

T.C.
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Yağ Dokudan Elde Edilen Mezenşimal Kök Hücrelerin Elektrospinlenmiş
Biyomalzeme veya Üç Boyutlu Matriks Üzerinde Kültürü ve Karakterizasyonu

Kadriye Gizem İMRAK

EYLÜL, 2018

Biyomühendislik Anabilim Dalında Kadriye Gizem İMRAK tarafından hazırlanan YAĞ DOKUDAN ELDE EDİLEN MEZENŞİMAL KÖK HÜCRELERİN ELEKTROSPİNLENMİŞ BİYOMALZEME VEYA ÜÇ BOYUTLU MATRİKS ÜZERİNDE KÜLTÜRÜ VE KARAKTERİZASYONU adlı Yüksek Lisans Tezinin Anabilim Dalı standartlarına uygun olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. Mustafa YİĞİTOĞLU

Anabilim Dalı Başkanı

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

Prof. Dr. Siyami KARAHAN

Danışman

Jüri Üyeleri

Başkan (Danışman) : Prof. Dr. Siyami KARAHAN _____

Üye : Prof. Dr. Mustafa TÜRK _____

Üye :Dr. Öğr. Üyesi Ozan KARAMAN_____

...../...../.....

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

Prof. Dr. Mustafa YİĞİTOĞLU

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ÖZET

Yağ Dokudan Elde Edilen Mezenşimal Kök Hücrelerin Elektrosinlenmiş
Biyomalzeme veya Üç Boyutlu Matriks Üzerinde Kültürü ve Karakterizasyonu

İMRAK, Kadriye Gizem

Kırıkkale Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyomühendislik Anabilim Dalı, Yüksek Lisans tezi

Danışman: Prof. Dr. Siyami KARAHAN

AĞUSTOS 2018, 76 sayfa

Mezenşimal kök hücre (MKH)'ler çoğalma, farklılaşma ve kendini yenileyebilme özellikleri ile embriyonik dönemde gelişimde önemli bir rol oynamakla birlikte erişkin dönemde de dokularda yenilenmeyi sağlar. MKH'ler birçok farklı dokudan elde edilebilmektedir. Bu çalışmada mezenşimal kök hücreler tavşanın yağ dokusundan elde edilmiştir. Çalışmada elektroğirme yöntemi ile elde edilmiş PHEMA (Poli(2-Hidroksietil metakrilat)) nanofiber üzerine mezenşimal kök hücreler ekilmiş ve kültür edilmiştir. Çalışmanın amacı, bu hücrelerin nanofiber üzerinde kültürü, karakterizasyonu ve bunların doku mühendisliği alanında kullanım potansiyelinin anlaşılmasıdır. HEMA (2-Hidroksietil metakrilat)'nın ısı polimerizasyonu ile PHEMA elde edilmiş, bu polimer kullanılarak da elektroğirme yöntemi ile nanofiber üretilmiştir. Üretilen nanofiber, 4S-PEG (4-kollu Polietilen glikol) ile çapraz bağlanmıştır. Nanofiberin kimyasal karakterizasyonu FTIR ile gösterilmiş, SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu) fotoğrafları çekilmiş ve fiber çapları ölçülmüştür. Fiber çaplarının 190-350 nm arasında olduğu belirlenmiştir. Diğer taraftan, hücrelerin kimliğinin belirlenmesi amacıyla immünositokimya ve flow sitometri yöntemleri ile CD90, CD44 ve CD105 markırlarının varlığı gösterilmiştir. Ardından nanofiberler üzerine hücre ekimi yapılmış ve SEM

fotoğrafları çekilmiş ve MTT, Alamar mavisi ve Calcein AM metotları ile hücre canlılığı tespit edilmiştir. MTT sonuçlarına göre, hücre canlılığı 1. gün %94,10, 3. gün %81,98 ve 5. gün %74,46 olarak bulunmuştur. Alamar mavisi sonuçları ise; 1. gün %88,22, 3. gün %81,58 ve 5. gün %74,93 şeklindedir. Ayrıca, western blot yöntemiyle de CD105 markırına rastlanırken, CD146'ya rastlanmamıştır.

Alınan sonuçlara göre, elde edilen nanofiberin mezenşimal kök hücreler ile birlikte doku mühendisliği alanında kullanım potansiyeline sahip olduğu görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: HEMA, PHEMA, Kök hücre, Mezenşimal kök hücre, Nanofiber, Doku mühendisliği, Elektroçirme

ABSTRACT

Culture And Characterization of Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells on
Electrospun Biomaterial or Three Dimensional Matrix

İMRAK, Kadriye Gizem

Kırıkkale University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Bioengineering, Master Thesis

Supervisor: Prof. Dr Siyami KARAHAN

August 2018, 76 pages

Mesenchymal stem cells (MSCs) play an important role in development in the embryonic period with their proliferation, differentiation and self-renewal properties, but also renewal in tissues in the adult period. MSCs can be obtained from many different tissues. In this study, mesenchymal stem cells were obtained from the fat tissue of the rabbit. In the study mesenchymal stem cells were seeded and cultured on PHEMA (Poly(2-Hydroxyethyl methacrylate)) nanofiber obtained by electrospinning method. The aim of the study is to understand the culture, characterization of these cells on nanofibers and their potential for use in tissue engineering. PHEMA was obtained by thermal polymerization of HEMA (2-Hydroxyethyl methacrylate) and nanofibers were produced by electrospinning using this polymer. The produced nanofiber is cross-linked with 4S-PEG (4-arm polyethylene glycol). The chemical characterization of the nanofiber is shown by FTIR, SEM (Scanning Electron Microscopy) photographs are taken and fiber diameters were determined to be between 190-350 nm. On the other hand, the presence of CD90, CD44 and CD105

markers has been demonstrated by immunocytochemistry and flow cytometry methods to identify the cells. Cell culture was then performed on the nanofibers and SEM photographs were taken and cell viability was determined by MTT, Alamar blue and Calcein AM methods. According to MTT results, cell viability was 94,10% on the 1st day, 81,98% on the 3rd day and 74,46% on the 5th day. The results of the Alamar blue test are; 88,22% on the 1st day, 81,58% on the 3rd day and 74,93% on the 5th day. In addition, the CD105 marker was found by western blot method but CD146 was not found.

According to the results obtained, the nanofiber obtained has been found to have potency in use in the field of tissue engineering together with mesenchymal stem cells.

Key words: HEMA, PHEMA, Stem cell, Mesenchymal stem cell, Nanofiber, Tissue engineering, Electrospinning

TEŞEKKÜR

Tezimin hazırlanması esnasında daima yönlendiren ve araştırmalarımın her aşamasında bilgisini esirgemeyen, bilimsel anlamda gelişmeye katkıda bulunmasının yanında maddi manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen danışman hocam, Sayın Prof. Dr. Siyami KARAHAN'a,

Her koşulda destek olan, laboratuvar çalışmalarında her türlü maddi ve manevi imkanı sunan hocam Sayın Prof. Dr. Mustafa TÜRK'e,

Yüksek lisans bursiyer öğrencisi olduğum 2140314 no'lu 'Elektroçirme Yöntemiyle Üretilmiş ve Biyouyumluluğu İyileştirilmiş Nanofiberlerin Menisküs Tedavisinde Uygulama Potansiyeli' adlı 1001 projesi kapsamında yürüttüğüm tez çalışma sürecimde maddi ve bilimsel anlamda beni destekleyen Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK)'na,

Laboratuvar imkanlarını sunan, bilgilerini esirgemeyen ve deneysel çalışmalarında destek olan hocalarım, Sayın Doç Dr. Aytül KÜRÜM'e, Doç Dr. Barış KÜRÜM'e, Yrd. Doç. Dr. Murat İNAL'a, Sayın Prof. Dr. Serpil OĞUZTÜZÜN'e, Sayın Sezen TÜRKAN'a, Sayın Yasin ÖZKABADAYI'ya,

Manevi desteklerinden dolayı İMRAK ve AKVERAN ailelerine, değerli arkadaşlarım Sema TUNCER'e, Kübra GÜNAY'a,

Birçok konuda yardımlarını esirgemeyen Uzm. Yaşar ALUÇ'a, Uzm. Esra ARAT'a, Uzm. Mustafa Doğan'a,

Sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
KISALTMALAR DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
1.1. Kök Hücre Nedir?.....	2
1.2. Kök Hücrenin Tarihçesi	2
1.3. Kök Hücrelerin Kaynağı.....	4
1.4. Mezenşimal Kök Hücre ve Kaynakları.....	5
1.4.1. Plasenta Mezenşimal Kök Hücre ve Amniyon Mezenşimal Kök Hücre	6
1.4.2. Kordon Kanı Mezenşimal Kök Hücre ve Umbilikal Mezenşimal Kök Hücre	6
1.4.3. Kemik İliği Mezenşimal Kök Hücre ve Dental Pulpa Mezenşimal Kök Hücre	7
1.4.4. Yağ Doku Kökenli Mezenşimal Kök Hücre.....	8
1.5. Yağ Dokudan Kök Hücre İzolasyonu	9
1.6. Hücre İmünofenotipi	11
1.7. Yağ Doku Kökenli Kök Hücrelerin Farklılaşması ve Potansiyel Kullanım Alanları.....	13
1.8. Nanofiberler, Avantajları ve Uygulama Alanları	16
1.9. Nanofiberlerin Doku Mühendisliğinde Uygulamaları	17
1.9.1. Kemik Doku Mühendisliğinde Nanofiberler	18
1.9.2. Kıkırdak Doku Mühendisliğinde Nanofiberler	18

1.9.3.Ligament Doku Mühendisliğinde Nanofiberler	19
1.9.4.Çizgili-kas Doku Mühendisliğinde	19
1.9.5. Deri Doku Mühendisliğinde Nanofiberler	19
1.9.6. Damar Doku Mühendisliğinde Nanofiberler	20
1.9.7.Nöral Doku Mühendisliğinde Nanofiberler	20
1.10. Nanofiber Üretim Metotları.....	20
1.10.1 Moleküler Öztoplanma.....	21
1.10.2.Faz Seperasyon.....	21
1.10.3.Elektroegirme	23
1.11. PHEMA, Özellikleri ve Kullanım Alanları	25
1.11.1.PHEMA'nın Fiziksel Özellikleri.....	26
1.11.2. PHEMA'nın Biyouyumluluğu ve Kullanımı.....	26
2. MATERYAL ve YÖNTEMLER	27
2.1. Materyaller	27
2.2 Metotlar	28
2.2.1.Tavşan Yağ Dokusundan Kök Hücre Elde Edilmesi.....	28
2.2.2. Kök Hücre Oranının Flow Sitometri ile Belirlenmesi	29
2.2.3. Hücrelerin İmmünohistokimyasal Boyanması	30
2.2.4. Elektroegirme ile Nanofiber Eldesi	31
2.2.4.1.HEMA'nın Polimerizasyonu.....	31
2.2.4.2. Elektroegirme ile PHEMA Nanofiber Elde Edilmesi	32
2.2.4.3. Nanofiberlerin 4S-PEG ile Çapraz Bağlanması.....	33
2.2.5. Elde Edilen NanofiberlerinSEM Görüntüleri	34
2.2.6. Nanofiber Üzerine Hücre Ekimi.....	34
2.2.7.Alamar Mavisi Testi.....	26
2.2.8.MTT Testi	34
2.2.9. Western Blot ile Protein Bantlarının Görüntülenmesi.....	35

2.2.9.1.Hücre Örneklerinden Protein İzolasyonu	35
2.2.9.2. Surelock XCELL Dikey Jel Sisteminde Yürütme İşlemi	36
2.2.9.3. Iblot Dry Blotting Sistem ile Blotlama	37
2.2.9.4.Bloklama İşlemi.....	38
2.2.9.5.Antikorun Eklenmesi	38
2.2.9.6.Sekonder Antikorun Eklemesi.....	39
2.2.9.7.Kromojen Uygulanması ve Görüntüleme	39
2.2.10. Calcein AM ile Canlılığın Gösterilmesi	39
3. BULGULAR.....	40
3.1. Yağ Dokudan Mezenşimal Kök Hücre Elde Edilmesi.....	40
3.2. Kök Hücre Oranının Flow Sitometri ile Belirlenmesi.....	41
3.3.İmmünohistokimyasal Analiz	42
3.4.Nanofiberlerin FTIR ile Kimyasal Karakterizasyonu	43
3.4.1. Hazırlanan PHEMA Nanofiberin FTIR Karakterizasyonu	43
3.4.2. 4S-PEG'in FTIR Karakterizasyonu	45
3.5. Nanofiberlerin SEM Görüntüleri	48
3.6. Nanofiberler Üzerine Mezenşimal Kök Hücre Ekimi	49
3.7. Western Blot Yöntemi ile Protein Görüntüleme	50
3.8. Nanofiber Üzerinde Kültür Edilen Hücrelerin MTT Testi ile Canlılığının Gösterilmesi.....	51
3.9. Nanofiber Üzerinde Kültür Edilen Hücrelerin Alamar Mavisini ile Canlılığının Gösterilmesi	53
3.10. Hücrelerin Calcein AM ile Boyanması.....	54
4. SONUÇLAR ve TARTIŞMA.....	55
KAYNAKLAR.....	60

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>ŞEKİL</u>	<u>SAYFA</u>
2.1. HEMA'nın ısı polimerizasyonu.....	31
2.2. HEMA'nın polimerizasyon sonrası hali ve liyofilize edilmiş hali	32
2.3. Elektrodeğirme cihazı ve kullanılan metal toplayıcı.....	33
2.4. Nanofiberin üzerine çapraz bağlayıcı solüyon eklenmesi	33
2.5. Iblot cihazı ile jel görüntüsünün membrana aktarılması	38
3.1. İzole edilen mezenşimal kök hücrelerin ışık mikroskopunda görüntüleri	40
3.2. İşaretli olmayan hücrelerin flow sitometri sonuçları	41
3.3. CD90 ile işaretli hücrelerin flow sitometri sonuçları.....	41
3.4. Kontrol grubunun immünohistokimyasal boyama görüntüleri	42
3.5. CD44 antikoruna ile immünohistokimyasal boyama görüntüleri	42
3.6. CD105 antikoruna ile immünohistokimyasal boyama görüntüleri	44
3.7. Aminoasit içeren PHEMA nanofiberin FTIR görüntüsü	45
3.8. 4S-PEG'e ait FTIR görüntüsü.....	46
3.9. Aminoasit ve 4S-PEG içeren PHEMA'ya ait FTIR görüntüsü	47
3.10. PHEMA nanofiberlerin SEM görüntüleri	48
3.11. Fiber çaplarının tespit edilmesi	48
3.12. Çapraz bağlı nanofiberin SEM görüntüsü	49
3.13. Nanofiber üzerine ekilen hücrelerin ışık mikroskopu görüntüleri.....	49
3.14. Nanofiber üzerine ekilen hücrelerin SEM görüntüleri.....	50
3.15. Western blot deneyinde kullanılan ladder'a ait bantlar	50
3.16. Western blot sonucu elde edilen membran görüntüsü	51
3.17. MTT testi sonuçlarına göre yüzde canlılığı gösteren grafik.....	52
3.18. Alamar mavisi testi sonuçlarına göre yüzde canlılığı gösteren grafik	50
3.19. Calcein AM ile boyama sonucu görüntüler (1. Gün).....	54

3.20. Calcein AM ile boyama sonucu görüntüler (3. Gün).....	55
3.21. Calcein AM ile boyama sonucu görüntüler (5. Gün).....	55



ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>ÇİZELGE</u>	<u>SAYFA</u>
2.1. Numunelerden elde edilen protein konsantrasyonları.....	37
3.1 PHEMA'nın FTIR analizi	44
3.2. Aminoasit içeren PHEMA nanofiberin FTIR analizi.....	45
3.3. MTT testi sonucu absorbans değerleri (1. Gün)	52
3.4. MTT testi sonucu absorbans değerleri (3. Gün)	52
3.5. MTT testi sonucu absorbans değerleri (5. Gün)	52
3.6. Alamar mavisi testi absorbans değerleri	53

KISALTMALAR DİZİNİ

APS	Amonyum persülfat
CD	Küme Farklılaşması (Cluster Differentiation)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
4S-PEG	4-kollu PEG Süksinimidil glutarat
DAB	Diaminobenzidin
DMSO	Dimetil Sülfoksit
ECM	Ekstraselüler Matriks
EDTA	Etiendiamin Tetraasetik Asit
FBS	Fötal Sığır Serum
FDA	Gıda ve İlaç İdaresi
FITC	Floresin izosiyonat
FTIR	Fourier Dönüslümlü Kızılötesi (Fourier Transformed Infrared)
HEMA	2- (Hidroksietil metakrilat)
HRP	Horse radish peroxidase
MKH	Mezenşimal kök hücre
MSC	Mezenşimal kök hücre (Mesenchymal stem cell)
MTT	3-(4,5-dimetiltiyazol2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum-bromür
PBS	Tuzlu Fosfat Tamponu (Phosphate Buffered Saline)
PEG	Polietilen glikol
PHEMA	Poli(2-hidroksietil metakrilat)
SEM	Taramalı elektron mikroskop
UV	Ultraviyole

1. GİRİŞ

Son yıllarda modern tıbbın en büyük ilgi alanlarından biri olan ve hızlı bir şekilde gelişmekte olan yenileyici tıp ve hücre tabanlı tedavi yöntemleri birçok hastalık için umut olmaya başlamıştır. Bu tedavi yöntemleri için en önemli kaynak olan kök hücreler ise hasarlı olan dokularda doku onarımını uyarmakta ve iyileşme oranını artırmaktadırlar. [1]

Kök hücreler; birçok özelliğe sahip oldukları için çok değerlidirler. Yenilenme, hızlı proliferasyon, başka hücelere dönüşebilme, hasarlı doku bölgesini onarabilme özellikleri, bu özellikler arasında en belirgin olanlardır. Kök hücreler vücutta yaygın olarak bulunmaları, kolayca elde edilebilmeleri, farklılaşarak çoğalabilmeleri, alıcılara güvenli ve etkin bir şekilde nakledilebilmeleri sebebiyle yenileyici tıp uygulamalarında tercih edilmektedir. [2]

Mezenkimal kök hücreler; mezoderm tabakasından köken almakla birlikte vücudun bazı bölgelerinde nöral krista kaynaklı mezenkim dokudan da gelişirler. Kemik iliği, adipoz doku, göbek kordonu, kordon kanı, karaciğer, beyin, diş pulpası, deri ve fetal dokularda bulunan farklılaşmamış, çoğalma kapasitesi yüksek, kendini farklılaşmadan yenileyebilme özelliğine sahip, mezodermal farklılaşma yetisi çok fazla olan kök hücrelerdir. Mezenkimal kök hücreler kemik, kıkırdak, kas gibi farklı hücre tiplerine dönüşüm kapasitelerinin yanında ürettikleri birçok büyüme faktörü ve sitokinler nedeni ile immün baskılayıcı ve trofik etki potansiyeline de sahiptir. [1]

Yağ dokusu kaynaklı mezenşimal kök hücrelerin; tip 1 ve 2 diyabet hastalığı, karaciğer sirozu, Crohn hastalığı, Graft versus host hastalığı (GVHD), miyokard enfaktüsü, lipodistrofi, Alzheimer, Parkinson, inme, vitiligo, böbrek ve kalp yetmezliği, fekal inkontinans, osteoartrit, osteoporoz, menisküs gibi ortopedik hastalıklar, kanser ve immün hastalıklarda bağışıklık sistemini baskılayıcı ve düzenleyici, multipl skleroz (MS), sekonder progresif MS, nörodejeneratif hastalıklar, omurilik yaralanmaları ve travmatik sinir kesileri gibi sinir sistemi hastalıkları, diş hekimliğinde implantlar, plastik cerrahide yanık tedavisi gibi

rejeneratif amaçlı, osteogenesis imperfekta gibi kalıtsal hastalıklarda kullanıma ait deneysel ve klinik çalışmalar vardır. Yağ dokusu kaynaklı mezenşimal kök hücreler düşük immünojenitesi, yüksek modülatör ve immünsupresif özelliklere sahip olduğu için klinikte kullanılmaktadır. Bununla birlikte belli bazı hastalıkların tedavisi için klinik çalışmalar halen devam etmektedir. [2]

Geniş yüzey alanına sahip poroz yapılar, birçok farklı alanda uygulanma potansiyeline sahiptir. Nanofiberler de istenen yüksek poroziteye ve yüzey/hacim oranına sahiptirler. Geleneksel sert poroz yapıların aksine, nanofiberler, por büyüklüğü ve şekli değişebilen dinamik sistemlerdir. Ayrıca gerketiği takdirde sert ve sıkı bir yapıya da dönüştürülebilirler. Nanofiber üretim teknikleri içinde en işe yarar ve yüksek verimli teknik, elektroğirmediir. Elektroğirme ile elde edilen nanofiber ağlar, birçok uygulamada kullanılmaktadır. [3]

Poli(2-hidroksietil metakrilat) (PHEMA), yüksek biyouyumluluğu, canlı dokulara benzer fizyokimyasal özellikleri ve benzeri avantajları ile, doku mühendisliği uygulamaları için ideal bir polimerdir.

Bu çalışmada, tavşan yağ dokusundan izole edilen mezenşimal kök hücrelerin elektroğirme yöntemiyle elde edilen PHEMA nanofiber üzerinde kültürü, karakterizasyonu ve bunların doku mühendisliğinde kullanım potansiyellerinin ortaya çıkarılması amaçlanmıştır.

1.1. KÖK HÜCRE NEDİR?

Kök hücreler, teorik olarak sınırsız bölünme ve oldukça farklı ve değişik hücre türüne dönüşebilme kabiliyetine sahip hücrelerdir. Kök hücreler bölündüğünde oluşan genç hücreler ya bir kök hücre olarak kalır ya da daha özelleşmiş bir fonksiyonu yerine getiren yeni ve farklı bir hücreye farklılaşır.

1.2. KÖK HÜCRENİN TARİHÇESİ

İnsanlığın kök hücreler ile tanışıklığı 1960'lı yılların başına kadar uzanmaktadır. Kemik iliğinde bulunan bir grup hücrenin kanda dolaşan hücrelere farklılaştığının belirlenmesiyle, “kök hücre” terimi tıp terminolojisine girmiştir. Kemik iliğindeki bu kök hücrelerin dolaşım sistemine ait hücrelerini (kırmızı ve beyaz kan hücreleri gibi) oluşturma yeteneğinden oldukça yararlanılmıştır. Önceleri, başta lösemi hastaları olmak üzere birçok genetik kan hastalarının tedavisinde, bu hücrelerin sağlıklı bireylerden hastalara nakliyle başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Bu yöntem hala uygulanmakta ve cerrahi koşullar altında ameliyathanede yapılmaktadır. O nedenle bazı özel şartlara ve yetişmiş personele ihtiyaç vardır.

İlerleyen yıllarda vücutta dolaşan kandaki kök hücrelerin kullanılabileceği anlaşılmıştır. Bunun için önce hastaya hormon verilerek kemik iliğindeki kök hücrelerin hızla çoğalıp kana geçmesi sağlanır. Daha sonra, filtre (aferez) yardımıyla kandan toplanır ve kalan kan vücuda geri verilir. Bu yöntem de hala uygulanmaktadır fakat bu yolla elde edilen kök hücre sayısı diğer yöntemlere oranla daha azdır.

80'li yılların başlarında, yeni doğan bebeklerin kordon kanında da kök hücrelerin bol miktarda bulunduğu ve bu hücrelerin çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılabileceği fikri ortaya atılmıştır. Elde edilen kordon kanı belirli koşullar altında toplanıp dondurularak saklanabilmekte, daha sonra gerek duyulduğunda çözülerek kullanılabilmektedir. İlk olarak Dr. David Harris, 1992 yılında oğlunun kordon kanını kendi laboratuvarında dondurarak sakladı. Daha sonra bu uygulamanın halka açması ile 1994 yılında dünyadaki ilk Kordon Kanı Bankası, Amerika Birleşik Devletleri'nde kuruldu. Takip eden yıllar içinde dünya üzerinde birçok kordon kanı bankası kuruldu ve binlerce bebeğin kordon kanı bu bankalarda koruma altına alındı. Bu yöntem, kök hücre saklama ve depolama açısından en kolay ve en ucuz yöntemdir.

