalleri porojen olarak rol oynamakta ve monomerler ve başlatıcı, çözülmüş olarak küçük bir bölümü oluşturmaktadır. Sistem donmuş bir buz

kütlesine benzemesine rağmen polimerizasyon donmamış bir kısımda etkin olarak elde edilir. Eridikten sonra sürekli jel (kriyojel) oluşmaktadır [13,14]. Üretilen bu kriyojeller doku mühendisliği amacı ile in vitro ortamlarda kullanılmaya başlanmıştır.

Yapılan tez çalışmasında bu amaçla, Poli (hidroksietil metakrilat) [poli(HEMA)] yüksek biyolojik uyuşabilirliğe sahip olduğundan biyolojik uygulamalarda en sık kullanılan polimerlerdendir. Bu polimerlerin mekanik olarak dayanıklılığı ve kanla uyuşabilirlikleri oldukça yüksektir [15]. Yaptığımız çalışmada uygun yaştaki buzağının hareketli eklemleri total olarak alınarak laboratuvar ortamında kırıldak biyopsisi alındı. Çeşitli işlemler uygulanarak hücreler dokudan izole edildi ve hücre kültüründe çoğaltıldı. Çalışmamızda; pHEMA kriyojeller üzerinde primer kondrosit hücreleri kültüre alınarak jellerin kırıldak doku mühendisliği için uygunluğunu araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kriyojeller

Makro gözenekli polimerik materyaller biyoteknolojide, biyomedikalde ve eczacılık biliminde ön plana çıkmaktadır [16,17]. Makro gözenekli polimerik materyallerin sentezine bilinen yaklaşımlar, indüklenmiş faz dağılmasını, gaz veya sıvı porojenlerin kullanımını, süper kritik uygulamalar veya kalıp sentezlerini içerir [18-22]. Son dönemlerde kriyotropik jelleşme tekniği negatif sıcaklıklarda hidrofilik makro gözenekli materyallerin oluşturulmasında kullanılır [23-25]. Bu polimerik materyaller kriyojeller olarak adlandırılır. Kriyojeller pratik olarak bir jel oluşturan öncüllerden üretilir ve çok sayıda değişik morfoloji ve gözeneklere sahiptirler.

Kriyotropik jelleşme (kriyoyapılanma) potansiyel olarak jelleşme kapasitesi olan sistemin kriyojenik işleme sokulmasıyla meydana gelen sipesifik türdeki jel oluşumudur. Kriyojelin temel özelliği; sıcaklığın düşürülmesiyle jelleşme meydana geldiğinde, kriyojelleşmeyi soğutmayla oluşan jelle ayırt eden çözücünün zorunlu olarak kristal hale gelmesidir.

Kriyojellerin (makro gözenekli jeller olarak tanımlanabilir) oluşumunda yarı donmuş sulu ortamda buz kristalleri gözenekli bir yapı oluşturur kalıp buz kristallerinin erimesinden sonra gözenekler birbiri ile bağlanmış olur. Sistemin büyük çoğunluğunda gözenekler birbiri ile bağlantılı ve yüksek esnekliğe sahiptir. Klasik jellerin tersine kriyojeller heterofaz sistemde polimerleşir. Kriyojellerde makro ve mikro gözenekli yapılar da olabilir [26].

Kriyojeller yüksek esneklik ve süngersi yapısıyla yüksek ve düşük moleküler ağırlıklı öncüllerle oluşturulan ve sulu ortamda serbest radikal, polimerizasyon ile negatif sıcaklıkta üretilir [24,25,27,28].

Kriyojellerin scaffold yapıları poliakrilamid (pAAM), polihidroksietil metakrilat (pHEMA), polietilenglikol (PEG), dextranmetakrilat, polivinilalkol (PVA) temeline dayanır [24,28-31].

1980' li yıllarda bilinmesine karşın biyo ayırma özellikleri son zamanlarda fark edilen kriyojeller disk, monolitik kolon ve tabaka şeklinde oluşturulur [23,32].

2.2. Artrit

Kireçlenme ve iltihaplı eklem romatizması olarak bilinen ve kronik bir hastalık olan artrit, eklemlerde ağrı, hareket kısıtlılığı ve eklemlerde şekil bozukluğu ile kendisini gösterir. Akut veya kronik olabilen artritlerin en sık görülen şekli romatoid artrit (RA) ve osteoartrittir (OA) [33,34,36,39].

Artrit ve romatizma kelimeleri çoğu zaman eş anlamlı olarak kullanılır ancak;artritler eklemler ile, romatizma ise daha çok kaslar, eklemleri birbirine bağlayan bağlar ve kasların eklemlere bağlanma yerleri ile ilgilidir [38,40-42].

Artrit, dünya nüfusunun % 10'unu etkilemekte ve kadınlarda erkeklere nazaran 3 kat daha fazla görülmektedir. Dünya üzerinde 50 yaş üzerindeki insanlarda iş bırakma nedeni olarak kardiyovasküler hastalıklardan sonra ikinci sırada gelmektedir. Daha çok kadınlarda görülen romatoid artrit prevalansı % 0.3-2.1 oranındadır. Dünyadaki 60 yaş üzeri kadınların % 18'inin, erkeklerin ise % 9.6'sının osteoartrit olduğu tahmin edilmektedir. Amerika'da 65 yaş üzerindeki bireylerin % 49'u artritlenmektedir. Türkiye'de 700 bin kişi romatoid artritlenmektedir. Ayrıca Türkiye'deki 65 yaş üzerindeki bireylerin 1/3'ünün osteoartrit hastası olduğu ve Türkiye'deki osteoartri hastaların % 75'ini kadınların oluşturduğu bilinmektedir [36,38,40,43,44].

Artrit daha çok diz, el, omurga ve kalça eklemleri olmak üzere tüm eklemleri etkilemektedir. Artritin ortaya çıkmasında obesite, yaş,

hipertansiyon, eklemlere aşırı baskı, aşırı hareketsizlik, genetik faktörler ve özellikle de kadınlarda menopoz sonrası hormonal bozukluklar (özellikle östrojen hormonu) risk faktörleri olarak sıralanabilir [33,34-36,40].

Ağrıyı azaltmak, enflamasyonu kontrol altına almak ve eklemlerin hareketini sürdürerek normal yaşantının devamını sağlamak artrit tedavisi ve bakımının temel amaçlarıdır. Dinlenme, egzersiz, eklemlerin korunması, ağrı ve enflamasyonun denetimi de artrit tedavisi ve bakımının öğeleridir [33,36,38,40,45].

2.3. Artrit Çeşitleri

Artrit, 100'ün üzerindeki durum ve hastalığı kapsar. Dünyada ve Türkiye'de en sık görülen artrit çeşitleri; inflamatuvar eklem hastalığı olarak bilinen "romatoid artrit" ve dejeneratif eklem hastalığı olarak bilinen "osteoartrittir". Ayrıca artrit ankilozan spondilit, reaktif, psoriatik, enteropatik, juvenil gibi spondiloartrit türlerinin yanı sıra, fibromyalji, gut, sedef, mono, enfeksiyöz artrit, sistemik lupus eritematozus, behçet, vaskülit olmak üzere 100'ün üzerinde pek çok çeşidi vardır [37,38,40,43,46].

İlk kez 1859'da Garrod tarafından adı konan, kronik poliartritis olarak da adlandırılan RA, eklemlerin sinovyal dokusunu tutan kronik, inflamatuvar, ağrılı ve nedeni bilinmeyen bir hastalıktır. RA, birey ve ailenin yaşam kalitesini düşürerek bireye yaklaşık her 3-6 ayda bir olmak üzere ömür boyu hastane kontrolü gerektiren bir hastalıktır. Bu nedenle RA, ulusal sağlık harcamalarını büyük oranda kullanılmasını gerektiren kronik bir hastalıktır [42,45,46-52].

Dejeneratif eklem hastalığı olarak adlandırılan OA ise, özellikle yaşlılarda sakatlığa yol açabilen, kıkırdak dokusunun kaybı ve eklem yüzeylerinde yeni kemik oluşumu ile karakterize kronik noninflamatuvar bir hastalıktır [33,38,40,53].

2.4. Osteoartrit

Dejeneratif eklem hastalığı (osteoartrit), özellikle ileri yaşlarda önemli oranda disabiliteye yol açan, sinovyal eklemleri tutan kronik noninflamatuvar ve sıkça rastlanan romatizmal hastalıklardan biridir.

75 yaşındaki bireylerin %30' u belirti vermeye birlikte, radyolojik osteoartrit 3. evrede %20, 8.evrede ise %80' den fazla görülmektedir [1-3].

Osteoartritteki yapısal ve biyomekanik bozuklukları düzelttiği ispatlanmış herhangi bir ajan bulunmamakla birlikte hastalığın tedavisi genellikle belirtileri düzeltmeye yönelik olmaktadır.

Hayvansal çalışmalarda bazı medikal ve biyomekanik yöntemlerin hastalığın seyrini yavaşlattığı bazen de geriletmediği belirtilmiştir. Eklem kıkırdağını koruyucu ve onarıcı çeşitli ajanlar üzerinde çalışmalar yapılmakta ve gelecek ileriki yıllarda osteoartrit tedavi yöntemlerinin değişeceği düşünülmektedir. Ayrıca, günümüzde hastalar erken dönemde çok basit tedavi yöntemlerinden belirgin yarar sağlamaktadırlar [4,5]. Osteoartritte en önemli belirti ağrı ve hareket kısıtlılığıdır. Ağrının azaltılmasında basit analjezikler, nonsteroidal antiinflamatuvar ilaçlar, lokal steroid enjeksiyonları, antispazmadikler yaygın bir biçimde kullanılmaktadır.

Günümüzde eklem kıkırdağının korunmasında hyaluranik asit preparatları gibi ajanlar kullanılsa da sadece ilaç tedavileri yeterli değildir. Hastalık ilerledikçe kronik eklem ağrısı, hareket kısıtlılığı ve kas güçsüzlüğü, mobilitede kısıtlanmaya ve disabiliteye yol açmaktadır [5-7]. Bu yüzden, temel olarak eğitim ve psikososyal destek, egzersiz programları, fiziksel ajanlar ile biyomekanik ve bazı cerrahi uygulamaları kapsayan rehabilitatif yaklaşımlar tedavide önemli yer tutar.

Osteoartrit tedavisinde temel amaç; inaktivite ve sertliğinin etkileri ile, mekanik strese bağlı ve dinlenmedeki ağrıyı azaltmak, eklem hareket

açıklığını korumak, deformasyonlar, hareket kısıtlılığı ve disabilitiyi önlemektir [8]. Bu yüzden hekimlerin, hastaların ağrısını azaltan ve yaşam kalitesini arttıran bu metodlar konusunda bilgi sahibi olması gerekmektedir.

2.5. Romatoid Artrit (RA)

RA hem eklemesel hem de sistemik belirtileri olan kronik bir otoimmün rahatsızlıktır. Tam olarak patojenisi bilinmemektedir ve tedavisi yoktur [54,55].

Romatoid artrit nedeni hala bilinmese de uzun yıllar enfeksiyondan şüphelenilmiştir. Gıda alerjileri veya dışarıdan organizmalardan şüphe duyulmuştur. Ayrıca fiziki veya psikolojik etkiler, stres ve yetersiz beslenme hastalıkta rol oynayabilir.

Hastalığın seyri hastadan hastaya büyük oranda çeşitlilik gösterir. Bazı hastalar orta seviyeli kısa-dönem belirtilere sahipken, çoğunda hastalık hayat boyunca gelişim gösterir [56].

Enflamasyon eklem bölgesinin kalınlaşmasına neden olur aşırı sinoviyal sıvı oluşturur. Sinoviyal sıvı hareket esnasında eklemleri rahatlatan ve koruyan bir maddedir. Doku enflamasyonu ve sinoviyal sıvı birikmesi eklem ağrısı, bükülmezlik ve şişmeye neden olur. İltihaplı sinoviyal, sinoviyal sıvı içerisinde yol alarak kemik ve kıkırdağa atak yapabilecek enzimleri oluşturur. Diğer artrit türlerinin aksine RA' nın etkisi sadece eklemlerle sınırlı değildir ve tüm vücutta problem yarabilir. Zamanla eklem ağrısı artar ve eklemler deformasyona uğrar. Erken tedavi bozulmayı yavaşlatabilir ve ağrıyı hafifletebilir [57].

RA üç aşamada ilerler:

1. İlk olarak sinoviyal zarın şişmesiyle eklem etrafında ağrı, sıcaklık, bükülmezlik, kızarıklık ve şişme meydana gelir.
2. İkinci olarak hücrelerin hızlı bölünmesi ve gelişmesiyle sinoviyal kalınlaşma meydana gelir.
3. Üçüncü olarak iltihaplı hücreler kemiği ve kıkırdağı sindirebilen enzimler salgılar, çoğunlukla eklem yeri değişir, acı ve ağrı artar, hareket kaybolur [57].

Otoimmün hastalıklar kadınlarda erkeklere oranla daha yaygındır. Kadınlarda var olan östrojen hormonunun bazı otoimmün hastalıklara yol açtığı düşünülmektedir. Ayrıca otoimmün hastalığının varlığı diğer bir otoimmün hastalığın oluşma ihtimalini artırır [58].

Herhangi bir ırk ve coğrafi bölge farkı olmaksızın RA' nın tüm dünyada görülme sıklığı yaklaşık % 1 dolaylarında iken Sahra altı Afrika kırsalında yaşayanlarda ve Karayipli siyahlarda daha az görülür. Hastalık her yaşta kendini gösterebilmesine karşın hastaların % 80' inde 35-50 yaş arasında ortaya çıkar. Kadınlarda, erkeklere oranla 2-3 kat daha fazla görülür ve yaş ilerledikçe cinsiyet farkı kaybolur [59]. Cinsiyet farklılığının temel nedeni tam olarak bilinmese de endokrin sistemin immün fonksiyon üzerinde etkili olduğu düşünülmektedir [60].

2.6. Doku Mühendisliği

Doku mühendisliği günümüzde ve gelecekte tıbbın en önemli tedavi şeklini oluşturacaktır. Günümüzde rejeneratif tıpta devam eden araştırmaların çoğu doku mühendisliğinde biyomateryallerle oluşturulan destek ve yapı malzemesinin geliştirilmesi yönündedir. Bir biyomateryal olan kitosanın doğal bir polimer olması, gözenekli yapıya sahip olması, kimyasal değişikliklere uygunluğu, jel formunda kullanılabilirlik özelliği, biyouyumlu olması ve metabolitlerinin zararlı olmaması; doku mühendisliğinde ilgi kaynağı haline

gelmiştir. Kitin ve kitozdan türevi bileşiklerin, biyomateryal olarak çok çeşitli alanlarda kullanıldığı bilinmektedir [61].

Doku mühendisliği; amaca uygun doku ve organ meydana getirmek için canlı hücrelerin, genellikle polimerlerden oluşan destek, iskelet tabaka üzerinde bu hücrelerin ve dokunun biyolojik işleyiş ve organizasyonunu oluşturulmasına yönelik bir multidisipliner bilim dalıdır. Bilim alanındaki genel düşünce ilerideki doku mühendisliğinin yapay organ üretilmesi şeklinde olacağı yönündedir [61].

Bu bilim dalının temelini oluşturan hücre kültür çalışmalarında olduğu gibi canlı hücreler; matriks oluşumundan, hücre proliferasyonu ve differansiyasyonundan sorumludur. Bu alanda çalışmalar insan genom projesinin tanımlanması gen baskılanmasını kontrol eden in-vivo ve in-vitro sinyal mekanizmalarının aydınlatılması, gelişim biyolojisi ve patoloji dallarında ilerlemeye olanak sağlamıştır. Bunun yanı sıra moleküler genetik, immünoloji, cerrahi, biyomühendislik ve monoklonal antikor ve aşı üretimi alanlarında da etkin rol oynamaktadır [62]. Rejeneratif tıpta ki bu yeni yaklaşım üç boyutlu proliferatif organ çalışmalarına önemli bir hız kazandırmıştır.

