

T.C.

KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ADİPOZ KÖK HÜCRELERDEN FARKLILAŞTIRILMIŞ KONDROSİTLERİN
ALJİNAT TEMELLİ MİKROKÜRELERDE ENKAPSÜLASYONU

BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MURAT PARLAK

KIRIKKALE 2018

Biyomühendislik Anabilim Dalında, Murat Parlak tarafından hazırlanan “**Adipoz Kökenli Kök Hücrelerden Farklılaştırılmış Kondrositlerin Aljinat Temelli Mikrokürelerde Enkapsülasyonu**” adlı Yüksek Lisans Tezinin Ana Bilim Dalı standartlarına uygun olduğunu onaylarım.

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

Anabilim Dalı Başkanı

Mustafa YİĞİTOĞLU

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

Prof. Dr. Mustafa TÜRK

Danışman

Jüri Üyeleri

Başkan : Prof. Dr. Murat BOZKURT.

Üye Danışman : Prof. Dr. Mustafa TÜRK

Üye : Yrd.Doç Dr. Murat İNAL

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

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

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Mustafa YİĞİTOĞLU

ÖZET

Adipoz Kökenli Kök Hücrelerden Farklılaştırılmış Kondrositlerin Aljinat Temelli
Mikrokürelerde Enkapsülasyonu

PARLAK, Murat

Kırıkkale Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyomühendislik Anabilim Dalı, Yüksek Lisans tezi

Danışman: Prof. Dr. Mustafa TÜRK

OCAK 2018, 103 sayfa

Doku mühendisliği biyoloji bilimlerini mühendislik ilkeleriyle birleştiren, hasara uğramış dokuların fonksiyonlarını geri kazanması amacıyla biyolojik bileşenlerin üretilmesi ve geliştirilmesi olarak tanımlanmaktadır. Kıkırdak doku mühendisliği modeliyle yapılan çalışmalarda hasarlı kıkırdak dokusuna, çeşitli fizikokimyasal yöntemlerle elde edilen polimerik iskelet yapılarının üstüne istenilen sayıda hücre ekilerek implantasyonu hedeflenmektedir. Elde edilen polimerik iskelet yapıları, ekimi yapılan hücrelere hem mekanik destek hem de hücrelerin üzerlerinde tutunup çoğalabilecekleri üç boyutlu fiziksel ortam sağlamaktadırlar.

Bu çalışmanın amacı, çeşitli hayvanlardan izole edilen in-vitroda kondrosite farklılaştırılan adipoz kök hücrelerin ve kondrositlerin, aljinat mikroküreler içerisinde hücre canlılıklarını ve kendine özgü morfolojilerini aljinat doku iskelesine ve tek tabaka flask kültürüne göre daha iyi koruduğunu göstermektir. Koyunların lumbal bölgesinden elde edilen adipoz kök hücrelerin kondrosite farklılaştırılması in-vitro flask kültürlerinde gerçekleştirilmiş, 3. pasaj sırasında mikrokürelere ekimleri yapılmıştır. Koyunların artiküler bağ dokusundan elde edilen kondrosit hücreleri de kültüre edilip hem mikrokürelere hem de doku iskelelerine ekimi yapılmıştır. Aljinat mikroküre yapılarını elde etmek için %2'lik aljinat ve %2 aljinat-%1 hyaluronik asit karışımı 6×10^5 tane/ml kondrosit içeren 100 mikrolitre

besiyeriyle karıştırılmış, sonrasında 23G bir şırıngadan CaCl₂ çözeltisi içerisine damlatılıp çapraz bağlanmıştır. Aljinat doku iskelesi yapısı elde etmek için ise %2'lik aljinat çözeltisi %0,3'lük kitosan çözeltisi ile 5'e 2 oranında karıştırılmış sonrasında CaCl₂ ile çapraz bağlanmış, 2 gün boyunca -80 °C'de dondurucuda bekletildikten sonra liyofilize edilip %70'lik alkolle sterilize edildikten sonra üzerlerine 6x10⁵tane/ml kondrosit ekilmiştir. Koyunlardan elde edilen adipoz kökenli kök hücreler, antikor boyaması ve glikozaminoglikan (GAG) işaretleyicileri (marker) ile işaretlenerek kök hücre oldukları gösterilmiştir. Kök hücreler StemPro kondrojenik farklılaştırma ortamında yaklaşık 7-14 gün içerisinde kondrosit hücrelerine farklılaştırılmış, antikor boyaması ile gösterilmiştir. Ayrıca mikroskopik gözlemlerle kondrositten fibro-bağ farklılaşması (dedifferansiyasyon) gösterilmiştir. Sonrasında 3. pasaj sonrası kondrosit hücreleri aljinat mikrokürelere enkapsüle edilerek orijinal morfolojilerini geri kazanmış ve mikrokürelere içinde hyalin kıkırdaktaki kondrositlerin sentezlediği kondroidin sülfatı yeniden sentezlemeye başladıkları Toluidine Mavisi boyaması ile gösterilmiştir. Son olarak koyundan izole edilen ve flask kültüründe çoğaltılan kondrosit hücreleri hem aljinat mikrokürelere enkapsüle edilerek hem de aljinat doku iskeleleri (skaffold) üzerine ekilerek Alamar Blue testi ve mikroskop görüntüleriyle hücre canlılığı açısından karşılaştırılmış, çıkan sonuçlar bize mikroküre enkapsülasyonu tekniğinin, doku iskelesine ekim tekniğine ve düz flask kültürüne göre kondrosit hücrelerini orijinal morfolojilerine daha yakın bir görünümde olmalarını ve daha yüksek metabolik aktivite göstermelerini sağladıklarını göstermiştir.

Elde edilen sonuçlara göre kondrositlerin hücrel ekstrasellüler matriks bileşenlerinin kıkırdak dokusuna iletimi açısından aljinat mikrokürede enkapsülasyon tekniğinin, aljinat doku iskelesine ekim tekniğine nazaran daha etkili bir hücrel ilaç iletim mekanizması olduğu sonucuna varılmıştır. Ayrıca her iki aljinat polimerleşme tekniğinde de hidrojellerden flask kültür tabakasına besiyeri ortamında herhangi bir kondrosit hücresi aktarılmadığı görülmüştür. Enzimatik hidroliz uygulamalarıyla kondrositlerin mikrokürelere geri elde edim teknikleri in-vitro ve in-vivo çalışmalarla geliştirilebilir.

Anahtar Kelimeler: kıkırdak doku mühendisliği, hücreyel bileşenlerin iletimi, aljinat mikroküre, aljinat-kitosan doku iskelesi, adipoz kökenli kök hücre, kondrojenik farklılaşma.



ABSTRACT

Encapsulation of Chondrogenically Differentiated Adipose Derived Stem Cells in
Alginate Based Microspheres

PARLAK, Murat

Kırıkkale University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of bioengineering, Master Thesis

Supervisor: Prof. Dr. Mustafa TÜRK

January 2018, 103 pages

Tissue engineering combines biological sciences with engineering principles, aims to regenerate damaged tissues by producing and improving biological substances such as cells, growth factors, signalling molecules and polymeric matrices. It is possible, regenerating damaged cartilage tissue via cartilage tissue engineering model by inoculating desired cell population into produced polymeric matrixes with desired shape and geometry. These polymeric matrixes provides cells to be easily attached and proliferate on and mechanical stability.

This study aims to demonstrate chondrogenic potential of adipose derived stem cells taken from rabbit and sheep adipose tissue in alginate microspheres comparing with alginate-chitosan scaffold and monolayer flask culture by measuring cell viability and morphology.

Adipose derived stem cells isolated from lumbal region of sheeps are identified with antibody and glycosaminoglycan (GAG) markers. Then they cultured in flasks using StemPro chondrogenesis differentiation kit for 14 days. After the 3rd passage dedifferentiated chondrocytes are encapsulated in alginate microspheres and also inoculated into alginate-chitosan scaffolds. Alginate microspheres are fabricated by dropping %2 alginate with 6×10^5 cells/ml by drop-weight method into %10 CaCl_2 with a 23G syringe nozzle. Alginate-chitosan scaffolds are fabricated by mixing %2 alginate with %0,3 chitosan with a ratio of 5/2 in pH 4.5. The mixture electrostatically mixed with %10 CaCl_2 , lyophilized for two days and sterilized with %70 alcohol. 6×10^5 cells/ml chondrocytes inoculated onto scaffold and cultured.

After cultivation chondrocytes shows spherical morphology on both alginate microspheres and lyophilized scaffolds. Chondrocytes in microspheres and scaffolds synthesized hyaline cartilage oligomatrix chondroitine sulphate protein shown by Toluidine Blue dye. Fresh chondrocytes isolated from rabbits encapsulated in alginate microspheres, and inoculated in alginate-chitosan scaffolds then cultured. These are compared for cell metabolic activity and cell morphology by using Alamar Blue test and microscope view.

According to the results, chondrocytes encapsulated in alginate microspheres shows more metabolic activity and more spherical morphology than alginate-chitosan scaffold and monolayer flask culture. It is possible to say that for cartilage tissue engineering model, alginate microspheres shows more promises about implantation efficiency.

Key Words: Cartilage Tissue Engineering, transfer cell substances, alginate microspheres, alginate-chitosan scaffold, adipose derived stem cell, chondrogenic differentiation.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca beni destekleyen, değerli bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan ve her türlü sıkıntıda bana yol gösteren tez danışmanım sayın Prof. Dr. Mustafa TÜRK'e,

Yüksek lisans eğitimimi Kırıkkale Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü'nde almamı izin veren değerli bölüm başkanımız sayın Prof. Dr. Mustafa YİĞİTOĞLU'na ve yüksek lisans eğitimim boyunca değerli bilgi ve tecrübelerini bizlerden hiç esirgemeyen Kırıkkale Merkezi Araştırmalar Birimi Müdürü sayın Prof. Dr. Siyami KARAHAN'a ve laboratuvarını ve tavsiyelerini bizden asla esirgemeyen sayın Prof. Dr. Oğuz KUL'a,

Yüksek lisans bursiyer öğrencisi olduğum 'Osteokondral Defektlerin Tedavisi İçin Biyoteknolojik Olarak Hedeflenmiş Mikrokürelerle Otolog Kök Hücrelerden Farklılaştırılmış Kondrosit İmplantasyonu' adlı ve 213M683 nolu 1003 projesi kapsamında yürüttüğüm tez çalışma sürecimde maddi ve bilimsel anlamda beni destekleyen Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'na (TÜBİTAK),

Eğitimim boyunca bana hep yol gösterici olan sayın hocalarım Doç. Dr. Mehmet Doğan Aşık'a, Yrd. Doç. Dr. Murat İnal'a, Uzman Dr. Sibel Özkan , Uzman Dr. Esra ARAT, Uzman Dr. Yaşar ALUÇ, Uzman Dr. Aytuna ÇERÇİ, Uzman Dr. Ogün Bozkaya ve Ar. Gör. Tuğçe Sümer Antepioğlu'na,

Deney Hayvanları laboratuvarında bilgi, tecrübelerini ve desteklerini benden hiç esirgemeyen değerli laboratuvar çalışanları sayın, Yaşar Şahin, Murat İğde ve Behçet Poyrazer ve zor günlerimizi aynı dersliklerde ve laboratuvarlarda paylaştığımız değerli arkadaşlarım Burak Bozkurt, Gökçe GÖKDOĞAN, Selçuk TOKLUCU, Sema TUNCER, Özlem ÖZDEMİR, Seval Birdane, Gizem ve Ümit YAŞAR'a,

Hayatım boyunca hiç desteklerini esirgemeyen değerli arkadaşlarım Levent GÜÇLÜ'ye ve Nuriye GÜNEŞ'e ve her koşulda sağlamış oldukları destekleri ile tezi bitirmemi sağlayan değerli ailem Ahmet PARLAK, Şükriye PARLAK ve Özlem PARLAK'a, sevgi ve tüm saygılarımla TEŞEKKÜR EDERİM.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iv
TEŞEKKÜR	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR	xiii
1. GİRİŞ.....	1
1.1 KULLANILAN BİYOPOLİMERLER.....	3
1.1.1 ALJİNAT POLİMERİ VE DOKU MÜHENDİSLİĞİ ALANINDA KULLANIMI.....	3
1.1.2 KİTOSAN VE DOKU MÜHENDİSLİĞİ ALANDA KULLANIMI	10
1.2 HÜCRE İMMOBİLİZASYON YÖNTEMLERİ.....	16
1.2.1 PELLET OLUŞTURMA	17
1.2.2 ADSORBSİYON (YÜZEYE TUTUNMA) TEKNİĞİ	18
1.2.3 HAPSETME İŞLEMİ	18
1.2.4 KOVALENT ÇAPRAZ BAĞLAMA.....	19
1.3 ALJİNAT HİDROJELİ OLUŞTURMA TEKNİKLERİ	19
1.3.1 ALJİNATIN İYONİK OLARAK ÇAPRAZ BAĞLANMASI	20
1.3.4 HÜCRELERİN BİRBİRLERİYLE ALJİNAT İÇERİSİNDE ÇAPRAZ BAĞLANMASI.....	22
1.4 MİKROKÜRELER VE MİKROKÜRE ÇEŞİTLERİ.....	23
1.4.1 CAM MİKROKÜRELER.....	24
1.4.2 SERAMİK MİKROKÜRELER.....	25
1.4.3 POLİMERİK BAZLI MİKROKÜRELER	26
1.4.3.1 SENTETİK POLİMERİK MİKROKÜRELER	27
1.4.3.2 DOĞAL POLİMERİK MİKROKÜRELER	29
1.5 KÖK HÜCRE BİYOLOJİSİ VE TANIMLAMALAR	32
1.6 DOKU HASARLANMALARINDA YANGI MEKANİZMASI VE İYİLEŞME SÜRECİ.....	41
1.7 KONDROSİT HÜCRE KÜLTÜRÜ VE KIKIRDAK DOKU MÜHENDİSLİĞİ UYGULAMALARI	45
2. MATERYAL METHOD	63
2.1 KULLANILAN MATERYALLER.....	63
2.2 ALJİNAT MİKROKÜRELERİN SENTEZİ	63
2.3 ALJİNAT-HYALURONİK ASİT MİKROKÜRELERİNİN SENTEZİ	63
2.4 ALJİNAT VE HYALURONİK ASİT-ALJİNAT MİKROKÜRELERİNİN IN- VİTRO LİZOZİM DEGREDASYON SÜRELERİNİN HESAPLANMASI.....	64
2.5 TAVŞANLARDAN ARTİKÜLER BAĞ DOKUSUNDAN ELDE EDİLEN KONDROSİT HÜCRELERİNİN IN-VİTRO KÜLTÜRE EDİLMESİ.....	64
2.6 TAVŞANLARIN ARTİKÜLER BAĞ DOKUSUNDAN ELDE EDİLEN KONDROSİTLERİN ALJİNAT MİKROKÜRELERDE ENKAPSÜLASYONU	66

2.7 MİKROKÜRELERDE ENKAPSÜLE EDİLEN KONDROSİTLERİN HİSTOLOJİK KESİTLERİNİN MİKROSKOPTA GÖRÜNTÜLENMESİ.....	66
2.8 MİKROKÜRELERDE ENKAPSÜLE EDİLEN KONDROSİTLERİN TOLUIDİNE MAVİSİ İLE BOYANMASI VE MİKROSKOPTA GÖRÜNTÜLENMESİ	67
2.9 KİTOSAN-ALJİNAT POLİMER DOKU İSKELELERİNİN OLUŞTURULMASI	67
2.10 MİKROKÜRELERDE ENKAPSÜLE EDİLEN VE KİTOSAN-ALJİNAT DOKU İSKELELERİNE EKİLEN KONDROSİTLERİN ALAMAR BLUE TESTİ İLE KONDROSİT METABOLİK AKTİVİTESİNİN HESAPLANARAK KARŞILAŞTIRILMASI	69
2.11 KOYUNLARIN LUMBAL BÖLGESİNDEN ELDE EDİLEN ADİPOZ KÖKENLİ MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN KÜLTÜRE EDİLMESİ (AKH KÜLTÜRÜ) VE KÖK HÜCRELERİN KONDROJENİK FARKLILAŞTIRILMASI.....	69
2.11.1 KOYUN LUMBAL BÖLGESİNDEN ADİPOZ KÖKENLİ KÖK HÜCRE İZOLASYONU	69
2.11.2 KOYUN LUMBAL BÖLGESİNDEN İZOLE EDİLMİŞ ADİPOZ KÖKENLİ KÖK HÜCRELERİN KONDROJENİK FARKLILAŞTIRILMASI... ..	72
2.12 REAL TIME-PCR İLE KONDROSİTLERİN TİP I VE II KOLLAGEN, AGGREGAN, SOX9, COMP GEN EKSPRESYONLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ.....	73
2.13 GLİKOZAMİNOGLİKAN ÖLÇÜMÜ İLE (DMMB) İLE GLİKOZAMİNOGLİKAN MİKTARININ BELİRLENMESİ.....	74
2.14 GERÇEK ZAMANLI ANALİZ SİSTEMİ İLE KÖK HÜCRELERİN VE KONDROSİTLERİN PROLİFERASYONU VE FARKLILAŞMA PROFİLLERİNİN OLUŞTURULMASI.....	75
2.15 KONDROJENİK OLARAK FARKLILAŞTIRILMIŞ ADİPOZ KÖK HÜCRELERİN ALJİNAT MİKROKÜRELERDE ENKAPSÜLASYONU	76
3.TARTIŞMA VE SONUÇLAR	77
3.1 ALJİNAT VE ALJİNAT-HYALURONİK ASİT MİKROKÜRELERİN SENTEZLENMESİ VE IN-VİTRODA LİZOZİM DEGRADASYONUNUN DEĞERLENDİRİLMESİ.....	77
3.2 TAVŞANLARDAN ELDE EDİLEN KONDROSİT HÜCRELERİNİN IN-VİTRO KÜLTÜRE EDİLMESİ MİKROKÜRELER İÇERİSİNDE ENKAPSÜLASYONU	79
3.3 KONDROSİT İÇEREN ALJİNAT MİKROKÜRELERİN TOLUIDİNE MAVİSİ İLE BOYANMASI.....	81
3.4 ALJİNAT-KİTOSAN POLİMER DOKU İSKELELERİNE KONDROSİT HÜCRELERİNİN EKİMİNİN MİKROSKOP ALTINDAKİ GÖRÜNTÜLERİ... ..	82
3.5 KONDROSİT İÇEREN ALJİNAT-KİTOSAN POLİMERDE ALAMAR MAVİSİ SONUÇLARININ KONDROSİT İÇEREN ALJİNAT MİKROKÜRELERDE ALAMAR MAVİSİ FLUORESANS SONUÇLARI İLE KARŞILAŞTIRILMASI	83

3.6 KOYUNLARIN LUMBAL BÖLGESİNDEN İZOLE EDİLİP ÇOĞALTILAN VE MİKROKÜRELER İÇERİSİNDE ENKAPSÜLE EDİLEN ADİPOZ KÖK HÜCRELERİNİN MİKROSKOPTAKİ GÖRÜNÜMLERİ	84
3.7 KOYUNLARIN LUMBAL BÖLGESİNDEN İZOLE EDİLEN ADİPOZ KÖKENLİ KÖK HÜCRELERİN IN-VİTRODA KONDROJENİK FARKLILAŞMASININ VE KONDROJENİK FARKLILAŞMA SONRASI DEDİFFERANSİYASYONUN GÖSTERİMİ.....	85
3.8 KOYUNLARDAN ELDE EDİLEN KONDROSİTE FARKLILAŞTIRILAN ADİPOZ KÖKENLİ KÖK HÜCRELERİN MİKROKÜRELER İÇİNDE ENKAPSÜLASYONU	88
3.9 GERÇEK ZAMANLI ANALİZ SİSTEMİ İLE KÖK HÜCRELERİN VE KONDROSİTLERİN PROLİFERASYONU VE FARKLILAŞMA PROFİLLERİNİN OLUŞTURULMASI.....	89
3.10 KONDROJENİK FARKLILAŞMA SIRASINDAKİ GLİKOZAMİNOGLİKAN DEĞERLERİNİN DMMB İLE ÖLÇÜMÜNÜN DEĞERLENDİRİLMESİ.....	90
3.11 ANTİKOR BOYAMASI SONUÇLARI (KOLLAJEN TİP I, TİP II VE AGREKAN)	91
3.12 PCR SONUÇLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ.....	93
4. DEĞERLENDİRME	95
5. KAYNAKLAR DİZİNİ	98

ŞEKİLLER DİZİNİ

ŞEKİL	SAYFA
1.1 Aljinatın yapısında bulunan gulukuronik asit (G) ve mannunorik asit (M) zincirlerinin aljinat polimerinde zincir oluşturma şekilleri.....	4
1.2 Aljinatın çapraz bağlanmasıyla kalsiyum aljinat hidrojellerinin oluşturulması (yumurta-kutu modeli). Kalsiyum ile sadece guluronate blokları çapraz bağlanmaktadır.....	7
1.3 Kitin ve kitosanın kimyasal yapısı.....	10
1.4 Kitosanın çapraz bağlanması.....	13
1.5 Aljinat mikrokürelerde oluşturulmuş bir hücre agregatının faz kontrast mikroskopundaki görünümü.....	20
1.6 Aljinat Mikroküreler içerisinde hücrelerin kovalent çapraz bağlanması ile oluşturulmuş hidrojel yapısının görünümü.....	21
1.7 Aljinatın polietilen glikolle termal jelleşmesi sonucu oluşturulmuş termal duyarlı aljinat hidrojel yapısı.....	22
1.8 Hücrelerin aljinat aracılığıyla birbirleriyle çapraz bağlanması (hücre-hücre çapraz bağlanması).....	22
1.9 Biyoaktif cam mikrokürelerin silikon dioksit-kalsiyum oksit bileşiğinin SEM görüntüsü.....	25
1.10 Kalsiyum silikat tozundan emülsiyon methodu ile elde edilen seramik mikrokürelerin SEM görüntüsü.....	26
1.11 Polimerik mikrokürelerin Hazırlama Methodları.....	27
1.12 Emülsifikasyonla elde edilmiş polilaktik asit mikrokürelerin SEM Görüntüsü.....	28
1.13 Polikaprolakton mikrokürelerin görünümü.....	28
1.14 Polilaktik-ko-glikolik asit mikrokürelerin görünümü.....	29
1.15 Aljinat mikrokürelerin SEM görüntüleri.....	30
1.16 Kitosan mikrokürelerin SEM ve DAPI görüntüleri.....	31
1.17 Hyaluonik asitten sprej-kurutma yöntemiyle elde edilen mikrokürelerin çeşitli yakınlaştırmalardaki SEM görümleri.....	31
1.18 Kollajen mikrokürelerin SEM görünümleri.....	32

1.19	Hücre popülasyonlarının vücuttaki hareketi ve doku onarım mekanizmaları.....	44
1.20	Bir kondrosit hücresinin TEM’de çekilmiş görüntüsü.....	46
1.21	Ekstrasellüler matriksin bileşenleri.....	48
1.22	Eklem bağ dokusunun bölgelere göre ekstrasellüler matriks bileşen.....	49
1.23	Ekstrasellüler Matriks İçeriğinin Bölgelere Göre Değişimi.....	49
1.24	Hyalin kıkırdak matriksinin moleküler yapısı.....	51
1.25	Hematoksilin ve eosin ile boyanmış örnek bir hyalin kıkırdak fotoğrafı.....	55
1.26	Kıkırdak Doku Mühendisliği Yaklaşımıyla Aljinat Mikroküreler İçerisinde Enkapsüle Edilen Kondrositlerin Yüksek Miktarlarda Döner Flasklarda Eldesi.....	62
2.1	Koyunun lumbal bölgesinden adipoz kökenli kök hücre eldesi.....	70
3.1	Adipoz kökenli mezenkimal kök hücrelerin kültürü 1. Gün.....	77
3.2	Adipoz kökenli mezenkimal kök hücrelerin izolasyonu ve sonrasında StemPro kondrojenik farklılaştırma ortamındaki mikroskop görüntüleri.....	77
3.3	İn-Vitro Lizozim Degredasyonu Çalışması.....	78
3.4	Kültüre alınan kondrositlerin 15.gündeki morfolojileri.....	80
3.5	Kondrosit içeren aljinat mikrokürelerin toluidine mavisi boyanma görüntüsü.....	81
3.6	Koyunun artiküler bağ dokusundan elde edilen kondrosit hücrelerinin aljinat-kitosan polimerine ekim fotoğrafları.....	82
3.7	Tek tabakalı kondrosit kültürünün geçen zaman içindeki metabolik aktivite değişimi...83	
3.8	Adipoz kökenli mezenkimal kök (AKH) hücrelerin kültürü.....	84
3.9	Adipoz kökenli mezenkimal kök hücrelerin (AKH) izolasyonu ve sonrasında StemPro kondrojenik farklılaştırma ortamındaki mikroskop görüntüleri.....	86
3.10	Koyunlardan elde edilen adipoz kök hücrelerin akış sitometri analizleri.....	87
3.11	Adipoz kök hücreden farklılaştırılan kondrositlerin mikroküreler içerisinde enkapsülasyonu.....	88
3.12	Xcelligence Cihazıyla 96’lı E-Platelere ekilmiş olan hücrelerin bilgisayar ortamında empedansının gösterimi.....	89
3.13	Antikor 7. Gün Boyama Sonuçları.....	92
3.14	Kondrojenik Farklılaşma PCR Sonuçlarının Grafikselleştirilmesi.....	94

ÇİZELGELER DİZİNİ

ÇİZELGE	SAYFA
1.1 Adipoz dokudan elde edilen kök hücrelerinin farklı kondrojenik ortamlarda kültürü ve elde edilen sonuçlar.....	38
1.2 Bağ dokusu tamiri için doku mühendisliğinde kullanılan hücre kaynaklarının avantajları ve dezavantajları.....	40
1.3 Vücutta rejenerasyon ve onarımda görev alan büyüme faktörleri.....	44
3.1 Absorbansa Göre Kondrosit Sayısının Belirlenmesi.....	90
3.2. Kullanılan besiyerlerine göre kondrojenik farklılaşma PCR sonuçları.....	93

SİMGELER VE KISALTMALAR

AKH	: Adipoz Kökenli Kök Hücre
CaCl₂	: Kalsiyum Klorür
CD	: Farklılaşma Derecesi
DDA	: Deasetilasyon Derecesi
DMEM	: Dulbecco'nun Modifiye Besi Ortamı
DMMB	: Dimetil Metilen Mavisi
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
FBS	: Fötal Sığır Serumumu
GAG	: Glikozaminoglikan
HCL	: Hidroklorik Asit
ITS	: İnsulin-Transferrin-Selenyum
NaOH	: Sodyum Hidroksit
NH₄CL	: Amonyum Klorür
MHC	: Temel Doku Uyumluluğu Kompleksi
MKH	: Mezenkimal Kök Hücre
PBS	: Fosfat Tampon Tuzu

pH	: Hidrojenin Gücü
RGD	: Arjinin-Glisin-Aspartik Asit
RPM	: Dakikadaki Dönüş Hızı
P/S	: Penisilin / Streptomisin
RNA	: Ribonükleik Asit
RTCA	: Gerçek Zamalı Analiz Sistemi
SEM	: Taramalı Elektron Mikroskobu
SVF	: Stromal Vasküler Fraksiyon
TGF	: Dönüştürü Büyüme Faktörü
TERM	: Doku Mühendisliği ve Rejeneratif Tıp

1. GİRİŞ

Doku mühendisliği biyoloji bilimlerini mühendislik ilkeleriyle birleştiren, hasara uğramış dokuların fonksiyonlarını geri kazanması amacıyla biyolojik bileşenlerin üretilmesi ve geliştirilmesi olarak tanımlanmaktadır (Vinatier and Guicheux 2016). Günümüzde doku mühendisliği ve rejeneratif tıp olarak geçen TERM kavramı; akut travma, cerrahi müdahale, doğuştan hastalıklar veya kronik problemlere bağlı olarak kısmen fonksiyon gösteren ya da hasarlı dokuları desteklemeyi, canlandırmayı veya yerine koymayı hedefleyen disiplinler arası bir alandır (Sivashanmugam, Arun Kumar et al. 2015). Doku mühendisliği, biyomateryallerin, hücrelerin ve biyolojik veya çevresel faktörlerin birlikte kullanımını temel almaktadır (Vinatier and Guicheux 2016). Dr. Robert Langer ve Dr. Joseph Vacanti'nin 1990'larda yapmış oldukları bir çalışmada biyoemilebilir özelliğe sahip yapay polimerleri matriks olarak hücre transplantasyonunda kullanarak çeşitli hayvanlara implante etmişler ve bugün doku mühendisliği olarak bilinen kavramın temelini ortaya atmışlardır (Langer and Vacanti 2016). Her ne kadar vücudun kendini iyileştirme kapasitesi olsa bile bazı dokularda bu durum yetersiz kalabilmekte, bu sebeple de alternatif olarak dışarıdan bir etki olarak biyomateryallerin kullanımı ile hem çeşitli hücrelerin ve tedavi edici kimyasalların dokulara kontrollü bir şekilde iletimi sağlanabilmekte, hem de dokudaki mekanik kaybın geri kazanımı mümkün olabilmektedir (Lee, Kasper et al. 2014). Ayrıca biyomateryallerin sentetik materyallere nazaran en büyük üstünlükleri olan vücuttaki biyobozunurlukları sayesinde polimer bozunurken vücuttaki dokular kendilerini vücuttaki özgül yapısına uygun şekilde iyileştirme özelliğine sahip olabilmektedirler (Lee, Kasper et al. 2014).

Hidrojel, kullanılan biyomateryaller arasında yüksek su tutma kapasitesine sahip olmaları sebebiyle önemli bir yere sahiptirler. Hücre içerikli biyomateryalin canlıya implantasyonu sırasında hücrelerin ve biyolojik faktörlerin aktivitelerini koruması için uygulayan kişiye yeterli miktarda zaman sağlamaktadırlar (Sivashanmugam, Arun Kumar et al. 2015). Bunun yanısıra hidrojel minimum cerrahi müdahale ile derin yara dokularına ulaşabilmekte ayrıca hasarlı bölgenin şeklini alabilmekte bu

sayede dokuda daha düşük oranda skar yapısı, acıyla ilişkili infalamasyon ve enfeksiyon riski yaratmaktadırlar (Sivashanmugam, Arun Kumar et al. 2015).

İyonik bağlanmayla elde edilen hidrojel mikroküreler, sahip oldukları küre simetrisi sayesinde besin ve oksijen taşınımı açısından diğer simetrilere göre daha verimli olabilmekte, enjekte edildiği dokuların 3 boyutlu şekillerine kolaylıkla adapte olabilmektedirler. Mikroküreler, in-vitro tek tabakalı hücre kültürlerinde yaşanan fibro-bağ farklılaşması sorununa 3 boyutlu polimer matriks yapısı sayesinde çözüm sunabilmekte, sahip olduğu geniş yüzey alanı sayesinde ise in-vivo hücre transplantasyon çalışmalarında kolaylıkla kullanılabilirler (Leong and Wang 2015). Ayrıca üretilen mikrokürelerin arasındaki boyut farklılıklarının en fazla %5 oranında değişiklik göstermesi sebebiyle in-vitro analizlerde kullanım kolaylığı sağlamaktadır (Leong and Wang 2015).

Hücrelerin polimer iskelete tutunmasını sağlayacak pek çok teknik bulunmaktadır (Hashemi and Kalalinia 2015). Bunlardan polimer çözeltisinin içerisine hücrelerin karıştırılması ve sonrasında bu karışımın bir şırınga içerisinden çapraz bağlayıcı çözeltisine damlatılması ile elde edilen mikroküre enkapsülasyon tekniği ile hücrelerin polimer matriks içerisine yüksek verimlilikte tutunmaları sağlanmakta, hücreler buldukları orjinal morfolojilerini koruyarak çevrelerindeki dokuyla besin ve biyosinyal molekülü transferi yapabilmekte hücre canlılıkları korunabilmekte, kullanılan materyalin uygunluğuna göre immunojenik yanıt düşürülebilmekte, ve gerekli görülürse hücreler farklı hücrelere mikroküreler içerisinde farklılaştırılabilirler (Hashemi and Kalalinia 2015).

Deniz yosunlarından elde edilen aljinat anyonik polisakkariti, biyoyumlu, biyobozunur, non-toksik ve suda çözünebilir olmasından ötürü doku iskelesi çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır (Lee and Mooney 2012). Aljinat, multivalent bir katyon olan Ca^{+2} ile çapraz bağlandığında stabil bir yapı göstermekte, ayrıca mikroküre enkapsülasyon tekniği ile aljinat polimerinin içerisinde hücrelerin büyük bir kısmı enkapsüle olarak hücre canlılıklarını koruyabilmektedirler (Lee and Mooney 2012).

Osteokondral yaralanmalar sonucu oluşan hasarlarda kıkırdak dokusunun kendini iyileştirmesinde büyük zorluklar yaşanmaktadır (Debnath, Shalini et al. 2015). Literatürde belirtilen çalışmalarda, artiküler bağ dokusu dejenerasyonu sonucu oluşan hasarlara, doğrudan iki boyutlu kültür flasklarında üretilmiş allojenik kondrositler enjekte edilerek dokuların iyileştirilmesi sağlanmaya çalışılmış, ancak bu bölgedeki hücrelerin tutundukları dokular da dejenere veya kayıp olduğu için kondrositlerin bu ortamda orjinal küresel şekillerini koruyamadıkları buna bağlı olarak da farklı tipte bileşenler sentezledikleri (dedifferansiyasyon) gözlemlendiği belirtilmiştir (Debnath, Shalini et al. 2015). Bu sebeple yaptığımız çalışmada dejenere olmuş dokuyu tamir etmek amacıyla orijinal dokudaki ortam koşullarının benzerini aljinat mikroküreler içerisinde sağlayarak kondrositlerin üç boyutlu küresel morfolojilerini mikroküre içinde tekrar kazanmalarını ve doku iyileşmesini hızlandırıcı etkisi olan gerekli ekstrasellüler bileşenleri sentezlemeleri hedeflenmektedir.

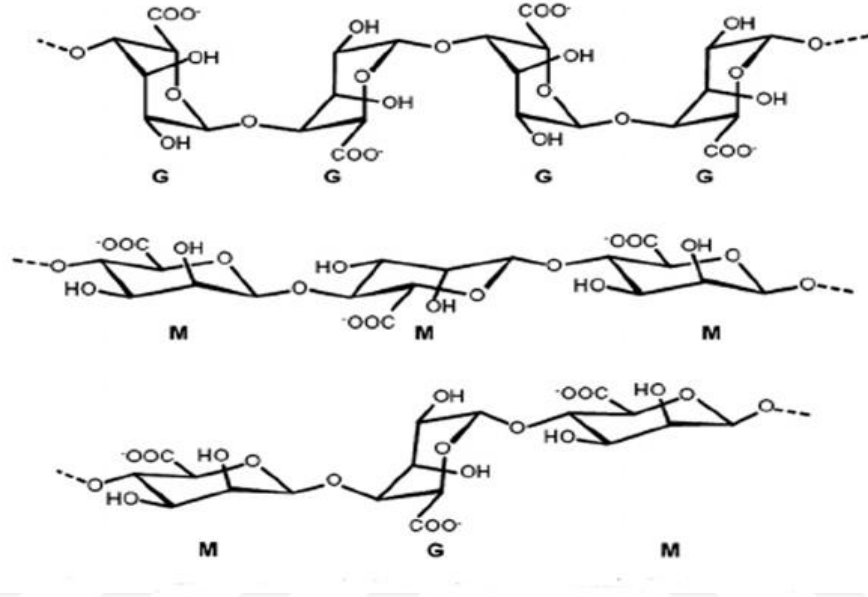
1.1 Kullanılan Biyopolimerler

Biyomateryaller canlı temelli kaynaklardan elde edilen bileşenler olup, doku mühendisliğinde bu kavram biyolojik sistemelerin dokularına, organlarına ya da vücudun çeşitli fonksiyonlarına değerlendirme, uygulama yapılması ya da yerine konması aracılığıyla arayüz oluşturması hedeflenen ara materyaller olarak tanımlanmaktadır (Lee and Mooney 2012). İmplant edilebilir iskeletlerde dikkat edilmesi gereken hususlar özetle; vücuda olan uyumluluğu, mekanik özellikleri, iskelet morfolojisi ve porozitesi, doku açısından iyileştirme gücü ve dokunun yerini alabilme kapasitesidir (Croisier and Jérôme 2013). Yaptığımız çalışmada kullanmış olduğumuz biyomateryaller sırasıyla anlatılmıştır.

1.1.1 Aljinat Polimeri ve Doku Mühendisliği Alanında Kullanımı

Aljinat, kahverengi deniz yosunlarından ve topraktaki bakterilerden elde edilen ve pek çok biyomedikal uygulamalarda biyoyumluluğu, düşük toksisitesi, düşük maliyeti ve Ca^{+2} gibi divalent katyonların eklenmesiyle sağlanan kontrol edilebilir

jelleşme özelliği sebebiyle sıkça kullanılan anyonik bir biyopolimerdir. Aljinat hidrojenleri çeşitli çapraz bağlama yöntemleriyle hazırlanabilmekte olup canlı dokuların ekstrasellüler matrikslerine olan benzerliklerinden ötürü yara iyileşmesinde, ilaçlar ve proteinler gibi biyoaktif kimyasal bileşenlerin taşınmasında ve hücre transplantasyonunda kullanılmaktadır (Lee and Mooney 2012).



Şekil 1.1. Aljinatın yapısında bulunan gulukuronik asit (G) ve mannuronik asit (M) zincirlerinin aljinat polimerinde zincir oluşturma şekilleri (Chapman and Chapman 1980, Gåserød, Smidsrød.1998).

Ticari olarak satılan aljinat genellikle kahverengi alglerin (*Phaeophyceae*) *Laminaria hyperborea*, *Laminaria digitata*, *Laminaria japonica*, *Ascophyllum nodosum* ve *Marocystis pyrifera* türlerinin NaOH gibi sıvı alkali çözeltilerinde bekletilerek elde edilmektedir. Ekstrakt filtre edildikten sonra aljinatın dibe çökmesi için filtrata sodyum klorit ya kalsiyum klorit eklenmektedir. Sonrasında elde edilen aljinat tuzu seyreltilmiş HCl uygulaması ile aljinik asite dönüştürülmektedir. Saflaştırma ve dönüştürme işlemlerinden sonra suda çözünebilen aljinat tozu elde edilir. Bu çok basamaklı ekstraksiyon işlemleriyle saflaştırılan aljinat hayvanlara implante edildiğinde herhangi bir yabancı vücut reaksiyonunu tetiklememektedir (Lee and Mooney 2012).

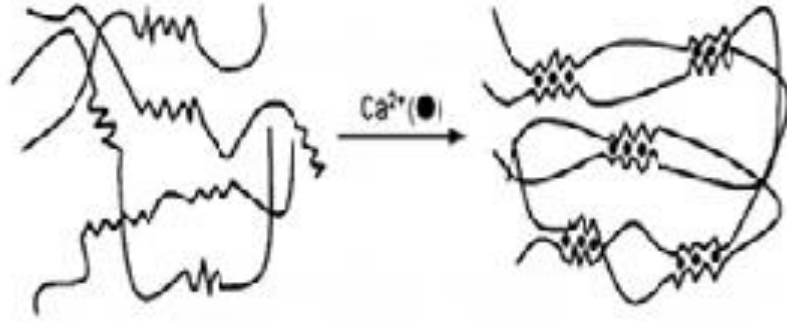
Aljinat kimyasal olarak çizgisel kopolimerlerden $\beta(1,4)$ D-mannuronat (M) ve α -L-guluronat (G) kalıntılarının bloklarını içermektedir. Bu bloklar ardışık M zincirlerinden (MMMMMM), ardışık G zincirlerinden (GGGGGG) ya da hem G hem M zincirlerinden oluşmaktadır (GMGMGM). Aljinatın sadece G bloklarının Ca^{+2} gibi divalent katyonlarla moleküller içi çapraz bağlandığı düşünülmektedir. Bu yüzden sekans bileşimi (M/G oranı), G-blok uzunluğu ve moleküler ağırlığının aljinatın ve ondan elde edilen hidrojel formunun fiziksel özellikleri üzerine etki ettiği sonucuna varılmaktadır (Lee and Mooney 2012). Örneğin aljinat pelletlerinde %70'den fazla guluronik içerik varsa ve gluluronik bloklarının ortalama uzunluğu 15'den fazlaysa oluşan yapı düşük büzülme, iyi bir mekanik güç ve iyi bir mekanik stabiliteye sahip olmakta ancak daha büyük por çapları içermektedir. Yüksek porozite küçük boyutlu ilaçların salınım açısından dezavantaj yaratmakta, ancak hücreler gibi daha büyük porozif yapılara ihtiyaç duyan sistemler için hücre immobilizasyonunda kullanılması uygun görülmektedir. Bunun yanında mannuronik asit içeriği yüksek olan aljinatların implant sistemleri için daha yüksek biyoyumluluk gösterdiği belirtilmiştir. Bu yüzden tercih edilecek aljinat içeriğinin yapılacak çalışmaya uygun olarak optimize edilmesi gerekmektedir (Goh, Heng et al. 2012).