1998 yılında ABD'li bilim adamı James Thomson ve ekibi, ilk defa “insan embriyonik kök hücrelerini” laboratuvarında embriyodan ayırdılar ve çoğalttılar. Bu

oldukça önemli bir gelişmeydi, çünkü bu hücrelerin çoğalma ve farklılaşma potansiyelleri erişkin bir insandan elde edilen kök hücrelere (kemik iliği kök hücreleri gibi) oranla çok daha fazlaydı. [4]

1.3. KÖK HÜCRELERİN KAYNAĞI

Kök hücreler üç kaynaktan elde edilmektedir. Bunlardan ilki insan veya hayvan embriyosudur. Yani daha anne karnında 56 hücre aşamasındaki organizmadan kök hücre elde edilebilir. Buna embriyonel kök hücre denilir. İnsan embriyonel kök hücresi, ilk olarak 1994 yılında izole edildi, 1998 yılında ise laboratuvarlarda üretilmeye başlandı. Anne karnında büyüyen fetüs haline gelen organizmanın ilerde sperm veya yumurta olacak üreme hücreleri de kök hücre kaynağı olarak kullanılabilir. Kök hücrelerin diğer bir kaynağı ise, erişkinlerde bulunan ve birkaç hücre türüne dönüşebilen "erişkin kök hücre"lerdir. Hücrelerin duvarındaki belirli işaretleri tespit ederek, hangi hücrenin kök hücre, hangisinin farklılaşarak özelleşmiş hücre olduğunu anlamak mümkündür. Erişkin kök hücrelere en iyi örnek, her insanda kemik iliğinde bulunan kan kök hücreleridir. Deneysel çalışmalarda her iki kaynaktan elde edilen kök hücreler kullanılmaktadır. Hangi kaynaktan alınırsa alınsın elde edilen kök hücrelerin laboratuvarda çoğaltılmasıyla yeni kök hücre elde edilmesi veya farklı hücreye dönüşmesi mümkündür. Ancak embriyodan elde edilen kök hücreler ahlaki açıdan oldukça tartışmalıdır. Bu hücreleri elde etmek için embriyonun hayatına son vermek gerekir ve bu da özellikle toplumun tepkisine yol açmaktadır. [5]

Yukarıda özetlenen geniş tanımlamaya dâhil olduğu halde birbirinden çok farklı kök hücre tipleri bulunmaktadır:

Totipotent kök hücre: Bir canlı türünün tüm hücre tiplerini ve bu canlının embriyosunu destekleyecek plasenta vb hücrelerini oluşturabilen kök hücredir. Örneğin: Zigot (bir spermin bir yumurta hücresini döllemesi sonucunda oluşan tek hücre) ve morula (zigotun organizmayı oluşturduğu gelişim sürecinin çok hücreli başlangıç evrelerinden biri) totipotenttir.

Embriyonik kök hücre: Preimplantasyon (rahme yerleştirilmeden önceki) embriyoda bulunan ve her üç germ tabakasını (farklılaşarak değişik hücre ve doku gruplarını oluşturan embriyo tabakası) oluşturabilen totipotent kök hücrelerdir. Bunlar ayrıca, bağışıklık sistemi baskılanmış farelerde teratom adlı tüm embriyonik dokuları içeren tümör oluşturabilirler.

Pluripotent/multipotent kök hücre: Embriyonik gelişimde üç germ tabakasından köken alan ve bir canlı türünün tüm hücre tiplerini oluşturabilen hücrelerdir. Ancak embriyo dışı (koryon, plasenta vb) hücreleri oluşturamazken teratom oluşturma özelliğine sahiptirler. İç hücre kitlesini oluşturan hücreler pluripotenttir. Bu hücreler tüm somatik hücrelerin (üreme hücreleri dışındaki vücut hücreleri) ve dokuların kaynağıdırlar ve embriyonik kök hücreler olarak adlandırılırlar. 4-6 günlük insan embriyosundan elde edilirler. Üç germ yaprağı yani ektoderm, mezoderm ve endoderm hücreleri de pluripotenttir. Gelişmenin 2. haftasında, epiblast adlı hücrelerin arasında ileride eşey hücrelerine dönüőecek primordiyal germ hücreleri belirir. Bu hücreler de pluripotenttir ve uygun Őartlar altında çeşitli hücre ve doku tiplerine farklılaşabilirler.

Unipotent kök hücre: Sadece bir seriye ait hücreleri oluşturabilen kök hücre, örneğin hematopoietik kök hücre, olgun olan ve olmayan tüm kemik iliği hücrelerini (eritrosit, lökosit, trombosit, lenfosit, monosit ve öncüleri) oluşturabilir.

Mezenşimal kök hücre: Embriyonun oluşum sürecinde mezoderm olarak bilinen katmanın oluşturduğu kas, kıkırdak, kemik, yağ dokusu gibi tüm dokulara ait hücreleri oluşturabilen pluripotent kök hücredir.

Somatik kök hücre: Son yıllarda tanımlanan, erişkin bireylerin dokularında saptanan ve bulunduğu dokunun tüm hücrelerini oluşturarak yeniden tamirine olanak veren kök hücredir. Örneğin beyinde nöral kök hücrelerin bulunduğu ve bunların sinir hücrelerini oluşturabildiği artık bilinmektedir.

Uyarılmış progenitör kök hücre (IPS): Fizyolojik koşullarda embriyodan elde edilen, Oct-4, Nanog vb transkripsiyon belirleyicilerine sahip hücrelerin erişkin somatik hücrelerinden gen tedavisi yöntemiyle elde edilmesidir. [6]

1.4. MEZENŞİMAL KÖK HÜCRE ve KAYNAKLARI

Mezenşimal kök hücrelerin farklı dokulardan elde edilebilmesi ve standart kültür koşullarında büyütülebilmesi gibi sebeplerle bu hücreler üzerinde yapılan çalışmaların sayısı giderek artmaktadır. Mezenşimal kök hücreler immünojenik değildir, bolca sitokin üretirler ve genetik manipülasyonları kolaydır. En önemlisi, kimyasal, hormonal ya da yapısal uyarılara cevap vererek adipozit, kondrosit, osteosit gibi mezoderm kökenli hücrelerin yanı sıra farklı embriyonik tabakalardan köken alan hücrelere de dönüşebilirler.

Farklı dokulardan elde edilen mezenşimal kök hücreler hakkında çok sayıda yayımlanmış bilgi bulunsa da yaygın olan bazı özellikleri;

- i. Plastik aderensine ve fibroblast benzeri morfolojiye (fibroblastlar daha simetrik morfolojiye sahiptir) sahip olmaları,
- ii. Multipotansiyel ve multi-köken farklılaşma kapasitesi göstermeleri,
- iii. CD73,CD90 ve CD105 gibi tipik yüzey markırlarını eksprese etmeleri,
- iv. CD34, CD14 ve CD45 gibi kökene spesifik olan markırların hücrede yokluğu.

Bilinen ilk mezenşimal kök hücre, kemik iliği stromasından elde edilmiştir. Klinik araştırmalarda en avantajlı mezenşimal kök hücreler de bunlardır. İlerleyen süreçte bu hücreleri farklı dokulardan elde etmeye yönelik bir eğilim olmuştur. [7]

1.4.1. Plasenta Mezenşimal Kök Hücreleri ve Amniyon Mezenşimal Kök Hücreleri

Her iki doku da fetal kökenlidir ve ontogenetik özellik ve erken dönem mezenşimal kök hücre özelliği gösterdiklerine inanılmaktadır. Amniyon kök hücreleri (A-MSK), Oct-4 ve Nanog isimli pluripotensi genlerini eksprese eder, ki bu genlere genelde olgun mezenşimal kök hücrelerde rastlanmamıştır. Yalnızca bir yayında farede amniyon ve kemik iliği kökenli kök hücreler karşılaştırılıp buna uymadığı görülmüştür. [8]

Her iki hücre tipi de osteojenik ve kondrojenik hatlara kolaylıkla dönüşebirse de amniyon mezenşimal kök hücreleri, adipojenik dönüşümde başarısızdır. Amniyon kök hücreleri, mezenşimal kök hücrelerin tüm özelliklerini gösterse de diğer kök hücre hatlarından ayırt edilmeye ihtiyacı vardır. [9]

Plasenta, bir diğer mezenşimal kök hücre kaynağıdır. Gebelik dönemindeki plasentadan elde edilen hücreler mezenşimal kök hücre markıklarını eksprese eder fakat CD34 ve CD49d için pozitifler. Bu iki markır ise Wharton's Jelly kaynaklı mezenşimal kök hücreler [10] dışında, diğer kaynaklardan elde edilen mezenşimal kök hücreler tarafından eksprese edilmemektedir. [7]

1.4.2. Kordon Kanı Mezenşimal Kök Hücreleri ve Umbilikal Kordon Mezenşimal Kök Hücreleri

Periferal kanın, hiç mezenşimal kök hücre taşımadığı veya çok az sayıda taşıdığı konusunda tüm araştırmacılar hemfikirdir. Periferal kandan farklı olarak, umbilikal kordon kanı koleksiyonları, yaklaşık %10-30 oranında bulunan mezenşimal kök hücrelerin plastik kapta kültürünü mümkün kılmaktadır. Kültür kabının önceden fetal buzağı serumu ile kaplanması, verimi artırabilir. Bu da gösterir ki, kriyoprezerve edilmiş örneklerden umbilikal kordon mezenşimal kök hücrelerin kültürü daha zordur. Hücrelerin yüzeye tutunup yayılması 2-4 haftayı almaktadır. Diğer

kaynaklardan elde edilen mezenşimal kök hücrelerin sadece birkaç günde çoğaldığı düşünüldüğünde, bu süre uzundur.

İçinde mezenşimal kök hücre bulunan kordon kanının (az sayıda mezenşimal kök hücre içerse de) diyabet ya da bazı nörolojik hastalığı olanlarda, infüzyondan sonra faydalı etkiler görüldüğü rapor edilmiştir. [11]

1.4.3. Kemik İliği Mezenşimal Kök Hücreleri ve Dental Pulpa Mezenşimal Kök Hücreleri

Kemik iliği kök hücreleri, en uzun süre tartışılan ve klinik çalışmaları halen devam eden kök hücrelerdir. Kemik iliği biyopsisi, ağrılı ve pratik olmayan bir prosedür içerebilmektedir. Ayrıca, bu hücrelerin çoğalma kapasiteleri yaşa göre düşüş gösterme eğilimindedir ve 20 yaş üzerinde olduğunda farklılaşma kapasiteleri önemli derecede azalmaktadır. [7]

Kemik iliği kök hücrelerinin farklılaşma potansiyeli ile ilgili olarak anlaşılması gereken ve birbirini etkileyen iki faktör vardır. Fare kemik iliğinden elde edilen kök hücrelerin adipojenik, kondrojenik ve osteojenik farklılaşmasındaki değişimlerde donör hayvanın yaşı ve hücrelerin pasaj numarasının etkili olduğu gözlenmiştir. Daha genç donörlerden alınan hücreler polistiren kültür kabına daha iyi tutunmuş ve daha yaşlı donörlerden alınanlardan çok daha iyi çoğalmışlardır. Kondrojenik ve osteojenik potansiyel her bir grup içinde giderek azalırken adipojenik potansiyel sadece en yaşlı grupta azalmıştır. Yani, hem yaşı hem pasaj sayısının etkilediği faktörler, kemik iliğinden elde edilen kök hücrelerin farklılaşma potansiyelini etkilemektedir. [11]

Dişlerin oluşumu süresince, epitelyal hücreler ile dental papilla hücreleri; dental pulpa kök hücrelerinin odontoblastlara dönüşümünü desteklemektedir. İlk çalışmalar göstermiştir ki, dental pulpadan elde edilen kök hücreler, kemik hücrelerine ve nöronlara farklılaşma konusunda bir üstünlüğe sahiptir. Dental pulpa kök hücreleri, nestin gibi nöral markırları eksprese etmesi için uyarılmış ve Parkinson,

nörodejeneratif hastalıklar ve omurilik yaralanmalarının tedavisinde klinik öncesi model olarak kullanılmıştır. [7]

1.4.4. Yağ Doku Kökenli Mezenşimal Kök Hücreler

On yılı aşkın bir süredir sadece enerji kaynağı olarak bilinen yağ dokusu, aynı zamanda multipotent kök hücreler yönünden zengin bir kaynaktır. Minimal invaziv bir prosedür ile (liposakşın aspirasyon) subkutan adipöz dokulara ulaşmak mümkündür. Liposakşın işlemi güvenli bir prosedürdür ve kemik iliğinden kök hücre izolasyonu işlemine göre daha ucuz ve daha az invazivdir. Ayrıca, lipoaspirat, medikal atık olarak çıkarılır ve iyi bir (otolog) mezenşimal kök hücre kaynağı ve başlangıç materyali olarak kabul edilir. Bununla birlikte bu hücreleri insandan iğne biyopsisi ile elde etmek mümkün olduğu gibi fare ya da diğer memelilerin kasık bölgesindeki yağ yastıkçıklarından da elde etmek mümkündür. [13]

Adipöz doku, çok sayıda multipotent hücre içerir, ki bu da kök hücre tabanlı tedavilerin önemli bir ön koşuludur. Adipöz dokunun kök hücre ve projenitör hücre elde edilen kısmı, stromal-vasküler fraksiyon (SVF)'dur. Kök hücre ve projenitör hücreler dokudaki tüm hücrelerin genelde yaklaşık %3'lük kısmını oluşturur. Bu oran, kemik iliğindeki kök hücre oranından 2,500 kat fazladır. [14]

Bir kemik iliği transplantında, 1ml'de yaklaşık 6×10^6 tane çekirdekli hücre bulunur. [15] Bunların da sadece % 0,001-0,01 kadarı kök hücredir. [16] Karşılaştırıldığında, subkutan liposakşın aspiratlarından elde edilen SVF hücrelerinin sayısı, 1 gram adipöz doku başına yaklaşık $0,5-2 \times 10^6$ hücre kadardır. [17] Bu sayı, toplam hücre sayısının %1-10'una tekabül etmektedir. Oran, donöre ve doku alınan bölgeye bağlı olarak değişiklik göstermektedir. [18]

1.5. YAĞ DOKUDAN KÖK HÜCRE İZOLASYONU

Histolojik ve elektron mikroskopik çalışmalarla embriyonik ve yetişkin adipoz dokularda adipozit projenitör hücreler tanımlanmıştır. Projenitörler, en erken evrelerinde fibroblastik özellik gösterirler. Endoplazmik retikulum bolca bulunur ve sitoplazmik hacme göre nükleus büyüktür. Gelişim ilerlediğinde stoplazmada küçük lipid vakuelleri ve mitokondrilerinde paranükleer lokalizasyon görülür. Bu görüntü, taşlı yüzeğe benzer, ince bir stoplazmanın çevrelediği tek, büyük bir lipid vakuölü ve merkez dışında bulunan nükleus görüntüsüyle karakterize edilir.

Klasik bir çalışmada Rodbell, ilk defa *in vitro* olarak, sıçan epididimal yağ yastığından, olgun adipozit ve projenitörler izole etmiştir. Bu işlemde, doku küçük fragmentlerine ayrılmış, 37°C'de kollajenaz tip I ile muamele edilmiş ve diferansiyel santrifüj ile hücresel fragmentlerine ayrılmıştır. Süpernatant olgun adipozitleri içerir, yüksek lipid içeriği sebebiyle yüzmektedir. Pellet ise stromal vasküler komponentleri, adipozit projenitör hücreleri ve hematopoetik hücreleri içermektedir. [19]

Van, Roncari, Deslex ve Hauner bu yaklaşımı, insan adipozit projenitörlerini izole etmek için modifiye etmişlerdir. Stromal vasküler komponentleri indüktif faktörler (dekzametazon, triiodotironin, biotin, insülin, pantotenat) varlığında kültür etmişler ve hücrelerin lipid vakuellerini akümüle ettiğini ve lipoprotein lipaz ve gliserol-3-fosfat-dehidrojenaz gibi adipojenik enzimleri eksprese ettiğini görmüşlerdir.

Son yıllarda kozmetik sebeplerle çok sayıda hastadan liposakşın yöntemiyle yağ dokusu alınmakta ve bu dokular yağ doku kökenli kök hücre izolasyonunda başlangıç materyali olarak kullanılmaktadır. Katz ve arkadaşları, kollajenaz muamelesi ve doku yıkama basamaklarında başarıyı artırmak için sıcaklık kontrolü olan, kendine yeten (başka cihaza ihtiyacı olmayan) bir sistem geliştirmişlerdir. Bunun gibi mekanik cihazlar büyük ölçekte izolasyon ve üretimde kalite kontrolü sorunlarını çözmek için avantajlıdır.

Daha ayrıntılı bir izolasyon örneği olarak, sıçandan elde edilen yağ dokudan mezenşimal kök hücre izolasyonunu ele alalım. 2012’de Niyaz ve arkadaşları tarafından yapılmış olan çalışmada, 250-300 g ağırlığında, Wistar albino, erkek sıçanlar kullanılmıştır. Ksilazin ve ketamin ile anestezi altına alınan sıçanlardan, steril koşullar altında, yan yağ doku alınmıştır. Aynı soydan gelen 3 farklı sıçandan 1’er kez yağ dokusu alınmıştır ve alınan dokuların ortalama ağırlığı 0.62 g’dır. Alınan dokular, % 10 FBS (föetal bovin serum) (v/v) ve % 0.4 penisilin-streptomisin (v/v) içeren DMEM/F12 besiyerine alınır ve bir petri kabında 4-5 mm kalınlıkta fragmentlere ayrılır. Bu doku fragmentleri de % 20 FBS (v/v) ve %0.2 (v/v) içeren DMEM/F12 besiyerinde, 6 kuyucuklu kültür plağında, standart kültür koşullarında (% 95 nemli hava, % 5 CO₂ ve 37 °C) inkübe edilir. Besiyeri hergün değiştirilir, böylece mezenşimal kök hücrelerden kaynaklanan çeşitli sitokinlerin olası farklılaştırma etkisinden kaçınılmış olunur. Hücreler, standart tripsinizasyon metoduyla pasajlanır, tripan mavisi ile boyanarak hücre sayısı tespit edilir. Kısaca, besiyeri uzaklaştırılır, hücreler tripsin/EDTA (%0.05/0.02; w/v) ile muamele edilerek hasat edilir. Hücre süspansiyonu bir santrifüj tüpüne alınarak 800 rpm’de 5 dakika santrifüj edilir. Süpernatant dikkatlice uzaklaştırıldıktan sonra hücreler (pellet) % 10 FBS (v/v) ve % 0.2 penisilin-streptomisin (v/v) içeren DMEM/F12 besiyerinde inkübe edilir. Mezenşimal kök hücreler 4 kez pasajlandıktan sonra daha sonraki uygulamalar için dondurulur. Dondurma (kriyoprezervasyon) işlemi için hücreler tripsin/EDTA ile hasat edildikten sonra hemen dondurma besiyerine alınır. Bu solüsyon, % 50 FBS (v/v), % 40 DMEM/F12 (v/v) ve % 10 DMSO (v/v) içerir. Bu süspansiyonlar, kriyotüplere alınır ve -80 °C’ de 48 saat bekletilir. Donan kriyotüpler, uzun süreli depolama amaçlı, -196 °C’deki sıvı azota alınır. Standardizasyon için, üç tane 6 kuyucuklu kültür plağından elde edilen hücreler, 1 kriyotüpe alınır. [19]

Bu çalışmada enzim kullanılmamış ve ilk hücreler 18 saat sonra görülmeye başlanmıştır. 7 gün içinde de hücreler fibroblastik görünüme kavuşmuş ve kültür plağını kaplayacak kadar çoğalmışlardır.

2009'da Francis ve arkadaşları hızlı bir izolasyon metodu (yağ doku kökenli kök hücrelerin izolasyonu için) geliştirmişlerdir. Daha önce uygulanan enzimli yöntemde, lipoaspirat en üst kısmındaki yağ kısmından 200 ml kadar bir parça alınıp eşit hacimde PBS ile 3-4 kez yıkanır, arkasından yarısı kadar hacimde 150 µg/ml konsantrasyonda kollajenaz ve % 1 antibiyotik-antimikotik ile 60 dakika, 37 °C'de 250 rpm hızda karıştırılarak inkübe edilirdi. Kollajenaz, % 10 FBS ile inaktive edilir, bu karışım 1,000 xg'de 10 dakika santrifüj edilir, böylece yağ ve stromal vasküler fraksiyonun birbirinden ayrılması sağlanırdı. Santrifüjden sonra pellet kısmında bulunan SVF, oda sıcaklığında 10 dakika 160 Mm NH₄Cl ile muamele edilir, böylece eritrositlerin parçalanması sağlanırdı. Percoll gradyent uygulanarak da tek çekirdekli hücreler pürifiye edilirdi.[19]

Bu çalışmadaki hızlı izolasyon metoduna göre ise, lipoaspirattaki kanlı/tuzlu fraksiyon, 400xg'de 10 dakika santrifüj edilir, ardından 160 mM NH₄Cl ile 5 dakika muamele edilir ve yine 400xg'de 10 dakika santrifüj yapılır.

Her iki metotta da hücreler, % 40 FBS ve 10 ng/ml EGF (Epidermal Growth Factor) içeren 25 ml DMEM/F12 (antibiyotikli/antimikotikli) besiyeri ile tekrar süspansen edilir ve yapışan/tutunan hücrelerin seçilmesi için gece boyu inkübe edilir. Ertesi gün, arta kalan yüzen hücreler ortamdaki uzaklaştırılır ve PBS ile yıkama yapılır. Elde edilen yağ doku kökenli kök hücreler, düşük glikozlu DMEM, % 10 FBS, % 1 antibiyotik/antimikotik (10 ng/ml EGF eklenerek/eklenmeyerek) içeren besiyerinde standart kültür koşullarında inkübe edilir. [19]

Klasik yöntemde 8-10 saatte hücre edilirken, bu çalışmada anlatılan hızlı metotta 30 dk gibi kısa bir sürede hücre elde edilebilmektedir.

1.6. HÜCRE İMMÜNOFENOTİPİ

In vitro ortamda kültür edilen farklılaşmamış insan yağ doku kökenli kök hücreleri, akış sitometrisi ve immünohistokimyasal metotlarla ayırt edilir.

-Adezyon molekülleri : Yağ doku kökenli kök hücreler, düzenli olarak, tetraspan proteini (CD9), integrinler $\beta 1$ (CD29) ve $\alpha 4$ (CD49d), interselüler adezyon molekülü 1 (ICAM 1; CD54), endoglin (CD105), vasküler hücre adezyon molekülü (VCAM; CD106) ve aktifleşmiş lenfosit hücre adezyon molekülü (ALCAM; CD166)'nü eksprese eder. Bu kök hücrelerin yüzeyinde bulunmayan moleküller ise; integrinler αb (CD11b) ve $\beta 2$ (CD18), interselüler adezyon molekülü 3 (ICAM-3; CD50) ve endotelial selektin (E-selektin; CD62)'dir.

-Reseptör molekülleri : Yağ doku kökenli kök hücreler, hiyaluronat (CD44) ve 13etsin13rin (CD71) reseptörlerini eksprese eder.

-Yüzey enzimleri : Bu hücreler, nötral endopeptidaz (CD10 ya da yaygın akut lenfositik lökemia antijen CALLA), aminopeptidaz (CD13) ve ekto 5'nükleotidaz (CD73) enzimlerini eksprese eder.

-Ekstraselüler matirks proteinleri ve glikoproteinler : Bu hücreler, Tip I ve Tip III kollajenleri, osteopontin, ostenektin, Thy-1 (CD90) ve MUC-18 (CD146)'i üretir.

-İskeletsel proteinler : Yağ doku kökenli kök hücreler, interselüler α SMA (smooth muscle actin) ve vimentin eksprese eder.

-Hematopoetik hücre markırları : Bu hücreler, CD14, CD31 veya CD45 hematopoetik markırlarını eksprese etmezler.

-Komplement düzenleyici proteinler : Bu hücreler, parçalanmayı hızlandırıcı faktör (CD55) ve komplement protektin (CD59) için pozitifdir.

-Doku uyumluluk proteinleri : Sınıf I doku uyumluluk proteini HLA-ABC için pozitif, Sınıf II proteini HLA-DR için negatiftirler.

Bu bilgilerin yanı sıra bazı çelişkiler de mevcuttur. Örneğin, yağ doku kökenli kök hücreleri üzerinde Gronthos ve arkadaşları CD34 ve VCAM (CD106)'a rastlamışken, Zuk ve arkadaşları rastlamamıştır. Ayrıca Zuk ve arkadaşları Stro-1'e rastlamışken de Gronthos ve arkadaşları rastlamamıştır. Bu çelişkilerin sebepleri, hücre izolasyon metotlarındaki farklılıklar, analizden önce hücrelerin kültür edilme süresi, aynı yüzey proteini üzerinde farklı farklı epitoplara tespit eden monoklonal antikorların kullanılması ve immünohistokimyasal ve akış sitometrisi yöntemlerindeki hassasiyet farkı olabilmektedir.

Yağ doku kökenli kök hücrelerin fenotipinin, insan kemik iliğinden elde edilen (mezenşimal kök hücre) ve iskelet kasından elde edilen yetişkin kök hücrelere benzediği rapor edilmiştir. Bununla birlikte farklılıklar vardır: yağ doku kökenli kök hücre NCAM (CD56) ekspres etmezken, kas kökenli yetişkin kök hücre ekspres eder. Aslında, yağ doku kökenli kök hücrelerle kemik iliği kök hücrelerinin protein modellerinin karşılaştırılması henüz tam olarak yapılmamıştır. Bir çalışmada bu iki farklı hücredeki 28 gende bir farklılık gözlememiş olunmasına rağmen bu konuda yapılacak çalışmalara ihtiyaç vardır. [19]

1.7. YAĞ DOKU KÖKENLİ KÖK HÜCRELERİN FARKLILAŞMA POTANSİYELİ ve KULLANIM ALANLARI

Kondrosit-Kıkırdak Onarımı:

İnsan yağ dokusu kökenli kök hücreler ve olgunlaşmış kondrositler, aynı biyokimyasal markırlarla çalışabilmektedir. *In vitro* ortamda, 1-2 haftada, uygun 3-boyutlu matriks üzerinde, ortama TGF- β (transforming growth factor- β), askorbat ve dekzametazon eklenmesiyle yağ doku kökenli kök hücreler kıkırdağın ekstraselüler matriks proteinlerinden olan kollajen tip II, kollajen tip IV ve agrekan salgırlarlar.