Örneklerden en başarılısı suni deri modellerinin geliştirilmesidir. Yapılan çalışmalarda, suni deri oluşturmak üzere kullanılan organotipik kültürler; epidermal keratinositler, dermal fibroblastlar; polimer ve kollajen esaslı özel filtreler üzerinde oluşturulmaktadır. Elde edilen sentetik deri örnekleri greftleme işlemleri için uygun özelliktedir ayrıca deri örnekleri irritasyon ve inflamasyon testleri içinde kullanılmaktadır [63,64].

Doku ve hücre kültürleri günümüzde bilimin pek çok alanında kullanılan bir teknoloji haline gelmiştir. Bu yeni teknoloji gen terapisi, organ-doku nakli çalışmaları ve klonlama çalışmalarının ilerlemesiyle ivme kazanmıştır. Doku ve hücre kültür tekniklerindeki ilerlemeler hayvan deneylerini geri plana itmiştir. Örneğin eskiden havanlar üzerinde yapılan yeni ilaçların denenmesi ve yeni tedavilerin geliştirilmesi amacı ile yapılan hücre dışında ilaçların

Zararlı etkilerinin belirlenmesi artık hücre ve doku kültürlerinde gerçekleştirilmektedir [65].

Doku ve hücre kültürünün dinamik özelliği olan sayıca artış, göç, besin kullanımı ve ürün eldesinin kontrolü zor olaylardır. Bu nedenle hücre içi koşullardaki hücre etkileşimlerinin karmaşıklığının hücre dışı koşullarda yaratmak çok zor olabilmektedir. Bu konuyu destekleyici nitelikteki orijinal dokudaki yapısal bütünlüğü sağlamaya yönelik fazla çalışma ve eğilim oluşturulmaktadır. Bu amaçla organotropik kültürlerde farklı nesil hücreler kombine olarak çoğaltılmaya çalışılmaktadır. Bu hususta, amniyotik fibroblastların oluşturduğu hücrelerden 'besleyici tabaka' oluşturup üzerinde embriyonik hücre kültürlerinin yapılması yada yapay deri geliştirilmesi gibi örnekler verilebilir [66].

2.7. Kıkırdak Onarımında Doku Mühendisliği Uygulamaları

Bilim adamları uzun süredir, sinoviyal eklemlerde onarım ve yenilenme yeteneği sınırlı olan kıkırdak kaybı veya bozulmalarının tedavisinde yeni yöntemler üzerinde çalışmaktadır. Burada onarım ve yenilenme kavramları arasındaki farka değinmek gerekmektedir. Yenilenme normal eklem kıkırdağının ayırt edilemeyen yeni doku oluşumunu ifade ederken, onarım yer alan eklem kıkırdağının hiyalin kıkırdağa benzeyen ancak yapı, işlev ve içerik olarak farklı olarak yeni bir doku ile yer değiştirmesidir.

Doku mühendisliği, biyolojik dokuların yapay yada yapay olmayan malzemeler üzerine yerleştirilen hücreler veya bunlara eklenen sistemik yada yerel düzenleyiciler ile tamiridir.

Son dönemlerde doku mühendisliğinde yapay organ ve hücrelerin kullanılmasının yanı sıra, büyümeyi ve farklılaşmayı etkileyen veya önleyen sistemik veya yerel etkili düzenleyicilerin doku mühendisliğinde kullanılması gündemde olup; özellikle genetik taşıyıcılar kullanılarak bu mediatörlerin

hasarlı dokuya aktarılmasını yönelik çok sayıda çalışma meydana getirilmektedir [66].

Doku mühendisliğinin tarihsel gelişimine baktığımızda 20. yüzyılın başlarında Lexer yeni kadavradan aldığı allogreftleri eklem rekonstrüksiyonunda kullanarak doku mühendisliği kavramını ilk ortaya süren araştırmacı olmuştur [67].

Önceleri; kırıkta, kemik, diş ya da başka dokuların suni malzemelerle onarılması çabası başarısızlıkla sonuçlanmıştır. Sonraki yıllarda genel anlamda malzeme teknolojisindeki gelişmelerin akabinde tıpta yeni metal veya metal olmayan seramik ve polimer gibi sentetik malzemelerin geliştirilmiş olması doku mühendisliği çalışmalarını hızlandırmıştır.

Doku mühendisliğinde elde edilen dokular, hücre içi ortamda doğal dokular gibi fiziksel, kimyasal, biyolojik uyarılara uyumlu cevap verirler. Buna karşılık hücre içermeyen bir implant, enzimler tarafından dejenere olur yada mekanik uyarılarla fiziksel özelliğini kaybeder. Bu gerçek, doku mühendisliği çalışmalarının temel dayanağını oluşturur [68].

Eklem kırıkta kayıplarında dokunun kendi kendini onarması oldukça zordur. Sınırlı onarım gerçekleşse de oluşan doku, fibröz kırıkta olup orijinal eklem kırıkta ile aynı özelliği taşımamaktadır. En iyisini oluşturma isteği ile çok sayıda araştırmacı, eklem kırıkta onarımında değişik tedavi yöntemleri üzerinde yoğunlaşmıştır. Bu yöntemlerde doku mühendisliği yaklaşımları, diğer tıp alanlarında olduğu gibi ortopedi ve travmatolojide de önemli yer tutmaktadır.

2.8. Eklem Kıkırdağının Yapısı ve Doku Mühendisliğindeki Önemi

Eklem kıkırdağı gözle incelendiğinde, bozulmalara direnç gösteren, sert, parlak bir yüzey olarak görülür. Bunun yanı sıra ışık mikroskopunda incelendiğinde ise tek tip hücrenin bulunduğu, kan ve lenf damarları ile sinir uçlarının bulunmadığı bir doku ön plana çıkmaktadır. Kas veya kemik gibi dokularla kıyaslandığında eklem kıkırdağı daha düşük metabolik aktivite gösterir. Eklem kıkırdağı hücre, eklem sıvısı ve makromoleküler ağ iskeletinden oluşurken, tendon, ligament ve menisküs gibi diğer bağ dokulara benzer özellik gösterir. Yapısını ve mekanik özelliklerini ağırlıklı olarak makromoleküler ağ sisteminden alır.

Erişkin eklem kıkırdağının yalnızca % 1' ini kondrositler oluştururken, su eklem ile etkileşerek eklem kıkırdağının yaş ağırlığının yaklaşık % 80' ini oluşturur. Su ile ağ molekülleri dokunun mekanik özelliklerini belirler. Eklem kıkırdağı Tip 2, 6, 9, 10 ve 11 kollajenlerini bünyesinde bulundurmaya beraber % 90-95' ini Tip 2 kollajen oluşturur. Tüm doku boyunca uzanan Tip 2 kollajen ağı direnç oluşturur. Kondrositlerle ağ arasındaki iletişim, dokunun yaşam boyu bütünlüğünün korunmasını sağlar. Kondrositlerle ağ arasındaki ilişki, hücrelerin ağ makromoleküllerinin üretilmesiyle sınırlandırılmaz. Ağ, normal eklem hareketleri sırasında hücreye mekanik yaralanmalardan korur ve hücrenin fenotipinin devamını sağlar. Besinler, ağ moleküllerini sentezlemek için gerekli maddeler, degrade olan ve yeni sentezlenen ağ molekülleri, metabolik artıklar ve sitokin, büyüme faktörü gibi hücre fonksiyonlarının düzenlenmesinde yardımcı moleküller ağdan geçerler. Ayrıca bu moleküller ağda depolanabilirler. Ağdan geçecek molekülün tipi ve geçiş hızı yoğunluk ve içeriğine bağlıdır [69].

Kondrositler, yaşam süresince ağ makromoleküllerini yıkar veya yapar. Yapım ve yıkım arasındaki dengeyi kontrol eden sistem veya ilişki henüz çok iyi bilinmemektedir. Ağ, kondrositler için uyarı iletkeni görevini de gerçekleştirir ve eklem yüzeyinde mekanik yüklenmeyle oluşan sinyalleri kondrosite iletir. Kondrositler bu sinyallere cevap olarak, otokrin ve parakrin mekanizma ile sitokinleri uyararak ağda değişiklikleri başlatır. Yer çekiminin

olmadığı ortamlarda ve uzayda kültüre alınan kondrositler morfolojik değişikliğe uğrar bu nedenle eklem kıkırdağının normal bileşimini devam ettirebilmesi için azda olsa hareket ve mekanik yüklenmeye ihtiyaç vardır [69-72].

Kondrositler ve ağ arasındaki biyolojik ve mekanik etkileşim, kıkırdak onarımını sağlayan çözüm yolunda en önemli yol göstericidir. Onarım için kullanılacak doğal yada yapay malzemeler bu etkileşimi örneklendirmelidir.

2.9. Kıkırdak Doku Mühendisliği

Kondral ve osteokondral kayıplarda, dokunun kendini yenileme yeteneği sınırlıdır. Buda araştırmacıları hücreleri hasarlı veya kayıp bölgeye uygulama ve barındırma yollarını araştırmaya yöneltmiştir. Kıkırdak doku mühendisliği bu sorunu çözmek için ortaya çıkarılmış biyoteknolojik bir alandır. İlk kez 1977 yılında Green tarafından ortaya konulmuş ve 1980' li yıllarda gündeme gelmiştir [73].

1994' de Brittberg ve arkadaşları ilk klinik uygulama sonuçlarını belirtmişlerdir [74]. Kıkırdak doku mühendisliğinin amacı, elde edilen yapay dokunun normal eklem kıkırdağı ile eş biyomekanik özelliklere sahip olmasıdır. Ancak bu şekilde eklem yüksek gerilme altında kaldığı hücre içi ortamda normal fonksiyonunu devam ettirebilir.

2.10. Hücrenin Kökeni

İntraselüler işlevsel ağ oluşturmak için metabolik etkinlikleri açısından uyumlu hücrenin edinilmesi gerekmektedir. Chen ve arkadaşları, in vitro bir çalışmada, transplante edilen hücrenin sayısının sentezlenen ağ miktarını etkilediği belirtmişlerdir [75].

Araştırmacılar çok çeşitli hücre seçenekleri arasında durmuşlardır. Tam kat eklem kıkırdağı kayıplarında onarım için hücre ile ağ bileşeni için kullanılan

hücreler erişken eklem kıkırdağı kondrositi, periosteum ve perikandriumun kambiyum bölgesinden alınan hücreler, mezankimal kök hücreler, sinoviyal hücreler, fetal ve embriyonik öncül hücreler (fetal kök hücreler ve kondroblastlar) dir. İyileşme olayı sadece bu şekilde değil aynı zamanda subkondral kemikten gelen diğer hücreler ve bunların sentezlediği sitokinlerle de olmaktadır.

Bu sebeple kıkırdak doku mühendisliği çalışmalarında kontrol edilemeyen çok sayıda değişkenin varlığı gözden kaçırılmamalıdır.

2.11. Kondrositler ve Kondroblastlar

Kıkırdak doku mühendisliğinde ilk akla gelen hücre modeli kondrositlerdir. Bir çok araştırmacı tarafından kolayca bulunduğu için yaygın şekilde farklı polimer ağlarla birlikte kullanılmıştır.

Erken dönemde kıkırdak yüzeyinde yeterli düzeyde onarımı sağlandığı fark edilmiş ancak uzun dönem izlenimlerinde aynı sonuca ulaşılmamıştır. Farklılaşmış dokudan üretildiğinden yeterli çoğalma ve yeniden farklılaşmayı sağlamada yeterli olmadıklarına değinilmektedir.

Diğer taraftan, kıkırdağın her tabakasındaki kondrositin kendine özgü farklı biyokimyasal, morfolojik özellikleri vardır. Tam kat kıkırdak örneği alınarak elde edilen kondrosit çözeltisi tek katlı kültür ortamında üretildiğinde oluşan hücrelerin tekrar ağa aktarılmasıyla, farklı tipte makromolekül sentezleyen farklı biçimde ayrılmış hücrelerin birbiri ile karışacağını söylemek mümkündür. Bu olayda erken dönemde her şey normal gözükürken, uzun dönemde kıkırdak yüzeyinde kalsifiye adacıklar görülmektedir. Bu durum farklılaşmış kondrositlerin zona özel olduğunun ispatıdır [76].

Bu sorunun üstesinden gelebilmek için, Kandel ve arkadaşları farklı kıkırdak katlarından elde ettikleri kondrositleri laboratuvar ortamında üreterek orijinal üç boyutlu eklem kıkırdağını meydana getirmişlerdir [77].

Kondrositler kültüre alınarak, kıkırdak defektine enjekte edilip, üzerini tibia proksimalinden alınan periost örtüsü ile kapatılması insanlarda uygulanan bir yöntemdir [78].

Bu yöntem uzun süre takip altında tutulmuŐ, onarılan kıkırdak yüzeyinde kalsifiye alanlar gözlenmiştir. Bunu araŐtırcılar periostal flebe olarak tanımlamıŐ ayrıca yukarıda bahsi geçen nedenden dolayısıyla böyle bir sorun ortaya çıkmıŐ olabilir. Perikondrial ve periosteal hücreler her iki dokuda kondrojenik iŐlevlerini kalsiyum tabakalarındaki proliferasyon iŐlevli hücrelerinden alır [79].

Otojenik kökenli hücreler kullanıldığında daha baŐarılı olunmuŐtur. Ancak yine de bu hücrelerin uzun süre canlı kalmadığı ve zaman içerisinde iyileşme dokusundaki miktarlarının azaldığı belirtilmiştir. Bunun yanı sıra subkondrol kemikle bağlantıda olan hücrelerin kondrosit değil de osteoblastlara farklılaŐabileceđi belirtilmiştir [80].

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Asetik asit (Reidl-de Haén, Almanya), TPP (Sigma Aldrich, ABD), TBS buffer (Thermo, USA), %30' luk H₂O₂ Solüsyonu (Sigma), Ksilol (Merck), Etanol (Merck, Almanya), FBS (Fötal sığır serumu, Serva, İsrail), Dulbeccos Modified Eagles Medium (DMEM, BD., ABD), tripsin/10 mM EDTA (Etilendiamintetraasetat) (Sigma, ABD), PBS (fosfat buffer saline) (Sigma, ABD), kollagenaz II (Sigma-Aldrich, Almanya), Dimetilen mavisi (DMB, Sigma-aldrich, Almanya), formik asit (Sigma-Aldrich, Almanya), papain (Amresco, İsrail), EDTA (Amresco, İsrail), N-acetyl-L-cysteine (Sigma-aldrich, Almanya), kondrotin sulfat (Sigma-Aldrich, Almanya), Hoechst 33358 (Sigma-Aldrich, Almanya), fetal calf timüs DNA (Amresco, İsrail), beta-merkaptotanol (Merck 8.057.400.250), Rneasy Mini Kit (Qiagen Katalog No: 74104), Primerler (Metis, Ankara, Türkiye), cDNA Sentez Kitindeki (Roche 11 483 188 001 (30rxn)), First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche 1596 594 (10x250unit)), Master-Mix ve Taq DNA Polymerase (Roche 1596 594 (10x250unit)), PCR Master Kit' teki PCR Master (Roche 11 636 103 001), 96, 48, 24 gözlü hücre kültür kabı (BD, ABD), hücre kültürü flaskları (BD, ABD), 0,45 µm filtreler (Sartorius), santrifüj tüpleri (Nunc, Almanya), WST-1 (Roche, Almanya), mikropipetler (Scaltec, Almanya), pipetler, çeşitli cam malzeme ve çeşitli plastik malzeme analitik düzeyde kullanılmıştır.

