

T.C.
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kondrosit Hücrelerinin Elektrospinleme Yöntemi ile Elde Edilmiş Biyomalzeme
Üzerinde Kültürü ve Karakterizasyonu

Özlem ÖZDEMİR

AĞUSTOS 2017

Biyomühendislik Anabilim Dalında Özlem ÖZDEMİR tarafından hazırlanan KONDROSİT HÜCRELERİNİN ELEKTROSPİNLEME YÖNTEMİ İLE ELDE EDİLMİŞ BİYOMALZEME ÜZERİNDE KÜLTÜRÜ VE KARAKTERİZASYONU adlı Yüksek Lisans Tezinin Anabilim Dalı standartlarına uygun olduğunu onaylarım.

Prof.Dr.Mustafa YİĞİTOĞLU

Anabilim Dalı Başkanı

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

Prof.Dr.Mustafa TÜRK

Danışman

Jüri Üyeleri

Başkan (Danışman) : Prof.Dr.Mustafa TÜRK _____

Üye : Prof.Dr.Siyami KARAHAN _____

Üye : Doç.Dr.Erdal UĞUZDOĞAN _____

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

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

Prof. Dr. Mustafa YİĞİTOĞLU

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ÖZET

Kondrosit Hücrelerinin Elektrospınleme Yöntemi ile elde edilmiş Biyomalzeme
Üzerinde Kültürü ve Karakterizasyonu

ÖZDEMİR, Özlem

Kırıkkale Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyomühendislik Anabilim Dalı, Yüksek Lisans tezi

Danışman: Prof. Dr. Mustafa TÜRK

AĞUSTOS 2017, 144 sayfa

Kıkırdak dokusu sınırlı iyileşme kapasitesi sahiptir. Bu çalışmada; HEMA ile aminoasit monomerleri ile birleştirilerek elektroğirme yöntemiyle nanofiber üretilmesi, nanofiberler üzerinde kondrositleri kültürü, karakterizasyonu ve kıkırdak doku mühendisliği açısından değerlendirilmesi amaçlandı. Isıl polimerizasyon ile PHEMA'dan üretilen nanofiberler düşük molekül ağırlıklı kitosan polimeri ile kaplandı ve 4S-PEG polimeri ile çapraz bağlandı. Antikor ve aminoasit immobilizasyonu ile her ikisinin de nanofibere bağlanıp bağlanmadığı FTIR ile belirlendi. SEM ile 260nm-390nm fiber çapları, FTIR ile antikor ve aminoasitlerin polimerler üzerindeki bağ titreşimleri gözlemlendi. Kültüre edilen tavşan kondrositleri CD44 antikorunu kullanılarak flow sitometri ile belirlendi. Hem nanofiber üzerine hem de düz hücre kültüründe ekimi yapılan kondrositlerin Anexin V FITC yöntemiyle 5.,10. ve 15.günler sırasıyla; %12.72 apoptoz ile %9.09 nekroz, %10.81 apoptoz ile %6.75 nekroz , %6.25 apoptoz ile %7,81 nekroz olarak belirlendi. Kondrositlerin metabolik aktiviteleri Alamar mavisi ile hücrenin 5.Gün %78.95; 10.Gün %74.93, 15.Gün %81.58 oranlarında gün sayısı ile hücrelerde olan artışa bağlı arttığı belirlendi. Kollajene bağlanan ekstraselüler matriksi düzenleyen GAG miktarı 5,10 ve 15.günlerde sırasıyla; 12,45µg/ml, 18,09µg/ml, 24,16µg/ml belirlendi ve GAG/DNA oranı ile DNA miktarı tayini yapıldı. Matriks gelişim proteini olan

COMP miktarı hücre canlılığına bağı olarak 5,10 ve 15.günler sırasıyla 10,13; 16,94; 13,19 olarak ifade edildi. Kollajen tip II immünohistokimyasal boyamalarla üç boyutlu kültür ortamında 5.gün %4.81, 10.gün.%13,90 ve 15.gün%17.51 oranlarında iki boyutlu kültür ortamına göre boyanma oranı fazla olduğı gözlemlendi. CD44 immünofloresan tekniğı ile kondrositlerin nanofiber üzerinde düz hücre kültürüne göre biraz daha fazla ışımaya yaptığı belirlendi. Toluidin mavisi ve hematoksilin-eozin boyaması ile iki ve üç boyutlu kültür ortamında çekirdek ve sitoplazma boyanmaları belirlendi. RT-PCR relatif değerlerinin Mann Whitney U testi ile anlamlı farklılık bulunmadığından kollagen tipI, kollajenTipII, sox9, agreccann genlerinin ekspresyonlarının referans gene göre cp değerleri karşılaştırıldı ve az da olsa artığı ifade edildi.Sonuç olarak; 4S-PEG çapraz bağı PHEMA-Kitosan nanofiberlerin kondrojenik potansiyeli korumada faydalı olacağı düşünölmektedir.

Anahtar Kelimeler: PHEMA, 4S-PEG, Kitosan, Nanofiber, Kondrosit, Doku mühendisliğı, Biyopolimerler

ABSTRACT

Culture and Characterization of Chondrocyte Cells on Electrospun Biomaterials

ÖZDEMİR, Özlem

Kırıkkale University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of bioengineering, Master Thesis

Supervisor: Prof. Dr. Mustafa TÜRK

August 2017, 144 pages

Cartilage tissue has limited capacity of healing. In this study; it was aimed to produce nanofibers by electrospinning by combining with HEMA and amino acid monomers, culture chondrocytes on nanofibers, characterize, and evaluate by with respect to cartilage tissue engineering. With thermopolymerization, the nanofibers produced from PHEMA were coated with low molecular weight chitosan polymer and cross-linked with 4S-PEG polymer. Antibody and amino acid immobilization were determined by FTIR, which resulted in being linked to the nanoporous. Binding of antibodies and amino acids on polymers were observed with SEM (260nm-390 nm fiber diameters) and FTIR. Cultured rabbit chondrocytes were characterized by flow cytometry using CD44 antibody. Chondrocytes seeded on nanofibers as well as on regular cell culture were analyzed by Annexin V FITC method at the 5th, 10th, and 15th days: %9.19 necrosis with %12.72 apoptosis, %6.75 necrosis with %10.81 apoptosis and %7.81 necrosis with %6.25 apoptosis, respectively. Alamar blue cell metabolic activity of chondrocytes were %78.95 at Day 5, %74.93 at 10th day, and 81.58% at 15th days that indicates the metabolic activity rates increases over the time. The amount of GAG regulating the collagenous extracellular matrix were 12.45 µg/ml, 18.09 µg/ml, and 24.16 µg/ml at the 5th, 10th and 15th days, respectively. The DNA amount was determined and the GAG/DNA ratio was also determined. The amount of COMP, the matrix development protein, were %10.13, %16.94, and %13.19 at the 5th, 10th and 15th days, respectively. Immunostaining intensity ratios

of type II collagen were %4.81, %13.90, and %17.51 at the 5th day, 10th and 15th days. The intensity was higher in three dimensional culture compared to two dimensional culture. In immunofluorescence technique, chondrocytes were slightly more immunoreactive for CD44 on nanofibers than on the flat-cell culture. Toluidine blue and hematoxylen-eosin staining revealed nuclear and cytoplasmic staining in two- and three-dimensional culture media. In RT-PCR analyses, except that of type I collagen the expressions of collagen type II, Sox9, and Agrecann genes increased but the by the Mann Whitney U test did not reveal statistical significance. As a result; 4S-PEG cross-linked PHEMA-chitosan nanofibers are thought to be useful in chondrogenic potential protection to some degree.

Key words: PHEMA, Chitosan, 4S-PEG, Nanofiber, Chondrocytes, Tissue engineering, Biopolymers

TEŞEKKÜR

Tezimin hazırlanması esnasında daima yönlendiren ve araştırmalarımın her aşamasında bilgisini esirgemeyen, bilimsel anlamda gelişmeye katkıda bulunmasının yanında maddi manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen her zaman örnek aldığım danışman hocam, Sayın Prof. Dr. Mustafa TÜRK'e. ',

Her koşulda destek olan, laboratuvar çalışmalarında her türlü maddi ve manevi imkanı sunan hocam Sayın Prof. Dr. Siyami KARAHAN'a,

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

Polimer sentezinde tüm laboratuvar imkanlarını sunan, bilgisini esirgemeyen ve bilimsel anlamda gelişmeye katkıda bulunan hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Murat İNAL'a,

En zor anımda yardımına koşan, bilgisini esirgemeyen hocam Sayın Yrd.Doç.Dr.Fatma Azize BUDAK YILDIRAN'a

Birçok konuda yardımlarını esirgemeyen Uzm. Yaşar ALUÇ'a, Uzm. Esra ARAT'a, Uzm. Aytuna ÇERÇİ'ye, Uzm. Rümeyşa AKÇAPINAR'a, Uzm. Mustafa Doğan'a, Sema TUNCER'e, Murat PARLAK'a,

Sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

SAYFA

ÖZET	i
ABSTRACT	İİİ
TEŞEKKÜR	V
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ	X
ÇİZELGELER DİZİNİ	XIV
KISALTMALAR DİZİNİ	XV
1. GİRİŞ	1
1. 1. Kıkırdak Anatomisi ve İşlevleri	6
1. 2. Perikondrium.	8
1. 3. Ekstraselüler matriks	9
1. 4. Kıkırdak Çeşitleri	10
1. 4. 1. Hyalin Kıkırdak	11
1. 4. 2. Elastik Kıkırdak	11
1. 4. 3. Fibröz Kıkırdak	12
1. 4. 3. 1. Menisküs	14
1. 5. Kondrosit ve Kondroblastların Histofizyoloji.....	15
1. 6. Kıkırdak Dokusunun Gelişim Aşamaları	17
1. 7. Kıkırdak Dokuda Ortaya Çıkan Rahatsızlıklar	17
1. 8. Doku Mühendisliği	18
1. 9. Kıkırdak Doku Mühendisliği ve Kullanılan Hücrelerin Üretimi	20
1. 9. 1. Otolog Hücre	21
1. 9. 2. Model Olarak Hücre-Polimer	21
1. 10. Kıkırdak Doku Mühendisliği ve Polimerik Biyomalzemeler	22
1. 10. 1. Sentetik Polimerler	23
1. 10. 1. 1. 4S-PEG	24
1. 10. 1. 2. PHEMA	25
1. 10. 2. Doğal Polimerler	25
1. 11. Kıkırdak Doku Onarımı İçin Proteinler	26

1. 11. 1. Kollajen	26
1. 11. 2. Jelatin.....	27
1. 11. 3. Fibrin	27
1. 11. 4. Elastin	28
1. 12. Polisakkaritler	28
1. 12. 1. Kitosan.....	28
1. 13. İskeleler	29
1. 13. 1. Hidrojeller.....	29
1. 14. İskele Hazırlama Yöntemleri	30
1. 14. 1. Elektroçirme	30
1. 14. 2. Lif(Fiber) Bağlama	30
1. 14. 3. Gazla köpüklenme	31
1. 15. Biyomimetik Polimerler.....	31
1. 16. Kıkırdak Doku Mühendisliğindeki Hücreler	31
1. 17. Doku Hücre Kültürü.....	32
1. 17. 1. Statik Teknik	32
1. 17. 2. Dinamik Teknik:	33
1. 18. Büyüme Faktörleri	33
2. MATERYAL VE METOD	34
2. 1. Materyal	34
2. 2. Metod	34
2. 2. 1. HEMA'nın Polimerizasyonu ve Karakterizasyonu.....	34
2.2.2. PHEMA Nanofiberinin Kitosan Polimeri İle Kaplanması ve 4S-PEG ile Çapraz Bağlanması.....	36
2.2. 3. Antikor İmmobilizasyonu	36
2. 2. 4. 4S-PEG ile Çapraz Bağlı PHEMA-Kitosan Nanofiberi Üzerine Antikor/aminoasit Eklenmesi.....	37
2.2.5. Hücre Kültürü	38
2.2.5.1. Primer Kondrosit Kültürü.....	38
2.2.6. Kondrositlerin Flow Sitometri ile Ayrılması	39
2.2.7. Hücrelerin Elektrospinleme Yöntemi İle Üretilmiş 4S-PEG ile çapraz bağlı Phema-Kitosan Nanofiberler Üzerinde Kültürü.....	40

2.2.8. 4S-PEG ile çapraz bağlı Phema-Kitosan Nanofiberler kültüre edilmiş kondrositlerin taramalı elektron mikroskop (SEM)incelemesi	40
2.2.9. Glikozaminoglikan Miktarının Ölçümü (GAG Tayini)	41
2.2.10. Nanofiber Üzerine Ekilmiş Hücrelerden Dna İzolasyonu Ve Dna Miktarının Ölçülmesi	42
2.2.10.1. DNA İzolasyonu:.....	42
2.2.10.2. DNA Miktar Tayini.....	43
2.2.11. Real Time Pcr İle Kollagen Tip I, Tip Iı, Agrecann Ve Sox9 Ekspresyonlarının Kondrositler Üzerinde Değerlendirilmesi.....	44
2.2.11.1. RNA İzolasyonu.....	44
2.2.11.2. cDNA İzolasyonu.....	45
2.2.12. Comp (Cartilage Oligomeric Matrix Protein) Tespiti Ve Konsantrasyonunu Belirleme	47
2.2.12.1. Örnek Hazırlama	47
2.2.12.2. Uygulama	48
2.2.13. Nanofiber Üzerine Ekili Olan Kondrosit Hücrelerinin Annexin V Yöntemi İle Canlılığını Belirleme.....	48
2. 2. 14. Kondrosit Canlılığını Belirlemek İçin Alamar Blue Testi	49
2. 2. 15. İmmünohistokimyasal	49
2.2.16. İmmünohistokimyasal	50
2.2.17. Nanofiber Üzerine Ekili Olan Kondrosit Hücrelerinde Hematoksilen-Eozin Boyama	51
2.2.18. Nanofiber Üzerine Ekili Olan Kondrosit Hücrelerinde Toluidin Blue Boyama	51
2.2.19. İmmünofloresan Tekniği.....	52
3. BULGULAR	53
3.1. Primer Kondrosit İzolasyonu	53
3.2. 4S-PEG ile Çapraz Bağlı PoliHEMA-Kitosan Nanofiberinin Flow SitometriKimyasal Karakterizasyonu	54
3.3. 4S-PEG ile Çapraz Bağlı PoliHEMA-Kitosan Nanofiberinin FTIR Kimyasal Karakterizasyonu	56
3.3.1. PoliHEMA Nanofiberinin FTIR Karakterizasyonu	57
3.3.2. Kitosan FTIR Karakterizasyonu	58

3.3.3. PoliHEMA-Kitosan Nanofiberinin FTIR Karakterizasyonu	59
3.3.4. 4S-PEG FTIR Karakterizasyonu.....	60
3.3.5. Aminoasitsiz ve Antikorsuz 4S-PEG ile Çapraz Bağlı PoliHEMA-Kitosan Nanofiberinin Karakterizasyonu	61
3.3.6. Aminoasitlerin Karakterizasyonu	62
3.3.6. 1. Histidin FTIR karakterizasyonu.....	62
3.3.6.2. Fenilalanin FTIR karakterizasyonu.....	63
3.3.6.3. Aspartikasit FTIR karakterizasyonu	64
3.3.7. Aminoasitli ve Antikorlu 4S-PEG ile Çapraz Bağlı PoliHEMA-Kitosan Nanofiberinin Karakterizasyonu	65
3. 4. 4S-PEG ile çapraz Bağlı PoliHEMA-Kitosan Nanofiberinin hücre kültürü ışık mikroskop görüntüleri:.....	67
3.5. 4S-PEG ile çapraz Bağlı PoliHEMA-Kitosan Nanofiberinin SEM Görüntüleri	70
3.5.1. PoliHEMA Nanofiberinin SEM görüntüsü.....	71
3.5.2. PoliHEMA – Kitosan Nanofiberinin SEM görüntüsü	71
3.5.3. 4S-PEG Çapraz Bağlı PoliHEMA – Kitosan Nanofiberinin SEM görüntüsü .	72
3.5.4. Kondrosit ekili 4S-PEG Çapraz Bağlı Antikorlu ve aminoasitli PoliHEMA – Kitosan Nanofiberinin SEM görüntüsü.....	73
3.6. Glikozaminoglikan Değerlendirilmesi	74
3.7. DNA Miktar tayin sonucu	78
3.7. Kıkırdak oligomerik matris proteini COMP belirlenmesi	79
3.9. Annexin V İle Apoptoz-Nekroz Sonuçları.....	84
3.10. Alamar Blue Sonuç	88
3.11. Hematoksilen-Eozin Boyama Sonucu	90
3.12. Toluidin Blue Boyama Sonucu	92
3.13. İmmünsitokimyasal Analiz	94
3.14. İmmünhistokimyasal analiz sonucu	96
3.15. Polimer Zincir Reaksiyonu (Pzr) Kondrosit Fenotipinin Belirlenmesinden Elde Edilen Sonuçlar	101
3.16. İmmunofloresan İle Cd44 Antikoru İşaretlenmesi.....	105
4. TARTIŞMA	108
KAYNAKLAR	117

ŞEKİLLER DİZİNİ

ŞEKİL	SAYFA
1.1.Tek Tek ve ya Grup Halinde Bulunan Kondrositler	7
1.2.Hiyalin kıkırdak görüntüsü	11
1.3.Elastik kıkırdak	12
1.4.Fibröz kıkırdak yapısı	13
1.5.Hiyalin kıkırdağın şematik gösterimi.....	14
1.6.Menisküs yapısı.....	15
1.7.Hücrelerin şematik gösterimi	16
1.8.Doku mühendisliği yaklaşımı	17
1.9.Hasarlı bölgeye yerleştirililen implant modeli.....	17
1. 10. 4S-PEG Moleküler Yapısı	24
2. 1. HEMA (Hidroksietil metakrilat)'ın ısı polimerizasyonu	34
3. 1. Kıkırdak dokudan İzole Edilen Kondrositler.....	52
3. 2. CD44 markerı ile muamele edilmeye kondrosit boyaması.....	53
3. 3. İlk primer antikor olarak CD44, sonra sekonder antikor olarak Alexa flour işaretli goat anti-rabbit antikor ile muamele edilen ve boyanan kondrositlerin flow sitometri analizi	54
3. 4. PHEMA FTIR Spektrumu	55
3. 5. Kitosan'a ait FTIR spektrumu.....	56
3. 6. Kitosan-poliHEMAFTIR Spektrumu.....	57
3. 7. 4S-PEG 'e ait FTIR spektrumu	58
3. 8. Aminoasitsiz ve CD44 antikoruna olmadan 4S-PEG ile Çapraz Bağlı PoliHEMA-Kitosan Nanofiberinin FTIR spektrumu.....	59
3. 9. Histidin aminoasitine ait FTIR spektrumu	60
3. 10. Fenilalanine ait FTIR spektrumu	61
3. 11. Aspartikasite ait FTIR spektrumu	62
3. 12. 4S-PEG ile çapraz Bağlı PoliHEMA-Kitosan Nanofiberinin içerisinde bulunan polimerlere, aminoasitlere ve CD44 kondrosit yüzey reseptörüne ait bağ titreşimleri aşağıda şekilde verildi.	64

3. 13. 4S-PEG ile apraz Bağlı PoliHEMA-Kitosan Nanofiberinin zerine kondrosit ekimi 5. gün ışık mikroskop görüntüsü	65
3. 14. 4S-PEG ile apraz Bağlı PoliHEMA-Kitosan Nanofiberinin zerine kondrosit ekimi 10. gün ışık mikroskop görüntüsü.	66
3. 15. 4S-PEG ile apraz Bağlı PoliHEMA-Kitosan Nanofiberinin zerine kondrosit ekimi 15. gün ışık mikroskop görüntüsü.....	67
3. 16. PoliHEMA Nanofiberinin SEM ile çaplarının görüntüsü	68
3. 17. PoliHEMA – Kitosan Nanofiberinin SEM görüntüsü	69
3. 18. 4S-PEG apraz Bağlı PoliHEMA – Kitosan Nanofiberinin SEM görüntüsü .	70
3. 19. Kondrosit ekili 4S-PEG apraz Bağlı PoliHEMA – Kitosan Nanofiberinin SEM (Scanning Electron Microscope) görüntüsü	71
3. 20. Nanofiber zerine ekilen kondrositlerdeki GAG tayini için hazırlanan standart grafiği.....	72
3. 21. Nanofiber zerine ekilen kondrositlerdeki 5. gün GAG konsantrasyon hücre sayısı grafiği	72
3. 22. Nanofiber zerine ekilen kondrositlerdeki 10. gün GAG konsantrasyon hücre sayısı grafiği	73
3. 23. Nanofiber zerine ekilen kondrositlerdeki 15. gün GAG konsantrasyon hücre sayısı grafiği	73
3. 24. Tüm zaman aralıklarının birlikte bulunduğu GAG konsantrasyon grafiği	74
3. 25. COMP kitinde bulunan standart solüsyonların içeriğine göre hazırlanan COMP standart grafiği verildi	76
3. 26. 4S-PEG PHEMA-Kitosan nanofiberi üzerine ekilen kondrositlerin 5. , 10. ve 15. gün rneklerinin COMP konsantrasyon grafiği.....	77
3. 27. Kontrol olarak ekimi yapılan kondrositlerin 5. , 10. ve 15. gün rneklerinin COMP konsantrasyon grafiği verildi.	78
3. 28. COMP'un kontrole göre artış grafiği	79
3. 29. Kondrositlerin kütürün kontrol grubunun sırasıyla 5. , 10. Ve 15. günlerine ait Annevin-V FITC ile apoptoz mikrograf grnleri	80
3. 30. Kondrositlerin kütürün sırasıyla kontrol grubunun 5. , 10. Ve 15. günlerine ait propidyum iodid ile nekroz mikrograf grnleri.....	80
3. 31. Nanofiber zerine ekilen kondrositlerin kütürün 5. Gününde Annevin-V ile canlılıklarının mikrograf görüntüleri	81