Bu olay, kalsiyum aljinat jele 4-10 milyon hücre/ml konsantrasyonunda hücre süspansiyonunun eklenmesi veya 0.25 milyon hücrenin pellet olarak eklenmesiyle gerçekleştirilmiştir. Bununla birlikte monolayer (tek tabakalı) kültür ortamında, kondrojenik kültür koşullarında da kondrositik markırların eksprese edildiği (daha az olmak üzere) görülmüştür. Daha da önemlisi, *in vivo* ortamda (farelerde, 12 haftada) bu hücrelerin aljinat matris (implantasyon) üzerinde kondrojenik fenotipini sürdürdüğü gösterilmiştir.

Miyosit-İskelet Kası Onarımı:

Yağ doku kök hücrelerinin miyosit hücre hattı yolağına doğru farklılaştığını gösteren kanıtlar bulunmaktadır. At serumu varlığında, bu kök hücreler iskelet kası farklılaşmasını düzenleyen miyoD, miyogenin ve transkripsiyon faktörlerini eksprese etmektedir. Gerekli koşullar sağlandığında hücreler birleşir, çok-çekirdekli miyotüpler oluşturur ve miyozin ışık zincir kinaz gibi protein markırlarını eksprese eder.[19]

Osteoblast-Kemik Defekt Onarımı:

Yağ doku kökenli kök hücreler, askorbat, β -gliserofosfat, dekzametazon ve D3 vitamini varlığında osteoblast benzeri hücrelere farklılaşmaktadırlar. *In vitro* ortamda 2-4 haftadan fazla bir sürede, hem insandan hem de sıçandan elde edilen yağ doku kökenli kök hücreler ekstraselüler matrikslerinde kalsiyum fosfat mineralini depo etmektedirler. Ayrıca alkalın fosfataz, kemik morfojenik proteinleri ve bunların reseptörleri, osteokalsin, osteonektin ve osteopontin gibi osteojenik gen ve proteinleri de eksprese ederler. *In vivo*'da immün sistemi yetersiz farelere, yağ doku (insan) kökenli kök hücrelerin gömülü olduğu hidroksiapatit/trikalsiyum fosfat poroz küpler implante edilmiş ve 6 haftada yeni osteoid oluştuğu görülmüştür.

Adipozit-Yumuşak Doku Kozmesisi:

İnsan yağ dokusu kök hücreleri, orijinal farklılaşma yolları olan adipojeneze de dönebilme yeteneğine sahiptir. İndüksiyon için, metilizobütülsantin (bir fosfodiesteraz inhibitörü), hidrokortizon veya dekzametazon (bir glikoz reseptör agonisti), indometasin veya tiazolidindion (bir peroksizom proliferatörü), pantotenat, biotin ve/veya triiodotironinden oluşan bir kokteyl hazırlanır. Yaklaşık 7-10 gün sonra hücrelerin nötral lipid ile dolu vakuoller taşıdığı görülür. Bu da Oil Red veya Nile Red boyama ile tespit edilir.

Düz Kas ve Kardiyak Miyosit:

İnsan yağ doku kök hücrelerinin α -SMA (smooth muscle actin) ekspres ettiği bilindiğinden beri gastrointestinal ve üriner bölgelerde düz kas defektlerinin onarımında değerlendirilmesi yapılmıştır. Garcia-Olmo ve arkadaşları, bir hastanın rektovajinal fistülünün onarımında otolog yağ doku kök hücrelerin kullanıldığını rapor etmişlerdir. Sonuçta fistülün iyi derecede kapandığı bildirilmiştir.

Son zamanlarda hazırlanan bir raporda 5'azasitadine maruz bırakılan yağ doku kökenli kök hücrelerin *in vitro* ortamda kardiyak miyosit farklılaşma yolağına girdiği gösterilmiştir. Yaklaşık 3 hafta sonra spontane olarak çarpmaya (atmaya) başlayan hücrelerin, kültürde kardiyomiyosit spesifik protein ve troponin I ekspres ettiği gözlenmiştir.

Diğer Hatlar ve Fonksiyonlar:

Nöronal-Spinal Kord ve Periferal Sinir Sistemi Hasarı:

Yağ doku kökenli kök hücrelerin nöronal ve/veya oligodendriyositik markırları gösterdiği kanıtlanmıştır. Fare ve insan yağ doku kökenli kök hücreleri, serumsuz ortamda antioksidanlara maruz bırakıldığında, nöronal hücrelere benzeyen bipolar

morfoloji göstermişlerdir. Ayrıca nöronal proteinler olan etsin, orta (intermediate) filament M ve Neu N'i, gliyal fibriler asidik protein (GFAP, oligodendrik farklılaşma ile görülen bir protein) kadar iyi eksprese ettiği görülmüştür. Kök hücrelere indometasin, insülin ve izobütümetilksantin uygulandığında da benzer fenotipler görülmüştür.

Hematopoetik Destek-Hematopoetik Kök Hücre Transplantı ve *in vitro* Yayılımı:

Kemik iliği stromal hücrelerinin hematopoetik kök hücrelerin çoğalmasını ve farklılaşmasını desteklemek için kullandığı yüzey proteinlerinin benzerlerini, insan yağ doku kökenli kök hücreler de eksprese etmektedir. Ek olarak, kemik iliği stromal hücreleri tarafından üretilen sitokinlerin çoğu (M-CSF, GM-CSF, TNF α (tümör nekroz faktörü- α), IL-6, IL-7, IL-8, IL-11 ve kök hücre faktörü) yağ doku kökenli kök hücreler tarafından da salgılanmaktadır. Bu gözlemlere paralel olarak, insan yağ doku kökenli kök hücreler, CD34+ hematopoetik kök hücrelerin *in vitro* ko-kültür sistemlerde (B-hücreleri, T-hücreleri ve miyeloid hatları) farklılaşmasını uyarmaktadır. Bu sonuçlar, insan yağ doku kökenli kök hücrelerinin hematopoetik kök hücre transplantasyonunda uygulanma potansiyeli olduğunu göstermektedir.

Gen Terapisi:

Ekzojen DNA'nın viral vektörler kullanılarak yağ doku kökenli kök hücrelere aktarılması mümkündür. Adenoviral, herpes simplex virüs, lentiviral ve retroviral vektörlerin hepsi, *in vitro* ortamda bu kök hücreleri enfekte edebilmektedir. Katz ve arkadaşları, temel fibroblast büyüme faktörü geninin (Bfgf) bu kök hücrelere aktarımını sağlamışlar ve viral transdüksiyonu takip eden 3 gün içinde Bfgf proteininin sekresyonunun pik yaptığı görülmüştür. En iyi sonuç, lentiviral vektörler ile alınmıştır. Bu sonuçlar, yağ doku kökenli kök hücrelerin gen transferi için hücre taşıyıcılar olarak kullanılabileceğini göstermektedir.

Sonuç olarak gelinen noktada, rejeneratif tıbbın doku onarımı konusunda en önemli sorunlarından biri, güvenilir kök hücre kaynağıdır. İnsan yağ dokusu kökenli kök hücreleri, doku mühendisliği için birçok ihtiyacı karşılayabilecek 'ideal' hücrelerdir.

Bundan sonra yapılacak çalışmalarda bu kök hücrelerin klinik olarak kullanılması gereklidir. Araştırmacılar, bu kök hücrelerin etkinliğini ve güvenliğini hayvan modeller üzerinde, bir biyomateryal iskele ile birlikte veya tek başına, kanıtlayabilirler. Ek olarak, üretim ve kalite güvencesi sorunlarının üzerine eğilmelidirler. Sorunların devam etmesine rağmen, yağ doku kökenli kök hücreler gelecekteki uygulamalar için çok önemlidir.

1.8. NANOFİBERLER, AVANTAJLARI VE UYGULAMA ALANLARI

Otolog doku/hücre transplantasyonu ile doku onarımı, doku rejenerasyonu için en fazla gelecek vaat eden tekniktir. Bununla birlikte, donör dokusunun hasta olabilmesi ve uygunluğu gibi bazı limitasyonları vardır. Allograftlar, otograflara bir alternatiftir. Fakat bunlarda da immün yanıtı sebep olma ve hastalık transfer etme riski bulunmaktadır. Doku mühendisliği, mükemmel bir yaklaşım sunmasının yanında yukarıda bahsedilen yöntemlerin taşıdığı risk ve limitasyonları içermemektedir.

Doku mühendisliği, doku rejenerasyonu için biyoloji, kimya, mühendislik gibi birçok alanı bir arada sunar. Doku mühendisliği yaklaşımları, doku fonksiyonlarını korumak, geliştirmek ya da restore etmek için; biyomateryalleri, hücreleri ve faktörleri tek başlarına veya birlikte kombine ederek kullanır. Strateji genel olarak, hastadan sağlıklı hücrelerin izole edilmesi ve bunun da *in vitro* ortamda çoğaltılması şeklindedir. Çoğalan bu hücreler üç boyutlu skafolda ekilir ve bu skafold zamanla degrade olurken ekilen hücrelerden de yeni bir doku oluşur.

Biyomateryaller, hücrelere tutunma, çoğalma, yeni doku oluşturmaları için sentetik bir çerçeve sağlar. Biyomateryal bazlı üç boyutlu skafold üretimi için pek çok geleneksel metot vardır. Son zamanlarda nanofiber bazlı skafoldlar ortaya çıkmıştır.

Nanofiberlerin geliştirilmesiyle birlikte nano boyutta doğal insan dokusunun taklit edilmesi konusunda aşama kaydedilmiş olmuştur. Nanofiberlerin yüzey alanı/hacim oranı yüksektir. Ayrıca, mikroporoz yapıları, hücrenin adezyonu, proliferasyonu, migrasyonu ve farklılaşması için çok uygundur. Nanofiberler, doku mühendisliği uygulamalarında istenen pek çok özelliği de taşımaktadır. Nanofiberlerle ilgili çalışmalar daha çok, uygulama, karakterizasyon ve üretimleri üzerine yoğunlaşmıştır.

1.9. NANOFİBERLERİN DOKU MÜHENDİSLİĞİNDE UYGULAMALARI

Son on yıl içinde doku mühendisliğindeki potansiyel kullanımları sebebiyle nanofibröz sistemler geliştirilmiştir. (Ma ve Zhang 1999; Li ve ark., 2002; Smith ve Ma 2004; Ma ve ark., 2005). Yüzey alanı ve porozitesinin yüksek olması hücre adezyonunu artırmada avantaj sağlarken, doğal ekstraselüler matrikse benzeyen fiziki yapısı ise hücrelerin büyümesi ve fonksiyonlarını başarıyla yerine getirme konusunda mükemmel bir mikro/nano çevre sağlayarak avantaj sağlar. (Doshi ve Reneker 1995; Stupp ve ark., 1997; Zhang ve Ma 2000). Bu sebeple nanofibröz sistemlerin doku mühendisliği uygulamaları ile ilgili çalışmalar hızla devam etmektedir. [20]

1.9.1. Kemik Doku Mühendisliğinde Nanofiberler

Kemik doku mühendisliği için skafold dizayn edilirken mekanik kuvvet, por boyutu, porozite, sertlik ve üç boyutlu yapı gibi fiziksel özelliklerin kemik dokusuna benzemesi istenir. Por büyüklüğü 100-350 µm ve porozitenin % 90'ın üzerinde olması, kemik rejenerasyonu için tercih edilen özelliklerdir. (Bruder ve Caplan 2000; Hutmacher 2000).

1.9.2. Kıkırdak Doku Mühendisliğinde Nanofiberler

Kondrositlerin elverişsizliği ve projenitör hücrelerin bulunmamasından dolayı, artiküler (eklemsel) kıkırdak dokunun onarımı çok sınırlıdır. Kondrositler, artiküler yüzeyin ekstraselüler matriksinde gömülüdür ve bu da onların hareketliliğini engeller ve hasar onarım prosesine katılımını sınırlar. (McPherson ve Tubo, 2000). Bunun yanı sıra artiküler dokunun avasküler bir doku olması da rejenerasyon kapasitesini sınırlar. Bu problemi çözebilmek için geliştirilen cerrahi tekniklerde de sınırlı bir başarı elde edilmiştir. (Colwell ve ark., 2001). Bu konuda doku mühendisliği yaklaşımları geliştirilmiştir ve bu yaklaşımlardan biri, kondrosit veya projenitör hücrelerle kombine edilmiş üç boyutlu skafoldların kullanımınıdır. (Tuli ve ark., 2003; Li ve ark., 2005).

Li ve arkadaşlarının polikaprolakton nanofiberler ve fetal sığır kondrositleri ile yaptığı çalışmanın sonuçlarına göre, PCL (polikaprolakton) nanofiberler, agrekan, kollajen tip II ve IX, COMP (cartilage oligomeric matrix protein) gibi kıkırdak dokuya özgü ekstraselüler matriks genlerinin ekspresyonunun sürdürülmesi ile kondrositik fenotipin korunduğu gösterilmiştir. (Li ve ark., 2003). Ayrıca kondrositler, polistiren kültür kabı ile karşılaştırıldığında, nanofibröz skafold üzerinde, yuvarlak şekle daha yakın bir morfoloji sergilemişlerdir. [20]

1.9.3. Ligament Doku Mühendisliğinde Nanofiberler

Ligamentler, yoğun bağ doku bantlarından oluşan, eklemlerin hareket ve stabilitesinden sorumlu bantlardır. Ligamentlerin kopması, çevre dokuda geri dönüşümsüz hasarlara neden olur. Doğal yoldan iyileşmez ve geleneksel klinik metotlarla tamamen onarmak da mümkün değildir. (Lin ve ark., 1999; Goulet ve ark., 2000). Son zamanlarda nanofiberleri kapsayan doku mühendisliği metotları bu konuda başarılı olmuştur. (Lin ve ark., 1999). Özellikle düzenli liflerden oluşan nanofiberler, hücre yanıtını olumlu etkilemektedir. [20]

1.9.4. Çizgili-kas Doku Mühendisliğinde Nanofiberler

Yine bu dokunun da onarımının zor olmasının yanı sıra cerrahi müdahaleler yetersiz kalmaktadır. Riboldi ve arkadaşlarının 2005'te yapmış olduğu çalışmada elektrospunlenmiş, bozunur poliestere üretilen mikrofiberler kullanılmıştır. Sonuçlara göre, yeterli mekanik özellik gösterdiği ve hücrelerin adezyon ve farklılaşmasını teşvik ettiği görülmüştür. [20]

1.9.5. Deri Doku Mühendisliğinde Nanofiberler

Deri dokusu, epidermis ve dermis adı verilen iki tabakadan oluşur. Epidermisin rejenerasyon kapasitesi sınırlı iken, dermiste bu yetenek çok daha fazladır. Fakat yaralı dokuda dermisin olmaması, elastikiyet ve kuvvet yönünden eksikliğe sebep olur. Sonuçta, hareket sınırlanır, ağrıya ya da acıya sebep olur ve kozmetik yönden de istenmeyen bir durumdur. Doku mühendisliği metotları ile elde edilen deri dokusu, mükemmel bir alternatif oluşturur. Sadece yarayı kapatmakla kalmaz, aynı zamanda dermis rejenerasyonunu da stimüle eder. Min ve arkadaşları, 2004'te yaptıkları çalışmada elektrospunleme ile elde edilmiş dokunmamış ipek fibroin nanofiberler üreterek başarılı sonuçlar almışlardır. [20]

1.9.6. Damar Doku Mühendisliğinde Nanofiberler

Vasküler graft olarak kullanılan biyomateryalin, damardan akan kan ve komşu dokularla minimum derecede etkileşime girmesi gerekir. Araştırmacılar uzun süredir nano-boyutta bir kan damarı geliştirme konusunda çalışmaktadırlar. [20]

Yapılan bazı çalışmaların sonuçlarına göre, nano boyuttaki fiberler, doğal ekstraselüler matriksi taklit edebilmektedir, mekanik özellikleri sağlamaktadır (insan koroner arteri ile karşılaştırıldığında) ve düz kas hücrelerinin adezyonu ve

proliferasyonu için gerekli yapı ihtiyacını karşılamaktadır. (Mo ve Weber 2004; Mo ve ark., 2004; Xu ve ark., 2004).

1.9.7. Nöral Doku Mühendisliğinde Nanofiberler

Sinir sisteminde, nöronların ya da glial hücrelerin dejenerasyonu veya ekstraselüler matrikste meydana gelen herhangi bir istenmeyen değişiklik, birçok klinik hastalığa neden olabilmektedir. Nöral doku tahribatı, ürkütücü bir sorundur çünkü hemen hemen tüm nöral tahribatlar geri dönüşümsüz fonksiyon kaybı ile sonuçlanmaktadır. (Fine ve ark., 2000). Nöral doku mühendisliği, normal ya da genetik olarak değiştirilmiş hücreler ve skafold dizaynı ve/veya ilaç salınım sistemlerinde kullanılan biyomateryaller gibi biyolojik araçları kullanarak nöral dokuyu onarmayın amaçlar. Yang ve arkadaşları bu amaçla poli(l-laktik asit) bazlı elektrospinlenmiş nanofibröz skafold üzerine çalışma yapmışlardır. Çalışmanın kapsamı, nöral kök hücreler üzerinde nanofibröz skafoldların etkilerinin anlaşılmasıdır. Çalışmanın sonuçlarına göre, rastgele yapılanmış, 150-300 nm boyutlarında lifler içeren nanofiberler, sadece nöral kök hücre adezyonunu desteklemekle kalmamış, aynı zamanda bu hücrelerin farklılaşmasını da teşvik etmiştir. (Yang ve ark., 2004, 2005). [20]

1.10. NANOFİBER ÜRETİM METOTLARI

Lif çaplarının kontrol edilebilmesi, organik-inorganik ve hibrid nanometaryallerin üretilmesi nanofiber üretim teknolojilerine olan ilgiyi artırmıştır. Nanolifler rastgele veya düzenli şekillerde, kabuk-öz, içi boş, gözenekli ve çok kanallı mikrotüp olarak kullanılabilir. Bu çok farklı özelliklere sahip malzemeler, yine çok farklı fiber üretim teknikleri sayesinde üretilmektedir. Hiç şüphesiz ki, bunların arasında en uygunu elektroğirme metodudur. [21]

1.10.1. Moleküler Öztoplanma (Kendiliğinden Kurulma)

Moleküler öztoplanma, doku mühendisliği için skafold üretmek amacıyla ortaya çıkmış faydalı bir yaklaşımdır. (Goldberg ve ark., 2007). Elektrospinlemenin aksine, bu metotta hidrofilik, elektrostatik ve van der Waals bağları gibi kovalent olmayan etkileşimler sayesinde spontane bir proses gerçekleşir. (Philp ve Stoddart, 1996; Hartgerink ve ark., 2001). [20]

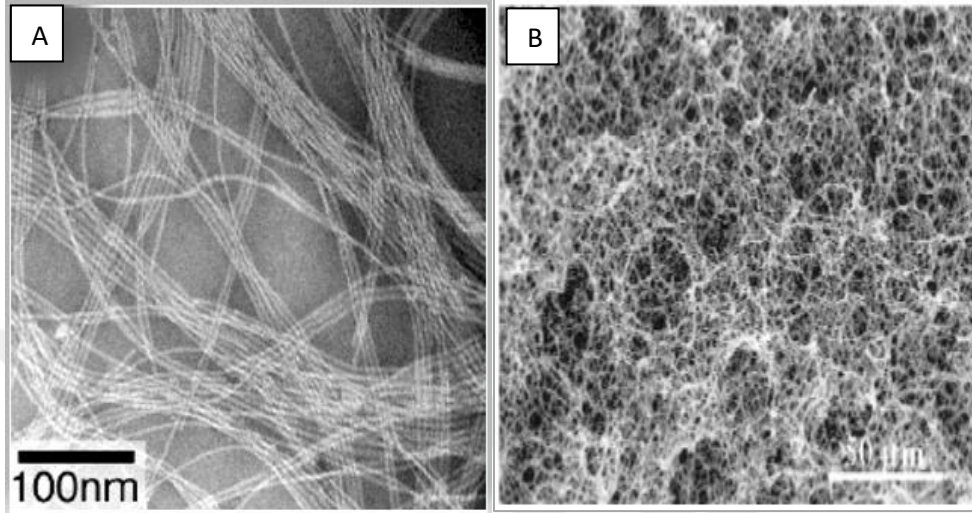
Öztoplanma materyallerinin yapısal özellikleri; kinetikler, moleküler kimya ve kurulum çevresinin (pH, çözücü, ışık, tuz eklenmesi, sıcaklık, vb.) gibi etkenlerin kontrol edilmesiyle ayarlanabilir. Öztoplanmada esas zorluk, spontane şekilde organize olup biyolojik sistemlerin yapısal özelliklerini taklit edebilecek moleküler yapıtaşların dizayn edilmesidir. (Smith ve ark., 2008). Küçük molekülleri, nükleik asitleri ve peptidleri kapsayan küçük yapıtaşları, nanofibröz yapıya kendiliğinden dönüşür. [22]

1.10.2. Faz Seperasyon (Termal İndüklenmiş Faz Seperasyon Metodu)

Bir diğer ilginç nanofibröz skafold üretim yöntemi olan faz seperasyon, fiziksel uyumsuzluktan dolayı fazların seperasyonunu içeren termodinamik bir prosestir. Spesifik olarak, mutlak sıcaklık koşulları altında homojen bir polimer solüsyonu termodinamik olarak stabil-olmayan hale gelir ve ardından polimerce-zengin ve polimerce-zayıf faz oluşur. Solvent uzaklaştırıldığında, polimerce-zengin faz 3-boyutlu yapıya dönüşürken, polimerce-zayıf faz boşluğu oluşturur. Bu proses, tipik olarak 5 ana basamak içerir:

- i. Ham materyalin çözünmesi,
- ii. Jelasyon (pelteleşme),
- iii. Solvent ekstraksiyonu,
- iv. Dondurma,
- v. Kurutma'dır. (Ramakrishna, 2005).

Ayrıca nanofibröz skafoldun porlarının morfolojisi; polimer konsantrasyonu, faz seperasyon sıcaklığı, çözgen/çözgen-olmayan değişimi gibi parametrelerin değiştirilmesiyle ayarlanabilir. (Zhang ve ark., 2012). [22]



Şekil. 1.1. Farklı metotlarla elde edilmiş nanofiberlerin TEM ve SEM görüntüleri. **A)**Moleküler öztoplanma metoduyla elde edilmiş peptid amfifi nanofiberin TEM görüntüsü kaynak: Hartgerink JD, Beniash E, Stupp SI. 2002. Peptide-amphiphile nanofibers: a versatile scaffold for the preparation of self-assembling materials. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99:5133–8. 2002 National Academy of Sciences, USA. **B)**Faz ayrılma metoduyla elde edilmiş PLLA nanofiberin SEM görüntüsü, 500x kaynak: Ma PX, Zhang R. 1998. Synthetic nano-scale fibrous extracellular matrix. J Biomed Mater Res, 46:60–72, 1998.

1.10.3. Elektroçirme

Elektroçirme (elektrospinleme), biyomateryallerin nanofiberlere dönüştürülmesi için oldukça cazip bir tekniktir. Bu teknik, nanofiberlerin kalınlığını, kompozisyonunu ve porozitesini kontrol etme fırsatı sunar. (Doshi ve Reneker 1995; Reneker ve Chun 1996; Dzenis 2004; Jayaraman ve ark., 2004).

Elektroeğirme yöntemi ile elde edilen nanofiberler, yüksek yüzey alanı ve poroziteye sahip olduğu için, istenen hücre etkileşimine izin verir ve bu da onları doku mühendisliği uygulamaları için iyi birer potansiyel malzeme haline getirir. (Li ve ark., 2002; Smith ve Ma 2004; Khil ve ark., 2005; Ma ve ark., 2005).

Elektroeğirme prosesinde, polimerik solüsyona elektrik potansiyel uygulanarak 50 nm-1000 nm (ve daha kalın da olabilir) arasında (Reneker ve Chun 1996; Shin ve ark., 2001; Fridrikh ve ark., 2003), kalınlığa sahip fiberler elde edilir. (Hohman ve ark., 2001, 2001).

Solüsyon, bir kapiler tüpün ucunda, yüzey geriliminin etkisiyle, tutulur. Elektriksel potansiyel uygulanması, polimer solüsyonunun yüklenmesini sağlar. Polimer solüsyonundaki karşılıklı yük repulsiyonu (geri-tepkisi), polimer solüsyonunun yüzey gerilimine zıt bir kuvveti indükler. Elektriksel potansiyeldeki artış, öncelikle, kapiler tüpün ucundaki solüsyonun yarı-küresel yüzeyinin uzamasına ve Taylor konisi denilen konik benzeri şeklin oluşmasına yol açar. (Doshi ve Reneker 1995; Yarin ve ark., 2001).