Etüv (Ultralab U – 120), santrifüj (Ultralab), santrifuj, liyofilizatör, ultra santrifüj, terazi (Scaltec), manyetik karıştırıcı (şimşek Labor teknik), vorteks, Elisa pleyt okuyucu (ASYS Hitech UVM 340 Plate Reader), Laminar akış kabin (klas II Laminar Flow Cabinet, Labor ildam, Türkiye), UV sterilatör (İngiltere), karbondioksitli etüv (Nüve, Türkiye), pH metre, ışık mikroskobu (Olympus CK2, Japonya), invert mikroskop (Leica, İsveç), dijital kamera (Olympus C-4000, Japonya),

3.1.1. Kriyojellerin Hazırlanışı Ve Karakterizasyonu

Çözücünün kristallenme hızı ve kriyojelleşme hızının kontrol edilmesi uygun özelliklere sahip kriyojellerin hazırlanmasına olanak sağlar. Kriyojel sistemde, büyüyen buz kristalleri porojen olarak ve erimesinden sonra birbirine bağlı gözenekler için kalıp olarak davrandıklarından dolayı tipik olarak kriyojeller, -10 ile -20 °C gibi düşük sıcaklıklarda sulu ortamda üretilir. Reaksiyon karışımı soğutulduğunda donmuş monolitik blok iki ana parçadan oluşur. Kriyojelleşme donmamış sıvı mikrofaz içinde gerçekleşir. Reaktif içermeyen çözücünün kristalleri donma sırasında büyür, donmuş çerçevenin sürekli bir sistemi oluşana kadar diğer kristallerle birleşir. Kimyasal reaksiyonlar bittikten sonra sistem eritilerek sıvı çözücü ile dondurulmuş sürekli makro gözenekler içeren bir matriksten oluşur.

Yarı donmuş reaksiyon ortamında çözünmüş reaktifler kriyojelleşmenin gerçekleştiği donmamış sıvı mikrofaz içerisinde yoğunlaşır. Bu durumda polimer zincirlerin gözeneklerden gözenek duvarlarına taşınarak kriyojeller oluşturulur. Klasik bir jel içindeki polimer derişimi ile karşılaştırıldığında gözenek duvarları daha yüksek polimer yoğunluğuna sahip olur. Gözenek duvarları içerisindeki artan polimer yoğunluğu kriyojelin mekanik sertliğinin yeterli olmasını sağlar [24,29,31].

Kriyojelin gözenek yapısı 100 µm' ye kadar büyüklüğü olan geniş, birbirine bağlı makro gözenekli yapılardan meydana gelirken klasik jel homojen ve mikro gözenekli yapılardan oluşur. Değişik jel öncüllerinden hazırlanan kriyojellerin şişme dereceleri aynı koşullarda fakat yüksek sıcaklıklarda hazırlanan jellerin şişme derecesinden en az 3-6 kez düşüktür [26].

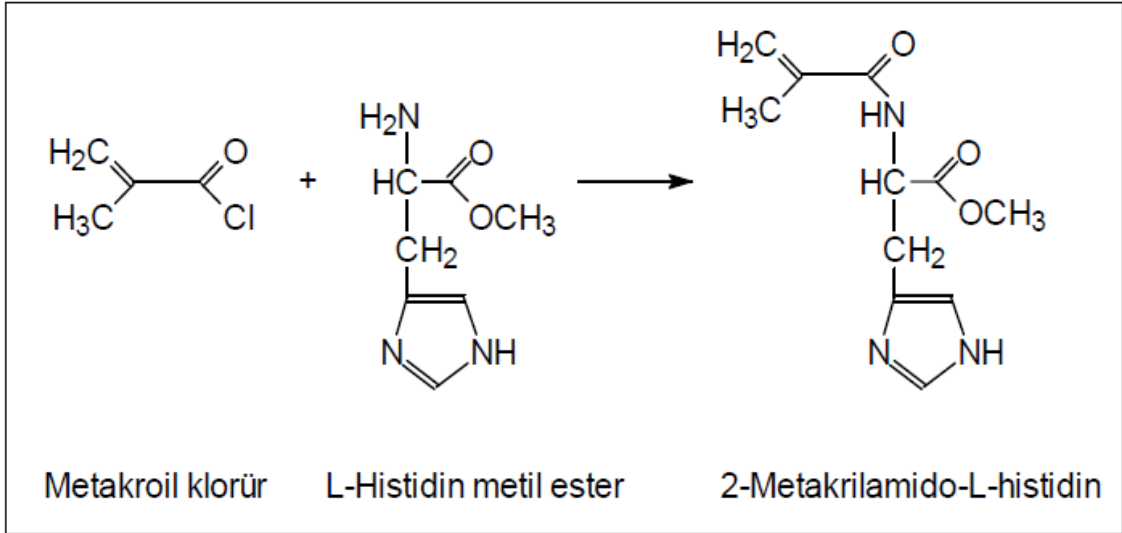
Negatif sıcaklıklarda jelleşmeyle hazırlanan değişik kriyojeller bulunmaktadır. Hazırlanan kriyojellerin çoğu esnek olup, scaffold yapıdadır ve negatif sıcaklıklarda sulu ortamda serbest radikal polimerleşme reaksiyonuyla uygun bir şekilde kontrol altında tutularak kriyojeller istenen formlarda hazırlanabilirler [25,27].

Büyük ve sıkıca birbirine bağlı gözeneklerin varlığından ötürü kriyojellerin çoğu gözenekli yapıya zarar vermeden kurutulabilir ve sonra hızla tekrar şişirebilirler. Kriyojellerin kurutularak saklanabilmesi en önemli özelliklerindedir [26].

Kriyojeller oldukça elastik yapıdadır. Esnek ve süngersi yapılarından dolayı kriyojeller büyük bozulmalara uğrasa da mekanik olarak zarar görmezler. %80' e kadar kolayca sıkıştırılabilirler. Geleneksel hidrojel %30' dan az sıkıştırıldıklarında kolayca tahrip olurlar. Sıkıştırılma kalktığında kriyojeller hızla eski şekline dönerler [25,26].

3.1.1.1. N-Metakroil-(L)-Histidin Metil Ester (MAH) Monomerinin Sentezlenmesi

N-metakroil-(L)-histidin metil ester (MAH) monomerinin sentezi için uygulanan yöntem kısaca şöyledir: 5.0 g L-histidin metil ester ve 0.2 g hidrokinon, 100 mL CH₂Cl₂ çözeltisi içerisinde çözülmüştür. Çözelti 0°C'a soğutulmuştur. 12.7 g trietilamin bu çözeltiliye eklenmiştir. Çözelti üzerine yavaşça 5.0 mL metakroil klorür eklenmiştir. Reaksiyon karışımı azot atmosferi altında manyetik karıştırıcı ile 2 saat oda sıcaklığında karıştırılmıştır. Bu sürenin sonunda, reaksiyona girmeyen metakroil klorür, %10'luk NaOH çözeltisi ile ekstrakte edilmiştir. Sulu faz döner buharlaştırıcıda uzaklaştırılmış ve kalan kısım (MAH) etanolde çözülmüştür [81].



Şekil 3.1. MAH monomerinin sentezi

3.1.1.2. Poli(HEMA-MAH) Kriyojel Kolonun Hazırlanması

Poli(HEMA-MAH) bazlı kriyojel kolon hazırlanırken HEMA ve çapraz bağlayıcı olarak metilen bisakrilamid kullanılmıştır. Öncelikli olarak 0.283 g MBAA 10 mL deiyonize su içinde ve 1.3 mL HEMA 5 mL deiyonize su içinde ayrı beherlerde çözülmüştür. Metal kompleks oluşturucu olarak kullanılan ligand histidin, daha önceden sentezlenmiş olan N-metakroil-(L)-histidin metil ester (MAH) monomeridir. 100 mg MAH, iyice çözülmüş olan MBAA'lı karışıma ilave edilerek manyetik karıştırıcıda homojen bir karışım haline getirilmiştir. Bu homojen karışıma daha sonra HEMA çözeltisi ilave edilerek bir süre daha manyetik karıştırıcıda karışması beklenmiştir. Polimerizasyon başlatıcı olarak amonyum persülfat (APS; 0.02 g) katalizör olarak ise N,N,N',N' tetrametil-etilendiamin (TEMED; 25µL) kullanılmıştır. Buz kalıbı içerisine yerleştirilen şırıngalara eşit oranlarda karışım aktarıldıktan sonra ağızları sıkıca kapatılarak -16°C'de 24 saat süre ile polimerizasyon gerçekleştirilmiştir. 24 saat sonunda şırıngalar buzdolabından çıkarılmış ve tüm polimerizasyon artıkları uzaklaştırılana kadar deiyonize su ile yıkanmıştır. Polimerler, kullanılmadıkları zaman, deiyonize su içerisinde ağız sıkıca kapalı olarak 4°C 'de saklanmıştır.

3.2. Karakterizasyon Çalışmaları

3.2.1. Denge Şişme Oranının Belirlenmesi

Poli(HEMA-MAH) kriyojelinin denge şişme oranının belirlenmesinde aşağıda verilen yöntem izlenmiştir. Kuru polimer ± 0.0001 duyarlıkla çalışan bir terazide tartılmış ve 50 ml saf su içeren kaba konulmuştur. Kap 24 saat süre ile sabit sıcaklıktaki su banyosunda tutulmuştur ($25 \pm 0.5^\circ\text{C}$). Polimer sudan alınmış, süzgeç kağıdı yardımı ile yüzeyindeki su uzaklaştırılarak tartılmıştır. Kuru ve ıslak ağırlıklar kaydedilmiş ve aşağıdaki eşitlik yardımı ile poli(HEMA-MAH) kriyojel kolonun su içeriği belirlenmiştir.

$$\text{Şişme oranı (\%)} = [(W_s - W_0) / W_0] \times 100$$

W_0 ve W_s sırası ile polimerin şişmeden önceki ve sonraki ağırlıklarını ifade etmektedir.

3.2.2. Elementel Analiz

Sentezlenen poli(HEMA-MAH) kriyojeli, yapıdaki MAH miktarının belirlenmesi için, elementel analize tabi tutulmuştur. 1 mg kriyojel elementel analiz cihazının (Leco, CHNS-932, ABD) alüminyum hücre sine yerleştirilerek ± 0.0001 g duyarlılıkla tartılmıştır. Polimerik örnek cihaza konularak yakma işlemi sonucunda örneğin % karbon (C), hidrojen (H), oksijen (O), azot (N) analizi yapılmıştır.

3.2.3. FTIR ile Yapı Analizi

MAH monomerinin FTIR spektrumu, FTIR spektrofotometresi (FTIR 8000 Series, Shimadzu, Japonya) kullanılarak elde edilmiştir. MAH monomeri ve

kuru mikroküreler (0,1 g), KBr (0,1 g, IR Grade, Merck, Almanya) ile homojen olarak karıştırılmış, pelet haline getirilmiş ve FTIR spektrumu çekilmiştir.

3.2.4. NMR Çalışmaları

MAH monomerinin proton NMR spektrumu, $CDCl_3$ içerisinde JEOL GX-400 300 MHz (Japonya) NMR cihazı kullanılarak alınmıştır. Kimyasal kaymalar (δ) ppm cinsinden $CHCl_3$ referans alınarak rapor edilmiştir.

3.3. Yöntem

3.3.1. Hücre Kültürü

3.3.1.1. Primer Kondrosit Kültürü

Uygun yaştaki buzağuların hareketli eklemleri bütün olarak alınıp laboratuarda aseptik koşullarda eklemler açılarak eklem kıkırdağının mineralize olmayan kısmından oldukça fazla miktarda kıkırdak biyopsisi alındı. Kıkırdak doku parçaları serum içermeyen sıvı besi ortamında %10' luk kollagenaz II (Sigma-Aldrich, Almanya) enzimi, %10 tripsin-EDTA' lı (Amresco, İsrail) besi yerinde doku parçaları 1 gece inkübe edildikten sonra santrifüj edilerek dokudan ayrılmış hücreler izole edildi. İzole edilen hücreler steril serum fizyolojik ile 2–3 defa yıkandı. Daha sonra hücreler % 10 FCS, % 1 antibiyotik içeren DMEM (Amresco, İsrail) kültür ortamında flasklarda 37°C'de karbondioksit etüvünde inkübe edildi. Hücreler yeterli sayıya ulaşıncaya kadar 2 gün ara ile besi ortamının vasatı değiştirildi. Hücrelerin yaklaşık 1 ay sonunda flaskın neredeyse tamamına yakın bir kısmını kapladığı görüldü. Bu süre sonucunda flask içerisinde serum ihtiva eden vasat alındıktan sonra serum fizyolojik ile 2 kez yıkandı. Daha sonra tripsin-EDTA ile kısa bir süre hücreleri etkileştirerek ortamdaki kalkmaları sağlandı. Hücrelere tripsinin

zararını önlemek için hücreler kalktıktan hemen sonra ortama serum içeren besi yeri ilave edildi. Hücreleri içeren karışım 15 ml' lik tüplere konularak 3000 devirde 4 dakika santrifüj edildi. Hücreler besi yerinden alındıktan sonra eşit miktarda bölünerek farklı 25 lik flasklara ekimi yapılmıştır.

3.3.1.2. Üç Boyutlu Makrokürelere Tutunan Hücre Sayısının Tespiti İçin Kondrosit Kültürü

Çalışmanın bu kısmında; PHEMA kriyojeller üzerinde primer kondrosit hücrelerin kültürü yapılarak bu jellerin kıkırdak doku mühendisliği için uygunluğu araştırılmıştır. Kriyojel rulolar steril bistürü ile 5 mm kalınlıkta kesildi. Kesilen kriyojeller UV ışık altında lamnar flow kabin içersinde 30 dakika steril edildi. Hücrelerin kültür çalışmalarında steril 24 gözlü hücre kültür kapları kullanıldı. İçersinde 100 bin hücre/100 µl stoktan alınan hücreler öncelikle üzerine kriyojeller yavaşça bırakılarak 1 saat vasat ilave etmeden inkübe edildi. Bu işlemin amacı; hücrelerin bu süre içersinde kriyojellere tutunmasını sağlamaktır. Süre sonunda hücrelerle etkileşmiş makro kürelerin üzerine 1ml FCS ve antibiyotik içeren besi yeri ilave edildi. 24 kuyucuklu kültür kabı içersine yerleştirilmiş olan destek materyalinin üzerine belli sayıda vasat içersinde ilave edilen hücreler bir gün inkübe edildikten sonra destek maddesi başka bir (boş) göze yerleştirildi ve vasat ilave edilerek inkübe edilmeye devam edildi. Hücreler kriyojeller üzerinde 4, 8, 12 ve 16 saat süre ile inkübe edildi. Daha sonra üzerinde kondrosit kültürü yapılmış kriyojeller taramalı elektron mikroskobu (SEM), glikoz amino glikan sentezi (GAG), hücre proliferasyonunu göstermek için deoksiribo nükleik asit (DNA) ölçümü ve Kollagen tip II sentezi gibi moleküler analizler için kullanılmıştır. Burada belirtilen her bir test için ayrı ayrı ekim yapılmış olup her bir çalışma üç kez tekrar edilmiştir.

3.3.1.3. Kriyojellerde Kültüre Edilmiş Kondrositlerin Taramalı Elektron

Mikroskop (SEM) İncelemesi

Gille ve ark. (2005) tarafından kullanılan metot [82] temel alınarak farklı zamanlara ait kriyojellere ekilmiş kondrositler rutin taramalı elektron mikroskop hazırlık aşamalarından geçirilmiştir. Altın ile kaplanarak taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile kondrositlerin tutunup tutunmadıkları ve genel morfolojileri incelendi [83,84]. Taramalı Elektron Mikroskopta farklı büyütmelelerde gözeneklerin yüzeyi ve genel morfolojisi incelendi ve belirlenmiş büyütmede yüzeye tutunmuş hücreler görüntülendi. Veriler farklı zamanlara (4, 8, 12 ve 16. gün) ait 3 farklı örneğin 3 farklı kriyojel incelenerek elde edildi.