3. 32. Nanofiber üzerine ekilen kondrositlerin kütürün 10. Gününde Annevin-V ile canlılıklarının mikroskop görüntüleri	82
3. 33. Nanofiber üzerine ekilen kondrositlerin kütürün 15. Gününde Annevin-V ile canlılıklarının mikroskop görüntüleri	82
3. 34. Alamar blue yüzde redüksiyon grafiği	84
3. 35. 4S-PEG ile çapraz bağlı pHEMA nanofiberleri üzerinde ekilen kondrositlerin Hematoksilen-Eozin boyamasından sonra ışık mikroskop görüntüleri	85
3. 36. 4S-PEG ile çapraz bağlı pHEMA nanofiberleri üzerinde ekilen kondrositlerin Hematoksilen-Eozin boyamasından sonra ışık mikroskop görüntüleri	85
3. 37. 4S-PEG ile çapraz bağlı pHEMA nanofiberleri üzerinde ekilen kondrositlerin Hematoksilen-Eozin boyamasından sonra ışık mikroskop görüntüleri	87
3. 38. 4S-PEG ile çapraz bağlı pHEMA nanofiberleri üzerinde ekilen kondrosit hücrelerinin toluidin blue boyamasından sonra ışık mikroskop görüntüleri ..	88
3. 39. 4S-PEG ile çapraz bağlı pHEMA nanofiberleri üzerinde ekilen kondrosit hücrelerinin İmmünsitokimyasal analizi ile collagen tip II ile boyama sonrasında ışık mikroskop görüntüleri 5. gün	89
3. 40. 4S-PEG ile çapraz bağlı pHEMA nanofiberleri üzerinde ekilen kondrosit hücrelerinin İmmünsitokimyasal analizi ile collagen tip II ile boyama sonrasında ışık mikroskop görüntüleri 10. gün	89
3. 41. 4S-PEG ile çapraz bağlı pHEMA nanofiberleri üzerinde ekilen kondrosit hücrelerinin İmmünsitokimyasal analizi ile collagen tip II ile boyama sonrasında ışık mikroskop görüntüleri 15. gün	90
3. 42. 4S-PEG ile çapraz bağlı pHEMA nanofiberleri üzerinde ekilen kondrosit hücrelerinin İmmünhistokimyasal analizi ile collagen tip II ile boyama sonrasında ışık mikroskop görüntüsü kontrol grubu	91
3. 43. 4S-PEG ile çapraz bağlı pHEMA nanofiberleri üzerinde ekilen kondrosit hücrelerinin 5. günde İmmünhistokimyasal analizi ile collagen tip II ile boyama sonrasında ışık mikroskop görüntüsü ve yapılan analiz sonucu	92
3. 44. 4S-PEG ile çapraz bağlı pHEMA nanofiberleri üzerinde ekilen kondrosit hücrelerinin 10. günde İmmünhistokimyasal analizi ile collagen tip II ile boyama sonrasında ışık mikroskop görüntüsü ve yapılan analiz sonucu	93
3. 45. 4S-PEG ile çapraz bağlı pHEMA nanofiberleri üzerinde ekilen kondrosit	

hücrelerinin 15. günde İmmünohistokimyasal analizi ile collagen tip II ile boyama sonrasında ışık mikroskop görüntüsü ve yapılan analiz sonucu	94
3. 46. Real Time PCR sonucu elde edilen Amplifikasyon Eğrisi Grafiği	96
3. 47. Real Time PCR hedef gen ve referans gen sonuçları	97
3. 48. Agrecan ve Collagen tip I geni için relative değerlerin karşılaştırma grafiği ..	97
3. 49. SOX9 ve Collagen tip II geni için relative değerlerin karşılaştırma grafiği	98
3. 50. Kondrositlerin iki boyutlu kültür ortamında ışık mikroskop görüntüsü	99
3. 51. Kondrositlerin iki boyutlu kültür ortamında kullanılan FITC işaretli CD44 antikoruna ile yapılan floresan boyama mikroskop görüntüsü	99
3. 52. Kondrositlerin 4S-PEG çapraz bağlı PHEMA-Kitosan nanofiber üzerinde kültürü sonucu mikroskop görüntüsü	100
3. 53. Kondrositlerin 4S-PEG çapraz bağlı PHEMA-Kitosan nanofiber üzerinde kültürü sonucu kullanılan FITC işaretli CD44 antikoruna ile yapılan floresan boyama mikroskop görüntüsü	100

ÇİZELGELER DİZİNİ

ÇİZELGE	SAYFA
2. 1. GAG tayini için belirlenen standart oranlar	40
2. 2. First Strand cDNA Synthesis kit içeriğine göre hazırlanan solüsyon miktarları.....	44
2. 3. Real Time PCR için LightCycler® 480 SYBR Green I Master kit içeriğine göre hazırlanan solüsyon miktarları	45
3. 1. 4S-PEG ile çapraz bağlı PHEMA-Kitosan nanofiberi üzerine kültüre edilen 6×10^5 kondrositin 5. , 10. ve 15. günlerdeki DNA miktarları.....	76
3. 2. 4S-PEG çapraz bağlı PHEMA-Kitosan nanofiberi üzerine kültüre edilen 2×10^4 adet kondrosit hücrelerinin 5. , 10. ve 15. günlerdeki GAG ve DNA miktarları ile GAG/DNA oranları.....	76
3. 3. 4S-PEG çapraz bağlı PHEMA-Kitosan nanofiberine yapılan COMP uygulamasına ait standartlar, konsantrasyon ve absorbans değerleri aşağıda verildiBu değerler ELISA kitinde bulunan standartlar ve 450 nm’ de okunan absorbans değerleri	77
3. 4. 4S-PEG PHEMA-Kitosan nanofiberi üzerine ekilen kondrositlerin 5. 10. ve 15. gün örneklerinin ortalama absorbans	78
3. 5. 4S-PEG PHEMA-Kitosan nanofiberi üzerinde ekili olan kondrosit hücrelerinin ve kontrollerin 5. , 10. Ve 15. gün örneklerinin 570 ve 600 nm ‘deki ortalama değerleri	85

KISALTMALAR DİZİNİ

APS	amonyum persülfat
cDNA	tamamlayıcı deoksiribonükleik asit
COMP	Kıkırdak oligo matriks proteini(Cartilage Oligomeric Matrix Protein)
Ct	Eşik döngü değeri
DMMB	dimetil metilen mavisi
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DNaz	Deoksiribonükleaz
dNTP	Dezoksiribonükleotit trifosfat
ECM	Ekstraselüler Matriks
EDTA	Etiendiamin Tetraasetik Asit
ELİSA	Enzim Bağlantılı İmmün Analiz
EDC	N-Etil-NR-(3-dimetilaminopropil) karbodiimit
FITC	Fluorescein İsothiocyanate
FTIR	Fourier Dönümlü Kızılötesi(Fourier Transformed Infrared)
GAG	glikozaminoglikan
HEMA	2- hidroksietil metakrilat
H&E	Hematoksilin-Eosin
H ₂ O ₂	Hidrojenperoksit
IHC	İmmünohistokimya (Immunohistochemistry)
FBS	Fötal Sığır Serum
mRNA	mitokondrial ribonükleik asit
MgCl ₂	magnezyum klorür
NHS	N-Hidroksisüksinimit
PBS	Tuzlu Fosfat Tamponu (Phosphate Buffered Saline)
RNA	Ribonükleik asit
OD	optik yoğunluk

PHEMA	Polihidroksietil Metakrilat
PEG	Polietilenglikol
PCR=PZR	Polimeraz Zincirleme Reaksiyonu
RNA	ribonükleik asit
RT-PCR = PZR	RealTimePolimeraz Zincirleme Reaksiyonu
SEM	taramalı elektron mikroskop
4S-PEG	4arm PEG Succinimidyl Glutarate
TGF1	Dönüştürücü Büyüme Faktörü (Transforming Growth factor)
UV	ultraviyole



1. GİRİŞ

Seyrek bir hücre popülasyonuna sahip bir avasküler doku olan artiküler kıkırdak, çeşitli büyüme faktörleri tarafından düzenlenen ekstraselüler matriks (ECM) ile sarılmıştır (Holland ve ark. , 2003). Bu nedenden dolayı, kondrositleri ve büyüme faktörü iletimini içeren doku mühendisliği stratejileri, eklem kıkırdak lezyonlarının tedavi sürecinde iyileştirmeye yönelik yardımcı olabilmektedir(Doku mühendisliğinde önemli bir hedef haline gelen büyüme faktörleri düşük konsantrasyonlarda proliferasyon ve matriks üretimi gibi hücrel işlevleri düzenlemektedir. Özellikle büyüme faktörü olan sitokinler bu konuda örnek olarak gösterilebilmektedir (Chen ve ark., 2006 ve Jackson ve ark., 1999).

Kıkırdak temel olarak eklem hareketi ve ağırlık taşıma aktivitelerinde ağrı ve hareket kaybını önlemek için kemik uçları arasında bir yastık gibi davranmaktadır (Kim ve ark., 2011).

Kıkırdak doku, tipinde yaralanmalar ve hastalıklar nedeniyle çeşitli dejeneratif hastalıklar sıkça gözlenmektedir. Bu amaç doğrultusunda çeşitli ortopedik ve hücreye dayalı teknikler geliştirilmiştir. Ancak gerekli olan tedavi tam olarak gerçekleştirilememektedir (Zhao ve ark., 2013).

Çeşitli doğal ve sentetik malzemeler potansiyel hücre taşıyıcıları olarak veya kıkırdak tamiri için terapötik ajanlar olarak incelenmektedir (Spiller ve ark., 2011 Kock ve ark., 2012).

Bu yüzden doku mühendisliğiyle son yıllarda laboratuvar ortamında üç-boyutlu biyobozunur ve biyoyumlu polimerik yapıların ve kıkırdak dokusunun üretimi için çalışılmaktadır. Farklı yapılarıdaki ve özellikteki polimerik malzemeler test edilerek belirlenen doğrultusunda kullanılmaktadır ve kültür şartları bu uygulamalara göre optimize edilmektedir.

Kıkırdağın tamiri zordur buyüzden, semptomatik kıkırdak lezyonlarının eklem ağrısı ile yaş ortalamasının artmasıyla birlikte tedavi edilmesi adına aşırı bir talep oluşturulmaktadır.

Bu tezde hasar görmüş kıkırdağı onarma yoluna gitmek yada rejenerasyonu için bir tedavi yolu aranırken bir yandan dakıkırdağın biyokimyasal yapısını, fonksiyonunu ve dokunun gelişimini anlamlandırabilmek için birçok yararlı çalışmalar yapılmıştır.

Başlangıçta menisküsün körelmiş bir yapı olarak tanımlanmıştır fakat diz eklemi ömrü ve işleyişi adına oldukça önemlidir. Bazı araştırmacılar bu durumun çeşitli yıl aralıklarında araştırmışlardır. Bu araştırmacılar sırasıya; 1948'de Fairbank, 1982'de Burr ve Radin, 1988'de Arnoczky ve diğerleri, 1897'de Sutton, 1992'de Arnoczky, 1992'de Spilker ve diğerleri, 1998-2001'de Roos ve diğerleri, 2000'de Rodkey, 2006'da McDermott and Amis'dir.

Menisküs, sinovyal sıvının femoral kondillerdeki çevredeki eklem kıkırdağına düzgün biçimde dağılımını ve eklem beslenmesini sağlamaktadır. Menisküs yırtığı günümüzde en yaygın yaralanmalar olmakla birlikte yaş arttıkça çeşitli spor faaliyetleri veya normal doku dejenerasyonu sonucu da oluşabilmektedir (Holland ve ark., 2003).

Kas-iskelet sistemi rahatsızlıklarında neden olarak menisküs yaralanmaları kabul görülmektedir (Chen ve ark., 2006).

Menisküs uyumu artırarak tibiofemoral eklem boyunca yük aktarmakla görevliyen eklem kıkırdağındaki stresin ve yükün azaltılmasını sağlamak birinci görevleri arasındadır. Fonksiyonel özelliklerinin bir sonucu olarak gösterilen genç ya da yaşlı hastalarda hasar ve yaralanma eğilimi olduğu bilinmektedir.

Çeşitli yöntemler menisküs yırtıklarının tedavisi için geliştirilmiştir. Birçok yöntemde çeşitli yönlerden eksikliklerin olduğu bilinir ve doku mühendisliği bunların giderilmesi için gözde bir çözüm olarak görülmektedir. Travmanın derecesine bağlı olarak, menisküs tamiri, meniskal transplantlar, menisküsektomi gibi çeşitli tedavi yöntemleri allogreftler-otogreftler ile bu yaralanmaları tedavi etmek amaçlı kullanılabilir (Jackson ve ark., 1999).

Kullanılması amaçlanan çeşitli biyomateryaller menisküs yaralanmalarında tedavi amacı doğrultusunda uygun ideal malzemenin belirlenmesi için hayvan modelleri üzerinde araştırılma yapılmıştır.

Hasarlı menisküsleri iyileştirebilen biyolojik doku ile değiştirme amaçlanarak ytrtlen bu çalışmada, biyolojik olarak uyumlu ve parçalanabilir nanofiberlerden oluşan iskelelerle çalışmalar yapılması ngrlmştır.

Bisceglie'nin 1930'da ilk olarak sentetik malzeme kullanımına tümör hücrelerini polimerik membran üzerine ekerek domuzun karın boşluğuna yerleştirilmesi ile başlamıştır (Bisceglie ve ark., 1993).

Hidrofilik polimerler potansiyel biyoyumlu materyal olarak araştırılmıştır. (Ratner ve ark., 1976). Yüklü olmayan polimerlerde su ile etkileşim öncelikle su ve hidrofilik gruplar arasındaki hidrojen bağından kaynaklanmaktadır. Bu sınıfta en çok çalışılan polimerler arasında PHEMA yer almaktadır (Wichterle ve ark., 1960; Wichterle ve ark., 1971). PoliHEMA (polihidroksietil metakrilat), yüksek biyoyumluluğa sahip olduğundan biyolojik uygulamalarda en çok kullanılan polimerlerden biridir. PHEMA polimerinin, mekanik olarak dayanıklılığı ve kanla uyulaşabilirliği oldukça yüksektir. Metil ve diğer alkil metakrilatların sentezi oldukça iyi bilinmektedir. Sentez sırasında iki yöntem kullanılmaktadır. Bunlar, düşük sıcaklıkta radikal polimerizasyon ve eter solvent içinde anyonik polimerizasyondur (Fox ve ark., 1958; Fox ve ark., 1962).

Bu tez alışmamızda, HEMA monomerini kullanarak radikal polimerizasyon sonucu PHEMA polimerini elde ettik. PHEMA tabanlı kompozit nanofiberlerin elde edilmesi ve geliştirilmesi, farklı konfigürasyonlarda elde edilerek dayanıklılığı, hücre canlılığını ve yapısal özelliklerini koruyup korumadığını belirlemek amaçlanarak doku mühendisliği yaklaşımı ile potansiyeli araştırılmıştır.

Kitosanın pozitif yüzey yükü ve biyoyumluluk, hücrenin büyümesini etkin bir Şekilde desteklemesini sağladığı bilindiğinden dolayı ilk önce elde ettiğimiz phema nanofiberi Kitosan ile kaplama yoluna gidildi.

PEG'ler, biyoyumluluk ve minimum toksisite ve suda veya diğer yaygın solventlerde iyi çözünürlüğü nedeniyle sıklıkla kullanım için seçilmiştir. Çalışmamızda PEG 'in dört kollu çeşidi olan hemen hemen aynı yapı ve özelliklere sahip 4S-PEG üyesini kullandık.

Kompozit nanofiber oluşturmak için PHEMA, Kitosan ve 4SPEG kullanıldı. Elde edilen kompozit nanofiberlere kondrosit ekimi yapılarak nanofiberlerin doku mühendisliğindeki potansiyeli *in vitro* koşullarda araştırıldı. İlerleyen zamanlarda *in*

vitro araştırmalar sonucu elde edilen nanofiber yapısı *in vivo* alışmalarla desteklenecektir. Karakterizasyon için SEM ve FTIR analizleri yapıldı.

PHEMA nanofiberi, dayanıklılığını daha fazla arttırmak ve daha kuvvetli polimerik malzeme yapmak amacıyla doğal polimer olan kitosan ile kaplama yapıldı. Farklı zaman aralıklarında yapılacak inkübasyon sürelerindeki degradasyonu en aza indirmek için ise biyouyumluluğu daha önce çeşitli makalelerden araştırılmış ve doğrulanmış olan 4S-PEG polimeri ile hazırlanan çözelti içerisine konularak modifiye olarak hazırlandı. Hazırlanan nanofibere önce fiziksel ve kimyasal karakterizasyonuna bakıldı ardından primer hücre kültürü ile elde edilen kondrositlerin nanofiberler üzerine kültürü yapılarak biyokimyasal, morfolojik ve moleküler biyolojik özellikleri araştırılmaktadır.

Teknoloji sınırlamaları, araştırma zorlukları ve gelecekteki eğilimler ile ilgili diğer konular da birçok makalede olduğu gibi aşağıda belirtilen makalede ele alınmaktadır. Açık literatürde belirtildiği üzere elektrospinning tekniğini kullanarak çok ince liflere başarıyla bükülmüştür. Elektrospinning prosesinin potansiyel olarak umut verici olması ve literatürde yıllardır varlığını sürdürmesine rağmen, günümüzde sınırlı olarak çalışılmaktadır.

Kim ve ark. (2005) yılında sulu etanolden elektrospinning ile PHEMA elyaflarının hazırlanmasında çözelti viskozitesi ve moleköl ağırlığı arasındaki ilişkiyi araştırmışlardır. Elektrospinning işleminde ultraviyole ışığı uygulayarak PHEMA'nın aynı anda polimerleşmesini ve çapraz bağlanmasını başarmışlardır.

Bir diğer araştırmaya göre Deitzel ve ark. (2001), güç yasası ilişkisine göre polimer konsantrasyonunun artmasıyla lif çapının arttığını saptamışlardır. apı etkileyen en önemli parametrelerden biri çözelti viskozitesi olarak belirlenmiştir ve hazırlanan çözeltinin yüksek viskoziteli olmasının fiber çapının yüksek olmasına neden olduğu ifade edilmiştir (Bergshoef ve ark., 1999).

Bu çalışmada, elektrospinning ile polimer nanofiberlerin üretimi, yapısı fiziksel ve kimyasal karakterizasyonu uygulamaları ile ilgili araştırmalar üzerine bir inceleme yapıldı. Elektrospinning ile ilgili en önemli parametrelerden birinin biri fiber çapı olduğu daha önceki çalışmalardan bilindiği üzere biz çalışmamızda katı polimeri uygun çözücü içinde çözündüğünde, çözelti viskozitesi polimer konsantrasyonu ile orantılı olması gerektiğine dikkat ettik. Böylece, polimer

konsantrasyonu dengeli olduğu takdirde nanofiber çaplarının istenilen boyutta olduğu tespit edildi.

Annexinler protein ailesine mensupturlar. Mevcut olan geleneksel testlerle karşılaştırıldığında, Annexin V testi hassas ve kolay gerçekleştirilmektedir. Bununla birlikte hücre membranının normalde iç kısmında bulunan ancak apoptoz ile hücre yüzeyine çıkan fosfolipidlerine bağlanma özelliği göstermektedir. Annexin V testi, hücre zarı bütünlüğünün kaybedilmesinden önce erken apoptoz fazlarını saptama imknı sunmakta ve hücre döngüsü ile ilişkili olarak apoptotik lme ait kinetik ölümlerine izin vermektedir. Annexin V testinde iki ölüm şekli vardır. Bu iki hücre ölüm şekli arasındaki fark, apoptozun başlangıç aşamalarında hücre zarının bozulmadan kalması, nekroz meydana geldiği anda hücre zarı bütünlüğünü kaybetmekte ve sızıntı yapmasıdır (Vermes ve ark. , 1995).

Alamar Blue testi ise, doğru zaman-mesafe ölümleri sağlar, yüksek hassasiyet ve doğrusallığa sahiptir, hücre lizisi içermediğinden ölüm sonrası fonksiyonel testlerde ve farklı hücre modelleri ile kullanılabilir ve lklenebilir olduğu iiniin ideal bir yöntemdir.

Kollogen tip II, SOX9, Aggrecan gen ekspresyonları hedef ve referans gen karşılaştırmalarıyla Real Time PCR cihazında tespit edildi.