Elektriksel potansiyeldeki artış devam ettikçe kritik değere ulaşılır ve yüzey gerilimi kuvvetlerinin aşılması Taylor konisinin ucundan çıkan bir jet oluşumuna sebep olur. Yüklü jet, dengesizliklere maruz kalır, uzama ve solvent buharlaşmasından dolayı havada zamanla inceler. (Zeleny 1914; Reneker ve ark., 2000; Shin ve ark., 2001a, 2001b; Frenot ve ark., 2003).

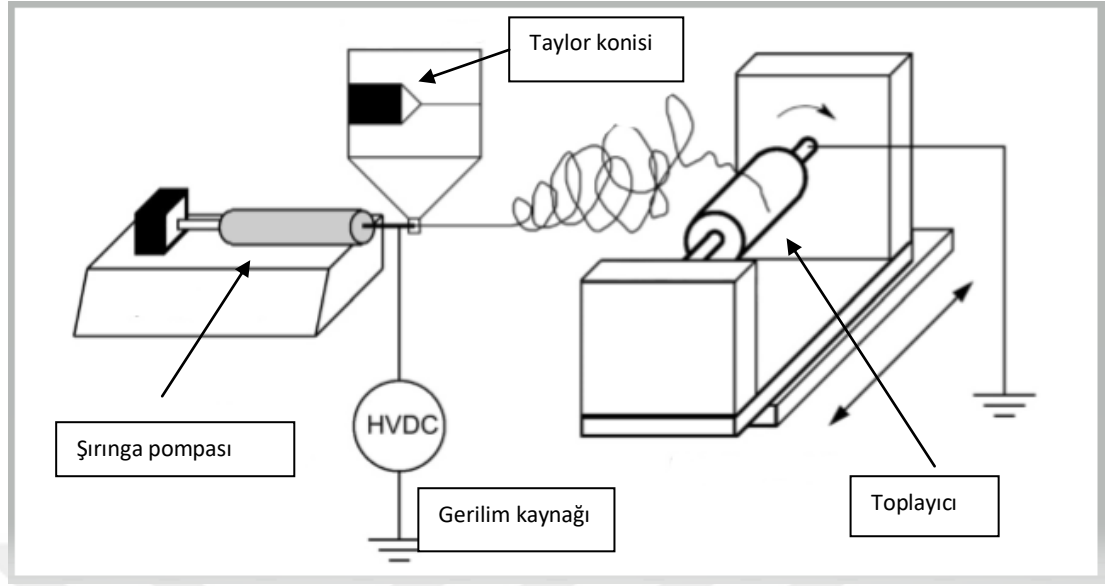
Yüklü jet, durgun ya da dönen metalik toplayıcının zemininde, nanofiber olma yönünde, rastgele yavaş yavaş şekil alır. (Doshi ve Reneker 1995; Kameoka ve Craighead 2003).

Elektroeğirme, “elektrospreyleme”den köken alır. Elektrospreylemede iletken bir sıvıya elektrik yükü verilir ve spreye benzeyen ince partiküllere ayrılan bir jet üretilir. İsmi de bu nedenle “elektrospreyleme”dir. (Rayleigh 1882; Zeleny 1914).

Bununla birlikte, elektrospreyleme prosesi için düşük-moleküler-ağırlıklı bir madde yerine bir polimer kullanıldığında, polimerin uzun zincirli yapısı, jetin partiküllere ayrılmasına olanak sağlamaz. Bunun yerine, jet, dengesizliklere maruz kalır ve nanofiber oluşturmak üzere inceler. Bu nedenle, elektroğirme/elektrospreyleme tekniği ile nanofiber elde edilirken, polimerler (sentetik ya da doğal) kullanılmalıdır. [20]

Elektroğirme prosesi, iki grup parametreden etkilenir: sistem parametreleri ve proses parametreleri. Polimerin moleküler ağırlığı ve ayrışımı gibi sistem parametreleri, nanofiberlerin degradasyon hızını belirler. Polimer solüsyonunun özellikleri (viskozite, yüzey gerilimi ve iletkenlik gibi) gibi sistem parametreleri de nanofiber çapını belirler ve boncuk oluşturma olasılığını azaltır. Orifiz çapı, polimerin akış hızı ve elektriksel potansiyel gibi proses parametreleri fiber çapını etkiler. Kapiler ile metal toplayıcı arasındaki mesafe gibi proses parametreleri, nanofiberlerden solventin buharlaşma derecesini ve toplayıcıdaki birikmeyi belirler. Toplayıcının hareketi de fiber birikimi süresince desen (yapı, şablon) oluşumunu belirler. Farklı polimerik sistemleri değiştiren sistem ve proses parametreleri, her durumda modifiye edilebilir ve spesifik kullanım için nanofiberler uygun hale getirilebilir. (Shin ve ark., 2001b; Zong ve ark., 2002; Fridrikh ve ark., 2003; Katti ve ark., 2004). [20]

Nanofiberlerin yüksek porozite ve yüzey alanına sahip olarak üretilmesi, doğal veya sentetik, birçok polimere uygulanabilmesi, bu tekniği çok yönlü bir teknik haline getirmiştir. Bununla birlikte, fiber kalınlıklarının geniş bir aralıkta meydana gelebilmesi, nanofiberlerin rastgele yönelimi ve fiber ağlarının düşük mekanik özellikte olması, bu tekniğin limitasyonları arasındadır. Yine de genel olarak elektrospinleme tekniği, birçok farklı polimerden nanofiber üretmeye yarayan, güçlü ve basit bir tekniktir. [20]



Şekil 1.2. Elektroğirme yönteminin şematik gösterimi

1.11. PHEMA, ÖZELLİKLERİ ve KULLANIM ALANLARI

2-Hidroksietil metakrilat, birçok uygulaması olan bir monomerdur. Hakkında 1967 yılından beri 1500 yayın yapılmış, yaklaşık 2000 tane de polimeri ile ilgili patent veya yayını mevcuttur. [25]

Bazı faktörler bu monomere gösterilen ilgiyi açıklamaktadır: Bu monomer ticari olarak kolay ulaşılması mümkün bir monomerdur, metil metakrilat veya metakrilik asitten tek adımda hazırlanır. Ayrıca, Kolaylıkla metakrilik türevleri olarak polimerizasyonu yapılabilir. Suda çözünen bu monomer, polimerizasyondan sonra hidrojele dönüşebilir, bu da biyomedikal uygulama alanları açısından çok önemlidir. [25]

Metakrilik türevlerin çokluğu sebebiyle, HEMA, radikal indikatörlerle veya diğer farklı birçok metotla (gama ışını, UV, plazma, vb.) polimerize edilebilir. Monomer pürifiye edildiğinde (bir çapraz bağlayıcı olan EGDMA olmadan), çözünür bir polimer sentezlenebilir. Fakat monomer, düşük oranda bile olsa, EGDMA içeriyorsa, hazırlanan kopolimerler, suda ve diğer birçok solventte şişen jellere dönüşür.

1.11.1. PHEMA'nın Fiziksel Özellikleri

PHEMA'nın biyomedikal alanda birçok uygulama alanı olması nedeniyle, fiziksel özellikleri ile ilgili olarak geniş çapta çalışmalar yapılmıştır.

- i. Difüzyon çalışmaları: PHEMA'nın permeabilitesi, oksijen için, membran olarak kullanımı, diğer makromoleküllere karşılaştırılmıştır. Düşük oralarda EGDMA ile çapraz bağlanan PHEMA hidrojellerin suyu difüzyonu üzerine çalışmalar yapılmıştır. Çapraz bağlanma derecesinin, difüzyon kanunlarının, su ile denge sabiti ölçümlerinin etkileri ile şişen jellerin yapısal çalışmaları üzerine yayınlar bulunmaktadır.
- ii. Mekanik ve viskoelastik özellikler: Çapraz bağlanmış PHEMA kullanılarak elde edilen kompozitler, iyi elastik özelliklere sahiptir. Optik lenslerde kullanım için, sodyum klorür (suda) solüsyonunun PHEMA'nın elastik özelliğine etkisi de araştırılmıştır.
- iii. Viskometrik, termal ve diyalektik özellikler ve NMR karakterizasyonu: PHEMA'nın camsı geçiş sıcaklığı gibi termal özellikleri ile diyalektik özelliği arasında iyi bir korelasyon olduğu rapor edilmiştir. [25]

HEMA ve PHEMA'nın biyomedikal alanda kullanımları;

- i. Histolojik gömme
- ii. Diş hekimliği
- iii. Molekül ve hücrelerin immobilizasyonu
- iv. Enzimlerin immobilizasyonu
- v. İlaçların immobilizasyonu
- vi. İmplantlar
- vii. Optik lensler [25]

1.11.2. PHEMA'nın Biyouyumluluğu ve Kullanımı

PHEMA, mükemmel biyouyumluluğu ve canlı dokulara benzeyen fizyokimyasal özellikleri nedeniyle avantajlı bir polimerdir. Ayrıca, Birleşik Devletler Gıda ve İlaç İdaresi (FDA)'nin klinik uygulamalar için onayını almıştır. Yüksek biyouyumluluğu, toksik olmaması, iyi oksijen geçirgenliğine iyi iletim ve absorpsiyon özellikleri nedeniyle biyomateryaller arasında gelecek vaat etmektedir.

Tutulmuş hücrelere (immobilizasyon ile) karşı dikkate değer bir toleransa sahiptir ve iyi kimyasal ve hidrolit stabilite sergiler. PHEMA'nın intervertebral diskler için çok uygun bir hidrojel materyali olduğu bulunmuştur. Bunun dışında, bir farmakolojik ajan olan bikukulinin *in vitro* salınımında PHEMA kullanılmış ve nöral aktivite çalışmalarında başarı elde edilmiştir. Bir antikanser ilaç olan doksorubisinin PHEMA nanopartiküllerden kontrollü salınımı ile ilgili yapılan çalışma da PHEMA'nın etkin bir ilaç salınım skafoldu olduğunu onaylamıştır.

Bazı araştırmacılar, ilaç salınım aygıtı olarak PHEMA ve PHEMA ko-sodyum metakrilat'tan intravajinal halkalar (ringler) hazırlamışlardır. Ayrıca yapılan birkaç çalışma PHEMA'nın oftalmik uygulamalar için uygun olduğunu göstermiştir.[26]

PHEMA'nın biyouyumluluğu hücre ve doku düzeyinde çalışılmıştır. Hücresel biyouyumluluk mekanizmasını açıklamak için hücreler, PHEMA-kaplı lamalar ya da PHEMA hidrojeller kullanılmıştır. Jel parçaları hayvanlara implante edilerek bu rezinin organizmanın tümünde bir yan etkiye sebep olup olmadığına bakılmıştır.

Öncelikle, PHEMA rezininin hidrofilitésinin hücre kültürü için elverişli ve uygun olduğu düşünülmüştür. PHEMA'ya hücresel yapışma, ilk olarak 1975'te tavuk embriyolarından elde edilen miyoblastların PHEMA ile aşılınmış polisiloksan üzerinde kültür edilmesi ile gösterilmiştir. Hamster böbreğinden alınan hücrelerin de modifiye edilmiş PHEMA üzerinde, polistiren üzerinde olduğundan daha iyi

yayıldığı gösterilmiştir. Burada PHEMA rezinin hidrofilik özelliklerinin avantaj sağladığı düşünülmüştür. Benzer deneyler yenidoğan kordonundan alınan endotelial hücrelerle de yapılmış ve hücrelerin hidrofilik substrata önce yapışması, sonra yayılması ve çoğalması gözlenmiştir. Bununla birlikte, saf ve modifiye-edilmemiş PHEMA'nın memeli hücrelerinin tutunması ve büyümesi için destek sağlayamadığı görülmüştür. [25]



2. MATERYAL ve YÖNTEMLER

2.1. MATERYALLER

Kollajenaz tip II (Gibco, 1737780), Western kromojenik immünoteksiyon sistem (İnvitrogen, 1933084), RIPA tamponu (Boster, BST11B03A05), Proteaz inhibitör kokteyli (Boster, BST10L10A82), Mezenşimal kök hücre özel medyum kiti (Biological Industries, 1610177), Mezenşimal kök hücre ataçman solüsyonu (Biological Industries, 1629575), Tripsin EDTA Solüsyon C (Biological Industries, 1646917), Fötal sığır serumu (Biological Industries, 1624434), Penisilin-Streptomisin solüsyonu (Biological Industries, 1703092), Calcein AM (Life Technologies, 1778260), Propidyum iyodür (Life Technologies, 1702578), CD90 (Abcam, ab226), CD44 (Novus Biologicals, NBP2-22530F), CD146 (Biorbyt, orb243943), CD105 (Abbiotec, 251222), 4-arm PEG (Jenkem Technology, ZZ243P102), Amonyum peroksidisülfat (Merck, K42478301), L-Fenilalanin (Sigma aldrich, MKBT4681V), L-Histidin (Sigma aldrich, MKBQ7783V), L-Aspartik asit (Sigma aldrich, BCBN7700V), 2-(Hidroksietil metakrilat) (Sigma aldrich, STBF6205V), Kalsiyum klorür (Reidel-de Haen, 12022), EDTA (Amresco, 1340C449), Alamar mavisi (İnvitrogen). Hücrelerin sayımı, tripan mavisi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Sitotoksitate testinde MTT ve Alamar mavisi solüsyonlarından yararlanılarak hücre canlılığı tespit edilmiştir. İkili boyamada Calcein AM ve Propidyum İyodür kullanılmıştır. Hücre kültürü çalışmalarının tamamı, kültür kapları ve çoklu kuyucuklu plakalarda (Corning, ABD) gerçekleştirilmiştir.

2.2. METOTLAR:

2.2.1. TAVŞAN YAĞ DOKUSUNDAN KÖK HÜCRE ELDE EDİLMESİ

Tavşanın interskapula bölgesinden yağ doku izole edildi. Alınan doku önce batikona batırıldı, 1 dakika sonra hazır DMEM-F12 (%89 DMEM-F12, %10 Fötal

bovin serum, %1 antibiyotik (Penicilin-streptomisin-amphoterycin) içeren) besiyerine aktarıldı. Ardından %1 ve %5 antibiyotik (Penicilin-streptomisin-amphoterycin) oranları olan PBS içerisinde 1'er kez, 5'er dakika yıkama yapıldıktan sonra dokular 6 kuyucuklu kültür plağına alınarak 1 ml hazır DMEM-F12 içerisinde bistüri yardımıyla fragmentlerine ayrıldı. Daha sonra aşağıdaki protokol uygulandı:

Kollajenazlı Yöntem:

10 ml, 2 mg/ml 'lik kollajenaz (2 mg kollajenaz/1 ml PBS)'a 2 ml 1mg/ml 'lik CaCl₂(suda) eklendi. Bu karışım yıkanan dokuların bir kısmına eklenerek parçalamaya devam edildi ve fragmentlerine ayrılan dokular 1 saat etüvde inkübe edildi. Çorba kıvamına gelen kollajenazlı doku santrifüj tüpüne alınarak üzerine 2'şer ml hazır DMEM-F12 besiyeri eklenerek 3000 rpm de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldı ve kalan pelletin üzerine yeteri kadar hazır MEM-alpha (%20 FBS ve %1 Penisilin-Streptoisin içeren) besiyeri eklenip pipetleme yapıldıktan sonra 25 cm²'lik flasklara ve 6 kuyucuklu kültür plağına ekildi. Flask ve plaklar etüvde inkübasyona bırakıldı. İki günde bir flask ve plakların besiyerleri değiştirildi.. Besiyeri değişiminden sonra besiyerinin hacimce % 1'i kadar da (1mM) L-glutamin eklendi. Flask ve plaklar konfluent hale geldiğinde (yaklaşık bir hafta sonra) pasajlama yapıldı.

2.2.2. KÖK HÜCRE ORANININ FLOW SİTOMETRİ İLE GÖSTERİLMESİ

Vasküler kök hücrelerin bulunduğu 25 cm² lik flaskta bulunan besiyeri (DMEM-F12), laminar hava akışlı kabin içerisinde pipetle aspire edildi. Üzerine PBS (Phosphate Buffer Saline) konuldu. PBS ile yıkama yapıldıktan sonra, flaskta Tripsin EDTA eklendi (1 ml) ve 4 dakika boyu 37 °C, %5 CO₂ li etüvde inkübe edildi. 4 dakika sonra 2 ml besiyeri (DMEM-F12) flaskta eklendi ve hücre süspansiyonu santrifüj tüpüne aktarıldı. Flaskın yüzeyinden ayrılan hücreler, 2500 rpm de 2 dakika süreyle santrifüj edildi. Santrifüjün ardından süpernatant aspire edildi.

Kalan pellet, elle hafifçe tüpe vurma yoluyla dağıtıldı. Üzerine 1 ml besiyeri (DMEM-F12) eklendi. Pipetleme ile hücrenin iyice dağılması sağlandı. Ardından hücrenin bulunduğu süspansiyondan ve Tripan mavisinden 10'ar µl alınarak ependorf tüpe aktarıldı. Yine iyi bir pipetleme yapıldıktan sonra karışımdan 10 µl alınıp sayma lamına pipetle aktarıldı. Hücre sayım cihazında hücre sayma işlemi gerçekleştirildi. Canlı hücre miktarı, $1,1 \times 10^6$ olarak tespit edildi. Sayma işlemi bittikten sonra hücre bulunan tüpe tekrar 2 ml besiyeri (DMEM-F12) eklenerek tekrar 2500 rpm de 2 dakika santrifüj yapıldı. Santrifüjden sonra süpernatant atıldı ve tüpe elle hafifçe vurularak hücre pellet dağıtıldı.

CD90 (FITC işaretli), sadece flow sitometri için kullanıma hazırlanmıştır ve seyreltme işlemi uygulanmaz. Protokole göre 10^6 tane hücre için 10 µl antikor gerekmektedir. Bu sebeple 10 µl CD90 antikor, dağılmış hücre pelletine eklenir ve 20 dakika, oda sıcaklığında, karanlıkta inkübasyona bırakıldı. 20 dakikanın sonunda flow sitometri cihazında 488 nm de (FITC için) okuma yapıldı.

2.2.3. HÜCRELERİN İMMÜNOSİTOKİMYASAL METOT ile BOYANMASI

Önceden steril edilmiş olan lameller, 6 kuyucuklu kültür kabına pens yardımıyla yerleştirildi. Her bir lamelin üzerinde 20×10^3 hücre olacak şekilde hücre ekimi yapıldı. Hücrelerin iyice tutunup çoğalması için iki gün beklendi.

Bundan sonra fiksasyon aşamasına geçildi. Kuyucuklardaki besiyeri aspire edildi ve oda sıcaklığındaki PBS ile yıkama yapıldı. Daha sonra lameller % 4 paraformaldehit (PBS içerisinde) solüsyonunda oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi. Son olarak PBS ile 2 dakika yıkama yapılarak fiksatiflerden arındırılan lameller, fikse edilmiş oldu.

Permeabilizasyon işlemi için; kuyucuklara %0,3 PBST (PBS içerisinde Triton-x) 100 'er µl damlatıldı ve 15 dakika inkübe edildi. 3 kez 5'er dakika PBS ile yıkama yapıldı. Kuyucuklara 100 'er µl protein bloklama solüsyonu eklendi ve 15 dakika beklendi. Negatif kontrol yapılan kuyucuklar hariç diğer tüm kuyucuklara yıkama

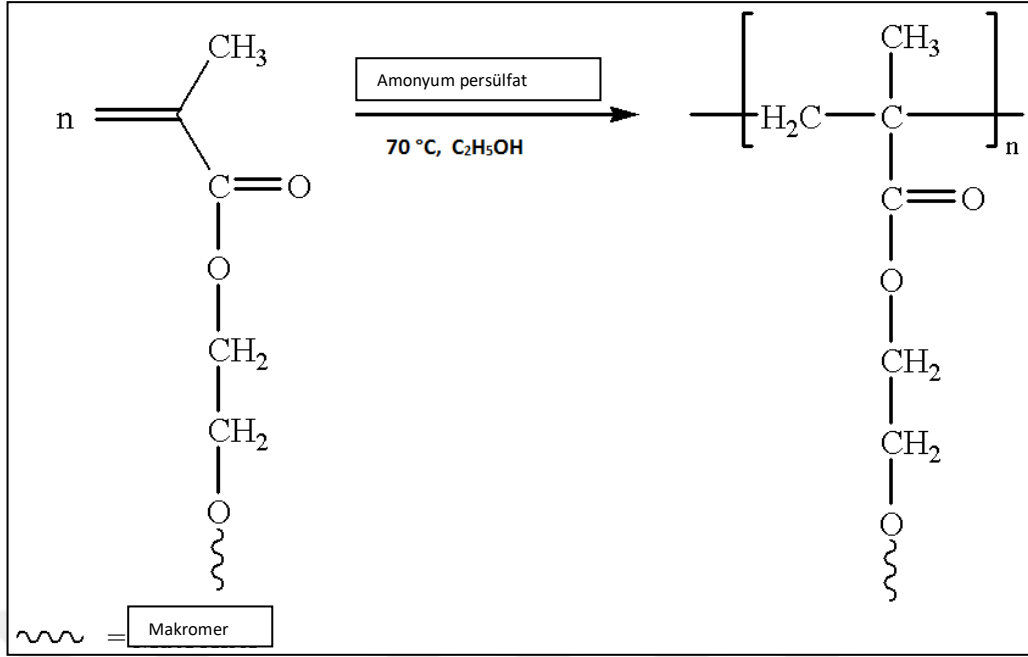
yapılmadan, seyreltilen primer antikorlardan (CD44 1:100), (CD105 1:100) 200'er µl eklendi. 1 saat inkübasyondan sonra 3 kez 5'er dakika PBS ile yıkama yapıldı. Yıkamanın ardından solüsyon aspire edildi ve negatif kontrol de dahil tüm kuyucuklara 100'er µl sekonder antikor eklenerek 30 dakika inkübasyon yapıldı. Sekonder antikor pipetle atılarak 2 kez 5'er dakika PBS ile yıkama yapıldı. Kuyucuklara 100 'er µl HRP- Streptavidin eklendi ve 20 dk beklendi. 20 dk sonra 2 kez 5 'er dk arayla PBS ile yıkama yapıldı. PBS pipetle atıldı. 150'şer µl AEC Kromojen (Thermo AEC kullanıma hazır solüsyon) kuyucuklara eklendi. Boyanma görülene kadar beklendi.

Boyanma görüldükten sonra PBS ile 2 kez 5 'er dk arayla yıkama yapıldı ve solüsyon aspire edildi. Ardından her bir kuyucuğa 200'er µl Gill's hematoksilen eklenip 2 dakika beklendi. Sonra da PBS ile 5 kez yıkama yapıldı. Lamellerin 200'er µl PBS eklenip ve ışık mikroskobunda fotoğraf çekildi.

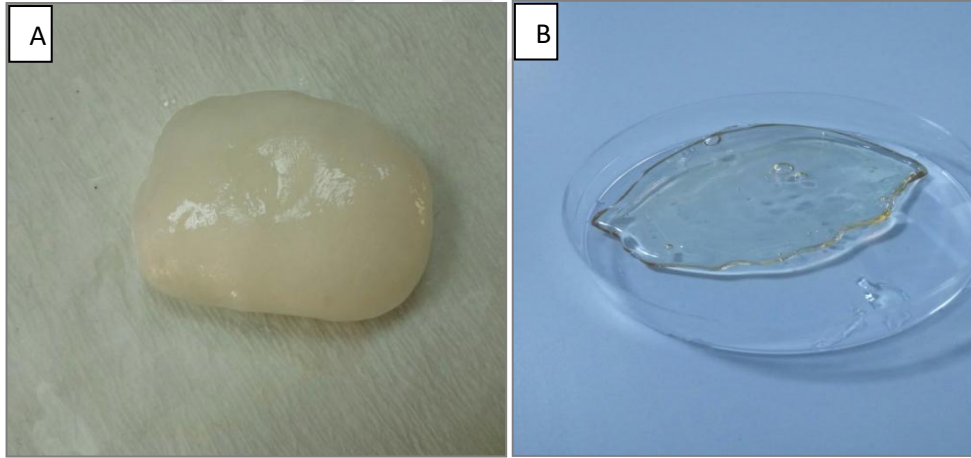
2.2.4. ELEKTROEĞİRME İLE NANOFİBER ELDESİ

2.2.4.1. HEMA'nın Polimerizasyonu

İlk yapılan işlem, HEMA'nın ısı polimerizasyonu ile PoliHEMA elde etmektir. Bunun için polimerizasyon başlatıcı olarak 0,12 gr Amonyum persülfat tartılıp balonjojenin içine konuldu. Üzerine % 66'lık, 90 ml etanol çözeltisi (suda) eklendi. Manyetik karıştırıcı yardımıyla iyice çözünmesi beklendi. Çözünmenin ardından 12 ml HEMA karışıma ilave edildi. Balon, daha önceden 70 °C 'ye kadar ısıtılmış su banyosunun içerisine yerleştirilerek geri soğutucu yardımıyla polimerizasyon işlemi başlatıldı. Üç saat sonra polimerizasyon tamamlanmış oldu ve elde edilen polimer yaklaşık 2 L distile su içinde çöktürüldü. Elde edilen katı polimer kurutmak amacıyla liyofilizatörde 6,11 bar ve -60 °C 'de liyofilize edildi.