3.3.1.4. Glikozaminoglikan (GAG) Miktarının Belirlenmesi

Temel olarak Enobakhare ve ark. (1996)' in kullandığı metot [69] takip edildi. 16 mg dimetilen mavisi (DMB, Sigma-aldrich, Almanya) 5 ml etanol içerisinde çözüldü. 2gr sodyum format (Sigma-Aldrich, Almanya) ve 2 ml formik asit (Sigma-Aldrich, Almanya) ilave edildi ve distile su ile 1 litreye tamamlandı. Hazırlanan DMB çözeltisi kahverengi saklama şişesine konularak kullanılıncaya kadar saklandı. Üzerinde kondrosit kültürü yapılmış yaklaşık 1 gr. kriyojel 300 µg/ml papain (Amresco, İsrail), 2 mM EDTA (Amresco, İsrail), 2mM N-acetyl L-cysteine (Sigma-aldrich, Almanya) içeren çözelti içerisinde 65°C 'de 1 saat parçalandı. Daha sonra parçalanmış makro kürelerden oluşan solüsyondan 250 µl alınarak 5 ml 'lik polisitiren tüp içersine konuldu ve üzerine 2.5 ml DMB çözeltisi eklendi. Örnekler vortekste iyice karıştırılarak spektrofotometrede 535 nm' de okundu. Standart çözeltiden elde edilen formüle göre 10 gr. kriyojelde ne kadar GAG olduğu tespit edildi. Standart için ticari olarak satılan kondriotin sülfat (Sigma-Aldrich, Almanya) kullanıldı. 1 µg-60 µg arasında kondriotin sülfat çözeltisi hazırlandı ve bu çözeltiler üzerine 2.5 ml DMB solüsyonu ilave edildi. 535 nm' de yapılan ölçüm

sonucunda elde edilen grafiğe göre $Y = 0,061X$ formülü elde edildi. R^2 değeri 0,9773 olarak (güvenilir bir aralıkta) elde edildi.

3.3.1.5. DNA Miktarının Belirlenmesi

DNA miktarının belirlenmesi için yukarıda bahsedildiği gibi öncelikle papain ile parçalanmış aynı miktardaki kriyojelden elde edilen solüsyon kullanıldı. Temel olarak Hsu ve ark. (2004) kullandığı metot [85] takip edildi. DNA miktarının belirlenmesinde yine standart bir metot olan floresan boya ile DNA'sı işaretlendi ve floresan spektrofotometrede okutularak hesap edildi. Öncelikle floresan boya olarak Hoechst 33358 (Sigma-Aldrich, Almanya) floresan boyanın 1 mg/ml saf su içersinde çözeltisi hazırlandı. Daha sonra 0.01 M Tris, 0.2 M NaCl, 0.001 M EDTA içeren TNE tamponu hazırlandı. Hazırlanan tamponun pH'sı HCl ile 7.4 'e ayarlandı. 1 mg/ml' lik Hoechst 33358 floresan boya hazırlanan TNE tamponu ile 0.1 µg/ml' ye seyreltildi. Daha sonra papain ile parçalanmış kondrosit içeren makro küre solüsyonlarının her birinden 250 µl alınarak üzerine Hoechst boya çözeltisinden ilave edilerek toplam hacim 2.5 ml ye tamamlandı. Solüsyonlar vortekste iyice karıştırılarak bekletmeden Floresan spektrofotometrede (Jasco FP 700, Japonya), yayılma dalga boyu 458 nm. ve uyarılma dalga boyu 365 nm' de ölçüm yapıldı. DNA miktarının hesaplanması ticari olarak satılan fetal calf timüs DNA (Amresco, İsrail) 'sından elde edilen $Y = 2,8425X$ ($R^2 = 0,9922$) formülde yerine konularak hesaplanmıştır.

3.3.1.6. Polimeraz Zincirleme Reaksiyonu (PCR) ile Kondrosit Fenotipi Belirlenmesi

PCR çalışması öncelikle 2 boyutlu kültürdeki kondrositlere uygulandı. Daha sonrada kriyojellere ekilmiş kondrositlere uygulandı. İki boyutlu hücre kültüründeki kondrositlere uygulanmasının amacı ise; kriyojellere aktarılmadan önce kondrositlerin fenotipleri hakkında bilgi edinmektir. Temel

olarak her ikisi içinde aynı protokol uygulandı; fakat 2 boyutlu kültürden yapılan PCR çalışmalarında sonikatör ve homojenizatör uygulamalarına yer verilmedi.

Polimeraz zincirleme reaksiyonu (PCR) için hazırlık aşamasında kondrosit ekilmiş yaklaşık 1 gr. ağırlığındaki farklı zamanlara ait kriyojel örnekleri 300 µg/ml papain (Amresco, İsrail), 2 mM EDTA (Amresco, İsrail) 2 mM N-acetyl L-cysteine (Sigma-Aldrich, Almanya) içeren çözelti içerisinde 65°C 'de 1 saat parçalandı ve 15 dakika sonikatörde sonike edildikten sonra homojenizatör yardımıyla iyice parçalandı. Daha sonra 5000 devirde santrifüj edilerek süpernatant alınarak RNA izolasyonu için kullanıldı. Parçalanmış kondrositleri ihtiva eden süspansiyon tekrar 0.625 U/mL kollajenaz enzimi (Sigma-Aldrich, Almanya) ile muamele edildi ve santrifüj edildi. Bu işlemden sonra RNA izolasyonu ve cDNA sentezi gerçekleştirildi. Reverse transkriptaz enzimiyle RNA elde edildi ve RNA'dan Kollajen Tip I, II ve beta 2-mikroglobulin primerleri yardımıyla, cDNA sentezi gerçekleştirildi. Bu işlemler kalite kontrol bölümünde PCR çalışma kabini 1 ve 2' de gerçekleştirildi. Hazırlık aşamasında gerekli solüsyonlar hazırlandı. Kollajenaz NB4 Solüsyonu 0.625 U/mL RLT tampon, %70 etanol ve primer stok solüsyonu hazırlandı. Kollajenaz solüsyonları, -20°C' de 1.5 mL' lik kriyo tüplerde hazır olarak bekletilmekteydi. RTL tamponstok solüsyonu Rneasy Mini Kitinin (Qiagen 74104) içinde bulunmaktadır ve stok solüsyondan 1 mL RLT Buffer + 10 µL beta-merkaptoetanol (Merck 8.057.400.250) olarak hazırlandı. %70 etanol çözeltisi; 70 mL Etanol + 30 mL PCR Water olarak hazırlandı.

Çizelge 3.1 RNeasy Mini Kit (Qiagen Katalog No: 74104 (50 reaksiyonluk)) içinde bulunanlar:

Reaktif	Miktarı
RNeasy Mini spin kolonu	50
Toplama tüpleri (1.5 ml)	50
Toplama tüpleri (2 ml)	50
RLT tamponu	45 ml
RW1 tamponu	45 ml
RPE tamponu (derişik)	11 ml
RNeasy-susuz	10 ml

Primer stok solüsyonu için liyofilize primerler belirlenen miktarlarda PCR suyu ile 10 µL primer stok solüsyonu + 90 µL PCR suyu olarak hazırlandı.

Primerler (Metis, Ankara):

İleri Kollagen I-PCR 5'-cca tcc aaa cca ctg aaa-3

Geri Kollagen I-PCR 5'-tga cga gac caa gaa ctg-3

İleri Kollagen II-PCR 5'-tct ggc aaa gat ggt gct aat gg-3

Geri Kollagen II-PCR 5'-tct tct tgg gaa cgt ttg ctg g-3

İleri β2Microglobulin-PCR 5'-ctc gcg cta ctc tct ctt tct gg-3

Geri β2Mmicroglobulin-PCR 5'-gct tac atg tct cga tcc cac tta a-3

olarak kullanıldı.

RNA izolasyonu ve RNA miktar ölçümü için şu protokol takip edildi; RNA izolasyonu PCR çalışma kabini 1'de (Biosan UVC/T) yapıldı. RNeasy Mini Kit (Qiagen 74104 (50 rxn)) ile yapılan tüm analizler oda sıcaklığında gerçekleştirildi. Hücre peleti reaksiyon tüpünün kenarından alındı ve uygun miktarda RLT tampona konuldu. Pelet, hücre grubu kalmaması için pipetle birkaç kez homojenize edildi. Homojenize lizata 1 birim hacim (350 µL veya 600 µL) %70'lik etanol eklendi, pipetleme yöntemiyle iyice karıştırıldı. 2 mL toplama tüpüne RNeasy kolonu yerleştirildi. RNeasy kolonuna 700 µL örnek (çökeltilerle birlikte) eklendi. Tüp hızlıca kapatıldı ve ≥10.000 rpm'de 15

saniye santrifüj (Nüve NF800R) edildi. Üstteki akışkan kısım atıldı. Eğer örnek hacmi 700 µL' den fazlaysa, geri kalan örnek aynı RNeasy kolonuna koyuldu, santrifüj edildi ve akışkan kısım atıldı. 700 µL RW1-tampon RNeasy kolonuna eklendi. Kap hızlıca kapatıldı ve kolonu yıkamak için ≥ 10.000 rpm' de 15 saniye santrifüj edildi. Üstteki akışkan kısım ve toplama tüpü atıldı. RNeasy kolonu yeni bir 2 mL' lik toplama tüpüne alındı. 500 µL RPE-tampon RNeasy kolonuna eklendi. Tüp hızlıca kapatıldı ve yıkamak için ≥ 10.000 rpm'de 15 saniye santrifüj edildi. Üstteki akışkan kısım atıldı. Yeniden 500 µL RPE-tampon RNeasy kolonuna eklendi. Tüp hızlıca kapatıldı ve RNeasy Silica Jel Membranın kuruması için ≥ 10.000 rpm'de 2 dk santrifüj edildi. Etanol kalıntılarının bundan sonraki reaksiyonları etkilememesi için RNeasy Silica Jel Membran' ı tamamen kurutuldu. RNeasy kolonu, santrifügasyondan sonra toplama tüpünden dikkatlice ayrıldı. Akışkan kısım ile kolonun temas etmemesine dikkat edildi. RNA' nın ayrımı için RNeasy kolonu başka bir 1.5 mL' lik toplama tüpüne alındı. RNeasy Silica Jel Membran üzerine 30 – 50 µL RNase-susuz eklendi. Tüp hızlıca kapatıldı ve RNA'yı ayırmak için ≥ 10.000 rpm' de 1 dk santrifüj edildi.

RNA miktarının belirlenmesi için 7 µL eluent kullanıldı. Eluentteki RNA miktarının belirlenmesi, cDNA senteziyle eşzamanlı yürütüldü. 260 nm' de spektrofotometrik (Analytik Jena Spekol 1300) ölçüm yapıldı. RNA solüsyonu 1:20 oranında WFI ile seyreltildi. (7 µL RNA çözeltisi + 133 µL WFI). 122.5 µL' si mikro küvete alındı ve ölçüm yapıldı. 260 nm' de RNA miktarı [$\mu\text{g}/\text{mL}$]= OD değeri x 20 x 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ olarak belirlendi.

Spektrofotometre için referans değeri = OD (260 nm) / OD (280 nm)

DNA Sentezi PCR Çalışma Kabini 1' de gerçekleştirildi. DNA sentezi için sadece cDNA Sentez Kitindeki (Roche 11 483 188 001 (30rxn)) materyaller kullanıldı.

Çizelge 3.2. First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche 1596 594 (10x250unit)) içinde bulunanlar:

10 x Reaksiyon buffer
dNTPs
MgCl ₂ (25mM)
RNase-inhibitörü
Revers transkriptaz

2 µg RNA 16.4 µL PCR suyuna (son hacim) koyuldu. 4 µL Oligo-dT eklendi. Karışım 5 dk. 68°C' de Thermocycler' da (Eppendorf Mastercycler personel) inkübe edildi. (RNA Linearization) Daha sonra 10 dk. 4°C' de Thermocycler' da soğutuldu.

Çizelge 3.3. PCR Tüplerinde Master-Mix hazırlanışı:

<i>Bileşen</i>	<i>Miktar (µL)</i>
10 x Reaksiyon Buffer	4
dNTPs	4
MgCl ₂ (25mM)	8
RNase-inhibitörü	2
Revers transkriptaz	1.6

İhtiyaç olan miktardan 1 fazla hazırlandı. Her RNA-Oligo-dT karışımına 19.6 µL Master-Mix ve Taq DNA Polymerase (Roche 1596 594 (10 x 250unit)). Örneklerin çoğalmaları Thermocycler' da gerçekleştirildi.

- 25°C, 10 dk (Oligo-dT' nin yapışması)
- 42°C, 60 dk (Revers transkripsiyon)
- 99°C, 5 dk (Revers transkriptazın inaktive olması)
- 4°C, 5 dk

cDNA için yapılan PCR için yalnızca PCR Master Kit' teki PCR Master (Roche 11 636 103 001) reaktörler kullanıldı.

Çizelge 3. 4. cDNA için pipetleme planı

<i>Bileşen</i>	<i>Miktar (µL)</i>
PCR Master-Mix	25
PCR suyu	20
İleri primer (10 µM)	2
Geri primer (10 µM)	2

Kollajen tip I, kollojen tip II ve Beta-mikroglobulin için yukarıdaki solüsyon ayrı ayrı hazırlandı. 49 µL' şer 3 mastermixe de 1' er µL cDNA (PCR ürünü) pipetlendi. Bu işlem her test edilecek cDNA için hazırlandı. (Kollajen tip I, tip II ve beta2 mikroglobulin) Toplam 3 adet örnek yürütüldü.

PCR Thermocycler' da aşağıdaki basamaklarda gerçekleştirildi

94°C, 60 sn

54°C, 30 sn

72°C, 90 sn

Bu basamaklar 34 devir devam etti ve 4°C, 10 dk. soğuma evresi uygulandı. Örnekler Agaroz jele direkt olarak eklendi.

% 1.5' lik Agaroz jel (Prona 101674PR) hazırlandı. Jel solüsyonu kaynatıldı ve manyetik karıştırıcıda yaklaşık 60°C' ye soğutuldu. Bu esnada jel yürütme tankı hazırlandı. Taraklar yerleştirildi, jel döküldü ve jelleşme beklendi. Agaroz katılaştığında jel haznesi kaldırıldı ve 90° döndürülerek tekrar tanka yerleştirildi. Jeli tamamen örtene kadar Tris-Asetat-EDTA (TAE) tampon çözeltisi (Sigma T-6025) eklendi (~350 mL). Taraklar dikkatlice kaldırıldı. Jel kuyucukları örneklerle dolduruldu. Yürütme tamponuna Sybr® Green I (Sigma S9430-1mL) eklendi, (Seyreltme: 1:10.000, örneğin, 350 mL tampona 35 µL boya eklenir).

Örnekler

10 µL PCR ürünü + 2 µL Roti® yükleme DNA örnek tamponu

0.4 µL DNA-Ladder+2 µL Roti® yükleme DNA örnek tamponu + 9.6 µL PCR suyu

Jele Yükleme (PCR Ürünleri ve DNA-Ladderörnek tamponu)

PCR Çalışma Kabini 3'de gerçekleştirildi.

Kuyucuk: 10 µL DNA – Ladder (100 – 1000 bp)

Kuyucuk: 10 µL Kollajen-I-PCR-Ürünü

Kuyucuk: 10 µL Kollajen-II-PCR-Ürünü

Kuyucuk: 10 µL beta2-Microglobulin-PCR-Ürünü

Yürütme kabininin kapağı kapatıldı. Jel 100-110 V'da yaklaşık 90 dk yürütüldü. (Bitime 0.5 cm kala durduruldu.)

Jel dökümantasyonu, Jel Dökümantasyon Sistemi (Uvitec) ile gerçekleştirildi.

Cihaz Ayarları: *Işık kaynağı*: Transiluminatör (UV) ve *Filtre*: Kısa dalga boyu geçişi.