Kıkırdak doku, devamlı olarak bazı gerinim ve gerilim kuvvetlerinin etkisi altındadır. Bu sebeple laboratuvar ortamında doku mühendisliği yaklaşımı ile üretilen rejenere kıkırdak doku, doğal kıkırdak doku ile tam bir uyum gösterememektedir. Bu nedenle menisküs yaralanmaları sınırlı iyileşme göstermektedir. Elektroğirme yöntemiyle elde edilen biyomalzemeler kullanılarak yapılan doku mühendisliği yaklaşımları menisküs tedavisinde umut vaat etmektedir. Bu çalışmada biyoyumluluğu iyileştirilmiş nanofiberlerin sentezi ve kondrosit izolasyonu ile birlikte nanofiberlerin kondrojenik potansiyeli ve menisküs yaralanmalarındaki tedavi edici etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

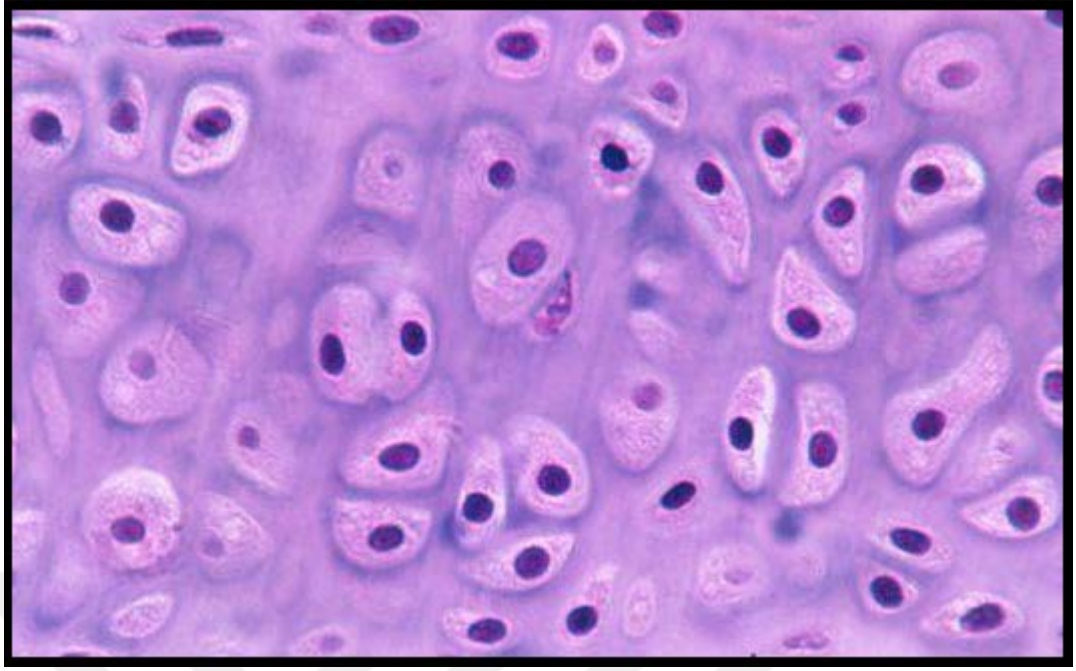
1. 1. Kıkırdak Anatomisi ve İşlevleri

Iskelet sisteminin kıkırdakları embriyonun mezoderm tabakasından oluşmaktadır. Gelişimin dördüncü haftasının sonunda progenitör hücreler, mezenkim adı verilen bağ dokusunu oluşturmak üzere toplanmaktadır. Mezenkimal kök hücrelerden meydana gelmekte olan kıkırdak gelişimi, beşinci haftada başlarkenkemik yapısı ve mezenkim iskele olarak düzenlenmektedir (Hall ve ark. , 1987).

Kıkırdak doku, normal bağ dokusundan dayanıklı ve daha esnektir. Organların bazılarının iskeletini, kemiklerin eklem yüzeylerini ve fetal iskeletin büyük bir kısmını oluşturur. Kıkırdak esas olarak interstisyel sıvı ve çapraz bağlı ekstraselüler matriks (ECM) moleküllerinden oluşmaktadır (Hutson ve ark., 2011).

Oluşan ve gelişen kıkırdak doku aşamasına *kondrogenez* adı verilmektedir. Ekstraselüler matriks, doku içinde sıkı bir kıvamda bulunmaktadır(Şekil 1). kıkırdak dokusuna, mekanik zorlamalar karşısında şekil bozukluklarına olmaması için gereken esnekliği ekstraselüler matriks sağlamaktadır(Vacanti ve ark. , 1997). Kemiklerin eklemleinde sürtünmeye dayanıklı bir sertlik oluşturmaktadır. Bu durumda neden iskele görevi grdüğünü açıklamaktadır.

Embriyonun mezoderm tabakasından gelişen kıkırdak, kondrositlerden oluşurken, lakün adı verilen oluklara yerleşir ve fibröz bağ dokusu ile sarılı lifli kılıf olan perikondrium metabolizma için gereklidir. Kıkırdağın %95'ten fazlası ekstraselüler matriksten oluşmaktadır. Ekstraselüler matriks içerisinde kondrositler lakün adı verilen boşluklarda tek veya grup halinde bulunabilirken kondronları oluştururlar (Akay, 2006). Mikroskopik görüntüsü ovoid ya da yuvarlaktır. Sitoplazması açıkrenkte ve fazla mitokondri içermektedir. Genç kondrositlerin yanı sıra yaşlandıkça yağlanır ve protein sentezinde aktivasyonu düşmektedir (Hall ve ark. , 2005; Akay, 2006). Kondrositler her daim ekstraselüler matriks üretimi için gereklidirle r(Green, 1977)



Şekil 1.1. Tek Tek ve ya Grup Halinde Bulunan Kondrositler(<https://www.studyblue.com/notes/note/n/a-p-lab-exam-2-histology/deck/12110656>)

Kıkırdağın dirençli olmasının nedenleri olarak ekstraselüler matriksin bükülebilir ve hafif katı yapıda olması gösterilmektedir. Perikondrium kapillerlerden ve eklem sinoviyal sıvısından difüzyonla besin alımını gerçekleştiren ve damar ağı bulunmayan kıkırdak doku kan, lenf kapillerleri ile sinir hücrelerini de bünyesinde barındırmaz. Avasküler dokuların tamamından kapillerinin olmamasından dolayı, metabolik aktivite düşüktür ki bu da solunumun düşük oksijen oranlarında yaptıklarını göstermektedir. Buyüzden kıkırdak dokusu daimakendini kolaylıkla yenileyip tamir edemez halde bulunur (Reinholz ve ark. , 2003).

Bu sebeple ekstraselüler matriksin yapısı, kondrositlerin yaşamını sürdürebilmesi için önemli olan ekstraselüler matriksteki glikozaminoglikanlarının tip II kollagenin oranının fazlalığı ve aynı zamanda çevrilenmiş yapısındaki bağ doku kan damarlarının kondrositler arasında madde difüzyonuna etkisi çok önemlidir. Bu doku canlılığının devamlılığı sağlanmaktadır. Kollojen lif ağı moleküler gerilmeye karşı dirençli olduğundan fazla miktarda hidratlanmış proteoglikan kümeleri olarak görev yapmaktadırlar. Proteoglikanların kopma dayanımları çok zayıftır ve sebeple sinoviyal eklemlerdekiyle aynı hareket halindedir. Bunun nedeni kıkırdağı ağırlık

taşıırken uygun hale getirmektir. Fetal iskeletin ve çoğu kemiğin büyüme ve gelişiminde kilit noktası olan kıkırdak daima bu özelliğini korumaktadır. Kalan matriksin %15-20 arasıkollajen ile gerilme direncini sağlarken, %2-10 oranında proteoglikanlar ile esnekliği sağlamaktadır (Ross ve ark. , 2013)

Kıkırdak doku eklemdeki hareketi kolaylaştırmak bir yana yumuşak dokuları korur ve desteklik görevi sağlamaktadır. Daha emriyodayken ergenlikteki kemiklerin büyüyüp gelişmesini sağlamak için iskelet sisteminde bu görevi üstenererek yardımcı olmaya çalışır. Solunum sisteminde; trakea, bronş gibi hava yolları yapılarının kapanmalarını özellikle önlemektedir (Vinatier ve ark. , 2009).

1. 2. Perikondrium

Kıkırdağı saran ve çevresindeki dokularla ara madde oluşturan kapsül şeklinde sıkı bağ dokudan olan bir kılıf vardır ki buna perikondrium adı verilmektedir (Junqueira ve ark., 1986).

Perikondrium dışta gevşek dokuya sahipken ve bu gevşek doku sinir ve damarlarla kuşanmışken, içte kıkırdakla özdeşleşmiştir (Kierszenbaum ve ark., 2012). Fibroblast içeren dış tabaka fibröz, mezenşimal hücrelerden oluşan iç tabaka ise kondrojenik tabaka olarak anılmaktadır. Bu durumda kondrojenik hücreler kondroblastlara, hücre dışı matrisin çoğunu sentezleyen kondroblastlar ise kondrosit haline gelmektedir (Soleimani ve ark. , 2011).

Hiyalin kıkırdak ve çoğu kıkırdakta bulunan lifli perikondrium eklemde bulunmaz. Tip I kollajen ve fibröz lif içeren perikondrium farklılaşmasıyla aktifleşir ve kıkırdak onarımını gerçekleştirir. Vasküler bir zemin oluşturduğu öngörülerek avasküler dokunun besin ihtiyaçlarını gidermeyi sağlamak başlıca neden olarak gösterilmektedir (Junqueira ve ark. , 1986; Paulsen ve ark. ,2010).

Perikondriumun avasküler olduğunu belirtilen kaynaklara göre beslenme ve atıkların ortamdan uzlaştırılması farklı bir bağ dokudan gerçekleştiği söylenmektedir (Leeson ve ark., 1988). Başka bir kaynakta ise, fibröz tabakave kan damarlarının varlığı dile getirilmektedir (Gartner ve ark., 1997). Eğer bir kıkırdak

doku perikondriyuma sahip değilse beslenme sinoviyal sıvıdan olduğu bilinmektedir (Mescher ve ark., 2010).

1. 3. Ekstraselüler matriks

Ekstraselüler matriks, hücrenin temel bileşeni olmakla birlikte, yapısal ve mekanik destek sağlarken hücre davranışlarını düzenlemektedir (Rosso ve ark., 2004; Daley ve ark., 2008). Çokça makromoleküllü bir araya getiren ekstraselüler matriks biyofiziksel ve biyokimyasal özelliklere sahiptir. (Kadler ve ark. , 2007; DeBelle ve ark., 1999). Hücrenin arka tabanında jel benzeri yapıda olmakla birlikte polisakkarit olan glikozaminoglikan ve proteoglikanlar bakımından göz dolduracak zenginliktedir (Griffith ve ark., 2006). Kollagen, proteoglikanlardan, glikoproteinlerden oluşan ve etrafını çevreleyen ekstraselüler matriks bulunduran kondrositler kıkırdağın temel hücreleridir(Ross ve ark., 2010).

Kondrositler, matris moleküllerini düzenleyerek doku yapısını korumakla sorumlu olsa da, sağlıklıken anabolik (matriks üreten) ve katabolik (matriks yıkıcı) denge söz konusudur (Mueller ve ark., 2011). Ekstraselüler matriks esnek katı kıvamlı ve jölemsidir (Soleimani ve ark., 2011). Matriks, kıkırdağa esneklik verip dokunun mekanik etkilere karşı dayanıklı olmasını sağlamaktadır (Junquera ve ark., 2011).

Ara madde ve fibrillerden ibaret olan kıkırdak ekstraselüler matriksi için kollojen tip II karakteristik özelliktedir. Aynı zamanda bu fibril yapıları kıkırdak farklılıklarına göre kollojen tip I, tipII ve elastik fibriller olarak belirtilir. Dokunun yapısında varolan ara madde ise; kıkırdak sıvısı, glikozaminoglikanlar, proteoglikanlar, proteoglikanagregatları, glikoproteinler'den meydana gelmektedir.

Kollojen fibriller ve glikozaminoglikanların yan zincirlerinde elektriksel bağların oluşması ile birlikte, negatif yüklü glikozaminoglikan zincirlerine proteoglikanların öz proteinlerinin bağlanması kıkırdak doku yapısındaki kollojen ve elastik liflerin dayanıklı ve jöle kıvamında olmasının nedenleri arasında gösterilmektedir (Junquera ve ark., 1986).

Ekstraselüler matriksin kondroblast ve kondrositteki transmembrandaki proteinlere bağlanma bölgelerine bağlanma alanları; kondronektin, kollojen yapıdaki fibronektin ve kondrotin 4-6 sülfat'tır. Bu durumda da hücrelerin amorf matriks ve fibröz elemanlara tutunmasını sağlamaktadır (Gartner ve ark. , 1997). Besin maddelerini çözmesi gereken sudifüzyon ile perikondriumdan kıkırdağın en dip bölgelerine ulaşmak zorunda olduğundan serbest su ortamda yoktur ve ekstraselüler matriks az da olsa kalınlık göstermektedir (Junquera ve ark., 1986).

Kondrositleri çevreleyen ekstraselüler matriks; Tek tek her bir kondrositi çevreleyen perisellüler matriks, perisellüler matriksini ya da bir tek hücreyi çevreleyen teritorial matriks, kıkırdak dokunun çok büyük kısmını oluşturur ve dokuyu koruyarak yapısal özelliklerini veren interteritorial matriksten oluşmaktadır. Perisellüler matriksin dışı çok fazla Tip II kollajen az miktarda proteoglikan bulundurmaktadır. Teritorial matriks de aşırı miktarda kondroidin sülfat bulundurur. Ayrıca perisellüler ve teritorial matriks, kondrositlerin interteritorial bölgeye yapışmasını ve hücreleri hasardan koruyup ve mekanik olan sinyallerin hücrelere gitmesini sağlamaktadır (Mescher ve ark. , 2010).

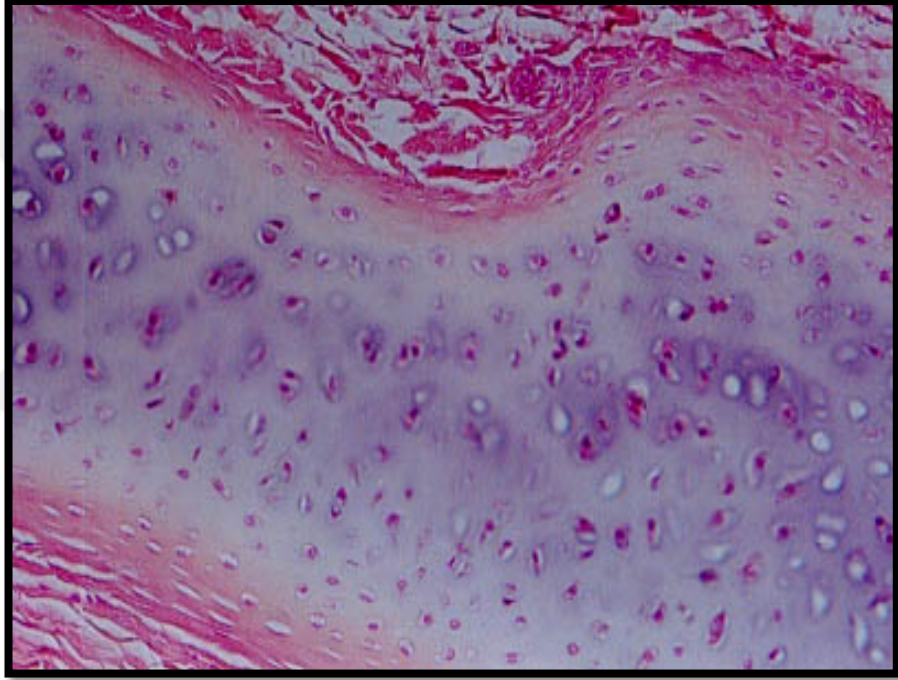
1. 4. Kıkırdak Çeşitleri

Hyalin, elastik ve fibröz olmak üzere yapısal ayrımları olan kıkırdak bağ doku olmakla birlikte yumuşak dokuyu desteklemekle de görevlidir. Düzgün yapılı ve esnek olmasından dolayı eklem yüzeyleri kaygan ve dış darbelerle dayanıklı olmasını sağlar. Eklemlerin hareket yeteneğini kolaylaştırmasının yanında, uzun kemiklerin oluşumunda ve gelişim aşamalarında doğum öncesi ve sonrası önemli rol oynamaktadır (Murathanoğlu, 1996).

Matriks yapısını glikozaminoglikanlar, proteoglikanlar tip II kollajen lifleri ve yapışkan proteinlerden oluşan matriksli hyalin kıkırdak, benzer şekilde elastik lifli matriksten oluşan elastik kıkırdak, bunun yanında yine hyalin kıkırdağa benzerlik gösteren fibröz kıkırdak bulunmaktadır.

1. 4. 1. Hyalin Kıkırdak

Hyalin kıkırdak, farklılık olarak homojen ve amorf matriksten ayırt edilebilir. Matriksi oldukça şeffaf, camsı görünümündedir ve içine kondrositlerin yerleştiği lakünler bulunmaktadır. Sinoviyal eklemlerin kayganlaştırılmasını sağlar ve tüm gücü alt tabakadaki kemiğe verir. İyileşme sınırlıdır ancak çoğu kişide yaşlanmayla ortaya çıkan bozunmalar bulunan eklem kıkırdağıdır (Gartner ve ark. , 1997).

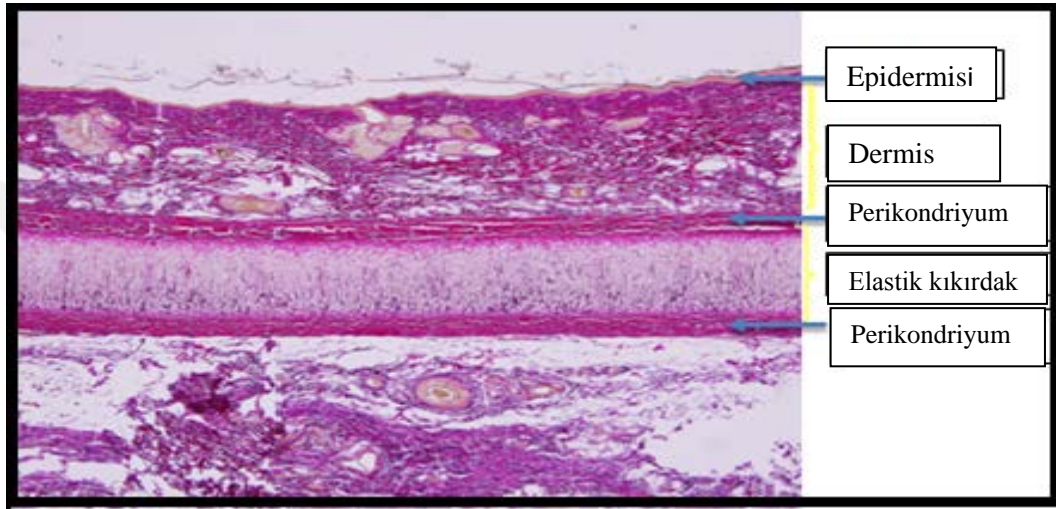


Şekil 1.2. Hyalin kıkırdak görüntüsü([https://www. delinetciler.org/showthread. php?t=160572](https://www.delinetciler.org/showthread.php?t=160572))

1. 4. 2. Elastik Kıkırdak

Hyalin kıkırdak kadar dayanıklı olmayan çokça elastik iplik içeren ve tip II kollojen bulunduran elastik kıkırdak; sarımsı renkte ve kolaylıkla ayırt edilebilir. Vücudumuzdaki tüp şeklinde organların içindeki boşlukları sarar ve elastiklik katar.

Sitoplazmalarında hiyalin kıkırdağa göre daha az lipid ve glikojen bulunmaktadır. Bunun yanı sıra az miktarda GAG ve diğer bileşenleri içermektedir. Perikondriyumu bulunan elastik kıkırdağa kondrosit miktarı daha fazladır. Östaki borusunda, küçük dilde, kulak kepçesinde ve burun kanatlarında bulunmaktadır (Hollander ve ark., 1996).



Şekil 1.3. Elastik kıkırdak (van gieson-volhuf, X4)

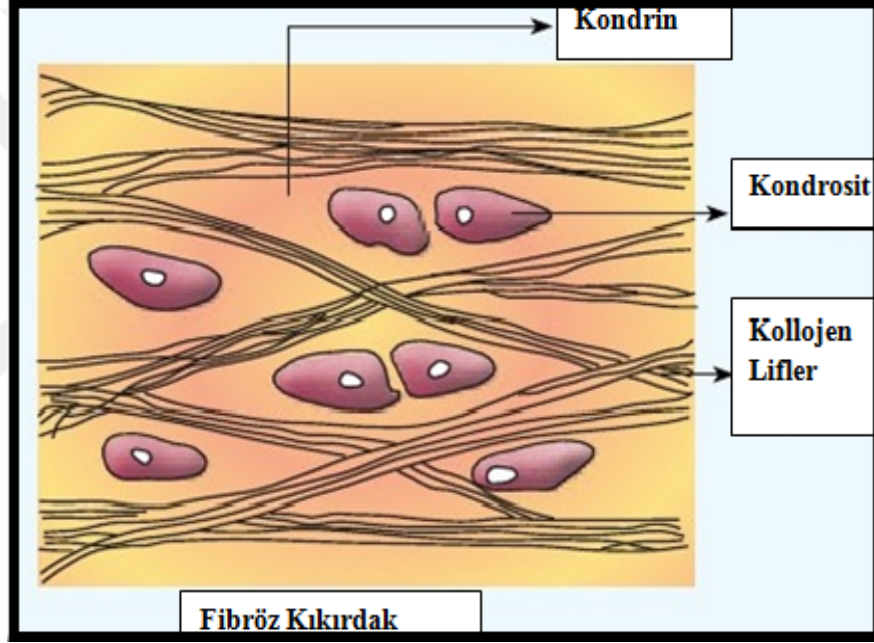
1. 4. 3. Fibröz Kıkırdak

Basıncılara dayanıklı bağ dokunun düzensiz sıkı bir ağ oluşturması sonucunda meydana gelmektedir. İntervertebral disklerde, eklemlerde ve tendonlara bağlandıkları bölgelerde, omurgalarda, kasık kemiğinin yapısında görülmektedir. Hücreler dokunun yüzde ikilik kısmını meydana getirdiğinden çok gelişmiş olduğu anlaşılmaktadır. Fötal dokuda görülen bu kıkırdak hücre çok yoğunken yaş ilerledikçe hücrelerde azalma olmaktadır (Meyer ve ark., 2006; Tıgılı., 2009).

Fibröz kıkırdak orjinal eklem kıkırdağı ile aynı özellikleri taşımayan fibröz kıkırdağın eklem kıkırdağı hasarlarında sınırlı da olsa iyileştirme göstermektedir (Şenköylü ve ark., 2004).

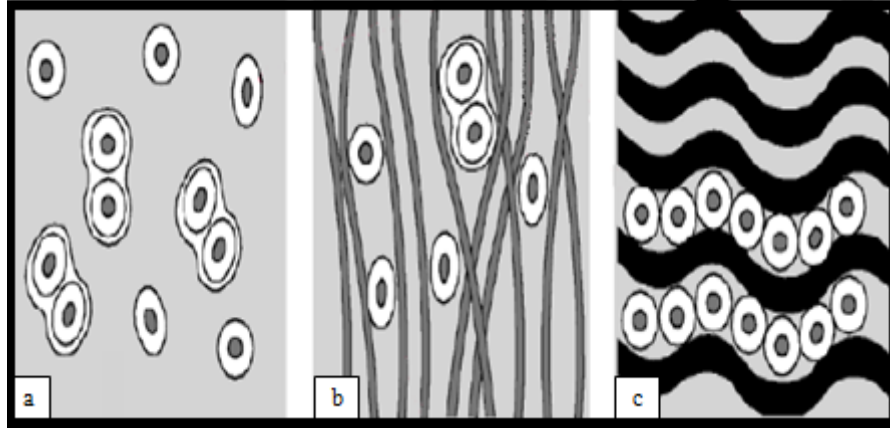
Fibröz kıkırdak dokuda testosteron, somatotropin ve tiroksin gibi hormonlar ve bazı maddeler kıkırdak büyümesini artırırken; östradiol, hidrokortison, kortison ise kıkırdak büyümesini engelleyenlerden olduğu bilinmektedir (Nejdet Şimşek).