Şekil 2.1. HEMA'nın ısı polimerizasyon reaksiyonu

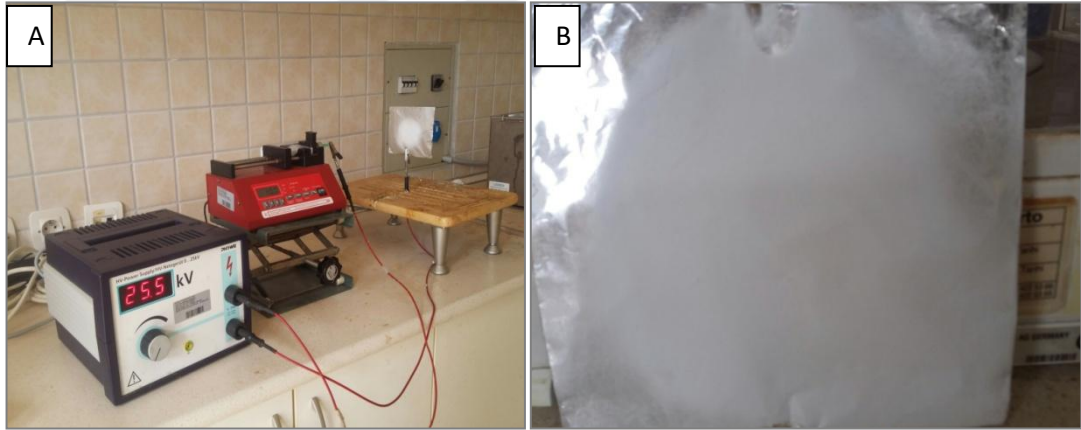


Şekil 2.2. HEMA'nın polimerizasyon sonrası hali ve liyofilize edilmiş hali. HEMA monomerinin polimerizasyonunun ardından distile suda çöktürme işlemi yapıldıktan sonra elde edilen polimer (Poli-HEMA) (A) ve bu polimerin kurutulmuş hali (B)

2.2.4.2. Elektroeğirme ile PHEMA Nanofiber Elde Edilmesi

Elektroeğirme işlemi için, önce aminoasitli PoliHEMA çözeltisi hazırlandı. Bunun için, 1'er mg Fenilalanin Aspartik asit, ve L-Histidin aminoasitleri tartılıp 10 ml ultra saf suda çözdürüldü. Çözeltinin üzerine 7 ml daha ultra saf su eklendi. Bu 17 ml aminoasit çözeltisinin üzerine 33 ml saf etanol eklendi. Böylece 50 ml %66'lık etanol (suda)'de aminoasitlerin çözeltisi elde edilmiş olur. Bu çözeltiden ve formik asitten 1:1 oranında, 5 ml karışım hazırlandı. Üzerine liyofilize edilerek kurutulmuş ve havanda dövülerek toz haline getirilmiş olan PoliHEMA'dan 1,75 gr tartılıp beherdeki çözeltiliye eklendi. Yaklaşık 24 saat sonra aminoasitli PoliHEMA çözeltisi elektrospining yapılmak üzere hazır hale gelmiş olur.

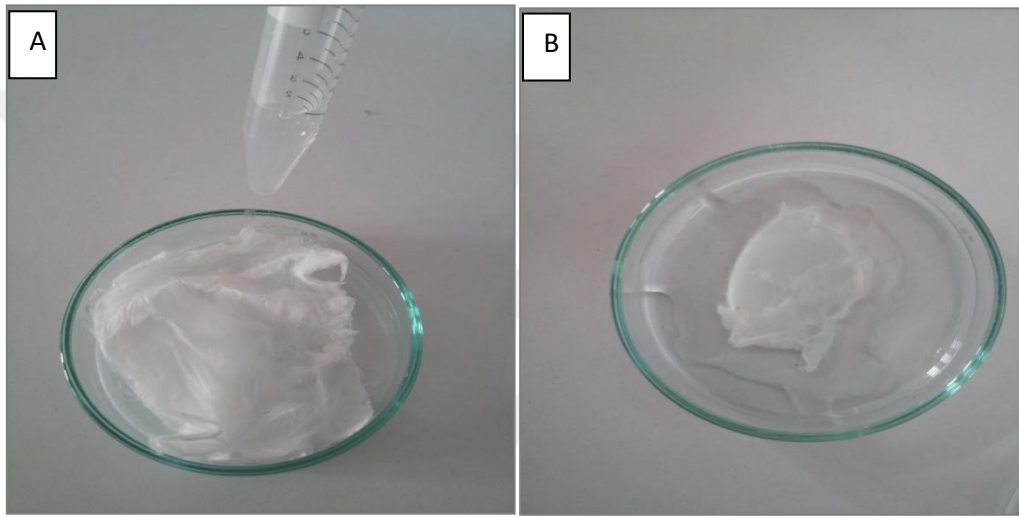
Oluşan çözelti elektroeğirme sistemindeki şırınga pompasına aktarıldı. Kaare şeklinde, alüminyum levhaya 15 cm mesafede ve akış hızı 10 μ l/dk olacak şekilde ayarlanarak 25,5 kV da elektroeğirme işlemi gerçekleştirildi ve nanofiber elde edildi.



Şekil 2.3. Elektroeğirme cihazı ve kullanılan metal toplayıcı. Elektroeğirme işlemi (A) ve işlem sonucu alüminyum levha üzerinde elde edilen poli-HEMA nanofiber (B)

2.2.4.3. Nanofiberlerin 4S-PEG ile Çapraz Bağlanması

Öncelikle 0,1 mg/ml konsantrasyonda 4-S PEG çözeltisi (PBS içerisinde) hazırlandı. Daha sonra ilk aşamada elde edilen nanofiber, alüminyum levhadan ince bir spatül yardımıyla sıyrılarak alındı. Çözelti petri kabına alındı ve nanofiber de çözeltinin içine doğru, büzüşmemesi sağlanacak şekilde bırakıldı. Nanofiber bu çözeltide bir gece bekletildikten sonra çözültiden alınıp distile suda 3 kez, 30'ar dakika yıkandı.



Şekil 2.4. Nanofiberin üzerine çapraz bağlayıcı solüsyonun eklenmesi.

2.2.5. ELDE EDİLEN NANOFİBERLERİN SEM GÖRÜNTÜLERİ

Çapraz-bağlı nanofiberler üzerinde kültür edilmiş olan mezenşimal kök hücreler rutin taramalı elektron mikroskop için hazırlandı. %2,5 glutaraldehit ile fiske edilen örnekler altına kaplama yapılarak taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile kök hücrelerin morfolojik yapıları ve nanofiber yüzeyine tutunup tutunmadıkları incelendi. Taramalı Elektron Mikroskopta farklı büyütmelerde nanofiberlerin yüzeyi ve genel olarak morfolojik yapıları incelendi. Farklı büyütmelerde nanofiber yüzeyine tutunmuş olan hücreler görüntülendi.

2.2.6. NANOFİBERLER ÜZERİNE HÜCRE EKİMİ

4S-PEG solüsyonu ile çapraz bağlanan ve distile su ile yıkanan ve kuruması beklenen nanofiberler, kullanılacak kültür plağındaki kuyucukların büyüklüğüne göre bistüri yardımıyla kesilip ayrıldı. Ardından önce ön yüzü, daha sonra arka yüzü (bir enjektör yardımıyla tersi çevrilerek) UV altında 30 dakika bekletilmek suretiyle steril edildi. Daha sonra, üreticinin protokolüne göre PBS ile seyreltilen kök hücreler için özel ataçman solüsyonu, her bir kuyucuğa gerekli miktarda (üreticinin önerdiği miktarlarda) eklendi ve 37° C' de inkübatörde inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında nanofiberler üçer kez PBS ile yıkandı. Bu aşamadan sonra ekim için hazır olan nanofiberlerin üzerine her deney için yeterli miktarda hücre ekildi. Bunun için; Tripsin EDTA-C solüsyonu ile kaldırılan hücreler, santrifüjden sonra hücre sayım cihazı ile sayıldı. Sayılan hücreler üzerinden hesaplama yapıp 30'ar µl fetal bovin serum içerisinde ekim yapıldı. Yaklaşık 1 saat kadar hücrelerin tutunması beklendikten sonra hücrelerin üzerine %10 özel serum, %1 Penisilin-Streptomisin içeren kök hücreler için özel besiyeri eklendi. 37°C'de, % 5 CO₂ içeren inkübatörde inkübe edildi.

2.2.7. ALAMAR MAVİSİ TESTİ

96 kuyucuklu kültür plağına 4S-PEG solüsyonu ile çapraz bağlanmış olan PHEMA nanofiber yerleştirildi. Ardından nanofiberlerin üzerine DMEM-F12 (%89 DMEM + %10 FBS+ %1 Penicillin-Streptomisin) hazırlanmış besiyeri ile her bir nanofiber üzerine 8×10^3 kök hücre gelecek şekilde ekim yapıldı. Ertesi gün kuyucuklardaki besiyeri aspire edildi ve her bir kuyucuğa 90'ar µl fenol redsiz DMEM konuldu. Üzerlerine 10'ar µl Alamar mavisi solüsyonu eklendi. Yaklaşık 24 saat CO₂'li etüvde, 37 °C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından 570 nm ve 600 nm'de ELISA (plak) okuyucuda okutma yapıldı.

2.2.8. MTT TESTİ

48 kuyucuklu kültür plağına 4S-PEG solüsyonu ile çapraz bağlanmış olan PHEMA nanofiber yerleştirilir. Ardından nanofiberlerin üzerine DMEM-F12 (%89 DMEM + %10 Fötal sığır serumu + %1 Penicillin-Streptomycin) hazırlanmış besiyeri ile her bir nanofiber üzerine 8×10^3 kök hücre gelecek şekilde ekim yapıldı. Ertesi gün kuyucuklardaki besiyeri aspire edildi ve her bir kuyucuğa 50'şer μ l fenol red'siz DMEM konuldu. Üzerine 50'şer μ l MTT solüsyonundan (5mg/ml) eklendi. Yaklaşık 1 saat %5 CO₂'li etüvde, 37 °C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından MTT solüsyonu çekilmeden her bir kuyucuğa 100' er μ l izopropanol eklendi ve 570 nm ve 590 nm'de ELISA okuyucuda okutma yapıldı.

2.2.9. WESTERN BLOT İLE PROTEİN BANTLARININ GÖRÜNTÜLENMESİ

2.2.9.1. Hücre Örneklerinden Protein İzolasyonu

Hücreler nanofiber ile muamele edilerek ve 1 ve 3 gün inkübe edildi. Sonrasında bu günlerde mekanik kazıyıcı ile hücreler kaldırıldı, santrifüj edildi. Süpernatant aspire edildikten sonra 1 kez PBS ile yıkama yapıldı. Ardından protein izolasyonu için hazırlanan karışım (100:1 oranında RIPA buffer: Proteaz inhibitör kokteyl) örneklerin her birine ilave edildi. 10 dakika vorteks yapıldıktan sonra -20 C'de 1 saat bekletildi. Sürenin sonunda çözdürülen süspansiyon, 11000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatant (protein içeren kısım), ependorfa alındı. Nanodrop cihazında protein konsantrasyonu mg/ml cinsinden ölçüldü ve deney günü kullanılmak üzere, ependorflar -20 °C'de muhafaza edildi.

Çizelge 2.1. Numunelerden elde edilen protein konsantrasyonları

1. gün	Kontrol (1.gün)	3. gün	Kontrol (3. Gün)
12,675 mg/ml	10,742 mg/ml	11,388 mg/ml	10,4345 mg/ml

Western blot deneyi, ticari kit (Tavşan Primer Antikorları İçin Novex WesternBreeze Kromojenik İmmunodeteksiyon Sistem) kullanılarak yapıldı. Üreticinin protokülüne göre, jele yüklenecek örnekler hazırlanarak toplamda her kuyucuk için 20'şer µl örnek elde edildi.

2.2.9.2. Surelock XCELL Dikey Jel Sisteminde Yürütme İşlemi

- Buffer core'u dikey jel sistemi tankı içerisine yerleştirildi.
- %4-12'lik Bis-Tris Gradient jeli plastik ambalajından çıkarıldı.
- Jel kaseti üzerinde yer alan beyaz bant sökölüp, jel kuyucuklarını bozmadan jel tarağı dikkatlice yerinden çıkartıldı.
- Jel kuyucukları içinde kalan fazla sıvıyı uzaklaştırmak için jel alt tarafından tutulup kurutma kağıdı üzerine silindi.
- Jel kasetinin alçak kısmı Buffer Core'a bakacak şekilde dikey jel sistemi tankın içerisine yerleştirildi. Diğer tarafa jel kasetinin alçak kısmı Buffer Core'a bakacak şekilde yerleştirildi ve Buffer dam'ı yerleştirildi.
- Jel sıkıştırma aparatı dikey jel tankı içerisine yerleştirilip jel sıkıştırıldı.
- Mezür içerisine 20x MES yürütme tamponu, distile du ile dilue edildi.
- Hazırlanan yürütme tamponu ile ilk önce buffer core içinde kalan üst buffer odası jel kuyucuklarının üzerini yaklaşık 0,5 cm geçene kadar dolduruldu. Kalan buffer, alt tampon odasına ilave edildi. İki jel arasında kalan kısma 500 µl antioksidan eklendi.
- Örnekler yüklenmeden önce 100 µl'lik pipetle kuyucuklar, pipetleme işlemi yapılarak temizlendi.
- Jel kasetinde yer alan ilk kuyucuğa 5 µl ladder yüklendi.

- Kalan kuyucuklara hazırladığımız protein örneklerinden 20'şer µl protein örneği yüklendi.
- Dikey jel sisteminin kapağı kapatıldı ve elektrot kabloları renk kodlarına göre güç kaynağına bağlandı.
- MES buffer (20x) için 150 volt'ta yaklaşık 1 saat jel yürütüldü.
- Yürütme işlemi sonrasında güç kaynağı kapatıldı ve dikey jel sisteminin elektrot kabloları güç kaynağından çıkarıldı.
- Jel kaseti jel spatül yardımıyla kenar bağlantıları koparılarak açıldı.
- Jel, içerisinde distile su bulunan temiz bir kap içerisine alındı.

2.2.9.3. Iblot Dry Blotting Sistem ile Blotlama

- Cihaz fişi elektrik prizine takıldı ve cihazın arka tarafında bulunan güç anahtarı açıldı.
- Iblot transfer stack PVDF kitinde yer alan Anot stack plastiği ile birlikte cihaza yerleştirildi.
- Distile su içerisinde yer alan jel dikkatli ve düzgün bir şekilde PVDF membran içeren Anot stack üzerine yerleştirildi.
- Kit içerisinde yer alan filtre kağıdı distile su ile ıslatıldı.
- Ardından kit içeride yer alan Katot stack plastiğinden çıkarıldı ve bakır yüzey yukarı, jelimsi yüzey ıslak filtre kağıdına bakacak şekilde filtre kağıdının üzerine dikkatlice yerleştirildi. Roller kullanılarak hava kabarcıkları uzaklaştırıldı.
- Kitte yer alan sünger, Iblot cihaz kapağının sağ tarafında yer alan elektroda denk gelecek şekilde kapağa yerleştirildi. Kapak kapatılarak cihaz 7 dakikalık süreye ayarlandı.
- Program bitiminde jelin kenarlarındaki boş kısımlar kesildi ve bloklama işlemine geçildi.



Şekil 2.5. Iblot cihazı yardımıyla jel görüntüsünün membrana aktarılması.

2.2.9.4. Bloklama İşlemi

20 ml (14 ml ultra saf su + 4 ml Diluent A + 2 ml Diluent B) bloklama solüsyonu hazırlandı. Membran 1 saat çalkalayıcıda inkübe edildi. Ardından membran deiyonize su ile 2'şer dakika, üç defa yıkandı. Daha sonra primer antikor ekleme aşamasına geçildi.

2.2.9.5. Primer Antikorum Eklenmesi

CD 105 ve CD146 antikorumu 1:200 oranlarında dilüe etmek için, (2x2=4 ml ultra saf su + 5x2=10 ml Diluent A + 3x2=6 ml Diluent B) solüsyon hazırlandı. Bu solüsyonlarda antikorlar dilüe edildi. Bu antikor içeren solüsyonların içerisinde 10'ar ml alınarak membran üzerine ilave edildi. Ardından 1 gece (yaklaşık 16 saat), karanlıkta +4°C 'de inkubasyona bırakıldı. Yıkama solüsyonu (45 ml ultra saf su + 3 ml antikor yıkama solüsyonu) ile 5'er dakika 3 kez yıkama yapıldı. Yıkamanın ardından 2'şer dakika, 3 defa 20 ml ultra saf su ile yıkama yapıldı. Daha sonra sekonder antikor ekleme aşamasına geçildi.

2.2.9.6. Sekonder Antikor Eklenmesi

Membranların üzerine 15'er ml sekonder antikor ilave edildi ve 30 dakika çalkalayıcı üzerinde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından yıkama solüsyonu (45 ml ultra saf su + 3 ml Antikor yıkama solüsyonu) ile 5'er dakika, 3'er kez yıkama yapıldı. Yıkamanın ardından 2'şer dakika, 2 defa 20 ml ultra saf su ile yıkama yapıldı. Ardından kromojen uygulamasına geçildi.

2.2.9.7. Kromojen Uygulaması ve Görüntüleme

Membranların üzerine 5'er ml kromojenik substrat uygulandı ve 1 saat çalkalayıcı üzerinde bekletildi. Daha sonra 20'şer ml ultra distile su ile 2'şer dakika, 2 defa yıkama yapıldı. Son yıkama tamamlandıktan sonra kurutma kağıdı üzerinde membranları görüntüleme işlemi gerçekleştirilmiştir

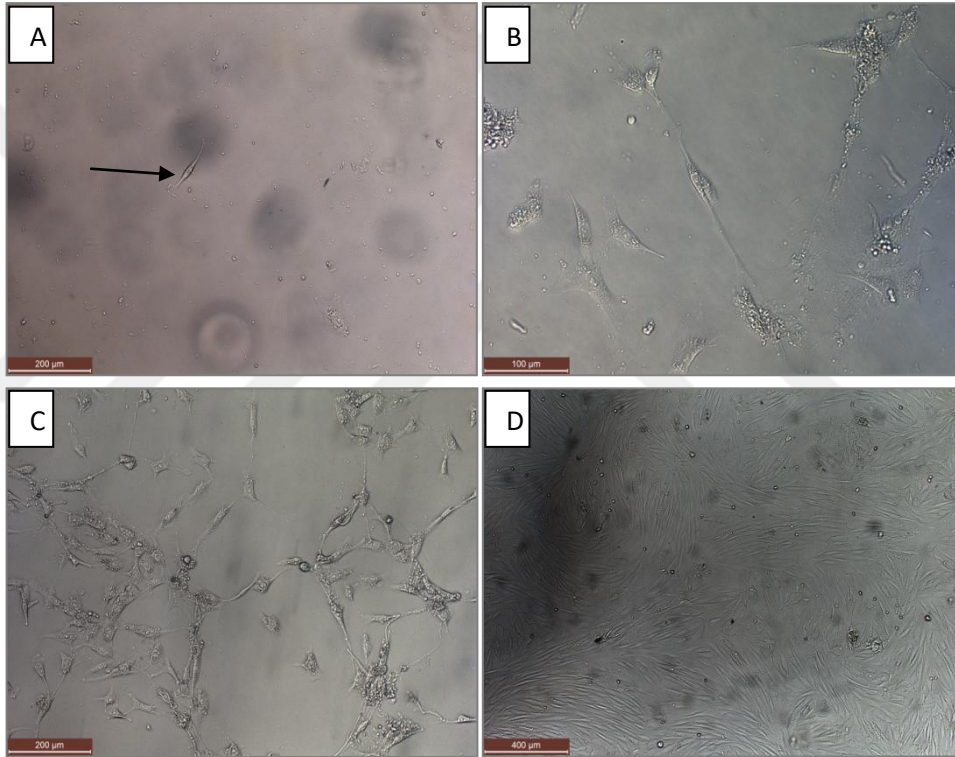
2.2.10. CALCEIN AM ile CANLILIĞIN GÖSTERİLMESİ

96 kuyucuklu kültür plağına nanofiberler yerleştirilip UV altında steril edildikten sonra her bir nanofiberin üzerinde yaklaşık 10^4 hücre olacak şekilde ekim yapıldı. Kontrol grupları için ise, nanofiber kullanmadan aynı şekilde hücre ekimi yapıldı. Ekimin 1., 3. ve 5. günlerinde kontrol grupları ve nanofiberler üzerinde ekili kuyucuklarda şu işlem yapıldı: Önce kuyucuklardaki besiyeri aspire edildi ve bir kere PBS ile yıkama yapıldı. Ardından daha önce hazırlanmış olan, Calcein AM ve propidyum iyodür içeren ikili boyama solüsyonu (PBS içerisinde $3 \mu\text{M}$ Calcein AM ile $3 \mu\text{M}$ propidyum iyodür) kuyucuklara eklenip 15 dakika, 37°C , % 5 CO_2 'li inkübatörde inkübe edildi. İnkübasyondan sonra floresan ataçmanlı mikroskopta kuyucukların görüntüsü incelendi.

3. BULGULAR

3.1. YAĞ DOKUDAN MEZENŞİMAL KÖK HÜCRE ELDE EDİLMESİ

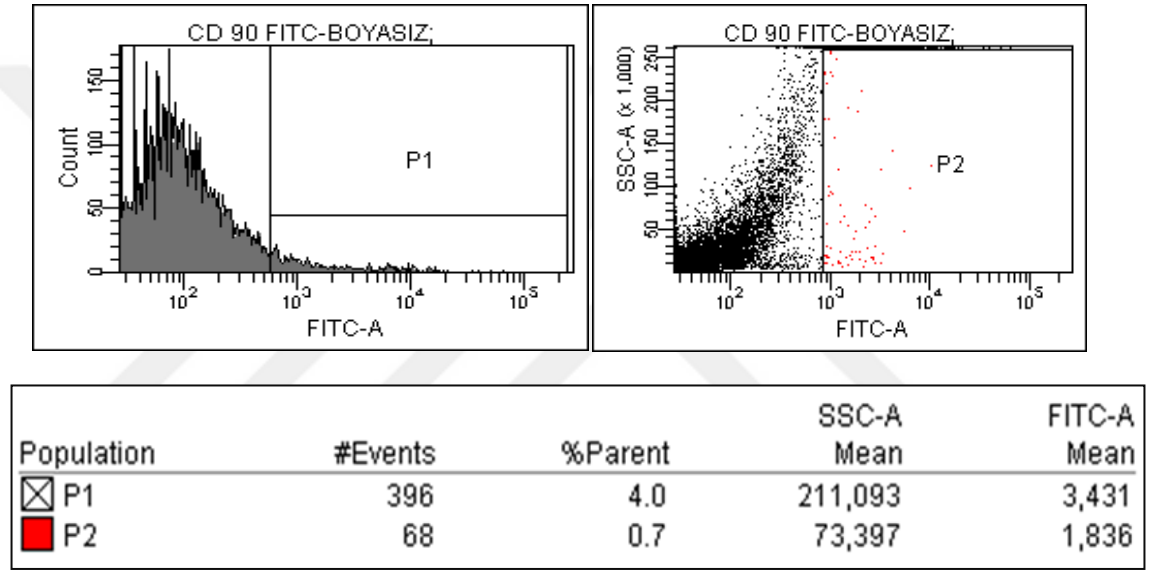
İzolasyonun 4. gününden itibaren, hücre görülmeye başlanmıştır. Daha sonra 2 günde bir besiyerleri değiştirilmiş ve yaklaşık 10 günde 25 cm²'lik flaskın konfluent hale geldiği gözlenmiştir. Ortaya çıkan ilk hücre, Şekil 3.1.A'da ok işareti ile gösterilmiştir. Farklı büyütmelerde çekilen fotoğraflarda, hücrelerin fibroblast benzeri bir morfolojiye sahip oldukları görülmektedir.