3.3.1.7. İkili Boyama Metodu ile Apoptozun ve Nekrozun Belirlenmesi

1 mg/ml konsantrasyonda kriyojel serum fizyolojik içersine aktarıldı. 30 gün boyunca çalkalamalı etüvde 37°C' de inkübe edildi. Bu sürenin sonunda homojenizatör ile tamamen parçalandıktan sonra 0.45 µm steril şırınga filitresinden geçirildi ve 0-200 µg/ml olacak şekilde 48 well platelere (10000 hücre/well) farklı konsantrasyonlarda ilave edildi. 48 saat karbondioksitli etüvde 37°C' de %5' lik karbondioksitli ortamda inkübe edildi. Süre sonunda well tabanından kalkmış hücreleri falkona toplanan hücreler santrifüj edilir. Süpernatanı atılır ve üzerlerine ikili boyama solüsyonu [RNase (2 µl/ml), hoechst 33342 (2µl/ml), propidium iodid (2 µl/ml)] 10⁶ hücreye 100 µl solüsyon konuldu ve 20 dk. etüvde inkübe edildi. Lam üzerine damlatıldıktan sonra lamelle kapatılır ve floresan mikroskopta DAPI filitresi kullanılarak apoptoza uğramış ve FITC (480-520 nm dalga boyunda) nekroza uğramış hücrelerin değerlendirilmesi yapılmıştır. Well tabanına yapışık hücreler

enzimle kaldırılmadan aynı işlemlere tabii tutularak incelenmiştir. Değerlendirme Floresan mikroskopta (Leica DMI70, Almanya) 10 farklı alan (yaklaşık 1000 hücre) sayılarak ortalaması alınmıştır ve Apoptotik indeks yüzde (%) olarak ifade edilmiştir. Değerlendirmede normal apoptotik olmayan hücreler çekirdekleri sönük mavi, çekirdekte DNA dağılmamış, hücrede veziküller oluşmamış olarak görülmektedir. Apoptoza girmiş hücre çekirdekleri ise normal hücre çekirdeklerine göre çok parlak, çekirdek homojenliği kaybolmuş, çekirdek kenarları düzgün değil ve DNA parçalanmış parlak mavi görünümündedir. Kültür kabında yüzeye tutunan hücreler kaldırılmadan yukarıda belirtilen floresan boyama solüsyonu 100 µl/well hücrelere uygulanarak da inceleme yapıldı. İkili boyama sonucunda apoptoza girmiş hücrelerin çekirdekleri Hoechst 33342 floresan boyası ile boyanmıştır. İkili boyamada kullanılan diğer boya propodium iodid (PI) ise nekroza uğramış hücreleri göstermek amacı ile kullanılmıştır. PI floresan boyası normal de canlı ve hücre zarlarında hasar olmayan hücrelere giremez ve bu hücreler PI ile boyanmazlar. Fakat hücre nekroza uğradığında veya hücre zarı hasar gördüğünde hücre içersine girer ve çekirdeği kırmızıya boyar. Floresan ışık (FITC veya kırmızı floresan ışık) altında bakıldığında nekroza uğrayan hücrelerin çekirdekleri kırmızı renkte görülür.

3.3.1.8. WST-1 Metodu ile Sitotoksisitenin Belirlenmesi

Kondrosit hücreleri 96 well platelere her bir kuyucuğa 5000 hücre düşecek şekilde ekim yapıldı. Farklı miktarlarda (0–200 µg/ml) kriyojel ekstraktı ilave edildi ve 72 saat inkübe edildi. Negatif kontrol olarak sadeceçözelti ortamı, pozitif kontrol olarak H₂O₂‘ liçözelti hücrelere uygulandı. 72 saat sonunda her kuyucuğa 15 µl WST–1 çözeltisi ilave edilir. 37°C’ de 4 saat inkübasyondan sonra hücre yaşayabilirliğinin tespiti için 96 kuyucuklu platelerin absorbans yoğunluk değerleri ELİSA platka okuyucuda 420–480 nm’ de okunur. Yaşayan hücreler sarı renk oluştururken, ölü hücrelerde renk oluşumu gözlenmez. Toksik etki aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Inhibisyon} = [1 - (\text{Test} - \text{MI}) / (\text{MO} - \text{MI})] \times 10$$

3.4. Hidrodinamik Özellikler

Bir sistem içerisinde sıvıyı yürütebilmek için basıncın minimum düzeyde olması gerekir. Sabit bir ortamdan düşük akış direncini devam ettirmek için en az 1.5 – 2 μm boyutlarında gözeneklerde 3n akış olması gerekir. 0.3 μm ' den daha küçük yarıçaplı ortalama gözenekli olan kromatografik ortam olarak kullanılan maddeler için düşük bir akış hızını durdurmak için çok yüksek bir basınç uygulanmaktadır [87,88].

Monolitler, küçük gözenekler (belirli yüzey alanı ile etkileşimi sağlayan) ile gözeneklerdeki akış (sıvının akmasını sağlayan) arasında uygun bir denge olan sert yapılardır. Elastik ve süngersi kriyojel monolitler sert yapılara sahip olan diğer monolitik sistemlerle kıyaslandığında temel olarak farklı gözenekli bir yapıdadır. Kriyojel monolitik kolonlar büyük ve birbirine sıkıca bağlı makro gözenekler içerdiği için sıvı akış dirençleri düşüktür. Kriyojellerin gözenek yapısı geri basıncını etkiler. Kriyojellerin gözenek büyüklüğünün yanı sıra gözeneklerin birbirine bağlanması, gözenek duvarlarının kalınlığı da kriyojel monolitlerin akış direncini kontrol eder [87,89-91].

3.5. Gözenek Özelliklerinin Kontrolü

Kriyojellerin gözenek yapısını kriyojellerin donma sıcaklığı (T_d), çözülmüş monomerlerin derişimi, başlangıç reaksiyon karışım içeriği (amonyum persülfat, TEMED) ve kullanılan çözücü kontrol edilir [25].

Donma sıcaklığı, T_d (düşük sıcaklıktaki termostat içinde kurulan sıcaklık şeklinde ifade edilir) ve kullanılan çözücü, gözenekli yapıyı etkiler. pHEMA kriyojellerini elde ederken donma sıcaklığını -10°C ile -30°C ' ye düşürmek kriyojel monolitlerin akış yolu özelliklerini ve jelleşme verimini azaltır. -20°C ' ye kadar olan düşük sıcaklıklarda kriyojel oluşumu sırasında kriyojellerin monomer dönüşüm oranı %70-90 civarındadır [25,27,92,93].

pHEMA kriyojeller iki türlü gözenek boyutu dağılımına sahiptir ve oluşması iki işlemin birleşmesi sonucunda meydana gelir. Yani donmamış sıvı mikrofaz içerisindeki makro gözeneklerin oluşması ve donmamış sıvı fazda sentezlenen polimerin faz ayrımının birleşmesiyle meydana gelir [25,94].

Serbest radikal polimerleşme reaksiyonlarında polimerleşme reaksiyonu monomerlerin polimer zincirlerini çapraz bağlamak için serbest radikaller oluşturmak üzere başlatıcı amonyum persülfat (APS) ve TEMED arasındaki reaksiyonla başlar. APS ile TEMED' in derişimleri polimerleşme hızı ve oluşan polimerin molekül ağırlığı üzerinde etkilidir. Serbest radikal polimerleşme yoluyla negatif sıcaklıklarda kriyojeller hazırlanırken iki durum ortaya çıkar:

- Jelleşme meydana gelmeden önce çözeltinin donması
- Önceden jelleşmiş karışımın donması

Reaksiyon karışımındaki başlatıcı sistemin miktarı polimerleşme hızını etkiler. Bu durumda reaksiyon karışımındaki başlatıcı sistemin miktarı değiştirilerek büyük ve birbirine oldukça bağlı gözenekli pHEMA kriyojeller ve birbirine az bağlanmış ve büyük gözenekli pHEMA kriyojeller elde edilebilir. İlk durumda kopolimerleşme işlemi reaksiyon ortamının donmasından sonra geriye kalan donmamış mikrofazın içinde gerçekleşir ve birbirine sıkıca bağlı makro gözenekli yapıyı oluşturur. Bu yapılar partikül içeren sıvıların, mikrobiyal hücrelerin veya hücre kültür reaktörlerin kromatografik monolitik sorbentleri olarak başarıyla kullanılmaktadır [25].

pHEMA kriyojellerin hazırlanması sırasında monomerlerin yoğunluğunu arttırmak pHEMA kriyojeller içerisindeki gözenek hacmini düşürür. pHEMA kriyojellerin hazırlanması sırasında başlangıç reaksiyonu içerisindeki monomer yoğunluğunu arttırmak gözenek duvarının kalınlığını artırır ve gözeneklerin birbirine bağlanmasını azaltır. Gözenek duvarının kalınlığı ve yoğunluk pHEMA kriyojellerin makroskopik mekanik özelliklerini belirlerken

gözenek boyutu ve gözenek duvarının yoğunluğu polimer gövdesine kimyasal olarak bağlanan ligandların ulaşabilmesini etkiler [24].

4. DENEYSEL SONUÇLAR

4.1. Şişme Özellikleri

Bu çalışmada hazırlanan poli(HEMA-MAH) kriyojelin denge şişme oranı Çizelge 4.1' de verilmiştir. Poli(HEMA-MAH) kriyojeller çapraz bağlı jellerdir. Sulu ortamda çözünmezler fakat çapraz bağlarından dolayı şişerler. Yapıda bulunan MAH, polimer zincire daha fazla hidrofilik fonksiyonel grup kazandırmaktadır, böylece su alımı da artmaktadır. Ayrıca MAH'ın HEMA ile tepkimesi sonucu oluşan molekülün molekül kütlesi etkili biçimde düşer. Böylece su molekülleri karmaşık polimer zincirinin içine daha kolay girer ve bu da sulu çözeltide su alımını artırır.

Çizelge 4.1. Poli(HEMA-MAH) kriyojelin şişme davranışı.

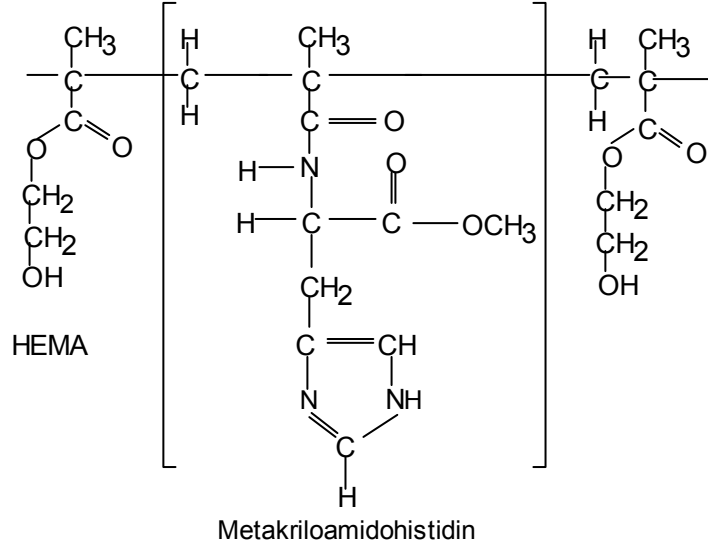
	Şişme Oranı%	Şişme Dercesi%	Makrogözeneklilik %
Poli(HEMA-MAH)	87	8.2	79

4.2. Elementel Analiz

Elementel analiz ile azot stokiyometrisinden faydalanılarak poli(HEMA-MAH) kriyojelin yapısına katılan MAH miktarı 78.2 $\mu\text{mol/g}$ polimer olarak bulunmuştur. Elementel analizle belirlenen azot miktarı polimer yapısına katılan MAH gruplarından kaynaklanmaktadır.

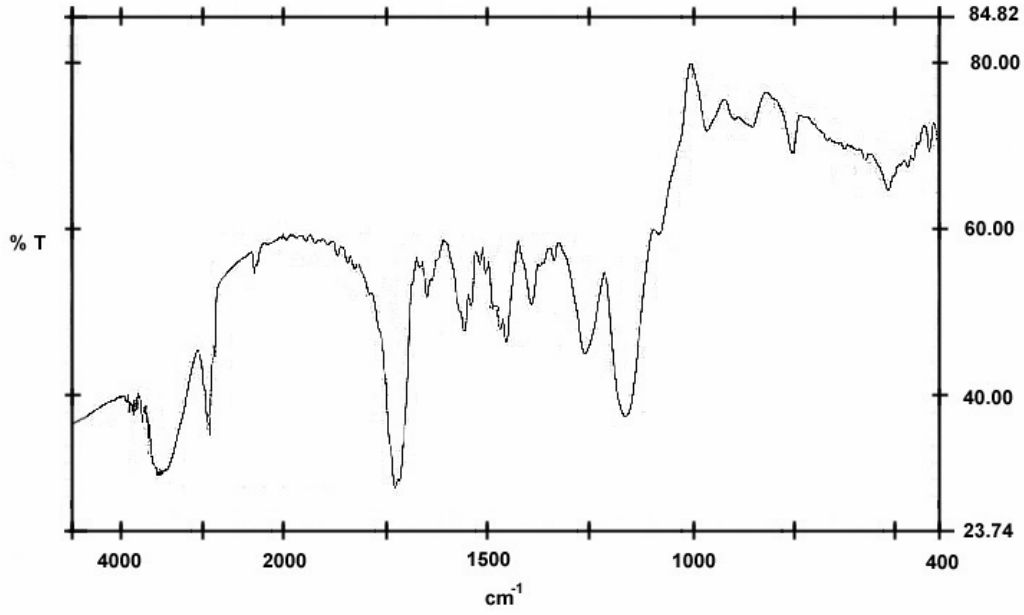
4.3. FTIR Çalışmaları

Sentezlenen poli(HEMA-MAH) kriyojelin kimyasal yapısı aşağıdaki Şekil 4.1'de verilmiştir.



Şekil 4.1. p(HEMA-MAH) kriyojelin kimyasal yapısı.

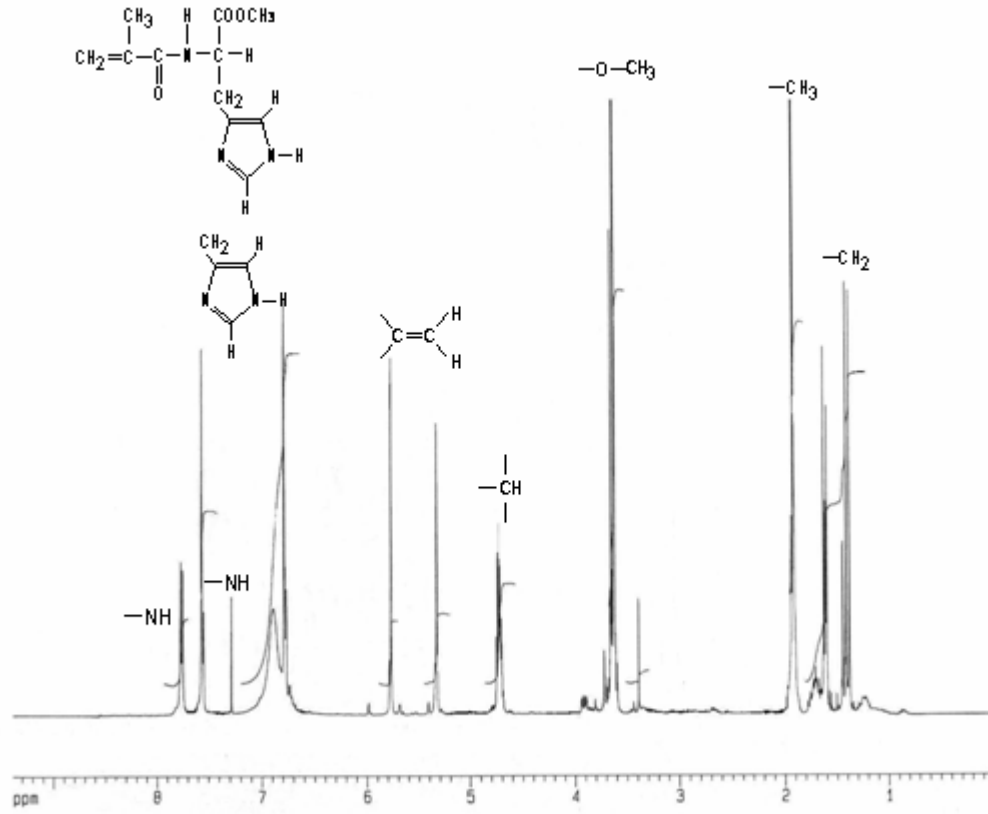
Şekil 4.2'de FTIR spektrumunda MAH monomerine ait karakteristik 1651 cm^{-1} karbonil ve 1558 cm^{-1} amid II gerilme titreşim bantları, 1724 cm^{-1} 'de ester bandı görülmektedir. p(HEMA-MAH) mikrokürelerin FTIR spektrumunda ise 3586 cm^{-1} civarında karakteristik O-H titreşim gerilmeleri, 1645 cm^{-1} 'de karbonil, 1516 cm^{-1} 'de amid II titreşim bantları görülmektedir (Şekil 4.5.).