Fibröz kıkırdak hücreleri tek tek ve ikişerli gruplar halinde bulunmaktadır. Yapısında bulunan çok miktarda tip I kollajenden dolayı hematoksilen eozin boyaması ile asidofilik boyanmaktadır. Perikondryumu belirgin olmayan fibröz kıkırdak Ayrıca amorf maddesi azdır. Ayrıca menisküs en belirgin fibröz kıkırdak şeklidir.



Şekil 1.4. Fibröz kıkırdak yapısı

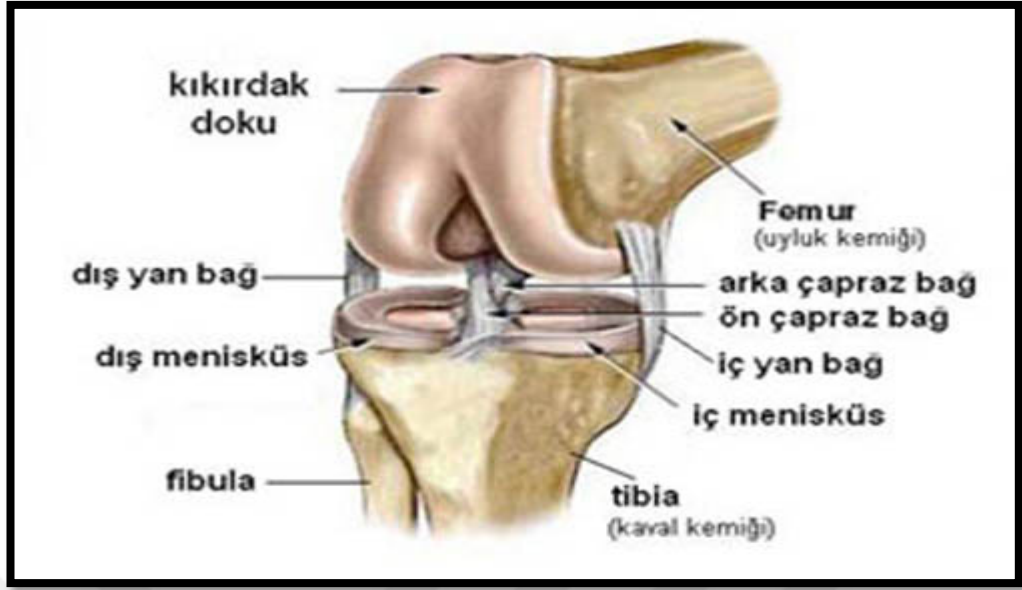
<https://www.emaze.com/@aqoqwzff/ba%c4%9eve-destek-doku>



Şekil 1. 5. A. Hiyalin kıkırdağın şematik gösterimi. **B.** Elastik kıkırdağın şematik gösterimi **C.** Fibroz kıkırdağın şematik gösterimi (Tıgılı, 2009).

1. 4. 3. 1. Menisküs

Menisküsler yarım ay şeklinde her iki diz ekleminde iki adet medial ve lateral kısmında konumlanmış halde bulunmaktadır. Fibrokartilaj yapıdadır ve femoral kondillerin alt bölgesinde lateral ve medial tibia kenarında yerleşik haldedirler (<http://www.drdenizdogan.com/2014/05/diz-anatomisi.html>). Üst kısmı konkav şeklinde olmalarının sebebi femoral kondillere uyum sağlamak olmakla birlikte alt kısım düzdür (Bahçecioğlu., 2011). Dize gelen yük dağılımını sağlayıp dengeler ve eklem sabitleyicisi olarak görevin yapmaktadır (Yoldaş., 2008).



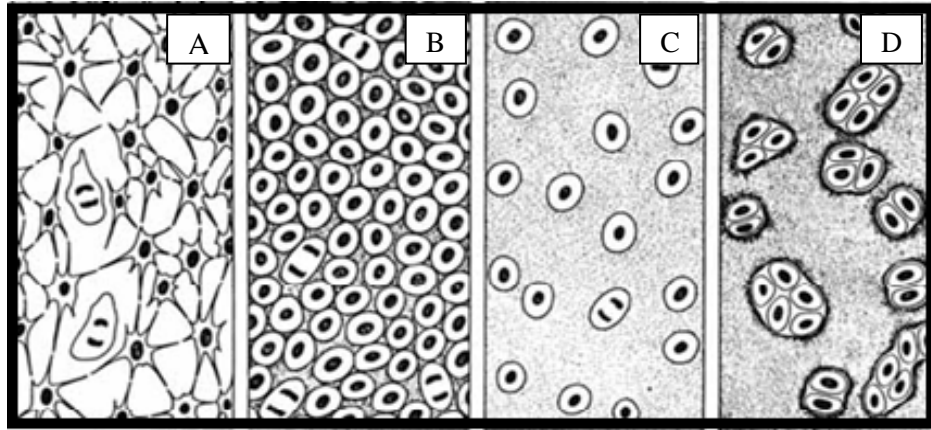
Şekil 1. 6. Menisküs yapısı(http://www.kayserikent.com/site/page.asp?dsy_id=9891)

Menisküslere fibrokartilajinöz yapıda demelerinin sebebi iki türlüde lif ve bağlardan oluşması sonucu ortaya çıkan özelliklerle eklemesel kıkırdak yapısını göstermesidir. Kollogen liflerden çok yüksek oranda ekstraselüler matriks oluşmaktadır. Kollogen lifler enine bir şekilde yayılır ve çekim kuvvetini ters yönde etkileyecek mikrofibrilleri oluştururken, matriksin kalın kısımları proteoglikanlardan meydana gelmektedir. Agregan glikozaminoglikanlardan oluşan en önemli proteoglikandır (Baker., 2010).

1. 5. Kondrosit ve Kondroblastların Histofizyoloji

Aynı hücrenin iki farklı evresi olarak kabullenilen kıkırdak dokusunda aktif olarak ekstraselüler matriks üreten, genç kıkırdak hücrelerini *kondroblastlar*, olgun kıkırdak hücrelerini ise *kondrositler* olarak adlandırılmaktadır (Soleimani ve ark., 2011).

Embriyonun beşinci haftasında mezenkimal hücrelerin kondroblastlara farklılaşmaya başlar ve böylelikle kıkırdak dokusu oluşmaktadır. Kondroblastlar hilal şeklinde olup belirgin çekirdekçik ve ökromotik çekirdeğe sahiptir. Sitoplazmalarında paralel ve yassılaştırmış sisternaları bulunan endoplazmik retikuluma sahiptir. Dağınık mitokondri olan kondroblastlarda glikojen agregatları ve lizozom ile birlikte ekstraselüler matriks içinde sitoplazmada çıkıntılar görülmektedir. Perisellüler matriks görülmemektedir. Ekstraselüler matriksi başladıktan sonra geçici olarak kondroblastlarda görev yapan gap junction adı verilen intersellüler balantılar yok olmaktadır. Bu sayede kondroblastların bölünme yetenekleri kaybolur ve metabolik aktiviteleri düşmektedir. Bu durumdaki kondroblastlara kondrosit adı verilmektedir. Eğer kondrosit olgunlaşmış ise çok fazla glikojen ve lipid yapısı içerirken daha büyük ve yuvarlak şekle sahiptir ve görülmesi az da olsa silyum yapıları bulunmaktadır. Birden fazla veya bir tane çekirdekçığı ve çok belirgin olan çekirdeği bulunmaktadır. Sitoplazması hücre içi ve hücre dışı sidirimden sorumlu golgiyle ve granüler endoplazmik retikuluma doludur ve kondroblastlara oranla çok fazla mitokondri, lizozom, pigment granülleri ve ara filament olarak adlandırılan vimentini içermektedir (Mescher ve ark., 2010).



Şekil 1.7. Hücrelerin şematik gösterimi. **A.** Mezenkimal hücrelerin gösterimi, **B.** Oval kondroblastlar, **C.** Kondroblastlar kondrosit oluşumu **d.** Lakünlerdeki kondrositler (Junqueira ve ark. , 1993).

Ekstraselüler matriks içinde sindirime uğrayan besin endositoz ile hücre içine alınır ve lizozimal vakuolde sindirimi tamamlanmış olmaktadır (Kato., 1988).

Hücre- hücreler arası madde ilişkisinde hücreler arası maddenin gen ifadesini uyaran ve fonksiyonlarını düzenleyen integrin gibi yüzey reseptörleri önemlidir. İntegrin ailesi; tip II ve VI kollajen, fibronektin, vibronektin ve osteopontindir, laminin olarak ifade edilmektedir (Guilak ve ark., 1999).

1. 6. Kıkırdak Dokusunun Gelişim Aşamaları

Kıkırdakta ekstraselüler matriksin sentezinde metakromotik matriks salgılayan kondroblastlar oldukça fazla görev almaktadır. İnterstisyel ve apozisyonel olmak üzere iki farklı çeşit gelişim devam etmektedir. Eğer kondrosit hücreleri mitoz bölünmeyle çoğalıyorsa interstisyel büyüme meydana gelmektedir. Ve interstisyel büyüme ergenlikten önce çocukluk döneminde gerçekleşmektedir. Kıkırdak gelişiminin ilk dönemlerinde matriks içten dışa doğru genişler ve interstisyel büyüme ortaya çıkar (Junqueira ve ark., 1993).

İkinci olarak ise aposizyonel büyüme tipi vardır. Bu büyüme tipinde ise perikondriumdaki hücreler farklılaşır ve ilerleyen yaş dönemlerinde ortaya çıkmaktadır. Fakat eklem kıkırdağında perikondrium bulunmadığı için apozisyonel büyüme de görülmediğinden dolayı hasar gören ve yıpranan matriks kıkırdağın iç tarafından temin edilmektedir (Junqueira ve ark., 1993). Kompleks bir şekilde gerçekleşen büyüme temel madde sentezi ve kollojen lifler ile olmaktadır (Sağlam., 2001).

1. 7. Kıkırdak Dokuda Ortaya Çıkan Rahatsızlıklar

Eklem bölgelerinde oluşan hasarlar bireylerin yaşam kalitesini zorlamaktadır. İlerleyen yaşla birlikte kıkırdak kendi kendini sınırlı ölçüde tamir etmektedir. Bu sırada önce bağ sonra kıkırdak doku oluşmaktadır (Reinholz ve ark., 2003). Hasarlı

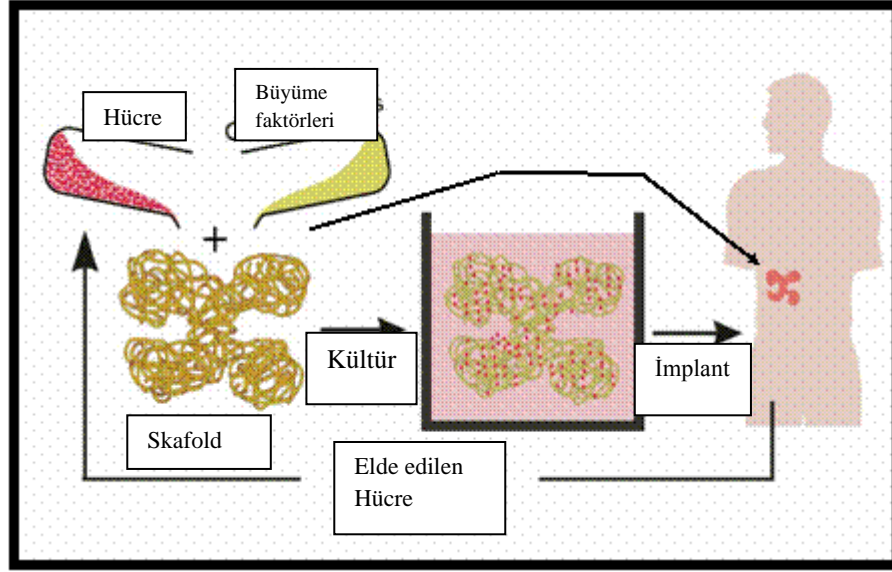
dokuyapısında perikondriyum bulunuyorsa önce kondroblastlar oraya gider ve bu sayede yenilenme meydana gelmektedir (Junqueira ve ark., 1993).

Kıkırdaktaki hasarlar arasındakireçlenme, eklem yıpranması(artroz), eklem iltihabı(arterit), menisküs yırtığıvs. yer almaktadır (Angel ve ark., 2003).

Meydana gelen hasarlar bazen travmatik sebepler bazende patalojik sebepler sonucu kaynaklanmaktadır. Oluşan hasarların tedavileri ortopedik ve ya estetiksel ameliyatlardan ziyade transplantasyon aşamaları da kullanılan yöntemler arasındadır (Angel ve ark., 2003).

1. 8. Doku Mühendisliği

Amerikan Ulusal Bilim Vakfı ile doku mühendisliği kavramı ilk defa 1988 'de söz konusu olmuştur. Vacanti ve Langer 1993'te doku mühendisliği alanındaki gelişmeleri değerlendirmişlerdir. Sonuç olarak ise doku ve organ işleyişlerini onamak ve tamir etmek amacı doğrultusunda kullanılmıştır (Chapekar., 2000).Doku mühendisliğinde temel prensip, bağışçılar ile alıcılar ile olan anlaşmazlıkların ortadan kaldırmaktır. Bu sayede, hücreler bir iskele üzerinde doğal bir doku oluşturmak üzere kültür edilir ve daha sonra hastaların kusur bölümüne oluşan dokular yerleştirilir. Bazı vakalarda, hücrelerle birlikte bir iskelet veya iskelecenli olarakdoğrudan implante edilir ve konakçının vücudu, yeni dokular oluşturmak için bir biyoreaktör olarak çalışmaktadır. Doku mühendisliğinde uygun iskeleler, yeni dokuların yerini almasını desteklemek için biyolojik olarak parçalanabilir ve biyolojik olarak emilebilir olmak durumundadır. Kullanılan iskeleler hastaya uygun yapıda olmak zorundadır (Akman., 2007).

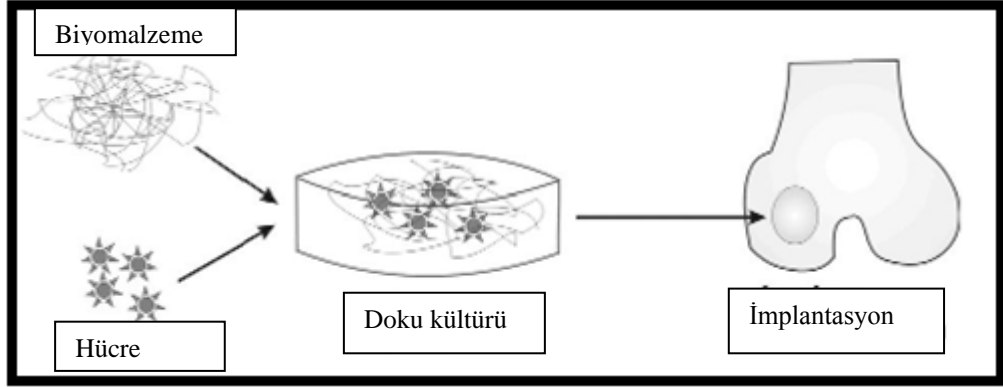


Şekil 1. 8. Doku mühendisliği yaklaşımı

(<http://www.turkcadcam.net/rapor/otoinsa/uyg-medikal.html>)

Ayrıca bu yaklaşım ile sentetik ve olmayan biyomalzemeler üzerine tohumlanan hücreler ile onarım şekli ifade edilmektedir (Spector., 2006).

İskele, büyüme faktörleri ve kullanılacak hücre doku mühendisliğini meydana getiren başlıca parametrelerdendir. İlk önce hücre kaynağı belirlenir ve uygun hücre alınarak çoğaltılması sağlanır. Ardından bu hücreler için kullanılacak olan uygun biyomalzeme üretimi gerçekleştirilir. Üretilen biyomalzeme *in vivo* olarak uygun bölgelere monte edilir.



Şekil 1.9. Hasarlı bölgeye yerleştirililen implant modeli (Şenköylü ve Korkusuz., 2004)

İmplantasyon yapıldıktan sonra hasar etrafındaki hücreler biyomalzemeye doğru, biyomalzemedeki hücreler ise dokuya ilerleyerek matrisi üretimini gerçekleştirmektedirler (Thomson ve ark., 1995).

Biyomalzemeler, büyüme faktörleri vs. nakledilebilir organ ve doku üretimi adına çok iyi olanaklar sağlamaktadırlar (Vacanti ve Vacanti., 1997).

1. 9. Kıkırdak Doku Mühendisliği ve Kullanılan Hücrelerin Üretimi

1977 yılında ilk kez Green tarafından ortaya sunulan kıkırdak doku mühendisliği hücrelerin hasarlı bölgeye gönderilmesi ve dokunun kendini yenileyebilme sorununu gidermeyi kapsayan biyoteknoloji alanıdır (Green., 1977). 1984 yılında ise Brittberg ve ark. klinikte uygulanan sonuçlarını bildiri halinde ortaya koymuşlardır (Brittberg ve ark., 1994).

Yaralanma aşamasından sonraki nekroz avasküler dokuda vasküler dokulardaki tamir ve inflamasyon sürecinin farklılıklarından dolayı meydana gelmektedir. Bu sebeple kıkırdak doku mühendisliğinde çeşitli yaklaşımlar söz konusudur. Büyüme faktörleri veya sitokinler kullanılır ve kondrojenik farklılaşma kontrol edilmesi adına, hücrelerin 3-boyutlu yapılarla desteklenmesi ve iyileşmesi

gerçekleşene kadar matriksin defekt bölgesinde kalması ifade edilmektedir. Konakçının immün sisteminin hücreleri reddetmesi önlenmek amacıyla immün sistemi baskılayıcı etkenler kullanılmalıdır (Stock ve Vacanti., 2001).

Çesitli büyüme faktörleri, kemik ve kıkırdak gelişimiyle doğru orantılıdır. Bu durumda kıkırdak aşamasındaki doku gelişimi durdurulamazsa kemikleşme söz konusu olmasını sağlamaktadır.

Doku mühendisliği ile son zamanlarda üretimi gerçekleştirilen kıkırdak doku, günümüzde geçerli olan tedavilere alternatif olarak geliştirilmektedir. Bu aşamada *in vitro* ortamda çoğaltılan kıkırdak hücresi transplantasyonu ilk alternatif, üç boyutlu kültür ortamında üretilen biyomalzeme olan polimer modelidir (Elçin., 2004).

1. 9. 1. Otolog Hücre

İlk defa hasarlı dokuların tamiri veya o alana nakli olan otolog hücre nakli çalışmaları 1968 yılında başlamış ancak yüzde kırk oranında seyretilmiştir. Sebebi ise ekstraselüler matriks üretimine kadar geçen süreçteki zorluklar olarak gösterilmektedir. 1987 yılında ise İsviçre’de kodrosit hücre izolasyon çalışmaları yapılmıştır. Çeşitli çalışmalar devam ettirilmektedir (Anonim, 1999).

1. 9. 2. Model Olarak Hücre-Polimer

Freed ve arkadaşları tarafından 1994 yılında hücre nakillerinde kullanılmak için aşırı gözenekliliğe sahip materyal kullanımı adına hücre-polimer modeli meydana getirilmiştir (Freed ve ark., 1994). Bu hücre polimer modeli doğal ve sentetik olan biyobozunur destek materyali ile gerçekleştirilmektedir (Elçin ve Elçin., 2006).

İnvitro ortamda elde edilen kondrositler için kendi matrikslerini üretebilecekleri polimer modeli yapıllı destek materyali son derece önemli olduğu bilinmektedir (Temenoff and Mikos., 2000).

Çalışmalarda iki boyutlu kültürde üç boyuta göre hücrelerin dediferansiye oldukları gözlemlenmiştir (Furukawave ark., 2003).

1. 10. Kıkırdak Doku Mühendisliği ve Polimerik Biyomalzemeler

Biyomalzemeler, biyouyumluluk, biyobozunurluk ve mekanik dayanıklılık özelliklerine sahipken öte yandan iskele-doku yaklaşımını sağlayacak ardından da hücrel etkileşimleri izeleyebilecek uygun şartlı sinyalleri oluşturabilmektedir (Segura., 2004). Şuanki koşullarda klinik yada deneysel olarak 4 farklı çeşit biyomalzemenin çalışılması söz konusudur.

Sentetik organik veya inorganik sırasıylapoliolen glikol, alifatik poliesterler, hidroksiapatit vs. şeklinde olmakla birlikte;dogal organik ve ya inorganik: sırasıyla kitosan, jelatin, hyaluronik asit, kollajen, mercan hidroksiapatiti vs.'dir.

Biyomalzemelerin vucut içerisine girmeden önce birtakım özellikleri bulundurmaları söz konusudur (Elçin ve Elçin., 2004).

- Mekanik Dayanım:Üretimi gerçekleştirilen polimerik biyomalzeme mekanik etkilerden etkilenmede doğal şartlar altında parçalanma gerçekleşmelidir.
- Biyobozunurluk:Elde edilecek biyomalzeme vucüda girdiğinde tahmini zaman aralığında doğal yollarla parçalanmaya uğramalıdır. Belirlenen bu zaman aralığında hücreler ihtiyaç duydukları ekstraselüler matrikslerini sentezleyebileceklerdir.
- Biyouyumluluk:Polimerik biyomalzeme vücuttayken hiçbir yan etkisi ters reaksiyon olmamalı ve uygun dokular için inert bir yapıya sahip olmaları gerekmektedir. Aynı zamanda parçalanma gerçekleşirken girdiği vucuda toksik etki yapmamalıdır.