Laboratuvarlarda kullanılan sodyum aljinatın moleküler ağırlığı 32.000 ve 400.000 g/mol aralığında değişmektedir. pH düştükçe aljinatın vizkozitesi artmakta ve pH 3-3,5'ta aljinat iskeleti protonlanmış hale getirilip hidrojen bağları oluşturarak vizkozitesi maksimum düzeye çıkarılmaktadır. Aljinat çözeltisinin hep yüksek moleküler ağırlıklı polimer bloklarından oluşması vizkozitesini oldukça arttırmaktadır. Bu genellikle istenmeyen bir durumdur, çünkü hücre enkapsülasyonunda karıştırma ve enjeksiyon aşamalarında yüksek vizkoziteden kaynaklı gerilim stresi oluşabilmekte ve bu durum hücrelere veya protein yapılarına zarar verebilmektedir. Ayrıca aljinatın elastik dayanımı oldukça arttırılabilmekte, bu da düşük ve yüksek molekül ağırlıklı bloklarının benzer oranlarda karıştırılmasıyla sağlanabilmektedir. Aljinatın amfifilik türevleri uzun alkil zincirlerinin aljinat yapısına ester bağları aracılığıyla katılmasıyla sağlanabilmektedir. Bu yeni türevler fiziksel olarak çapraz bağlanmış jel benzeri ağlar oluşturmakta bunlar da bağ dokusu rejenerasyonunda ve tamirinde başarılı bir şekilde kullanılabilir (Lee and Mooney 2012).

Aljinat biyopolimeri memeli hücrelerinin tutunmasında hücrelerle zayıf bir etkileşim göstermektedir. Bu yüzden uygun ligandların kullanımı ile özellikle hücre kültüründe ve doku mühendisliği uygulamalarında aljinatın hücresel etkileşimi artırılabilir. Bu ligandlara örnek olarak arjinin-glisin-aspartik asit (RGD) protein sekansları verilmektedir. Bu sekansların aljinat jeline katılıp yapıldığı çalışmalarda çeşitli hücre tiplerinin hücrelerin aljinat matriksine tutunmalarında ve hücresel etkileşimlerinde artış olduğu görülmüştür (Lee and Mooney 2012).

Aljinatın fizikokimyasal özelliklerinden biri olan vizkositesi aljinatın konsantrasyonuna ve aljinat segmentlerindeki monomer birimlerinin uzunluğuna ve sayısına bağlıdır. Gulukuronik asit zincir oranı yüksek olan sodyum aljinatın suda çözünürlüğü mannuronik asit zinciri oranı yüksek olan sodyum aljinata göre daha yüksek olduğu görülmektedir. Aynı konsantrasyonlarda, uzun zincirlere sahip olan aljinat daha yüksek vizkosite göstermektedir. Ayrıca buna bağlı olarak aljinatın polimerik segmentlerdeki moleküler ağırlığı aljinatın vizkositesine etki etmektedir. Deniz yosunlarından elde edilen aljinattaki bu özellikler bakterilerden elde aljinatta daha farklıdır. Bu yüzden tercih edilen aljinatın hangi kaynaktan elde edileceği önemlidir. Aljinat jellerin termal (ısısal) stabilitesini sağladığı sıcaklık aralığı 0-100 °C'dir. Sıvı aljinatın çözeltisinin çözücü-jel dönüşümü ortamda çapraz bağlayıcı katyonlar olduğu zaman gerçekleşmektedir. Genellikle çapraz bağlanmış aljinat jelleri üç mekanizmada gerçekleşmektedir: Dışsal jelleşme, içsel jelleşme ve soğutarak jelleşme. Dışsal jelleşmeyle gerçekleşen büyük veya mikro pellet yapılarının şekil alması için aljinat-ilaç karışımı çapraz bağlayıcı çözeltisine çok küçük boyutlara çekilmiş (atomize) halde damlatmayla ya da kalıplamayla gerçekleşir ve bu sırada katyonik bileşenler aljinat çözeltisine dıştan içe şekilde difüze olur. İçsel jelleşmede ise çözülmeyen kalsiyum tuzları (kalsiyum karbonat) ilk olarak aljinat-ilaç çözeltisine katılır sonrasında ise susuz asetik asitle pH ayarlaması yapılarak kalsiyum iyonları serbest kalırlar ve böylece jelleşme içsel jelleşmede her bölgede daha homojen şekilde gerçekleşir. Son olarak soğutarak jelleşmede ise aljinat, kalsiyum tuzu ve kalsiyumun metal bağlayıcısı 90°C gibi yüksek sıcaklıkta çözülmekte ve sonrasında soğutulmakta. Yüksek sıcaklıkta aljinat zincirleri normal polimerik uyumluluğu bozularak polimerik yan zincirler kovalent olmayan moleküller içi bağlarını tersinir olmayacak şekilde kaybederler. Düşük sıcaklıklara soğutma işlemiyle moleküller içi bağlar tekrar organize olurlar ve 3 boyutlu yapıların

tekrar farklı formasyonda oluşması sağlanarak homojen bir matriks yapısı sağlanmış olur (Goh, Heng et al. 2012).



Şekil 1.2. Aljinatın çapraz bağlanmasıyla kalsiyum aljinat hidrojellerinin oluşturulması (yumurta-kutu modeli). Kalsiyum ile sadece guluronate blokları çapraz bağlanmaktadır (Lee and Yuk, 2007).

Polivalent katyonlar, poligluronat segmentlerinin içinde bulunan sodyum iyon kalıntılarındaki bağlama noktalarına bağlanırlar ve çapraz bağlı bir “yumurta-kutu” modeli oluştururlar. Aljinat moleküllerindeki G-kalıntısında şelatlanma guluronik asit gruplarının birbirleriyle van der Waals kuvvetleriyle iyonik bağlanarak üç boyutlu bir yapı oluşturmasıyla sonuçlanmaktadır. Divalent alkali iyonları temel olarak (Ca^{+2} , Ba^{+2} ve Sr^{+3}) GG segmentlerine bağlanmaktadır. Bunlardan Ca^{+2} 'un tercih edilmesinin sebebi suda çözünen formunun hücrelere daha az sitotoksik etki göstermesi ve kolay elde edilebilirliğidir (Goh, Heng et al. 2012).

Aljinat ilaç endüstrisinde kimyasal ilaçların taşınımında, protein taşınımında, hücre kültüründe ve doku mühendisliği uygulamalarında olduğu gibi çok çeşitli kullanım alanları bulunmaktadır. (Lee and Mooney 2012). Yapılan bir çalışmada kısmen okside edilmiş aljinatın jel formuna flurbiprofen yüklenmiş ve bu ilaç yaklaşık 1,5 saatte salınmıştır. Başka bir çalışmada kitosanla karıştırılmış aljinat mikroküreleri iyonotropik jelleşme metodu ile oluşturulmuş ve bu mikroküreler farelere oral yolla verilip *Helicobacter pylorinin* baskılanmasında başarıyla uygulanmıştır. Genel olarak

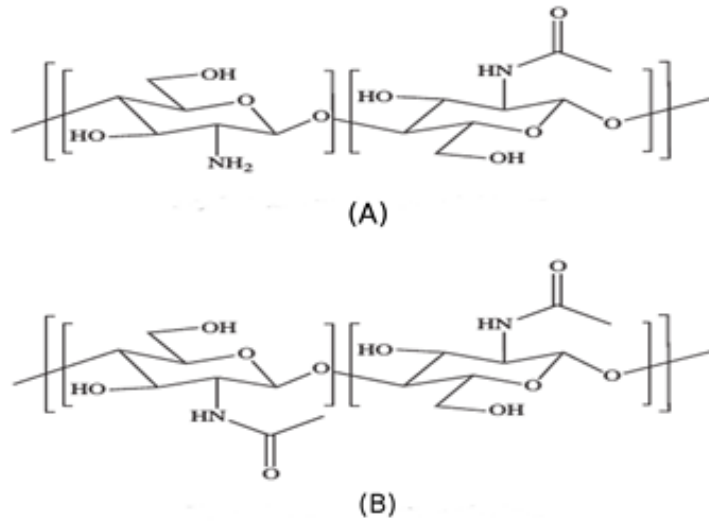
protein iletimi açısından proteinlerin aljinat mikrokürelerden salınımı aljinatın geniş çaplı porozif yapısı ve hidrofilik özelliğinden ötürü hızlı gerçekleşmekte olmaktadır, damarsı endotelial büyüme faktörü (VEGF) ve temel fibroblast büyüme faktörü (bFGF) gibi faktörlerin salınımındaysa aljinata tersinir bağlanma özelliklerinden ötürü bölgesel ve kontrol edilebilir bir salınım gerçekleşmektedir. Bunun yanısıra iyonik olarak çapraz bağlanan aljinat mikrokürelerinde lizozim veya kemotripsin gibi enzim yapısı gösteren proteinlerin fiziksel olarak sodyum aljinatla çapraz bağlanabildikleri bu sayede mikrokürelerden kontrollü salınım gerçekleştirilebildikleri görülmüştür. Bu tip çalışmalarda hidrojellerin proteinlerin pH gibi fiziksel etkilerden korunması açısından önemli olduğu belirtilmelidir. Aljinatın anyonik polimerlerle (selüloz asetat ftalat, polifosfat, dekstran sülfat) karıştırılmasıyla elde edilen insülin yüklü aljinat mikrokürelerin gastrik pH'dan korunması için kitosanla kaplandığı ve kontrollü salınımın bağırsaktaki pH'ta başarıyla gerçekleştirilebildiği görülmüştür. Aljinat mikroakışkan bir sistemde ışıkla harekete geçirilmiş kafesli kalsiyum DM-nitrojen bileşiklerinin kullanımıyla 3 boyutlu kültür substratı olarak preosteoblastların (MC3T3) ve insan umbilikal damar endotel hücrelerinin kokültüründe kullanılarak hücre kültür sistemleri için önemli bir alternatif olabileceği gösterilmiştir. Doku mühendisliği uygulamalarında ise aljinat hidrojel formunda ortalama olarak 5 nm por çapına sahip olması sebebiyle proteinlerin salınımında ve jel bozdukça bu çaptan daha büyük moleküllerin ortama salınmasına izin vermektedir. Kan damarları oksijen ve besinin tüm dokulara taşınımında, metabolik atık ürünlerin atılmasında ve kök hücre ve progenitor hücrelerin iletiminde yara iyileşmesi modellerinde önemli bir rol oynamaktadır. İlaç moleküllerinin zamana bağlı kontrollü iletimi yeni damar oluşumunda önemli bir rol oynamaktadır. Plateletlerden elde edilen büyüme faktörleri vasküler endotelial büyüme faktörüyle birlikte aljinat jellerde enkapsüle edilip farelerin kan damarı tıkanıklığı olan arka bacağına enjekte edildiğinde bu ilaçların kan damarı şekillenmesini, olgunlaşmasını ve fonksiyon kazanmasını arttırdığı görülmüştür. Kemiksi yapılarda kemik yaralanmaları zayıf iyileşme yüzünden kısıtlanmış olup aljinat mikroküreler osteoindüktif faktörlerin, kemik oluşturan hücrelerin ya da bunların kombinasyonlarının iletiminde kullanılarak potansiyel bulmuştur. Kemik morfojenik proteinlerinin düşük dozlarda arjinin-glisin-aspartik asit (RGD)-aljinat mikrokürelerde kullanımı ile tamamen iyileşen kritik boyutlu femur defektleri oluşturulmuştur. Primer kondrositlerin ve osteoblastların kotransplantasyonu

büyüme plakası benzeri yapılar oluşturulup fonksiyonunu kaybetmiş epifizlerin potansiyel olarak yer değiştirilmesi sağlanmıştır. Kemik kök hücrelerinin ve kemik morfolojik proteinlerinin (BMP-2) birlikte aljinat/kitosan jellerde hapsedilmesi yöntemiyle farelerde trabeküler kemik formasyonunda olumlu etkisi olduğu görülmüştür. Birbirine içten bağlı porlu yapılar içeren aljinat/hidroksiapatit kompozit iskeletleri faz ayrıştırması metoduyla üretilmiş bu da osteosarkoma hücrelerinin adhezyonunu arttırdığı görülmüştür. Hasar görmüş veya bozunmuş bağ dokusu ortopedi alanında hala zorluklar içermekte olup doku mühendisliği yaklaşımı bağ dokusu rejenerasyonunda gelecek için potansiyel taşımaktadır. Erken çalışmalar kondrosit süspansiyonlarının kalsiyum sülfatla karıştırılmış aljinat çözeltisi eklenmesiyle gerçekleştirilmiş olup önceden şekillendirilmiş bağ dokusunun üretimi amacıyla yüz implant kalıplarına enjekte edilmiştir. Bu yapılar farelere ve koyunlara derialtı olarak enjekte edildiğinde 30 hafta boyunca 3 boyutlu yapısını koruyup doğal bağ dokusundaki proteoglikan içeriğininve kollajenin %80'ine ulaşmayı başarmıştır. Daha önceden tanımlanmış geometriye sahip makro düzeyde porlara sahip aljinat jellerininin kullanıldığı bir çalışmada kateter iğnesiyle mikroküreler elde edilmiş, sonrasında in-situ olarak polimer besiyeri ortamında rehidre edilerek primer sığır artiküler kondrositleri süspansiyonu ile karıştırılmış ve böylece şekil hafızası olan polimerik bir yapı göstererek orijinal şeklini 1 saatte kazanmış, bu da aljinat jelinin bağ dokusu formasyonuna istenilen geometride sahip olmasını sağlamıştır. Başka bir bağ dokusu çalışmasında insan mezenkimal kök hücreleri aljinat mikrokürelerde serum olamayan besi ortamında kültüre edilmiş, ortama dönüştürücü büyüme faktörü (TGF)-B1, deksametazon ve askorbat-2 fosfat bir haftadan fazla sürede verilmiş sonuç olarak büyük osteokondral defektlerde bağ dokusu formasyonunun olduğu gözlenmiştir. Aljinat jelleri merkezi sinir sistemi ve periferik sinir sistemi çalışmalarında da kullanılmış, aljinat temelli yüksek anisotropiye sahip kapiller jeller olgunlaşmış farelerde akut olarak servikal omurilik lezyonlarında denenmiş omurilik parenkimasına entegre edilmiş, herhangi bir inflamatuvar cevap görülmeden yönlendirilmiş aksonal büyüme sağlanmıştır. Aljinat jelleri ayrıca periferik sinir boşluklarını yapıştırmak amacıyla doku yapıştırıcı olarak da denenmiştir. Pankreasta yapılan bir çalışmada pankreatik adacık allograftları ve ksenograftları doku mühendisliği yöntemleri kullanılarak enkapsüle edilmiş sonrasında Tip 1 diyabet tedavisi amacıyla farelere transplante edilmiştir. Burada aljinat enkapsülasyonu ile immunobaskılayıcıların kullanımına gerek kalmadan graft uyumsuzluğunun aşılması

hedeflenmiştir (Lee and Mooney 2012).

1.1.2 Kitosan ve Doku Mühendisliği Alanda Kullanımı

Kitin, selülozdan sonra doğada en çok bulunan ikinci polisakkarit olup onun deasetillenmiş hali olan kitosan çizgisel, yarı-kristalimsi selüloza benzer bir şekilde N-asetil-D-glukozamin (asetilli) ve B-(1-4) D-glukozamin (deasetillenmiş) zincirlerden oluşmaktadır. Doğada bulunduğu kitin formundan alkalın deasetilasyonu ile kitosan formuna dönüştürülerek daha biyoaktif hale getirilmektedir (Choi C. 2016). Kitosan sahip olduğu 6,5 Pka değeri sebebiyle, asit çözeltilerde çözünebilmekte ancak saf suda ve alkalın pH'larda çözünmemektedir (Choi C. 2016). Kitosanın çözünürlüğü deasetilasyon derecesine (DDA) bağlı olup kitosan dendiğinde deasetillenme derecesinin en az 60 (D-glukozamin zincirlerinin en az %60'ı deasetillenmiş) olan kitinden bahsedilmektedir. Kitinin kitosana deasetilleme işlemi alkalın ortamlarda kimyasal hidrolizle ya da kitin deasetilaz gibi enzimlerin varlığında enzimatik hidrolizle gerçekleştirilmektedir. Kitosan, deasetilasyon derecesine bağlı olarak piyasada 300 kDA ile 1000 kDA aralığında bulunmaktadır (Croisier and Jérôme 2013).



Şekil 1.3. Kitin ve kitosanın kimyasal yapısı. (A) Kitosanın kimyasal yapısı. (B) Kitinin kimyasal yapısı (Rinaudo 2006).

Kitosanın sahip olduğu katyonik uçlar, ana zincirinde bulundurduğu primer amino gruplar ve sulu çözeltilerinde pH'a bağlı bir çözünlüğe sahip olması sebebiyle biyomedikal sektöründe ilaç/gen/hücre taşınımında, endüstriyel su arıtma işlemlerinde, ağır metal biriktirilmesinde, yiyeceklerin fonksiyonelleştirilmesinde ve kozmetik sektörlerinde kullanılmaktadır (Croisier and Jérôme 2013).

Asidik ortamlarda kitosanın amino grupları pozitif olarak yüklenmekte ve böylece musin bileşiiyle etkileşime girebilmektedir. Deasetilleme arttıkça kitosanın mukoadhezyonu da ona bağlı olarak artış göstermektedir. Kitosanın homeostatik aktivitesi kitosanın omurgası üzerindeki pozitif yüklerle sağlanmaktadır. Örneğin kırmızı kan hücrelerinin membranları negatif olarak yüklü olduğundan pozitif yüklü kitosana etkileşime girebilmektedir (Croisier and Jérôme 2013).

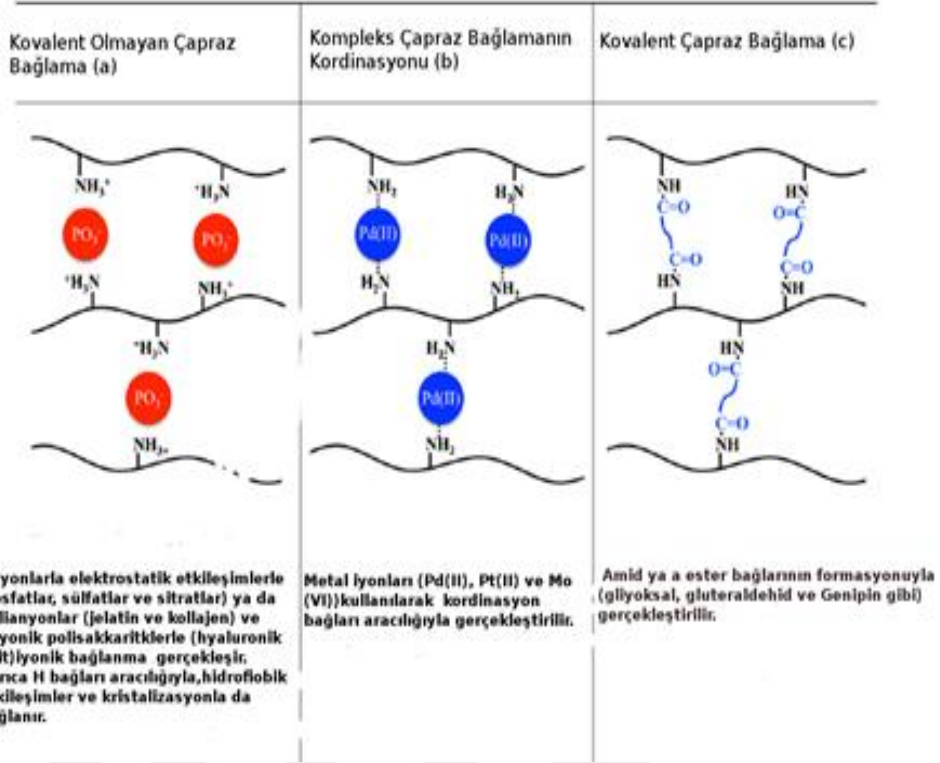
Kitosanın antimikrobiyal aktivitesi oldukça kompleks bir yapıya sahiptir. İki ana mekanizma kitosanın antimikrobiyal ve antifungal aktivitesini açıklamaktadır. Bunlardan birincisinde pozitif yüklü kitosan hücrelerin yüzeyindeki negatif yüklü membran zarlarıyla etkileşime girebilmekte buna bağlı olarak mikroorganizmaların hücre geçirgenliğini baskılamaktadır. İkinci mekanizmada ise hücre DNA'sıyla bağ kurup mikrobiyal RNA sentezini inhibe etmektedir (Croisier and Jérôme 2013).

Kitosanın polikasyonik doğası kitosanın analjezik etkisini açıklamaktadır. Amino gruplarının D-glukozamin kalıntıları ortamda proton iyonları olduğunda protonlanmakta ve inflamatuvar bölgesinde analjezik bir etki yaratmaktadır (Croisier and Jérôme 2013).

Kitosanın doğal bir polisakkarit olması onun parçalanabilir glikosidik bağlara sahip olmasını böylece biyobozunur bir yapıya sahip olmasını da sağlamaktadır. Kitosana, lizozim gibi bazı proteazlarla in-vivo ortamda parçalanmakta ayrıca insanda tanımlanmış 8 tane kitinaz enzimi bulunmaktadır. Parçalanması sonucu oluşan polisakkaritler toksik olmayan çeşitli uzunluklarda oligosakkaritlere dönüşmektedir. Kitosanın biyobozunurluk hızı deasetilasyon derecesine bağlı olduğu kadar N-asetil D-glukozamin kalıntılara ve kitosanın moleküler kütesine de bağlıdır. Kitosanın deasetilasyon derecesi düşürüldüğünde onun kristallii de bozulmakta buna bağlı olarak biyobozunurluk hızı düşmektedir. Ayrıca daha küçük kitosana zincirlerine

sahip kitosan karışımları oligosakkaritlere daha hızlı bozunmaktadır. Ayrıca kitosanın sahip olduğu biyouyumluluk özellikleri sebebiyle doku mühendisliği açısından 3 boyutlu iskelet tasarımları için önemli bir alternatif teşkil etmektedir (Croisier and Jérôme 2013).

Jeller katı faz bileşenlerinden oluşmakta olup genel olarak sıvı fazda %10'dan daha az oranda hacme sahip olmaktadır. Hidrojellerde sıvı faz genelde sudur. Sahip oldukları yüksek su tutma kapasitesi sayesinde canlı dokuların büyük bir kısmı için uyumluluk gösterirler. Hidrojeller yumuşak ve eğilebilirler, bu sayede hastaya implante edildiklerinde diğer alternatiflerine nazaran minimum zarar vermektedirler. Tamir edilecek yumuşak dokunun mekanik özelliklerini taklit edebilirler. Bu yüzden hidrojeller biyomedikal alanda polimerik iskeletler olarak ilaç ve büyüme faktörü iletiminde kullanılmaktadırlar. Kitosan hidrojelleri geri dönüştürülebilir ve geri dönüştürülemez jelleşme ile üretilebilmektedirler. Fiziksel olarak üretilen hidrojel terimi yapısında bulunan polimerik zincirlerinin geri dönüştürülebilir etkileşimlerine dayanmaktadır. Bu etkileşimler kovalent olmayan yapıya sahip olup elektrostatik etkileşimler, hidrofobik etkileşimler ve hidrojen bağlarını içermektedir. Kitosan herhangi bir ek maddeye gerek duymadan kendiliğinden jelleşebilmektedir. Ancak sahip olduğu fiziksel özelliklerini güçlendirmek amacıyla PVA veya PEG gibi başka polimerlerle etkileşime sokulabilmektedirler. Isıya duyarlı kitosan hidrojeli elde etmek için poliol tuzları ve gliserol fosfat disodyum tuzları kullanılmaktadır (Croisier and Jérôme 2013).



Şekil 1.4. Kitosanın çapraz bağlanması. (A) Kovalent olmayan. (B) Kompleks kovalent çapraz bağlama. (C) Kovalent çapraz bağlama (Croisier and Jérôme 2013).

Kitosan pozitif yüklü iyonlara sahip olduğu için fosfat, sülfat ve sitrat gibi negatif yüklü moleküllerle etkileşime sokularak hidrojel formuna getirilebilmektedir. Değişen konsantrasyonlarda ve anyonik türlerde D-glukozamin ve N-asetil-D-glukozamin birimleri elde edilen hidrojellerde iyi bir ayarlanabilir şişmeyi sağlamaktadırlar (Croisier and Jérôme 2013).

Büyük negatif yüklü moleküller doğal ve sentetik polianyonlar da kitosanla jel oluşturmaktadır. Doğal polianyon kategorisinde proteinler (jelatin, kollajen, keratin, albumin ve fibroin), anyonik polisakaritler (hyaluronik asit, aljinat, pektin, heparin, ksantan, dekstran sülfat, kondroidin, fukoidan), karboksimetil selüloz ve glikozaminoglikanlar ile jel yapıları elde etmek için kullanılmıştır. Ayrıca elektrostatik etkileşimler hidrojen bağlanması gibi ikincil etkileşimlerle birlikte gerçekleşmektedir. Ancak pozitif yüklü kitosanın anyonlar ve polianyonlarla yaptıkları ikincil etkileşimler bu ikincil bağlanma tiplerinden daha güçlüdür. İyonik kitosanın hidrojelinin oluşturulması herhangi katalizöre veya toksik reaktif kimyasala

ihtiyaç duymaması aynı zamanda biyomedikal uygulamalar için bir gerekliliktir (Croisier and Jérôme 2013).

Kitosan sahip olduğu hidroksil ve amino gruplarından, amid ve ester bağlanmalarla hidrojel formu oluşturabilmektedir. Ayrıca kitosan aktive edilmiş bu fonksiyonel hidroksil ve amino gruplarından ışınla tetiklenerek veya enzimatik katalitik reaksiyonlarla modifiye edilebilmektedir. Kitosan, Pt(II), Pd(II) ve Moo(II) gibi metal iyonlarıyla koordine kovalent bağları da yapabilmekte ancak bu tip kovalent bağlı bileşikler biyomedikal uygulamalar için daha az uygundur. Bunun yanında metal iyonları yerine başka polimerler de kitosanın kovalent bağlı bir hidrojele dönüşmesi için kullanılmaktadır. Elde edilen hidrojeller iyonik etkileşimle çapraz bağlanan hidrojellere göre jelleşmenin tersinir olmaması sebebiyle daha stabil yapı sergilemektedir. Bu tip kovalent bağlı hidrojel elde edebilmek için kitosanın primer yapısında kimyasal modifikasyon yapması gerekmekte bu da amino gruplarının dahil edildiği modifikasyonlarda onun kitosanın temel özelliklerini değiştirmektedir. Bunun yanında reaksiyon sonucu oluşan toksik kalıntıların kimyasal kontaminasyona yol açabilmektedir. Son zamanlarda doğal kaynaklardan elde edilen genipin çapraz bağlayıcısı ($C_{11}H_{14}O_5$) alternatif bir çapraz bağlayıcı olarak kullanılmaya başlanmıştır. Genipinle yapılan çapraz bağlanmalar diğer sentetik bağlanmalarla sağlanan çapraz bağlanmalara göre daha uzun sürede parçalanmakla beraber, henüz in-vivo toksisitesi konusunda net bir sonuca varılmış değildir. Genipin proteinlerle ve kitosanın da yapısında bulunan amino gruplarıyla çapraz bağlanma yapabilmektedir (Croisier and Jérôme 2013).

Sünger açık poroziteye sahip köpüklere verilen addır. Bu katı sahip oldukları mikro porozif yapıları sayesinde yapılar yüksek miktarlarda akışkanı (neredeyse kuru hacminin 20 katı) absorbe edebilmektedir. Kitosan süngerler genel olarak yara iyileşmesi materyali olarak kullanılmaktadır. Doku bir yandan iyileştirirken diğer yandan yara üzerinde oluşan atıklarını emmektedirler. Ayrıca kemik doku mühendisliği alanında dolgu maddesi olarak kullanılmaktadırlar. Bu süngerler dondurma kurutma (liyofilizasyon) işlemi ile elde edilmekte, kitosanın sıvı çözeltisinin dondurulup düşürülmüş basınç altında süblimleştirilmesiyle porozitesi yüksek yapılar elde edilmektedir. Çapraz bağlı kitosan süngerleri, -norfloksazin antibiyotik ilacı ile yüklenmiş olarak- çözücü buharlaştırma tekniği kullanılarak

hazırlanmaktadır. Fibriller bir yapı elde edilmekte bu süngerler yara örtüsü olarak gelecek vaat etmektedirler. Bunun yanısıra süperkritik karbondioksit kullanımı ile kitosan iskeletlerinde daha porozif bir yapı sağlanılmaya çalışılmaktadır (Croisier and Jérôme 2013).

Kitosanın iki boyutlu iskelet yapılarına filmler ve porlu membranlar örnek verilebilir. Kitosan filmler kitosanın tuzlu çözeltilerine ıslak döküm sonrasında kurutma ile devam edilir (genel olarak fırın veya infrared (IR) kurutması). Örneğin HemCon bandajları hemostatik örtü olarak kitosan asetat formülasyonu olarak tasarlanmıştır (Croisier and Jérôme 2013).

Kitosan filmlerin özellikleri fizikokimyasal proseslerle güçlendirilebilmektedir. Filmlerin üzerine azot ya da argon plazması uygulamasıyla film yüzey pürüzlülüğü ve hücre adhezyonu ve proliferasyon kapasitesi arttırabilmekte, ozon veya UV radyasyonu kullanılarak kitosanın depolimerizasyonu ile kitosan içeren filmlerin yüzey modifikasyonu yapılabilmekte, silika partikülleri ya da polietilenglikol ile etkileşime sokularak makro ve mikro porozitesi yapay olarak modifiye edilebilmektedir (Croisier and Jérôme 2013).

Kitosanın nanopartiküllerle birleştirilmesi ile oluşan yeni karışımda sağlanan sinerjistik iyileşmede performansı arttırmaktadır. Gümüş (Ag) nanopartiküllerinin antibakteriyel etkisi ispatlanmış olup gümüş temelli yara örtüsü olarak kullanıma sunulmuştur (Croisier and Jérôme 2013).

Kitosandan fiber eldesinde erken tekniklerde asetik asit, lityum klorit ya da N,N-dimetilasetamid çözeltilerinden kuru ve ıslak spinleme yöntemiyle fiber elde edilmiştir. Kitosandan elde edilen fiberlerin maliyetini düşürmek için sodyum aljinat, tropokollajen, selüloz, sodyum hyaluronat, sodyum heparin, sodyum kondroidin sülfat, poliakrilik asit gibi polimerlerle karıştırılması tercih edilmiştir. Güncel uygulamalarda ise elektrospinlemeyle mikrometreden nanometreye boyutları ayarlanabilir kitosan fiberler elde edilmeye başlanmıştır. Elektrospinlemede yüksek voltajda elektrikle yüklenmiş polimer çözeltisi fiber formasyonu üretimini sağlamaktadır. Ayrıca bu yöntemle elde edilen fiberlerde yüksek porozite, yüksek spesifik yüzey alanı sağlanabilmekte ve bu sayede doğal hücre dışı matris taklit

edilebilmektedir. Elde edilen fiberler yara iyileşmesinde ve doku mühendisliği uygulamalarında kullanılabilir. Ayrıca elektrospunlenmiş kitosan fiberlerle trifloroasetik asit, diklorometan kullanılarak fiberin saflığı ve homojenitesi artırılmış; polietilen glikol (PEG), polietilen oksit (PEO), polilaktik asit (PLLA), polivinil alkol (PVA), polietilen tereftalat (PET), polivinil pirolidon (PVP) gibi polimerlerle ise hücre tutunması, hücresel canlılığı ve hücre morfolojisinin korunması gibi avantajlar sağlanmıştır. Chitoflex, elektrospunlenmiş kitosan bazlı bir nanofiber yapıda yara örtüsü olarak piyasada yer almıştır (Croisier and Jérôme 2013).

Kitosan, genetik materyallerin iletiminde Kitosan /DNA nanopartikülleri oluşturularak veya DNA/siRNA polifleks yapıları kurularak gen terapisi amacıyla hasarlı yapıların daha hızlı onarımında veya genetik hastalıklarında tedavisinde çalışmalar yapılmıştır. Kitosanın fizikokimyasal özelliklerinin güçlendirilmesi amacıyla hidrofilik hale getirilmekte (kitosanın trimetilasyonu), hidrofobik materyallerle (stearik asit), katyonik materyallerle (Urekanik asit, imidazol, dietiletilamin) , hedef ligandlarla (arjinin-glisin-aspartik asit, galaktoz, mannoz, laktoz, folaktoz, transferrin), tiyol gruplarıyla (tioglikolik asit, 2-iminotiyolan gibi) ve amino asit ve peptid yapılarıyla (TAT peptidleri gibi) modifiye edilmiş ve bu yapılarla genetik materyallerin transferinde daha başarılı sonuçlar elde edildiği bildirilmiştir (Choi, Nam et al. 2016).

1.2 Hücre İmmobilizasyon Yöntemleri

Canlı hücrelerin çözülmeyen yüzeylere tutturulması, biyomedikal alandaki güncel çalışmalarda giderek önem kazanmaktadır. Tarihsel olarak biyoteknoloji alanında kompleks protein yapılarının immobilizasyonu ile kimya endüstrisinde yeni bir alan çalışılmaya başlanmış, enzimlerin sanayideki proseslerde birden çok defa kullanımını sağlayacak teknikler ortaya çıkmıştır. Bu immobilizasyon teknikleri ile enzim stabilitesinin artırılması, endüstriyel kullanıma uygun üç boyutlu katı yapıların sağlanması, enzim üzerinde kimyasal modifikasyonların daha kolay ve daha stabil halde yapılabilmesi, enzim mikroçevresinin modifikasyonunun sağlanabilmesi, enzimatik aktivite kaybının azaltılması ve enzim inhibisyonunun azaltılması veya

engellenmesi hedeflenmiştir (Guisan, JM 2006). Geçen yüzyılda bu alanda oluşan bilgi birikimiyle immobilizasyon teknikleri, enzimatik proseslerde kullanılan mikrobiyal hücrelerin endüstriyel çapta üretilmesi ve tekrar kullanımı amacıyla geliştirilmiştir. Canlı hücrelerin içinde bulunan enzimlerin doğal yapılarını diğer immobilizasyon tekniklerine nazaran çok daha iyi koruyabilmesi, endüstriyel prosesler için ayırma ve saflaştırma işlemlerine gerek kalmadan ve hatta enzim aktivite kaybına uğramadan kullanılabilmesini sağlayarak hücrelerin ve hücre içindeki organik yapıların saklanabilmesi ve tekrar kullanımı mümkün olmaktadır (Grosse 1990). Son yıllardaki gelişmeler immobilizasyon tekniklerinin biyomedikal alanda doku mühendisliği uygulaması olarak hasarlı hücre ve dokuların tamiri amacıyla hücre transplantasyonunda, biyoteknoloji endüstrisinde büyük miktarlarda hücre üretilmesi elde edilebilmesi amacıyla, in-vivo hücre kültürü çalışmalarında, istenilen hücre kültür klonunun spesifik olarak elde edilebilmesi amacıyla ve sitotoksikite testlerinde kullanıldığı görülmektedir (Uludağ, De Vos et al. 2000)

Hücrelerin immobilizasyonu literatürde 4 temel kategoride incelenmektedir;

- a. Herhangi bir Destek Olmadan İmmobilize Etme (Pellet Oluşturma)
- b. Adsorbsiyon
- c. Hapsetme
- d. Kovalent Çapraz Bağlama (Grosse 1990)

1.2.1 Pellet Oluşturma

Bağlanmaya kesinlikle ihtiyaç duyan immobilize enzim sistemlerinin aksine, hücreler katı bir destek yüzey olmadanda da hücreler birbirlerine bağlanarak immobilize sistemler oluşturabilmektedirler. Mikrobiyal hücrelerde hücre duvarı ve hücre yüzey elektron yükü aracılığıyla gerçekleşen bu olay memeli hücrelerinde sadece hücre yüzeyindeki etkileşimlerle sağlanabilmektedir. Memeli hücrelerinde tüpte pellet oluşturma tekniği herhangi bir desteğe ihtiyaç olmadan in-vitro analizler için kullanılabilir. Yapılan bir çalışmada bir falkon tüpünün dibinde kondrosit

hücreleri santrifüj edilerek pellet halde elde edilmiş ve bu şekilde kültüre edilerek hücre-hücre etkinliklerine bakılmıştır (Debnath, Shalini et al. 2015).

1.2.2 Adsorbsiyon (Yüzeye Tutunma) Tekniği

Pseudomonas, *Saccharomyces*, *Penicillium*, *Streptomyces* içeren geniş çeşitlilikte bir mikrobiyal hücre grubu kieselguhr, tahta, cam, seramik ve plastik yüzeylere tutunma göstermekte ve bazıları adeziv diskler oluşturarak destek materyale tutunmaktadır. Adhezif disk oluşturamayanlar ise hücrelerin yüzey bölgesinde hücre duvarlarındaki bileşenlere bağlı olarak taşıyıcıyla elektrostatik ya da iyonik bölgeler aracılığıyla tutunma gerçekleştirmektedir. Her hücre tipine bağlı olarak hücrelerin tutunma oranları değişmektedir. Örneğin basiller için tutunan hücre sayısı az olmaktadır tutunanların sıkı bir şekilde bağlandıkları görülmektedir. Hücre tutunmasında hücrenin zarının ve hücre duvarının içeriği ve net yükü, fiziksel ortamın pH'ı, destek materyalin bileşen içeriği ve porozitesi önemlidir. Son yıllarda hücrelerin tanımlanması ve saf hücre hattı elde edilebilmesi amacıyla antijenlerle kaplanan mikroküreler adsorbsiyon tekniğini kullanılarak karışık hücre hattından saf hücre hattı elde edilmesi amacıyla kullanılmaktadır (Kuan, Horak et al. 2014).

1.2.3 Hapsetme İşlemi

Yapılan ilk çalışmalardaki hücreler için fiziksel hapsetme yönteminde agar immobilize edilen *Saccharomyces* grubu hücreleri örnek verilmektedir. Aljinat asit polisakkarit ve türevleri ile yapılan immobilizasyon işleminde aljinat çözeltisine karıştırılan hücreler çapraz bağlayıcı $CaCl_2$ çözeltisine karıştırılıp bir aljinat jeli elde edilerek immobilize edilmektedir. Benzer çalışmalar aynı teknik kullanılarak kitosan ve karragenan gibi başka polisakkaritleri; plastik, poliakrilamid, selofan, polietilen, kaprone ve foroplast gibi sentetik bileşenleri ve kollajen gibi proteinleri hücreleri doğrudan jel içinde hapsetme için farklı çapraz bağlayıcılarla gerçekleştirilmiştir. İnsan hücreleri de aynı şekilde hücresel iletim teknikleri amacıyla kullanılmaktadır. Ayrıca başka bir metotta yağlar ile hücre süspansiyonu arasında sıvı bir membran yapısı oluşturularak faz ayrımı sağlanmış hücreler bu membran yapıları içinde

hapsedilmiştir(Guisan,JM2006).