Şekil 4.2. MAH monomerinin FTIR spektrumu.

4.4. ¹H-NMR Çalışması

MAH monomerinin kimyasal yapısının belirlenmesinde ¹H-NMR kullanılmıştır. ¹H-NMR spektrumunda MAH'da bulunan gruplara ait karakteristik pikler görülmektedir (Şekil 4.3.). Bu karakteristik pikler: ¹H-NMR (CDCl₃): 1.99 (t; 3H, J=7.08 Hz, CH₃), 1.42 (m; 2H, CH₂), 3.56 (t; 3H, -OCH₃), 4.82-4.87 (m; 1H, metin), 5.26 (s; 1H, vinil H), 5.58 (s; 1H, vinil), 6.86 (δ; 1H, J=7.4 Hz, NH), 7.82 (δ; 1H, J=8.4 Hz, NH), 6.86-7.52 (m; 5H, aromatik).

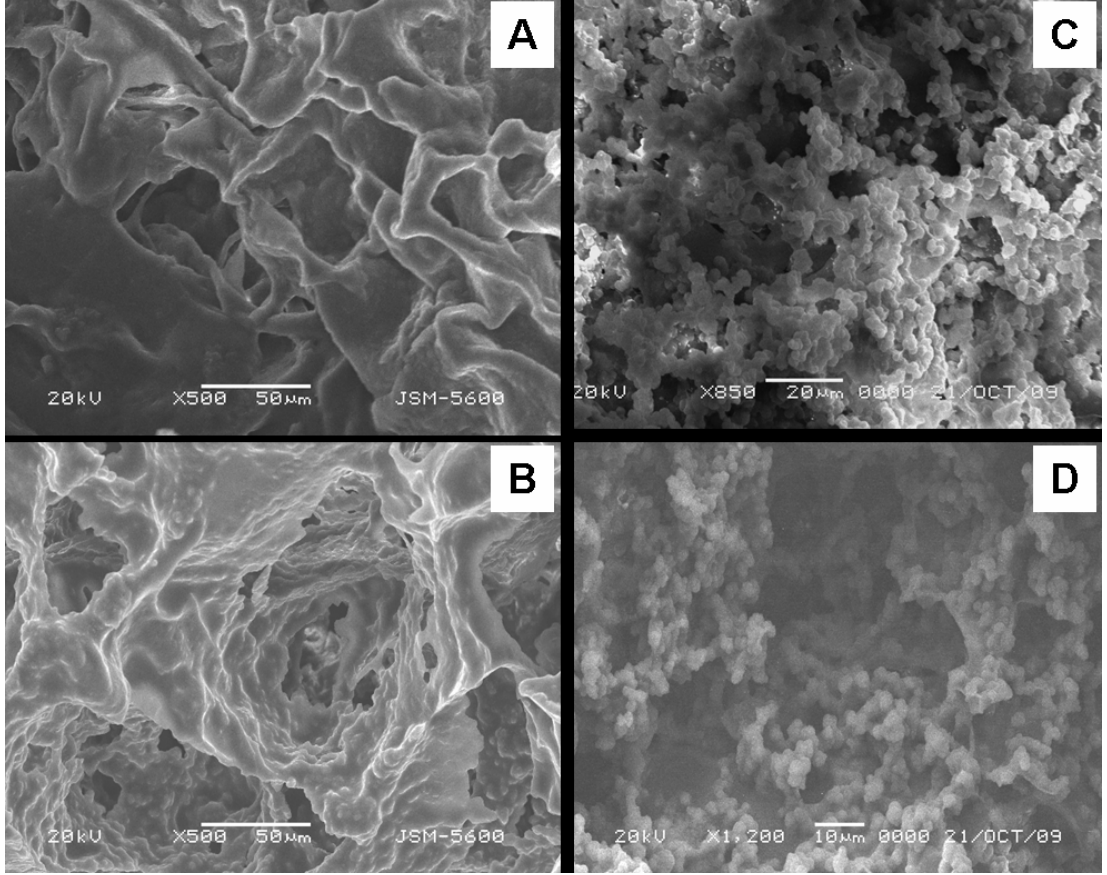


Şekil 4.3. MAH monomerinin $^1\text{H-NMR}$ spektrumu.

4.5. Kriyojellerde kültüre edilmiş kondrositlerin taramalı elektron mikroskop (SEM) ile incelenmesi

Kriyojeller üzerinde kondrosit hücreleri 4, 8, 12, 16 gün gibi farklı sürelerde kültüre edilmiştir. Her bir farklı zaman dilimi için deney üç kez tekrarlanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre; bir günlük inkübasyon süresinden sonra kriyojeller alınarak kurutulmuş ve altın ile kaplatılarak taramalı elektron mikroskop fotoğrafları (TEM) çekilmiştir. Bir günlük inkübasyonda jel üzerinde ve boşluklarında oldukça fazla miktarda hücre olduğu tespit edilmiştir (şekil 4.1.). İnkübasyon süresi uzatıldığında hücre sayısının özellikle yüzeyde azaldığı tespit edilmiştir. Farklı inkübasyon sürelerinden elde edilen TEM fotoğrafları şekil 4.1.' de verilmiştir. Şekilde görüldüğü gibi kondrosit hücrelerinin jel yüzeyine ve gözeneklerine tutunduğu gözlenmiştir. Fakat TEM örnek hazırlama esnasında yapılan kurutma işleminden dolayı

hücrelerin gerçek boyutlarından daha küçük görülmektedir. Ayrıca kondrosit hücrelerinin diğer doku hücrelerinde olduğu gibi materyal yüzeyine yayılmadığı gözlenmiştir. Bu durumun kondrosit hücrelerinin lakün içerisinde bulunmalarından kaynaklandığı tahmin edilmektedir.

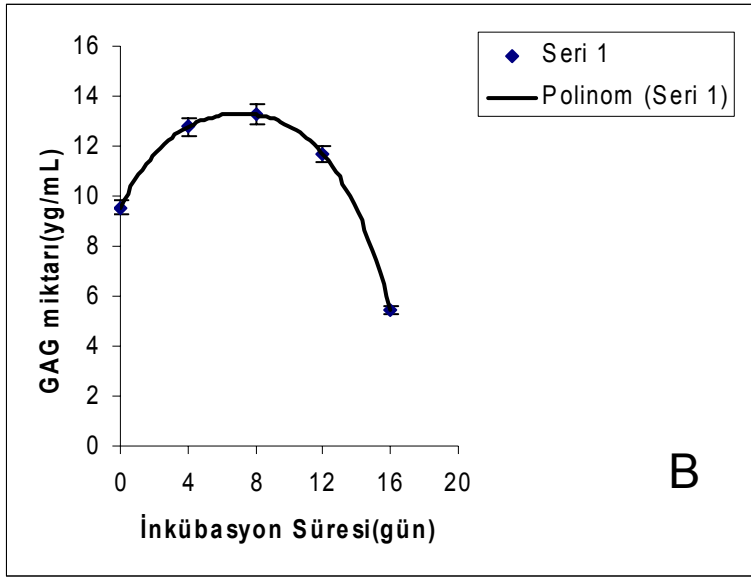
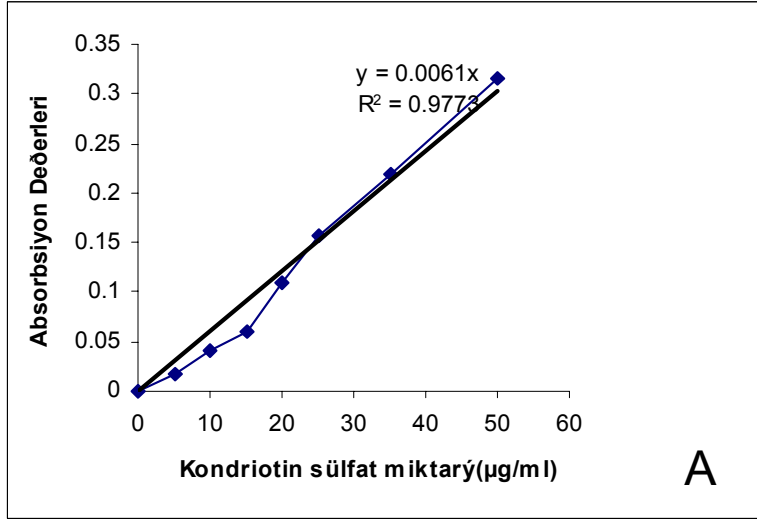


Şekil 4.4. Farklı zamanlarda kriyojel üzerinde kültüre edilen kondrosit hücrelerinin ve kriyojelin taramalı elektron mikroskop fotoğrafları
a. Kriyojelin üsten görünüşü. **b.** Kriyojelinden alınan enine kesitten elde edilen fotoğraflar. **c.** 4 günlük kültürden elde edilen fotoğraf. **d.** 8 günlük kültürden elde edilen fotoğraf

4.6. Glikoz aminoglikan (GAG) miktarının belirlenmesi sonucu

Kriyojeller üzerinde kondrosit hücreleri 4, 8, 12, 16 gün gibi farklı sürelerde kültüre edilmiştir. Her bir farklı zaman dilimi için deney üç kez tekrarlanmıştır. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.2.'de verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre;

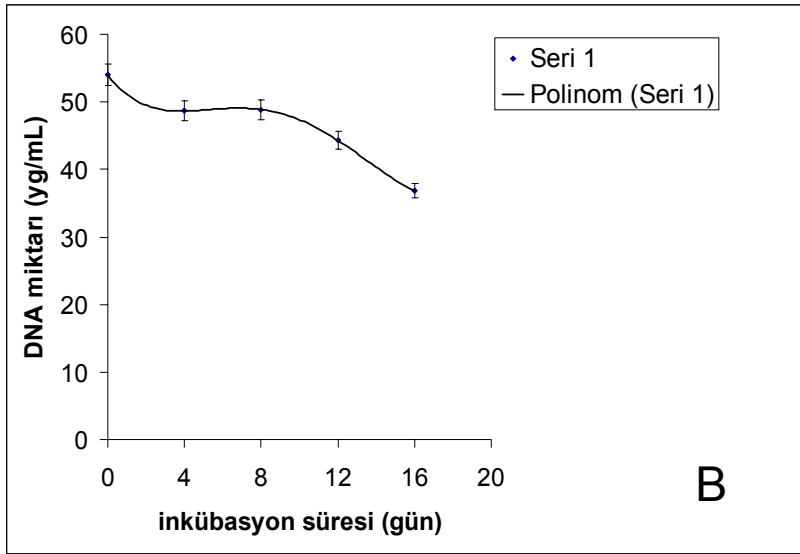
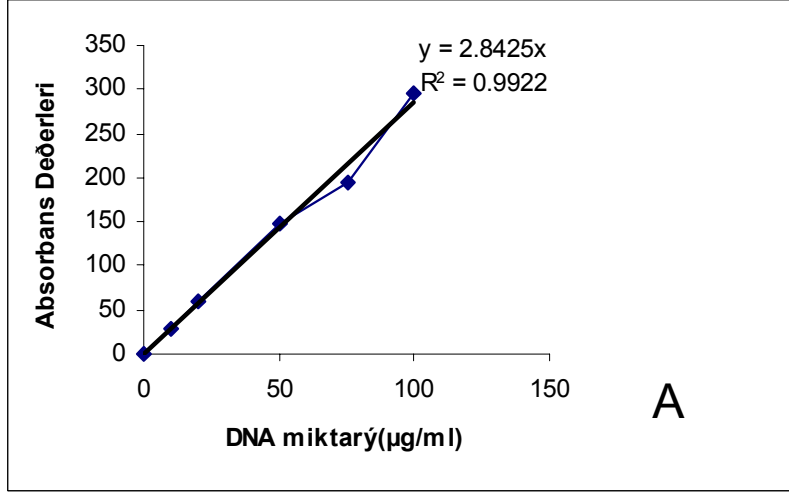
ekimden hemen sonra 2 gr kriyojelden yapılan ölçümde 9.543 µg/ml Glikoz amino glikan (GAG) miktarı tespit edilirken, 4. gün ve 8. günde GAG miktarının 2-3 µg/ml arttığı gözlenmiştir. Fakat 12. günde bu miktarı azaldığı, 16 günde ise daha da azalarak ilk ekim yapıldığı günkü değerlerin de altına düştüğü görülmüştür. Bu sonucun kondrosit hücrelerinin üç boyutlu kriyojele yeterince tutunamadığından kaynaklandığı tahmin edilmektedir. Ayrıca kriyojellerin içine konulduğu wellerin tabanında kondrosit hücrelerinin bulunması bazı hücrelerin tutunamadığı ve kriyojelden düştüğü gözlemlenmiştir. Fakat 16. gün sonu itibari ile glikoz amino glikanların ortamda bulunması hücrelerin canlılığının devam ettiğini ve az da olsa metabolik aktivitelerinin varlığını göstermektedir.



Şekil 4.5.a. Ticari olarak satılan kondriotin sülfattan hazırlanan standart grafiği. **b.** Farklı zaman dilimlerinde kriyojel üzerinde kültüre edilen kondrosit hücrelerinden elde edilen Glikoz amino glikan (GAG) miktarlarını gösteren grafik.

4.7. DNA miktarının belirlenmesi sonucu

Kriyojeller üzerine tutunan kondrosit hücreleri 4, 8, 12, 16 gün gibi farklı sürelerde kültüre edilmiştir. Her bir farklı zaman dilimi için deney üç kez tekrarlanmıştır. Elde edilen sonuçlar şekil 4.3.' de verilmiştir. Birinci günden itibaren yapılan ölçümlerde zamanla ortamdaki DNA miktarının giderek azaldığı tespit edilmiştir. Elektron mikroskop çalışmalarından elde edilen görüntülere göre kriyojel üzerinde hücreler bulunmasına rağmen hatta çok sayıda hücre bulunmasına rağmen, DNA miktarının zamana göre azalması hücrelerin bir kısmının kriyojel üzerinden sıyrılarak koptuğunu veya DNA' nın parçalanarak hidrolize olduğunu göstermektedir. Ayrıca DNA' nın kriyojela bağlanarak floresan boya ile reaksiyon vermemiş olabileceği düşünülmektedir. Ölçüm esnasında parçalama işleminden sonra santrifüjleme yapılarak süpernatantdan alınan sıvı kısım floresan spektrofotometrede ölçümde kullanılmıştır. Bu nedenle parçalanmış hücrelerin DNA' sının önemli bir kısmının santrifüjleme esnasında çökelen kriyojel ekstraktına bağlı olarak kaldığı tahmin edilmektedir. Çökelen kısmın floresan spektrofotometrede ölçümü yanlış sonuçlar ve hata verdiği için değerlendirilmediği kullanılmamıştır. İlave olarak elektron mikroskop çalışmalarında zamana göre hücre sayısında artış olduğu tespit edilememiştir. Aksine zamana karşı hücre sayısında azalmaların olduğu tespit edilmiştir.