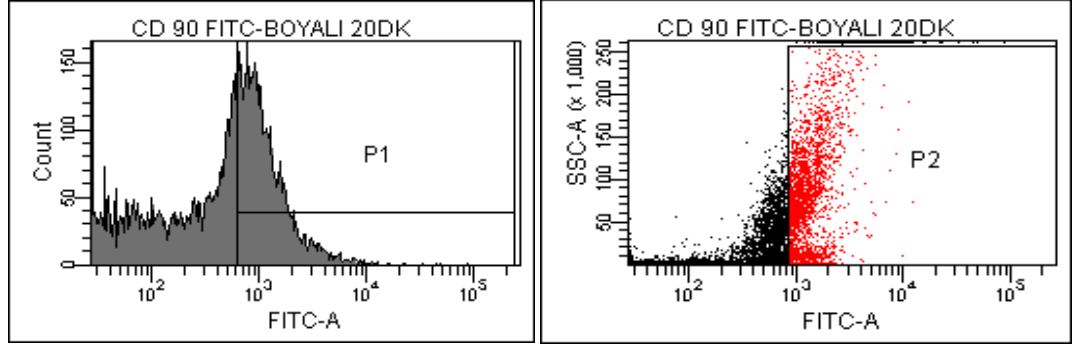
Şekil 3.1. İzole edilen mezenşimal kök hücrelerin ışık mikroskopunda görüntüleri. Elde edilen kök hücrelerin ilk ortaya çıkması ve çoğalarak konfluent hale gelmesi. A) Kök hücre, ok işareti ile gösterilmiştir (10x), B) 20x, C)10x ve D)5x büyütme ile çekilmiştir.

3.2. MEZENŞİMAL KÖK HÜCRE ORANININ FLOW SİTOMETRİ ile GÖSTERİLMESİ

Mezenşimal kök hücre oranını göstermek amacıyla, flow sitometri yöntemi ile CD90 antikor kullanılmış ve Şekil 3.2 ve Şekil 3.3'te nokta alan grafiği ile sonuçlar gösterilmiştir. Bu sonuçlara göre, tavşan yağ dokusundan primer kültür ile elde edilen tüm hücre popülasyonunda, yaklaşık % 36,6 oranında mezenşimal kök hücre bulunduğu tespit edilmiştir.



Şekil 3.2. Antikor (CD90) eklenmemiş, işaretli olmayan hücrelerin flow sitometri sonuçları

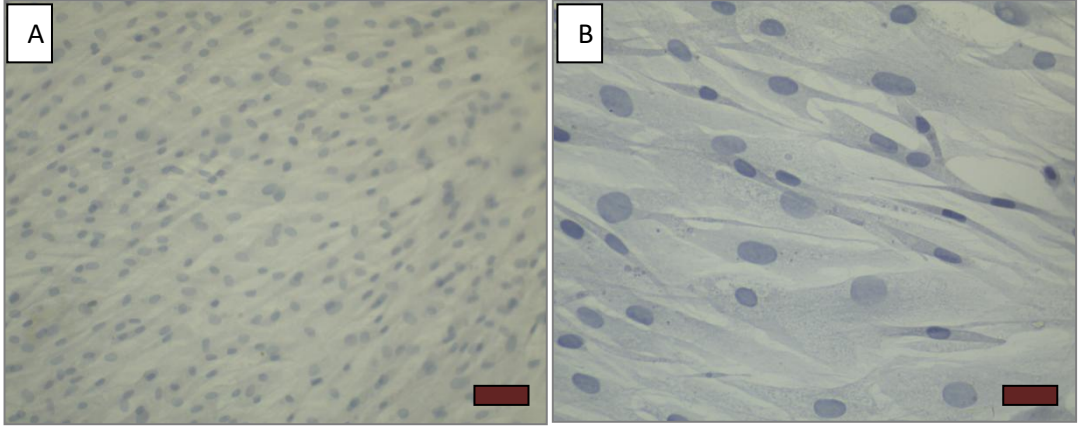


Population	#Events	%Parent	SSC-A Mean	FITC-A Mean
☒ P1	3,661	36.6	69,002	1,404
■ P2	2,331	23.3	71,434	1,525

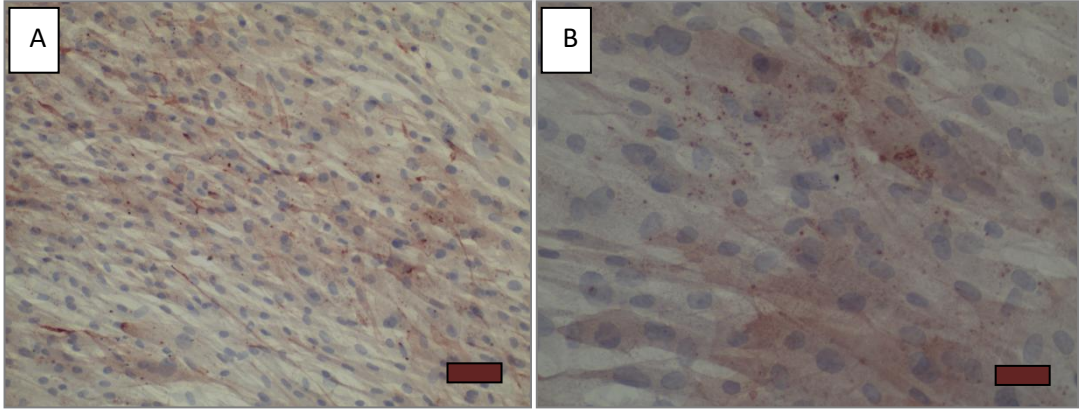
Şekil 3.3. CD90 antikoruna muamele edilmiş, işaretlenmiş hücrelerin flow sitometri sonuçları

3.3. İMMÜNOSİTOKİMYASAL ANALİZ

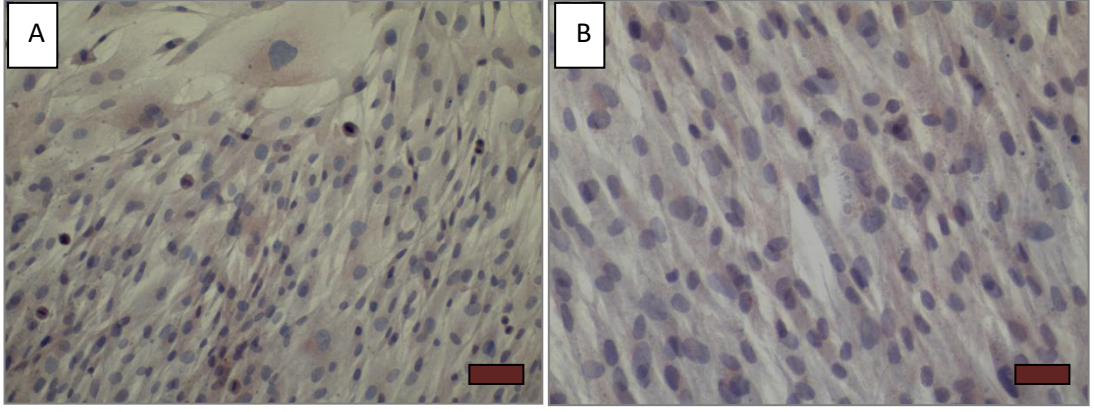
İmmünohistokimyasal boyama sonucunda, boyanmamış olan kontrol grubu ve CD44 ve CD105 antikorları ile boyanmış olan mezenşimal kök hücreler, farklı büyütmelerle çekilmiş olan aşağıdaki fotoğraflarda görülmektedir.



Şekil 3.4. Kontrol grubunda immünohistokimyasal boyama sonucu görüntüler. Kontrol grubunun 20x (A) ve 40x (B) 'de ışık mikroskopunda görüntüleri



Şekil 3.5. CD44 antikoruna boyama sonucu görüntüler. Mezenşimal kök hücrelerin CD44 ile boyanması 20x (A) ve 40x (B) görüntüleri

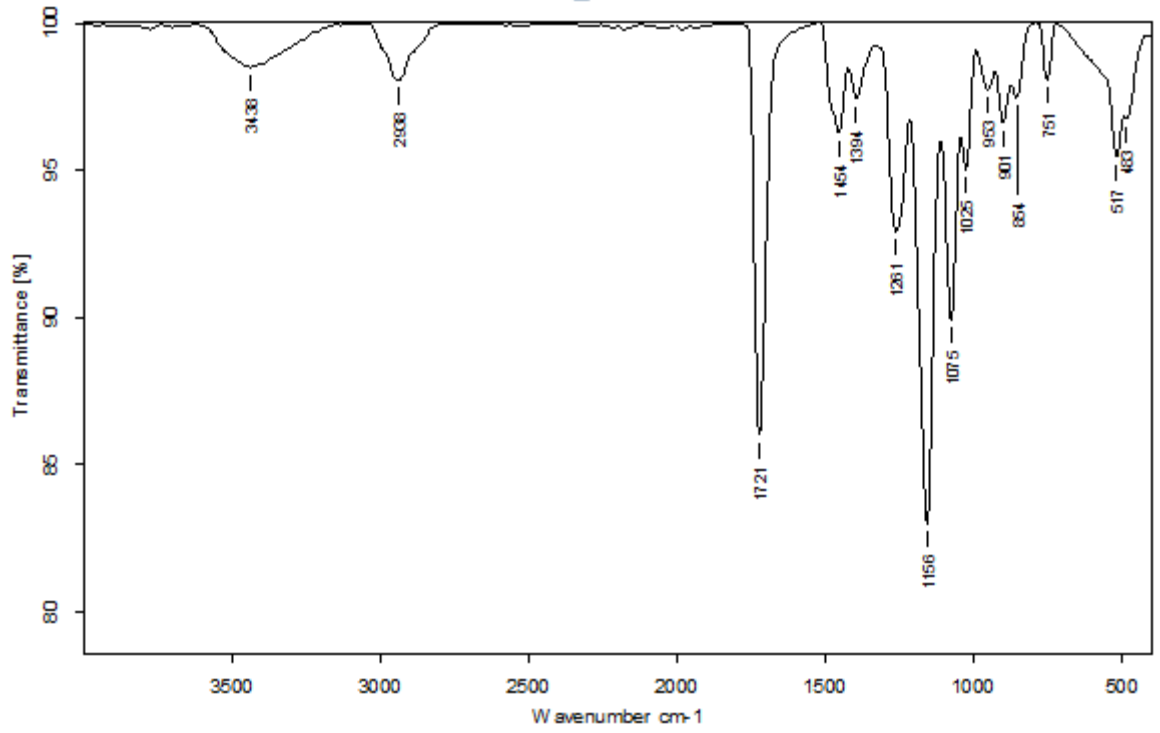


Şekil 3.6. CD105 antikoruna ile immünohistokimyasal boyama sonucu görüntüleri. Hücrelerin CD105 ile boyanması 20x (A) ve 40x (B)

3.4. NANOFİBERLERİN FTIR İLE KİMYASAL KARAKTERİZASYONU

3.4.1. Hazırlanan Poli-HEMA Nanofiberin FTIR Karakterizasyonu

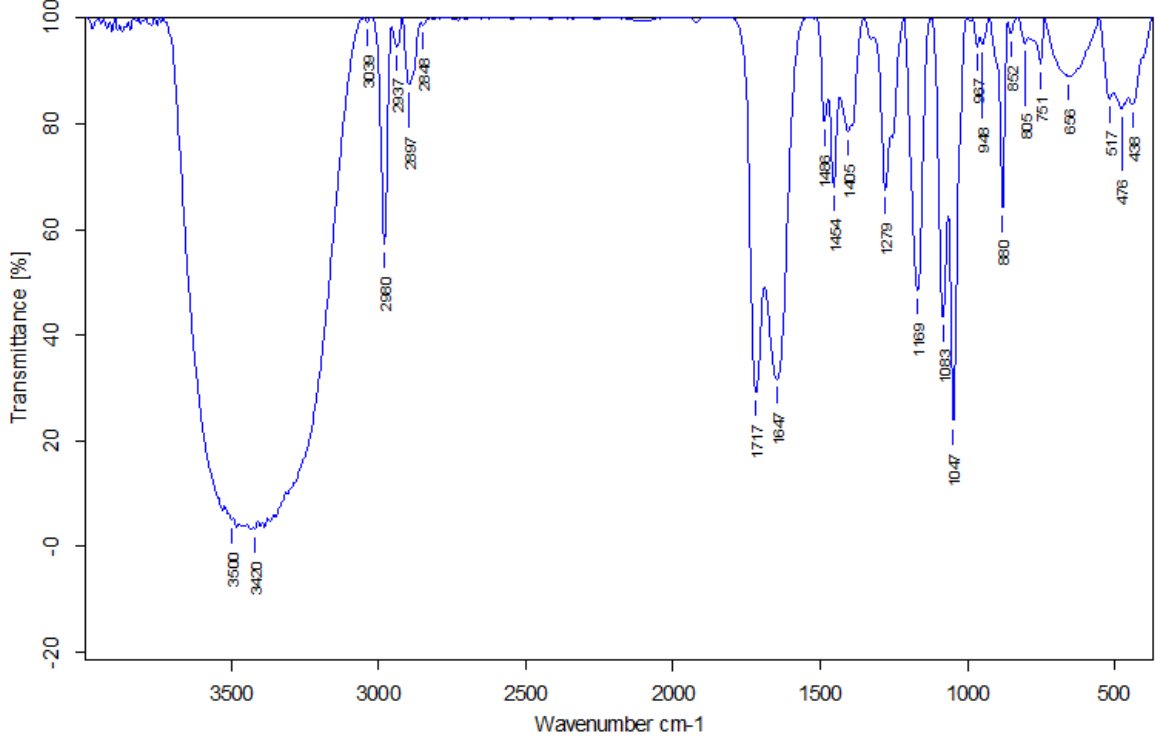
FTIR analizi sonucunda oluşan pikler şekilde görülmektedir. Hangi bağda hangi pik oluştuğu ise çizelgede görülmektedir.



Şekil 3.7. PoliHEMA'nın FTIR Analizi

Çizelge 3.1. Poli-HEMA'nın FTIR analizi

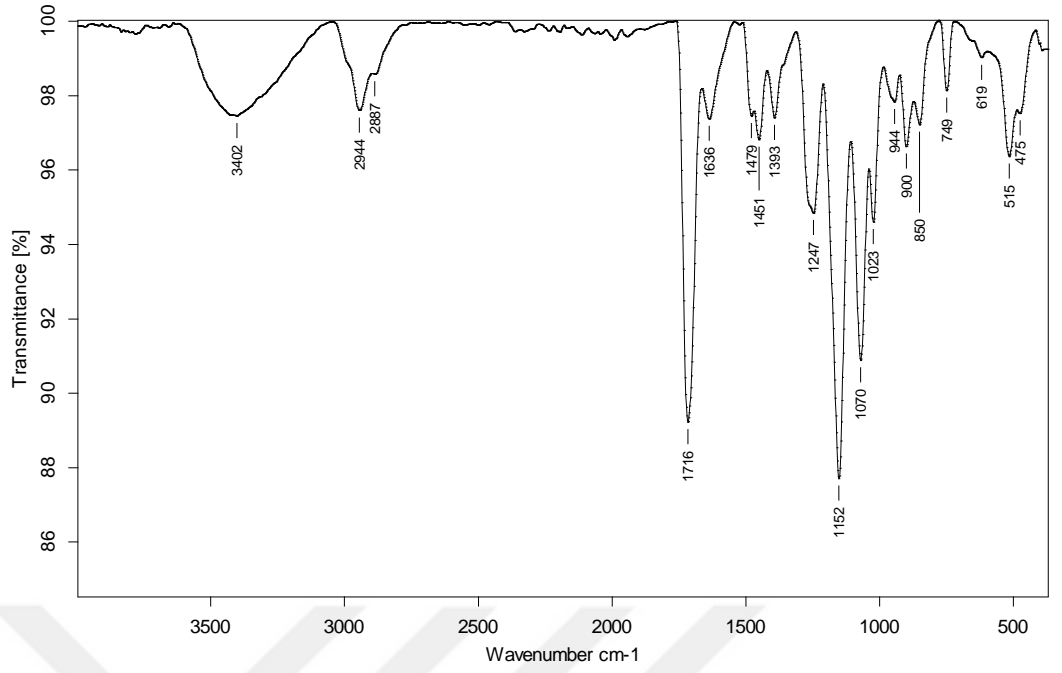
BAĞ TİTREŞİMİ	POZİSYON (cm ⁻¹)
C-O-C	1156
	1261
C=O	1721
C-H	2938
-OH	3438



Şekil 3.8. Aminoasit (L-Histidin, Fenilalanin ve L-Aspartik asit) içeren PoliHEMA nanofiberinin FTIR görüntüsü

Çizelge 3.2. İçine L-Aspartik asit, Fenilalanin ve L-Histidin eklenmiş PHEMA nanofiberin FTIR analizinde görülen aminoasitlere ait karakteristik bağlanmalar

BAĞ TİTREŞİMİ	POZİSYON (cm⁻¹)
L-Aspartik asitten gelen simetrik COO ⁻ grubu	1405
Fenilalaninden gelen benzil grubu	1486
L-Histidinden gelen –NH grubu	3420
Her üç aminoasitten gelen asimetrik COO ⁻ grubu	1647
Her üç aminoasitten gelen – NH ₂ grubu	3200-3400 arası sık pikler



D:\analizler\PROF.DR.SIYAMI KARAHAN\2016\9 SUBAT\TA.ASITLI POLYHEMA2.0

09/02/2016

Page 1/1

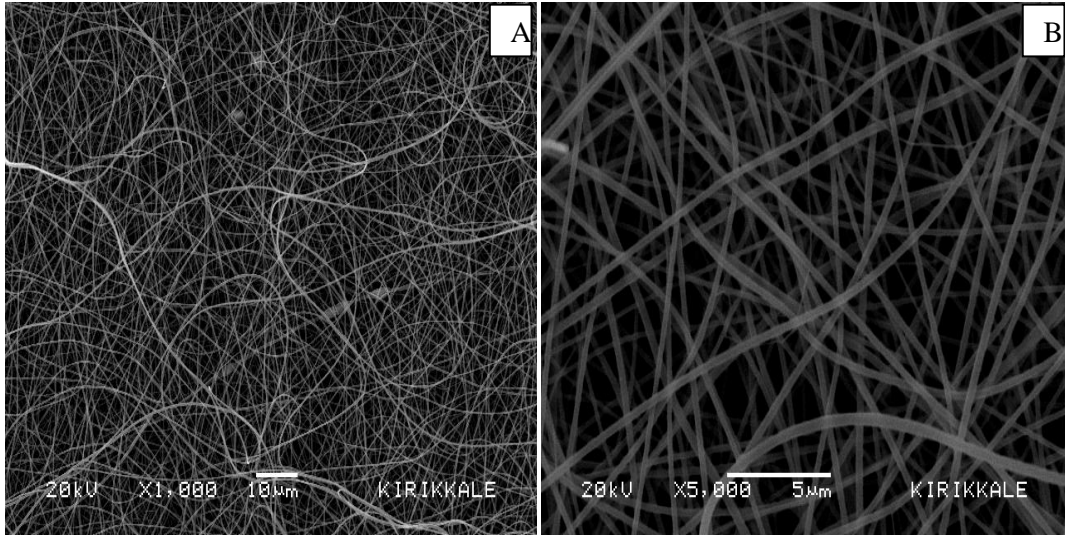
Şekil 3.9. Aminoasitlerin ve 4S-PEG'in bulunduğu Poli-HEMA'ya ait FTIR sonucu

Nanofiberin aminoasitli ve 4S-PEG ile çapraz bağlanmış halinin FTIR sonuçlarında, 2887 cm⁻¹'de bir omuzlanma görülmektedir. Elementler arasındaki bağların bazıları Poli-HEMA ve 4S-PEG'de ortak olarak bulunduğu ve yıkama esnasında nanofiber üzerindeki 4S-PEG artıklarının uzaklaştırılmış olmasından dolayı 4S-PEG'e ait bariz şekilde görülebilen bir pik bulunmamaktadır.

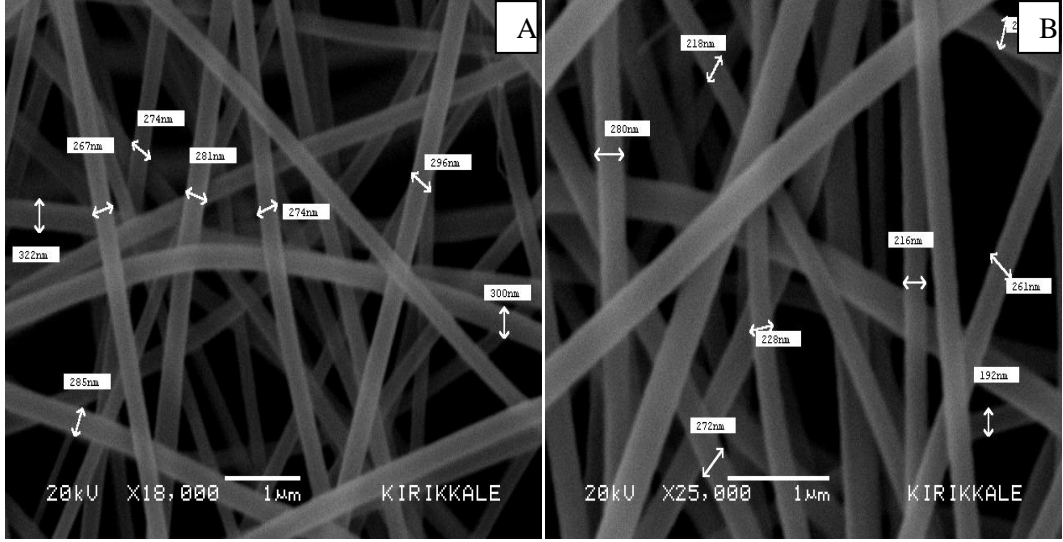
3.5. NANOFİBERLERİN SEM (TARAMALI ELEKTRON MİKROSKOBU) GÖRÜNTÜLERİ

Nanofiberlerin Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM)'nda çekilmiş olan görüntüleri ve ölçülen fiber çapları, Şekil 3.10 ve Şekil 3.11'de gösterilmiştir. Fotoğraflarda fiberlerin levha üzerinde, beklendiği gibi, rastgele şekillendiği anlaşılmaktadır. Ayrıca, Şekil 3.11'de fiberler daha ayrıntılı görülmekte ve fiber çaplarının kaç nm olduğu da anlaşılmaktadır. Buna göre, en kalın fiber çapı 322 nm ve en ince fiber çapı 192 nm'dir. Fiber çaplarının genel olarak 200-300 nm arasında değiştiği görülmektedir.

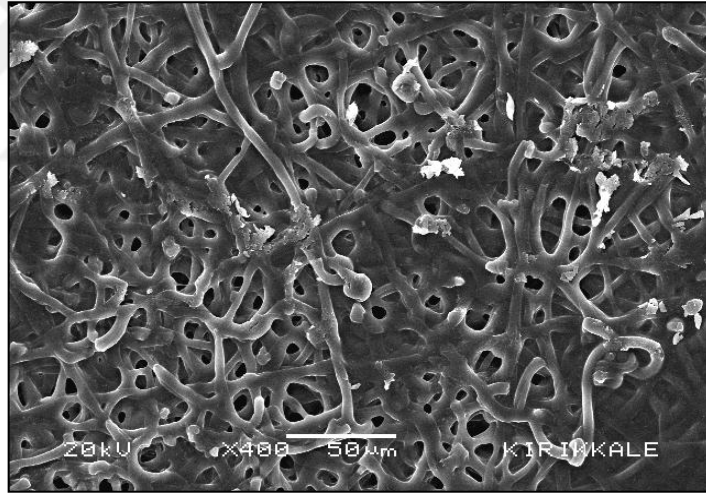
Şekil 3.13'te ise, hücre ekilmemiş ve çapraz bağlanmış olan nanofiberin 400x büyütmede SEM görüntüleri bulunmaktadır. Bu görüntüden de fiberlerin çapraz bağlandığı anlaşılmaktadır.



Şekil 3.10. PHEMA nanofiberlerin SEM görüntüleri, 1000x (A) ve 5000x (B) büyütmelerde.