- **Yüksek Gözeneklilik Yapısı:**Elde edilen polimerik yapıdaki biyomalzeme belirli hücrelerin o alana yerleşmesi ve tutunması adına gerekli olan gözenekliliğe sahip olmak durumundadır.
- **Uygun Yüzey:**Şöyle ki elde edilen kondrosit hücreler özelliklerini kaybetmemeleri için bir yüzeye tutunmak zorundadırlar. Bu nedenden ötürü hazırlanan polimerik yapının uygun özellikte olması temel şartlardandır. Yapısı böyle olan polimerlere 'biyopolimerler' denilmektedir.

Bir biyomateryal, vücudun herhangi bir dokusunu, organını veya fonksiyonunu değerlendirmek, tedavi etmek, arttırmak veya değiştirmek için biyolojik sistemler ile ara yüz oluşturmayı amaçlayan bir materyal olarak tanımlanabilmektedir. Biopolimerler biyomalzemelerin en başında gelmektedir. Bozulma özelliklerine göre, biyopolimerler biyolojik olarak parçalanabilir ve biyolojik olarak bozunmayan biopolimerler olarak sınıflandırılabilir. Biyolojik olarak üretilmiş ve sentetik biyolojik olarak bozunabilir biyopolimerler ortaya çıkmıştır (Tibbith ve ark., 2009). Polisakaritler ve protein tipik biyolojik biyopolimerlerken, alifatik poliesterler ve polifosfoester sentetik biopolimerlerdir. Biyolojik olarak bozunabilir polimerler kaynağa göre doğal veya sentetik polimerler olarak sınıflandırılabilir.

1. 10. 1. Sentetik Polimerler

Biyolojik olarak türetilen biyolojik olarak bozunabilir polimerlere kıyasla, sentetik biyolojik olarak parçalanabilir polimerlerin kimyasal olarak modifiye edilmiş ve işlevselleştirilmesi daha kolay olmaktadır. Sık sık kullanılan sentetik polimerlerin örnekleri arasında poli (etilen glikol), poli(N-isopropylacrylamide-ko-akrilik asit, poli (2-hidroksietil metakrilat), poli (laktit-co-etilen oksit-co-fumarat) ve kendi kendine toplanan peptidler bulunmaktadır(Tibbit ve ark., 2009). Sentetik biyopolimerler, biyomedikal uygulamalar için aşağıda sıralanan nedenlerle elverişli alternatifler haline gelmektedir;

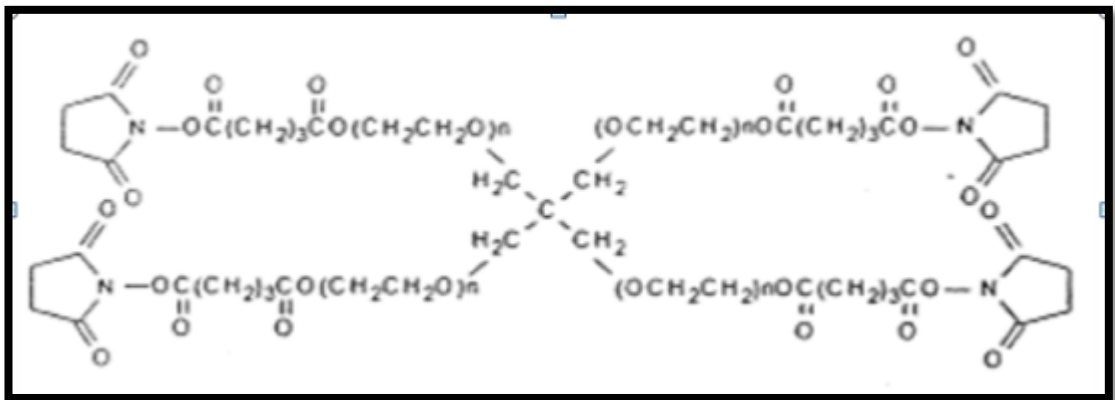
- Biyolojik olarak türetilen parçalanabilir polimerler daima biyouyumluluk göstermektedir.
- Biyolojik olarak parçalanabilir olan tüm polimerlere kimyasal değişiklikler yapmak oldukça zor bir kıstasdır.
- Eğer kimyasal değişiklik yapılırsa bu polimerin tüm özelliklerini değişmesine sebep olacaktır.

1. 10. 1. 1. 4S-PEG

Her bir kolun terminal hidroksil daha sonra bir glutaril-süksinimidil ester bağlı dört kollu polietilen glikol polimeri olan 4S-PEG hızla jelleşme özelliğine sahiptir.

PEGler, genel yapı HO'nun diolleridir. İki hidroksil uç grubu, metiloksil, karboksil, amin, tiyol, azid, vinil sülfon, asetilen veya akrilat gibi diğer işlevsel gruplarla türevlendirilebilir, simetrik veya asimetrik olurken, polieter omurgası oldukça kimyasal olarak inerttir (Stuart., 1999).

PEG, biyomedikal uygulamalar için en yaygın kullanılan malzemelerden biridir biyomalzemeler için tartışmasız standart haline gelmiştir.



Şekil 1. 10. 4S-PEG Moleküler Yapısı

1. 10. 1. 2. PHEMA

HEMA seçimi benzersiz şişme özelliğine ve iyi oksijen geçirgenliğine dayanmaktadır. PHEMA biyolojik olarak uyumlu özellikleri nedeniyle, küçük moleküller, yüksek geçirgenlik için kullanılmaktadır. Yüksek hidrofilitik ve kan proteinleri, kan hücrelerinin yapışmasına direnç sağlamaktadır. Mühendislik uygulamaları için oldukça uygundur.

1. 10. 2. Doğal Polimerler

Hücre proliferasyonu ve bünyelerinde bulundurmaya amacıyla doğal kaynaklı bozunabilir polimerler doku rejenerasyonunu desteklemek amacıyla kullanılmaktadır. Doğal polimerler, ekstraselüler matrikse benzeme özelliğiyle, toksisitesinin olmaması oldukça avantajlı olduğu bilinmektedir (Mano ve ark., 2007).

Umut verici araştırmalara tanıklık eden çeşitli doğal polimerler doku mühendisliği çalışmaları ve onarımı için son derece geniş bir alana sahiptir. Genellikle parçalanabilir doğal polimerlerden yapılmış kırıkta implantı, iskele üzerinde veya içinde farklılaşmayı ve çoğalmayı hızlandıran hücreler veya büyüme faktörleri için kullanılmaktadır. Fiziksel ve kimyasal değişimler implantların biyoaktivitesini, dayanıklılığı gibi belirli (hidrojen bağlama, elektrostatik etkileşimler, vb.) etkileşimleri rol model almaktadır. Ne yazık ki çoğu doğal polimer mekanik bakımdan zayıf olduğu için tüm klinin gereksinimleri karşılayamamaktadır.

Doğal polimerler protein-temelli ve karbohidrat-temelli olmak üzere sınıflandırılabilir. Kullanımı yaygın olan doğal polimerler kollajen, kollojen-GAG ile jelatin ve kollojen hiyaluronik asit olduğu bilinmektedir (Grande ve ark., 1997). Elastin, kollajen ve fibrin protein esaslı oldukları, hiyalüronik asit, dekstran, kitosan ve alginat polisakkarit bazlı oldukları bilinmektedir (Tibbitt., 2009).

1. 11. Kıkırdak Doku Onarımı İçin Proteinler

Aminoasitlerin peptit bağları ile bir araya gelmesi sonucu proteinler meydana gelmektedir. Yumuşak ve sert dokuların insan vücudundaki temel bileşeni olduğu bilindiğinden yakın geçmişte ve günümüzde protein temelli biyomalzemeler doku mühendisliği ve ilaç salım sistemleri uygulamaları adına araştırılmaktadır.

1. 11. 1. Kollajen

Kollajen, vücuttaki ekstraselüler matriksioluşturan proteinden eklem kıkırdağında, kuru ağırlığın% 90'ı çapraz bağlı lifler şeklinde olan II tipi kollajenden oluşur, diğer kollajen türlerinin oluşumuna yardımcı olurken kondrositlerle veya biyomoleküllerle temas halindedir. Ticari kollajen ağ veya sünger izole edilir ve enzimatik işleme ve tuz-asit ekstraksiyonu ile hayvan dokusundan arındırılmaktadır. Hem tip I hem de II kollajen iskeletleri kıkırdak doku oluşumunu kolaylaştırmaktadır. Bununla birlikte, tip I kollajen, kondrositlerin dediferansiyasyonunu indükleyebilme özelliğine sahip bir faktördür (Parenteau-Bareil ve ark., 2010).

Yamaoka ve arkadaşları (2006) yılındakollajen tip I hidrojel içine gömülmüş kondrositlerin fetal bovin serumla hızlı çoğaldığını ve bol miktarda kollajen II ve glikozaminoglikan (GAG) ürettiğini öne sürmüşlerdir (Yamaoka ve ark., 2006). Bir tavşan modelinde tip I kollajen hidrojellerine düzenli olarak verilmesi, kemik iliği kökenli mezenşimal kök hücrelerden kondrojenik farklılaşmayı göstermiştir (Rutherford ve ark., 2003). Sonuç olarak Hücre-kollajen etkileşimi matriks miktarını ve hücre çoğalmasını arttırdığı tespit edildi.

Doku mühendisliği için yüksek oranda gözenekli sünger iskeleleri, hem proteinler hem de polisakaritler için dondurarak kurutma olarak adlandırılan liyofilize yöntemiyle hazırlanmıştır (Lee ve ark., 2008).

Luve arkadaşları (2010) yılında şablon partikülleri olmayan dondurularak kurutulan kollajen süngerinin homojen kıkırdak oluşumunu desteklemediğini bildirmişlerdir (Lu ve ark., 2010).

Kollajen, aldehitler, karbodiimidler ve izosiyanatlar gibi geleneksel çapraz bağlayıcılarla birlikte bunun yanında genipin ve transglutaminaz gibi daha az zehirli doğal çapraz bağlayıcılarla kimyasal olarak çapraz bağlanabilmektedirler.

1. 11. 2. Jelatin

Jelatin, genellikle hayvan kaynaklı kollajen için bir endişe yaratan çok daha düşük antijenik özellik göstermektedir. Saf jelatin, mekanik dayanıklılığının zayıf olduğundan kıkırdak doku mühendisliği için iskele olarak kısmen de olsa kullanılmaktadır.

Yapılan literatür çalışmalarında *in vitro* uygulamalarda genipin ile çapraz bağlanmış jelatin hidrojellerde kondrositlerin jelatin üzerine ekimi ve kültürü glutaraldehitte çapraz bağlı hidrojellerden daha iyi olduğunu gösterilmiştir. Aynı zamanda kollajen ve glikozaminoglikan için hücre ekiminden yaklaşık dokuz gün sonra kondrojenez tespit edilmiştir (Lien ve ark., 2008). Jelatinli iskelelerde gözenek boyutu ve gözenekli yapılar, hücre yapışması, farklılaşması ve büyümesi için önemlidir (Lien ve ark., 2009).

1. 11. 3. Fibrin

İpek kozaları, örümcek ağları, ipek proteinlerinin fibrillerine dayanan doğal bileşikleridir. Globüler proteinlere nispeten, ipek proteinleri ve kollajenler, mükemmel mekanik özelliklere sahip lifli proteinlerdir. İnsanlar ipek kurtçukları yetiştirmiş ve ipeklerini tekstil ve kağıt olarak binlerce yıldır kullanmıştır (Hardy ve Scheibel., 2010). Doku mühendisliğinde ipek esaslı yara pansuman ve iskeleleri oldukça fazla yayılım göstermişlerdir (Altman ve ark., 2003). Fibrin proteinleri

ağırlıklı olarak antiparalel β -yaprakta glisin, amino asitlerle serinden oluşmaktadır (Kim ve ark., 2005). Mükemmel mekanik özellik, kıkırdak doku mühendisliği için biyolojik uyumluluk ve biyolojik çözünebilirlik iskeleler adı altında oldukça iyi kullanılmaktadır (Wang ve ark., 2005).

1. 11. 4. Elastin

Bağ dokusu bileşeni olan Elastin, vücudun neredeyse her organında bulunur.

1. 12. Polisakkaritler

Polisakkarit temelli polimerler arasında Nişasta, hiyaluronik asit, aljinat, kitosan yer almaktadır.

1. 12. 1. Kitosan

Kitosan, selülozdan sonraki doğadaki en bol biyopolimer olan ve kabukluların kabuklarında ve mantar duvarlarında bulunan, deasetillenmiş bir kitin türü. (1-4) bağlı 2-asetamit-2-deoksi-bD-glikopiranoz ve 2-amino-2-deoksi-bD-glikopiranoz kalıntılarından oluşan bir ikili heteropolisakkarittir (Feng ve ark., 2009).

Kitosan, moleküler ağırlık ve deasetilasyon derecesine bağlı olarak çeşitli fiziko-kimyasal ve biyolojik özellikler sergilemektedir. Asetilasyon derecesi, toplam birim sayısına göre N-asetil-D-glukozamin birimlerinin oranını temsil eder ve kitin ve kitosan arasında ayırım yapabilmek için kullanılabilir. Kitosan molekül ağırlığı 10, 000 ile 2 milyon Dalton arasında değişebilir. Polimerin asidik ortamda çözülmesinden sonra, amino grupları protonlanmış hale gelir ve molekülü pozitif yüklü hale getirir (Senel ve MsClue., 2004). Kitosanın katyonik yapısı nedeniyle,

anyonik glikozaminoglikanlar, proteoglikanlar ve diğerk negatif yüklü moleküller ile etkileşime girer. Çok sayıda sitokin ve büyüme faktörü glikozaminoglikanlarla bağlantılı olduğu için, kitosanglizosaminoglikanlar kompleksi içeren bir iskeletin büyüme faktörlerini daha etkin bir Şekilde taşıması beklenir (Muzzarelli., 2009).

1. 13. İskeleler

Doğal ve sentetik polimerlerin yanı sıra hidrojeller ve biyomimetik polimerler de biyopolimerler arasında yer almaktadır. Ayrıca hidrojellerin yanı sıra süngerler ve ağsı fibröz yapılar da kullanılan iskele tiplerindedir.

1. 13. 1. Hidrojeller

Çok yüksek derecede su tutabilen çapraz bağlanmış polimerlerin tümüne hidrojel adı verilmektedir. Polimerik hidrojeller (% 60-90 su ile çapraz bağlanmış polimer ağları), kıkırdak doku mühendisliği için iskele olarak mkemmek adaylar haline gelmiştir (Melrose ve ark. , 2008; Balakrishnan ve Banerjee., 2011). Yumuşak madde olarak bilinen polimer hidrojelleri, kimyasal yapı, bileşim, organizasyon, biyolojik işlevsellikleri, parçalanabilirlik ve mekanik özellikler, sürtünme ve yağlama da dahil olmak üzere hidrojel greftlerin performanslarını optimize etmek için birkaç kritik özelliğin aynı anda ince manipüle edilmesini sağlamaktadır (Gong., 2006).

Kıkırdak doku mühendisliği ve onarımı için proteinler (kollajen, jelatin, fibroin ve fibrin) ve polisakaritler (kitosan, hiyalüronik asit, aljinat ve agaroz vb.) dahil olmak üzere birçok bozunabilir doğal polimer hidrojeli bulunmaktadır.

1. 14. İskele Hazırlama Yöntemleri

1. 14. 1. Elektroğirme

Elektrospinning, eğirme işlemini yürütmek ve çözeltilerden polimer lifleri üretmek için tek başına elektriksel kuvveti kullanan bir tekniktir. Geleneksel mikrometre çapında lif üreten diğer tekniklerin aksine elektrospinning nanometreçapına sahip lifler üretmektedir(Li ve ark. , 2009; Su ve ark. , 2009).

1. 14. 2. Lif(Fiber) Bağlama

İskele malzemeleri olarak kullanılan lifler geniş yüzey ve hacim alanı sağladığı için tercih edilmektedir. Mikos ve ark. 1996 yılında rejenere bağırsak, kan damarları ve üreterler için boru şekilli iskele hazırlamak amacıyla alternatif bir fiber bağlama yöntemi geliştirilmişlerdir. Bu teknikte, dokunmamış bir PGA ağsı yapısı dönen bir teflon silindire bağlanmaktadır. İskele plakaları PLLA veya PLGA solüsyonlarıyla püskürtülür ve PGA liflerinin çapraz noktalarını birbirine bağlayan ince bir tabaka oluşturulmaktadır. Kısacası PGA lifleri kürek şeklinde hizalanarak bir PLLA, Metilen klorür çözeltisi ile çözdürülmeye bırakılmaktadır. Çözücünün buharlaştırılmasından sonra, PLLA-PGA kompozit her iki polimerin erime sıcaklığının üzerinde ısıtılır. Poli (L-laktik asit) soğumadan sonra seçici çözüme ile uzaklaştırılır ve PGA liflerinin çapraz noktalarında fiziksel olarak birleşme gerçekleşerek ilk çaplarını doruduğu görülmektedir (Lu ve ark., 1996).

1.4. 3. Gazla köpüklenme

Harris ve ark. 1998 yılında organik solventlerin ve yüksek sıcaklıkların kullanılmasını önleyen yüksek basınçlı bir gaz tekniği kullanarak poli (laktik-koglikolik asit) (PLGA) içerisinden yüksek oranda gözenekli matrislerin imalatı için bir teknik anlatmışlardır. Polimer örnekleri 48 saat boyunca yüksek basınçlı CO₂ gazına maruz bırakılmıştır. Daha sonra gaz basıncını ortam basıncına indirgeyerek bir termodinamik istikrarsızlık oluşturulmuştur. Böylece polimer içindeki CO₂ miktarının gözeneklerinin çekirdeklenmesine ve büyümesine yol açtığını gözlemlemişlerdir. CO₂ ortamdaki uzaklaştırıldığında gözenek boyutunun değiştiği kanısına ulaşılmıştır (Harris ve ark., 1998).

Bunların yanı sıra dondurarak kurutma (liyofilizasyon), faz ayrımı ve çözücü taneciği uzaklaştırılması yöntemleri de kullanılan iskele hazırlama yöntemleri arasındadır.

1. 15. Biyometik Polimerler

Doğal dokuların benzeri ve ya taklidi olarak ifade edilen polimerlere biyometik polimerler adı verilmektedir (Furukawa ve ark., 2003). Biyometik polimerler doğal dokuları taklit ederler, sinyal proteinleri polimerle özdeşleştirirler, bağlanmayı kolaylaştırıp biyomolekülleri tanımlamayı kolaylaştırmaktadırlar. Biyometik olarak trikalsiyum fosfat ve hidroksiapatit iskeleleri örnek olarak verilebilir (Chang ve ark., 2004; Wang ve ark., 2008).

1. 16. Kıkırdak Doku Mühendisliğindeki Hücreler

Kıkırdak doku mühendisliğinde kondrosit, kök hücre ve fibroblastların özellikleri araştırılarak kullanılma çalışmaları sürdürülmüştür. Ancak en çok kullanılan ve ilk akla gelen hücreler kondroblast ve kondrositlerdir. Fakat bazen kısmen çoğaldıkları için farklılaşma evresinde sorunlar ortaya çıkarabilmektedir. Bu

nedenle iki boyutlu kültür ortamında kondrositler bir gerileme yaşayarak karakteristik morfolojilerini yok edip fibröz yapılara dönüşebilmektedir (Giannoni ve Cancedda., 2006). Bunun yanında kondrositlerdeki kısmi çoğalmadan dolayı fibroblast ve kök hücreler kullanıma uygun hale gelmiştir (Kessler ve Grande., 2008; French., 2004).

Kıkırdak doku mühendisliğinde kullanılacak hücrelerin aşırı bölünme kabiliyetinin olmasının gerektiği bilinmektedir. Beyin, göbek kordonu kemik iliği vs. 'den elde edilebilen kök hücrelerde farklılaşmamış aşırı bölünebilen hücrelerdir. Kök hücreler embriyonik ve yetişkin olarak ayrılır ve embriyonikler ilgili organdaki hücrelere, yetişkinler ise çok fazla hücreye dönüşmektedirler. En önemlisi de kondrosit, adiposit, osteosit gibi hücrelere dönüşebilmesidir (Zuk., 2001). Kıkırdak hasarında kök hücrelerde elde edilen dokularperiostum (Fukumoto., 2003), sinovyum ve kas (Sakaguchi., 2005; Adachi., 2002) söz konusudur.

1. 17. Doku Hücre Kültürü

Hücrelerin çoğalmaları ve fenotiplerinin devamlılığı için iki önemli kültür tekniği vardır. Bunlar; Statik (Petride) ve Dinamik (biyoreaktörlerde) kültür teknikleridir.

1. 17. 1. Statik Teknik

Kollogenaz ile enzimatik ayrışım gerçekleştirilen kıkırdak doku fetal bovin serum, besiyeri ve antibiyotik bulunan ortamla birlikte vücut sıcaklığına yakın derecede olan inkübatörlerde inkübasyona bırakılmaktadır. Böylece besin maddeleri ortama verilerek atıklar uzaklaştırılmaktadır (Şenköylü., 2001).

1. 17. 2. Dinamik Teknik:

Üç boyutlu kültür ortamlarında gerçekleştirilen tekniktir. (Emin ve ark., 2004). Oksijen ve besin difüzyonu biyoreaktör yardımıyla sağlanabilmektedir. Spinner flask, mikrotarıyıcı-destekli reaktörler, perfüzyon kültür sistemi ve dönerduvarlı biyoreaktörler dinamik kültür reaktörleri için örneklendirilebilmektedir (Darlig ve Athanasiou., 2003). Dinamik kültür; Üç boyutlu ortamı desteklerken matriks salınımını hızlandırmaktadır. Ayrıca besin maddelerinin alınımı verilimi oldukça kolay gerçekleşmektedir (Vunjak ve ark., 1999).