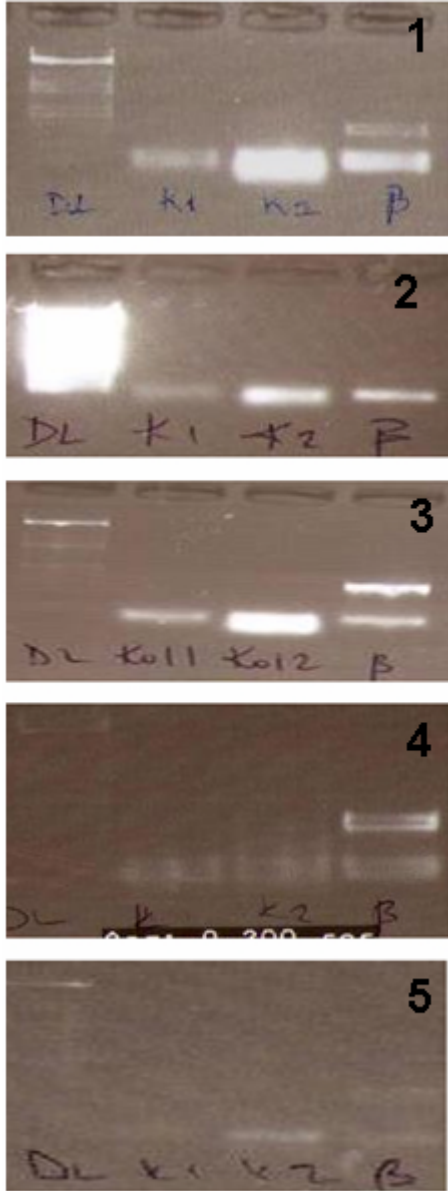


Şekil 4.6.a. Ticari olarak satılan balık sperm DNA' sından elde edilen Standart grafik. **b.** Farklı sürelerde kriyojel üzerinde kültüre edilmiş kondrosit hücrelerinden elde edilen DNA miktarındaki değişimi gösteren grafik.

4.8. Polimer zincir reaksiyonu (PZR) kondrosit fenotipinin belirlenmesinden elde edilen sonuçlar

Yapılan çalışmada önemli karakterizasyonlardan biri de kondrosit fenotipi için karakteristik olan kollagen tip II sentezinin belirlenmesidir. Bu sayede kondrositlerin fenotipik özelliklerin üç boyutlu kriyojel matrisi üzerinde

muhafaza edip etmediği anlaşılmaktadır. Farklı sürelerde kriyojel üzerinde kültüre edilen kondrosit hücreleri alınarak öncelikle bunlardan m-RNA izole edilmiştir. Bu m-RNA' lardan kollagen tip II, kollagen tip I ve β mikroglobulin (house keeping gen) c-DNA sentezi gerçekleştirilerek fenotip karakterizasyonu yapılmıştır. Son olarak c-DNA' lar elektroforeze tabii tutularak jeller analiz edilmiştir. Çalışmadan elde edilen c-DNA jel fotoğrafları Şekil 4.4.' te verilmiştir. Primer kondrositlerin ölü buzağı eklemlerinden alınıp kültüre edildikten 7 gün sonraki karakterizasyonda Kollagen tip II sentezinin yüksek oranda kollagen tip I' in ise çok düşük oranda olduğu gözlenmiştir. İki boyutlu kültürde uzun süre hücreler kültüre edildiğinde kondrosit hücrelerinin fenotipinde değişikliğe uğradığı kollagen tip I sentezindeki artış dikkate alınarak belirlenmiştir. Jel fotoğraf görüntülerine bakıldığında; 8. güne kadar fenotipik özelliklerini koruduğu, fakat kollagen tip II 'in yanında az da olsa kollagen tip I sentezinin de gerçekleştiği görülmüştür (Şekil 4.4. 1,2 ve 3). İnkübasyon süresi artığında diğer verilerde olduğu gibi kollagen tip II sentezinde azalma görüldüğü tespit edilmiştir. Özellikle 12 ve 16 gün' e ait örneklerde kollagen tip iki sentezinin minimum düzeyde olduğu görülmektedir (Şekil 4.4. 4, 5). Elde edilen sonuçlara göre kriyojellilerin gözenek çapının çok büyük olmasına bağlı olarak hücrelerin üç boyutlu matriks içerisine istenildiği gibi yerleşememesi sonucunda zamana bağlı olarak fenotipik özelliklerini kaybettikleri tahmin edilmektedir. Bu sonuç diğer karakterizasyon metotlarından elde edilen sonuçlarla örtüşmekte olup, esas önemli olan noktanın ise özellikle 12 ve 16. gün inkübasyonlarda canlı hücre sayısındaki azalmaya bağlı olarak fenotipik karakterlerinde değiştiği tahmin edilmektedir.

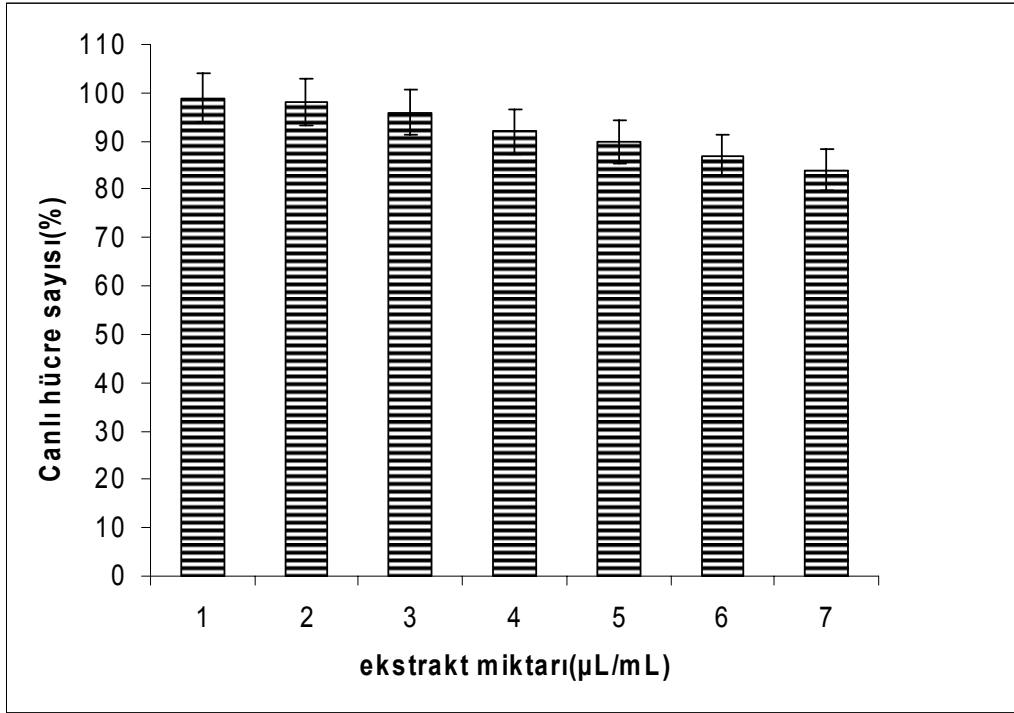


Şekil 4.7. PCR sonucu elde edilen c-DNA jel fotoğrafları. 1. birinci güne ait fotoğraf. 2. dördüncü güne ait fotoğraf, 3. sekizinci güne ait fotoğraf, 4. onikinci güne ait fotoğraf, 5. onaltıncı güne ait fotoğraf. DL; DNA marker, K1; kollagen tip I, K2; Kollagen tip II ve β ; Betamiyoglobin c-DNA'sını ifade etmektedir.

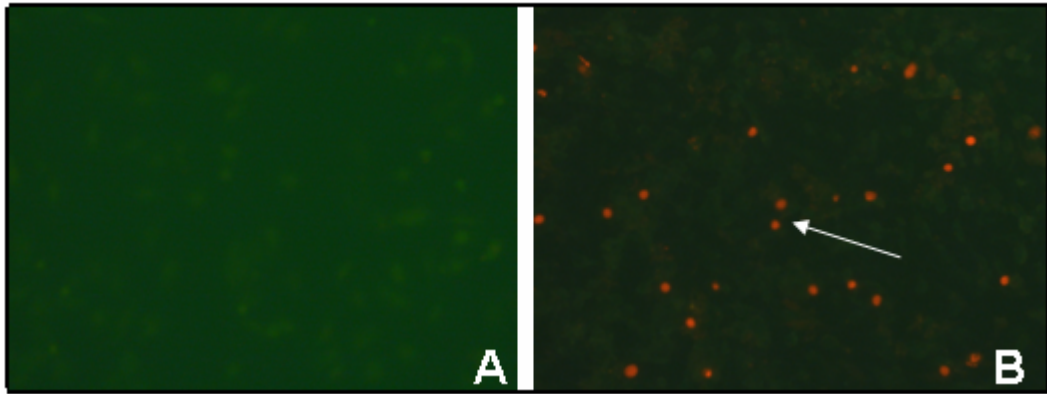
4.9. Kriyojel ekstraktının toksisitesinin ve nekrotik etkisinin belirlenmesi sonucu

Belli süre inkübatörde serum fizyolojik içerisinde bekletilen kriyojel daha sonra parçalanmış, homojenize edilmiştir. UV ile 30 dk. sterilize edildikten sonra 1 mg/ml kriyojel ekstraktından 5-120 µL wellere ilave edilmiş ve 72 saat inkübe edilmiştir. WST toksisite testi ile kriyojel ekstraktını toksisite değerleri tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.5.' de verilmiştir. Sonuçlara göre düşük konsantrasyonlarda toksisitenin kontrol grubu ile karşılaştırıldığında bir fark olmadığı ve toksisitenin çok düşük olduğu gözlenmiştir. 80-120 µL ekstrakt wellere ilave edildiğinde ise toksisitenin biraz arttığı ve en yüksek oranda %14 ± 2 kondrosit hücrelerine toksik olduğu tespit edilmiştir.

Nekrotik etkinin değerlendirilmesinde de toksisite testinden elde edilen sonuçlara yakın sonuçlar elde edilmiştir. Nekrotik indeks çizelge 4.1.' de, floresan mikroskop fotoğrafları ise Şekil 4.6.'da verilmiştir. Çizelgeye bakıldığında düşük konsantrasyonlarda nekrotik etki kontrol grubu ile hemen hemen aynı elde edilmiştir. Sadece 80-120 µL konsantrasyonda nekrotik etkide biraz artma elde edilmiştir. En yüksek nekrotik etki %15 ± 1 ile 120 µL konsantrasyonda elde edilmiştir.



Şekil 4.8. WST metodu ile elde edilmiş toksisite sonuçları. Grafikte konsantrasyona karşı 72 saat' lik inkübasyonda % canlılık oranları verilmiştir.



Şekil 4.9. İkili boyama metodundan elde edilen Floresan mikroskop fotoğrafları. **a.** Kondrosit hücrelerinin kontrol grubu. **b.** 120 µL konsantrasyonda kriyojel ekstraktı uygulanmış Nekrotik ve nekrotik olmayan kondrosit hücrelerin fotoğrafı. Fotoğraflar 200X büyütmede Leica DMI 6000 inverted mikroskopta çekilmiştir. Fotoğraflar FITC filtrede çekilmiştir.

Çizelge 4.2. İkili boya ile elde edilen nekrotik indeks (%) oranları.
Sonuçlar standart hata (SD) değerleri ile birlikte verilmiştir

ekstrakt ($\mu\text{L}/\text{mL}$)	miktarı nekrotik indeks
0	1 ± 1
5	1 ± 1
10	3 ± 1
20	5 ± 1
40	7 ± 1
80	11 ± 2
120	15 ± 2

5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

▪ Doku mühendisliği çalışmalarında kullanılan doku iskeleleri birbiriyle bağlantılı, hücre büyümesine ortam hazırlayan ve gözenekli yapıya sahip olmalılar [95]. Geniş gözenekli yapılar hücre ve doku nüfuzu için yararlı, mikro veya nano gözenekler ise difüzyona katkı sağlar, biyoçözünürlüğün yüksek hızda gerçekleşmesi için ortam oluşturur [96]. Bizde yaptığımız çalışmada makro gözeneklere sahip, birbiriyle bağlantılı kriyojeller üreterek çalışma ortamımızı oluşturduk.

Sunulan çalışmada başlatıcı olarak APS ve TEMED kullanılarak HEMA ve MAH polimerize edildi. Serbest radikal polimerizasyonunun başlamasıyla PHEMA kriyojel üretildi. Yüksek biyolojik uyuşabilirliğe sahip olduğundan biyolojik uygulamalarda en sık kullanılan polimerlerdendir. Bu polimerlerin mekanik olarak dayanıklılığı ve kanla uyuşabilirlikleri oldukça yüksektir [15].

Uygun yaştaki buzağının hareketli eklemleri total olarak alınarak laboratuvar ortamında kıkırdak biyopsisi alındı. Çeşitli işlemler uygulanarak hücreler dokudan izole edildi ve hücre kültüründe çoğaltıldı.

Daha önceki çalışmalarda kriyojellerin kondrosit hücreleri için uygunluğu araştırılmamıştır. Biz de yaptığımız çalışmada PHEMA kriyojeller üzerinde primer kondrosit hücreleri kültüre alınarak jellerin kıkırdak doku mühendisliği için uygunluğunu araştırdık. Kondrosit kültürü yapılan kriyojeller SEM, GAG, hücre proliferasyonunu göstermeleri ve DNA ölçümü, kollejen tip II sentezi gibi analizlerde kullanıldı.

▪ SEM ile kondrositlerin tutunup tutunmadığı, genel morfolojileri incelendi. Yüzeye tutunmuş hücreler görüntülendi. İnkübasyon süresi uzatıldığında hücre sayısının yüzeyde azaldığı tespit edilmiştir.

- GAG miktarında inkübasyon süresi uzadıkça GAG miktarının düştüğü saptanmış, bununla birlikte kondrositlerin kriyojele yeterince tutunamadığı tahmin edilmektedir.

- DNA miktarına bakıldığında inkübasyon süresi uzadıkça DNA miktarının azaldığı gözlemlenmiştir.

- Yaptığımız çalışmada önemli karakterizasyonlardan bir diğeri kondrosit fenotipi için karakteristik olan kollajen tip II sentezinin belirlenmesidir.

Primer kondrositlerin 7 gün sonundaki karakterizasyonunda β mikroglobulin (house keeping gen) ile kıyaslandığında kollajen tip II sentezinin yüksek, kollajen tip I ise çok düşük olduğu gözlemlenmiştir. Inkübasyon süresi arttırıldığında kollajen tip II sentezinin azaldığı tespit edilmiştir.

- Kriyojel ekstraktının toksisite ve nekrotik etkisine baktığımızda düşük konsantrasyonda kontrol grubundan farklı olmadığı ve toksisitenin çok düşük olduğu görülmüş, yüksek konsantrasyonda ise toksisitenin çok arttığı gözlenmiştir.

Nekrotik etkide de toksisiteye yakın sonuçlar elde edilmiştir. Düşük konsantrasyonda nekrotik etki kontrol grubuyla yaklaşık aynı iken yüksek konsantrasyonda nekrotik etkinin arttığı tespit edilmiştir.

- Kriyojel gözenek boyutu kondrositlerin tutunması için uygun değildir bu yüzden gözenek boyutu küçültülerek hücrelerin tutunması ve kondrosit yüklü kriyojele titreşim vererek hücrelerin çoğaltılması sağlanabilir.

KAYNAKLAR

- [1] Aksoy C. Yücel K, Alyanak AM; Osteoartrit cephesinde son görüşler. Hipokrat, 55: 55–62, 1996.
- [2] Felson DT: Epidemiology of the rheumatic diseases. in: Koopman WJ (ed). Arthritis and Allied Conditions. Baltimore: Williams & Wilkins 3–34, 1997.
- [3] Felson DT, Zhang Y, Hannan MT, Naimark A, Weissman B. Aliabadi P, Levy D: Risk factors for incident radiographic knee osteoarthritis in the elderly. The Framingham Study. Arthritis Rheum, 40(4):728–733, 1997.
- [4] Altman RD: New strategies in treatment of osteoarthritis. J Rheum Med Rehab, 8(2): 66, 1997.
- [5] Doherty M, Jones A, Cawston TE; Osteoarthritis. in: Maddison PJ;Isenberg DA, Woo P, Glass DN (eds). Textbook of Rheumatology. Oxford: Oxford University Press 1515-1553, 1998.
- [6] GERİATRİ 1999, CİLT: 2, SAYI: 2, SAYFA: 7415. Fransen M, Margiotta E, Crosbie J, Edmonds J: A revised group exercise program for osteoarthritis of the knee. Physiother Res Int 2(1):30-41, 1997.
- [7] Kovar PA, Allegrante JP, MacKenzie CR, Peterson MGE, Gutin B: Charlson ME: Supervised fitness walking in patients with osteoarthritis of the knee. A randomized, controlled trial. Ann Intern Med, 116(7):529-534, 1992.
- [8] Kisner C. Colby LA: Therapeutic Exercise Foundations and Techniques. Philadelphia: F.A. Davis Company 211–240, 1990.
- [9] Gindzienska-Sieskiewicz, E., Klimiuk, PA., Kisiel, DG., Gindzienski, A., Sierakowski. S. Clin.Rheumatol. 26, 685–690, 2007.