1.2.4 Kovalent Çapraz Bağlama

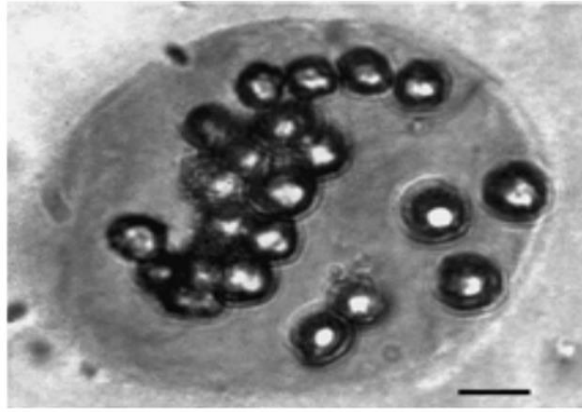
Erken çalışmalarda aktifleştirilmiş inorganik desteklerin ve hücrelerin bir çapraz bağlayıcı aracılığıyla birbirleriyle kovalent bağ oluşturması sağlanmıştır. Destek materyali üzerinde kovalent bağ yapılabilmesi için destek yüzeyinde yüzey modifikasyonları yapılması gerekmektedir. Bu şekilde elde edilen yapılarda kovalent bağlanma sebebiyle yapı stabilitesi daha yüksektir. Ancak çapraz bağlayıcıların sitoksisitesi sebebiyle hüce canlılıkları düşük çıkmaktadır. Bu tip çalışmalara örnek olarak silika kürelere tutturma, glutraldehitte çapraz bağlama, isosiyanat grupları ile birden fazla hücre grubunun destek materyalleri üzerinde (borosilikat, zirkonyum-spinel gibi) birbirleriyle eşlenmesi, metal hidroksit - hücre karboksil ve amino gruplarının reaksiyonuyla jel yapısı oluşturma örnek olarak verilebilir (Guisan, JM 2006).

1.3 Aljinat Hidrojeli Oluşturma Teknikleri

Hidrojeller hidrofilik polimerler içeren üç boyutlu çapraz bağlı ağlar olup yüksek su tutma kapasitesine sahip olmaları, kolay elde edilebilir olmaları, yumuşak bir yapıya sahip olmaları sebebiyle doku mühendisliği uygulamaları için tercih edilen yapılardan bir tanesidir. Bu yapılar genellikle biyouyumlu özellik göstermekte olup vücuttaki makromoleküler bileşenlerin yapılarını andırmakta ve minimal invazif yöntemlerle canlı dokulara uygulanabilmektedirler. Hidrofilik polimerlerin kimyasal ya da fiziksel yöntemlerle çapraz bağlanmasıyla elde edilmektedirler. Hidrojellerin fizikokimyasal özellikleri çapraz bağlanma yöntemine ya da çözünen-çapraz bağlayıcı oranlarına oldukça bağlıdır (Lee and Mooney 2012).

1.3.1 Aljinatın İyonik olarak Çapraz Bağlanması

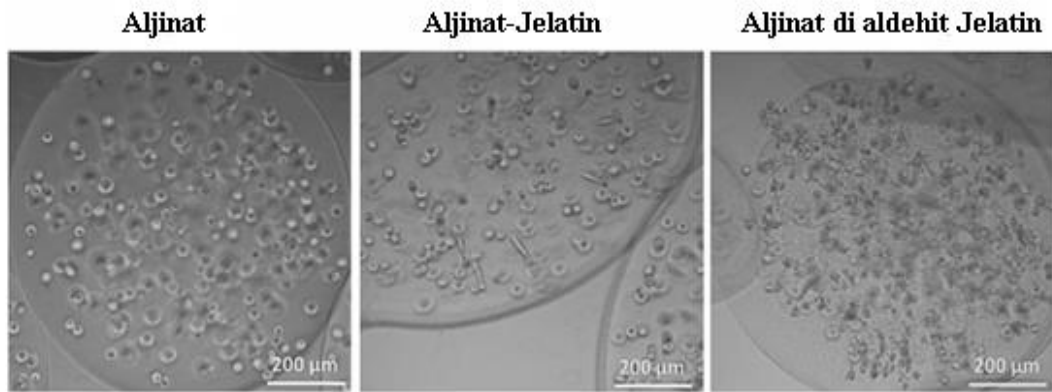
Aljinat polimerlerinin iyonik olarak çapraz bağlanması aljinat çözeltisinin bir çapraz bağlayıcı ile karıştırılmasıyla sağlanmaktadır. Bu çapraz bağlayıcı genellikle bir divalent katyon olan Ca^{+2} iyonu ile sağlanmaktadır. Ca^{+2} diğer divalent katyonlara nazaran daha az sitotoksikite göstermesi ve kolay elde edilebilir olması sebebiyle tercih edilmektedir. İyonik bağlanma kovalent bağlanmaya göre daha düşük stabilite göstermekte olsa bile kısa ve orta vadeli doku rejenerasyonu çalışmaları için gerekli stabiliteyi göstermektedir. Genellikle iyonik çapraz bağlamada jelleşme süresi uzatılarak jelleşme oranı kontrol altında tutulmakta ve daha uniform bir yapı buna bağlı olarak da daha yüksek mekanik dayanım elde edilmektedir. Aljinatın kimyasal yapısı da jelleşme oranına etki etmekte yüksek glukuronat zincir oranına sahip olan polimerik yapıları mekanik olarak daha sağlam olmaktadır. Sıcaklığın jelleşmeye olan etkisinde sıcaklık düştükçe çapraz bağlayıcının reaktivitesi düşmekte, çapraz bağlanma işlemi yavaşlamaktadır (Lee and Mooney 2012).



Şekil 1.5. Aljinat mikrokürelerde oluşturulmuş bir hücre agregatının faz kontrast mikroskopundaki görünümü 25 μm (Masuda, Miyabayashi et al. 2002).

1.3.2 Kovalent Olarak Çapraz Bağlanma

Doku mühendisliği çalışmalarında aljinattaki jelleşmenin mekanik dayanımını arttırmak amacıyla çeşitli kovalent çapraz bağlayıcılarla çalışılmıştır. Çapraz bağlayıcının etkinliği ve bağlanma şekli jelin yapısı üzerine etki etmektedir. Polialdehitguluronat (PAG) ve poliakrilamidhidrazid aljinat jelin mekanik dayanımını arttırmış degradasyon süresini uzatmıştır. Foto çapraz bağlama yöntemiyle yapılan bir çalışmada metakrilatla modifiye edilmiş aljinat lazerle kovalent olarak çapraz bağlanmış korneal dokuların dikişsiz bir şekilde cerrahi olarak kapatılması hedeflenmiştir. Kovalent bağlanmalarla gerçekleştirilen jelleşme işlemlerinde genelde su tutma kapasitesinde büyük bir değişiklik olmamakta ancak jelin sitotoksik etkisi artmaktadır. Bunun önüne geçmek amacıyla bağlama sonrası çapraz bağlayıcının ortamdan uzaklaştırılması araştırılmakta, doğal bileşen bazlı çapraz bağlayıcıların kullanımı denenmektedir (Lee and Mooney 2012).

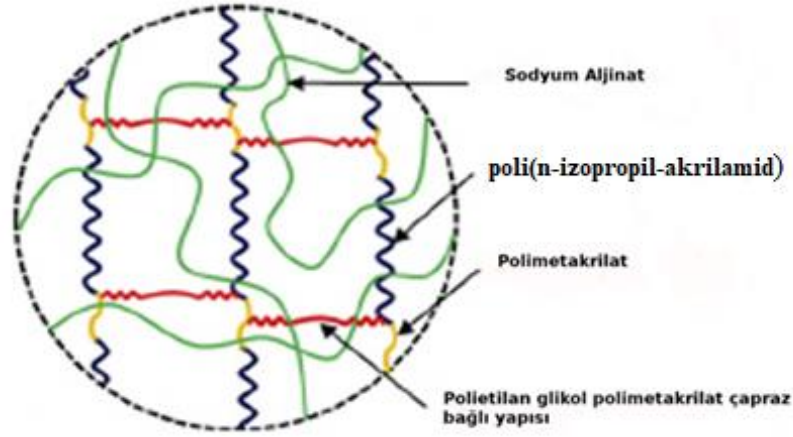


Şekil 1.6. Aljinat Mikroküreler içerisinde Hücrelerin Kovalent Çapraz Bağlanması ile Oluşturulmuş Hidrojel Yapısının Görünümü (Sarker, Rompf et al. 2015).

1.3.3 Termal Jelleşme

Termal jelleşme uygulaması sıcaklığın kontrolüyle biyobozunurluğun ayarlanabilmesi açısından pek çok ilaç taşıyım uygulamasında denenmektedir. Aljinatla yapılan bir çalışmada yarı-etkileşimli polimer ağı oluşturmak için (semi-interperating polymer network) in-situ kopolimerizasyon işlemi aljinat varlığında N-

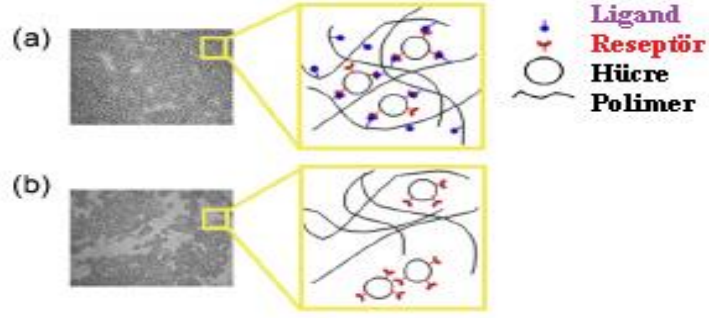
isopropilakrilamid ile polietilen glikol-ko-poli(ϵ -kaprolakton) UV ile vücut sıcaklığına yakın bir sıcaklıkta çapraz bağlanmış bu da aljinat polimerinin mekanik dayanımını artırarak polimer içine yüklenmiş sığır serum albumininin salınımı hızı üzerinde kontrol olanağı sağlamıştır (Lee and Mooney 2012).



Şekil 1.7. Aljinatın polietilen glikolle termal jelleşmesi sonucu oluşturulmuş termal duyarlı aljinat hidrojel yapısı (Zhao, Cao et al. 2010).

1.3.4 Hücrelerin Birbirleriyle Aljinat İçerisinde Çapraz Bağlanması

Aljinatın hücre adezyon molekülleriyle modifiye edilmesi sonucu, hücreler çoklu polimer zincirlerine hücre adezyon ligandlarıyla bağlanarak kimyasal çapraz bağlayıcılar olmadan ağsı yapılar oluşturabilmektedirler. Özellikle arjinin-glisin-aspartik asit (RGD) sekansları ile modifiye edilmiş aljinat çözeltisine hücreler eklenerek tek tip bir yapı elde edilmiş çapraz bağlayıcılar olmadan spesifik ligand etkileşimleri sayesinde kendiliğinden çapraz bağlı ağsı yapılar oluşturulabilmiştir. Elde edilen jellerde gerilim kuvvetine bağlı olarak bir dejenerasyon oluşsa bile hücre aktivitesi sayesinde jel yapılarının tekrar oluşabildiği görülmüştür (Lee and Mooney 2012).



Şekil 1.8. Hücrelerin aljinat aracılığıyla birbirleriyle çapraz bağlanması (hücre-hücre çapraz bağlanması (Lee, Kong et al. 2003).

1.4 Mikroküreler ve Mikroküre Çeşitleri

Mikroküreler partikül büyüklüğü 1 ile 1000 mikrometre arasında değişen sentetik polimerlerden veya biyopolimerlerden oluşan yapılardır (N.R 2015). Bugün biyopolimerlerden, biyoaktif camdan ve seramiklerden mikroküreler elde edilmektedir. Sahip olduğu küresel simetrisi ve mikrodüzeydeki boyutları sayesinde doku mühendisliği alanındaki uygulamalarda mikroküreler doldurulması gereken dokunun şeklini alabilmeyi kolaylaştırmakta, ideal besin, oksijen ve atıklarının atılması için gerekli transfer yüzey alanını en yüksek düzeye çıkarmaktadır. Mikrokürelerin biyomedikal alanda en yaygın kullanımı ilaç taşınımındadır. Kontrol edilebilir ilaç salınım profilleri oluşturabilmesi, nükleik asit ve proteinler gibi kırılabilir ilaçların korunmasında esnek yapı göstermesi, vücutta hemen parçalanabilecek ilaçların matris yapıları içinde korunması sayesinde ilaç kapsülasyonunda kullanılmaktadır. Ayrıca aşıların taşınımında sahip olduğu küresel simetri sebebiyle antijen tanıma hücrelerinin yüzeye tutunmasını kolaylaştırması onları bu alanda ideal hale getirmektedir. Günümüzde ilaç taşınımında en çok tercih edilen mikroküreler polilaktik asit (PLA), polilakti-ko-glikolik asit (PLGA) ve polikaprolakton (PCL)'den elde edilen mikrokürelerdir. Mikrokürelerin yüksek küresel simetri göstermesi sebebiyle iletilmek istenen hücrelerin polimerin yüzeyine tutunması ve antijen tanınmasını kolaylaştırmakta ve bu sayede hücrelerin dokulara iletiminde kullanılmaktadır. Bu amaçla yapılan araştırmalarda OCT-1 osteoblast benzeri hücreler, nöral hücreler, kondrositler ve kök hücreler mikrokürelerle birlikte

kullanılmıştır. Mikrokürelerin porlu bir şekilde üretilmesi sayesinde yapı içerisinde hücreler iletim ağı oluşturabilmekte bu sayede daha iyi proliferasyon olabilmektedirler. Ayrıca geniş bir iç hacme ve yüzey alanına sahip oldukları için besin taşınımı/ atık atılımı yapılabilmekte ve hücre proliferasyonu ve differansiyasyonu sağlayabilmektedirler. Bu avantajlarına rağmen cam malzemeden elde edilen mikrokürelerin kırılmalıklarının yüksek olması, seramik malzemenin hem kırılmalık hem de pahalı ve zor proseslerle elde edilebilmesi, biyopolimerik bazlı mikrokürelerin ise mekanik dayanımlarının zayıf olması onların her alanda kullanılabilmesinin önüne geçmektedir (Hossain, Patel et al. 2014).

Mikroküre temel olarak iki alt başlık altında incelenmiştir:

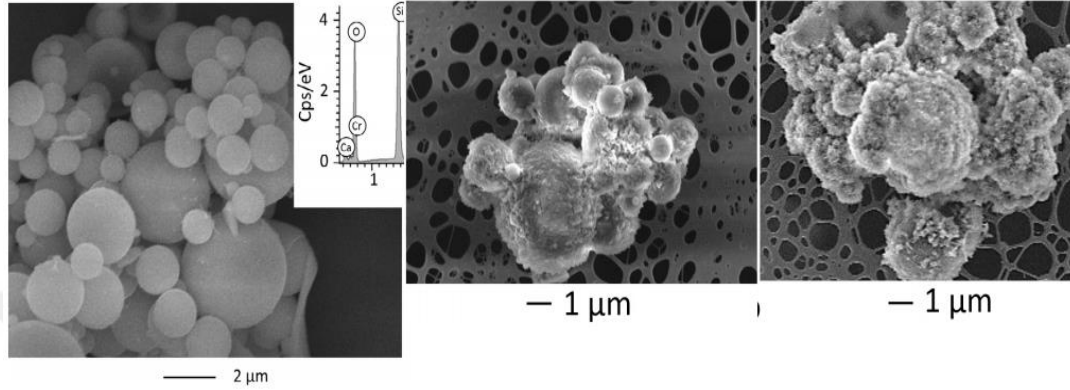
- (a) Mikrokapsül: Polimer içerisine emdirilmiş (hapsedilmiş) bileşenlerin tamamıyla kalın bir kapsül duvarla çevrelenmesi sonucu elde edilen yapılara verilen addır.
- (b) Mikromatriksler: Emdirilmiş (hapsedilmiş) bileşenlerin polimer matriks içerisine homojen bir şekilde her bölgesine dağıtılmasıyla elde edilen yapılara verilen addır (Mujoriya 2012).

Çalışmamızda üretmiş olduğumuz mikrokürelerde tutulan hücreler polimerik matriksin her bir bölgesinde bulunması sebebiyle mikromatriksler alt grubunda yer almaktadırlar.

1.4.1 Cam Mikroküreler

Biyomedikal alanda cam mikrokürelerin kullanımı “Bioglass” adlı materyalin keşfedilmesiyle 1960’ların sonunda kullanılmaya başlanmıştır. Günümüzde 3 tip cam malzeme biyomedikal alanda kendine yer bulmaktadır; silikat bazlı, borat bazlı ve fosfat bazlı. Bu malzemelerden gelişen teknolojiyle beraber yığınlar, çubuklar, diskler ve son olarak fiberler üretilmeye başlanmıştır. Cam mikroküre elde etmede erimiş cam materyali paslanmaz çelik bir malzeme üzerine dökülerek damlalar elde edilmekte, sol-jel, spray kurutma teknikleri ve alevden küreleştirme teknikleri

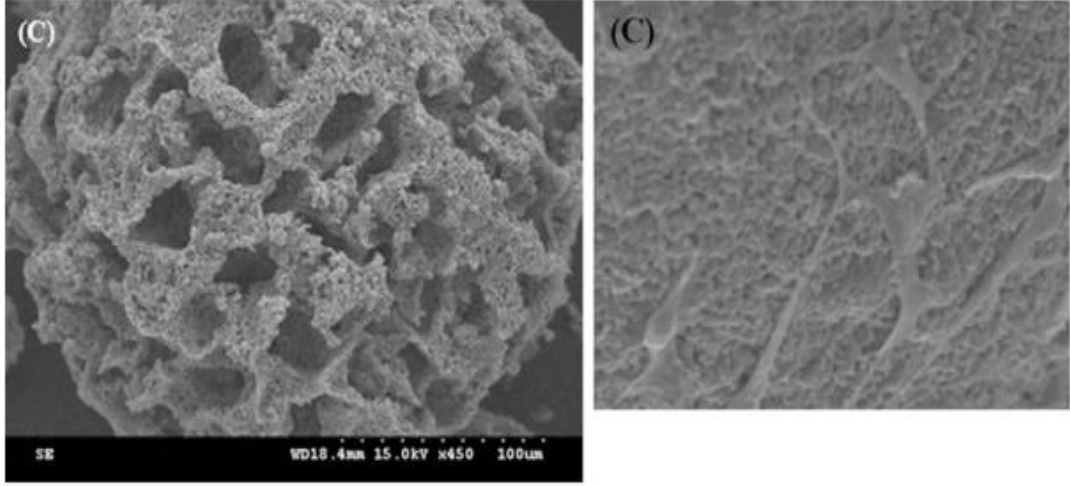
kullanılmaktadır. Cam mikroküreler doku mühendisliğinde biyouyumlu özelliğinden ötürü implant malzemesi olarak ve kontrollü ilaç salınımında yer bulmaktadır (Hossain, Patel et al. 2014).



Şekil 1.9. Biyoaktif cam mikrokürelerin silikon dioksit-kalsiyum oksit bileşiğinin SEM görüntüsü (Pontiroli, Dadkhah et al. 2017).

1.4.2 Seramik Mikroküreler

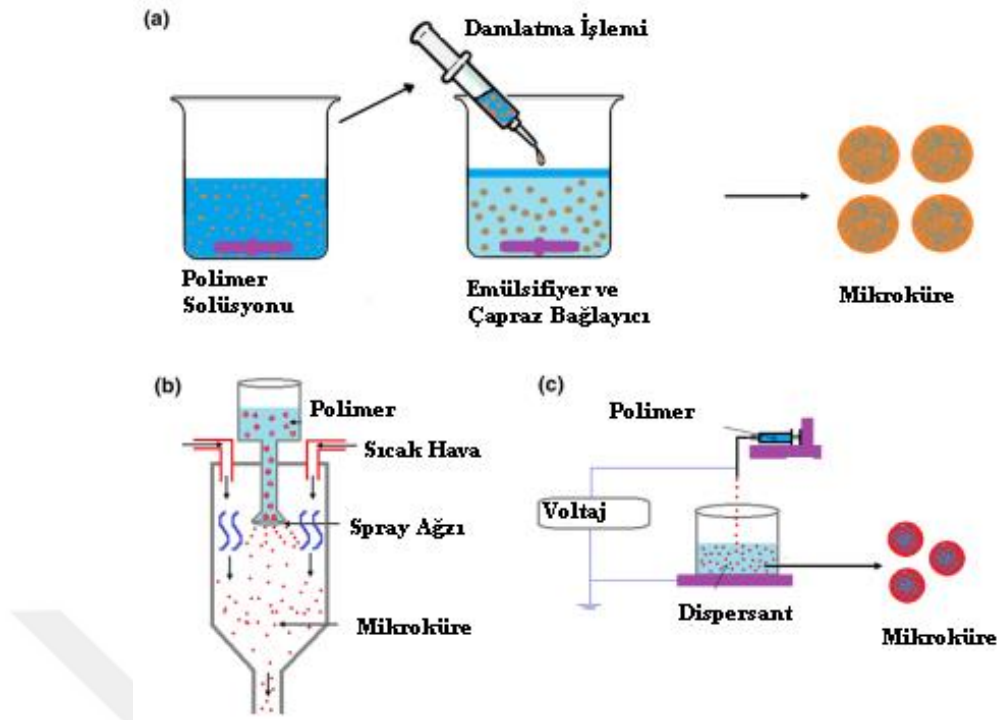
Kalsiyum fosfat bazlı (CaP) mikroküreler araştırmacılar için ortak bir bilimsel çalışma alanı yaratmakta, özellikle hidroksi apatit (HA) ve β -trikalsiyum fosfat ortopedide, dişçilikte ve ilaç sanayinde sahip oldukları biyouyumluluk, osteoiletkenlik ve uygun mekanik özellikleri sebebiyle tercih edilmektedirler. Seramik mikroküreler minimal invazif yöntemlerle implante edilebildiğinden ve bu bölgede iyi bir mekanik dayanım göstermesi sebebiyle ve kalsiyum fosfat içeriği sebebiyle kemik doku mühendisliği alanında da kullanılmaktadır. Küresel simetriye sahip mikrokürelerin elde edilebilmesi için geniş bir aralıkta başlangıç materyali (tozlar, karışımlar, macunlar ve çözeltiler halinde) ve çözünme fazı (gaz, sıvı çözelti ve katı) alternatiflerine sahiptirler. Kalıplamayı yapacak malzeme olarak da (şırınga iğneleri, sprey püskürtücü başlıkları, elekler, karıştırıcılar ve pervaneler) ve sertleştirme methodları alev spreyleme, dondurarak kurutma, jelleştirme ve kimyasal çöktürme işlemleri yapılmaktadır (Hossain, Patel et al. 2014).



Şekil 1.10. Kalsiyum silikat tozundan emülsiyon methodu ile elde edilen seramik mikrokürelerin SEM görüntüsü (Hong, Yu et al. 2009).

1.4.3 Polimerik Bazlı Mikroküreler

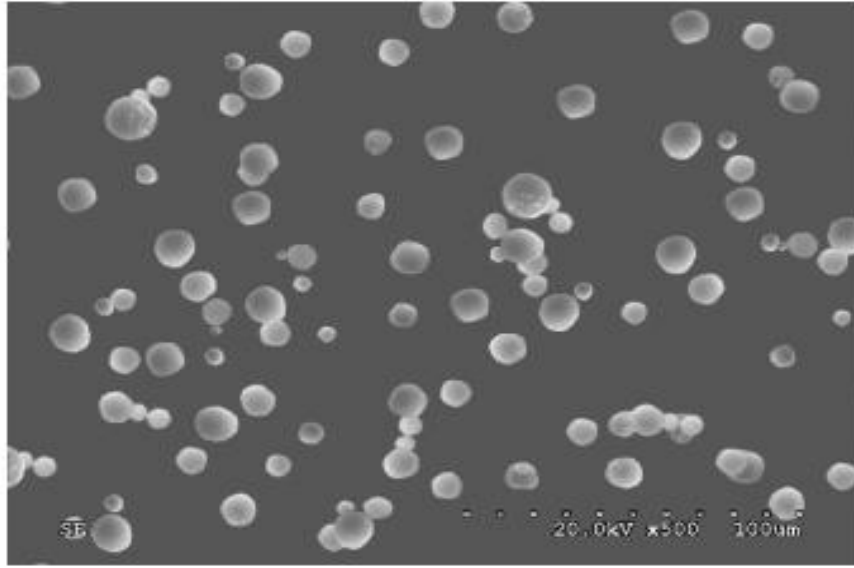
Polimer bazlı mikroküreler günümüzde doku mühendisliği alanında kontrollü ilaç salınımında biyobozunur taşıyıcı matrisler olarak giderek önem kazanmaktadır. Pek çok doğal yapılı polisakkaritler (aljinat, selüloz, kitosan gibi), proteinler (kollajen gibi) vücuttaki enzimatik aktivitelerle doğal yollarla bozunmakta, polilaktik asit (PLA), polikaprolakton (PCL), poliglikolik asit (PGA) ve polilaktik-ko-glikolik asit (PLGA) vücutta hidrolitik degradasyona uğramaktadır. Polimer bazlı mikrokürelerin üretiminde spreylendirme, elektrospinning, emülsifikasyon ile jelleşme, süspansiyon oluşturarak polimerleştirme, ultrasonikasyon ve faz ayrıştırması methodları ile üretilmektedir (Hossain, Patel et al. 2014).



Şekil 1.11. Polimerik Mikrokürelerin Hazırlama Methodları (Hossain, Patel et al. 2014).

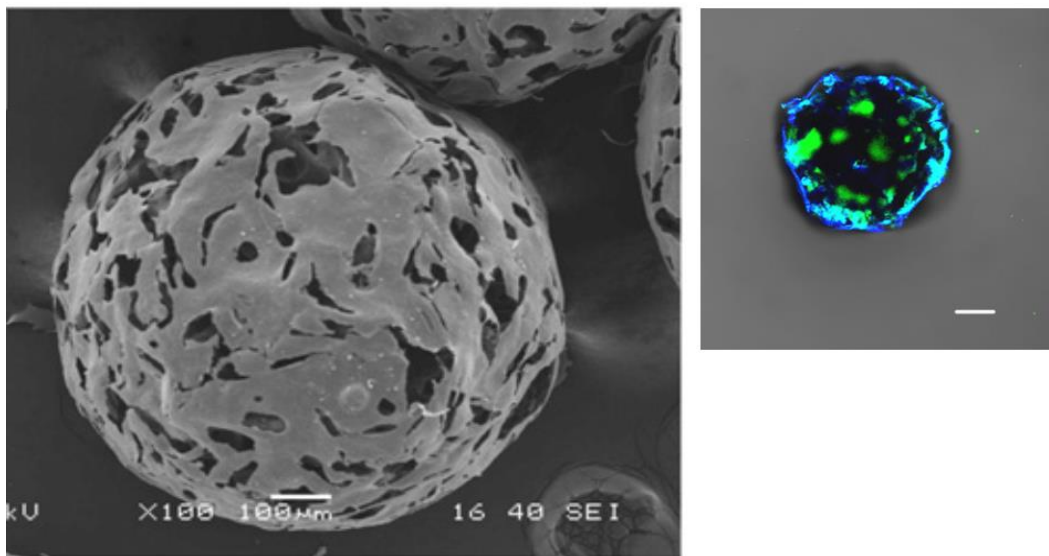
1.4.3.1 Sentetik Polimerik Mikroküreler

Polilaktik asit (PLA) biyomedikal alanda biyoemici polimer olarak yoğun bir şekilde kullanılmakta olup kontrol edilebilir bozunma hızına sahip olması, iyi mekanik dayanım göstermesi ve değiştirilebilir laktit içerikleri sebebiyle kullanılmaktadırlar. Termoplastik PLA mimari yapısının düzgün ayarlanabilmesi sebebiyle film olarak, iskelet yapısı olarak, fiber olarak, çubuk olarak ve mikroküre olarak ilaçların kontrollü salınımlarında kullanım alanı bulmaktadır. Bu polimer çözücü buharlaştırma ve emülsiyon, çözücü buharlaştırma teknikleriyle mikroküre formunda üretilmektedirler (Hossain, Patel et al. 2014)



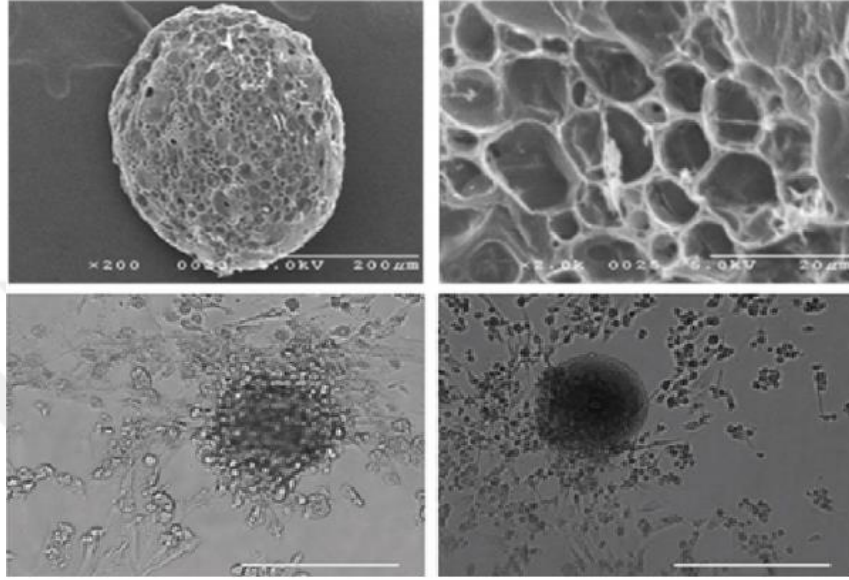
Şekil 1.12. Emülsifikasyonla elde edilmiş polilaktik asit mikrokürelerin SEM Görüntüsü (Chen, Yang et al. 2014).

Polikaprolakton biyomedikal ve doku mühendisliği alanında kullanılmakta olan bir biyoemici polimer olarak kullanılmakta olup emülsiyon-çözücü buharlaştırma, elektrospınleme ve eriterek kalıplama gibi işlemlerden geçirilerek elde edilmektedir (Hossain, Patel et al. 2014).



Şekil 1.13. Polikaprolakton Mikrokürelerin Görünümü (Zhang, Tan et al. 2012).

Poli (D,L-laktid-ko-glikolik asit) (PLGA) PLA'nın bir kopolimeri olup biyomedikal alanda tekrar çözünebilir dikişler, polimerik iskeletler, çubuklar ve porlu mikropartiküller üretilmektedir. Porlu PLGA mikroküreleri kontrollü bir poroziteye sahip olabilecek şekilde üretilmektedirler (Hossain, Patel et al. 2014).



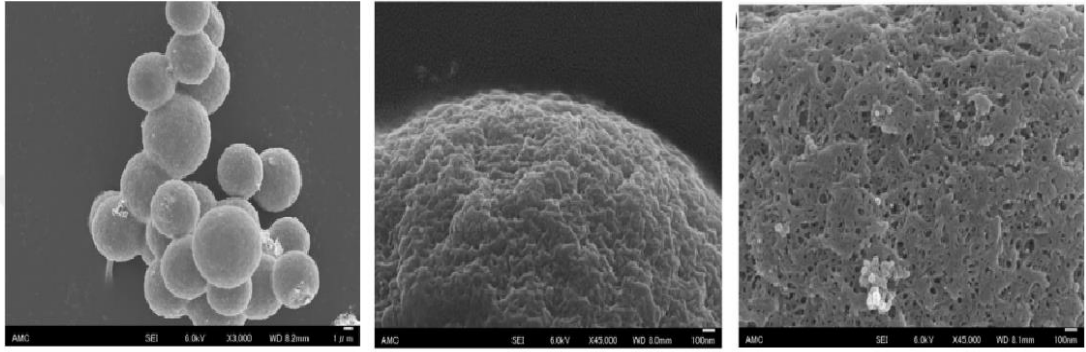
Şekil 1.14.Polilaktik-ko-Glikolik Asit Mikrokürelerin Görünümü (Lee, Lim et al. 2015).

1.4.3.2 Doğal Polimerik Mikroküreler

Kitosandan, aljinattan, kollajenden ve peptidlerden elde edilen mikroküreler biyomedikal ve doku mühendisliği alanlarında kullanılan mikrokürelerdir. Bu doğal mikrokürelerin çoğunluğu biyodegradasyona uygun olup genellikle biyouyumlu oldukları için büyük bir avantaja sahiptirler (Hossain, Patel et al. 2014).

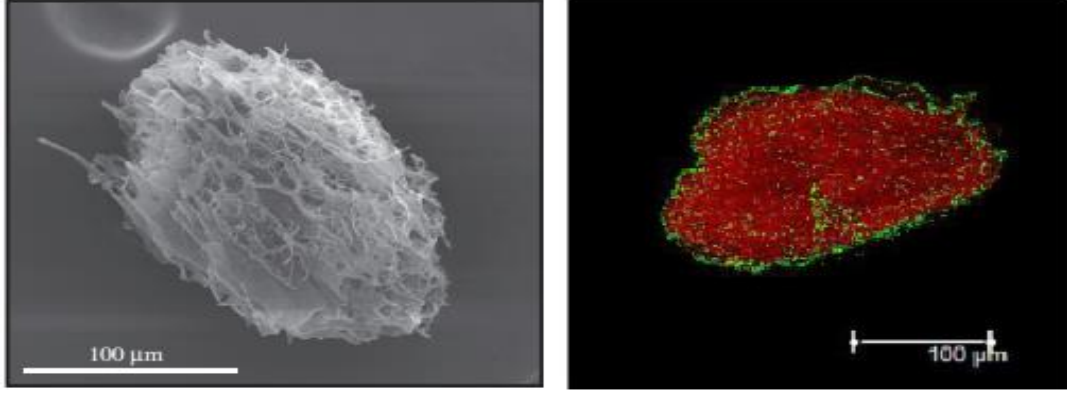
Aljinat biyomedikal ve doku mühendisliği alanında farklı dokularda çalışılmakta, aljinattan mikroküreler veya mikroboncuklar elde etmek için koagülasyon ve emülsifikasyon yöntemleri kullanılmaktadır. Genel olarak, mikroküreler aljinat çözeltisinin şekli düzgün damlacıklar elde edebilmesi amacıyla kalsiyum klorür çözeltisine damlatılarak çöktürülmesi (koagülasyon) ve asılı hale getirilmesi

(emülsifikasyon) işlemlerini kapsar. Çöktürme methoduyla endüstriyel çapta üretim yapılması sırasında mikrokürelerin birbirlerine yapışma riskleri oluşabilmekte bu sebeple yeni bir modifiye method olarak yağın içindeki suda asılı halde tutma (w/o emülsiyon) methodu geliştirilmiştir. Aljinat çözeltisi yağda çözülerek CaCl_2 'ye damlatıldığında 8 mikrometre çapında topaklaşmayan aljinat mikrokürler elde edilebilmektedir (Hossain, Patel et al. 2014).



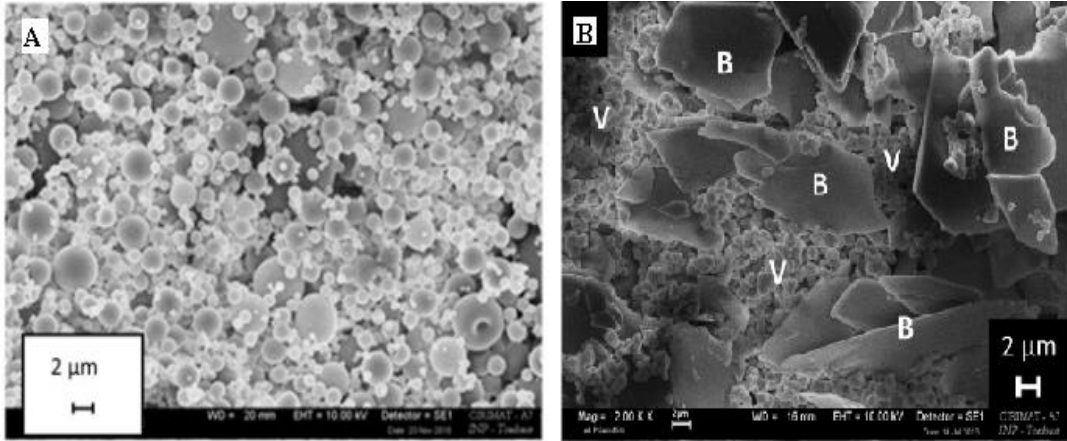
Şekil 1.15. Aljinat mikrokürelerin SEM Görüntüleri (Akamatsu, Maruyama et al. 2011).

Kitosan mikroküreler sprey kurutma, emülsifikasyon, içsel jelleşme, elektrospinleme ve dondurarak kurutma yöntemleriyle sağlanmaktadır. Mikrokürelerin porlu yapıları asetik asitteki kitosan çözeltisinin sıvı azota damlatılarak dondurulmasıyla ve ardından dondurma kurutma işlemi yapılarak sağlanmaktadır (Hossain KMZ. 2015).



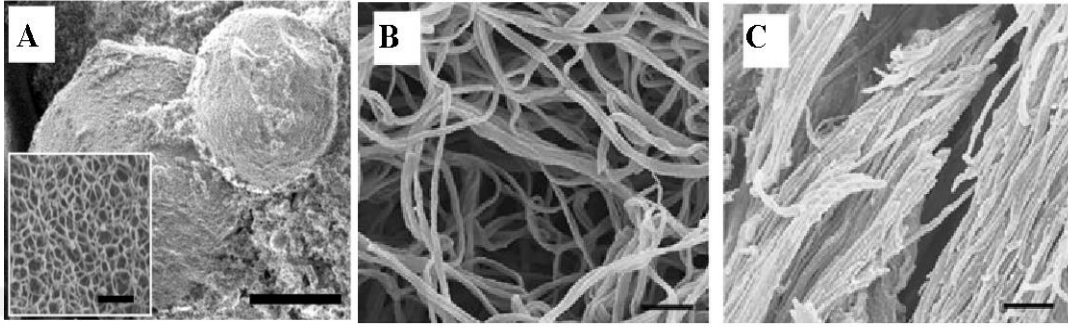
Şekil 1.16. Kitosan mikrokürelerin (A) SEM ve (B) DAPI görüntüleri (Goncalves, Magalhaes et al. 2013) .

Hyaluronik asit, sinovial sıvıda ve onun ekstrasellüler matriksinde bolca bulunan sülfatlanmamış glikozaminoglikan bileşenleri içeren bir biyopolimerdir. Biyouyumuluğu, düşük immunojenitesi ve biyobozunur özelliklerinden ötürü doku mühendisliği uygulamalarında geniş bir uygulama alanı bulmaktadır. Hyaluronik asitten mikroküre eldesi spre-kurutma yöntemiyle bir çalışmada denenmiş olup en büyük dezavantajlarından biri zayıf mekanik dayanım gösterdiği belirtilmiştir (Fatnassi, Jacquart et al. 2014).



Şekil 1.17. Hyaluonik asitten spre-kurutma yöntemiyle elde edilen mikrokürelerin çeşitli yakınlıştırmalardaki SEM görümleri (A)(B) (Fatnassi, Jacquart et al. 2014).

Kollajen, tendon, ligament ve deri gibi bağ dokularında ve ekstrasellüler matriksle bağlantılı dokularda en çok bulunan çözülme-yenilenen fibriller proteindir. Aljinat ve sentetik polimerlere benzer şekilde kollajenden de asılı halde tutma işlemiyle (emülsifikasyon) mikroküre elde edilmektedir (Hossain, Patel et al. 2014).



Şekil 1.18. Kollajen mikrokürelerin SEM görünümüleri. (A) Kollajen mikrokürenin genel görünüm (Mathieu, Vigier et al. 2014). Mezenkimal kök hücre yüklenmiş mikrokürelerdeki kollajen fiberlerin kondrojenik differansiyasyondan önceki (B) ve kondrojenik differansiyasyondan sonraki (C) görünümüleri (Hui, Cheung et al. 2008).