1. 18. Büyüme Faktörleri

Farklılaşma ve metabolik aktivitede önemli yeri olan büyüme faktörlerinden ilk olan somatemedinlerdir. İnsülin benzeri bu büyüme faktörü metabolik aktiviteyi hızlandırdığı belirlenmiştir. aynı zamanda farklılaşmayıda artırdığı bilinmektedir. Diğer bir büyüme faktörü olan (FGF), kondrosit faktörü (CGF), kırıkta çıkarılan faktör(CDGF)'ü kırıkta uyarma görevini üstlenmektedir. Proteoglikanları uyararak onların parçalanmasını sağlayan TGF-beta1 dönüştürme büyüme faktörü kırıkta en fazla bulunanıdır (Doral ve ark., 2007).

2. MATERYAL VE METOD

2. 1. Materyal

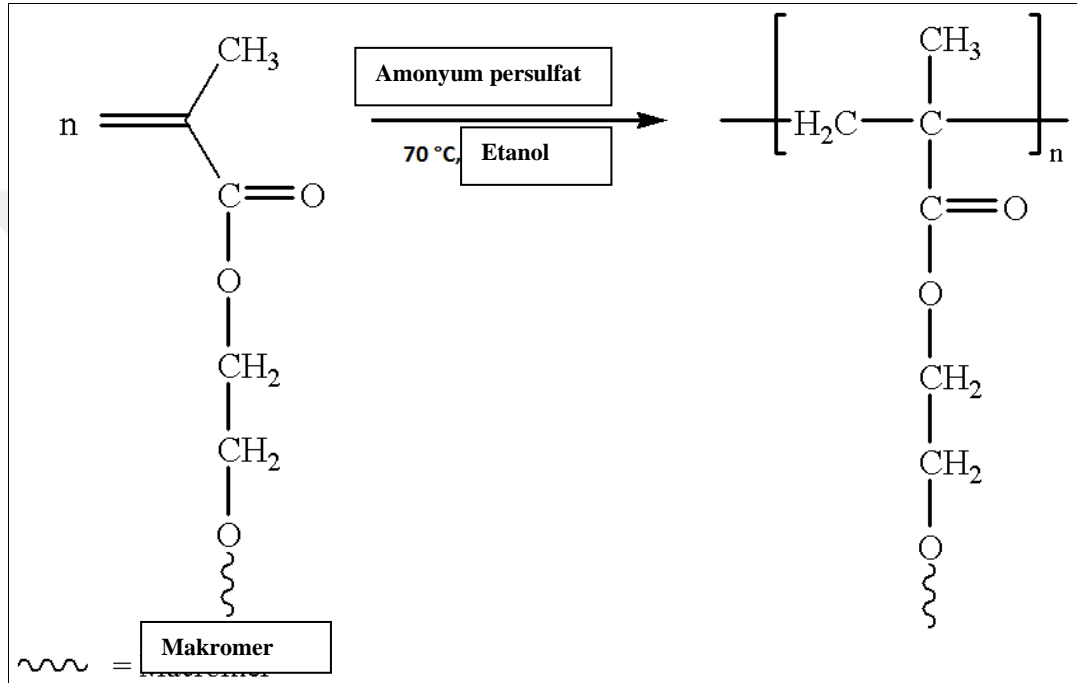
RPMI 1640 (Biological Industries, 1627513), MSC Attachment Solution Xeno Free (Biological Industries, 1629575), N-(3-Dimethylaminopropyl)-N-ethylcarbodiimide hydrochloride (Sigma Aldrich, 040M17411V), Trypsin EDTA Solution c (Biological Industries, 1646917), Foetal Bovine Serum(Biological Industries, 1624434), Pen-Strep Solution (Biological Industries, , 1703092), N-Hydroxysuccinimide(Aldrich, MKBG7914V), Histostain Plus Broad Spectrum(Invitrogen, 16666262A), 4arm PEG (Jenkem Technology, ZZ243P102), High pure RNA Isolation kit (Roche, 11828665001), DNA Isolation kit(SNPure Genomic 1504/001), aceticacid(Sigma aldrich, SZBC1160V), Ammonium peroxodisulfate (Merck, K42478301), L-Phenilalanine(sigma aldrich, MKBT4681V), L-Cystein(sigma aldrich, STBF6660V), L-Histidine(sigma aldrich, MKBQ7783V), L-Asparticacid(sigma aldrich, BCBN7700V), 2-Hydroxyethyl methacrylate(aldrich, STBF6205V), Annexin V-FTIC Apoptosis detection kit(Enzo, 01071616), Calcium chloride-2-hydrate(Reidel-de Haen, 12022), Sodium dihydrogen phosphate dihydrate(Merck), EDTA(Amresco, 1340C449), Di-sodium hyrrogen phospate(Merck), Alamar blue(invitrogen).

2. 2. Metod

2. 2. 1. HEMA'nın Polimerizasyonu ve Karakterizasyonu

Yaptığımız çalışmada ilk olarak monomer formunda olan HEMA'nın ısı polimerizasyon işlemidir. Bunun için polimerizasyon başlatıcı olarak 0, 12 gr Amonyum persülfat (APS) tartılıp balonjojenin içerisine konuldu. Üzerine % 66'lık, 90 ml etanol çözeltisi (suda) eklendi. Manyetik karıştırıcıda iyice çözünmesi beklendi. Çözünmenin ardından 12 ml HEMA karışıma ilave edildi. Balonjoje, daha önceden 70 °C 'ye kadar ısıtılmış su banyosunun içine yerleştirilerek geri soğutucu

yardımla polimerizasyon işlemi başlatıldı Chuang ve Chiu, 2012).Üç saat sonra polimerizasyon tamamlanmış oldu ve elde edilen polimer yaklaşık 2 L distile su içine aktarılarak çöktürüldü (Şekil 2.1). Elde edilen katı polimer il önce -20°C 'de 1 saat bekletildi ve daha sonra tamamen kurutmak amacıyla liyofilizatörde 6, 11 bar ve -60 °C 'de liyofilize edildi.



Şekil 2.1. HEMA (Hidroksietil metakrilat)'ın ısıl polimerizasyonu

Elektroegirme işlemi için içerisinde aminoasit bulunan PHEMA çözeltisi hazırlandı. Bunun için ilk önce 0, 1'er mg Aspartik asit, Fenilalanin ve L-Histidin tartılıp 10 ml ultra saf suda çözdürüldü. Çözeltinin üzerine 7 ml daha ultra saf su eklendi. Bu karışımın üzerine 33 ml saf etanol eklendi. Böylece 50 ml %66'lık etanol (suda)'de aminoasitlerin çözeltisi elde edilmiş olur. Liyofilize edilerek kurutulmuş ve havanda dövülerek toz haline getirilmiş olan PHEMA'dan 1, 75 gr tartılıp beherdeki çözeltiye eklendi. Üzerine hazırlanmış olduğumuz %66'lık aminoasitli etanolden ve formik asitten 1:1 oranında 5ml olacak şekilde eklendi (Huanga ve ark. , 2003).Bir saat sonra aminoasitli PHEMA çözeltisi elektrospining yapılmak üzere hazır hale

getirildi. Oluşan çözelti elektrospining sistemindeki şırınga pompasına aktarıldı. Alüminyum levhaya 15 cm mesafede ve akış hızı 10 µl/dk olacak şekilde 25 kV da elektrospining gerçekleştirildi.

2.2.2. PHEMA Nanofiberinin Kitosan Polimeri İle Kaplanması ve 4S-PEG ile Çapraz Bağlanması

Elektrospining ile elde edilen PHEMA nanofiberinin üzeri kitosan polimeri ile kaplandı ve 4S-PEG ile çapraz bağlama reaksiyonu gerçekleştirildi. Kısaca, kitosan polimeri (Düşük moleküler ağırlıklı, Sigma-aldrich EC222-311-2) 0, 15 g tartılıp % 50 glasiyal asetik asit çözeltisinde (distile suda) çözdürüldü. Ardından alüminyum folyo üzerinde spinlenmiş olarak bulunan pHEMA nanofiberin üzerine 10 µl/dk akış hızı, 15 cm mesafe ve 25 kV'da kitosan polimeri elektrospinleme yapıldı. Daha sonra elektroğirme yöntemi ile 15 cm mesafede ve akış hızı 10 µl/dk olacak şekilde 25 kV da elde edilen kitosan ile kaplanmış PHEMA nanofiberi toplamda 1mM konsantrasyonda hazırlanan 4S-PEG (4arm PEG Succinimidyl Glutaramide, MW 10000) çözeltisi içerisinde çapraz bağlanmak üzere 24 saat 37°C'de bekletildi. Ardından çalkalamalı su banyosunda bir gece boyunca PHEMA nanofiberi yıkamaya bırakıldı. Yıkama işleminin ardından nanofiberlerin kurutma ve laminar flow kabinde UV ışını altında sterilizasyon işlemi her iki yüz için 1'er saat olacak şekilde gerçekleştirildi.

2.2.3. Antikor İmmobilizasyonu

Antikor immobilizasyonu için, öncelikle PBS (Phosphate Buffer Saline) buffer kullanıldı. PBS(Phosphate Buffer Saline)buffer, aşağıda belirtilen şekilde hazırlanır:

Bir beherde 10 mM, 50 ml (distile suda) Na₂HPO₄ ile 0, 15 M, 50 ml (distile suda) KCl hazırlanıp manyetik karıştırıcı yardımıyla karıştırıldı. Başka bir beherde 10 mM 50 ml (distile suda) NaH₂PO₄ ile 0, 15 M, 50 ml (distile suda) KCl hazırlanıp

karıştırıldı. Son olarak, bu iki çözelti birbirine eklenip manyetik karıştırıcı yardımıyla iyice homojen hale gelmeleri beklendi.

PBS Buffer hazırlandıktan sonra, 10 mM PBS Buffer içinde 5 mM NHS (N-hidroksisüksinimid) ve 2 mM EDAC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidroklorid) karıştırıldı. Bu karışımın pH' ı 5, 5'a ayarlandı. Bu şekilde antikor immobilizasyonu için gerekli solüsyon (EDAC/NHS solüsyonu) hazırlanmış olur. (Sandhna ve ark. , 2010).

Ardından EDAC/NHS solüsyonundan 5 ml alınarak 0, 2 µm'lik filtreden geçirilerek steril edildi ve bu 5 ml steril solüsyonun üzerine 100 µl CD44(LifeSpan BioSciences, Inc., LS-C13435-100)antikordan ilave edildi. Karışım çalkalayıcı etüvde, oda sıcaklığında 35 rpm'de, 30 dk inkübe edildi.

Ardından nanofiberler üzerine antikor eklenmesi yapılmadan önce aminoasitlerin çözünmesi için gereken asidik tampon hazırlanır. Bunun tampon 0, 23 M NaCH₃COO. 3H₂O (sodyum asetat trihidrat), 50 ml distile suda hazırlandı. Üzerine 2 M asetik asitten 0, 144 ml eklendi. Son olarak, karışımın toplam hacmi distile su ile 200 ml'ye tamamlandı. Bu şekilde tampon hazırlanmış oldu. Bu tampona 200'er mg fenilalanin, aspartikasit, L-Histidin ve Sistein eklendi. Tampondaki aminoasitlerin manyetik karıştırıcıda iyice çözünmesi beklendi.

2.2.4. 4S-PEG ile Çapraz Bağlı PHEMA-Kitosan Nanofiberi Üzerine

Antikor/aminoasit Eklenmesi

Öncelikle elde edilen PHEMA nanofiberleri 10x10 mm boyutlarında olacak şekilde bistüri ile kesilerek 12 kuyucuklu kültür plağının kuyucuğuklarına yerleştirildi ve UV altında 1'er saat olacak şekilde her iki yüzeyi de steril hale getirildi. Hazırlanan EDAC/NHS solüsyonundan alınan 5ml içine 100µl CD44 antikor eklenildi. Üç seri halinde bu işlem yapıldı. Daha sonra kültür plağı flow kabin içerisine alındı ve EDAC/NHS solüsyonundan 1'er ml alınıp kuyucuklardaki nanofiberlerin üzerlerine eklendi. İki saat boyunca kültür plağı çalkalayıcı etüvde, tekrar oda sıcaklığında 35 rpm'de, inkübe edildi. Süre sonunda EDAC/NHS solüsyonu pipet yardımıyla ortamdaki atıldı. Ardından nanofiberler üzerine

aminoasitlerin bulunduğu asidik tampondan 100'er µl eklendi. 2 saat, etüvde inkübe edildi. 2 saat sonra tüm kuyucuklardaki sıvılar pipetle atıldı. Böylelikle nanofiberler kondrosit ekimi için hazır hale getirilmiş oldu.

2. 2. 5. Hücre Kültürü

2. 2. 5. 1. Primer Kondrosit Kültürü

Aseptik şartlarda tavşandan kırkırdak doku alındı. Daha sonra alınan doku bistüri yardımıyla çok küçük parçalara ayrıldı. Ardından dokular 15ml'lik falkon tüp içerisinde 1mg/ml olacak şekilde hazırlanan kollejenaz tip II enzimi ile muamele edildi. 37°C 'de CO₂ 'li etüvde 24 saat inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün dokular 1200 rpm'de 10 dk santrifüj edildi ve süpernatant atıldı. Dokudan ayrılan ve izole edilen hücrelerden elde edilen pellet kısmına %1 antibiyotik(Penicillin-streptomycin), %20 FBS (Fötal Bovin Serum) ve %79 RPMI 1640 içeren hazır besiyeri ilave edilerek 25cm² kültür flasklarına ekim yapıldı. Haftada iki kez besiyeri değişimi yapılarak elde edilen hücrelerin çoğalması gözlemlendi. Yaklaşık 4 haftada flask yüzeyini tamamen kapladığı ve çoğaldığı görülen hücreler, flask içerisindeki vasat besiyeri atılarak 1x PBS ile yıkandı ve ardından Tripsin-EDTA enzimi eklenerek 37°C'de CO₂ 'li etüvde 4 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından flask yüzeyinde tutunmuş halde olan hücrelerin yüzer durumda olduğu ışık mikroskopunda bakılarak gözlemlendi. Daha sonra yüzer halde olan tripsin-hücre süspansiyonuna hazır RPMI 1640 hazır besiyerinden eklenerek 2500 rpm'de 2dk santirüj yapıldı. Süpernatant atılarak pellet kısmına bölünecek flask sayısı belirlenerek hazır besiyeri eklendi ve böylece hücrelerin daha fazla çoğalmaları için yapılan pasaj işlemi gerçekleştirildi.

2.2.6. Kondrositlerin Flow Sitometri ile Ayrılması

Kondrositlerin Üzerine yıkama amaçlı olarak 2 ml PBS (Phosphate Buffer Saline) konuldu. Birkaç saniye sonra (PBS flask yüzeyiyle yeterli süre temas ettikten sonra) PBS de pipetle çekilip alındı. Flask içindeki kondrositlere 1 ml Tripsin EDTA eklendi ve 4 dakika boyu 37 °C, %5 CO₂ li etüvde inkübe edildi. 4 dakika sonra 2 ml besiyeri flaska eklendi ve karışımın tamamı santrifüj tüpüne aktarıldı. Tripsin EDTA'nın etkisiyle yüzeyden kalkan hücreler 2500 rpm de 2 dakika süreyle santrifüj edildi. Santrifüjün ardından süpernatant atıldı. Üzerine 1 ml RPMI 1640 hazır besiyeri eklendi. Pipetleme ile hücrenin iyice homojen olması sağlandı. Ardından hücrenin bulunduğu süspansiyondan ve Trypan blue (Sigma Aldrich) solüsyonundan 10⁷ ar µl alınarak ependorf tüpe aktarıldı. Tekrar pipetleme yapıldıktan sonra karışımdan pipetle 10 µl çekilip sayma lamına konuldu. Cell Counter cihazında hücre sayma işlemi gerçekleştirildi. Canlı hücre konsantrasyonu 1,6x10⁶ hücre/ml olarak tespit edildi. Sayma işlemi bittikten sonra hücre bulunan tüpe tekrar 2 ml besiyeri hazır besiyeri eklenerek tekrar 2500 rpm de 2 dakika santrifüj yapıldı. Yıkama işlemi için 3'er ml 1x PBS(Phosphate buffer saline) eklenerek 2 kez 2500 rpm de 2 dk santrifüj yapıldı. Santrifüjün ardından süpernatant atıldı ve kalan pellete hafifçe vuruldu.

Primer antikor olarak kondrosit yüzey reseptörü olan CD44 (LifeSpan BioSciences, Inc. , LS-C13435-100) ve sekonder antikor olarak ise goat anti rabbit (Thermo Fisher Scientific, A-11008, Alexa flour 488 nm), flow sitometri için kullanıma hazırlandı. Sırasıyla 40 µl ve 20µl antikor eklendi. Önce CD44 sonra da Goat anti rabbit sekonder antikor, dağılmış hücre pelletine eklendi ve 20'şer dakika, oda sıcaklığında, karanlıkta inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda tüpe 1,5 ml lizing solüsyonu eklendi ve tekrar 20 dakika, oda sıcaklığında, karanlıkta inkübe edildi. 20 dakikanın sonunda flow sitometri (BD FacsAria II) cihazında 488 nm (Alexa flour için)' de okuma yapıldı.

2.2.7. Hücrelerin Elektrosinleme Yöntemi İle Üretilmiş 4S-PEG ile çapraz bağlı Phema-Kitosan Nanofiberler Üzerinde Kültürü

Yaptığımız çalışmamızın bu aşamasında; elektrosinleme ile elde edilen 4S-PEG ile çapraz bağlı PHEMA nanofiberleri üzerine primer kondrosit hücre kültürü yapıldı ve elde edilen bu nanofiberlerin kıkırdak doku mühendisliği uygulamaları için uygun olup olmadığı araştırıldı.

İlk olarak kondrosit ekimi için flask içerisindeki vasat besiyeri atılarak 1X PBS ile yıkandı ve ardından tripsin-EDTA ile muamele edilerek flask yüzeyinden kaldırılan hücreler, 2500 rpm'de 2 dk santrifüj edildi. Sonra süpernatant atılarak 1 ml hazır besiyeri (RPMI 1640) içerisinde hücre sayım cihazı ile hücre sayımı yapıldı. Sayım sonucunda hücre konsantrasyonunun 2. 000. 000 hücre/ml olduğu görülmüştür. Süspanse haldeki hücreli besiyerinden her bir kuyucuktaki nanofiber için 150. 000 hücre/ml olacak şekilde hesaplanarak pipet ile alındı ve üzerine 1ml hazır RPMI besiyeri eklenerek tekrar 2500 rpm 'de 2 dk santrifüj yapıldı. Ancak hücre ekiminden önce UV altında steril edilen nanofiberlere hücre yapıştırma medyumundan 200'er µl ilave edilerek 30 dk CO₂'li etüvde inkübasyona bırakıldı. Ardından santrifüj edilen hücrelerden süpernatant atıldıktan sonra hücre pelletinin üzerine 600 µl FBS (Fötal Bovin Serum) eklendi. Kültür plağındaki nanofiberlerin her birinin üzerine 50'şer µl serum-hücre karışımından eklendi. Kültür plağı iki saat boyunca 37 °C de inkübe edildi. İki saat sonunda hücre ekilmiş olan her bir nanofiberin üzerine 250 'şer µl hazır besiyeri eklendi. Kondrosit ekili nanofiberler SEM ile görüntülenmek için hazırlandı.

2. 2. 8. 4S-PEG ile çapraz bağlı Phema-Kitosan Nanofiberler kültüre edilmiş kondrositlerin taramalı elektron mikroskop (SEM)incelemesi

Aminoasitli-antikorlu nanofiberler üzerine ekilmiş olan kondrositler rutin taramalı elektron mikroskop için hazırlandı. Örnekler altına kaplama yapılarak taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile kondrositlerin nanofiber yüzeyine tutunup tutunmadıkları ve genel morfolojik yapıları incelendi. Taramalı Elektron Mikroskopta farklı büyütme oranlarında nanofiberlerin yüzeyi ve genel olarak morfolojisik

yapıları incelendi ve karar verilmiş olan büyütmede nanofiber yüzeyine tutunmuş olan hücreler görüntülendi.

2. 2. 9. Glikozaminoglikan Miktarının Ölçümü (GAG Tayini)

Glikozaminoglikan ölçümü için 12 kuyucuklu kültür plağına 5. , 10 ve 15 . günler için 4S-PEG çapraz bağlı pHEMA-kitosan nanofiber üzerine kondrosit ekimi yapıldı. Kültür plağında bulunan nanofiberlerdeki hücrelere, ilk önce soğuk PBS (1x)'te 2 kez yıkama yapıldı. Daha sonra (30µl EDTA+ 30µl sodyum odhavanodat+ 30µl PMSF+ 45µl Proteaz İnhibitör Kokteyl+3ml RIPA Lizis Buffer) stok solüsyonundan her bir kuyucuğa 750 µl lizis solüsyonu eklendi ve hücre kazıma aparatıyla hücreler kazıma işlemi yapılarak nanofiber ile birlikte herbir gün için ayrı ayrı 15ml'lik falkon tüpe konuldu. 10 dk çalkalamalı etüvde soğuk ortamda çalkalama işlemi gerçekleştirildi. Ardından falkon tüpler 30 dk sonikatör (130 watt, 20 kHz) işlemine tabii tutularak parçalama işlemi gerçekleştirildi. Falkon tüpteki karışım 2 ml'lik ependorf tüpe alındı ve 15. 000 rpm'de 20 dk santrifüj yapıldı. Santrifüjden sonra süpernatant kısmı alınarak GAG ölçümü aşağıdaki şekilde gerçekleştirildi:

Çizelge 2. 1. GAG tayini için belirlenen standart oranlar

STANDART(µg/ml)	ÖRNEK(µg/ml)	PBE(ml)
0. 00 µg/ml	0. 0 µl	50. 0µl
1. 25µg/ml	2. 5µl	47. 5µl
2. 50 µg/ml	5. 0µl	45. 0µl
5. 00 µg/ml	10. 0µl	40. 0 µl
7. 50 µg/ml	15. 0µl	35. 0 µl
10. 00 µg/ml	20. 0µl	30. 0 µl

- Her gün için 2'şer tekrarlı ölçüm yapılmak üzere 48 kuyucuklu kültür plağına 200' er µl dimetil metilen mavisi (DMMB) eklendi.
- Ardından örnek ve kondroitin sülfatı seyrelmek için PBE buffer (100 mM Na₂HPO₄+5 mM EDTA, 1x) 50µl'ye tamamlanacak şekilde eklendi. Standartlarda da örnek miktarı kadar kondroitin sülfat ve üzeri 50µl'ye tamamlanacak şekilde PBE eklenerek hazırlandı.
- Glikozaminoglikan olduğu takdirde gözle görülen morarma görüldüğünde 525 nm'de ELISA cihazında okutma işlemi gerçekleştirildi.