- [10] Seror, R., Pagnoux, C., Guillevin, L. *Transfusion and Apheresis Science*. 36, 195–199, 2007.
- [11] Bornouf, T., Goubramm, H., Radosevic, M. *J. of Chromtog. B*, 715, 65–80. 1998.
- [12] Plieva, F., Andersson, M., Galaev, J., Mattiasson, I.Y. *J. Sep. Sci.* 27, 828–836, 2004.
- [13] Lozinsky, VI. *Russian Chemical Reviews*. 17 (6), 489–511, 2002.
- [14] Plieva, FM., Galaev, I., Matiasson, B. *J. Sep. Sci.* 30,1657–1671, 2007.
- [15] Ian, R., Mackay, M.D., Fred, S., Rosen, M.D. *N Engl J Med*. 345, 5–9, 2001.
- [16] Chen, J., Jo, S., Park, K. *Carboh. Polym.*, 28, 69-76, 1995.
- [17] Peppas, N. A., Huang, Y., Torres-Lugo, M., Ward, J. H., Zhang, J. *Ann. Rev. Biomed. Eng.* 2, 9–29, 2000.
- [18] Hentze, H.-P., Antonietti, M. *Rev. Mol. Biotechnol.* , 90, 27- 53. 121, 2002.
- [19] Hjerten, S., Liao, J.-L., Zhang, R. *J. Chromatogr.*, 473, 273-275., 1989.
- [20] Nam, Y. S., Park, T. G. *J. Biomed. Mater. Res.*, 47, 8-17, 1999.
- [21] Wood, C. D., Cooper, A. I. *Macromolecules* 34, 5–8, 2001.
- [22] Kabiri, K., Omidian, H., Zohuriaan-Mehr, M. *J. Polymer Int.* 52,1158-1164, 2003.

- [23] Lozinsky, V. I., Plieva, F. M., Galaev, I. Y., Mattiasson, B. *Bioseparation*. 10, 163–188, 2002.
- [24] Plieva, F. M., Karlsson, M., Aguilar, M.-R., Gomez, D., Mikhalovsky, S., Galaev, I. Y. *Soft Matter* 1, 303-309, 2005.
- [25] Plieva, F., Huiting, X., Galaev, I. Y., Bergensthl, B., Mattiasson, B. J. *Mater. Chem.* 16, 4065–4073, 2006.
- [26] Plieva, F.M., Galaev, I.Y., Mattiasson, B. J. *Sep. Sci.* 30, 1657–1671, 2007.
- [27] Plieva, F. , Andersson, J., Galaev, I. Y., Mattiasson, B. J. *Sep. Sci.*27, 828–836, 2004.
- [28] Plieva, F., Galaev, I. Y., Mattiasson, B. *Langmuir*, 23(1), 35–40, 2007.
- [29] Plieva, F. M., Karlsson, M., Aguilar, M.-R., Gomez, D., Mikhalovsky, S., Galaev, I. Y., Mattiasson, B. J. *Appl. Polym. Sci.* 100,1057–1066, 2006.
- [30] Plieva, F., Oknianska, A., Degerman, E., Galaev, I. Y., Mattiasson, B. J. *Biomater. Sci. Polym. Edn.* 17, 1075–1092, 2006.
- [31] Arvidsson, P., Plieva, F. M., Lozinsky, V. I., Galaev, I. Y., Mattiasson, B. J. *Chromatogr. A.* 986, 275- 290, 2003.
- [32] Lozinsky, V. I., Galaev, I. Y., Plieva, F. M., Savina, I. N., Jungvid, H.,Mattiasson, B. *Trends Biotechnol.* 21, 445–451, 2003.
- [33] Akdemir N, Birol L. *İç Hastalıkları ve Hemşirelik Bakımı*. İstanbul, Ekin Tıbbi Yayıncılık, 1. Baskı, 2003.

- [34] World health organizations. "Quality of care: patient safety", (Çevrimiçi), http://www.who.int/gb/ebwha/pdf_files/WHA55/ea5513.pdf. 2002.
- [35] Glasgow RE, Davis CL, Funnell MM, Beck A. Implementing practical interventions to support chronic illness self-management. Joint Commission Journal on Quality and Safety, 29(11): 563-574, 2003.
- [36] Groessl EJ, Kaplan RM, Cronan TA. Quality of well-being in older people with osteoarthritis. Arthritis&Rheumatism, 49(1): 23-28, 2003.
- [37] Barlow JH, Cullen LA, Rowe IF. Educational preferences, psychological well-being and self-efficacy among people with rheumatoid arthritis. Patient Education and Counseling, 46(1):11-19, 2002.
- [38] Göksoy T. Romatizmal Hastalıkların Tanı ve Tedavisi. İstanbul, Tavaslı Matbaacılık, 2002.
- [39] Smeltzer SC, Bare BG. Textbook of Medical-Surgical Nursing. Philadelphia, Lippincott Company, 9th edition, 2000.
- [40] Hosie G, Field M, Brandon M. Shared Care for Rheumatology. London, Martin Dunitz Ltd., 2002.
- [41] İstanbul Ağrı Merkezi. "Romatizma ve artrit", <http://www.agritr.com/romatizma.htm>. 2004.
- [42] Baysal A, Aksoy M, Bozkurt N, Merdol TK, Pekcan G, Keçecioglu S, Besler HT, Mercangil SM. Diyet El Kitabı. Ankara, Hatiboğlu Yayınevi, 3. Baskı, 1999.
- [43] National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion. "Targeting Arthritis: Reducing Disability for 16 Million

Americans”, <http://www.cdc.gov/nccdphp/publications/aag/arthritis.htm>.
30.03.2006.

[44] World Health Organization. “Overview - Preventing chronic diseases: a vital investment”, http://www.who.int/chp/chronic_disease_report/part1/en/index.html. 2006.

[45] Romatoloji Araştırma Eğitim Derneği. “Osteoartrit”, http://www.romatoloji.org.tr/d_osteoartrit.htm. 2002.

[46] “Romatoid artrit hastalığını yeniden anlayalım”, <http://www.rheumatoide-arthritis.de/tr/>. 20.09.2004.

[47] Hewlett S, Kirwan J, Pollock J, Mitchell K, Hehir M, Blair PS, Memel D, Perry MG. Romatoid Artrit hastasının başlattığı poliklinik takibi: altı yıllık randomize kontrollü araştırma. BMJ,2004.

[48] Braunwald E, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL. Harrison İç Hastalıkları Prensipleri. Cilt: 3. Çev: SAĞLIKER Y. İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri Ltd.Şti&McGraw-Hill Comp.Inc., 2004.

[49] Kahan S. İç Hastalıkları. İstanbul, CSA Global Publishing. 217-229. Türkiye; 10 (2), 22-27, 2005.

[50] American College of Rheumatology Subcommittee on Rheumatoid Arthritis Guidelines. Guidelines for the management of rheumatoid arthritis. 2002 update. Arthritis&Rheumatism, 46(2): 328-346, 2002.

[51] Kırmaz C. “Romatoid artrit”, <http://www.alerjiklinigi.com/romatoid.html>. 2006.

[52] Gulanick M, Klopp A, Galanes S, Gradishar D, Puzas MK. Nursing Care Plans Nursing Diagnosis and Intervention. Fourth edition, Mosby Ltd. Şti., 752-763, 1998.

[53] Kozanođlu E, Göncü K. Dejeneratif eklem hastalığı rehabilitasyonu. Türk Geriatri Dergisi. 2(2): 71-75, 1999.

[54] Wagner, U., Kaltenhauser, S., Sauer, H., Arnold, S., Seidel, W., Hantzschele, H., Kalden, J. R., Wassmuth, R. Arthritis Rheum. 40, 341–351, 1997.

[55] Weyand, C. M., Hicok, K. C., Conn, D. L., Goronzy, J. Ann. Intern. Med. 117, 801–806, 1992.

[56] Anonim, http://tr.wikidoc.org/index.php/Romatoid_artrit 29 Ocak 2009.

[57] Yılmaz, E. Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniv. Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, ANKARA. 116, 2007.

[58] Zandman-Goddard, G. Autoİmmün Rev. 6(6), 366–372, 2007.

[59] Lipsky, P., Rheumatoid arthritis. In: Harrison's Principles of Internal Medicine, Braunwald E, Fauci A, Isslebacher K, Kasper D, Hauser S, Longo D; 16th ed., McGraw-Hill, 1968-1977, 2004.

[60] Persellin, R.H. Bull Rheum Dis. 27, 922–927. 117, 1997.

[61] Kim In-Yong, Seog-Jin Seo, Hyun-Seuk Moon, Mi-Kyong Yoo, In-Young Park, Bom-Chol. Kim, Chong-Su Cho: Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications. Biotechnol Adv, 26: 1–21, 2008.

[62] Uslu B, Arbak S, Biltekin B, Denir S, Özbaş-Turan S, Akbuğa J, Bilir A. Farklı Kitozan Formlarının Fibroblast Hücre Aktivitesi Üzerine Proliferatif

Etkisinin İn vitro Karşılaştırması, Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Uzmanlık Tezi, 2008.

[63] Wang YC, Lin MC: Fabrication of novel porous PGA-chitosan hybrid matrix for tissue engineering. *Biomaterials*, 24: 1047–1057, 2003.

[64] Çakar N. Primer Hücre Kültürü: Temel Hücre Kültürü Teknikleri Kursu Kitapçığı. Hacettepe Üniversitesi yayınları, 2006.

[65] Kaş H S: Chitosan properties, preparations and application to microparticulate systems. *J Microencapsul*, 14: 689–711, 1997.

[66] Buckwalter JA, Mankin HJ: Articular Cartilage Part II: Degeneration and osteoarthritis, repair, regeneration, and transplantation. *J Bone J Surg Am* 79-A(6):612-32, 1997.

[67] Lexer E: Substitution of whole or half joints from freshly amputated extremities by free plastic operations. *Surg Gynecol Obstet* 6: 601-9, 1908.

[68] Vacanti CA, Vacanti JP: The science of tissue engineering. *Orthop Clin North Am* 31 (3): 351-5, 2000.

[69] Buckwalter JA, Mankin HJ: Articular Cartilage Part I: Tissue design and chondrocyte interactions. *J Bone J Surg Am* 79-A(6): 600–11, 1997.

[70] Freed LE, Langer R, Martin I, Pellis NR, Vunjac-Novakovic G: Tissue engineering of cartilage in space. *Proc Natl Acad Sci* 94(25): 13885-90, 1997.

[71] Freed LE, Vunjac-Novakovic G: Microgravity tissue engineering. *In Vitro Cell Dev Biol* 33(5):381-5, 1997.

- [72] Steinmeyer J, Knue S, Raiss RX, Pelzer I: Effects of intermittently applied cyclic loading on proteoglycan metabolism and swelling behavior of articular cartilage explants. *Osteoarthritis Cartilage* 7 (2): 155–64, 1999.
- [73] Green WT: Articular Cartilage Repair: Behavior of rabbit chondrocytes during tissue culture and subsequent allografting. *Clin Orthop* 124:237-50, 1977.
- [74] Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L: Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med* 331(14):889–95, 1994.
- [75] Chen AC, Nagrampa JP, Schinagl RM, Lottman LM, Sah RL: Chondrocyte transplantation to articular cartilage explants in vitro. *J Orthop Res* 15(6):791–802, 1997.
- [76] Grande DA, Breitbart AS, Mason J, Paulino C, Laser J, Schwartz RE: Cartilage tissue engineering: Current limitations and solutions. *Clin Orthop* 367S: 176–85, 1999.
- [77] Kandel RA, Boyle J, Gibson G, Cruz T, Speagle M: In vitro formation of mineralized cartilagenous tissue by articular chondrocytes. *In Vitro Cell Dev Biol* 33(3):174–81, 1997.
- [78]. Brittberg M: Autologous chondrocyte transplantation. *Clin Orthop*, 367S:147–56, 1999.
- [79] Ito Y, Fitzsimmons S, Sanyal A, Mello M, Mukherjee N, O'Driscoll S: Localization of chondrocyte precursors in periosteum. *Osteoarthritis Cartilage* 9(3): 215-23, 2001.

- [80] Ostrander E, Goomer C, Tontz D, Khatod M, Harwood D, Maris W: Donor cell fate in tissue engineering for articular cartilage repair. *Clin Orthop* 389:228–37, 2001.
- [81] B. Garipcan, A. Denizli, *Macromol. Biosci.*, 135,2 2002.
- [82] Gille J., Meisner U., Ehlers E.M., Muller A., Russlies M., Behrens P., Migration pattern, morphology and viability of cells suspended in or sealed with fibrin glue: a histomorphologic study, *Tissue Cell*, 37(5), 339-48, 2005.
- [83] Battistelli M., Borzi R.M., Olivotto E., Vitellozzi R., Burattini S., Facchini A., Falcieri E., Cell and matrix morpho-functional analysis in chondrocyte micromasses, *Microsc Res Tech.*, 67(6), 286-95, 2005.
- [84] Schmal H., Mehlhorn A.T., Fehrenbach M., Muller C.A., Finkenzeller G., Sudkamp N.P., Regulative mechanisms of chondrocyte adhesion, *Tissue Eng*, 12(4), 741-50, 2006.
- [85] Enobakhare B.O., Bader D.L., Lee D.A., Quantification of sulfated glycosaminoglycans in chondrocyte/aljinate cultures, by use of 1,9-dimethylmethylene blue, *Anal Biochem*, 243(1), 189-91, 1996.
- [86] Hsu S.H., Whu S.W., Hsieh S.C., Tsai C.L., Chen D.C., Tan T.S., Evaluation of chitosan-aljinate-hyaluronate complexes modified by an RGD-containing protein as tissue-engineering scaffolds for cartilage regeneration, *Artif Organs*, 28(8), 693-703, 2004.
- [87] Svec, F., Frechet, J.M. *J. Ind. Eng. Chem. Res.* 38, 34–48, 1999.
- [88] Svec, F. *J. Sep. Sci.* 27, 747- 766, 2004.
- [89] Svec, F., Frechet, J. M. *Science.* 273, 205- 211, 1996.

- [90] Strancar, A., Podgornik, A., Barut, M. *BIOforum Int.* 3, 152-153, 2002.
- [91] Josic, D., Buchacher, A. *J. Biochem. Biophys. Methods.* 49, 153-174, 2001.
- [92] Lozinsky, V. I. *Russ. Chem. Rev.* 71, 489- 511. 122, 2002.
- [93] Plieva, F. M., Savina, I. N., Deraz, S., Andersson, J., Galaev, I. Y. Mattiasson, B. J. *Chromatogr. B.* 807, 129- 137, 2004.
- [94] Plieva, F., Bober, B., Dainiak, M., Galaev, I. Y., Mattiasson, B. J. *Mol. Recogn.* 19, 305- 312, 2006.
- [95] Hollister, S.J., Porous scaffold design fot tissue engineering, *Nature Materials* 4, 518-524, 2005.
- [96] Woerly, S., Restorative surgery of the central nervous system by means of tissue engineering using NeuroGel implants, *Neurosurgery Rewiews.* 23, 59–77, 2000.