1.5 Kök Hücre Biyolojisi ve Tanımlamalar

Organizmayı meydana getiren ilk hücreler kök hücrelerdir. Vücutta kendini yenileme kapasitesine sahip olan, başka hücre tiplerine farklılaşabilen ve kendisinin bir kopyasını oluşturabilen hücrelere kök hücre denir. Şu ana kadar tespit edilmiş kök hücrelerin ortak özelliklerine bakılacak olursa; vücuttaki dokularda az sayıda bulunan, yaşam boyunca belirli oranlarda bölünebilerek sayılarını koruyan, bölündüklerinde ortaya çıkan iki yavru hücrenin en az birisi kök hücre olarak mevcut hücre havuzuna tekrar katılabilen, çok kez bölünerek önce geçici hücreleri oluşturup sonrasında dokulara özgü hücrelere farklılaşabilen, bölünme hızları yavaş olmasına rağmen doku yaralanması sırasında bölünme etkinliklerini arttırarak dokuların iyileşmesini hızlandıran, dokuların en kalıcı ve en uzun süre yaşayan hücreleri olarak organizmanın yaşamı boyunca varlığını sürdüren, büyüme faktörlerine duyarlı olup TGF, Notch, Wnt ve Jak/Stat gibi sinyal moleküllerini etkin bir şekilde kullanabilen, birçoğu hücre döngüsünün G0 evresinde sessiz olarak bulunan, kendine özgü

kromatin örtüsüne sahip olan, DNA metilazlar veya histon deasetilazların transkripsiyon baskılayıcıları tarafından veya Groucho ailesi proteinleri tarafından sağlanan özgün DNA düzenlenişi sayesinde kendine has kök hücre DNA'sını kazanabilen, strese karşı dayanıklı olan ve bu özelliklerini; çoklu ilaç direnci taşıyıcılarına sahip, kendine özgün protein katlanma mekanizmaları, ubikutin ve detoksifikasyon sistemlerini kullanarak sağlayan hücrelerdir. Kök hücreler, farklı hücrelere dönüşme yetenekleri sayesinde doku mühendisliği alanında zarar görmüş dokudaki hücrelerin tedavisinde onların yerini alabilecek ya da sentezledikleri ekstrasellüler bileşenlerle onlara destek olabilecek potansiyele sahiptirler (Can 2014).

Farklılaşma yetkinliği açısından kök hücreleri sınıflandıracak olursak, vücutta iki haploid gamet bir araya gelerek zigotu oluşturur. Zigot tüm vücudu oluşturacak ilk hücredir. Bu hücrenin mitoz bölünmeleriyle blastomerler oluşur. Blastomerler farklılaşma düzeyi yetkinliği olarak totipotent olarak adlandırılıp canlıdaki en yüksek farklılaşma kapasitesine sahip olan hücrelerdir. Embriyoyu ve sonrasında tüm dokuların ortaya çıkmasını sağlarlar. Zigotun döllenmesinden sonraki 5-6 gün içerisinde blastokist oluşur. Blastokistin iç hücre kütesinde yer alan hücrelere embriyo kök hücresi adı verilir. Bu aşamadaki hücreler farklılaşma yeteneği açısından pluripotent (çoklu yetkin olma) olarak nitelendirilip embriyo gövdesine ait bütün hücre tabakalarını ve onlardan köken alan doku ve organ sistemlerini oluşturma yetkinliğine sahiptirler. Bireyin fetüs, prenatal, postnatal, infant ve çocukluk dönemlerinde artık embriyonik kök hücreleri yoktur. Ancak onların yerine başta kemik iliği olmak üzere çeşitli organların belirli doku bölgelerinde gerektiğinde kendini çoğaltabilen, kararlanabilen ve farklılaşabilen hücreler olan yetişkin kök hücreleri ya da diğer adıyla dokuya özgü (somatik) kök hücreler bulunur. Buradaki kök hücrelerin bir kısmı farklılaşma yetkinliği açısından multipotent olarak adlandırılırlar ve birkaç tip hücreye dönüşebilme yeteneğine sahiptirler. Mezenkimal ve hematopoetik kök hücrelerin bir kısmı da bu gruba dahildirler. Aynı zamanda yetişkin kök hücreleri arasında sadece belirli bir hücre tipine dönüşebilen hücreler de vardır ki bunlar da farklılaşma kapasitesi açısından unipotent veya öncül hücreler (projenitör, prokürsör) olarak adlandırılırlar (Can 2014).

Mezenkimal kök hücreler, mezenkim doku adı verilen embriyonik dönemde epiblastın farklılaşmasından sonra embriyonun gelişmesinde ve daha sonra fetüsün

yaşamında yer alan gevşek bağ dokusu yapısındaki dokulardan elde edilmektedir. Bu dokulardan elde edilen hücreler genel olarak kemik iliği kaynaklı ve kan kaynaklı mezenkimal kök hücreler, kordon kanı kaynaklı mezenkimal kök hücreler ve adipoz yağ dokusu kaynaklı mezenkimal kök hücre olarak gruplandırılmışlardır. Kök hücre çalışmaları açısından, kök hücreler in-vivo ve in-vitro ortamlarda birbirlerinden farklı tipte bileşenler sentezlemekte olduklarından mezenkimal kök hücre kavramı in-vivo çoğalan hücreler için kullanılmakta, in-vitro çoğaltılan mezenkimal kök hücreler için multipotent mezenkimal stroma hücresi adı önerilmektedir. Ancak henüz yaygın bir kullanımı oluşmamıştır (Can 2014).

Adipoz kökenli kök hücreler, mezenkim temelli yağ dokusundan elde edilen, multipotensi farklılaşma kapasitesine sahip, AKH olarak kısaltılan kök hücre tipidir. Yağ dokusunun damarca zengin stromasında (SVF); kan hücreleri, fibroblastlar, perisitler, endotel hücreleri ve adiposit (yağ hücresi) öncüsü preadipositler bulunmaktadır. Yağ dokusunu vücuttan çıkarmak için lipoemilim (liposuction), lipoplasti veya lopotomi uygulanır. Sonrasında bu dokudan saf adipoz kökenli kök hücre elde edebilmek için yapıdan yağ ve kan hücrelerinin uzaklaştırılmaları gerekir. Kollajenaz dokuların parçalanması için gerekli bir enzimdir. Bu enzimle bir süre muamele edilen doku parçaları sonrasında santrifüj edildiğinde tüpün üst tarafında yağ hücreleri, alt tarafında ise yağ dokusunun vasküler ve stromal bölümleri kalır. Böylece yağ hücrelerinden kök hücreler ve kan hücreleri ayrıştırılmış olur. Altta kalan bu doku bölümleri plastik bir flaska ekilecek olursa mezenkimal kök hücrelerin ortak özelliği olan plastiğe yapışması sayesinde kök hücreler plastiğe yapışırlar. Kan hücreleri tutunamadıklarından besiyeri değişimi sırasında sıvıyla beraber atılırlar. Dikkat edilmelidir ki zaman zaman alınan dokuda kan damarları ve buna bağlı olarak kan hücreleri çok yoğun olmakta, flasktaki kök hücrelerin tutunup çoğalmalarını yavaşlatabilmektedirler. Böyle durumlarda enzimle muamele edilip parçalanmış doku parçaları NH_4Cl ile muamele edilebilir ve bu sayede kan hücreleri osmolize uğratabilir. Ancak bu uygulama bir kısım kök hücrenin kaybına da sebep olabilir. Doku parçaları saf hücre kültürü yapabilmek için filtreden geçirilirler. Bu hem zaman tasarrufu hem de daha saf kök hücre kültürü yapmayı sağlamaktadır. Plastiğe tutunmuş kök hücreleri enzimatik kaldırma işlemi ile saf bir şekilde sağlanmakta, sıvı azot tanklarında uzun süre muhafaza edilebilmektedirler. Adipoz kökenli kök hücrelerin insan vücudundan elde edilmesi diğer kök hücre tiplerine nazaran daha

kolay olmakta ve alındığı bölgeye daha az hasara neden olmakta ayrıca istendiğinde daha büyük miktarlarda doku alınabildiğinden çok sayıda hücre sayılarına ulaşabilmektedir (yapılan bir çalışmada yaklaşık 404 000 hücre / ml oranında). Bu durum yağ kökenli kök hücrelerin doku mühendisliği uygulamalarında uygun bir alternatif olabileceğini göstermektedir (Can 2014).

Adipoz kök hücrelerin immunofenotiplendirmesi yapılarak saf kök hücre kültürünün ne düzeyde elde edildiği anlaşılır. Bunun için hücrenin yüzeyindeki reseptörlerinde bulunan kendine özgü belirteçler (markerlar) kullanılır. Bu yüzey belirteçleri numaralı bir CD (cluster of differentiation) kod sistemiyle adlandırılır. Temel doku uyumluluğu kompleksi (MHC) ise iki gruba ayrılır. MHC sınıf I hücre yüzeyi molekülleri, tüm çekirdekli hücrelerinde bulunurken eritrositlerde ve kan plaketlerinde az görülmektedir. MHC sınıf II hücre yüzeyi molekülleri ise temelde sadece antijen sunucu hücrelerin ve lenfosit yüzeylerinde bulunur. Bu belirteçlerden %85'in üzerinde sinyal alınanlar kuvvetli pozitif olarak geçerler. Adipoz kökenli kök hücreler için pozitif belirteçler; CD9, CD29, CD44, CD54, CD73, CD90, CD105, CD106, CD146, CD166'dır. Pozitif MHC belirteçleri ise sınıf I (HLA-A, HLA-B ve HLA-C'dir. Negatif CD belirteçleri CD14, CD31, CD34, CD45, CD133 ve CD144'tür. Negatif MHC belirteçleri ise sınıf II'dir (HLA-DR ve diğerleri). Adipoz kökenli kök hücrelerle ilgili yapılan çalışmalarda bu hücre tipinin özgül besiyeri koşullarında adipojenik, osteojenik, kondrojenik, nörojenik, hepatojenik, endotel, düz kas hücresi ve kardiyomiset hücresi farklılaşmasının mümkün olduğu belirtilmiştir (Can 2014).

Osteokondral hasarların giderilebilmesi için otolog adipoz kökenli kök hücrelerin klinik olarak bireylere uygulanması alternatif bir çözüm yöntemi olabilir. Öncelikle in vitro kültür açısından kondrojenik farklılaşmada sıkı bir hücre-hücre ilişkisi sağlanması gerekmekte, besiyeri ortamı açısından da deksametazon, askorbik asit, TGFβ, BMP, FGF ve IGF gibi kondrojenik maddelerin ortama eklenmesi gerekmektedir. Bu bileşenler flaska çözelti halinde tek tek eklenerek ya da piyasada hazır olarak satılmakta olan besiyeri kitleri kullanarak kondrojenik farklılaşma uyarılabilir (Can 2014).

Adipoz kökenli kök hücre hazır besiyerinde bulunan içeriğe bakılacak olursa;

DMEM düşük glukoz içeriği, bir hücrenin hayatta kalabilmesi için en gerekli bileşenleri içeren temel besi yeridir. Eagle adlı bilim insanının 1955’da analiz etmiş olduğu bir hücrenin hayatta kalabilmesi ve çoğalabilmesi için gerekli en temel bileşenleri içeren besiyeri MEM olarak adlandırılmıştır. DMEM bunun modifiye halidir. Düşük glikoz içeriği mezenkimal kök hücre kültürüne özgü bir durumdur. L-glutamin proteinleri oluşturan 20 amino asitten biridir. Kültür ortamındaki hücrelerin proliferasyon hızını arttırmaktadır. İnsulin-Transferrin-Selenyum (ITS) içeriğinde insülin, bir hormon olup hücreler tarafından glikoz ve amino asit alınımını artırır (Isyar, Yılmaz et al. 2016). İnsülin benzeri büyüme faktörü reseptörü IGF-1 reseptörü aracılığıyla mitojenik etki göstermektedir. Transferrin, demir taşınımı sağlayan bir protein olup hücrelerin içine demir taşınımını sağlar. Bu protein aynı zamanda besi ortamını oksijen radikallerinden ve peroksitlerden arındırmaktadır (detoksifikasyon). Selenyum bir kofaktör olup glutatyon peroksidazı aktifler, oksijen radikallerinin ortamdan arındırılmasında kullanılır. L-askorbik asit ve bunun türevi Asc-2-P, pirolin ve lizin amino asitlerinin hidrosilasyonunu sağlayarak kollajen uyarımını arttırmaktadır. L-Pirolin proteinleri oluşturan 20 aminoasitten biri olup protein sentezinde öncü madde olarak bu sayede protein sentezini indüklemektedir (Henzi, Reichling et al. 1992). Dekametazon, kıkırdak matriksinin ana proteini olan kollajen 11’i kodlayan genlerin ifadesini arttırmaktadır. TGF-B, hücre üzerinde iki farklı reseptöre bağlanarak Smad proteinleri aracılığıyla kondrojenik farklılaşmayı tetikleyen bir büyüme faktörüdür. Penisilin-Streptomisin, gram pozitif ve gram negatif bakterilerin ortamda çoğalmasını inhibe ederler. Antibiyotiklerin besi kültür ortamında %5’in üstünde kullanımının antiproliferatif etkilerinin olduğu belirtilmiştir. Bunun yanında Gentamisin kullanımı fungal kontaminasyonun önüne geçtiği belirtilmiştir (Isyar, Yılmaz et al. 2016),(StemPro® Kondrojenik Farklılaştırma Kiti, 2018), StemPro® İnsan Adipoz Kök Hücresi Kullanıcı Kitapçığı, 2018). Fetal dana ya da sığır serumu, yüksek oranlarda kullanıldığı zaman mezenkimal kök hücre kültürlerini adipojenik farklılaşmaya götürebildiği belirtilmiştir. Bu sebeple hücre kültürü sırasında %20 ve altında kullanılması önerilmektedir (Bunnell, Flaas et al. 2008). Ayrıca yapılan çalışmalar kültürlerde hipoksi ortamının (%5 ve altı O₂) mezenkimal kök hücrelerin proliferasyon hızını ve kondrojenik farklılaşma belirteçlerinin ekspresyonunu arttırdığını belirtmektedir (Meretoja, Dahlin et al. 2013, Cao, Li et al. 2015, Wan Safwani, Choi et al. 2017) Bunlardan birinde mezenkimal hücrelerin hipoksi ortamında kondrojenik

farklılaşmasının fibro-bağ yöneliminde olduğu belirtilmiştir (Meretoja, Dahlin et al. 2013).

Çizelge 1.1. Adipoz dokudan elde edilen kök hücrelerinin farklı kondrojenik ortamlarda kültürü ve elde edilen sonuçlar (Phull, Eo et al. 2016).

Tür	Kültür Ortamı	Ortam Katkı Maddesi	Önemli Sonuçlar
İnsan	Monolayer ya da pellet, %5 O ₂ ya da %20 O ₂	ITS, deksametazon, 10 ng/mL TGF- β 1:28 gün	Histoloji, gen ve protein ekspresyonu: tüm kondrojenik markerlar %5 O ₂ ortamında regülasyon artışı
İnsan	Aljinat, agaroz, porlu jelatin	ITS, deksametazon, 10 ng/mL, TGF β -1:28 gün	Tüm materyaller kondrogenesi desteklemektedir; jelatin iskelet kültürü en yüksek mekanik özelliklere ve GAG içeriğine sahip olmakta, hidrojeller içinde küresel morfoloji gözlemi
İnsan	Bağ dokusundan elde edilen iskelet	FBS, ITS, deksametazon	Histoloji, gen ve protein ekspresyonu, matriks bileşenleri ve modülüslerinin regülasyon oranlarının doğal dokulara göre artışı
İnsan	Aljinat Pellet	FBS, ITS, deksametazon ve 10 ng /mL TGF β 1, ya da 500 ng/mL, BMP-6, ya da 10 ng/mL, TGF β 3, 10 ng/mL BMP-6; 42 güne kadar	Agrekan, tip I, II, X, kollajen ve GAG, kondroidin sülfatın gen ve protein miktarında ve histolojik görünümünde olumlu sonuçlar

Çizelge 1.1. (Devam)

Mürin	Monolayer, pellet	100 ng/mL, BMP 6: 14 gün	Pellet kültürü kondrogenesi arttırmış, monolayer kültürde osteogenesisi arttırmış
İnsan	CD105 pozitif hücreleri için flow sitometriden geçirilmiş hücreler	Deksametazon, 10 ng /mL TGFβ3, 10 ng/mL BMP6, 50 ng/mL IGF-1:56 gün	CD105 ⁺ hücreleri CD105 ⁺ hücrelerinden daha yüksek kondrojenik potansiyeline sahiptir, kültür süresi CD105 ⁺ hücrelerde homojen bağ benzeri doku oluşumu, tip II kollajen ve proteoglikanlar için positive boyama gözlenmiş
İnsan	Aljinat	FBS ya da ITS + 0,1 ya da 10 ng/mL, TGF-β, ya da 0,10,100ng/mL deksametazon; 9 gün	ITS+TGF-β1 proliferasyonun ve protein ve proteoglikan sentezi, deksametazon protein sentezibib arttırmış fakat proteoglikan sentezini azaltmıştır
İnsan	Aljinat	FBS, ITS, deksametazon, 10 ng/mL TGF-β1; 14 gün, traş edilmiş farenin implante edilmiştir, 12 haftaya kadar	In vitro: Ciddi bir oranda Tip 2 kollajen ve GAG üretimi: In-vivoda bağ dokusu formasyonu

Çizelge 1.1. (Devam)

Tavşan	Monolayer	FBS, BMP2 ile transfekte edilmiş ve IGF-1: 14 gün	Immunoblotlama: kondrogenesiste transfeksiyon gerçekleşmiş, matris proteinlerin romasyonu ve MMP-13 seviyelerinde kontrole göre azalma
İnsan	Pellet	TGF- β 3+/- BMP6 %2 O ₂ ya da %20 O ₂ :24 gün	Gen ve protein ekspresyonu: TGF- β 3 ve BMP6 birlikte kullanımı kondrogenesisi indüklemektedir. Hipertrofik kondrositler için %2 O ₂ regülasyonun azalmasına yol açmaktadır.
İnsan	Aljinat	ITS, deksametazon, 10 ng/mL TGF- β 1, 10 ng/mL, TGF- β 3, 100 ng/mL IGF-1, 500 ng/mL BMP6:7 gün	Gen ve protein ekspresyonu: BMP 6'nın tek şekilde kullanımının diğer tüm kombinasyonlardan daha fazla olacak şekilde kondrojenik markerlarının regülasyonunun arttırılmasını sağlamaktadır

Çizelge 1.2. Bağ dokusu tamiri için doku mühendisliğinde kullanılan hücre kaynaklarının avantajları ve dezavantajları (Fischer 2013).

Hücre Tipi	Avantajları	Dezavantajları/ Kısıtlamalar
<ul style="list-style-type: none"> Kondrositler 	<ul style="list-style-type: none"> Bağ dokusu tamiri için gelecek vaat eden hücre kaynağı Projenitör hücrelerden daha çok sayıda bulunmaktalar Otolog kondrosit implantasyonu tekniği için ciddi bir klinik güvenlik durumu bulunmamakta Kondrojenik farklılaşmaya kapalı 	<ul style="list-style-type: none"> Bağ dokusu eldesi sırasında hasarlı bölge yaratma riski Hücre yayılması sırasında kondrosit dedifferansiyasyonu riski Sınırlı hücre olanağı ve çok sayıda cerrahi prosedür gerektirmekte Otolog bağ dokusu gerekliliği
<ul style="list-style-type: none"> Olgunlaşmış Mezenkimal Kök Hücreler Adipoz dokudan elde edilen mezenkimal kök hücreler Kemik iliğinden elde edilen mezenkimal kök hücreler 	<ul style="list-style-type: none"> Adipoz (yağ) dokusu, kemik iliği ve sinovial membran gibi kolay elde edilebilir dokulardan kaynak sağlanması Bu hücreler daha yüksek oranda proliferasyon kondrojenik farklılaşma kapasitesine sahiptir Yaşlanmaya karşı daha dirençliler Bu hücreleri elde etmek için sağlıklı otolog bağ dokusuna ihtiyaç yok 	<ul style="list-style-type: none"> Tümerogenesisin stimülasyonu ya da indüksiyonu potansiyel riskini taşıması, hedeflenmemiş dokuların kolonizasyonu, enfeksiyon bulaşma riski, hücre yayılması sırasında insan (allojenik) ya da hayvan serumundan elde edilmiş kimyasalların kullanımı Yaş ve hastalıklarla potansiyelin düşmesi Bağ dokusunun yerini hücre hipertrofisine ve mineralizasyonuna bağlı olarak kemik dokusunu kaplaması veya hyalin bağ dokusu yerine fibro-bağ dokusu oluşumu riskleri

Çizelge 1.2. (Devam)

<ul style="list-style-type: none">İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücreler (iPSCler)	<ul style="list-style-type: none">iPSC' ler bağ dokusu rejenerasyonunda gelecek vaat eden sonuçlar vermektedirHücre miktarı çok önemli değil ve istenirse gerekli sayıda hücre elde etmek için stimüle edilebilir	<ul style="list-style-type: none">iPSC' lerin kndrojenik etkinliğinin düşük olmasıHücrelerin ex vivo saflaştırması gerekliliğiTekrar programlanabilir protokollerle ilişkili genetik modifikasyonların gerekliliğiTeratogenesis yaklaşımı ve in vivo doku fonksiyon bozuklukları
<ul style="list-style-type: none">Embriyonik Kök Hücreleri (ESCLer)	<ul style="list-style-type: none">Olgunlaşmış kondrositlerle birlikte kültürü ESC kondrogensisi olumlu yönde uyarmakta	<ul style="list-style-type: none">Teratoma formasyonunun oluşumuKlinik transplantlar için konakçı reddi riski

1.6 Doku Hasarlanmalarında Yangı Mekanizması ve İyileşme Süreci

Vücutta endojen (içsel kaynaklı) ya da eksojen (dışsal kaynaklı) zararlı etkilerle oluşan herhangi bir hasar karşısında gelişen temel konakçı yanıtına yangı denir. İki tipi vardır. Birincisi erken dönemde oluşan zayıf yanıt, akut yangısal yanıttır. Aniden gelişmekte olup genellikle hızlı olarak seyredir. Nedeni ortadan kaldırıldığında ya da sınırlandırıldığında veya elimine edildiğinde yangı uyarısı kesilir akut yangı sona erer. İkincisi ise erken veya geç dönemde dokuda ortaya çıkan belirgin immun yanıt bulgularını gösterir. Enfeksiyöz ya da hasarlı dokudan salınan antijenleri göstermektedir. Yangıya neden olan etkenin şiddeti azalarak devam etmesi halinde akut yangı belirtileri (kızarıklık ve eksudasyon) kaybolarak kronik şekle dönüşür. Bu

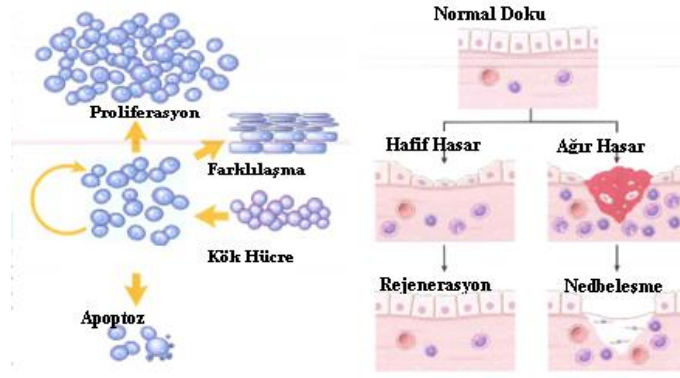
durumda rejenerasyon söz konusu değildir. Çünkü bağ dokusu parankimdeki zararlı etkenlerin ortadan kaldırılmasını engeller. Genellikle iyileştirici doku parankimde yıkımlanan kısımların yerini doldurur. Kronik yangı akut yangısal yanıtı izleyebildiği gibi başlangıçtaki yangı fazının çok hücreli hasar oluşturması durumunda da ortaya çıkabilmektedir. İyileşme daha çok yangının akut hale dönüşmesinden sonra gerçekleşir. Kronik yangıların, akut yangı sonrası kronik yangı ile iyileşen formu ile akut şekle dönüşüp hastalığa dönüşen formu arasında ayırım yapılması gerekir (Aydın Y. 2013).

Yangıda etken ve ona bağlı doku hasarlarında,

1. Hasarlı bileşenler bulunduğu yerlerde eritmeye çalışılırlar.
 2. Hasarlı bileşenler ve atıklar vücut dışına atılmaya çalışılırlar.
 3. Atılamayacak yapıdaki cisimler ise orada sınırlandırılıp izole edilmeye çalışılır.
- 5 Tip dış yangısal yanıt (septom) bulunmaktadır.

1. Kızarıklık: Yangılı bölgedeki kan miktarının aşırı derecede artışıyla ilgilidir.
2. Şişlik: Bölgede artan kan miktarı ile buradaki genişlemiş ve kanla dolu damarlardan çevre yayılan sıvı nedeniyle.
3. Sıcaklık: Yangı alanında artan arteriyel kan miktarıyla ilgili olup buraya gelen kanın vücudun iç sıcaklığını talmasıyla meydana gelir.
4. Ağrı: Yangılı bölgedeki kan ve eksudatın buradaki sinir uçlarına aşırı basıncına ilgili olarak meydana gelir. Ayrıca iritan maddelerin toksik ürünlerinin sinir uçlarına etkisi de söz konusudur.
5. Fonksiyon Kaybı ya da Bozukluğu: Bu olaylar sonucu organ veya dokuda meydana gelen fonksiyon bozukluğunu ifade eder (Erer H. 2008).

Bir organizmanın hayatta kalabilmesi için hayati olan, toksik etkilerin ve inflamasyonun yaratmış olduğu hasarın iyileştirilmesidir. Mikrobik enfeksiyonlara ve zarar görmüş dokulara inflamatuvar yanıt sadece tehlikelerin giderilmesi ile olmamakta, aynı zamanda iyileşmenin sağlanması da gerekmektedir. Hasar tamiri, doku mimarisinin ve fonksiyonunun yaralanma sonrasındaki restorasyonudur. İki tip reaksiyonla gerçekleşir. Bazı dokular hasarlı bileşenlerin yenileri ile değiştirilmesiyle yani normal hale getirilmesiyle restore edilmekte buna da doku rejenerasyonu denmektedir. Eğer hasarlı doku tamamen üç boyutlu organizasyonunu sağlayamıyorsa ya da dokuların destek yapıları ciddi şekilde hasarlıysa tamir mekanizması bölgede fibröz bağ dokusunun oluşumu aracılığıyla gerçekleşir ki buna da skar şekillenmesi ile iyileşme adı verilir. Fibröz skar dokusu normal bir doku olmayıp, sadece dokunun fonksiyonel olarak işlevini görmesini sağlaması amacıyla dokuya yeterli stabilite sağlayan bir yapıdır. Dokunun hasar derecesine bağlı olarak doku restorasyonunun ve skar formasyonunun oranı da buna bağlı olarak değişir. Fibröz terimi, kronik inflamasyon sonucu ya da aşırı oranda iskemik nekroz (enfarktüs) sonucu, oldukça çok miktarda kollajenin akciğerde, karaciğerde, böbrekte ve diğer organlarda biriktirilmesi anlamına gelir. Eğer fibroz dokusu inflamatuvar sıvısı (eksudat) içerisinde gerçekleşirse buna da organizasyon adı verilmektedir. Tamir mekanizması, çeşitli hücrelerin proliferasyonu ve hücrelerin ekstraselüller matriks ile etkileşimleriyle gerçekleşmektedir. Tamir mekanizmasının daha iyi anlaşılabilmesi için hücrelerinin proliferasyonunun kontrolü ve ekstrasellüler matriks yapısının fonksiyonu hakkında daha derin bilgi sahibi olunması gereklidir (Kumar 2014).



Şekil 1.19. Hücre popülasyonlarının vücuttaki hareketi (A). Doku onarım mekanizmaları(B)

Çizelge 1.3. Vücutta rejenerasyon ve onarımda görev alan büyüme faktörleri (Kumar 2014).

Büyüme Faktörü	Kaynağı	Fonksiyonları
<ul style="list-style-type: none"> Epidermal Büyüme Faktörü (EGF) 	<ul style="list-style-type: none"> Aktif makrofajlar; tükürük bezleri, keratinositler ve diğer birçok hücre tipi 	<ul style="list-style-type: none"> Keratinositler ve fibroblastlar için mitojendir, keratinosit göçünü uyarır; granülasyon dokusu oluşumunu uyarır
<ul style="list-style-type: none"> Transforme Edici Büyüme Faktörü-α (TGF-α) 	<ul style="list-style-type: none"> Aktif makrofajlar, keratinositler ve diğer birçok hücre tipi 	<ul style="list-style-type: none"> Hepatositlerin ve diğer birçok epitelyal hücrenin proliferasyonunu artırır;
<ul style="list-style-type: none"> Hepatosit Büyüme Faktörü (HGF) 	<ul style="list-style-type: none"> Fibroblastlar, karaciğerdeki stroma hücreleri, endotel hücreler 	<ul style="list-style-type: none"> Hepatositlerin ve diğer birçok epitelyal hücrenin proliferasyonunu artırır; hücre hücre motilitesinde artış nedenidir

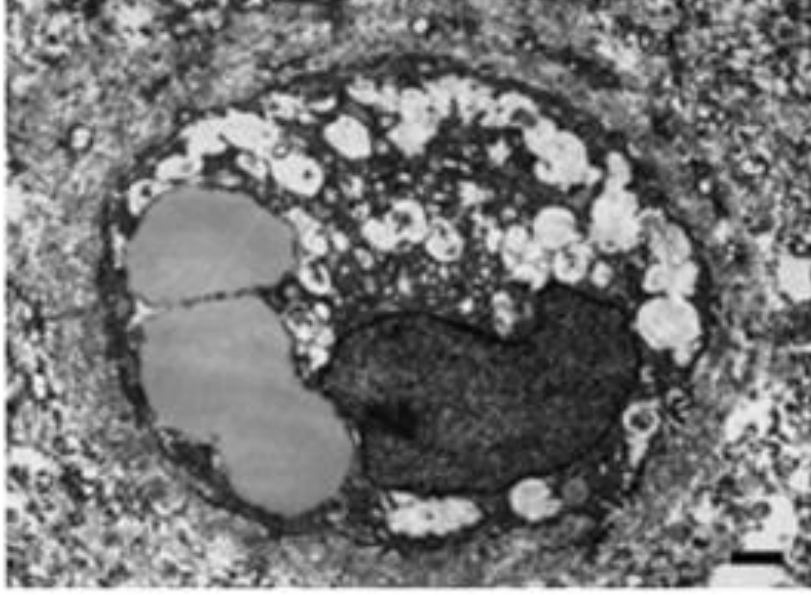
Çizelge 1.3. (devam)

<ul style="list-style-type: none">Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF)	<ul style="list-style-type: none">Mezenkim Hücreleri	<ul style="list-style-type: none">Endotel hücrelerin proliferasyonunu uyarır damar geçirgenliğini artırır
Trombosit Kökenli Büyüme Faktörü (PDGF) keratinositler	Trombositler, makrofajlar, endotel hücreleri, diğer birçok hücre tipi	Nötrofiller, makrofajlar, fibroblastlar ve düz kas hücreleri için kemotaksik; endotel hücreleri ve diğer hücreleri aktive eder, proliferasyonunu uyarır; ESM protein sentezini uyarır
Fibroblast büyüme faktörleri (FGF); asidik (FGF-1) ve bazik (FGF-2)	Makrofajlar, mast hücreleri, endotel hücreleri, diğer birçok hücre tipi	Fibroblastlar için kemotaksik ve mitojendir; anjiyogenezi ve ESM protein sentezini uyarır
Transforme Edici Büyüme Faktörü- β (TGF- β)	Trombositler, T lenfositler, makrofajlar, endotel hücreleri, keratinositler, düz kas hücreleri, fibroblastlar	Lökositler için kemotaksik ve mitojendir; anjiyogenezi ve ESM protein sentezini uyarır
Keratinosit büyüme faktörü (KGF) (örn: FGF-7)	Fibroblastlar	Keratinosit göçünü, proliferasyonunu ve farklılaşmasını uyarır

1.7 Kondrosit Hücre Kültürü ve Kıkırdak Doku Mühendisliği Uygulamaları

Kondrosit hücresi bağ dokusunun temel hücresi olup bu doku embriyonik evrede kemik bileşenleri için bir şablon görevi görmektedir. Yetişkinlerde ise, kalıcı bağ dokusu büyük ölçüde engellenmiş ve vücutta mekanik destek, büyüme ve hareket amacıyla gereklidir. Kondrosit hücresi bağ dokusunun hacimli ekstrasellüler matriksinden izole edilmekte olup bu yapı hem damar hem de sinir içermemektedir. Bunun sonucu olarak, besin/oksijen transferi difüzyonla gerçekleşmekte ve hem

normal kondrositler hem de patolojik durumda olanlar düşük oksijen içeriği altında yaşamaktadırlar (%10 ile %1 arasında) (Archer CW. 2003).



Şekil 1.20. Bir kondrosit hücresinin TEM'de çekilmiş görüntüsü. Büyük yağ damlacıkları, proteoglikan içeren vakuolleri ve belirgin golgi aygıtı ve hale şeklinde görülen ekstrasellüler matriks yapısı görünmektedir (Masuda, Miyabayashi et al. 2002).

Bağ dokusundaki kondrositler dokuda sitoplazmik çevresindeki hücrelerden izole olarak yaşamakta, yüksek ekstrasellüler matriks oranına sahip olup, herhangi dışsal patolojik bir uyarılma olmadığı müddetçe bölünememektedirler (Archer CW. 2003).

Kondrositlerin temel morfolojik özellikleri genelde yuvarlak şekilli ya da doku sınırları hariç poligonal şekilli olup, sadece bağ dokusunun eklem yüzeylerinde uzamış halde ya disk biçiminde bulunmaktadır. Kondrositler hücresel metabolizma olarak aktif bir hücrenin tipik özelliklerini göstermekte, kollajenler, glikoproteinler, proteoglikanlar ve hyaluronan içeren genişçe bir ekstrasellüler matriks bölgesinin dönüşümünden sorumludurlar. Buldukları bölgeye bağlı olarak fonksiyonları değişmektedir. Kondrositlerin temel fonksiyonu, artiküler bağ dokusu, trakeal bağ dokusu ve nazal bağ dokusu gibi yapılarda ekstrasellüler matriks

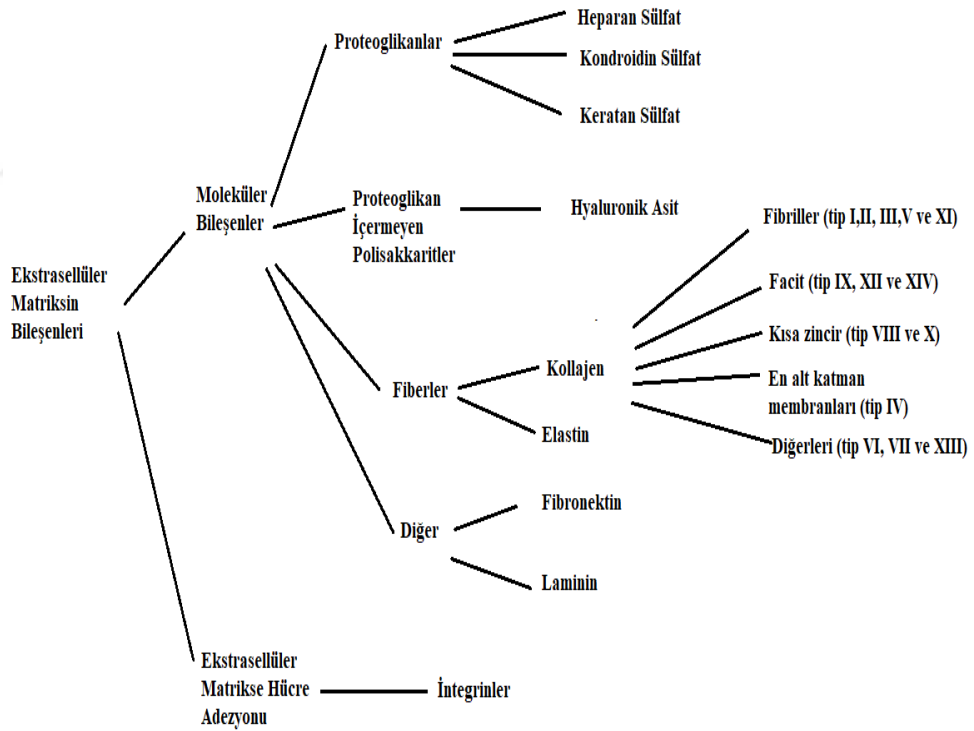
bileşenleri sentezlemek ve onların sürdürülebilmesini sağlayarak fiziksel deformasyondan korumaktır (Archer CW.2013).

İnsanda embriyo gelişiminin üçüncü haftasından sonra paraksiyel mezoderm hücrelerinin çoğalmasıyla ve orta bölgede çoğalmasıyla somitler meydana gelir. Bu somitler etrafında hyaluronan salgısı artarak somit çapı büyür. Somitin bir bölümünde epitel benzeri hücrelerden prekondroblastların gelişmesiyle bir skletrom yapısı meydana gelir. Bu değişim Notch ve Wnt sinyal yollarını kontrolü altında Sox9'un ifade bulmasıyla farklılaşarak kondroblastlara dönüşürler. Sox9, tip 2 kollajenin yani kıkırdak matriksindeki en temel kollajeni kodlayan Col2a1 geninin düzenlenmesinde görev alır. Embriyoda kıkırdak dokusunun ortaya çıkışı embriyo gövdesine sertlik kazandırırken aynı zamanda sinir yapıları için kalıp görevi yapar. İlk olarak hyalin kıkırdaktan oluşan kemik taslakları endokondral kemikleşme adı verilen süreçle kemik dokusuna dönüşür. Kondrositler bu süreçte tip 10 kollajeni de sentezledikten sonra hipertrofiye girerek ortadan kalkarlar (Archer CW 2013).

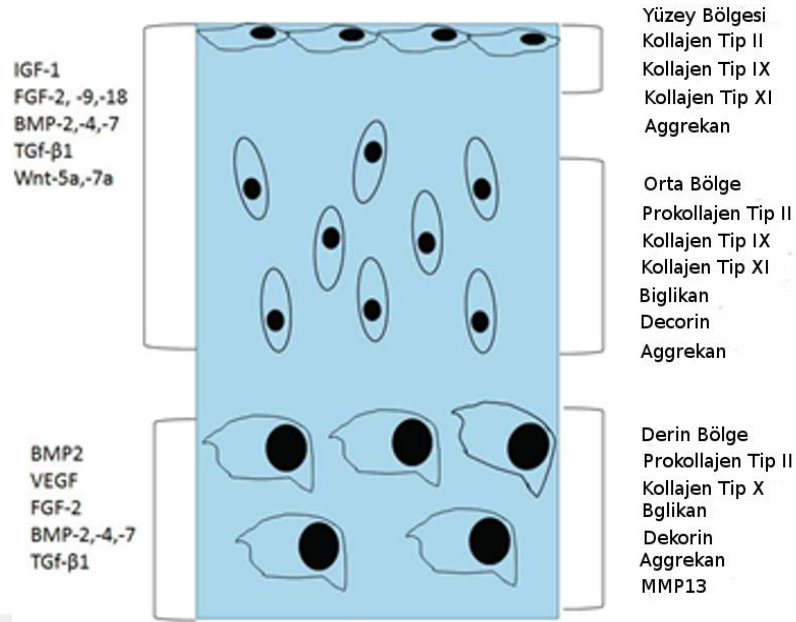
Eklem kıkırdaklarının oluşumu kondrositlerin geriye farklılaşarak mezenkim hücrelerine dönüşmesi ve bunların sinovial yapılarını oluşturmasıyla başlar. Daha sonra tekrar ortaya çıkan kondrositler tip 9 kollajeni ve proteoglikanları salgılamaya başlarlar. Gelişmekte olan kıkırdağın çevresinde ağırlık olarak tip 1 kollajen sentezi vardır. Kıkırdak dokusunun temel hücresi olan kondrositler, hücreler arasındaki matriksi sentezlerlerken sitoplazmalarına tipik bir aktin filamentleri şebekesi geliştirirler. Aktin filamanlarının görevi kıkırdağa özgü biyomekanik özellikleri kazandırmak ve kondrositi eklem matriksine bağlamaktır. Kondrosit sayısı kıkırdak dokusunun farklı bölümlerinde farklı oradadırlar, eklem yüzeyinde bu sayı 23.000 tane/mm'dir. Eklem kıkırdağının sınırlı oranda yenilenmesi kıkırdak yüzeyindeki öncü hücrelerin varlığına bağlıdır. Kıkırdak kılıfından (perikondrium) buraya göç eden hücreler kondroblast olarak kabul edilirler ve yüksek plastisiteye sahiptirler. Kondroblastlar farklı şekillerde farklılaşma kapasitesine sahip hücrelerdir. Kondroblastlar miyojenik yolağa girebilmekte, bazı kondrosit klonları ise kemiğe, yağa ve endotel hücrelerine farklılaşabilmektedirler (Can A. 2014). Kondrositlerin diğer önemli görevi ise epifizyal plakla alakalı kondrositlerin büyümesidir. Epifizyal kondrositlerin 3 temel mekanizmayla dokunun hacmini arttırdığı söylenebilir. Birincisi proliferasyonla yani hücre çoğalmasıyla. İkincisi, matriks sekresyonuyla

ve üçüncüsü de kondrositlerin hipertrofisi sırasında gerçekleşen hacim artışıyla (Archer CW. 2013).