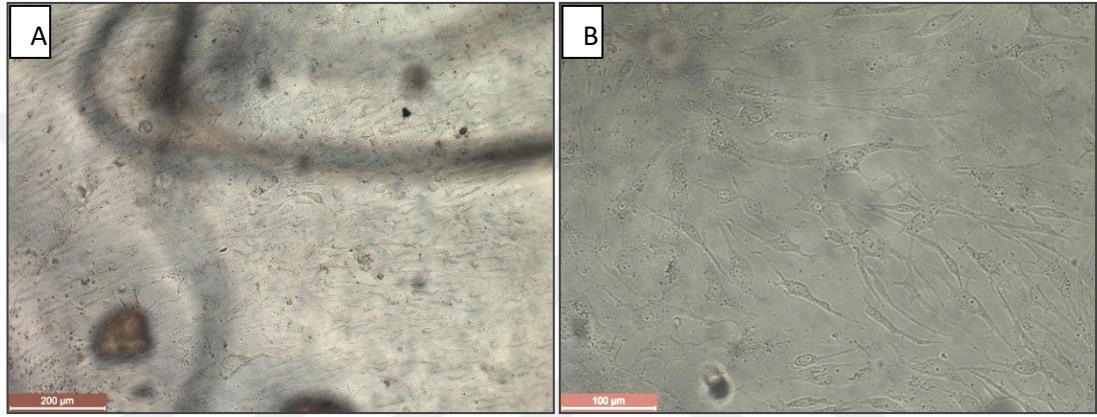
Şekil 3.11. Nanofiberlerin SEM görüntüleri ve fiber çaplarının tespit edilmesi, 18000x (A) ve 25000x (B) büyütmelerde



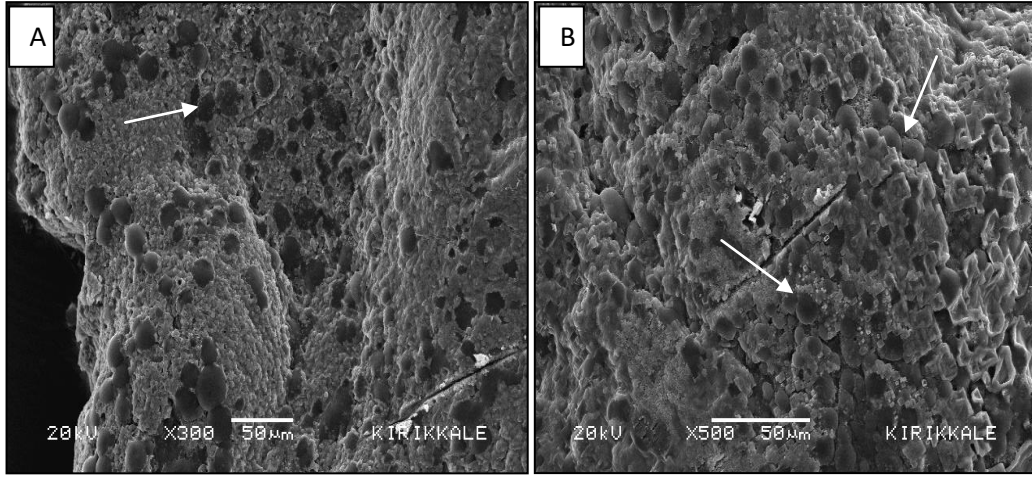
Şekil 3.12. Çapraz bağlı nanofiberin SEM görüntüsü. Poli-HEMA nanofiberin 4S-PEG solüsyonu ile çapraz bağlanmış halinin SEM görüntüsü (400x)

3.6. NANOFİBERLERİN ÜZERİNE MEZENŞİMAL KÖK HÜCRELERİN EKİMİ

Mezenşimal kök hücrelerin nanofiberler üzerine ekildikten sonraki 1. Günde ışık mikroskopunda ve SEM’de çekilmiş fotoğrafları, Şekil 3.13 ve Şekil 3.14’te görülmektedir. SEM fotoğraflarında hücreler, ok işaretleri ile gösterilmiştir. Işık mikroskopundaki görüntülerden de anlaşıldığı üzere, hücreler yüzeye tutunmuş ve normal morfolojilerini almışlardır.



Şekil 3.13. Nanofiber üzerinde ekilmiş olan hücrelerin görüntüleri. Ekimin 1. gününde 10x (A) ve 20x (B) büyütmede, ışık mikroskopunda çekilmiş fotoğraflar



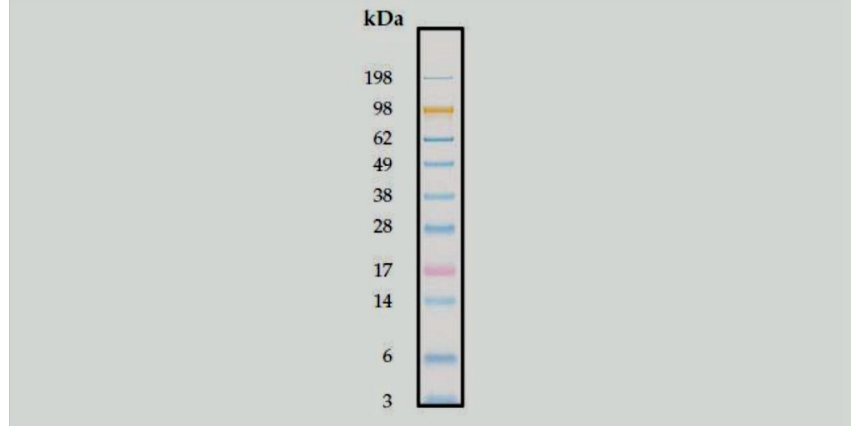
Şekil 3.14. Ekilen mezenşimal kök hücrelerin SEM görüntüleri. Hücre ekilmiş olan çapraz bağlı nanofiberlerin 300x (A) ve 500x (B) büyütmelede SEM görüntüleri

3.7. WESTERN BLOT YÖNTEMİ ile PROTEİN GÖRÜNTÜLEME

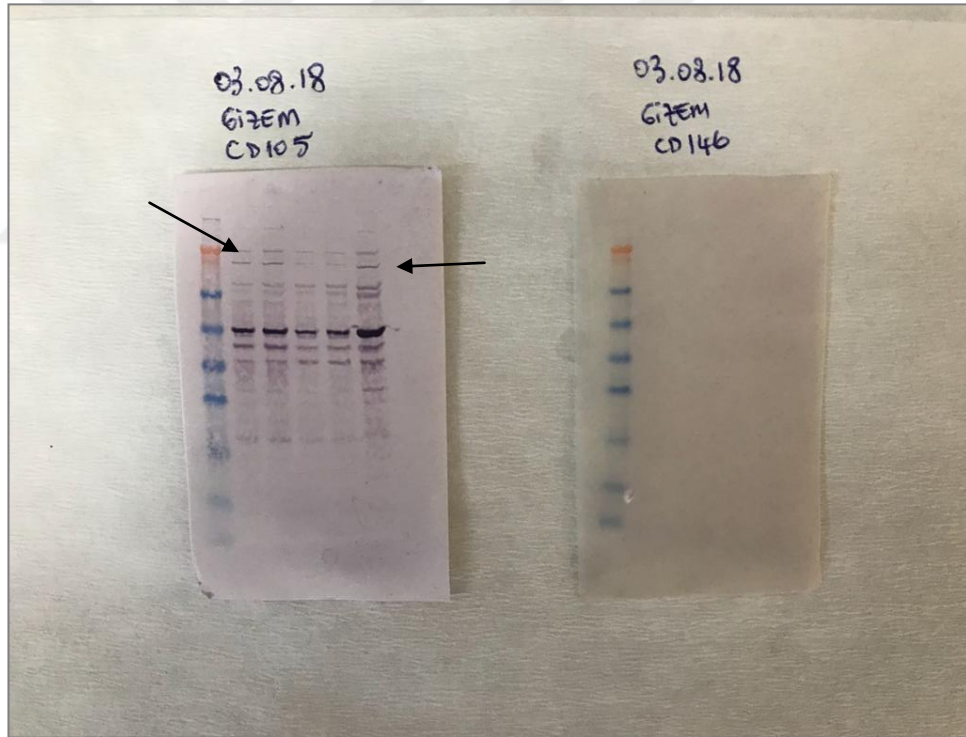
Şekil 3.15'te Western blot için kullanılan ladder'a ait protein bantları görülmektedir. Ladder, 3-198 kDa ve arasını göstermektedir. Şekil 3.16'da ise soldan sağa sırasıyla, hücrelerin nanofiber ile muamele edilmişinin 1. günü, sonra 1. güne ait kontrol grubu, sonra hücrelerin nanofiber ile muamele edilmişinin 3. günü, sonra 3. güne ait kontrol grubu ve en son (yine kontrol amacı ile) dondurulup çözündürülmüş hücrelere ait örneklerden elde edilen bantlar görülmektedir.

Sonuçlara göre, tüm örnekler için, CD105 antikoruna rastlanırken CD146 antikoruna rastlanmamıştır. Yani, elde edilen hücreler CD105 proteini eksprese ediyorken, CD146 proteinini eksprese etmemektedir. CD105'e ait olduğu tahmin edilen bantlar, Şekil 3.16'da ok işaretleri ile gösterilmiştir.

Ayrıca, elde edilen fotoğraflardan, 3. güne ait tüm örneklerden elde edilen bantların, 1. güne ait bantlara göre daha belirsiz olduğu görülmektedir.



Şekil 3.15. Kullanılan ladder bantları ve protein ağırlıkları



Şekil 3.16. Western blot sonucu elde edilen membran görüntüleri. CD105 ve CD146 markırları ile yapılan Western blot sonucu elde edilen görüntüler. CD105 olduğu düşünülen bantların hizası, ok işaretleri ile gösterilmiştir.

3.8. NANOFİBER ÜZERİNDE KÜLTÜR EDİLEN HÜCRELERİN MTT TESTİ ile CANLILIĞININ GÖSTERİLMESİ

Yapılan MTT testinin sonucunda 1., 3. ve 5. güne ait örneklerden ortaya çıkan absorbans değerleri, Çizelge 3.3, Çizelge 3.4 ve Çizelge 3.5'te gösterilmiştir. Deneyle üç tekrarlı yapılmış ve absorbans değerleri hem 570 nm'de, hem 590 nm'de ölçülmüştür.

Bu absorbans değerlerine göre grafik çizilmiş ve Şekil 3.17'deki gibi bir grafik elde edilmiştir. Buna göre; kontrol grupları her bir gün için ayrı ayrı %100 canlı kabul edildiğinde, 1. gün %94,09, 3. gün %81,93 ve 5. gün %74,58 oranlarında hücre canlılığı tespit edilmiştir.

Çizelge 3.3. MTT testi sonucunda absorbans değerleri (1. gün)

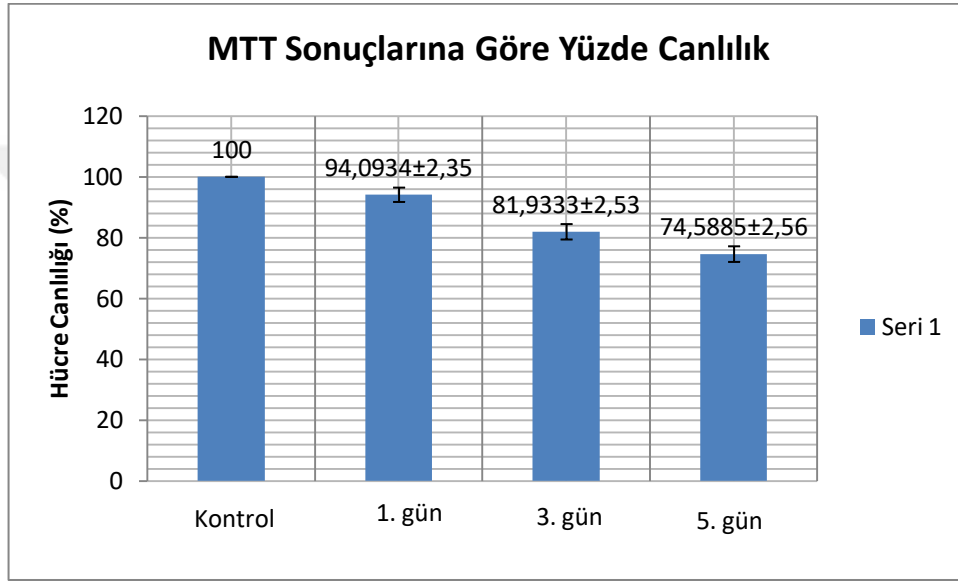
1. GÜN	Örnekler			Kontrol			Absorbans
Değerler	0,103	0,105	0,111	0,106	0,115	0,118	590 nm
Değerler	0,113	0,119	0,123	0,113	0,125	0,125	570 nm

Çizelge 3.4. MTT testi sonucunda absorbans değerleri (3. gün)

3. GÜN	Örnekler			Kontrol			Absorbans
Değerler	0,249	0,279	0,332	0,334	0,361	0,354	590 nm
Değerler	0,233	0,265	0,298	0,32	0,355	0,342	570 nm

Çizelge 3.5. MTT testi sonucunda absorbans değerleri (5. gün)

5. GÜN	Örnekler			Kontrol			Absorbans
Değerler	0,219	0,252	0,191	0,297	0,252	0,34	590 nm
Değerler	0,193	0,227	0,168	0,294	0,237	0,333	570 nm



Şekil 3.17. MTT testi sonuçlarına göre yüzde canlılığı gösteren grafik

3.9. NANOFİBER ÜZERİNDE KÜLTÜR EDİLEN HÜCRELERİN ALAMAR MAVİSİ ile CANLILIĞININ GÖSTERİLMESİ

Üreticinin verdiği bilgiler doğrultusunda, Alamar mavisi boyasının yüzde kaçının redüklendiği, pozitif kontrole göre (polimere değil, kuyucuğa ekili olan hücreler) hesaplandı. Yapılan işlemler ve elde edilen grafik, aşağıda gösterilmiştir.

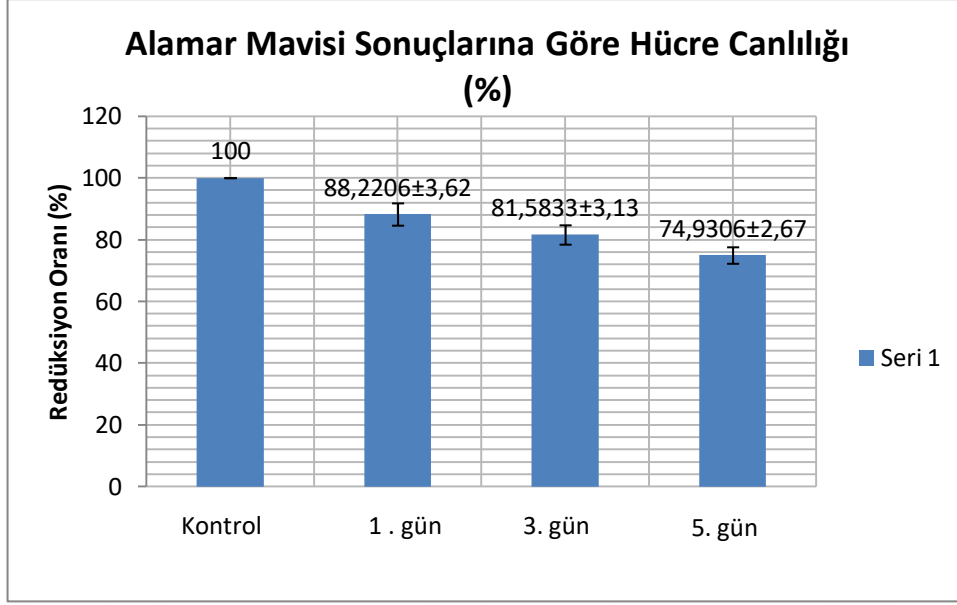
$$\text{Yüzde redüksiyon} = \frac{(117,216x(A(570)) - (80,586x(A(600)))}{(117,216x(B(570)) - (80,586x(B(600)))} \times 100$$

Çizelge 3.6. Nanofiber üzerinde kültür edilmiş olan mezenşimal kök hücrelerin ve kontrollerin 1., 3. ve 5.gün örneklerinin 570 ve 600 nm’de absorbans değerlerinin ortalaması

	1. gün (570 nm)	1. gün (600 nm)	3. gün (570 nm)	3. gün (600 nm)	5. gün (570 nm)	5. gün (600 nm)
Örnekler	0,22	0,047	1,75	1,35	0,3865	0,178
Kontroller	0,2533	0,059	3,413	3,499	0,345	0,28

Çizelgede verilen değerler, yukarıdaki formülde yerine yazıldığında; kontrol gruplarındaki redüksiyon oranının % 100 olduğu varsayıldığında, 1. gün örneği %88,22; 3. gün örneği %81,58; 5. gün örneği %74,93 redüksiyon oranı vermiştir (Şekil 3.18). Sonuçlara göre, 1., 3. ve 5. gün örnekleri arasında, hücre canlılığı yönünden önemli bir fark görülmektedir. Aynı zamanda tüm örneklerde canlılığın %70 üzerinde olduğu sonucuna da ulaşılmıştır.

Ayrıca, MTT sonuçları ile Alamar mavisi testinin sonuçları birbirine yakın olduğu değerlendirilmiştir.

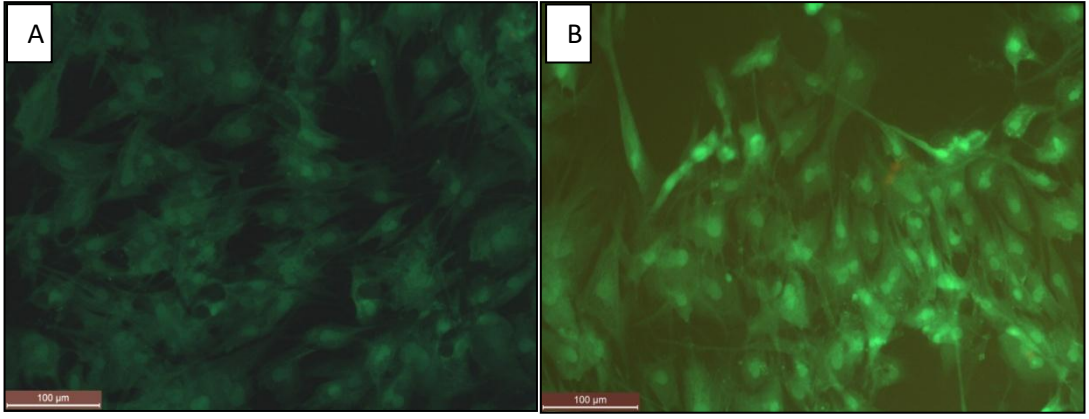


Şekil 3.18. Alamar mavisi testi sonucuna göre yüzde canlılığı gösteren grafik. Nanofiber üzerine ekilen mezenşimal kök hücrelerin 1., 3. ve 5.gün örneklerinin kontrollere göre yüzde redüksiyon grafiği

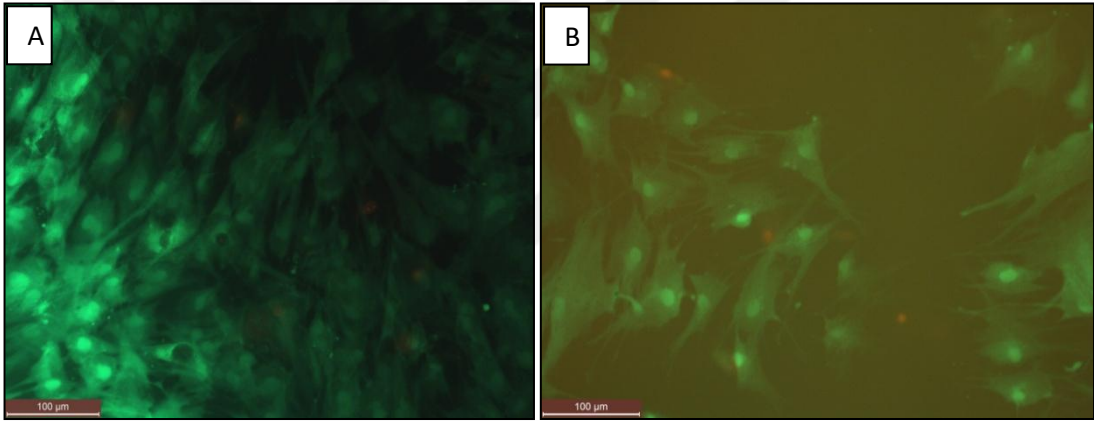
3.10. HÜCRELERİN CALCEIN AM ile BOYANMASI

Mezenşimal kök hücreler nanofiber üzerine ekildikten sonra, 1, 3 ve 5. Günlerde Calcein AM ve propidyum iyodür kullanılarak ikili boyama yapılmış ve floresan ataçmanlı mikroskopta fotoğraf çekilerek Şekil 3.19, Şekil 3.20 ve Şekil 3.21'deki görüntüler elde edilmiştir.

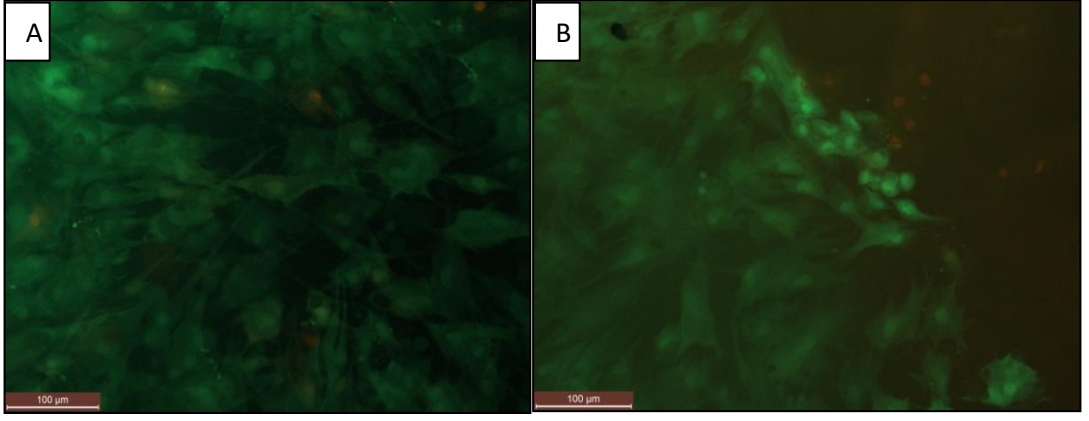
Boyama sonucunda, canlı hücrelerin çekirdeği yeşil renge boyanırken, nekroza uğrayan hücrelerin çekirdeği kırmızı renge boyanmıştır.



Şekil 3.19. Nanofiber üzerine ekili hücrelerin Calcein AM ile boyanması sonucu görüntüler. Kontrol (A) ve ekimin 1. Günü (B) (20x)



Şekil 3.20. Nanofiber üzerine ekili hücrelerin Calcein AM ile boyanması sonucu görüntüler. Kontrol (A) ve ekimin 3. Günü (B) (20x)



Şekil 3.21. Nanofiber üzerine ekili hücrelerin Calcein AM ile boyanması sonucu görüntüleri. Kontrol (A) ve ekimin 5. Günü (B) (20x)



4. SONUÇLAR ve TARTIŞMA

Yapılan çalışmanın ilk aşamasında, tavşanın interskapular bölgesinden yağ doku alınıp bu dokudan mezenşimal kök hücre izole etmek amaçlanmıştır. Bu amaçla yağ doku, mekanik yöntemle fragmentlerine ayrıldıktan sonra kollajenaz ile muamele edilip daha küçük parçalara ayrılması sağlanmıştır.

Yağ dokudan mezenşimal kök hücre izolasyonunda, kollajenaz enzimini kullanmadan izolasyon yapmak da mümkündür. Kollajenaz ile izolasyon yönteminin daha verimli fakat daha invazif olduğu rapor edilmiştir [84]. Fakat çalışmamızda kollajenaz kullanmak, sert bir yapı gösteren tavşan yağ dokusunun hem daha etkili, hem daha hızlı şekilde fragmentlerine ayrılmasını sağlamıştır.

Mezenşimal kök hücre izolasyonundan sonra yapılan flow sitometri sonuçları, izole edilen hücrelerin yaklaşık %36'sının mezenşimal kök hücre olduğunu göstermektedir. Flow sitometri için kullanılan markır, CD90 (Thy-1)'dir ve bu markır çeşitli kök hücrelerde rastlanabilen hücre yüzey glikoproteinidir (Giriş kısmında bahsedildiği gibi). Orijinal olarak, fare timositlerinde tanımlanmıştır.[83]

Sonrasında immünohistokimyasal boyama yapılmış ve çalışmada CD44 ve CD105 antikorları kullanılmıştır. Sonuçlara göre, izole edilen hücrelerde hem CD44, hem CD105 moleküllerine rastlanmıştır. CD44'ün diğer ismi hiyaluronat olup bir reseptör molekülüdür. CD105'in diğer ismi ise endoglin'dir ve adezyon molekülüdür. CD105, diğer taraftan western blot deneyinde de kullanılmış ve yine pozitif sonuç alınmıştır. Fakat western blot deneyinde kullanılan diğer markır olan CD146 (bir hücre adezyon molekülüdür) negatif sonuç vermiştir. (Bu konuya daha sonra tekrar değinilecektir). Giriş bölümünde de bahsedildiği gibi, izole edilen mezenşimal kök hücrelerde, farklı yer, zaman ve çalışmalarda rastlanan markırlar yönünden bazı çelişkiler vardır. Yine yukarıda da bahsedildiği gibi, bu tür çelişkiler, izolasyon metodlarındaki farklılıklar, hücrelerin kültür edilme süresi, aynı yüzey proteini üzerinde farklı epitoplara tutunan monoklonal antikorların kullanılması ve tespit

yöntemlerinin hassasiyet farkından kaynaklanıyor olabilir. Bu konuda daha fazla çalışma yapılmasına ihtiyaç vardır. [82]

Elektrospunlenmiş nanofiber elde etmek için birçok farklı polimer kullanılabilir. Kullanılan doğal polimerlere örnek olarak kollajen (Huang ve ark., 2001; Matthews ve ark., 2002; Gersbach ve ark., 2004; Shields ve ark., 2004), jelatin (Zhang ve ark., 2005), kitosan (Bhattarai ve ark., 2005; Geng ve ark., 2005), hiyaluronik asit (Um ve ark., 2004) ve ipek lifleri (Jin ve ark., 2002, 2004) verilebilir. Sentetik polimer olarak da poli(laktik asit) (Yang ve ark., 2004, 2005), poliüretan (PU) (Riboldi ve ark., 2005), poli(ϵ -kaprolakton) (PCL) (Reneker ve ark., 2002; Li ve ark., 2003; Li ve ark., 2005c), poli(laktik-koglicolik asit) (PLGA) (Luu ve ark., 2003; Kim ve ark., 2004; Uematsu ve ark., 2005), poli(etilen-ko-vinilasetat) (PEVA) (Kenawy 2002), ve poli(l-laktid-ko- ϵ -kaprolakton) (PLLA-CL) (Mo ve ark., 2004; Mo ve Weber 2004) çalışılmıştır [20]

Giriş bölümünde de bahsedildiği gibi, PHEMA, mükemmel bir biyouyumluluğa sahiptir, fizyokimyasal özellikler bakımından canlı dokulara benzemektedir ve FDA onaylı bir polimerdir. Yüksek biyouyumluluğu, toksik olmaması, iyi oksijen geçirgenliği, iyi iletim ve absorpsiyon özellikleri sebebiyle tercih edilmiştir.