Kondrositlerde GAG tayini yapılırken, nanofiber üzerine ekili hücrelerden protein izole edildikten (5. , 10. ve 15. gün) sonra proteinler -80°C'de muhafaza edildi ve 5. , 10. ve 15. günün örnekleri aynı anda GAG tayini yapıldı. Bu sebeple tek bir standart ile tüm kondrositlerin GAG miktarı belirlendi.

2.2.10. Nanofiber Üzerine Ekilmiş Hücrelerden Dna İzolasyonu Ve Dna Miktarının Ölçülmesi

2.2.10.1. DNA İzolasyonu:

DNA izolasyonu için 12 well plate 5, 10 ve 15. günler için 4S-PEG ile çapraz bağlı PHEMA-kitosan nanofiberi üzerine kondrosit ekimi yapıldı. Ardından ekim yapılan nanofiberlere sırasıyla DNA izolasyon işlemi SN-PURE marka DNA İzolasyon Kiti (SnPURE) ile gerçekleştirildi. DNA izolasyonu aşamaları şu şekildedir:

12 kuyucuklu kültür plağındaki nanofiberlere ekilmiş olan hücrelere, ilk önce soğuk PBS (1X) ile 2 kez yıkama yapıldı. Daha sonra 750µl lizis solüsyonu (1x) eklendi ve hücre kazıma aparatıyla hücreler kazıma işlemi yapılarak nanofiber ile birlikte 15 ml'lik falkon tüpe konuldu. 10 dk çalkalamalı etüvde soğuk ortamda çalkalama işlemi gerçekleştirildi. Ardından falkon tüpler 2-3 dk sonikatör (130 watt, 20 kHz) işlemine tabii tutularak parçalama işlemi gerçekleştirildi. Tamamen homojen bir hale gelen hücre ekili nanofiber karışımından 200µl alınarak 1, 5 ml'lik ependorf tüpe alındı. Ependorf tüpün üzerine kittede bulunan solüsyon B3 (liziz

buffer)'ten 200 µl ve 25µl Proteinaz-K eklendi. 70 °C 'de 20 dk inkübe edildi. Ependorf bu süreç içerisinde 5 dk aralıklarla hafifçe vorteks edildi. İnkübasyondan sonra ependorf tüpün üzerine 210µl %99, 5'luk etil alkol eklendi ve vorteks yapılarak yeni kolona aktarıldı. Ardından yeni kolona aktarılan karışım 11. 000 rpm'de 1dk santrifüj yapıldı. Toplama tüpü temizi ile değiştirildi. Kolon içerisine 500µl solüsyon WB (wash buffer) eklendi. 11. 000 rpm 1 dk santrifüj yapıldı. Toplama tüpü temizi ile değiştirildi ve kolona 600µl solüsyon B5(wash buffer) eklendi. 11. 000 rpm'de 1 dk santrifüj yapıldı. Toplama tüpü boşaltıldı ve tekrar 11. 000 rpm'de 1 dk boş bir halde santrifüj yapıldı. Daha sonra kolon temiz 1, 5 ml'lik ependorf tüpe alınır ve içerisine önceden 70°C'de 5 dk ısıtılmış olan elüsyon solüsyonundan 150 µl eklendi. 11. 000 rpm 'de 1 dksantrifüj yapıldı ve DNA elüsyon solüsyonu ile birlikte ependorfa aktarılmış oldu. DNA bir yıla kadar -20°C 'de saklanabilir hale getirildi.

2. 2. 10. 2. DNA Miktar Tayini

Elde edilen DNA'nın Qubit 2. 0 Fluorometer Cihazı ile Qubit Assay Kit dsDNA ölçümü aşağıdaki şekilde gerçekleştirildi. İlk önce her bir örnek ve standart için 200µl (1µl dsDNA HS Reagent + 199µl dsDNA HS Buffer) olacak şekilde working solüsyonu hazırlandı. 1 örnek+ 2 standart, toplam 3 tüp için gerekli working solüsyonu ((1µl x 3) dsDNA HS Reagent + (199 µl x 3) buffer) hazırlandı. Ardından küçük PCR tüplerine 20µl örnek + 180µl working solüsyonundan eklendi. Standartları hazırlamak için ise (10µl standart 1 + 190 µl working solüsyonu) ve (standart 2 + 190µl working solüsyonu) olacak şekilde 2 standart hazırlandı. Qubit cihazında standartlar ile kalibrasyon yapıldıktan sonra DNA miktar tayini sırasıyla okutma yapılarak gerçekleştirildi.

2.2.11. Real Time Pcr İle Kollagen Tip I, Tip II, Agrecann Ve Sox9 Ekspresyonlarının Kondrositler Üzerinde Değerlendirilmesi

Gerçek zamanlı kantitatif PCR metodunda oluşan ürün miktarıyla reaksiyon boyunca oluşan ürün miktarıyla orantılıdır. Ve kullanılan floresan boya sybr green ışınmasıyla sinyal izlenerek bu oran anlaşılmaktadır.

Real time PCR çalışması hücrelerin fenotipik özelliklerini yani kondrojenikpotansiyeli ölçmek amacıyla kondrositler hem iki boyutlu kültür ortamında hem de üç boyutlu kültür ortamında ekim yapıldı. . Kollogen tip II, SOX9 ve agrecann faktörleri kondrojenik yazılımlarını belirlemek amacıyla kullanıldı. Kollogen tip I ise kondrojenik yazılımın olmadığını belirlemek için kullanılan faktördür.

Yaptığımız çalışmada; 5. , 10. ve 15. günlerde farklı zaman aralıklarında inkübasyona bırakılarak hem iki boyutta hem üç boyutta kondrositlerin ekiminin yapılma sebebi her iki ortamda da fenotipik özelliklerini belirlemektir. kollagen tip II, Tip I, SOX9 ve agrecann genlerinde 5. , 10. Ve 15. günlerdeki ekspresyon tayini yapıldı. Kullanılan genlerle kıyaslanmak amacıyla referans bir gen olan GADPH kullanıldı.

Real time PCR analizi için 5. , 10. ve 15. günlerde 6 kuyucuklu kültür plağına 2×10^6 ve iki boyulu kültür ortamına ekim yapılan kondrositler ilk önce her inkübasyon süresinin ardından hücre kazıma aparatıyla kuyucuk içerisinden polimer ile birlikte kuyucuk içerisine yayılım yaparak çoğalan hücreler kazınarak 30 dk sonikatör (130 watt, 20kHz)'de parçalandı ve 3500 rpm'de 10 dk santrifüj yapılarak pellet kısmı baz alındı ve içerisine 200µl 1x PBS eklenerek RNA izolasyonu için hazırlandı.

2.2.11.1. RNA İzolasyonu

RNA izolasyonu Roche RNA İzolasyon kitindeki protokol takip edilerek yapıldı. Bu protokol doğrultusunda Hücre kültürü ortamında hazırlanan 200µl PBS içerisindeki kondrossit örneklerinin her birine ayrı ayrı 400µl Lysis Binding Buffer'dan eklendi ve 15sn cortex yapıldı. Daha sonra örnekler içerisinde filtrelili

tüpler olacak şekilde kt içerisinde bulunan koleksiyon tüplerine alındı. Her tüpü maksimum hacmi 700µl olacak şekilde ayarlandı ve 15sn 8000g'de santrifüj yapıldı. Alt kısmına çöken kısım atılarak filtreli kısım tekrar kolleksiyon tüpüne alındı. Her bir örnek için önceden çözünmesi için bekletilen DNase I ve DNase İnubation Buffer'dn sırasıyla 10µl ve 90 µl alınarak filtreli tüplere ilave edilerek 15dk da oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından wash buffer I solüsyonundan 500 µl üst rezervuar kısmına eklenir ve 15sn 8000g'de santrifj yapıldı ve çöken kısım atıldı. Rezervuar kısmına 500 µl wash buffer II solüsyonundan eklendi eklendi 15sn 8000g'de santrifüj yapıldı ve dip kısım atıldı. Ardından tekrar rezervuar kısmına wash buffer II konularak 2dk maksimum g hızında santrifuj yapıldı çöken kısım atılarak rezervuar boş bir şekilde tekrar santrifuj yapıldı. Filtreli rezervuar kısmı 2ml'lik ependorf tüplere alınır ve üzerine 70 µl elution buffer eklenir ve 1dk 8000 g'de santrifuj yapıldı çöken kısmın RNA olduğu nanodrop (MSP Touch-200 Micro Spectrophotometer Operation Manual Version 1. 0)cihazı ile ölçüm yapılarak tespit edildi.

2. 2. 11. 2. cDNA İzolasyonu

Elde edilen RNA ların ardından cDNA'ya çevirme işlemi First Strand cDNA Synthesis kitinin protokolüne uygun bir biçimde gerçekleştirildi. Öncelikle her bir örnekten 0, 2 ml'lik ependorflara 20, 8 µl konuldu ve üzerine kitteki oligo-dT'ten 2 µl eklendi. Hazırlanan örnekler 10dk 65°C 'de bekletildi. Sonra cDNA sentez kitindeki malzemeler ile mix hazırlandı. First Strand cDNA Synthesis kitine göre mix aşağıdaki gibi hazırlandı ve her bir örneğin üzerine 17, 2 µl olavak şekilde paylaştırıldı. ;

Çizelge 2.2. First Strand Cdna Synthesis Kit İçeriğine Göre Hazırlanan Solüsyon Miktarları.

10 x Reaksiyon buffer	64 µl
dNTPs	32 µl
H2O	16 µl
RNase-inhibitörü	8. 0 µl
Revers transkriptaz	17, 6 µl

Hazırlanan örnekler PCR cihazında 100°C, 85°C 5 dk, 55°C 30 dk olan programa konuldu. Ardından örneklerreal time PCR için primerler ile birlikte hazırlanama işlemine başlandı. Real Time PCR için LightCycler® 480 SYBR Green I Master(Roche 04707516001) kiti kullanıldı ve her bir örnek için primerlerin olduğu mix aşağıdaki şekilde hazırlandı. Kullandığımız kollogen tip II, kollagen tip I, SOX9, agrecan ve GADPH primerlerinin dizilimleri(PZR Biotech)aşağıdaki gibidir.

Kolajen Tip II Forward (CAACAACCAGATCGAGAGCA)

Kolajen Tip II Reverse(CCAGTAGTCACCGCTCTTCC)

Kolajen Tip I Forward (CAATCAGCCTCTCAGAACA)

Kolajen Tip I Reverse (TCGGCAACAAGTTCAACATC)

Aggracan Forward (GCTACGGAGACAAGGATGAGTTC)

Aggrecan Reverse (CGTAAAAGACCTCACCTCCAT)

SOX9 Forward (GGCTCCGACACCGAGAATAC)

SOX9 Reverse (TCCGGGTGGTCTTTCTTGTG)

GADPH Forward (TCACAATCTTCCAGGAGCGA)

GADPH Reverse (CACAATGCCGAAGTGGTCGT)

Çizelge 2.3. Real Time PCR İçin Lightcycler® 480 SYBR Green I Master Kit İçeriğine Göre Hazırlanan Solüsyon Miktarları

Sybr green	80 µl
H2O	32 µl
Primerler	5, 5 reverse + 5, 5 forward
Tag DNA polimeraz	1 µl
MgCl	4 µl

Sonra LightCycler® 480 Multiwell Plate 96, white kitinden bir tane alındı ve içerisindeki kuyucuklara 5 örneklerden hazırlanan primerlerin bulunduğu mix'ten 15 µl, örneklerden 5 µl alındı kuyucuklara eklendi ve 95°C-59°C-72°C'de sırasıyla 10 dk – 15 dk – 20 dk ayarlanarak Real time PCR (LightCycler®480 II, Roche)cihazına plate yerleştirildi.

2.2.12.Comp(Cartilage Oligomeric Matrix Protein) Tespiti Ve Konsantrasyonunu Belirleme

Eklem hasarı veya metabolizması için bir parametre olarak kırıkta oligomerik matris proteini (COMP) kullanıldı ve gün gün değişimine bakıldı.

2.2.12.1. Örnek Hazırlama

Üzerinde hücre ekili bulunan polimerler, (kültürün 5. , 10. ve 15. günlerinde) falkona alınarak PBS (Phosphate Buffered Saline) ile 3 kez yıkama yapıldı. Yıkamadan sonra 30 dk(130 watt, 20 kHz) sonike edildi polimer ve hücre parçalanması sağlandı. Örnekler 15 dakika 3000 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüjden sonra süpernatant -80°C' de daha sonra kullanılmak için muhafaza edildi.

2.2.12.2. Uygulama

Test kit protokolüne göre yapıldı. Örnekler -80°C 'den alındı çözdürüldü. Kitin içinde bulunan 96 kuyucuklu özel pleytin kuyucuklarına 100'er μl örnekler ve 100'er μl standartlardan eklendi. İki kuyucuğa da, kontrol için 100'er μl sadece PBS eklendi. Sonra örneklere, 10'ar μl balans solüsyonu eklendi. Kontroller dışında örnek ve standartların bulunduğu kuyucuklara 50'şer μl de konjugat eklendi. 96 kuyucuklu pleyt aliminyum folyo ile kapatılıp 37°C ' de 1 saat inkübe edildi.

İnkübasyondan sonra yıkama kuyucuklar kitte bulunan yıkama solüsyonu ile 5'er kez yıkandı ve kuyucukların tamamen kuruması beklendi.

Kuyucuklar kuruduktan sonra tüm kuyucuklara 50'şer μl substrat A ve 50'şer μl substrat B eklendi. Pleyt, karanlık ortamda, 37°C 'de 15 dakika inkübe edildi. Sonra tüm kuyucuklara 50'şer μl durdurma solüsyonu eklendi ve pipetaj yapıldı. Tüm aşamalardan sonra ELISA spektrumunda, 450 nm'de optik yoğunluğu ölçüldü.

2.2.13. Nanofiber Üzerine Ekili Olan Kondrosit Hücrelerinin Annexin V Yöntemi İle Canlılığını Belirleme

12 kuyucuklu kültür plağına 5. , 10. Ve 15. Gün olmak üzere 4S-PEG ile çapraz bağlı PHEMA- Kitosan nanofiberi yerleştirildi. Nanofiberin her iki yüzeyi de UV ışını altında steril edildi. Ardından Nanofiberler üzerine $1 \times 10^4/\text{ml}$ olacak şekilde kondrosit ekimi yapıldı. Ertesi gün ilk olarak hücre ekili nanofiber PBS(1x) ile yıkandı. Ardından Binding Buffer (4x) distile su ile dilue edilir (1x) ve 100'er μl her kuyucuğa eklendi. Üzerine 1, 5 μl Annexin V-FITC solüsyonundan ilave edildi ve 10 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından her bir kuyucuğa tekrar 100'er μl binding buffer damlatıldı. Bunun ardından 2'şer μl PI (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) eklenir ve 10 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakılır. İnkübasyonun sonunda floresan ataçmanlı inverted mikroskopta apoptoz-nekroz oranı belirlendi.

2.2.14. Kondrosit Canlılığını Belirlemek İçin Alamar Blue Testi

48 kuyucuklu kültür plağına 4S-PEG ile çapraz bağlı PHEMA-Kitosan nanofiberi yerleştirilir. Ardından üzerine RPMI 1640 (%89 RPMI+ %10 FBS+ %1 Penicillin-Streptomycin) hazır besiyeri ile her bir nanofiber üzerine 1ml süspanse besiyeri içinde sayım cihazı ile sayımı yapılarak 3×10^4 /ml kondrosit hücresi gelecek şekilde ekim yapıldı. Ertesi gün kuyucuklardaki besiyeri atıldı ve her bir kuyucuğa 100'er µl fenol redsiz DMEM (%89 Fenol redsiz DMEM+ %10 FBS + %1 Penicillin-Streptomycin) hazır besiyerinden konuldu. Üzerine 10'ar µl Alamar Mavisi solüsyonundan eklenir. 3, 5-4 saat CO₂'li etüvde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından alamar mavisi solüsyonu çekilemeden her bir kuyucuğa 50'şer µl DMSO eklenir ve 570nm ve 600 nm'de ELISA okuyucuda okutma yapıldı.

2.2.15. İmmünohistokimyasal

Kıkırdak dokunun oluşumunda salgılanan ekstraselüler matris bileşeni olan kollojen tip II(NBP'-33343, Novus) molekülünü belirlemek için yapıldı. Bunun nedeni ise kondrosit varlığını kanıtlamak için kullanılan bileşenin kollojen tipII olduğunun bilinmesidir.

Kondrosit hücreleri ekilmiş 4S-PEG çapraz bağlı PHEMA-Kitosan nanofiberi kültür plağının kuyucuğundan alınarak dondurmali mikrotomdaki stap'a damlatılan doku dondurma medyumuna üzerine yerleştirildi. Ardından 1 gece tamamen donması için bekletildi. Ertesi gün 20°C'de 3 mikron kalınlığında kesitler alınarak adeziv lam üzerine alınan kesit parçaları yerleştirildi. Lam üzerindeki nanofibere ilk önce PBS ile yıkama yapıldı. PBS atıldı. Ardından 100 'er µl protein blocking solüsyonu damlatıldı ve 10 dk beklendi. Seyreltilen primer antikorlardan(Collagen Tip II 1:100) 100'er µl eklendi. 1 saat beklendi. 1 saat sonra 3 kez 5'er dk arayla PBS ile yıkama yapıldı. Yıkamanın ardından ortam pastör pipetle atıldı. Lam üzerindeki tüm örnekler 100'er µl sekonder antikor eklenerek 10 dk beklendi. Sekonder antikor pipetle atılarak 3 kez 5'er dk arayla PBS ile yıkama yapıldı. Daha sonra 100 'er µl HRP- Streptavidin damlatıldı ve 10 dk beklendi. 10 dk sonra 3 kez 5'er dk arayla PBS ile yıkama yapıldı. PBS pipetle atıldı. 100'er µl DAB Kromojen (1 ml DAB

Quanto Substrate + 1 damla DAB Quanto kromojen) örneklerin üzerine eklendi. Kahverengi boyanma görülene kadar beklendi.

Boyanma görüldükten sonra PBS ile 3 kez 5 'er dk arayla yıkama yapıldı ve ortam pipetle atıldı. Ardından her bir örnek üzerine 150'şer µl hematoksilen damlatılarak 2 dk beklendi. Sonra da PBS ile 5-6 kez yıkama yapıldı. Son olarak ışık mikroskopunda fotoğraf çekildi.

2. 2. 16. İmmünohistokimyasal

Kondrosit ekilmiş olan kültür plağındaki her bir kuyucuk ilk önce üzerine % 4'lük paraformaldehitten 100 'er µl eklenerek 1 saatlik fiksasyon işlemi başlatıldı. 1 saat sonunda paraformaldehit ortamdan atılarak 10 dk PBS (phosphate buffer saline) ile yıkama yapıldı. PBS pipetle ortamdan atıldı. Ardından kuyucuklara %3'lük metanollü hidrojen peroksitten 100 'er µl damlatılır ve 15 dk beklendi. 3 kez 5'er dk arayla PBS ile yıkama yapıldı. PBS atıldı. Kültür kuyucuklarına 100 'er µl protein blocking solüsyonu damlatıldı ve 15 dk beklendi. Negatif kontrol yapılan kuyucuklar hariç diğer tüm kuyucuklara yıkama yapılmadan, seyreltilen primer antikordardan kollajen tip II (1:100)'den 200'er µl eklendi. 1 saat beklendi. 1 saat sonra 3 kez 5'er dk arayla PBS ile yıkama yapıldı. Yıkamanın ardından ortam pipetle atıldı ve negatif kontrol de dahil tüm kuyucuklara 100'er µl sekonder antibody eklenerek 30 dk beklendi. Sekonder antibody pipetle atılarak 2 kez 5'er dk arayla PBS ile yıkama yapıldı. Kuyucuklara 100 'er µl HRP- Streptavidin eklendi ve 20 dk beklendi. 20 dk sonra 2 kez 5 'er dk arayla PBS ile yıkama yapıldı. PBS pipetle atıldı. 150'şer µl DAB Kromojen (1 ml DAB Quanto Substrate + 1 damla DAB Quanto kromojen) kuyucuklara eklendi. Kahverengi boyanma görülene kadar beklendi.

Boyanma görüldükten sonra PBS ile 2 kez 5 'er dk arayla yıkama yapılır ve ortam pipetle atıldı. Ardından her bir kuyucuğa 200'er µl hematoksilen damlatılarak 2 dk beklendi. Sonra da PBS ile 5-6 kez yıkama yapıldı. Ortama 200'er µl PBS eklenip ve ışık mikroskopunda fotoğraf çekildi.