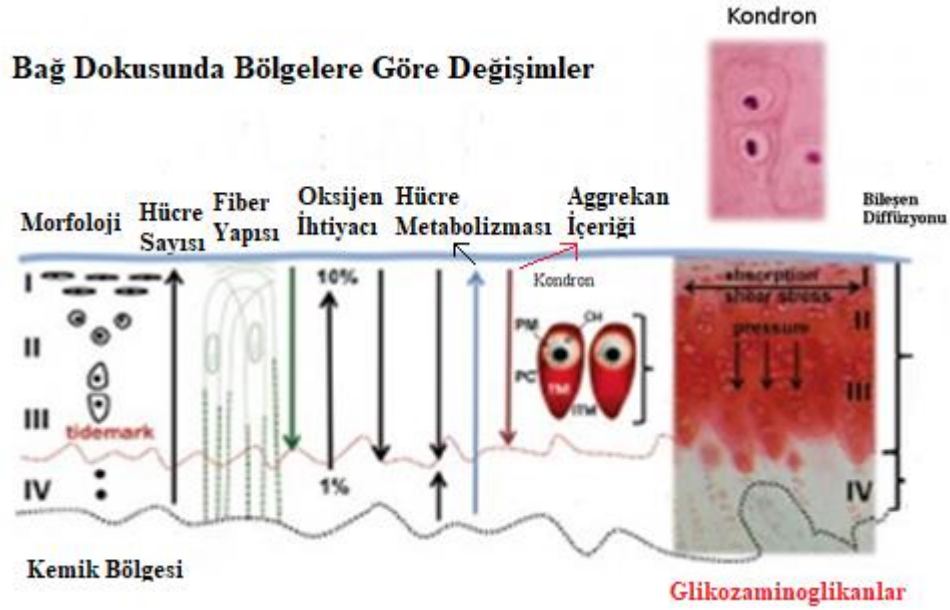
Kıkırdak ekstrasellüler matriksi katı ve sabit şekilli olup aynı zamanda üst üste katlanabilmekte ve bu sayede basınca ve mekanik etkilere başarılı bir şekilde dayanabilmektedir. Damardan ve sinir ağlarından yoksun bu yapının bozulmaması kondrositlerin hayatta kalabilmesi için gereklidir. Kıkırdak matriksindeki glikozaminoglikanların, tip II kollajen fiberlerine göre daha yoğun olması sayesinde bağ dokusuna yakın dokulardaki kan damarlarının bağ dokusu matriksiyle besin ve oksijen difüzyonunu sağlamasına izin vermektedir (Archer CW. 2013).



Şekil 1.21. Ekstrasellüler Matriksin Bileşenleri (Gao, Liu et al. 2014).



Şekil 1.22. Eklem Bağ Dokusunun Bölgelere Göre Ekstrasellüler Matris Bileşenleri (Akkiraju and Nohe 2015).

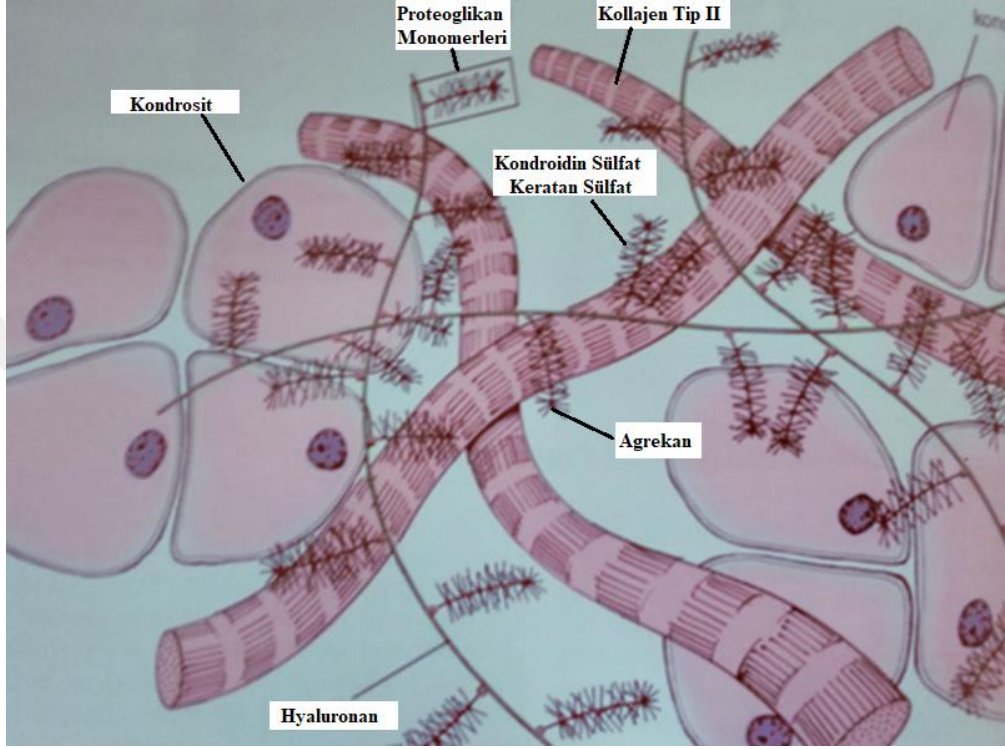


Şekil 1.23. Ekstrasellüler Matris İçeriğinin Bölgelere Göre Değişimi (Zreiqat, Dunstan et al. 2014).

Kıkırdak doku mühendisliği alanında yapılan ilk çalışmalarda temel hedef, hücrelerle birlikte yapay veya biyolojik iskelelerin belirli bir düzen içerisinde bir araya getirilip uyarıldıktan sonra vücuda konulduğunda kıkırdak ve çevresindeki dokularla bütünleşerek hasarlanan veya yaşlanan kıkırdak yapılarının yerini almaları olmuştur (Langer.1993).

Kıkırdak dokusunda az sayıda hücre bulunmakta (toplam kıkırdak hacminin %5'i), kondrositler oldukça düşük metabolik etkinliğe sahip olup, nadiren bölünen hücrelerdir. İnsan vücudunda üç tip kıkırdak bulunmaktadır. Eklem yüzeyleri, burun halkaları, trakea halkaları ve kaburgalar hyalin kıkırdak olarak; kulak kepçesi ve epiglot elastik kıkırdak olarak; intervertebral diskler, temperomandibular eklemler ve dizlerdeki menisküsler fibröz kıkırdak olarak bulunmaktadır. Hyalin kıkırdak, tip II kollajen fiberleri, GAG'lar, proteoglikanlar ve çoklu yapışkan glikoproteinler içeren matriksten oluşmaktayken, elastik kıkırdak, hyalin kıkırdağın matriks materyaline olarak elastik fiberler ve lameller içermekte, fibröz kıkırdak ise, hyalin kıkırdağın materyallerinin yanında tip 1 kollajen fiberleri içermektedir. Eklem kıkırdağı diartrodial eklemlerin (omuz, kalça diz gibi kemiklerin karşılıklı olarak hareket edebileceği eklemler) yumuşak hareketleri sağlayan oldukça narin bir dokudur ve hyalin kıkırdak dokusuna sahip olup ağırlığa karşı koyabilme ve düşük sürtünmeye sahiptir. Hyalin kıkırdak, tip II kollajen fiberleri, GAG'lar proteoglikanlar ve çoklu yapışkan glikoproteinler içeren matriksten oluşmaktayken, elastik kıkırdak, hyalin kıkırdağın matriks materyali olarak elastik fiberler ve lameller içermekte, fibröz kıkırdak ise, hyalin kıkırdağın materyallerinin yanında tip 1 kollajen fiberleri içermektedir. Hyalin kıkırdak camsı bir görünüm sergilediği için latince camsı anlamına gelen *hyalin* kelimesinden türetilmiştir. Kıkırdak matriksi boyunca laküna adı verilen boşluklar bulunur (Ross HM, 2017). Bu lakunalara olgunlaşmış kıkırdak hücreleri yani kondrositler yerleşmiştir. Hyalin kıkırdak sadece ekstrasellüler matriksten oluşan bir yapı değil içerisinde kondrosit hücreleri barındıran canlı bir yapıdır. Yüzeyinde sürtünmesi az olan, hareketli (sinovial) eklemlerin kayganlaştırılmasında rol alır ve mekanik gücü matriksi ile alttaki kemiğe yayar. Hyalin kıkırdak matriksinde 3 tip molekül sınıfı bulunmaktadır. Kollajen ana matriks proteinleridir. Çapı 20 nm olup kısa matriks fibrillerinden oluşan üç boyutlu ağın oluşumunda 4 tip kollajen bulunmaktadır. Tip II kollajen fibrillerin gövdelerini oluşturur. Tip IX kollajen, kollajen fibrillerini üç boyutlu hegzagonla örgü halinde

düzenlerler. Tip VI kollajen kondrositlerin periferinde bulunmakta olup hücrelerin matriks ağına tutunmalarını yardım eder. Tip II, VI, IX, X ve XI kıkırdağa özgü kollajen molekülleridirler.



Şekil 1.24. Hyalin kıkırdak matriksinin moleküler yapısı (Ross HM, 2017).

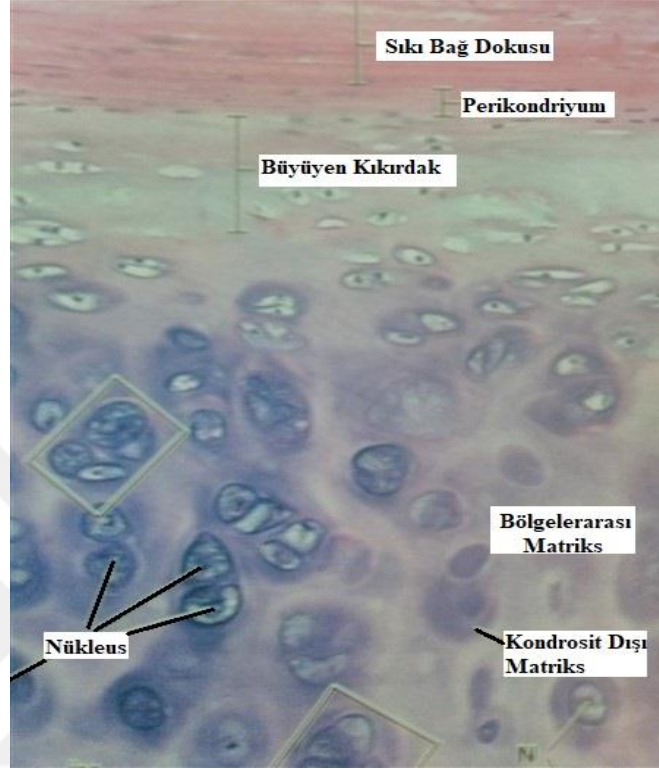
Kıkırdağın içerisindeki proteoglikanlar ise 3 tipe bulunurlar. Hyaluronan, kondroidin sülfat, keratan sülfat. Kondroidin ve keratan sülfat proteoglikan monomeri oluşturmak üzere merkezi proteine bağlanır. En önemli proteoglikan monomeri ise agrekandır. Molekül ağırlığı 250 kDa olup her molekül yaklaşık 100 kondroidin sülfat zinciri ve 60 kadar keratan sülfat molekülü içermektedir. Sülfat molekülleri sayesinde agrekan moleküllerinin net yükü eksi olur ve su moleküllerine afinite göstererek hidrojelimsi yapınının oluşumuna yardımcı olur. Her hyaluronan zinciri çok sayıda agrekan molekülü (300 kadar) ile ilişkilidir ve bunlar hyaluronan molekülüne N-terminalinden bağlanarak proteoglikan kümelerini oluştururlar. Bu eksi yüklü proteoglikan kümeleri kollajen matriks fibrillerine elektrostatik etkileşim ile ve

çoklu yapışkan glikoproteinler ile bağlanırlar. Kollajen fibrilleri arasına sıkışan bu kümeler kompleks bir matriks oluşturmakta ve kendine özgü biyomekanik fiziksel özellik göstermektedir. Kıkırdak matriksindeki diğer glikoproteinler (dekorin, biglikan, fibromodulin) ana zincirler ile küme oluşturmazlar fakat bazı molekülleri kendilerine bağlayarak matriksin stabilitesine destek olurlar. Çoklu yapışkan glikoproteinler, non-kollajenöz ve proteoglikanlara bağlı olmayan glikoproteinler olarak da bilinmektedirler ve kondrositler ile matriks proteinleri arasındaki etkileşimi etkilemektedirler. Çoklu yapışkan glikoproteinler, kıkırdak döngüsü ve dejenerasyonunun belirteçleri olarak klinik değere sahiptirler. Böyle proteinlere örnek olarak, kondrositler üzerinde kollajen reseptörü olarak fonksiyon gören 34 kilodaltonluk küçük bir molekül olan ankorin CII ve kondrositlerin matrikse bağlanmasına yardımcı olan tenasin ve fibronektin verilebilir. Bu tip kıkırdaklarda meydana gelen hasarlanmalarda hyalin kıkırdak damarlanmadığı için ve lenfatik sistemle doğrudan bağlantısı zayıf olduğu için doku yanıtı çok düşük olmakta, buna bağlı besin ve oksijen transferinin zor sağlanması sebebiyle kendiliğinden iyileşme oldukça az ve yavaş gerçekleşmektedir. Kıkırdak dokunun neredeyse %95'ini ekstrasellüler matriks bileşenleri oluşturur. Bu matriks ağırlıklı olarak iki tane birbirine bağlı ağ yapısından oluşmaktadır; tip 2 kollajen ağı ve hyaluronik asit/proteoglikan ağı. Kondrositler bu ağı yapıları hücre yüzeyindeki proteinleri aracılığıyla bağlanmakta bu onların mekanik baskıya karşı cevap vermelerini sağlamaktadır. Ekstrasellüler matriks bileşenlerinden kollajen ıslak doku hacminin yaklaşık %20'sine sahip olmakta ve bu kollajenin %90'unu kollajen tip 2 oluşturmaktadır. Tip 2 kollajen, 300 nm uzunluğunda 3 tip alfa zincir sarmalından oluşan fibersi bir yapıdır. Bu fiberler birbirlerine kovalent bağla bağlı olup dokuya gerilim kuvvetine dayanma özelliği sağlamaktadır. Agrekan, ekstrasellüler matriksteki temel proteoglikan olup ana omurgasını dallanmış glikozaminoglikan (GAG) zincirleri oluşturmaktadır. Buradaki GAG'lar ağırlıklı olarak keratin sülfat ve kondroidin sülfat içermekte, her bir agrekan molekülü bunlardan 50-100 adet arasında içermektedir. Tekrarlayan sülfat zincirleri bu yapı üzerinde total bir negatif yük oluşturmaktadır. Her bir agrekan birimi proteinlere uzun dallanmış hyaluronik asit ve polisakkarit zincirleriyle bağlanır. Agrekanın üzerindeki negatif yük yüksek osmotik doku basıncı sağlamakta, yük bindiğinde osmotik basınç yükün dağıtılmasını sağlamaktadır. Ayrıca agrekanla birlikte ortamda bulunan kollajen fiber ağı da dokunun ağırlık yükü altındayken dağılmasına engel olmaktadır. Yük

altındayken dokudaki bir kısım sıvı sinovial boşluğa dağılmakta yük kalkarken bu sıvı sinovial boşluktaki atıkları tekrar bağ dokusuna taşıyarak diffüzyon bazlı bir iletim mekanizması oluşturmaktadır. Bu yüzden hareket etmek, bağ dokusu fonksiyonlarının sağlıklı yürütülmesini sağlar. Femoral kondilinin üzerindeki insan artiküler bağ dokusunun yüksekliği yaklaşık 2,4 mm olarak ölçülmüştür. Yapı üç bölüme ayrılmış olup dokunun hemen altında kondrosit altı (subkondral) kalsifiye kemik bulunmaktadır. Kalsifiye kemik yapısı diffüzyona izin vermemektedir. Bağ dokusunda yüzeydeki bölüm tüm dokunun %10-%15'ini oluşturmakta ve eklemlerin kesiştiği bölgeyi tanımlamaktadır. Onun altındaki orta bölüm derinlik olarak tüm dokunun %60'ını oluşturmakta ve derin bölüm ise tüm dokunun %30'unu oluşturmaktadır. Bu üç bölümün ekstrasellüler bileşen oranları bakımından birbirinden farklıdır. Kollajen içeriği derinlik arttıkça artması rağmen burada kollajenin uzaysal düzenlenişinin daha önemli olduğu kabul edilmektedir. Yüzey bölümündeki kollajen fiberleri eklem bağlantı bölgesine paralel olarak şekillenmiş olup, gerilim kuvvetine dayanma gücü sağlamakla beraber bu düzenlenişin sinovial sıvıdan istenmeyen moleküllerin geçişini engellediği düşünülmektedir. Orta bölümdeki kollajenler rastgele düzenlenmiş olup derin bölümdelikiler ise eklem bağlantı bölümlerine dik olacak şekilde organize olmuşlardır. Proteoglikan içeriği açısından eklem bağlantı yüzeyinden uzaklaşıldıkça proteoglikan miktarı artmakta bu da yapının baskı (compressive) modülüsünün artmasını sağlamaktadır. Dokunun su içeriği yüzeyde en düşük olup, orta bölüm ve derin bölüm tüm bileşenlerin yaklaşık %65'ini içermektedir. Sinoviyal sıvıdan diffüzyon ile gelen oksijen sonucu, oksijen içeriği en yüksek yüzey bölümü olmasını sağlar, azalarak sırasıyla içerik olarak orta bölüm ve en düşük derin bölüm gelir (Fischer JP. 2013).

Bölgesel matris organizasyonundaki ve içeriğindeki farklılıklar hücrel aktivitelere dayanmaktadır. Bölümler arasında hücreler de morfolojik olarak, yoğunluk olarak ve metabolik aktivite açısından farklıdır. Yüzey bölümündeki kondrositler en küçük boyutta ve en yüksek yoğunluğa sahiptirler. Buradaki hücreler eklem yüzeyine paralel bir şekilde uzanmışlardır. Orta bölümdeki hücreler görece olarak daha büyük, daha az yoğun ve özel bir düzenlenişe sahip değildirler. Derin bölümdeki hücreler ise en az yoğunluğa ve en büyük boyuta sahip olup eklem yüzeyine dik bir şekilde yerleşmiş ve altındaki kalsifiye bölüme sıkı bir şekilde bağlanmışlardır. Kollajenin üç boyutlu düzenlenişiyle hücrelerin yerleşimi arasında bir bağlantı olduğu

görülmektedir. Yüzeydeki ve orta bölümdeki hücreler kendi başlarına ya da çiftler halinde bulunmakta, derin bölümdekiler ise 5 ile 8 hücre olarak kümelenmiş halde bulunmaktadırlar (Fischer JP. 2013).



Şekil 1.25. Hematoksilin ve eosin ile boyanmış örnek bir hyalin kıkırdak fotoğrafı (Ross HM, 2017).

Dokuda salgılanan bazı proteinler çeşitli bölgelerdeki hücrelerin belirteçleri olarak ortamda bulunmaktadır. Sadece yüzeydeki hücreler yüzey bölümü proteinlerini (superficial zone protein, SZP) salgılamakta, buldukları ortamı kayganlaştırmakta, proteoglikan 4 geni tarafından kodlanmaktadır. Bu bölgede bir glikoprotein içeriği de yer almakta ama fonksiyonu bilinmemektedir. Embriyonik gelişim sırasında büyüme endotelial bölgesi-1 (Del-1) proteini bölgenin gelişim sırasında zamanla damarlanmayı ve endotel hücrelerin gelişimini engellemektedir. Bu protein özellikle yüzeyde bulunan hücrelerde en yoğun olarak görülüş olup derin bölümdekilerde daha az yoğun görülmektedir. Orta bölüm hücreleri başka hiçbir bölgede üretilmeyen eşsiz bağ ara tabaka proteinlerini sentezlemektedirler. Bu proteinin tam fonksiyonu araştırılmakta olup osteoartritin gelişiminde rol oynadığı düşünülmektedir. Bağ

oligomerik matriks proteini büyük bir ekstrasellüler protein olup kondrositlerin çevresinde bulunmakta, matriks bağlarını sağlamlaştırmaktadır. Çalışmalar bu proteinin osteoartrit ve romatoid artiritteki bir belirteç olduğunu göstermiş ancak derin bölge için de aynı belirteç özelliklerini gösterdiği belirtilmiştir (Fischer JP 2013).

30 yaşından sonra bireylerde bağ dokusu zayıflamakta, gerilme kuvvetine dayanımı düşmektedir. Dokudaki kondrositlerin de zamanla yapısı bozulmakta büyüme faktörlerine ve sitokinlere verdiği tepki azalmaktadır. Mekanik dayanımın düşmesi kalıcı sakatlanma risklerini arttırmakta iyileşmeye verilecek tepkiyi düşürmektedir. Dokunun kendine has damarsız yapısı sebebiyle bu bölgede oluşan hasarların tedavisi hücre sayısının azlığı ve difüzyonun yavaş gerçekleşmesi sebebiyle matriks yapısının tekrar üretimini zorlaştırmaktadır. Küçük çaplı hasarlarda bile doku tam olarak iyileşememekte, ya da başka hastalıklara neden olacak şekilde bir gelişim göstermektedir (Fischer JP 2013).

Osteoartrit ve bağ dokusu hasarlanmalarında matriks proteinlerinin geri dönüşümü çok yavaş gerçekleşmektedir. Yapım yıkım olaylarının gerçekleşmesi açısından kollajenin yarı ömrünün 100 yıl, matriks proteinleri içinse 3-24 yıl arasındadır. Örneğin osteoartritte bağ dokusu yapısal ve fonksiyonel özelliklerinin yitimiyle hasara uğramaktadır. Eklem kıkırdağı (artiküler bağ dokusu) genel olarak kondrositlerden ve ekstrasellüler matriks bileşenleri olan kollajen II ve agrekanlardan oluşmaktadır. MMP13 sağlıklı kondrositlerin kollajen fibrillerini sürekli olarak yenilemelerini sağlayan metalloproteinazlardan biridir. Osteoartritte ise ekstrasellüler matriks degradasyon hızı yapım hızından fazla olmakta bu da bağ dokusu ekstrasellüler matriksine bağlı eklem yüzeylerinin erozyonuna yol açmaktadır. Osteoartrit boyunca MMP sentezi İnterlökin-1 gibi sitokinlerle indüklenmektedir. Bu sitokin bağ dokusu yıkımında ve yangı sürecinde kondrositlerin çoğalmasını, kollajen ve agrekan üretimini baskılamakta, doku metalloproteinaz inhibitörlerinin inhibisyonuna yol açmaktadır. Kondrositler sonrasında fenotipik bir modifikasyona uğrayarak fibroblast benzeri bir görünüm sergilemekte, kollajen II sentezinde kayıplar yaşanmakta, fetal fibriller kollajen I ve nitrik oksit sentazın (NOS) ekspresyonunu arttırmakta ve ortamda nitrik oksitin serbest kalmasına yol açmaktadır. Kondrositlerin bu fenotipik değişimine de-differensiyasyon denmektedir. Ayrıca

embriyonik ve olgun dönemdeki hücre differansiyasyonunda ve hücre farklılaşma hedeflerinin belirlenmesinde Wnt sinyalizasyon yolağı da önemli bir rol oynamaktadır. Wntler (Wnt1-19 arası), ortamda sentezlenen bir glikoprotein olup transmembran (frizzled) reseptörlerine bağlanmaktadır. Interlökinler (Il-1) bu Wnt sinyal yollarını etkileyerek hücrelerin farklılaşmasını etkilemektedirler. Wnt'nin bazı moleküler bileşenleri osteoartrit oluşumunda yer alan bazı genler için bir örnek teşkil etmektedir. Wisp1, bir Wnt-1 indükleyici protein olarak insan osteoartrit eklem kıkırdağında ve murin eklem kıkırdağında aşırı şekilde üretildiği belirtilmiştir. Monolayer olarak geçen flasklarda kondrosit kültürü yapılması osteoartritteki mekanizmaya benzer şekilde kondrositleri dedifferansiyasyona sokarak kondrositlerin osteoartrit bir hücresi fenotipinin elde edilmesini sağlamaktadır. Bu farklılaşma kondrositlerin flasklarda birkaç kere pasajlanmasıyla elde edilir. Yani dokudaki hücreler eğer zarar görürlerse hücreler fenotipik olarak değişebilmekte, hipertrofi sonucu apoptoza uğramakta ya da fibroblastik bir farklılaşmaya gidebilmektedirler (Fischer JP. 2013).

Denenen doku rejenerasyonu çalışmalarında doğal kıkırdak yapısını henüz tam anlamıyla doğal haline dönüştürebilmiş bir yöntem bulunamamıştır. Denenmiş cerrahi teknikler arasında osteotomi, artrodesis ve anhtroplasti ile eklem değişikliği denenmiş, ya da kemik iliğinin uyarılması, doku otograft veya allograft uygulamaları ve otolog kondrosit uygulaması denenmiştir. Eklem kıkırdağı uygulamaları genelde enfeksiyon riskleriyle ve eklem fonksiyon kaybıyla karşılaşmaktadır. Graft uygulamalarında ise allograftta doku uyumsuzluğu, otograftta ise dokunun alındığı bölgede yeni hasar oluşumları görülmektedir. Kemik iliği uyarılmasında düşük düzeyde kondrosit fenotipinde düzelme ve fibro-bağ dokusu iyileşmesi görülmektedir. Bunların arasında otolog kondrosit nakli hem donör uyumsuzluğuyla hem de düşük uyarılma riskleriyle karşılaşmaktadır. Güncel uygulamalarda bu sorunları aşabilmek için doku mühendisliği uygulamaları giderek artan şekilde kullanılmaya başlanmıştır (Fischer JP. 2013).

Cerrahi tekniklere kısaca bakılacak olunursa ilk nesil uygulamalar sadece otolog kondrositlerin oluşturulan kemik flepleri (parçaları) ile beraber ekilerek defekte implantasyonu sınırlıdır (Carticell, Chondroselect). Ancak bu uygulamanın başarılı sonuçlar sağlamanın ardından ikinci nesil uygulamalar çeşitli hayvanlardan

(sığır gibi) elde edilen kollajen matriksine gömülen otolog kondrosit implantasyonu olmuştur (Chondrogide-Bilayer membrane). Üçüncü nesilde ise biyomateryal bazlı otolog kondrosit implantasyonları yapılmaya başlanmıştır (MACI, CaReS, Tissucol gibi). Yapılan meta analizlerinde ostekondral otograft implantasyonlarıyla (mosaik plasti), matriks destekli kondrosit implantasyon çalışmaları karşılaştırılmış klinik sonuç olarak aralarında büyük bir fark bulunmadığı belirtilmiştir. Ancak matriks destekli implantasyon çalışmalarının giderek sayısının arttığı belirtilmiştir. Ayrıca yapılan çalışmaların implantasyon sonrası uzun vadeli sonuçlarına odaklanılmadığı bir eksiklik olarak belirtilmiştir (Zeng Li 2016).

Burada kondrosit kaynağı olarak nasal, artikular veya trakeal kıkırdak dokusu kullanılabilir. Bunun sebebi bu üç yapının da hyalin kıkırdak yapısında olmasıdır. Örneğin son zamanlarda yapılan bir çalışmada burundan alınan kıkırdak örneği in-vitro kültüre edilmiş ve sonrasında otolog olarak kollajen membranda transplantasyonu yapılmıştır. Burada genç bireyler için çözüm oluşturulabilmekte ancak yaşlı bireyler için çözüm önerilememektedir. Buna ek olarak kendi çocuklarının nasal bölgesinden elde edilebilecek kondrositlerin yaşlı aile bireylerinin tedavisinde kullanılabilmesi mümkün olabilir. Oogenez teorisinde belirtildiği üzere her hücre kendine benzer bir hücreyi meydana getirmektedir. Allajoneik, ksenojenik çalışmalarda doku uyumluluğunun artırılması üzerine çalışmalar yapılmaktadır.

Kıkırdak doku mühendisliği uygulamasında polimer iskelete istenilen sayıda hücre ekilmeli uygun besiyeri koşulları sağlanmalı sonrasında hasarlı bölgeye implantasyonu yapılmalıdır. Bu polimer iskeleti hem mekanik dayanım sağlamalı hem de hücrelere porlar içerisinde hareket edebileceği biyosinyal moleküllerini ve atıklarını atabileceği bir ortam sağlamalıdır. Buradaki hücreler polimer iskeletin içerisinde ekstrasellüler bileşenlerini rahat bir şekilde sentezleyip onların uygun konformasyonda yerleşmelerini sağlayabilmelidir. Zamanla polimer iskelet degrade olmalı geriye sadece canlı hücreler ve doğal doku matriksi kalmalıdır. Yapılan son çalışmalarda hem protein yapılarını hem de polisakkarit yapılarını içeren doku iskeleleri tercih edilmektedir. Polimerik iskeletler, köpük olarak, viskoz sıvı olarak, hidrojel olarak ya da yine hidrojel yapısındaki mikroküreler olarak elde edilmektedirler (Fischer JP. 2013).

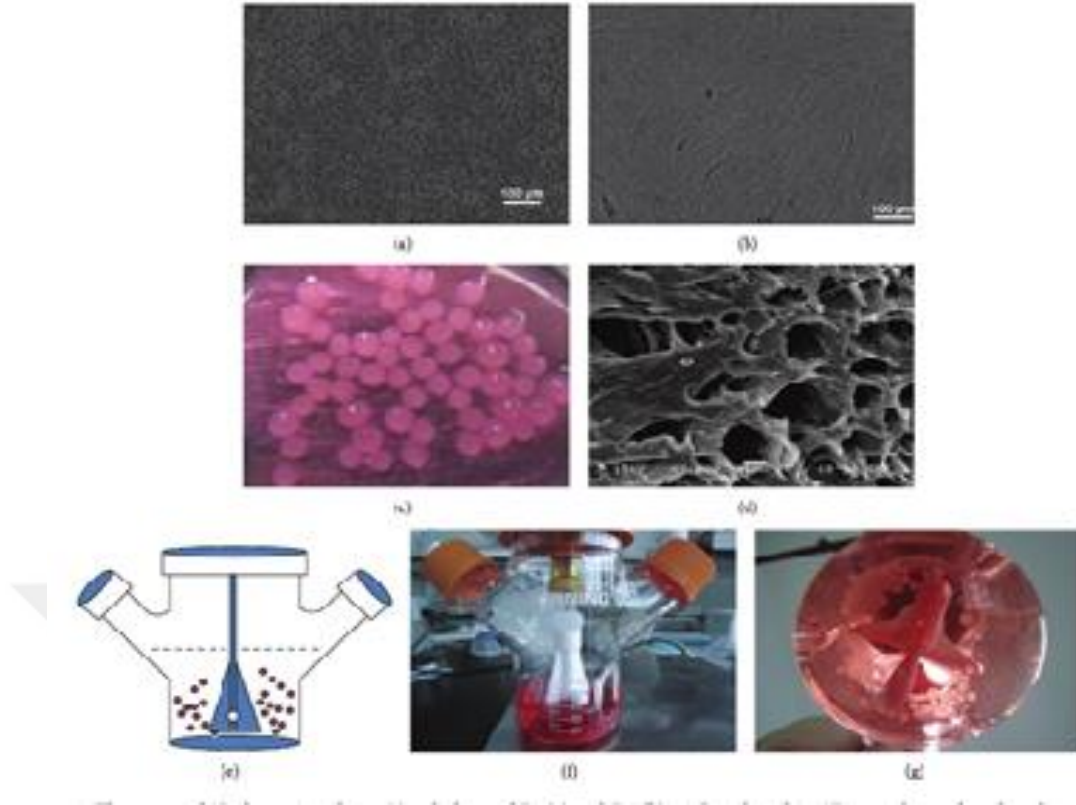
Tek tabakalı kondrosit kültüründe kondrositlerin her ne kadar proliferasyon kabiliyeti yüksek olsa da tek tabakada ilerleyen dönemde fenotipik özelliklerini kaybetmekte, kültürden alınıp polimerik doku iskelesine ekilen kondrositlerin fenotipik geri dönüşüm oranı (redifferansiyasyon oranı), eğer müdahale edilmezse düşük kalmaktadır. Çünkü kıkırdak bulunduğu dokuda fiziksel etkileşimlere cevap vermektedir. Basıncın ve üç boyutlu iskelet zincirlerinin düzenlenişinin de etkisiyle farklı tipte bileşenler sentezlenmekte bu da dokunun ekstrasellüler bileşen içeriğini ve fiziksel etkileşimlere vereceği cevabı değiştirmektedir. Güncel uygulamalarda ekstrasellüler matriks bileşimi başka bir polimer aracılığıyla taklit edilerek bağ dokusundaki kondrosit hücrelerinin differansiyasyon ve redifferansiyon mekanizması anlaşılmaya çalışılmaktadır. Ayrıca doğal ekstrasellüler matriks bileşenlerinin üç boyutlu düzenlenişi üzerine de çalışmalar devam etmemektedir. Bağ dokusunu katmanlı yapısı kısmen anlaşılmalı olsa bile son yapılan çalışmalar aynı hücre kültüründe bekletilen (ex-vivo) çok katlı polimerik iskeletlerin aynı fiziksel etkilere maruz kalması sonucu iç mimari düzenin aynı olmasına yol açtığını göstermektedir. Bölgesel bağ dokusu mühendisliği çok tabakalı dokuların ayrı ayrı ele alınarak değerlendirmesini öneren bir yaklaşımdır. Henüz çok yeni olsa bile ileride katmanlı (kompozit) polimerik iskeletlerin orijinal dokuya daha yakın polimerik iskeletlerin üretilmesini sağlayabilir (Fischer JP. 2013).

3 boyutlu iskelet destekli sistemler monolayer tabakalı sistemlere göre fenotipik geri dönüşümü (dedifferansiyasyonu) iyi düzeyde sağlayabilmektedir. Kondrositler bugün kullanılan aljinat gibi polimerik iskeletler içerisinde orijinal bağ dokusunda olduğu gibi kendilerine has yuvarlak veya uzunlamasına genişlemiş şekillerde fenotiplerini büyük oranda koruyabilmektedirler. Yapılan bir çalışmada bağ dokusu bölgeleri ayrı ayrı polimerik iskeletlerde kültüre edilmiş, yüzey bölümünden alınan kondrositler aljinat iskelette yüzeysel bölge belirteçleri olan klusterin ve proteoglikan sentezlemişlerdir. Polietilen bazlı polimerik iskelette benzer bir çalışma gerçekleştirilmiş, bölgesel bazlı kondrositler kendi bölgesinde bulunan fenotipik görünümünü göstermişlerdir. Ayrıca bir çalışmada desellulerize edilmiş (hücrelerinden arındırılmış) bağ dokusu yapısında sığır kondrositleri tıpkı doğal yapılarındaki bölgesel farklılaşmayı göstererek yüzey bölgedeki kondrositler orta ve derin bölgedeki kondrositlere göre PRG4 belirtecini daha yüksek pozitif verdiği görülmüştür. Bu da bölgesel farklılaşmanın, doğal dokunun mimarisinin ve

ekstrasellüler matriks bileşenlerinin doğru şekilde taklit edilmesiyle bölgesel doku mühendisliği uygulamasının kondrosit fenotip farklılıkları açısından daha iyi taklit edilebileceğini göstermektedir. Tabakalı kültür sistemleri henüz kullanımı ve tedariki kolay polimerle (örn. aljinatın farklı konsantrasyonları) denenmekte olup cerrahi doku alımı sırasında bağ dokusu bölgeleri ayrı ayrı in-vitro kültüre alınıp katmanlı polimerik iskelet sisteminde fenotipleri farklı kondrositler elde edilmeye ve in-vivo transplantasyona hazır edilmesi hedeflenmektedir. Ayrıca farklılaşmayı indükleyici ekstrasellüler bileşenler ve büyüme faktörleri her bölüme farklı konsantrasyonlarda verilebilecek bir kültür ortamı tasarlanabilirse doğal bağ doku yapısının daha iyi taklit edilebilmesi mümkün olabilir. Yapılan çalışmalarda böyle bir besleyici sistem için mikroçipler tasarlanmakta olup ve kollajenin 300 nm'lik fiber yapıları uzamsal konum açısından bölgesel dokuya uygun bir şekilde yerleştirilebilir. Nanoteknolojik çalışmalar açısından da nanopipetlerin ekstrasellüler bileşenleri ve fibersi yapıları hidrojeller içine üç boyutlu konumlaması faydalı olabilir (Fischer JP. 2013).

Gelişim evresinde kondrojenezis yani vücuttaki mezenkimal hücrelerin bağ dokusuna göçü ve farklılaşması kırık doku mühendisliği açısından başka önemli bir konudur. Mezenkimal hücreler bu bölgede yoğunlaşması sonrasında önce endotelial kemikleşme sonrasında kondroblastların oluşumu görülmektedir. Kondroblastlar Sox9 transkripsiyon faktörünün ortmada eksprese olmasıyla kondrositlere dönüşmektedirler. Oluşan yeni kondrositler agrekan ve tip 2 kollajen sentezleyerek hipertrofiye giderler, hipertrofik kondrositlerde 10 kollajen ve Runx2 transkripsiyon faktörlerinin sentezi artar ve sonrasında hipertrofi sonucu kondrositler apoptoza girerek bağ dokusu matriks kalsifikasyonu artar. Bu gerçekleştiğinde vasküler ağ yapısı oluşur ve osteoprojenitör hücreler osteoblastlara dönüşerek bağ matriksinde kemik sentezlemeye başlarlar. Bağ dokusunun bir tabakası bağ dokusu olarak kalır ve eklem bağlantı noktalarına dönüşür. Hipertrofik hücreler bağ dokusunun kalan kısmıyla yeni oluşan kemik dokusu arasında yer alırlar ve osteoblastlara dönüşümü devam ettirerek yeni kemik uzantılarının oluşumunu devam ettirirler. Bu duruma transdifferansiyasyon denir ve mezenkimal hücrelerin plastisitelerini göstermelerini sağlarlar. Yapılan bir çalışmada embriyonik kök hücreler olgunlaşmış kondrositlere dönüşmekte ve böyle bir plastisite gösterdiği ispat edilmiştir. Buradaki mekanizma henüz tam anlaşılammış olsa da TGF- β büyüme faktörü grubunun bağ dokusu gelişiminde önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. Terminal differansiyasyona

uğramayan veya hipertrofiye girmeyen stabil kondrosit kültürü elde edebilmek kıkırdak doku mühendisliği açısından önemlidir. Polimerik iskelet açısından da bağ dokusundan alınıp desellülarize edilmiş bir dokuda adipoz kökenli kök hücreler bağ doku yapısı formasyonu göstermiş, bu iskelet yapısı doğal dokuyla agregat modülüsü olarak karşılaştırıldığında polimer iskelet 150 kPa kadar dayanabilmekte aynı boyuttaki doğal doku 500-900 kPa kadar çıkabilmektedir. Hidrojeller küresel simetriye sahip kondrositler elde edilmesini sağlarken pellet kültürleri doğrudan hücrelerin birbirleriyle iletişim kurmasını sağlayarak hücre-hücre iletişimlerini ve buna bağlı olarak sinyal moleküllerini daha yoğun ürettikleri görülmüştür. Bu ikisinin sentezi bir mikroçevre yaratılması daha iyi sonuçlar alınabilmesini sağlayabilir. Dinamik kültür ortamlarının kullanılması hem besin iletimi açısından hem de atık atılması açısından kütle transfer kinetiklerinin daha iyi olmasını sağlayabilir. En çok kullanılan biyoreaktör tipleri döner duvarlı biyoreaktörler, perfüzyon biyoreaktörleri, döner flask ve tanımlanmış ve tanımlanmamış dinamik basınçlı biyoreaktörler olarak belirtilmiştir. Biyoreaktör sistemleri de tıpkı polimerik iskeletlerde olduğu gibi orjinal dokuyu başarılı bir şekilde taklit etmeyi hedeflemektedirler. Biyoreaktör sistemlerinde pH, oksijen, karbon dioksit, kısmi basınç, sıcaklık, besin desteği ve mekanik çevre kontrollü bir şekilde sağlanabilir (Fischer JP. 2013).