Bu çalışmada PHEMA, (literatürde genellikle radikal polimerizasyon yöntemleri kullanıldığı halde) HEMA'nın ısı polimerizasyonu ile elde edilmiştir. Isıl polimerizasyon, daha verimli sonuç vermesi sebebiyle tercih edilmiştir. Elde edilen PHEMA, polimerizasyon sonrasında elektroçirme için hazırlanacak solüsyonda kullanıma uygun hale getirmek için, elde edilen polimer kurutulup toz haline getirilmiştir. Bu aşamadan sonra, elektroçirmeyi etkileyen parametreler olan solüsyon viskozitesi ve iletkenliği için uygun miktar polimer, iletkenliği uygun çözeltilerde (%50 formik asit + %50 etanol) çözündürülmüştür. Ayrıca biyouyumluluğu artırmak amacıyla solüsyonda L-aspartik asit, L-histidin ve fenilalanin aminoasitleri kullanılmıştır. Bu aminoasitler, önce ultra saf suda çözündürülmüş, daha sonra PHEMA çözeltisine eklenerek nanofiberin yapısına katılmaları sağlanmıştır.

Oluşturulan nanofiberler SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu)'de görüntülenmiş ve fiber çapları ölçülmüştür. Fiber çaplarının yaklaşık 190-350 nm arasında değiştiği gözlenmiştir. Literatürde, 900 ya da 1000 nm'ye kadar nano-boyut olduğu kabul edilmektedir. Bu sonuca göre, elde ettiğimiz fiber çapları, nano-boyut'tadır ve istenen sonuç alınmıştır. Yine literatürde bildirildiği üzere, çözeltinin viskozitesi ve sistemin akış hızı arttıkça fiberlerin kalınlığı da artmaktadır. Bu sebeple sistemin akış hızı, yayınlarda (PHEMA'nın elektroçirilmesi ile ilgili) geçen en düşük akış hızı değeri (10 µl/dakika) olarak tercih edilmiştir. PEMA nanofiberin çapraz bağlanma işlemi, 4S-PEG solüsyonu ile sağlanmıştır ve bu işlem, bu çalışma ile ilk kez denenmiştir. PHEMA için literatürde farklı çapraz bağlayıcılar (özellikle EGDMA ve benzerleri) önerilmektedir. Fakat 4S-PEG'in toksik olmaması ve çok küçük konsantrasyonlarda bile etkin olabilmesi gibi sebeplerle PBS içinde çözünmüş 4S-PEG solüsyonu, çapraz bağlayıcı olarak kullanılmıştır.

Nanofiberin kimyasal karakterizasyonu için FTIR yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntem sayesinde, hangi elementlerin arasında hangi bağların (çift ya da tek bağ olarak) anlaşılabilir. Bu tespit yapılırken, daha önce yapılmış PHEMA FTIR analizleri incelenmiştir [26]. Ayrıca, eklenen aminoasitler ve 4S-PEG'in de küçük omuzlanmalarla FTIR sonuçlarında kendilerini gösterdiği görülmektedir.

Nanofiberin hücreler için kullanılan besiyerlerinde çok hızlı bir şekilde degrade olması üzerine, nanofiberin çapraz bağlanmasına karar verilmiş ve bunun için biyoyumluluğu iyi olan bir çapraz-bağlayıcı ajan araştırılmıştır. Biyoyumluluğu daha önce bildirilmiş olan 4S-PEG'in iyi bir alternatif olduğu deneylerde görülmüştür. Ayrıca çözücü olarak da yine toksik olmayan bir çözücü (PBS) kullanabilmek, ek bir avantaj olmuştur. Çapraz bağlanma işleminin gerçekleştiği, hem degradasyon süresinin uzadığının gözlenmesi, hem de SEM fotoğrafları ile kanıtlanmıştır.

Hücrelerin nanofiber üzerine ekiminin ardından, ekimin belirli günlerinde canlılık testleri uygulanmıştır (MTT, Alamar mavisi ve Calcein AM). MTT'den sonra, hem 570 nm'de, hem 590 nm'de okutma yapılarak boyada veya plak okuyucuda bir sorun olup olmadığı anlaşılmaya çalışılmıştır. Her iki testin sonucu, 1. gün dışında,

birbirine oldukça yakındır. Bu da sonuçların güvenilir olduğunu gösteren bir faktördür. Alamar mavisi sonuçlarına göre canlılık; 1. gün %88,22, 3. gün %81,58 ve 5. gün %74,93 olarak bulunurken bu oranlar MTT sonuçlarına göre sırasıyla; %94,10, %81,98 ve %74,46'dır. Testlerin son günü olan 5. günde, nanofiber büyük oranda degrede olmuş olarak görünmektedir. Canlılık oranlarında günler ilerledikçe hızlı bir düşüş olduğu düşünülse de, nanofiber büyük oranda degrede olduğu durumda (5. gün) bile, canlılığın %74 civarında olduğu görülmektedir. Bu durum, biyoyumlu olduğu zaten bilinen PHEMA ve 4S-PEG polimerleri için beklenen bir sonuçtur. Bununla birlikte, nanofiberin üzerinde eser miktarda da olsa formik asit (toksik etkisi vardır) kalıntısı olduğunu düşündüğümüzde, bu sonuçların beklenen absorban değerlerinden daha aşağıda olduğu da söylenebilir.

Bu testlerin yanı sıra yapılan Calcein AM ve propidyum iyodür boyaması, canlı ve nekrotik hücrelerin fotoğraflarla gösterilmesi için yapılmıştır. Bilindiği üzere, propidyum iyodür nekrotik hücreleri kırmızı renge boyarken canlı hücreler Calcein AM ile yeşil renge boyanır. Nanofiber üzerine ekili hücrelerde nekroz oranının günler ilerledikçe arttığı görülmekte ve ayrıca diğer fotoğraflar da baz alındığında, nanofiber üzerine ekili hücrelerin canlı olanlarında morfolojileri ile ilgili bir sorun gözükmemektedir.

Western blot deneyi sonuçlarında, CD105 markırına rastlanırken CD146 markırının bu hücrelerde bulunmadığı, bu sonuçlarda görülmektedir. Membran fotoğrafına dikkatle bakıldığında, nanofiber ekstraksiyonunun CD105 bant görüntüsünü etkilemediği fakat buna karşın 3. güne ait bantların, 1. güne ait bantlardan daha silik olduğu, 1. güne ait her iki bantın da 3. güne ait bantlardan daha belirgin olduğu görülmektedir. Bu durumda, nanofiberin ekstraktı, CD105 ekspresyonunu etkilemezken, günler ilerledikçe CD105 ekspresyonunun azaldığını söyleyebiliriz. Nitekim, dondurulmuş hücre örneğine ait bantın da gayet belirgin olduğu, fotoğrafta görülmektedir.

CD146 markırı ise, bir kök hücre markırı olduğu halde bu deneyde tespit edilememiştir. Bu durumun, yöntemden ya da izolasyon metodundan

kaynaklandığını söylemek mümkün olabilir. Fakat öneri olarak, farklı bir metot denenmesi de uygundur.

Sonuç olarak; elde edilen çapraz bağlı PoliHEMA nanofiberin, elde ettiğimiz mezenşimal kök hücrelerin tutunması ve çoğalması için uygun ve elverişli bir ortam olduğunu, biyoyumlu olduğunu ve (özellikle Western blot sonuçlarına göre) mezenşimal kök hücrelere özel protein ekspresyonunu etkilemediği görülmektedir.

Bu tez çalışmasının devamında, mezenşimal kök hücrelerin farklılaşması hedeflenerek buna uygun düzenek ve deneyler hazırlanabilir. Ayrıca özellikle osteogenez ve kondrojenez için nanofiberlerin uygun ortam oluşturduğu bilinmektedir.

KAYNAKLAR

[1] Akgün I., Mezenkimal kök hücre, FNG & Bilim Tıp Transplantasyon Dergisi, 2016;29:29-32.

[2] Tekeli S., Arısu Naghavi E., Gökçe B., Sır G., Yiğittürk G., Çavuşoğlu T., Uyanıkgil Y., FNG & Bilim Tıp Transplantasyon Dergisi, 2006;1:72-83.

[3] Ramakrishna S., Fujihara K., Teo W.E., Yong T., Ma Z., Ramaseshan R., Electrospun Nanofibers: Solving Global Issues, Materials Today, 2006;9:40-51.

[4] Daştan A., Günal G., İldoğan L., Somuncu G., Kök Hücre Teknolojisi.

[5] Şenel F., Bilim ve Teknik, Şubat 2002.

[6] Beksaç M., Bilim ve Teknik, Haziran, 2010.

[7] Klingemann H., Matzilevich D., “Mesenchymal Stem Cells – Sources and Clinical Applications”, 2008;35: 272–277.

[8] Nadri S., Soleimani M. :Comparative analysis of mesenchymal stromal cells from murine bone marrow and amniotic fluid. Cytotherapy;9: 729-37, 2007.

[9] De Coppi P., Bartsch G., Siddiqui M. M., : Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. Nat Biotech 2007;25:100-6.

[10] Friedman R., Betancur M., Tuncr H., Boissel L., Klingemann H.: Umbilical cordmesenchymal stem cells: adjuvants for human cell transplantation, Biol Blood Marrow Transplant 2007;13:1477-86.

[11] Sandhaanam, Sylvester Darwin “PrePrints”, 2013.

[12] Ichim TE, Solano F, Glenn E, et al: Stem cell therapy for autism. *J Transl Med* 2007;5:30-8.) (Koblas T, Harman SM, Saudek F: The application of umbilical cord blood cells in the treatment of diabetes mellitus. *Rev Diabet Stud* 2005; 2:228-34.

[13] K. M. Safford, K. C. Hicok, S. D. Safford, et al., “Neurogenic differentiation of murine and human adipose-derived stromal cells”, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2002;294:371-379.

[14] J. K. Fraser, M. Zhu, I. Wulur and Z. Alfonso, “Adipose-derived stem cells”, *Methods in Molecular Biology*, 2008;449:59-67.

[15] D.A. De Ugarte, K. Morizono, A. Elbarbary et al., “Comparison of multilineage cells from human adipose tissue and bone marrow,” *Cells Tissues Organs*, 2003;174:101-109.

[16] F. Pittenger, A. M. Mackay,, S. C. Beck et al., “Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells,” *Science*, 1999;284:143-147.

[17] P. A. Zuk, M. Zhu, H. Mizuno et al., “Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies,” *Tissue Engineering*, vol. 7, no. 2, pp. 211-228,2001.

[18] Baer, Patrick C, and Helmut Geiger, “Adipose-Derived Mesenchymal Stromal / Stem Cells : Tissue Localization, Characterization and Heterogeneity”. 2012.

[19] Wong, Hing L O K vd. 2015. “Characteristics of stem cells derived from rat fascia : In vitro proliferative and multilineage potential assessment”. : 1982–90.

[20] Vasita R., Katti D. S., Review: “Nanofibers and their applications in tissue engineering,” *International Journal of Nanomedicine* 2006:1(1) 15–30.

[21] Kiyak Y. E., Çakmak E., Review: Nanofiber production methods, *Tekstil Teknolojileri*, 2014;8:49-60.

[22] Chen H., Truckenmüller R., Van Blitterswijk C., Moroni L., Fabrication of nanofibrous scaffolds for tissue engineering applications, Woodhead Publishing Limited, 2013.

[23] Hartgerink JD, Beniash E, Stupp SI. 2002. Peptide-amphiphile nanofibers: a versatile scaffold for the preparation of self-assembling materials. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, National Academy of Sciences, USA, 2002;99:5133–8.

[24] Ma PX, Zhang R. 1998. Synthetic nano-scale fibrous extracellular matrix. J Biomed Mater Res, 1998;46:60–72,

[25] Montheard J-P., Chatzopoulos M., Chappard D., 2-Hydroxyethyl methacrylate (HEMA): Chemical properties and applications in biomedical fields, Macromolecular Science Part C Polymer Reviews, 1992.

[26] Ramalingam N., Natarajan T.S., Rajiv S., Development and characterization of electrospun Poly(2-hydroxyethyl methacrylate) for tissue engineering applications, Advances in Polymer Technology, Vol. 32, no:3, 2013.

[27] Pauley S, Kopecky B, Beisel K, Stem cells and molecular strategies to restore hearing[J]. Panminerva Med, 2008;50(1): 41-53.

[28] Delo, D. M., Guan, X., Wang, Z., Calcification after myocardial infarction is independent of amniotic fluid stem cell injection. Cardiovascular Pathology, 2011;20: 69-78.

[29] Decembrini, S., Cananzi, M., Gualdoni, S., Comparative analysis of the retinal potential of embryonic stem cells and amniotic fluid-derived stem cells. Stem Cells and Development, 2011;20: 851-863.

[30] Antonucci, I., Stuppia, L., Kaneko, Y., Amniotic fluid as a rich source of mesenchymal stromal cells for transplantation therapy, Cell Transplantation, 2011;20: 789-795.

[31] Shaw, S. W., Bollini, S., Nader, K. A., Autologous transplantation of amniotic fluid-derived mesenchymal stem cells into sheep fetuses. *Cell Transplantation*, 2011;20:1015-1031.

[32] Lovati, A. B., Corradetti, B., Lange Consiglio, A., Comparison of equine bone marrow, umbilical cord matrix and amniotic fluid-derived progenitor cells. *Veterinary Research Communications*, 2011;35:103-121.

[33] Yadav, P. S., Mann, A., Singh, V., Expression of pluripotency genes in buffalo (*Bubalus bubalis*) amniotic fluid cells. *Reproduction in Domestic Animals*, 2011;46:705-711.

[34] Bunnell A B, Flaat M., Gagliardi C., Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation. *Methods*, 2008;45: 115-20.

[35] Zuk AP, Zhu M, Ashjian P , Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* , 2002;13: 4279-95.

[36] Dominici M, Blanc KL, Mueller I Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy* 4: 315-17, 2006.

[37] Adams B, Xiao Q, Xu Q. Stem cell therapy for vascular disease. *Trends Cardiovasc Med* 2007;17: 246-51.

[38] Rangappa S, Fen C, Lee H., Transformation of adult mesenchymal stem cells isolated from the fatty tissue into cardiomyocytes. *Ann Thorac Surg*, 2003;75: 775-779.

[39] Cao Y, Sun Z, Liao L et al. Human adipose tissue-derived stem cells differentiate into endothelial cells in vitro and improve postnatal neovascularization in vivo. *Biochem Biophys Res Com*, 2005;332: 370-79.

- [40] Bianco P, Robey PG, Simmons PJ. Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. *Cell Stem Cell* 2008;2: 313-19.
- [41] Hass R, Casper C, Böhm S et al. Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): a comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. *Cell Comm Sign* 2011;9: 1-14.
- [42] Augello A, Kurth TB, De Bari C. Mesenchymal stem cells: a perspective from in vitro cultures to in vivo migration and niches. *Euro Cells Mater* 2010;20: 121-33.
- [43] Sessarego, N., Parodi, A., Podesta, M., Multipotent mesenchymal stromal cells from amniotic fluid: Solid perspectives for clinical application. *Haematologica*, 2008;93, 339-346.
- [44] Tholpady SS, Llull R, Ogle RC, .Adipose tissue: Stem cells and beyond, *Clin Plast Surg*, 2006;33(1):55-62.
- [45] Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Multilineage cells from human adipose tissue: Implications for cell-based therapies[J]. *Tissue Eng*, 2001;7(2):211-228.
- [46] Guilak F, Awad HA, Fermor B, .Adipose-derived adult stem cells for cartilage tissue engineering[J]. *Biorheology*, 2004;41 (3-4):389-399.
- [47] Klein, J. D., Fauza, D. O., Amniotic and placental mesenchymal stem cell isolation and culture, *Methods in Molecular Biology*, 2011;698, 75-88.
- [48] Kim, J., Lee, Y., Kim, H., Human amniotic fluid-derived stem cells have characteristics of multipotent stem cells. *Cell Proliferation*, 2007;40, 75-90.
- [49] Naveen N, Kumar R, Balaji S, Uma TS, Natarajan TS, Sehgal PK. Synthesis of Nonwoven nanofibers by electrospinning—A promising biomaterial for tissue engineering and drug delivery. *Adv Biomater* 2010;12:B380–B387.

[50] Frank A, Subbu SV, Santhosh KR, Freddy B. In vitro study of release mechanisms of paclitaxel and rapamycin from drug-incorporated biodegradable stent. *J Controlled Release* 2004;98:67–74.

[51] Yan C, Jie L, Yanna F, Hongbo W, Weidong G. Preparation and characterization of electrospinning PLA/curcumin composite membranes. *Fibers Polym.* 2010;11:1128–1131

[52] Francesco D, Yuwen W, Ji L, Qingrong H. Preparation of curcumin sub-micrometer dispersion by high-pressure homogenisation. *J Agric Food Chem* 2010;58:2848–2853.

[53] Elakkiya T, Natarajan TS, Ramdhar K, Praveen KS, Sheeja R. Fabrication of electrospun poly L-lactide nanofiber for drug delivery. *Fibers Polym* 2012;13:823–830.

[54] Sundarananthavalli S, Kulandaisamy A, Christopher CC. Synthesis, characterization, analgesic, anti-inflammatory, anti-ulcer, wound healing and antimicrobial effects of curcuminoids. *Int J Chem Tech Res* 2011;3:2040–2046.

[55] Bhawana, Rupesh KB, Harpreet SB, Jain VK, Nidhi J. Curcumin nanoparticles: Preparation, characterization and antimicrobial study. *J Agric Food Chem* 2011;59:2056–2061.

[56] Robert S, Keryn C, Stephanie JD, Robert SD, Matthew D, YhuChering H, Franklin DL. Update on the prevention and control of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA). *Int J Antimicrob Agents* 2012;39:193–200.

[57] Bhaarathi D, Nachimuthu S, Ramasamy M, Ponnusamy S, Palanisamy V, Sukumar V, Venugopal R. Electrospinning of curcumin loaded chitosan/poly(lactic acid) nanofilm and evaluation of its medicinal characteristics. *Front Mater Sci* 2013;7:350–361.

[58] Yan C, Jie L, Yugin W, Yanna F, Hongbo W, Weidong G. Preparation and blood compatability of electrospun PLA/curcumin composite membranes. *Fibers Polym* 2012;13:1254–1258.

[59] Sun XZ, Williams GR, Hou XX, Zhu LM. Electrospun curcuminloaded fibers with potential biomedical applications. *Carbohydr Polym* 2013;94:147–153.

[60] Jonathan GM, Shaun WM, Lu T, Cato TL, Alex FC, Lakshmi SN. Curcumin loaded poly(ϵ -caprolactone) nanofibers: Diabetic wound dressing with antioxidant and anti-inflammatory properties. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2009;36:1149–1156.

[61] Venugopal J, Ramakrishna S. Applications of polymer nanofibers in biomedical and biotechnology. *Appl Biochem Biotechnol* 2005; 125:147–157.

[62] Bagherzadeh R, Latifi M, Kong L. 2014. Three-dimensional pore structure analysis of polycaprolactone nano-microfibrous scaffolds using theoretical and experimental approaches. *J Biomed Mater Res A* 2014;102A:903–910.

[63] Bagherzadeh R, Latifi M, Najar SS, Tehran MA, Kong L. 2013. Three-dimensional pore structure analysis of nano/microfibrous scaffolds using confocal laser scanning microscopy. *J Biomed Mater Res A* 2013;101A:765–774.

[64] Park, K. E., Kang, H. K., Lee, S. J., Min, B. M., & Park, W. H., Biomimetic nanofibrous scaffolds: preparation and characterization of PGA/Chitin blend nanofibers. *Biomacromolecules*, 2006, 7, 365.

[65] Pham, Q. P., Sharma, U., & Mikos, A. G. , Electrospun Poly(ϵ -caprolactone) Microfiber and Multilayer Nanofiber/Microfiber Scaffolds: Characterization of Scaffolds and Measurement of Cellular Infiltration. *Biomacromolecules*, 2006, 7, 2796 .

- [66] Nie, H., Soh, B. W., Fu, Y. C., & Waing, C. H. , Three-dimensional fibrous PLGA/HAp composite scaffold for BMP-2 delivery. *Biotechnology and Bioengineering*, 2008;99, 223 .
- [67] Zhang, Y. Z., Wang, X., Feng, Y., Li, J., Lim, C. T., & Ramakrishna, S., Coaxial Electrospinning of (Fluorescein Isothiocyanate-Conjugated Bovine Serum Albumin)-Encapsulated Poly(ϵ -caprolactone) Nanofibers for Sustained Release. *Biomacromolecules*, 2006, 7, 1049.
- [68] Jiang, H., Hu, Y., Zhao, P., Li, Y., & Zhu, K. . Modulation of protein release from biodegradable coreshell structured fibers prepared by coaxial electrospinning. *Journal of Biomedical Material Research: Part B*, 2006, 79B, 50.
- [69] Jiang, H., Hu, Y., Li, Y., Zhao, P., Zhu, K., & Chen, W. , A facile technique to prepare biodegradable coaxial electrospun nanofibers for controlled release of bioactive agents. *Journal of Controlled Release*, 2005; 108, 237.
- [70] Chew, S. Y., Wen, J., Yim, E. K., Leong, K. W. (2005). Sustained release of proteins from electrospun biodegradable fibers. *Biomacromolecules*, 2005, 6, 2017.
- [71] Xu, X., Chen, X., Lu, T., Wang, X., Yang, L., & Jing, X. , BCNU-loaded PEG-PLLA ultrafine fibers and their in vitro antitumor activity against glioma C6 cells. *Journal of Controlled Release*, 2006;114, 307.
- [72] Liang, D., Luu, Y. K., Kim, K., Hsiao, B. S., Hadjiargyrou, M., Chu, B., In vitro no-viral gene delivery with nanofibrous scaffolds. *Nucleic Acid Research*, 2005, 33, E170.
- [74] Xie, J., & Wang, C. H., Electrospun micro- and nanofibers for sustained delivery of paclitaxel to treat C6 glioma in vitro. *Pharmaceutical Research*, 2006;23, 1817.

[75] Pham, Q. P., Sharma, U., & Mikos, A. G. ., Electrospun Poly(ϵ -caprolactone) Microfiber and Multilayer Nanofiber/Microfiber Scaffolds: Characterization of Scaffolds and Measurement of Cellular Infiltration. *Biomacromolecules*, 2006; 7, 2796.

[76] Li, D. and Xia, Y.N. , Electro-Spinning of Nanofibers: Reinventing the Wheel. *Advanced Materials*. , 2004.

[77] Laboration Work at Swerea IVF (Supervisor-Anna Thorvaldsson). , M. Sc in Textile Technology Program at University of Boras, Textile Fiber Material Course. 2009.

[78] Ioannis, S., Chronakis, Swerea IVF, M. Sc in Textile Technology Program, University of Boras, Lecture Materials of Textile Fiber Material Course.

[79] Sui, B. D., Hu, C. H., Zheng, C. X. & Jin, Y. Microenvironmental Views on Mesenchymal Stem Cell Differentiation in Aging. *J. Dent. Res.* 2016; 95:1333–1340.

[80] Wang, L. et al. IFN-gamma and TNF-alpha synergistically induce mesenchymal stem cell impairment and tumorigenesis via NFkappaB signaling. *Stem Cells*. 2013;31: 1383–1395 (2013).

[81] Lee, J. H. et al. A systematic review of diagnostic accuracy of vertebral fracture assessment (VFA) in postmenopausal women and elderly men. *Osteoporos. Int.* , 2016;27:1691–1699.

[82] Özen A., Gül Sancak İ., Ceylan A., Özgenç Ö., Isolation of adipose tissue-derived stem cells, *Veterinary and Animal Sciences*, 2016;40:137-141.

[83] Kisselbach L., Merges M., Bossie A., Boyd A., CD90 Expression on human primary cells and elimination of contaminating fibroblasts from cell cultures, *Cytotechnology*, 2009;59:31-44.

[84] Nae S, Bordeianu I, Stancioiu AT, Antohi N. Human adiposederived stem cells: definition, isolation, tissue-engineering applications. , Rom J Morphol Embryol 2013; 54: 919–924.