Şekil 1.26. Kıkırdak Doku Mühendisliği Yaklaşımıyla Aljinat Mikroküreler İçerisinde Enkapsüle Edilen Kondrositlerin Yüksek Miktarlarda Döner Flasklarda Eldesi(Xu,F.2014).

Yaptığımız çalışmanın amacı ileride in-vivo implantasyonu planlanan otolog kök hücrelerin veya olgunlaşmış kondrositlerin hangi matriks destekli polimerik yapılar kullanılarak koyunların eklem kıkırdağının rejenerasyonunda kullanılmasının belirlenmesidir. Literatür taramasıyla elde edilen bilgiler ışığında önceki kondrositlerin doğrudan bağ dokusuna enjeksiyonu çalışmalarında, izole edilen kondrositlerin istenilen hücre sayısına ulaşabilmek için kültür ortamında çoğaltılması sonucu istenmeyen fibro-bağ dokusu farklılaşması görüldüğü belirtilmiştir (Debnath, Shalini et al. 2015). Kendi yaptığımız çalışmada da önce literatür bilgilerini in-vitroda doğrulamayı sonrasında da çeşitli polimerik yapılar içerisinde otolog kondrositlerin çoğaltılmasını ve fibro-bağ farklılaşmasını önleyerek kondrositlerin orjinal morfolojilerinde istenen sağlıklı ekstrasellüler matriks bileşenleri sentezlemelerini sağlamaya çalıştık. Öncelikle ekilecek hücre tipleri in-vitroda adipoz kök hücreden farklılaştırılmış kondrositler ve doğrudan olgunlaşmış kondrositler olarak fibro-bağ

dokusu oluşturma oranları ve olgunlaşmış kondrosit eldesi açısından yapılan analizlerle karşılaştırılmışlardır. İkinci aşamada yapılan literatür taramasında mikroküre yapılarını sahip olduğu eşsiz geometrisi ve uygulanan dokuya uygun şekilde şekillenmesi ve diğer polimerik doku iskeleleri yapılarına nazaran daha iyi bir besin, oksijen ve ekstrasellüler matriks transfer kapasitelerine sahip olmaları sebebiyle mikroküre yapıları tercih edilmiştir. In-vitro laboratuvar analizlerinde polimer degradasyon sürelerine bakılarak aljinat mikroküreler ve aljinat-hyaluronik asit mikroküreler doku iyleşme süresinin 35 gün ve üstü süreyle sürmesi sebebiyle polimer dayanımı açısından karşılaştırılmış ve analizlerle doğrulanmışlardır. Elde edilen verilere göre mikroküre ve hücre tipi konusunda tercihler yapıldıktan sonra son aşamada daha önceden belirlenmiş olan tek tabakalı hücre kültürü ve hücre ekilmiş aljinat-kitosan liyofilize polimer kontrol grupları ile Alamar Mavisi testi ile metabolizmaları açısından birbirleri ile karşılaştırılmışlardır.

2. MATERYAL METHOD

2.1 Kullanılan Materyaller

Aljinat, kitosan düşük ağırlıklı, CaCl₂ dihidrat, NaCl (serum fizyolojik), HCl, distile su, susuz asetik asit, fosfat tampon tuzu (PBS), tripsin-EDTA, DMEM yüksek glikoz, fetal sığır serumu (FBS), penisilin/streptomisin (P/S) karışımı 100 U/mL, kollajenaz tip I, L-glutamin, StemPro kondrojenik farklılaştırma kiti, lizozim, N-asetil-L-sistein, Papain (papaya proteinaz I).

2.2 Aljinat Mikrokürelerin Sentezi

Aljinat mikrokürelerin sentezi için Durkut S. ve ark 2008'de yaptıkları protokol uygulanmıştır (Durtkut 2008). Buna göre 2 mL w/v %2'lik aljinat çözeltisi bir beher içerisinde hazırlanıp sonrasında 1 gün boyunca manyetik karıştırıcı ile karıştırılmış, ertesini gün otoklava atılarak sterilize edilmiştir. Bu çözelti bir 4 mL'lik bir şırınga içerisine alınarak bir beherde 600 rpm'de karışmakta olan w/v %10'luk CaCl₂ çözeltisi içerisine 10 cm yükseklikten elle damlatılmıştır. Damlatma sonrası aljinat çözeltisi CaCl₂ ile çapraz bağlanarak mikroküre formuna dönüşmüş ve çözelti içerisinde çapraz bağlanmanın iyi gerçekleşmesi için 10 dakika kadar bekletilmiştir. Oluşan mikroküreler steril metal bir kaşık yardımıyla 50 cm²'lik bir falkon tüpe alınmış bunun içerisinde serum fizyolojik ile 1-2 defa yıkanarak serbest CaCl₂ tuzlarından arındırılmıştır. Son olarak aljinat mikroküreler distile su içerisindeki 6 ve 12 kuyucuklu plateler içine alınarak 37 °C'deki inkübatörde sonraki analiz çalışmalarında kullanılması amacıyla saklama dolabında saklanmışlardır.

2.3 Aljinat-Hyaluronik Asit Mikrokürelerinin Sentezi

Aljinat-hyaluronik asit mikroküreler ise yukarıdaki belirtilmiş makalenin protokolü modifiye edilerek uygulanmıştır. Serum fizyolojik içerisinde çözdürülmüş 2 mL w/v %1'lik hyaluronik asit çözeltisi, yine serum fizyolojik içerisinde çözülen 2 mL w/v %4'lük otoklavlanmış aljinat çözeltisi ile karıştırılarak son karışım w/v %2'lik aljinat-%0,5'lik hyaluronik asit olacak şekilde çözelti karışımı elde edilmiştir. Bu

karışım 4 mL'lik 23 G bir şırınga içerisine yüklenmiş sonrasında bir beherde 600 rpm'de karışmakta olan 50 mL'lik %10'luk CaCl₂ çözeltisi içerisine damlatılmıştır. Bu çözelti içerisinde oluşan mikroküreler 10 dakika çapraz bağlanmanın güçlenmesi için bekletildikten sonra 50 mL falkon bir tüpün içine steril bir kaşık ile alınarak 1-2 defa yine steril serum fizyolojik ile yıkanmış, yıkanan örnekler kondrosit konulmadan 12 kuyucuklu bir plate içine alınarak 37 °C'deki inkübatörde sonraki degradasyon çalışmaları için saklama dolabında saklanmışlardır.

2.4 Aljinat ve Hyaluronik Asit-Aljinat Mikrokürelerin In-Vitro Lizozim Degradasyon Sürelerinin Hesaplanması

Kıkırdak eklemine yapılacak bir aljinat mikroküre implantasyonu sonrasında aljinat mikroküreler su içeriği yüksek bir ortamda aylarca dayanabilmekte iken vücut ortamında çok çeşitli enzimlerin etkisiyle enzimatik degradasyona da uğrayabilir. Hyalin eklem kıkırdağında aljinatın mikrokürelerin en yoğun maruz kalacağı enzimlerden biri de lizozimdir. Lizozim, bağ dokusunda kan serumundan yaklaşık 1000 kat daha yüksek oranda bulunmakta olduğu için (yaklaşık 10 mg/mL) yapılan polimer degradasyon çalışmalarında hyalin bağ dokusu ortamı baz alınmış ve sonuçlar değerlendirilmiştir (Park H. 2013). Aljinat mikrokürelerin eklem kıkırdağına implantasyonu sonrası nasıl bir degradasyon profili göstereceğini belirlemek amacıyla in-vitro ortamda 6'lı well platelerde mikroküreler PBS içerisinde 10 mg/mL oranındaki lizozim enzimi ile degradasyona uğratılmış, elde edilen sonuçlar sadece PBS çözeltisi içerisinde bekletilen mikrokürelerle çekilen mikroskop görüntüleri aracılığıyla karşılaştırılarak tamamen parçalanma süreleri belirlenmiştir.

2.5 Tavşanlardan Artiküler Bağ Dokusundan Elde Edilen Kondrosit Hücrelerinin In-Vitro Kültüre Edilmesi

Tavşanların artiküler bağ dokusundan izole edilerek sıvı azot tankında kriyotüplerde saklanılan kondrosit hücreleri sıvı azot tankından çıkarılarak 37°C'deki inkübatörde hızlı bir şekilde çözülür. Bu sırada laminer akışlı flow kabinde v/v %20'lik fetal sığır

serumu (FBS) ve v/v %1'lik penisilin/streptomisin antibiyotik içeren 50 mL'lik DMEM yüksek glikoz hazır besiyeri hazırlanır. İnkübatörde çözülen hücre çözeltisi 15mL'lik bir falkon tüpe alınarak üzerine 1 mL kadar hazır besiyeri eklenir ve 2500 rpm'de 2 dakika kadar santrifüj edilir. Üstteki süpernatant atılır dipte çökelmiş olan kondrositlerin üzerine 1 mL hazır besiyeri eklenir ve hücre miktarı sayılmak üzere 10 mikrolitre tripan blue mavisi-10 mikrolitre hücre çözeltisi karışımı bir eppendorf tüpünde karıştırılarak sayım lamına yüklenir ve otomatik hücre sayım cihazında sayımı yapılır. Sayımı yapılan hücrelerin sayısına göre ya bir-iki adet 25 cm²'lik flaskta toplamda 3 mL ya da 75 cm²'lik flaskta toplamda 5ml hazır besiyeri olacak şekilde kondrosit hücrelerinin ekimi yapılır. Flasklar 37⁰C'deki inkübatöre alınır ve besiyerleri gün aşırı olacak şekilde değiştirilir. Mikroskopik gözlemlerle takip edilen kondrositler fibroblast benzeri bir görünüm almaktadır. Flasklardaki hücre doluluk oranı %70-%80'e ulaştığında hücrelerin pasaj zamanı gelmiştir. Pasaj atmak için kullanılan Tripsinle kaldırma işlemi ile önce 25cm²'lik flaskta 1 mL, 75'lik flasklarda 1,5 mL PBS olacak şekilde kondrosit kültürü yıkanıp sonrasında 25 cm²'liklerde 0,5 mL tripsin 75 cm²'liklerde 1 mL tripsin eklenir ve 37⁰C 'lik inkübatörde 4-5 dakika kadar beklendikten sonra flasklara elle vurularak mikroskopta kondrositlerin kalkıp kalkmadığına bakılır, kalktıysa üzerlerine tripsinin sitotoksik etkisini ortadan kaldırmak için iki katı FBS içeren besiyeri eklenir ve santrifüj edilerek süpernatant atılır. Hücre sayımı yapılarak birden fazla flaska tekrar seyreltik olarak ekilir. Hücreler kalkmadığında ise tripsinde bekletme süreleri azalacak şekilde birden fazla tripsin işlemi uygulanır. Bu sayede kondrosit kültürü yaklaşık 40 gün boyunca pasaj atılarak kültüre edilmiş olur. Yaptığımız çalışmada kondrositler yaklaşık 3-4 pasaj sonrası flasklarda morfolojilerini kaybedip dejenere olmaya başladığından hem sonraki analiz çalışmaları için hem de elde çok sayıda flask tutmamak için hücreler sıvı azot tankında dondurularak saklanırlar. Dondurma işlemi için flastaki hücreler tripsinle kaldırılıp sayıldıktan sonra önceden hazırlanmış v/v %1'lik P/S ve v/v %10'luk dimetil sülfoksit (DMSO) içeren 10 mL'lik FBS dondurma çözeltisinden her kriotüpe yaklaşık 1,8 mL dondurma çözeltisi + 1 milyon kondrosit hücresi karışımı konularak kapağı kapatılır. Dondurma işlemi yavaş yavaş gerçekleşmeli, buz kristalleri hücrelere zarar vermemelidir. Bu yüzden hazırlanmış kriyotüpler önce -20⁰C'de 1 saat, ardından -80 ⁰C'de 1 gün dondurma kaplarında bekletildikten sonra -176⁰C'deki sıvı azot tankına alınıp saklanırlar. Devam etmekte olan kondrosit kültürleri için v/v %20'lik FBS ve v/v

%1'lik P/S içeren besiyerlerinin kullanımına devam edilir.

2.6 Tavşanların Artiküler Bağ Dokusundan Elde Edilen Kondrositlerin Aljinat Mikrokürelerde Enkapsülasyonu

Tavşanların artiküler bağ dokusundan elde edilen kondrositler aljinat mikrokürelerde Durkut S. ve ark'ın 2008'de yapmış oldukları çalışmanın üzerinde birkaç değişiklik yapılarak enkapsüle edilmiştir (Durtkut 2008). Özetle bölüm 2.1'de de anlatıldığı üzere w/v %2'lik 2mL aljinat çözeltisi, 10^6 adet / mL kondrosit içeren 1 ml %20'lik fetal sığır serumu ve v/v %1'lik P/S DMEM içeren besiyeri ile manyetik karıştırıcıda 300 RPM'de 5 dakika kadar laminer flow kabininin içerisinde karıştırılmıştır. Sonrasında aljinat – kondrosit çözeltisi 23G şırınganın içerisine çekilip yine manyetik karıştırıcıda 600 RPM'de cam beherde karışmakta olan w/v %10'luk 50 mL $CaCl_2$ çözeltisinin içerisine damlatılmıştır. Tüm çözelti şırınganın içerisine yüklenip damlatıldıktan sonra 10 dakika kadar çapraz bağlanmanın tamamen gerçekleşmesi için beklenilmiş ve beherde bulunan mikroküreler 6 ve 12 kuyucuklu plateler içerisine konmuş ve yine aynı besiyeri eklenerek inkübatörde inkübasyona alınmışlardır.

2.7 Mikrokürelerde Enkapsüle Edilen Kondrositlerin Histolojik Kesitlerinin Mikroskopta Görüntülenmesi

Hücre kültürünün 0., 3., 5., 8., 15. ve 30.'u günlerinde, kondrosit ihtiva eden kapsüller ve kapsülsüz veya kapsüllenmiş kondrositleri ihtiva eden hidrojel 3 kez PBS ile yıkama yapılacak ve w/v %3,7'lik formalinde 1 saat oda sıcaklığında fikse edilecektir. Rutin fiksasyondan ve alkol serisinden geçirilerek dehidrat edilecektir. Daha sonra örnekler parafine gömülerek 4-5 μ m kalınlığında kesitleri alındı ve rutin hematoksilin eosin boyama yapılarak morfolojilerine bakılmıştır.

2.8 Mikrokürelerde Enkapsüle Edilen Kondrositlerin Toluidine Mavisi ile Boyanması ve Mikroskopta Görüntülenmesi

Aljinatla kapsüllenmiş, kapsüllenmemiş kondrositlerden ve aynı zamanda kapsülleri ihtiva eden hidrojellerden alınan kesitler rutin rehidrasyon serilerinden geçirilen kesitlere kit protokolü takip edilerek toluidine blue boyası 1-2 damla damlatıldıktan sonra 1 dakika bekletildi. Daha sonra distile suda yıkanarak tekrar rutin dehidrasyon serilerinden geçirilerek lamelle kapatıldı. Kondrositlerdeki ve kondrositlerin hemen etrafındaki GAG boyanması incelemek üzere kurumaya bırakıldı. Sonrasında mikroskop görüntüleriyle boyama analiz edilmiştir.

2.9 Kitosan-Aljinat Polimer Doku İskelelerinin Oluşturulması

In-Vitroda karakterize edilen mezenkimal kök hücreden elde edilmiş kondrositlerin aljinat mikrokürelerde enkapsülasyonu in-vivo implantasyon sırasında kitosan-aljinat polimer iskeletiyle ve hiçbirşey uygulanmamış tek tabakalı tavşan kondrosit hücre kültürü örnekleriyle karşılaştırılması hedeflenmiştir. Bu sebeple bizim yaptığımız çalışmada in-vitroda bir kitosan-aljinat polimer iskeleti oluşturulup üzerine otolog olarak elde edilen tavşan kondrositleri ekilmiştir. Kitosan negatif iyon yüküne sahip olan bir polisakkarit, aljinat ise negatif iyon yüküne sahip bir polisakkarittir. Bu ikisinin birbirleriyle karıştırılmasıyla elde edilen polimer karışımının iyonik etkileşime girmesi beklenir. Bu karışımın sahip olduğu kimyasal yapılar eklem kıkırdağının ekstrasellüler matriksinde bulunan kondroidin sülfat, keratan sülfat ve hyaluronik asit gibi çeşitli glikozaminoglikanların kimyasal yapılarına benzemektedir. Bu glikozaminoglikanlar kıkırdak dokusuna basınca dayanım ve dolgu amaçlı şişme özelliği gibi mekanik özellikler sağlamaktadırlar. Kitosanın pozitif yüklü amin gruplar ($pK_a= 6.3$) ve aljinatın negatif yüklü karboksilik asit grupları ($pK_a 3.4-3.7$) ile elektrostatik olarak çapraz bağlanmasıyla ya da ileri düzeyde Ca^{+2} , Ba^{+2} , Sr^{+2} gibi divalent katyonlarla ileri düzeyde bağlanmasıyla çapraz bağlı bileşikler oluşturabilmektedir. Divalent katyonlar aljinatın yapısında bulunan gulukuronik asit kalıntılarıyla ortaklaşa etkileşime girmekte ve böylece farklı aljinat polimer zincirleri arasında iyonik bağlı köprüler oluşturmaktadırlar. pH 3,4 ile pH 6,3 arasında kitosanın ve aljinatın fonksiyonel grupları arasında iyonik etkileşim

olduğu görülmektedir. Ancak bu pH aralığında dolgu maddesi olarak kullanılmasını sağlayan şişkinlik özelliğini kaybetmekte bu yüzden mekanik özelliklerini istenilen şekilde gösterememektedir. Ancak insan vücudundaki pH'ın 7,4 olması sayesinde polimer karışımı şişkinliğini tekrar kazanması beklenir. Ayrıca aynı pH aralığında da aljinatla kitosan arasında bir miktar iyonik etkileşimle bağlanma gerçekleşmesi beklenmektedir (Reed and Wu 2017). Protokolü kısmen değiştirilmiş olarak kullanılan makalede elde edilen aljinat-kitosan polimer karışımı iskeletin in-vitroda kondrosit fenotipini düzenlediği ve kondrogenesi desteklediği belirtilmiştir (Reed and Wu 2017). Yaptığımız çalışmada dokunun fizyolojik durumu göz önüne alınarak aljinat oranı yüksek tutulmuş bu sayede aljinatın Ca^{+2} ile çapraz bağlanma oranı yükseltilmiştir. Başarılı sonuç elde edilen bir çalışmada in-vivo implantasyonu yapılan polimer iskeletlerin çapraz bağlanması sonucu elde edilen yapının mekanik dayanımının güçlendirilmesi hedeflenmiş yaklaşık 42 gün dayanmasının yeterli olduğu belirtilmiştir (Park, Choi et al. 2013). Bu sebeple biz de kendi çalışmamızda farklı karışım oranları deneyip liyofilize ettiğimizde görsel olarak şişkinlik ve mekanik dayanım açısından en stabil yapının özetle w/v %2'lik aljinat – w/v %0,3'lük kitosan karışımının 5/2 oranında hazırlanması olduğu kanaatine varıldı. Öncelikle w/v %2'lik aljinat distile su ile bir beher içerisinde çözülerek manyetik bir karıştırıcıda ertesi güne kadar karıştırılır, sonrasında otoklavlanarak oda sıcaklığında saklanır. Düşük moleküler ağırlıklı w/v %0,3'lük kitosan (Sigma-Aldrich) ise %1'lik saf asetik asitle (Sigma Aldrich) beraber pH'ı düşürülerek distile su içerisinde bir beherde çözülür. Sonrasında mekanik şişkinliği sağlamak amacıyla kitosanın pH'ı 4,5'e çekilir. Bu iki karışım cam bir beher içerisinde mikropipetle karıştırılır. Bu iki karışımın analiz çalışmaları için kalıplamasının düzgün olabilmesi amacıyla 96 well plateler kullanıldı. Bu plateler karışımdan belirli oranlarda eklenerek sonrasında üzerine w/v %10'luk $CaCl_2$ çözeltisi eklenir. Sterilizasyonun otoklavda mekanik dayanımı ve şişkinliğini düşürdüğü görüldüğü için bunun yerine v/v %70'lik etil alkolle 1 saat sterilize edilmiştir. Toksik alkol kalıntılarının arındırılması için bir saat boyunca v/v %10 FBS ve v/v %1 Pen/Strep içeren yüksek glikoz içerikli DMEM hazır besiyerinde bekletildi. Son olarak kültürü yapılmış kondrositler in-vitro analiz çalışmaları için 96'lı well platede aljinat-kitosan polimer karışımı üzerine ekilerek kültüre edildiler. Belirli günlerde mikroskop görüntüleri çekimi ve Alamar Blue metabolikaktivitetestleriyapıldı.

2.10 Mikrokürelerde Enkapsüle Edilen ve Kitosan-Aljinat Doku İskelelerine Ekilen Kondrositlerin Alamar Blue Testi ile Kondrosit Metabolik Akitivitesinin Hesaplanarak Karşılaştırılması

Alamar Blue testi için kullanılan protokol Mendes ve ark'ının 2012'de yaptığı makaleye dayanmaktadır. Aljinatla kapsüllenmiş ve düz hücre kültürlerinin metabolik aktiviteleri Alamar Blue uygulaması ile tespit edildi. 96 kuyucuklu platelerin içine konulan kapsüllü hücrelerin üzerlerine her kuyucuğun %10'u kadar Alamar Blue çözeltisi eklenerek 37⁰C'de 20 saat karanlık ortamada inkübe edildi. İnkubasyondan sonra her kuyucuktan 10 mikrolitre çözeltisi alınarak başka bir 96 kuyucuklu platelere ekimi yapıldı. Absorbans değerleri 570 nm ve 600 nm'de Elisa okuyucudaokundu.

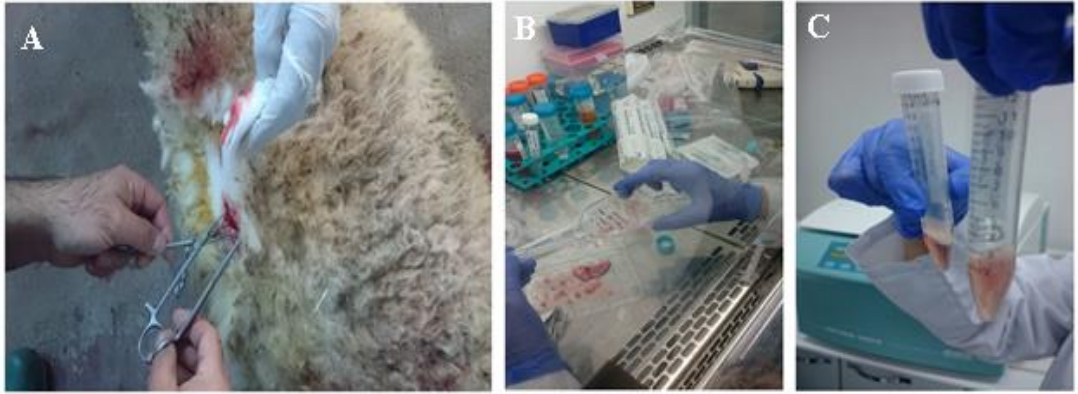
2.11 Koyunların Lumbal Bölgesinden Elde Edilen Adipoz Kökenli Mezenkimal Kök Hücrelerin Kültüre Edilmesi (AKH Kültürü) ve Kök Hücrelerin Kondrojenik Farklaştırılması

2.11.1 Koyun Lumbal Bölgesinden Adipoz Kökenli Kök Hücre İzolasyonu

Yapılan çalışmada Kırıkkale Üniversitesi Veterinerlik Fakültesinde düzenli bakımları yapılan koyunların yağ dokusunun damardan zengin olan stromasından (SVF) yağ hücreleri uzaklaştırıldıktan sonra adipoz kökenli kök hücre elde edilmiştir. Burada uygulanan protokol Alp Can ve arkadaşlarının 2014 yılında hazırlamış oldukları Kök Hücre kitabı baz alınarak ufak değişikliklerle hazırlanmıştır (Can 2014).

Koyunlardan doku örneği almak için Kırıkkale Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi'nde operasyonel cerrahi uygulaması etik şartlara uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Cerrahi operasyon yetkili bir veteriner hekim eşliğinde yapılmıştır. Koyunların Lumbal bölgesi öncelikle povidon iyodür (Batikon, Ankara) ile temizlenmiş, sonrasında 2-3 cm'lik insizyon ile yarılmış ve derinin hemen altında bulunmakta olan yağ dokusundan yaklaşık olarak 5 mL hacminde doku steril bir bistüri ile kesilerek alınmıştır. Alınan doku örnekleri önceden hazırlanmış olan v/v %5'lik P/S antibiyotik içeren 50 mL'lik PBS çözeltisi eklenerek falkon tüplerde doku

laboratuvarına getirilmiştir. Bu doku örnekleri sırasıyla 24 kuyucuklu plâtelere povidine iyodürde 5 dakika ve serum fizyolojikte bir-iki dakika bekletilerek havayla temas eden yüzeyleri tekrardan sterilize edilir. Sonrasında 24 kuyucuklu plâtelere kapak kısmı ters çevrilerek dokular üstüne konular, üzerine yaklaşık 0,5 mL %1'lik P/S ve v/v %10 FBS içeren DMEM'li besiyeri dokuların kurumaması için eklenip dokular steril bir bistüri ile çok küçük parçalara ayrıştırılır. Adipoz kökenli kök hücre eldesi işlemi çalışmanın deneysel kısmı kapsamında iki gruba ayrıldı.



Şekil 2.1. Koyunun lumbal bölgesinden adipoz kökemli kök hücre eldesi. A) Koyundan lipopektomi ile v/v %5'lik pen/strep antibiyotikli PBS çözeltisi içeren 50 mL'lik falkonlara alınan yağ dokusu. B) Alın yağ dokularının mekanik parçalama sonrası 25 cm²'lik flâsklara iğne ile ekimi C) Kollajenaz enzimi ile parçalanmış yap dokusunun santrifüjle üstte yağ dokusu altta Stromal Vasküler Fraksiyonları (SVF) olacak şekilde ayrıştırılması. Kırıkkale Üniversitesi Merkezi Araştırmalar Birimi (KÜBTAL) Kök Hücre Laboratuvarı. 2015.

1. grup elde işleminde doku parçaları flâsklara doğrudan ekilirler. Steril bir 23 G iğne ile iyice küçültülmüş olan yağ doku parçaları 25 cm²'lik flâsklara çizilerek yapılır. Önceden hazırlanmış olan v/v %10 FBS'li hazır besiyerinden birer damla iğne yardımıyla üzerlerine damlatıldı. Damlatma işleminden sonra flâsklar ters çevrilerek 37⁰C'lik inkübatöre konuldu. Ters çevirmenin sebebi dokuların flâsk içindeki yapışkan bölgeye iyice tutunmalarını sağlamaktır. Ertesi gün flâsklar tekrar ters çevrilip normal hallerine getirildi ve üzerlerine 3 mL v/v %10'luk besiyerinden eklenir. Doğrudan doku ekiminde yaklaşık bir hafta sonunda yağ doku parçalarından

hücrelerin döküldükleri mikroskop altında görülmektedir. İlk hafta hiç besiyeri değişimi yapılmadan geçtikten sonra kök hücrelerin dökülmelerinin başladığı görülen flasklarda gün aşırı olacak şekilde besiyeri değişimi yapılır. Primer kültür adı verilen hücrelerin flaska ilk kez tutundukları bu kültürler yoğun miktarda adipoz kökenli kök hücre içermektedir. Mikroskop gözlemiyle gündelik olarak takip edilen flasklarda hücreler yeterli yoğunluğa ulaştıklarında üst üste gelmeden yüksek hücre çoğalma evresinde tripsinle kaldırılıp yeni flasklara aktarılırlar. İkinci kez flaska ekilen hücreler kısmi olarak stromal vasküler fraksiyon parçaları içermektedir. Bu ufak parçalar çok sayıda kök hücrenin sağlıklı bir şekilde çoğalmalarına öncülük ederler. Doku kalıntıları ilk pasajdan sonra giderek azalır bu yüzden doğrudan doku ekiminde ilk pasajda çoğalan hücreler dondurularak sıvı azot tankında saklanırlar (Stem Pro® Human Adipose-Derived Stem Cells. Kullanım Kılavuzu ve İzolasyon Prosedürleri).

Kollajenaz Tip 1 enzimi kullanılarak yapılan 2. grup çalışmada ise doku parçaları iğne ucu yardımıyla 15'lik falkon tüplere konulurlar ve üzerlerine v/v %2'lik P/S antibiyotik, %0,075mL'lik Kollajenaz Tip 1 enzimi ve w/v %0,075'lik CaCl₂ enzim aktifleyici tuz içeren 5 mL PBS çözeltisi eklenerek tüpler +37°C'deki inkübatöre yerleştirilirler. Çalkalamalı inkübatör bulunmadığından tüpler her 15 dakikada bir çıkarılarak elde çalkalanır ve tekrar 37°C'lik inkübatöre konulurlar. Yaklaşık 1 – 1,5 saat sonunda tüpler inkübatörden alınıp 2500 rpm'de 2 dakika kadar santrifüj edilir. İki faz oluşur. Üstte oluşan faz yağ kısmı, altta kalan faz ise adipoz kök hücreleri de içeren stromal vasküler fraksiyondur (SVF). Yağ hücrelerinden kurtulmak için süpernatant atılır. Altta kalan kısım hala kollajenaz Tip 1'in etkisinde olduğu için falkon tüpe v/v %10'luk FBS içeren besiyeri konulup enzimin etkinliği sonlandırılır. Ardından tüpler tekrar santrifüj edilip üstteki sıvı atılarak enzim atıklarından uzaklaştırılmış olur. Dipte kalan pelletler ya doğrudan ekilerek yaklaşık 4-5 günde kök hücre dökülmesi sağlanır ya da varsa 70 mikrometrelik bir filtreden geçirilerek (Hücre Filtresi, BD Science) altta kalan sıvı doğrudan flasklara ekilip saf bir mezenkimal kök hücre kültürü yaklaşık 72 saatte elde edilmiş olur. Burada eğer cerrahi işlem sırasında alınan yağ dokusu yoğun miktarda kan içeriyorsa kan kontaminasyonu adı verilen flaskların eritrositlerle dolması durumuyla karşılaşılabilmekte ve mezenkimal kök hücre elde edim süresinin uzamasına yol açabilmektedir. Bu durumda son ekim öncesi elde edilen tüpler ya bir iki kez PBS ile

ya da NH_4Cl ile bir kez yıkanarak doku sıvısı eritrositlerden arındırılmalıdır. Yaptığımız çalışmada arındırma sırasında ilk elde edilen kök hücre sayısında azalmalar görülebilmektedir. Bu yüzden dokuyu alırken olabildiğince kansız almak gerekir. Ayrıca yapılan başka benzer çalışmalarda 3'lü antibiyotik olarak tabir edilen Penisilin/Streptomisin/Amfoterisin kullanımı önerilmekte ancak 2'li antibiyotik olarak tabir edilen P/S kullanımıyla da steril koşullar düzgün sağlandığında adipoz kök hücresi elde edilebilmektedir. Enzimatik işleme elde edilen kültürler doğrudan ekime göre daha az doku kalıntısı içermekte saf kültüre ilk flask ekiminde ulaşabilmektedir. Flasklar tutunmaya başlamış ilk kök hücrelerin görüldüğü günden itibaren gün aşırı olacak şekilde v/v %1 Pen/Strep ve v/v %10'luk FBS içeren DMEM besiyeriyle kültüre edilir. Flasklar %70-%80 doluluk oranına ulaştıklarında hücreler tripsinle kaldırılıp sonrasında dondurularak sıvı azot tankında saklanırlar. Normal FBS inkübatörde 60°C 'ye çıkarılıp 1 saat ısıtılıp inaktive olarak kullanıldı. FBS'nin inaktive hali daha steril olduğu için tercih edilmiştir. Mikroskopik gözlemler ile bakıldığında normal FBS ile kök hücre çoğalması ve morfolojisi açısından bir fark görülmemiştir. Ayrıca kök hücrelerin çoğaltılması sırasında besiyerinde %20'den fazla FBS'nin kullanımı adipojenik farklılaştırmaya yol açtığı belirtilmektedir. Yaptığımız bir deneysel çalışmada mikroskopik gözlemlerde %20'nin üstünde kullanılan FBS'li besiyeri kültüründe adipoz kök hücrelerinin adipojenik farklılaşmaya uğradığı görülmüştür. Bu yüzden kendi çalışmalarımızda kök hücre kültüründe besiyerinde v/v %10 FBS kullanımı uygun görülmüştür.

2.11.2 Koyun Lumbal Bölgesinden İzole Edilmiş Adipoz Kökenli Kök Hücrelerin Kondrojenik Farklılaştırılması

Sıvı azot tankından çıkarılan koyun lumbal adipoz kök hücreleri çözündürme işleminden sonra 25 cm^2 'lik flasklara ekilir. Hücre besiyeri olarak v/v %1'lik Pen/Strep antibiyotik ve v/v %20 FBS içeren DMEM grubu ve yine v/v %1'lik Pen/Strep antibiyotik içeren StemPro kondrogenesis farklılaştırma ortamı grubu (DMEM düşük glikozlu besiyeri), 200 mM L-Glutamin, 50 mM L-Askorbik Asit, Insulin-Transferrin-Selenyum (ITS), 100 mM Deksametazon, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ TGF-beta 3 (Gibco) olmak üzere iki grup kültüre edilmiştir. Sadece DMEM grubu hücreleri kontrol amaçlı olarak yapılan analiz çalışmalarında kullanılmıştır. Besiyerleri gün aşırı olacak şekilde değiştirilir. %70-%80 hücresel yoğunluğa ulaşıldığında pasaj

yapılmıştır. Kaynak makalelerden elde edilen veriler ışığında kondrositler dizdeki bağ dokusunda küresel bir simetriye sahip olmaktadır. Ancak yaptığımız çalışmada adipoz kök hücreleri flasklarda kondrositlere farklılaştıktan sonra differansiyasyon adı verilen süreç sonucu fibroblast benzeri bir görünüm kazanmaktadırlar. Bu görünüm onların morfolojik olarak yapılarını bozmakta, istenilen komponentleri üretmelerinde sorunlar yaratmaktadır. Bu sebeple 7. günden sonra farklılaştırılan kondrosit hücrelerinin bir kısmı aljinat-hyaluronik asit mikrokürelerde enkapsüle edilmiş ve orijinal küresel morfolojilerini tekrar kazanmaları sağlanarak dedifferansiye edilmişlerdir. Bu sayede adipoz kök hücrelerden farklılaştırılan ve sonrasında mikrokürelerde enkapsüle edilen kondrositler orijinal morfolojilerine sahip olup istenilen ekstrasellüler komponentleri sentezleyerek ileride yapılabilecek in-vivo bağ doku rejenerasyonu çalışmalarında hücre sel tedavi yöntemi olarak kullanılabilirler.

2.12 Real Time-PCR ile kondrositlerin Tip I ve II Kollagen, Aggrecan, SOX9, COMP Gen Ekspresyonlarının Değerlendirilmesi

PCR tekniğiyle kondrositlerin kondrojenik potansiyelleri için belirlenmiş olan ve çalışmalarda ön plana çıkmış olan kondrojenik parametrelerin (markerların) ekspresyonları kantitatif olarak incelenmiştir. Kondrojenik farklılaşmada kollajen tip I olgunlaşmış kondrositlerin sentezlemediği bir proteindir ve mezenkimal kök hücrelerin ortamda varlığını gösteren bir belirteçtir (negatif belirteç) (Chen, Tsai et al. 2005). Kollajen tip II hyalin kondrositlerin sentezlediği bir proteindir (pozitif belirteç) (Masuda, Sah et al. 2003). Aggrecan hyalin kıkırdak dokusunda bulunan hücrelerin sentezlemiş olduğu ekstrasellüler bir matriks proteinlerinden biridir (pozitif belirteç) (Masuda, Sah et al. 2003). Sox9 kıkırdak oluşumunda ortaya çıkan transkripsiyon faktörlerinden birisidir (pozitif belirteç) (Can 2014). Hücreler 200mL PBS içerisinde süspansiyon haline getirilir. Daha sonra üzerine 400µL Lysis/-Binding Buffer eklenir ve 15 saniye vortekslenirler. Örnekleri filtre tüpüne transfer etmek için: bir filtreli tüp toplama tüpünün içine yerleştirilir, maksimum 700µL örnek alınıp filtreli tüpe aktarılır ve 8000xg de 15 saniye santrifüj edilir. Santrifüjden sonra filtreli tüp toplama tüpünün içinden çıkartılıp sıvı kısmı atılır ve tekrar filtreli tüp toplama tüpünün içine koyulur. Steril reaksiyon tüplerinin içine her örnek için

90µL DNAaz Inkübasyon Tamponu koyulacak ve 10µL DNAaz I eklenip karıştırılır ve cam filtrenin üzerindeki çözelti alınıp filtre tüpünün üst kısmına eklenir. 15 dakika +15'ten 25°C ye kadar sıcaklıkta inkübe edilir. Daha sonra filtrelili tüpe 500µL Wash Buffer I eklenir ve 8000xg de 15 saniye santrifüj edilir. Santrifüjden sonra toplama tüpünde kalan sıvı kısım atılıp filtre tüpü yeni bir toplama tüpünün içerisine koyulur. Daha sonra filtrelili tüpe 500µL Wash Buffer II eklenir ve 8000xg de 15 saniye santrifüjden sonra toplama tüpünün içinde kalan sıvı kısım atılacaktır. Ardından filtrelili tüpe 200µL Wash Buffer II eklenecek ve hiçbir wash buffer kalıntısı kalmaması için 2 dk maksimum hızda (yaklaşık 13000xg) santrifüj edilir ve daha sonra toplama tüpü atılıp ve filtrelili tüp temiz ve steril 1.5mL' lik mikrosantrifüj tüplerine yerleştirilir. RNA'nın ayrıştırılması için; filtre tüpüne 50-100µL Elution buffer eklenir ve 8000xg de 1 dakika santrifüj edilir. Mikrosantrifüj tüpünün içine ayrıştırılan RNA, RT-PCR da kullanılmak üzere -80°C de saklanır. RNA miktarının belirlenmesi için 7 µL eluent kullanılır. Eluentteki RNA miktarının belirlenmesi, cDNA senteziyle eşzamanlı yürütülür. Daha sonra 260 nm'de spektrofotometrik (Analytik Jena Spekol 1300) ölçüm yapılır. RNA çözeltisi 1:20 oranında WFI ile seyreltilir, (7 µL RNA çözeltisi + 133 µL WFI). 122.5 µL'si mikroküvete alınır ve ölçüm yapılır. 260 nm'de RNA miktarı [µg/mL] belirlenir. Spektrofotometre için referans değeri= OD (260 nm) / OD (280 nm) olarak hesaplanır. Sonrasında cDNA sentezi yapılır. Jel dokümantasyonu için cDNA amplifikasyonu sağlanır. PCR Mix çözeltisi hazırlanır ve gerçek zamanlı PCR prosesi gerçekleştirilir. Elde edilen sonuçların kontrol grubuna göre karşılaştırması yapılır.

2.13 Glikozaminoglikan Ölçümü ile (DMMB) ile Glikozaminoglikan Miktarının Belirlenmesi

DMMB tayini için temel olarak Yoon I.S. ve ark. 2011'de kullanmış oldukları metod takip edildi (Yoon, Chung et al. 2011) . Özetle 16 mg dimetil metilen mavisi, 2,37 g NaCl, 95 mL 0,1 mol/L HCl 1000 mL olacak şekilde distile suda çözüldü ve pH 3.0 olarak ayarlandı. Hazırlanan DMMB çözeltisi kullanılmaya kadar kahverengi şişede 4°C'de saklandı. Yaklaşık 1×10^6 adet kondrosit besiyerinde kültüre edilmiş ve edilmemiş adipoz kökenli mezenkimal kök hücre hücreler 300 mg/mL papain (papaya proteinaz I), 2 mM EDTA, 2 mM N-asetil-L-sistein (Sigma-Aldrich) içeren çözelti içerisinde 65°C'de bir gece parçalandı. 100 mM Na₂HPO₄ ve 5mM EDTA

100mL distile suda çözülerek PBE (fosfat tamponu edta) tampon çözeltisi hazırlandı. Standart için 125µg/mL kondroidin sülfat, hazırlanan PBE çözeltisi içerisinde çözdürülerek hazırlandı. 0-10µg/mL arasında artan şekilde hazırlanan kondroidin sülfat çözeltileri 48 well plate in kuyucuklarına 20'er µL koyuldu ve üzerlerine 200 µL DMMB stok çözeltisi eklendi. 1 gece boyunca parçalanmış hücreler 8000 g de 15 dk santrifüj edildikten sonra üstte kalan süpernatant PBE çözeltisi kullanılarak 1-10µg/mL arasında artan şekilde hazırlanıp 3 tekrarlı olarak kuyucuklara 20'er µL eklendi ve üzerlerine 200 µL DMMB stok çözeltisi eklendi. Örnekler 525 nm de ELISA plate okuyucuda okutuldu.

2.14 Gerçek Zamanlı Analiz Sistemi ile Kök Hücrelerin ve Kondrositlerin Proliferasyonu ve Farklılaşma Profillerinin Oluşturulması

Adipoz kökenli kök hücreler ve kondrosite dönüştürülmüş 15. gündeki kondrosit hücreleri E-plate olarak adlandırılan hücrelerin tutunduğunda ve çoğaldığında elektriksel bir impedans oluşturduğu 96'lı well platalere e-plate'in her bir kuyucuğuna 5000 hücre olacak şekilde ekimi yapılır. Kök hücreler v/v %10 FBS ve v/v %1 Pen/Strep çözeltisi içeren DMEM'li besi yeri içerisinde well platin her bir kuyucuğunda gerçek zamanlı hücre analiz sistemine sahip (RTCA) X-celligence cihazı içerisinde 37⁰C'lik inkübatörde kültüre edilirler. Daha önceden kondrosite farklılaştırılmış hücreler de aynı zamanda hem kondrojenik farklılaştırma ortamında hem de DMEM'li hazır besiyerinde kültüre edilmişlerdir. Her gün hücrelerin vasatı değiştirilmiş ve toplam 96 saat süren bilgisayarlı gözlem yapılmıştır. Cihaz bu süre zarfında her on dakikada bir empedans ölçerek bize ekilmiş hücrelerin proliferasyon karakteri hakkında bilgi vermiştir. Oluşan hücre karakteristik çizelgeleri her hücre tipine özgü bir eğri oluşturmuş bu eğriler birbirleriyle karşılaştırılarak yorumlanmışlardır. Empedans değişikliği hücre sayısındaki artışa veya hücrenin yüzeyle temas ettiği alandaki küçülme veya artışa göre değişmektedir.

Farklılaşmış kondrosit ve adipoz kökenli kök hücrelerin empedans karakterlerinde değişiklikler, besiyerleri açısından karşılaştırılmıştır. Kondrosit hücrelerine 24. Saaten sonra ortama v/v %10 FBS'li kontrol DMEM'i eklendiğinde morfolojilerinde veya hücre proliferasyonunda bir azalma olduğu empedans değerlerindeki artış hızının

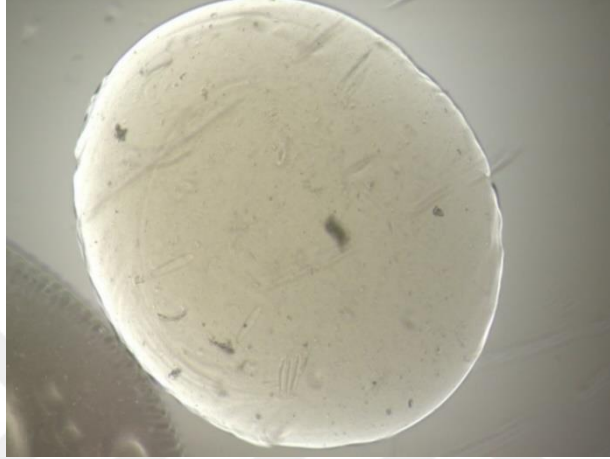
azalmasından anlaşılmaktadır. Bu da bize kondrojenik farklılaştırma ortamının DMEM besi ortamına göre proliferasyonu daha çok arttırıcı bir etkisi olduğunu göstermektedir. Aynı şekilde adipoz kökenli kök hücrelerin besiyerini farklılaştırma ortamıyla değiştirdiğimizde, benzer şekilde farklılaştırma ortamının kök hücrelerinin proliferasyonunu DMEM’li hazır besiyerinde daha çok arttırdığı görülmüştür. Kök hücreye bakıldığında ise normal besi ortamına içerisinde kültüre edilen kök hücrelerde daha fazla proliferasyon ve morfolojik değişiklik görülmemiş iken, 24. saatten sonra kondrojenik besi ortamına ilave edilen grupta normal besi ortamı göre proliferasyonda artış gözlenmiştir. Fakat 70. saatten sonra morfolojik değişikliğe bağlı olarak empedans değerlerinde bir düşüş gözlenmiştir. Bu da bize farklılaştırma ortamına konmuş kök hücrelerin yaklaşık 3. günden itibaren proliferasyon hızlarını düşürüp kondrojenik farklılaşmaya girmeye başladıklarını göstermektedir.

2.15 Kondrojenik Olarak Farklılaştırılmış Adipoz Kök Hücrelerin Aljinat Mikrokürelerde Enkapsülasyonu

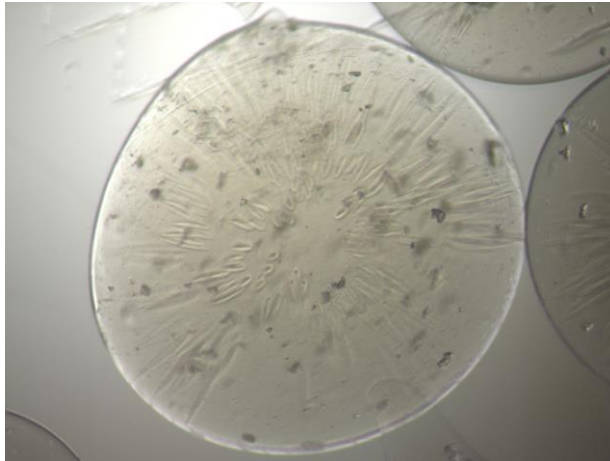
Koyunların lumbal bölgesinden elde edilen ve kondrojenik olarak farklılaştırılan kondrositlerin aljinat mikrokürelerde enkapsülasyonu Durkut S. ve ark’ın 2008’de yapmış oldukları çalışmanın üzerinde birkaç değişiklik yapılarak gerçekleştirilmiştir. (Durkut 2008). Bölüm 2.1’de de anlatıldığı üzere w/v %2’lik 2mL’lik aljinat çözeltisi, 10^4 adet / mL farklılaştırılmış kondrosit içeren 1 ml %20’lik fetal sığır serumu ve v/v %1’lik P/S DMEM içeren besiyeri ile manyetik karıştırıcıda 300 rpm’de 5 dakika kadar laminer flow kabininin içerisinde karıştırılmıştır. Sonrasında aljinat – kondrosit çözeltisi 23G şırınganın içerisine çekilip yine manyetik karıştırıcıda 600 rpm’de cam beherde karışmakta olan w/v %10’luk 50 mL $CaCl_2$ çözeltisinin içerisine damlatılmıştır. Tüm çözelti şırınganın içerisine yüklenip damlatıldıktan sonra 10 dakika kadar çapraz bağlanmanın tamamen gerçekleşmesi için beklenilmiş ve beherde bulunan mikroküreler 6 ve 12 kuyucuklu plâtelere içerisine konmuş ve yine aynı besiyeri eklenerek inkübatörde inkübasyona alınmışlardır.

3.TARTIŞMA VE SONUÇLAR

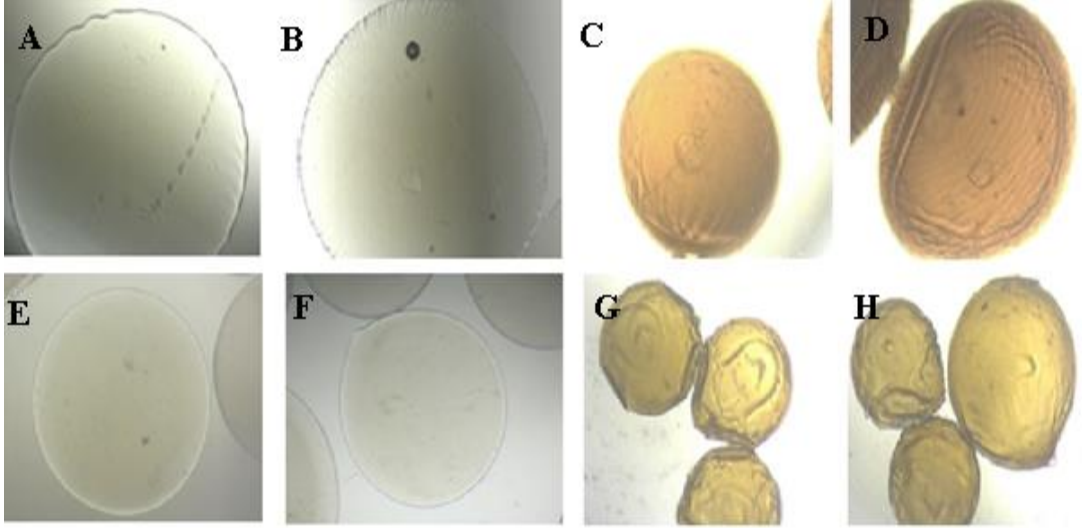
3.1 Aljinat ve Aljinat-Hyaluronik Asit Mikrokürelerin Sentezlenmesi ve In-Vitroda Lizozim Degredasyonunun Değerlendirilmesi



Şekil 3.1. Laboratuvarıda Üretilmiş %2'lik Aljinat Mikroküre Mikroskop Görüntüsü (40x).



Şekil 3.2. Laboratuvarıda Üretilmiş %2 Aljinat-%5 Hyaluronik Asit Mikroküre Mikroskop Görüntüsü (40x).



Şekil 3.3. İn-Vitro Lizozim Degredasyonu Çalışması 0. Hafta A) Aljinat mikroküre/PBS (Kontrol) B) Aljinat -Hyaluronik Asit mikroküre/PBS(Kontrol) C) Aljinat/PBS-Lizozim D) Aljinat-Hyaluronik Asit/PBS-Lizozim. 1. Hafta; E) Aljinat mikroküre/PBS (Kontrol) F) Aljinat -Hyaluronik Asit mikroküre/PBS(Kontrol) G) Aljinat mikroküre/PBS-Lizozim H) Aljinat-Hyalunik Asit mikroküre/PBS-Lizozim

Yapılan bir çalışmada hyalin kıkırdakta bulunan lizozim enziminin kitosan polimer iskelet degradasyonuna olan etkisine bakılmış, lizozimin kıkırdakta 10 mg/ml değerinde olduğu belirtilmiş, 42 gün sonunda kitosan polimer yapısının büyük oranda enzimatik degradasyona uğradığı belirtilmiştir (Park, Choi et al. 2013). Yaptığımız in-vitro lizozim degradasyonu testinde mikroskop görüntülerinin desteğiyle aljinat mikrokürelerin suda aylarca dayanabildiği, sadece PBS içerisinde 40 gün sonrasında yapısını büyük oranda koruduğu ve 10 mg/ml lizozimli PBS çözeltisi içinde ise 28 günden fazla süre dayandığı görülmüştür. Ancak aynı uygulama w/v %2 aljinat – w/v %0.5 hyaluronik asit karışımıyla elde edilen polimerik mikroküreler için denendiğinde yapının aljinat mikrokürelerden daha hızlı çözülerek 20. günden sonra parçalanmaya başladığı görülmüştür. Hyaluronik asit düz zincirlerden oluşan bir polisakarit olduğu için aljinatla karıştırıldığında herhangi bir güçlü iyonik çapraz bağlama görülmemesi ve üstüne düz hyaluronik asit polimerik zincirlerinin aljinatın $CaCl_2$ ile çapraz bağlanmış yapısının stabilitesini düşürmesi sebepleri ile degradasyon profillerinin sadece aljinatla edilen mikrokürelere göre daha düşük çıktığı düşünülmektedir. Bu sonuçlara dayanarak artiküler bağ dokusu implantasyonu hedefli yapılacak çalışmalar da düşünülerek hyaluronik asit–aljinat

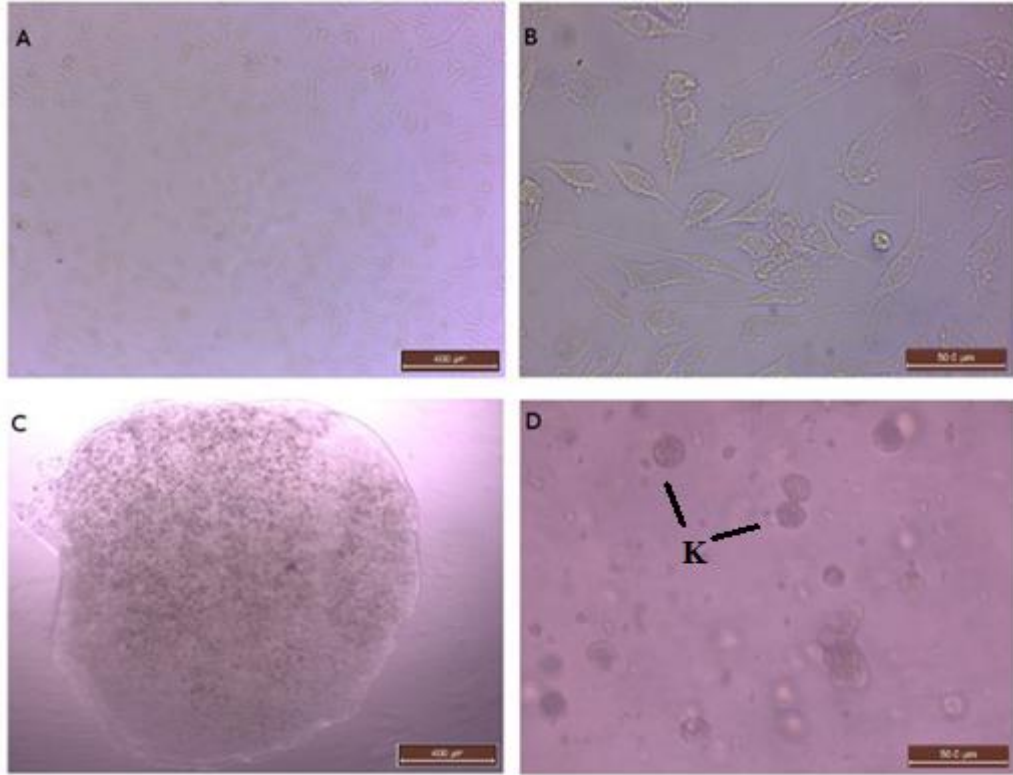
mikroküreler yerine sadece w/v %2'lik aljinat mikroküre uygulaması sonraki analizlerde tercih edilmiştir.

3.2 Tavşanlardan Elde Edilen Kondrosit Hücrelerinin In-Vitro Kültüre Edilmesi Mikroküreler İçerisinde Enkapsülasyonu

Koyunun artiküler bağ dokusundan izole edilen kondrositlerin tek tabakalı (monolayer) ve aljinat mikrokürede enkapsüle edilmiş kültürlerinde zaman içerisindeki morfolojik değişimleri ışık mikroskopunda görüntülenmiştir. Kondrosit hücreleri tek tabakalı kültürde fibroblast benzeri bir görünüm alırken aljinat mikroküre içindeki kültüründe küresel bir morfolojiye sahip olmaktadır. Bu durum bize flask kültürlerdeki kondrositlerin zamanla differensiyasyona (değişime) uğradığını gösterirken, 3 boyutlu kültürlerdeki kondrositlerin ise küresel morfolojilerini korumayı başarmakta olduklarını anlatmaktadır. Kaynak makalelerden elde edilen veriler ışığında dizdeki bağ dokusunda merkez bölgede bulunan kondrositlerin küresel bir simetriye sahip oldukları belirtilmiş, yapılan kabullerde tüm bölgelerdeki kondrositlerin de küresel simetriye sahip olduğu varsayımları yapılmıştır (Han, Federico et al. 2007) (Guilak and Mow 2000). Ancak yaptığımız çalışmada adipoz kök hücreleri flaklarda kondrositlere farklılaştıktan sonra dedifferansiyasyon adı verilen süreç sonucu fibroblast benzeri bir görünüm kazanmaktadır. Bu görünüm onların morfolojik olarak yapılarını bozmakta, istenilen komponentleri üretmelerinde sorunlar yaratmaktadır. Elde edilen literatüre göre mikroküreler içerisinde enkapsüle edilen farklılaştırılmış kondrositlerin mikroküreler içerisinde fibro-bağ karakteristiği göstermeden orijinal morfolojilerini koruyabildikleri belirtilmektedir (Ewa-Choy Y.W., et al. 2017), (Debnath, Shalini et al. 2015), (Girandon, L., et al. 2011) Mikroküre enkapsülasyonu sayede adipoz kök hücrelerden farklılaştırılan ve sonrasında mikrokürelerde enkapsüle edilen kondrositler orijinal morfolojilerine sahip olup istenilen ekstrasellüler komponentleri de sentezleyerek ileride yapılacak olan in-vivo bağ doku rejenerasyonu çalışmalarında hücresel tedavi yöntemi olarak kullanılabilirler.

Şekil 3.8'de de görüldüğü üzere tavşanların artiküler bağ dokusundan izole edilen kondrositlerin in-vitro flask ortamında çoğaltılması (A),(B) ve fibro-bağ

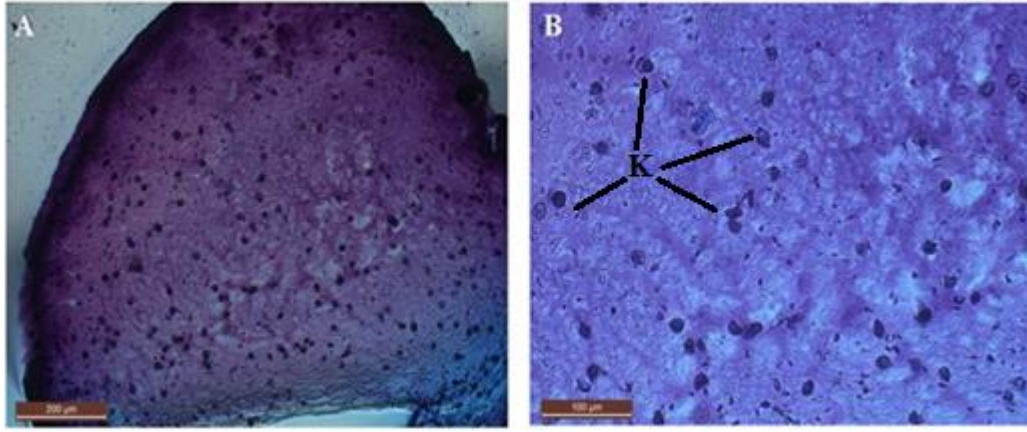
farklılaşması gerçekleştirilmeden mikroküreler içine enkapsülasyonu gerçekleştirilmiştir (C),(D). Mikroskop görüntülerinde de görüldüğü üzere kondrositler mikroküreler içerisine enkapsüle edildikten sonra yuvarlak görünümlü morfolojilerini 15. Gün sonundaki görüntülerde kondrositlerin yuvarlak morfolojilerini mikroküreler içerisinde korudukları görülmektedir.



Şekil 3.4. Kültüre alınan kondrositlerin 15.gündeki morfolojileri görülmekte. 2 boyutlu flask kondrosit kültürü (A) (50x) ve (B) (200x). Aljinat mikrokürede 3 boyutlu enkapsüle kondrosit kültürü (C) (50x) ve (D) (200x).

3.3 Kondrosit İçeren Aljinat Mikrokürelerin Toluidine Mavisi ile Boyanması

Aljinat mikroküreler 30 gün boyunca 12 kuyucuklu plakelerde inkübe edilip sonrasında çıkarılarak dondurma çözeltisi ile -20°C 'de dondurulduktan sonra kriyotomda 0,3 mm'lik kesitleri lam üzerine alınmış ve hemen ardından lamlara Toluidine Mavisi damlatılıp 5 dakika beklendikten sonra PBS ile yıkaması yapılmış ve ışık mikroskobunda görüntülenmiştir. Toluidine Mavisi boyası normalde mavi renkli boya iken, boyama sonrası kondrositlerin mikroküre içinde sentezlemiş olduğu glikozaminoglikan içeriğini mor-pembe renkte boyayarak hem mikroküredeki hücrelerin yoğunluğu hakkında hem de glikozaminoglikan yoğunluğunu göstererek kondrositlerin olgunlaşma düzeyi hakkında bize fikir vermektedir. Alttaki fotoğrafta aljinat mikroküreler içindeki olgunlaşmış kondrositler görülmektedir

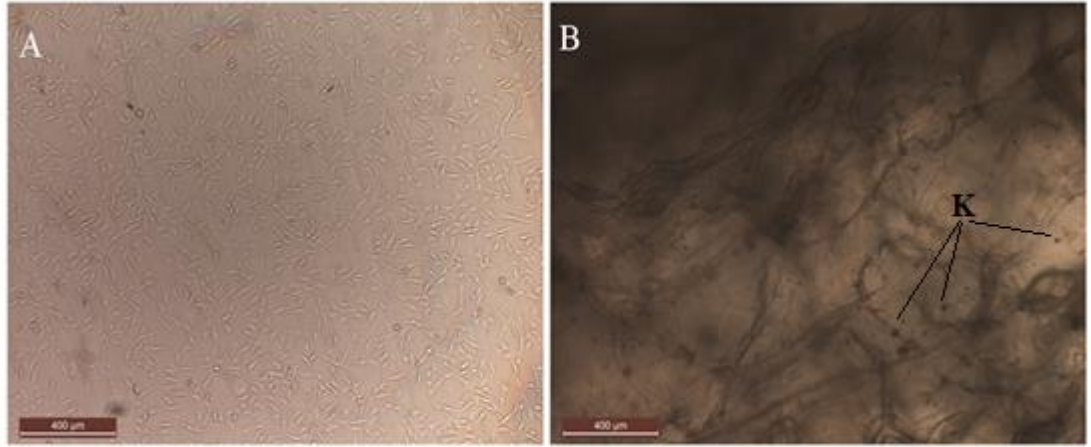


Şekil 3.5. Kondrosit içeren aljinat mikrokürelerin toluidine mavisi ile boyanma görüntüleri.. (A) (100x). Kondrositlerin (K) sentezlemiş olduğu glikozaminoglikan hücrenin çevresinde halesel bir görünümde renk vermektedir (B) (200x).

Şekil 3.9'da da görüldüğü üzere Toluidine mavisi kondrosit hücrelerinin sentezlemiş olduğu glikozaminoglikan bölgesini göstermektedir. Normalde koyu mavi olan boya, hücrenin çevresindeki glikozaminoglikanın varlığında mor-pembe renk almaktadır.

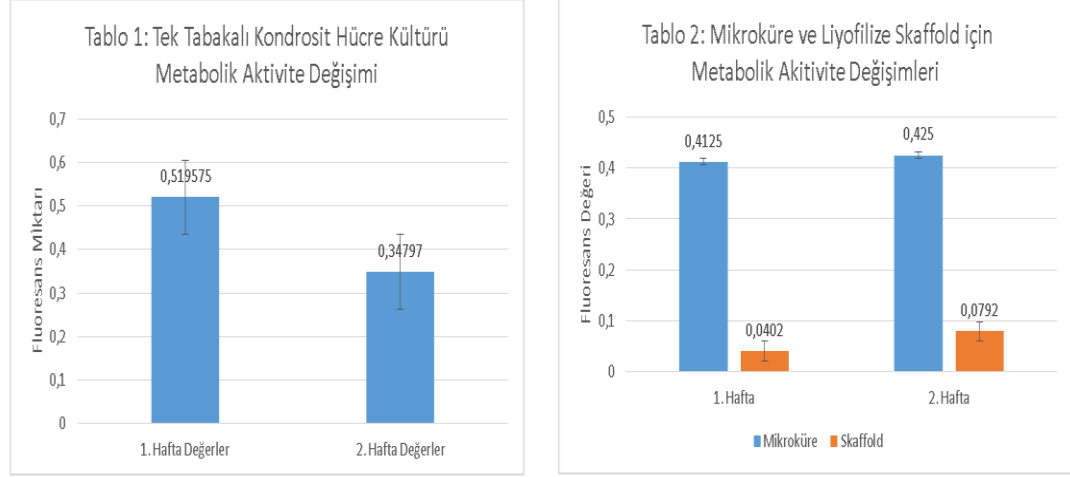
3.4 Aljinat-Kitosan Polimer Doku İskelelerine Kondrosit Hücrelerinin Ekiminin Mikroskop Altındaki Görüntüleri

Şekil 3.10’de görüldüğü üzere ekimi yapılan hücrelerin tutunma etkinliği açısından aljinatın doku iskelesi yapıları aljinat mikroküre yapılarına göre zayıf kalmaktadır. Kondrositler ekim sırasında polimer yüzeyine küresel bir morfolojiyle tutunmakta, bir kısım kondrosit hücresi ise yüzeyden ve geniş por çaplarından kayarak 96’lı well plate tabanına yapışmaktadır. Şekil 3.10’da ilk hafta boyunca hücrelerin polimere tutunup proliferere oldukları görülmektedir. Ancak görüntülerde aljinatın liyofilize edilmiş polimerik iskelet yapılarının hücre tutunma etkinliği açısından aljinat mikrokürelere göre zayıf kaldıkları görülmektedir.



Şekil 3.6. Koyunun artiküler bağ dokusundan elde edilen kondrosit hücrelerinin aljinat-kitosan polimerine ekim fotoğrafları; (A) düz hücre kültürü, (B) %2’lik aljinatın-%0,3 lük kitosanla 5/2 oranında karıştırılmasıyla elde edilen polimer iskeletine kondrosit hücresinin (K) ekimi sonrasındaki ilk hafta sonundaki kültür görüntüleri. Faz kontrast mikroskobu (50x).

3.5 Kondrosit İçeren Aljinat-Kitosan Polimerde Alamar Mavisi Sonuçlarının Kondrosit İçeren Aljinat Mikrokürelerde Alamar Mavisi Floresans Sonuçları ile Karşılaştırılması

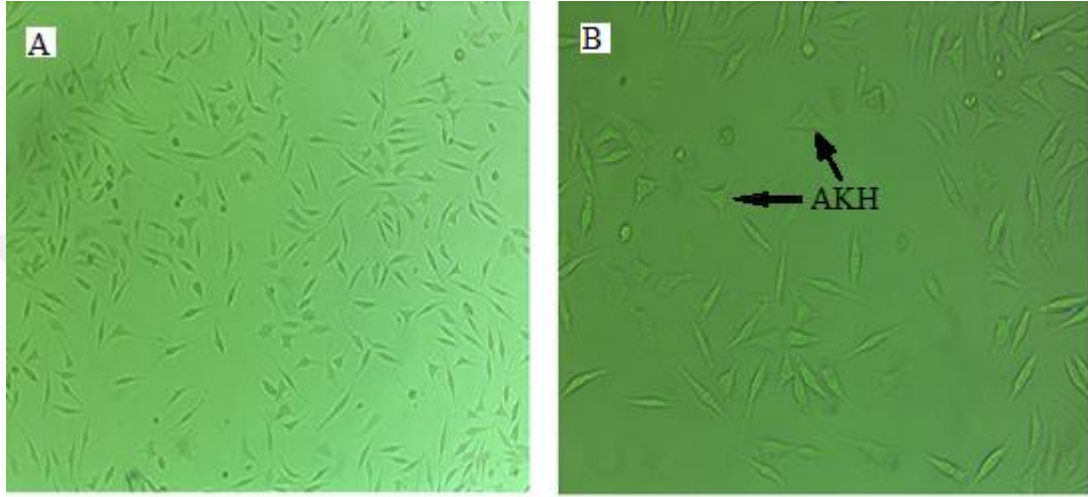


Şekil 3.7. Tek tabakalı kondrosit kültürünün geçen zaman içindeki metabolik aktivite değişimi (Tablo1). Aljinat mikrokürelere ve liyofilize edilmiş aljinat-kitosan doku iskelelerine ekilmiş kondrosit hücrelerinin Alamar Blue testi ile belirlenen metabolik etkinliğinin floresans değerlerinin haftalara göre değişimi (Tablo 2).

Mikroküre ve liyofilize doku iskeleleri içinde kültüre edilen kondrositlerin Alamar mavisiyle boyanması ile elde edilen metabolik aktivite sonuçlarına göre ilk haftada ortalama 4 mikrolitrelik bir aljinat mikroküredeki kondrositlerin floresans değeri aynı miktardaki liyofilize aljinat-kitosan doku iskelelerine göre daha yüksek çıktığı görülmüştür. Sebebi olarak mikroküre enkapsülasyon tekniğinin çok sayıda hücreyi matriks yapısı içine hapsettiği ancak liyofilize doku iskelesinin ise üzerine hücre ekilmesi gerektiğinden hücrelerin liyofilize doku iskelesindeki geniş por yapılarından ve zayıf yüzeysel hücre-polimer etkileşiminin de etkisiyle doku iskelesi matriksinde düşük tutunma gösterdikleri düşünülmektedir (Girandon, L., et al. 2011). İkinci haftada ise aljinat-kitosan liyofilize doku iskelesi içindeki kondrositlerin mikrokürelere göre metabolik aktivite artış hızı daha yüksek çıkmıştır. Ancak iki haftanın sonuçları genel olarak ele alındığı zaman enkapsülasyon tekniği enkapsüle edilen ilk hücre sayısının oldukça yoğun olması sebebiyle beklendiği üzere total

hücre sayısı sonuçları daha yüksek çıkmıştır.

3.6 Koyunların Lumbal Bölgesinden İzole Edilip Çoğaltılan ve Mikroküreler İçerisinde Enkapsüle Edilen Adipoz Kök Hücrelerinin Mikroskoptaki Görünümleri

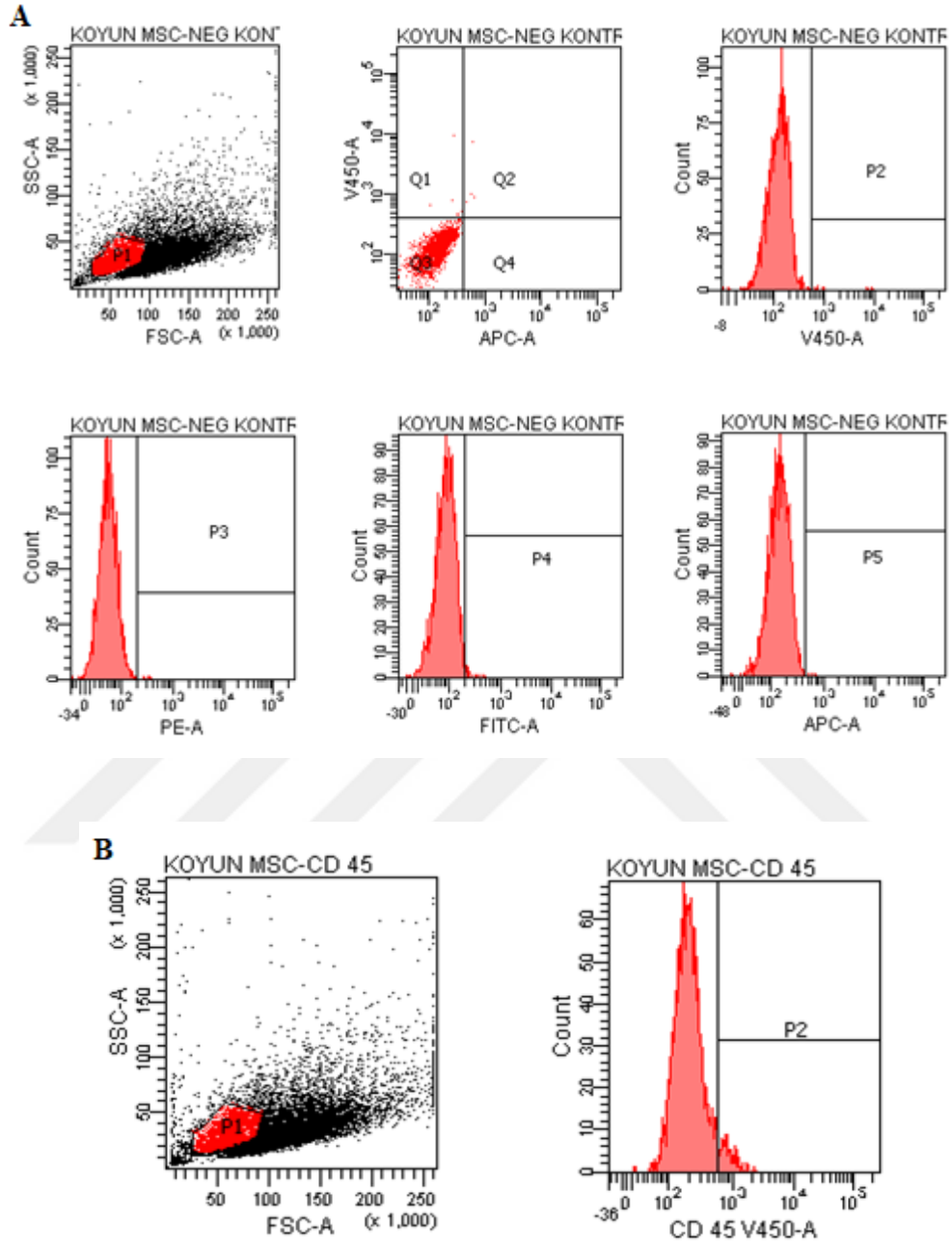


Şekil 3.8. Adipoz kökenli mezenkimal kök (AKH) hücrelerin kültürü 1. gün. Faz Konrast Mikroskobu, (A)100x. B(200x).

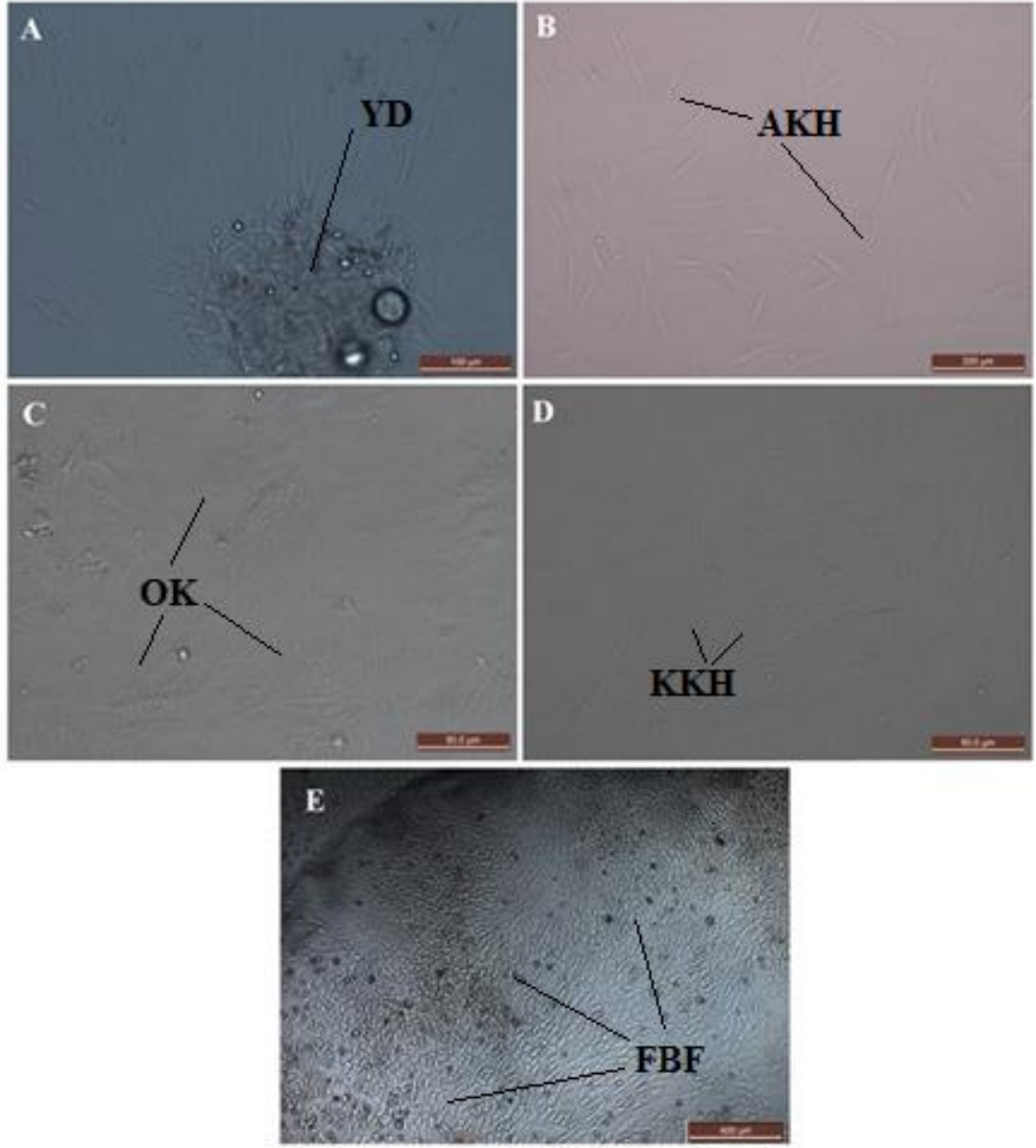
Koyunların lumbal bölgesinden izole edilen adipoz kökenli kök hücrelerin in-vitro ortamda kültüre edilmesi sırasında çekilen mikroskop görüntülerinde de (Şekil 3.8) görüldüğü üzere yağ dokusundan flaska dökülen ilk hücreler tripsin enzimi ile kaldırılmış sonrasında tüplere aktarılıp santrifüjlendikten sonra dipteki pelletler tekrardan yeni flaslara ekilmişlerdir. İlk pasajlarda da görüldüğü üzere hücrelerde herhangi bir deformasyona rastlanılmamaktadır.

3.7 Koyunların Lumbal Bölgesinden İzole Edilen Adipoz Kökenli Kök Hücrelerin In-Vitroda Kondrojenik Farklılaşmasının ve Kondrojenik Farklılaşma Sonrası Dedifferansiyasyonun Gösterimi

Çeşitli hayvanlardan (Mackay, Beck et al. 1998) ve insanlardan (Pittenger, Mackay et al. 1999) izole edilen mezenkimal kök hücrelerin spesifik farklılaştırma ortamlarında adiposit, kondrosit, myosit ve fibroblast hücrelerine dönüştükleri literatürde belirtilmiştir. Kondrojenik farklılaşma sonrası akabinde devam eden tek tabakalı hücre kültüründeki farklılaşma yaklaşık 3. pasaj sonrasında dedifferansiyasyona uğrayarak fibro-bağ dokusu karakteristiği kazandığı önceki çalışmalarda gösterilmiştir. Yapmış olduğumuz çalışmada koyunların lumbal bölgesinden izole edilen adipoz (yağ kökenli mezenkimal kök hücrelerin de benzer şekilde dedifferansiyasyona uğradıkları şekil 1’de gösterilmiştir.



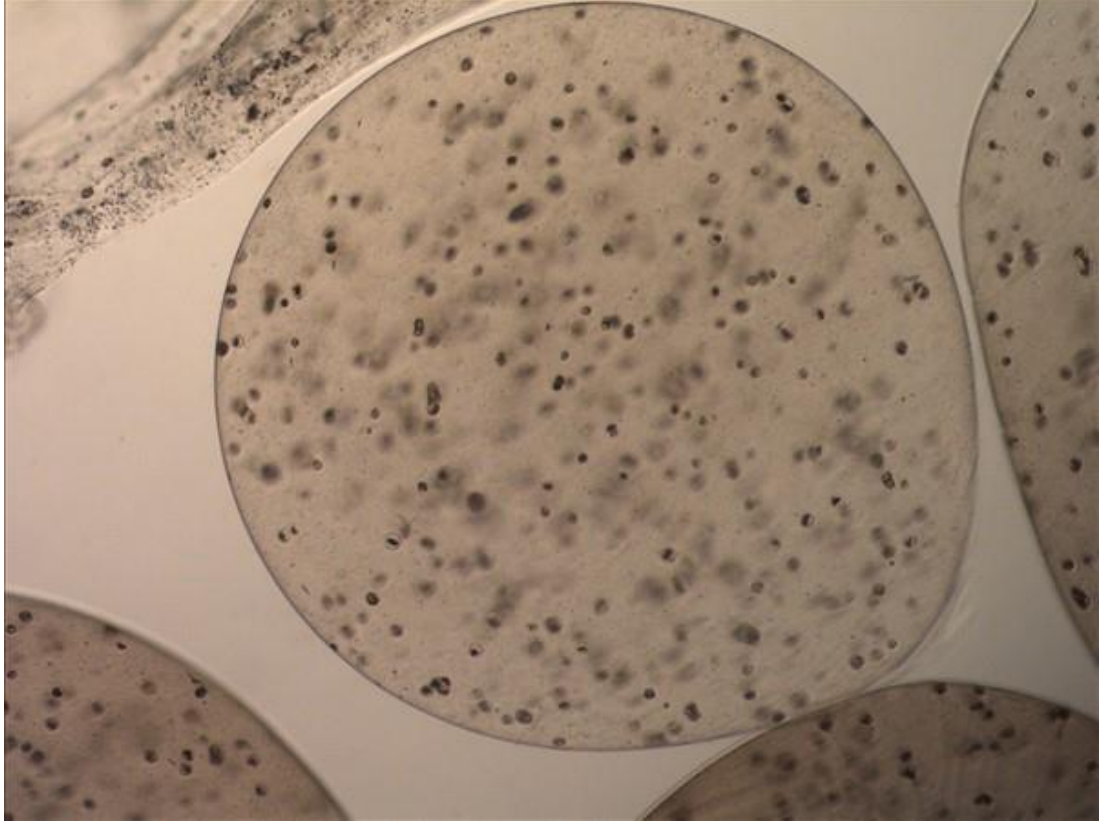
Şekil 3.9. Koyunlardan elde edilen adipoz kök hücrelerin flow sitometri analizleri. Koyunlardan izole edilen kondrositler flow sitometrik analizlerde negatif belirteç olarak analiz edilmişlerdir (A). Koyunlardan elde edilen adipoz kök hücrelerin kök hücre oldukları çeşitli farklılaşma (CD) markerlarıyla gösterilmişlerdir (B).



Şekil 3.10. Adipoz kökenli mezenkimal kök hücrelerin (AKH) izolasyonu ve sonrasında StemPro kondrojenik farklılaştırma ortamındaki mikroskop görüntüleri. (A) Koyun lumbal yağ dokusundan (YD) adipoz kök hücrelerinin eldesi (100x). (B) %10 FBS'lu DMEM ortamında in-vitroda çoğaltılan adipoz kök hücreler (AKH) (100x). (C) Stem Pro kondrojenik farklılaşma kiti ile farklılaştırılan kondrosit (K) hücreleri (400x). (D) %10 FBS'lu DMEM ile devam ettirilen kontrol kültür (400x). (E) Kondrojenik kondrosite farklılaştırılan kök hücrelerin fibro-bağ farklılaşması (dedifferansiyasyonu) (FBF) (50x).

Yaptığımız çalışmada literatür taramasıyla da desteklenen analizlerde kondrojenik farklılaştırma ortamında adipoz kökenli kök hücreler kondrojenik farklılaşmayla yaklaşık 7-10 gün içerisinde kondrosite dönüşmektedir. Kondrosite farklılaşmış hücreler ilerleyen zamanda differansiye olmakta, ilerleyen kültürlede ortalama 3.pasaj sonrası fibro-bağ dokusu karakteristiği göstermektedir (Debnath, Shalini et al. 2015). Faz kontrast mikroskobu(50x).

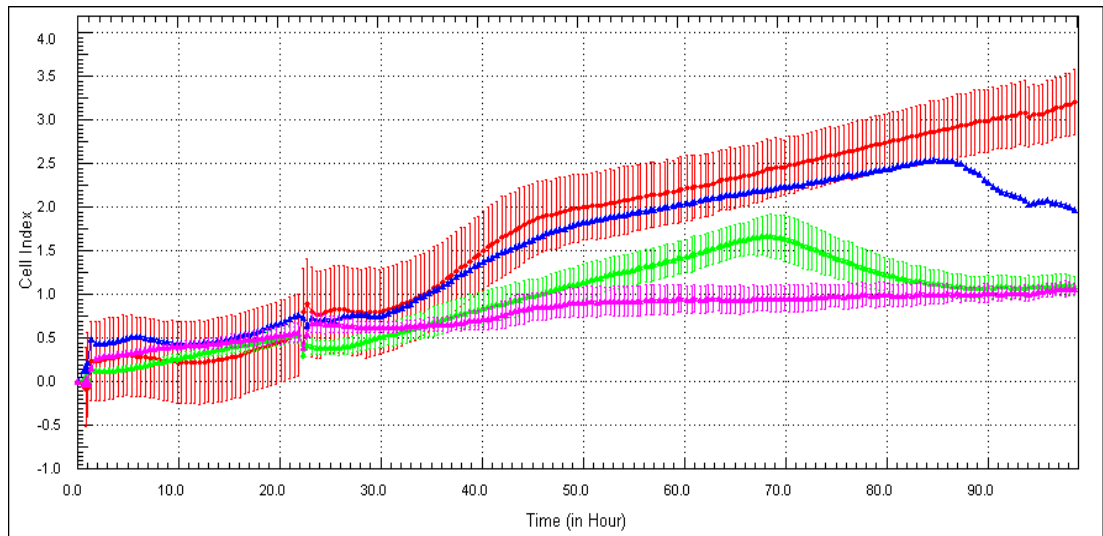
3.8 Koyunlardan Elde Edilen Kondrosite Farklılaştırılan Adipoz Kökenli Kök Hücrelerin Mikroküreler İçinde Enkapsülasyonu



Şekil 3.11. Adipoz kök hücreden farklılaştırılan kondrositlerin mikroküreler içerisinde enkapsülasyonu. Faz kontrast mikroskobu (40x).

3.9 Gerçek Zamanlı Analiz Sistemi ile Kök Hücrelerin ve Kondrositlerin Proliferasyonu ve Farklılaşma Profillerinin Oluşturulması

Farklılaşmış kondrosit ve adipoz kökenli kök hücrelerin empedans karakterlerinde değişiklikler, denenen besiyerleri açısından karşılaştırılmıştır. Kondrosit hücrelerine 24. Saaten sonra ortama v/v %10 FBS'li kontrol DMEM'i eklendiğinde morfolojilerinde veya hücre proliferasyonunda bir azalma olduğu empedans değerlerindeki artış hızının azalmasından anlaşılmaktadır. Bu da bize kondrojenik farklılaştırma ortamının DMEM besi ortamına göre proliferasyonu daha çok arttırıcı bir etkisi olduğunu göstermektedir. Aynı şekilde adipoz kökenli kök hücrelerin besiyerini farklılaştırma ortamıyla değiştirdiğimizde, benzer şekilde farklılaştırma ortamının kök hücrelerinin proliferasyonunu DMEM'li hazır besiyerinde daha çok arttırdığı görülmüştür. Kök hücreye bakıldığında ise normal besi ortamı içerisinde kültüre edilen kök hücrelerde daha fazla proliferasyon ve morfolojik değişiklik görülmemiş iken, 24. saatten sonra kondrojenik besi ortamına ilave edilen grupta normal besi ortamına göre proliferasyonda artış gözlenmiştir. Fakat 70. saatten sonra morfolojik değişikliğe bağlı olarak empedans değerlerinde bir düşüş gözlenmiştir. Bu da bize farklılaştırma ortamına konmuş kök hücrelerin yaklaşık 3. günden itibaren proliferasyon hızlarını düşürüp kondrojenik farklılaşmaya girmeye başladıklarını göstermektedir.



Şekil 3.12: Xcelligence Cihazıyla 96'lı E-Platelere ekilmiş olan hücrelerin bilgisayar ortamında empedansının 10'ar dakika aralıklarla kaydedilmesi sonucu elde edilen

hücreye özgü karakteristik eğri. Kırmızı çizgi farklılaştırılmış kondrosit (24 saat sonrası farklılaştırma ortamı eklenmesi). Mavi çizgi farklılaştırılmış kondrosit (DMEM kontrol) Yeşil çizgi adipoz kökenli kök hücre (20. Saat sonrası farklılaştırma ortamı). Pembe çizgi adipoz kökenli kök hücre (DMEM Kontrol).

3.10 Kondrojenik Farklılaşma Sırasındaki Glikozaminoglikan Değerlerinin DMMB ile Ölçümünün Değerlendirilmesi

Çizelge 3.1. Absorbansa Göre Kondrosit Sayısının Belirlenmesi

Gruplar	standart	7.gün		15.gün	
		kontrol	kondrojenik	kontrol	kondrojenik
0 µg/ml	0,082	0,075	0,078	0,073	0,074
1,25µg/ml	0,116	0,081	0,085	0,074	0,074
2,5µg/ml	0,129	0,084	0,085	0,077	0,076
5µg/ml	0,137	0,084	0,090	0,079	0,080
7,5µg/ml	0,145	0,086	0,094	0,085	0,081
10µg/ml	0,147	0,087	0,095	0,085	0,102

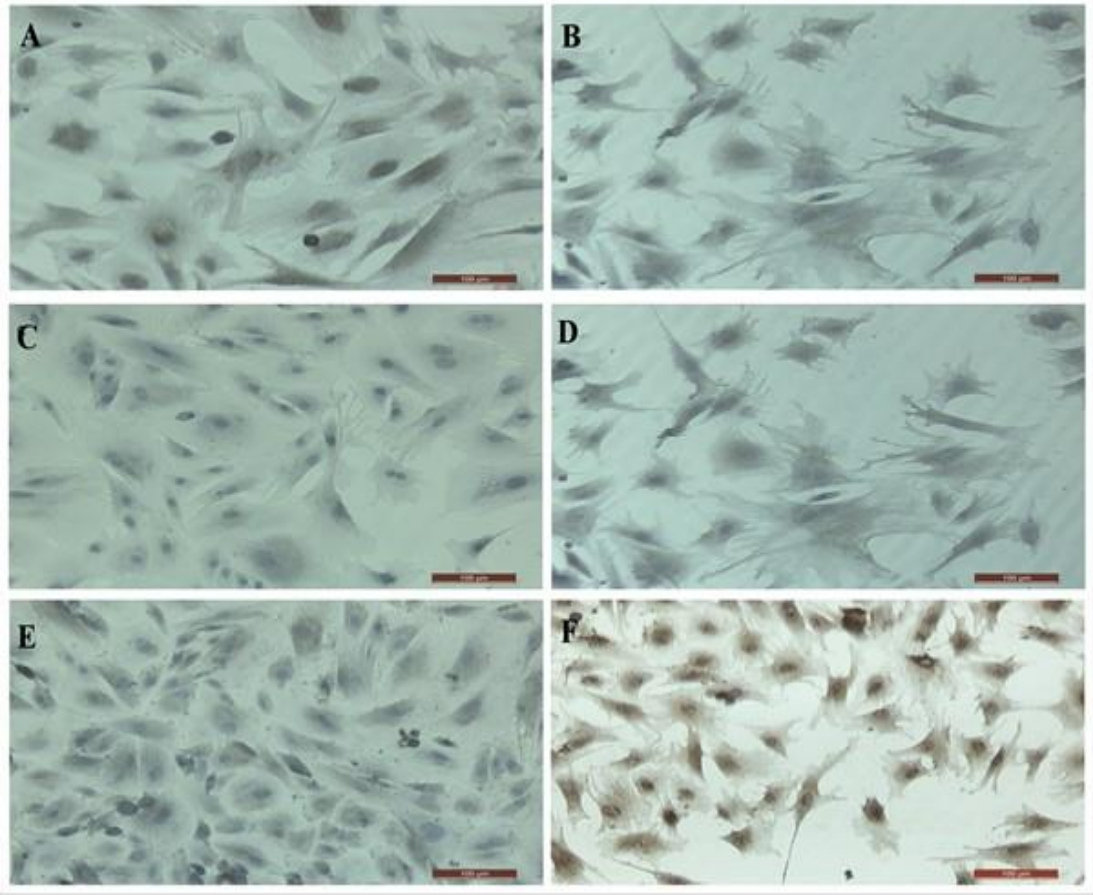
Yaptığımız çalışmada mikroküreler bir sonikatör içerisinde parçalanmış sonrasında elde edilen mikroküre parçalarının ölçümüne bakılmıştır. Ancak elde edilen değerler oldukça düşük çıkmıştır. Bunun sebebi olarak kontrol grubunun tripsin ile flasktan

hücre kaldırılması sırasında ortam sıvısının analize dahil edilmemesi gösterilebilir.

3.11 Antikor Boyaması Sonuçları (Kollajen Tip I, Tip II ve Agrekan)

Adipoz kökenli mezenkimal kök hücrelerin 1 hafta boyunca Stempro kondrojenik farklılaşma ortamında ve kontrol grubunun DMEM+%10 FBS çözeltisi kullanılması ile kültüre edilerek çeşitli proteinlerin gen ekspresyonlarına, üretilen proteinlere bağlanan spesifik antikorlarla (agrekan, kollajen tip I, kollajen tip II) bağlı floresans işaretleyiciler ile bakılmıştır. Burada antikor bağlanan bölgeler kahverengiyle boyanmış, hücrelerin çekirdekleri de mor renkle boyanmıştır. Buna bağlı olarak agrekan ve kollajen tip II kondrojenik farklılaşma belirteci olarak gösterilirken kollajen tip I ise fibroblast benzeri yapı belirteci olarak kullanılmaktadır. Elde ettiğimiz sonuçlarda 7. günde agrekan miktarının arttığı görülmekte bu da örneklerde mezenkimal kök hücrelerin artık kondrojenik farklılaşma yönünde ilerlediği gösterilmektedir. Burada kondrojenik farklılaşma ortamı DMEM + v/v %10 FBS'ye nazaran daha çok farklılaşma gösterdiği görülmektedir. Kollajen tip II için de ikisinde de pozitif belirteç gözükmekte, kondrojenik farklılaşma ortamı içinde olan grup daha fazla boyanarak hücreler açısından daha uygun bir besi ortamı olduğu anlaşılmaktadır.

Son olarak da kollajen tip I için de her iki besi ortamı da benzer bir görünüm göstererek mezenkimal hücre belirteci bize başlangıçta ve devamında ilk 7 gün için herhangi bir fibroblast benzeri bir oluşuma dönüşme olmadığı ispat edilmiştir.

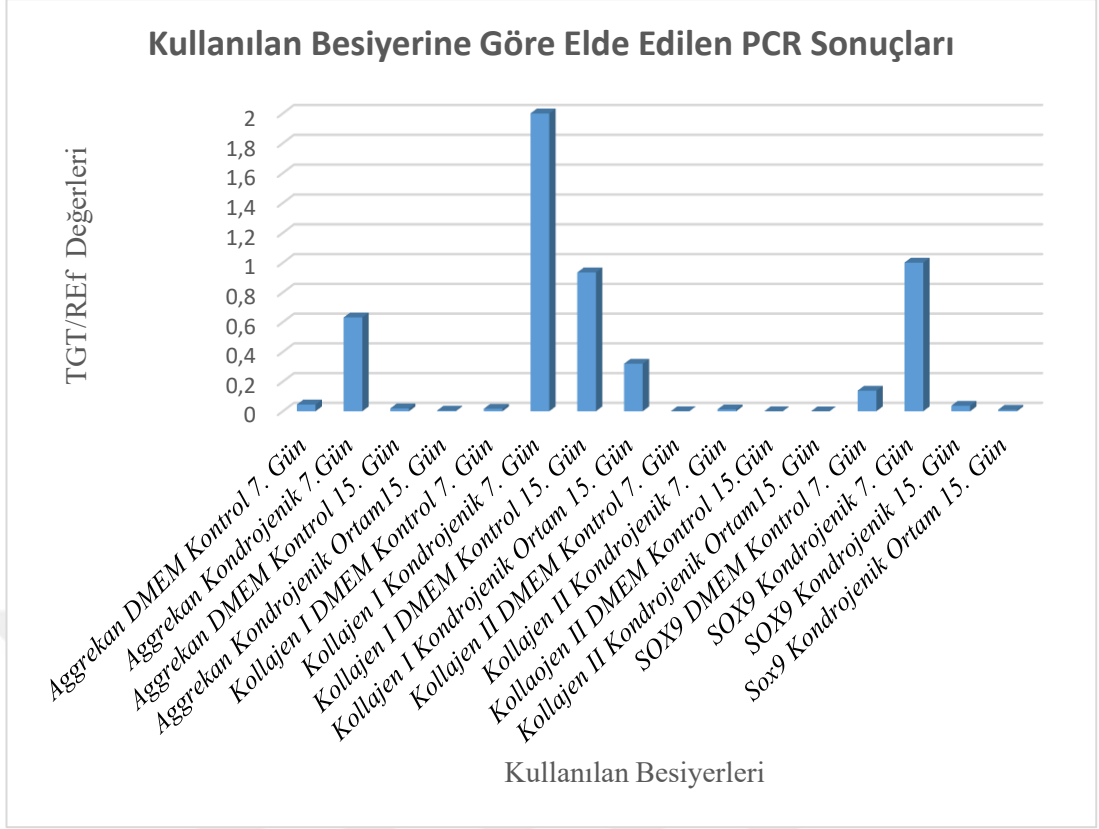


Şekil 3.13. Antikor 7. Gün Boyama Sonuçları. Faz kontrast mikroskopu. 200x. Koyun lumbal bölgesinden elde edilen adipoz kök hücrelerin (A) Agrekan, (C) Kollajen tip I ve (E) kollajen Tip II antikor boyaması ile elde edilen%10 FBS'lu DMEM kontrol sonuçları sonuçları. (B) Agrekan, (D) Kollajen Tip I ve (E) Kollajen Tip II antikor boyaması ile elde edilen StemPro kondrojenik farklılaştırma kiti sonuçları. Faz Kontrast Mikroskopu (200x).

3.12 PCR Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Çizelge 3.2. Kullanılan besiyerlerine göre kondrojenik farklılaşma PCR sonuçları

Gen İşaretleyicisi (Marker)	Hedef CP Değeri	Ref CP Değeri	Oranlar
Aggrekan DMEM Kontrol 7. Gün	29.54	25.08	4.56X10 ⁻²
Kollajen Tip I DMEM Kontrol 7. Gün	30.95	25.08	1.71x 10 ⁻²
Kollajen Tip II DMEM Kontrol 7. Gün	36.14	25.08	4.68x10 ⁻⁴
SOX9 DMEM Kontrol 7. Gün	27.93	25.08	0.1388
Aggrekan Kondrojenik 7.Gün	29.01	28.35	0,6314
Kollajen Tip I Kondrojenik 7. Gün	27.48	28.35	1.828
Kollajen Tip II Kondrojenik 7. Gün	34.65	28.35	1.26X10 ⁻²
SOX9 Kondrojenik 7. Gün	27.92	28.35	1.344
Aggrekan DMEM Kontrol 15. Gün	28.76	23.10	1.98x10 ⁻²
Kol Tip Tip 1 DMEM Kontrol 15. Gün	23.20	23.10	0,9343
Kol Tip Tip 2 DMEM Kontrol 15.Gün	34.81	23.10	2.99x10 ⁻⁴
SOX9 DMEM Kontrol Ortam 15. Gün	27.85	23.10	3.71X10 ⁻²
Aggrekan Kondrojenik Ortam15. Gün	28.84	21.16	4.87x10 ⁻³
Kol Tip I Kondrojenik Ortam 15. Gün	22.80	21.16	0,3199
Kol Tip II Kondrojenik Ortam15. Gün	34.72	21.16	8.3x10 ⁻⁵
Sox9 Kondrojenik Ortam 15. Gün	27.80	21.16	1x10 ⁻²



Şekil 3.14. Kondrojenik Farklılaşma PCR Sonuçlarının Grafiksel Gösterimi.

Yapılan literaür taramasına bağlı olarak adipoz kökenli mezenkimal kök hücrelerinin kondrojenik farklılaşması sırasında ilk haftada kollajen tip I değerlerinin yüksek çıkması, kollajen tip II, aggrekan ve SOX9 gen markerlarının ise yüksek çıkması beklenmektedir (Masuda, Sah et al. 2003, Chen, Tsai et al. 2005, Can 2014). İkinci haftada ise tip I kollajen değerinin düşmesi, tip II kollajen, aggrekan ve SOX9 değerlerinin artması beklenmektedir. Bu sonuçlara bazılarında ulaşılabilmektedir.

4. DEĞERLENDİRME

Aljinat ilaç endüstrisinde hücre kültürü ve doku mühendisliği uygulamalarında ilaç/protein/hücre/gen taşınımı gibi çok çeşitli kullanım alanları bulunmaktadır (Lee and Mooney 2012). Aljinat mikroküreler hidrojel formunda ortalama olarak 5 nm por çapına sahip olması sebebiyle enkapsülasyon sonrası proteinlerin salınımına, hidrojel bozundukça da bu çaptan daha büyük moleküllerin (plasmid DNA, antikor gibi) salınımına izin vermektedir (Lee and Mooney 2012). Ortopedi alanında hasar görmüş veya yapısı dejenere olmuş bağ dokularının iyileştirilmesinde hala zorluklar yaşanmakta olup doku mühendisliği yaklaşımı zorlukların aşılması hedeflenmektedir (Ma, Hung et al. 2003) . İnsan mezenkimal kök hücrelerinin kullanıldığı bir çalışmada aljinat mikrokürelerde serum olmayan besi ortamında kültüre edilmiş, ortama dönüştürücü büyüme faktörü (TGF)- β 1, deksametazon ve askorbat-2 fosfat bir haftadan fazla sürede verilmiş, sonuç olarak yapılan in-vitro analizlerde büyük osteokondral defektlerin iyileşmesi sırasında görülen bağ dokusu formasyonunun olduğu gözlenmiştir (Akkiraju and Nohe 2015). Endres ve ark. 2009’da yaptığı benzer bir çalışmada ise insan projenitör subkondral hücreleri aljinat mikrokürelerde enkapsüle edilerek in-vitro koşullarda TGF- β 3 ile kültüre edilmiş, 28. gün sonunda kondrojenik gen markerlarından tip II kollajenin ve proteoglikanın yoğun ekspresyonuna rastlanmıştır (Endres, Wenda et al. 2010). Moshaverinia A. ve ark’nın 2013’te yaptığı başka bir çalışmada ise çeşitli dental dokulardan elde edilen mezenkimal kökenli kök hücreler arjinin-glisin-aspartik asit (RGD) sekanslarıyla eşleştirilip TGF β -1 ile yüklenmiş mikrokürelerde enkapsüle edilerek kültüre edilmiş sonuç olarak mikroküreler içinde enkapsüle edilmiş mezenkimal kökenli kök hücrelerin otolog kök hücre implantasyonlarda uygun bir şekilde kullanılabileceğini gösterilmiştir (Moshaverinia, Xu et al. 2013). Dokuya implante edilecek mikrokürelerin degradasyon sürelerinin iyileştirilmesi ile hedeflenen dokuya özgü optimizasyonunun gerekliliği önceki çalışmalarla ortaya konmuştur (Sakai, Ono et al. 2002). Aljinat mikrokürelerin kök hücreler için mi yoksa kondrosit hücreleri için mi daha uygun bir polimerik yapı olduğunun anlaşılması için yapılan bir çalışmada aljinat mikrokürelerin kondrositlerin enkapsülasyonu sırasında küresel geometrilerini korudukları ve buna uygun ekstrasellüler bileşenler sentezleyebildikleri ancak kök hücrelerin farklılaştırılması amacıyla kullanıldıklarında mezenkimal hücrelerin yine

küresel geometride kalmaları sebebiyle istenilen ekstrasellüler matriks bileşenlerini sentezleyemedikleri belirtilmiştir (Debnath, Shalini et al. 2015).

Yapmış olduğumuz çalışmada koyunların lumbal bölgesindeki adipoz dokusundan izole edilen otolog mezenkimal kök hücreler in-vitro ortamda kondrosite farklılaştırılmış, kök hücreden farklılaştırılan kondrositlerin monolayer kültürün ilerleyen döneminde fibro-bağ dokusu dedifferansiyasyonuna uğradığı görülmüştür. Yine aynı şekilde koyunun artiküler bağ dokusundan izole edilen kondrositlerin düz hücre kültüründe ise ilerleyen zamanlarında metabolik aktivitesinin düştüğü görülmüş ve bunun aynı olguyla ilişkili olabileceği düşünülmüştür. Mikroküre tekniği ile aljinat matriks içerisinde kondrositlerin enkapsüle edilmesi sağlanmış kültürde kondrositlerin kendi orijinal morfolojilerini koruyarak olgunlaşmış kondrositler için gerekli olan ekstrasellüler bileşenleri sağladığı in-vitro ortamda analizlerle belirlenmiştir. Bu durum, ileride yapılacak bir in-vivo otolog implantasyon çalışması için kondrositlerin birkaç pasaj içerisinde 3 boyutlu polimerik matriksler içerisinde kültüre devam edilmelerinin gerekliliğini göstermektedir. Çalışmanın devamında ise in-vitro ortamda aljinat mikroküreler ile aljinat-kitosan polimer doku iskelesi ve tek tabaka (monolayer) kültür metabolik aktivite açısından karşılaştırılmışlar; aljinat mikrokürelerin, aljinat-kitosan liyofilize doku iskelesi yapısına nazaran tüm proses göz önüne alındığında daha verimli bir hücresel iletim mekanizması olduğu yapılan analizlerle belirlenmiştir. Bunun sebebinin aljinat mikrokürelerin yüksek oranda enkapsülasyon kapasite sahip olması olarak görülmektedir. Liyofilize doku iskelesi açısından ise gerçekleştirilen kondrosit ekim vermiliğinin düşük olması doku iskelesinin düşük hücre tutunmaya sahip olduğunu göstermekte ancak metabolik aktivite artışının daha yüksek çıkması doku iskele yapılarının da tutunma problemi çözüldüğünde bir hücresel iletim mekanizması olarak kullanılabileceğini göstermektedir. In-vivo implantasyon uygulamaları açısından aljinat mikroküreler içerisine enkapsüle edilmiş kondrositlerin ortamın ekstrasellüler içeriğine katkı yaparak doku hasarını morfolojik bozunmayı düzelterek iyileştirmesi kondrojenik markerların pozitif vermesi sebebiyle beklenebilir. In-vitroda mikroküreler parçalandıkça mikroküreler içerisinden kültür ortamına hücre invazyonu gözlenmemiştir. Ancak doğal yollarla degrade olabilen aljinat mikrokürelerin bağ dokusunda bulunan lizozim gibi enzimlerle kontrollü bir şekilde parçalanmasının mekanizması ileride araştırılması

gereken bir konu olup doku mühendisliğinin gelişimi açısından önemli bir potansiyel taşımaktadır.



5. KAYNAKLAR DİZİNİ

Akamatsu, K., et al. Drastic difference in porous structure of calcium alginate microspheres prepared with fresh or hydrolyzed sodium alginate. *Journal of Colloid and Interface Science*. 363(2): 707-710, 2011.

Akkiraju, H. and A. Nohe. Role of chondrocytes in cartilage formation, progression of osteoarthritis and cartilage regeneration. *Journal of Developmental Biology*. 3(4): 177-192, 2015.

Aydın Y. Temel Patoloji. *Ankara Üniversitesi Yayınları*, Ankara, 2008.

Bunnell, B.A., et al. Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation. *Methods*. 45(2): 115-120, 2008.

Can, A. (2014). Kök Hücre : Biyolojisi, türleri ve tedavide kullanımları. *Akademisyen Kitabevi*, Ankara, 2014.

Cao, B., et al. Effects of cell-cell contact and oxygen tension on chondrogenic differentiation of stem cells. *Biomaterials*. 64: 21-32, 2015.

Chapman, V. J. and D. J. Chapman. Algin and Alginates. Seaweeds and their Uses. *Springer Netherlands*. Dordrecht. 194-225, 1980.

Chen, C. W., et al.. Type I and II collagen regulation of chondrogenic differentiation by mesenchymal progenitor cells. *Journal of Orthopaedic Research*. 23(2): 446-453, 2005.

Chen, X., et al. Preparation of lung-targeting, emodin-loaded polylactic acid microspheres and their properties. *International Journal of Molecular Science*. 15(4): 6241-6251, 2014.

Choi, C., et al. "Application of chitosan and chitosan derivatives as biomaterials." *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*. 33: 1-10, 2016.

Croisier, F. and C. Jérôme. Chitosan-based biomaterials for tissue engineering. *European Polymer Journal*. 49(4): 780-792, 2013.

Debnath, T., et al. Comparative analysis of chondrogenesis from cartilage tissue and alginate encapsulated human adipose stem cells. *Journal of Arthroscopy and Joint Surgery*. 2(2): 67-74, 2015.

Durkut, S. Primer sıçan karaciğer hücrelerinin hidrojel yapılı kitosan ve alginat gibi polimerlerde enkapsülasyonu ve in vitro ortamda bazı özelliklerinin incelenmesi. *Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, 2008.

Endres, M., et al. Microencapsulation and chondrogenic differentiation of human mesenchymal progenitor cells from subchondral bone marrow in Ca-alginate for cell injection. *Acta Biomaterialia*. 6(2): 436-444, 2010.

Erer H., Kıran M.M., Çiftçi M.K. Veteriner Genel Patoloji. *Konya Üniversitesi Yayınları*, Konya. 2000.

Ewa-Choy Y.W., et al. Effect of alginate concentration on chondrogenesis of co-cultured human adipose-derived stem cells and nasal chondrocytes: a biological study. *Biomaterials Research*. 21:19, 2017.

Fatnassi, M., et al. Optimization of spray-dried hyaluronic acid microspheres to formulate drug-loaded bone substitute materials. *Powder Technology*. 255: 44-51, 2014.

Fischer, J. Tissue engineering: principles and practices, *Boca Raton : CRC Press*, 2013.

Gao, Y., et al. The ECM-cell interaction of cartilage extracellular matrix on chondrocytes. *Biomed Research International*. 2014: 648459, 2014.

Gåserød, O., et al. Microcapsules of alginate-chitosan – I. *Biomaterials*. 19(20): 1815-1825, 1988.

Goh, C. H., et al. Alginates as a useful natural polymer for microencapsulation and therapeutic applications. *Carbohydrate Polymers*. 88(1): 1-12, 2012.

Goncalves, I. C., et al. Bacterial-binding chitosan microspheres for gastric infection treatment and prevention. *Acta Biomaterialia*. 9(12): 9370-9378, 2013.

Grosse, H. H. "FRIEDA B. KOLOT. Immobilized Microbial Systems: Principles, Techniques and Industrial Applications. *Krieger Publishing Company*. Florida. 30(7): 506-506, 1990.

Guilak, F. and V. C. Mow. "The mechanical environment of the chondrocyte: a biphasic finite element model of cell-matrix interactions in articular cartilage." *Journal of Biomechanics*. 33(12): 1663-1673, 2000.

Han, S. K., et al. "The mechanical behaviour of chondrocytes predicted with a micro-structural model of articular cartilage." *Biomechanics and Modelling in Mechanobiology*. 6(3): 139-150, 2007.

Hashemi, M. and F. Kalalinia. Application of encapsulation technology in stem cell therapy. *Life Sciences*. 143: 139-146, 2015.

Henzi, V., et al. L-proline activates glutamate and glycine receptors in cultured rat dorsal horn neurons. *Molecular Pharmacology*. 41(4): 793-801, 1992.

Hong, S. J., et al.. Preparation of porous bioactive ceramic microspheres and in vitro osteoblastic culturing for tissue engineering application. *Acta Biomaterialia*. 5(5): 1725-1731, 2009.

Hossain, K. M. Z., et al. Development of microspheres for biomedical applications: a review. *Progress in Biomaterials*. 4(1): 1-19, 2014.

Hui, T. Y., et al. In vitro chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells in collagen microspheres: Influence of cell seeding density and collagen concentration. *Biomaterials*. 29(22): 3201-3212, 2008.

Isyar, M., et al. A practical way to prepare primer human chondrocyte culture. *Journal of Orthopaedics*. 13(3): 162-167, 2016.

Girandon, L., et al. In vitro models for Adipose Tissue Engineering with Adipose-Derived Stem cells Using Different Scaffolds of Natural Origin. *Folia Biologica*. 57: 47-56, 2011.

Guisan JM. Immobilization of enzymes and cells, 2d ed. *Scitech Book News*. Portland. 30, 2006.

Kuan, W. C., et al. "Immunocapture of CD133-positive cells from human cancer cell lines by using monodisperse magnetic poly(glycidyl methacrylate) microspheres containing amino groups." *Materials Science and Engineering. C, Materials for Biological Applications*. 34: 193-200, 2014.

Kumar, V. Robbins temel patoloji, *Nobel Tıp Kitabevleri*, İstanbul, 2014.

Langer, R. and J. Vacanti. Advances in tissue engineering. *Journal of Pediatric Surgery*. 51(1): 8-12. 2016.

Lee, E. J., et al. Biomaterials for tissue engineering. *Annals of Biomedical Engineering*. 42(2): 323-337, 2014.

Lee, K. Y., et al. Hydrogel Formation via Cell Crosslinking. *Advanced Materials* 15(21): 1828-1832, 2003.

Lee, K. Y. and D. J. Mooney. Alginate: properties and biomedical applications. *Progress in Polymer Sciences*. 37(1): 106-126, 2012.

Lee, K. Y. and S. H. Yuk. Polymeric protein delivery systems. *Progress in Polymer Science*. 32(7): 669-697, 2007.

Lee, Y. S., et al. Development of porous PLGA/PEI1.8k biodegradable microspheres for the delivery of mesenchymal stem cells (MSCs). *Journal of Controlled Release*. 205: 128-133, 2015.

Leong, W. and D. A. Wang. Cell-laden Polymeric Microspheres for Biomedical Applications. *Trends in Biotechnology*. 33(11): 653-666, 2015.

Ma, H.-L., et al. Chondrogenesis of human mesenchymal stem cells encapsulated in alginate beads. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 64A(2): 273-281, 2003.

Mackay, A. M., et al. Chondrogenic differentiation of cultured human mesenchymal stem cells from marrow. *Tissue Engineering*. 4(4): 415-428, 1998.

Masuda, K., et al. Proliferation of Canine Intervertebral Disk Chondrocytes in Three-Dimensional Alginate Microsphere Culture. *Journal of Veterinary Medical Science*. 64(1): 79-82, 2002.

Masuda, K., et al. A novel two-step method for the formation of tissue-engineered cartilage by mature bovine chondrocytes: The alginate-recovered-chondrocyte (ARC) method. *Journal of Orthopaedic Research*. 21(1): 139-148. 2003.

Mathieu, M., et al. Induction of mesenchymal stem cell differentiation and cartilage formation by cross-linker-free collagen microspheres. *European Cells and Materials*. 28:82-97, 2014.

Meretoja, V. V., et al. The effect of hypoxia on the chondrogenic differentiation of co-cultured articular chondrocytes and mesenchymal stem cells in scaffolds. *Biomaterials*. 34(17): 4266-4273, 2013.

Moshaverinia, A., et al. Dental mesenchymal stem cells encapsulated in an alginate hydrogel co-delivery microencapsulation system for cartilage regeneration. *Acta Biomaterialia*. 9(12): 9343-9350, 2013.

Mujoriya, R. A review on study of microsphere. *Research Journal of Pharmaceutical Dosage Forms and Technology*. 4(2): 80-85, 2012.

N.R, K. Microsphere: A Brief Review. *Asian Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences*. 05(47): 13-19, 2015.

Park, H., et al. Injectable chitosan hyaluronic acid hydrogels for cartilage tissue engineering. *Acta Biomaterialia*. 9(1): 4779-4786, 2013.

Phull, A. R., et al. Applications of Chondrocyte-Based Cartilage Engineering: An Overview. *Biomedical Research International*. 2016: 1879837, 2016.

Pittenger, M. F., et al. Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. *Science*. 284(5411): 143-147, 1999.

Pontiroli, L., et al. An aerosol-spray-assisted approach to produce mesoporous bioactive glass microspheres under mild acidic aqueous conditions. *Materials Letters*. 190: 111-114. 2017.

Reed, S. and B. M. Wu. Biological and mechanical characterization of chitosan-alginate scaffolds for growth factor delivery and chondrogenesis. *Journal of Biomedical Material Research Part B: Applied Biomaterials*. 105(2): 272-282, 2017.

Rinaudo, M. Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science*. 31(7): 603-632, 2006.

Ross, HM. Histoloji Konu Anlatımı ve Atlas. *Palme Yayıncılık*. s:199-201, Ankara, 2017.

Sakai, S., et al. In vitro and in vivo evaluation of alginate/sol-gel synthesized aminopropyl-silicate/alginate membrane for bioartificial pancreas. *Biomaterials*. 23(21): 4177-4183, 2003.

Sarker, B., et al. Alginate-based hydrogels with improved adhesive properties for cell encapsulation. *International Journal of Biological Macromolecules*. 78: 72-78, 2015.

Sivashanmugam, A., et al. An overview of injectable polymeric hydrogels for tissue engineering. *European Polymer Journal*, 72: 543-565, 2015.

StemPro® Kondrojenik Farklılaştırma Kiti. Katalog numarası: A1007101, *Thermo Fischer Scientific*, <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/A1007101>. Erişim tarihi 02.02.2018.

StemPro® İnsan Adipoz Kök Hücresi Kullanıcı Kitapçığı. Katalog numarası: R7788-110. <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/R7788115>. Erişim tarihi 02.02.2018.

Uludag, H., et al. Technology of mammalian cell encapsulation. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 42(1): 29-64. 2000.

Vinatier, C. and J. Guicheux. Cartilage tissue engineering: From biomaterials and stem cells to osteoarthritis treatments. *Annals of Physical Rehabilitation Medicine*. 59(3): 139-144, 2016.

Wan Safwani, W. K., et al. Hypoxia enhances the viability, growth and chondrogenic potential of cryopreserved human adipose-derived stem cells. *Cryobiology*. 75: 91-99, 2017.

Xu, F., et al. 3D dynamic culture of rabbit articular chondrocytes encapsulated in alginate gel beads using spinner flasks for cartilage tissue regeneration. *Biomedical Research International*. 2014: 539789, 2014.

Yoon, I. S., et al. "Proliferation and chondrogenic differentiation of human adipose-derived mesenchymal stem cells in porous hyaluronic acid scaffold." *Journal Bioscience and Bioengineering*. 112(4): 402-408, 2011.

Zhang, Q., et al. Preparation of open porous polycaprolactone microspheres and their applications as effective cell carriers in hydrogel system. *Materials Science and Engineering: C*. 32(8): 2589-2595, 2012.

Zhao, S., et al. Synthesis and characterization of thermo-sensitive semi-IPN hydrogels based on poly(ethylene glycol)-co-poly(epsilon-caprolactone) macromer, N-isopropylacrylamide, and sodium alginate. *Carbohydrate Research*. 345(3): 425-431, 2010.

Zreiqat, H., et al. *A Tissue Regeneration Approach to Bone and Cartilage Repair*.
Springer International Publishing, 2014.