2.2.17. Nanofiber Üzerine Ekili Olan Kondrosit Hücrelerinde Hematoksilen-Eozin Boyama

12 kuyucuklu kültür plağına 4S-PEG ile çapraz bağlı PHEMA-Kitosan her iki yüzeyide UV ışını altında steril edildikten sonra yerleştirildi ve hem nanofiber üzerine hem de kontrol amaçlı nanofiber bulunmayan kuyucuklara 5. , 10. Ve 15. günler için kondrosit ekimi yapıldı. Kontrol kuyucukları ilk önce %3, 7'lik formalde 1 saat oda sıcaklığında bekletilerek sabitlendi. Rutin sabitleme işleminden sonra alkol serilerinden geçirilerek dehidre edildi. Alkol serilerinden sonra 5dk hematoksilende bekletildi ve distile su ile yıkama yapıldı. Yıkamanın ardından kuyucuklara eozin damlatıldı ve 2, 5 dk bekletildi. Eozinden sonra tekrar distile su ile yıkama yapıldı ve ışık mikroskobunda incelendi. Daha sonra 5. , 10. Ve 15. günlerin hücre ekili nanofiber boyaması için ise dondurmalı mikrotomdaki stabın üzerine doku dondurma medyumunu (İnvitrogen, Bioblock) sürüldü. Üzerine hücre ekilmiş 4S-PEG ile çapraz bağlı PHEMA nanofiberden bir parça alınarak yerleştirildi. Ardından 1 gece tamamen donması için -20°C'de bekletildi. Ertesi gün 4-5µm kalınlığında kesitler alınarak adeziv lam üzerine alınan kesit parçaları yerleştirildi. Kesit parçalarının üzerine hematoksilen damlatılıp ve 5 dk beklendi. PBS (1x) ile lam üzerindeki kesite yıkama yapıldı. Daha sonra eozin damlatılarak 2, 5 dk bekletildi ve tekrar PBS (1x) yıkama yapıldı ve fikse etmek için gliserin damlatılıp lamelle kapatılarak ışık mikroskobunda incelendi.

2. 2. 18. Nanofiber Üzerine Ekili Olan Kondrosit Hücrelerinde Toluidin Blue Boyama

12 kuyucuklu kültür plağına 5. , 10. ve 15. gün olacak şekilde 4S-PEG ile çapraz bağlı PHEMA-Kitosan nanofiberi her iki yüzeyide UV ışını altında steril edildikten sonra yerleştirildi ve hem nanofiber üzerine hem de kontrol amaçlı nanofiber bulunmayan kuyucuklara kondrosit ekimi yapıldı. Kontrol kuyucukları ilk önce %3, 7'lik formalde 1 saat oda sıcaklığında bekletilerek sabitlendi. Rutin sabitleme işleminden sonra alkol serilerinden geçirilerek dehidre edildi. Alkol

serilerinden sonra 1-2 damla Toluidin Blue damlatılarak 1 dk bekletildi ve distile su ile yıkama yapıldı. Işık mikroskobunda incelendi. Hücre ekili nanofiber boyaması için ise dondurmalı mikrotomdaki stabın üzerine doku dondurma medyumu (İnvitrogen, Bioblock) sürüldü. Üzerine hücre ekilmiş 4S-PEG ile çapraz bağlı PHEMA nanofiberden bir parça alınarak yerleştirildi. Ardından 1 gece tamamen donması için -20°C'de bekletildi. Ertesi gün 4-5µm kalınlığında kesitler alınarak adeziv lam üzerine alınan kesit parçaları yerleştirildi. Kesit parçalarının üzerine Toluidin Blue damlatılıp ve 1dk bekletildi. PBS(1x) ile lam üzerindeki kesite yıkama yapıldı. Daha sonra fikse etmek için gliserin damlatılıp lamelle kapatılarak ışık mikroskobunda incelendi.

2.2.19. İmmüno Floresan Tekniği

Kondrositlerin polimer yüzeyindeki varlığı immüno floresan tekniği ile tespit edilmek üzere bu amaçla, FITC ile işaretli anti-rabbit CD44 antikorunun bağlanıp bağlanmadı gözlemlendi. Hem ikiş boyutlu kültür ortamında hemde üç boyutlu kültür ortamında analiz yapıldı ve inverted floresan ataçmanlı mikrokopta FITC filtresinde görüntülendi.

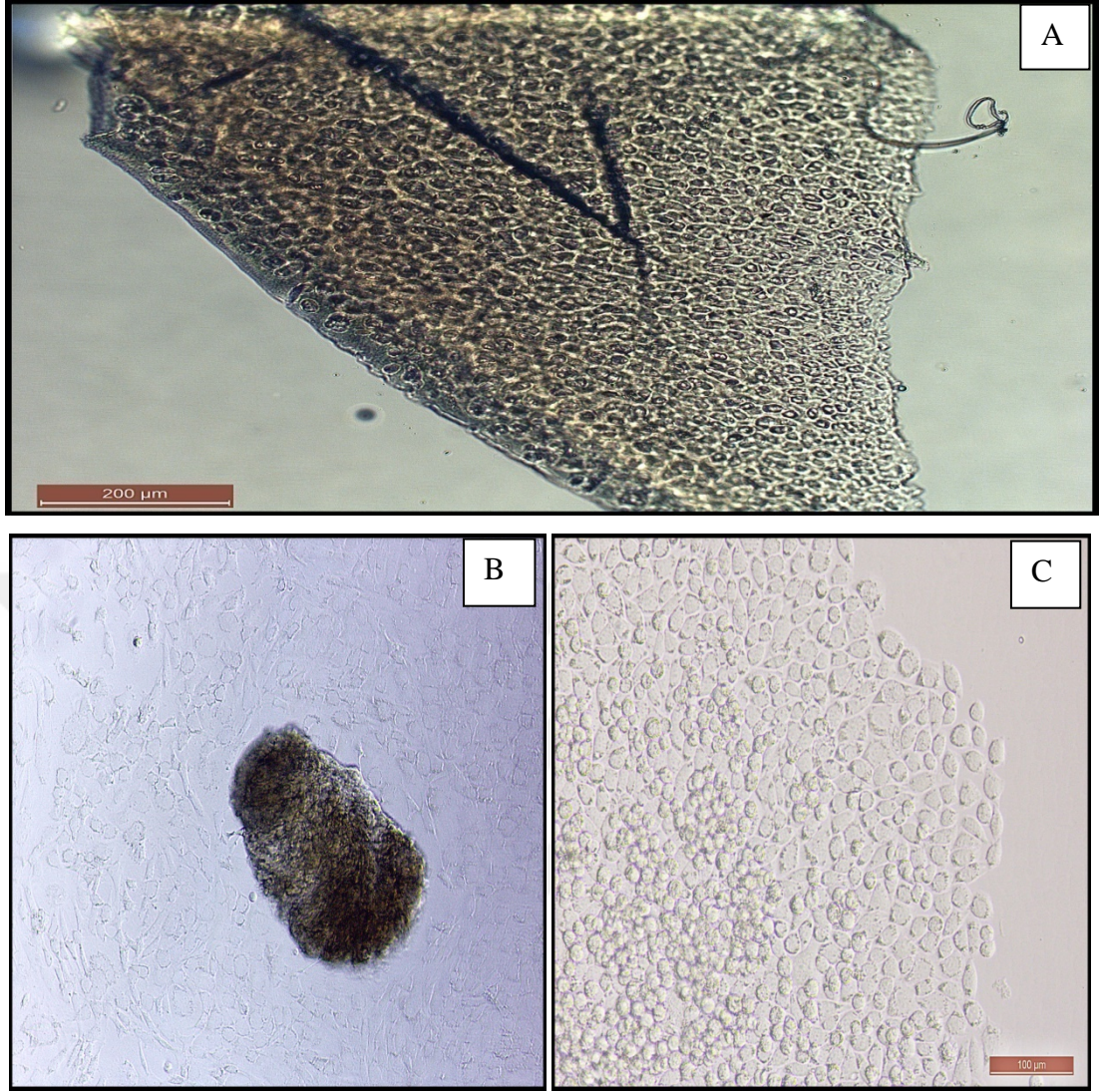
İlk önce Nanofiber üzerine ekimi yapılan hücreler -20C'de Kriyostat ta bir saat bekletilerek 3 mikron kalınlığında kesit alındıktan sonra % 4 paraformaldehit içerisine konularak 20 sn bekletildi ve fikse edilmiş oldu. Sonra FITC işaretli CD44 rabbit antikorunu 1:250 oranında dilue edildikten sonra lam ve normal kültür plağı üzerine 10 mikrolitre olacak şekilde ilave edildi. 1 saat oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Bir saat sonra LeicaDM6000 Inverted flouresan ataçmanlı mikroskopta FITC filtresinde ışımaya ypan hücreler 10x büyütmede görüntülendi.

3. BULGULAR

3.1. Primer Kondrosit İzolasyonu

Yapılan primer kondrosit izolasyonunda hücreler yaklaşık bir hafta içinde koloni oluşturmuş ve bir buçuk hafta içerisinde de konfluent olmuşlardır. Mikroskop görüntüleri Şekil 3. 1’de gösterildi.



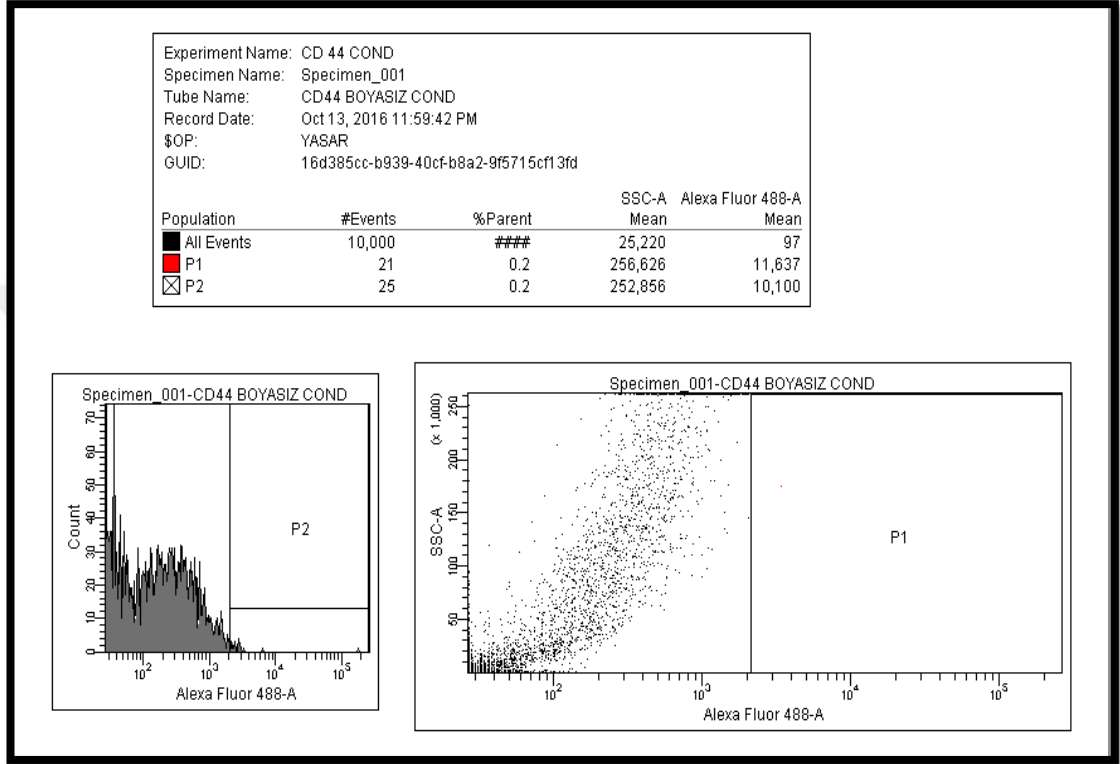


Şekil 3.1. Kıkırdak dokudan İzole Edilen Kondrositler (Bar=200 µm, 10x büyütme, LeicaDM6000 İverted Mikroskop ile görüntülendi) **A-** Tavşandan alınan kıkırdak doku **B-**Küçük parçalara ayrılan kıkırdak dokudan dökülen kondrositler **C-**Kondrositlerin birinci pasaj görüntüsü

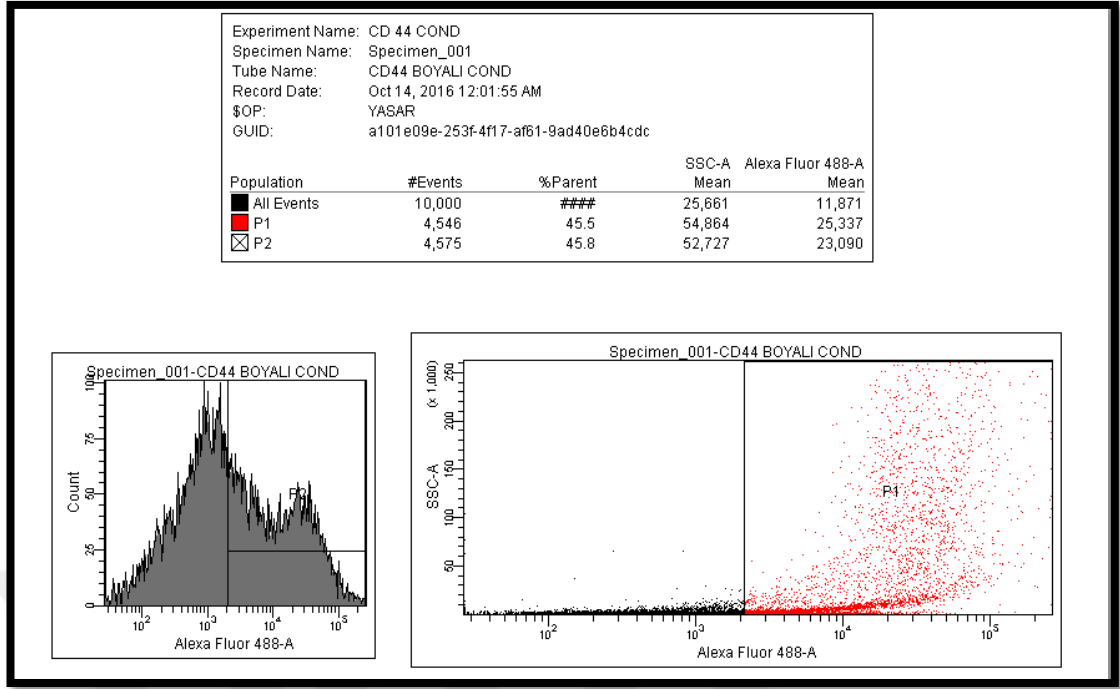
3.2. 4S-PEG ile Çapraz Bağlı PoliHEMA-Kitosan Nanofiberinin Flow SitometriKimyasal Karakterizasyonu

Kondrosit yüzey markerı olan CD44 (LifeSpan BioSciences, Inc. , LS-C13435-100) ile yapılan flow sitometri sonuçlarına göre, % 45 oranında kondrosit olduğu belirlendi. Hem CD44 ile muamele edilen hem de muamele edilmeyerek

kontrol olarak kullanılan kondrositlerin flow sitometri cihazından alınan ölçüm sonuçları verildi. 20 dk inkübasyona bırakılan CD44 antikoruna bulunan kondrositler de boyanma görüldü ve kondrosit varlığı tespit edildi.



Şekil 3.2. CD44 markeri ile muamele edilmeyen kondrosit boyaması



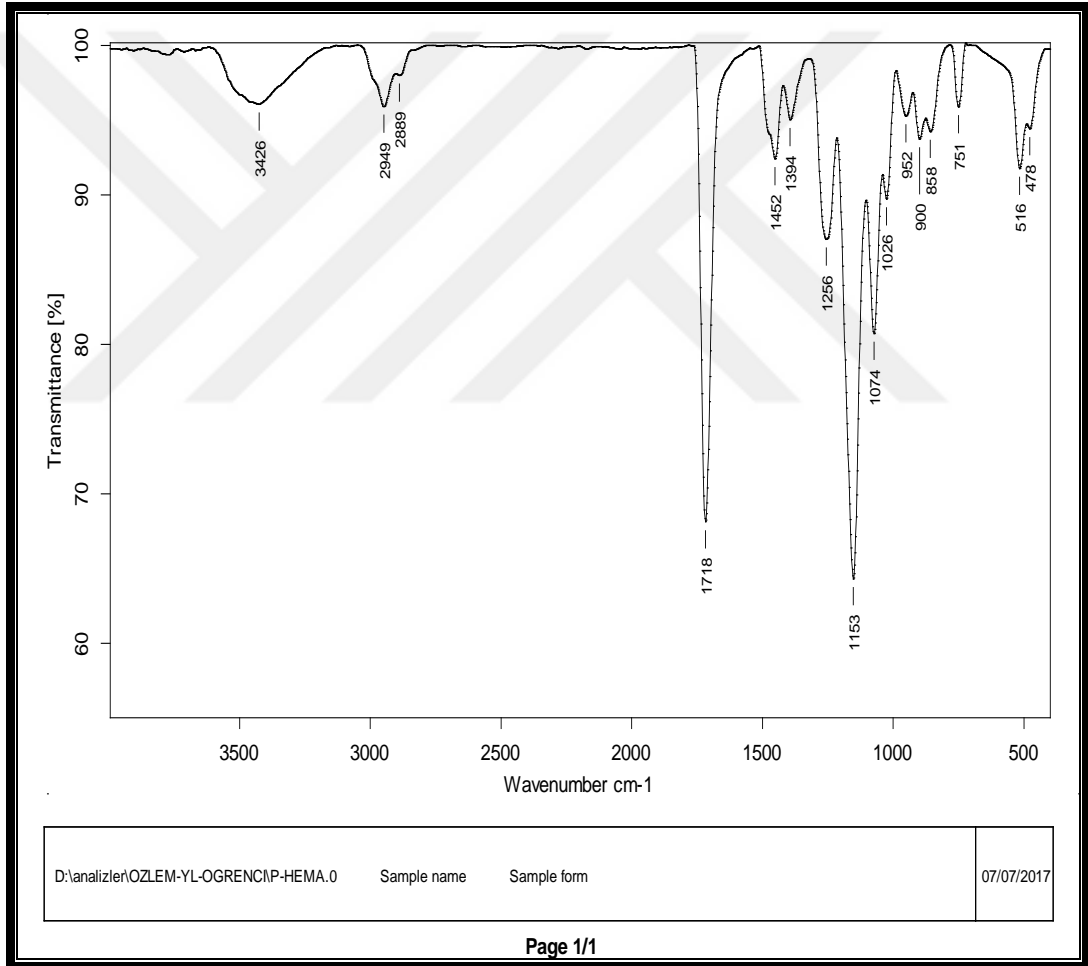
Şekil 3.3. İlk primer antikor olarak CD44, sonra sekonder antikor olarak Alexa flour işaretli goat anti-rabbit antikor ile muamele edilen ve boyanan kondrositlerin flow sitometri analizi

3.3. 4S-PEG ile Çapraz Bağlı PoliHEMA-Kitosan Nanofiberinin FTIR Kimyasal Karakterizasyonu

FTIR analizi, moleküllerdeki fonksiyonel grupların titreşimleriyle ilgili emilim bandlarının tanımlanmasına dayanmaktadır. 4S-PEG ile çapraz bağlı PoliHEMA-Kitosan nanofiberinin FTIR spektrumu, FTIR spektrofotometresi (Bruker Vertex 70V) kullanılarak 400-4000 cm^{-1} dalga boylarında spektrumlar alınarak analiz yapıldı. Nanofiber örnekleri sırasıyla polihema, polihema-kitosan, aminoasitli ve CD44 antikorlu 4S-peg çapraz bağlı polihema-kitosan nanofiberleri ile 4S-peg çapraz bağlı polihema-kitosan nanofiberleri olarak ATR ile FTIR spektrumuna bakıldı.

3.3.1. PoliHEMA Nanofiberinin FTIR Karakterizasyonu

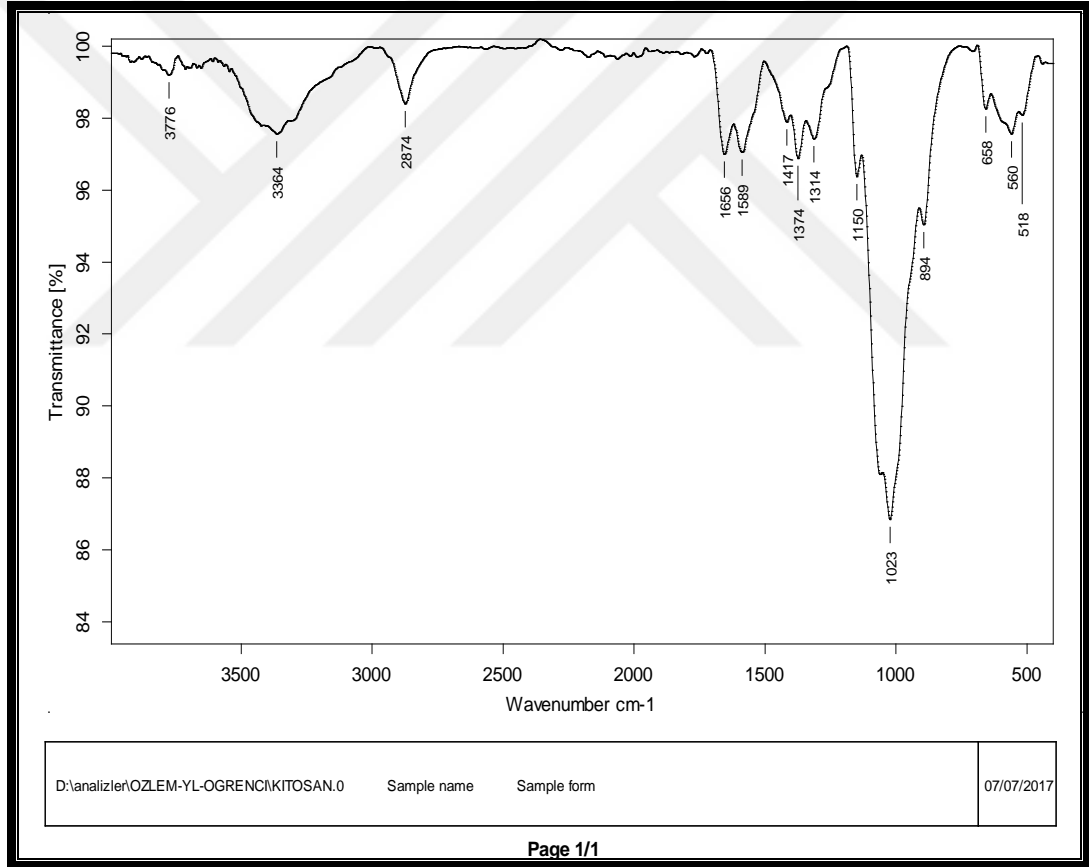
PoliHEMA nanofiberine ait FTIR spektrumunda hidroksil grubuna ait bağ titreşimi bandı 3426 cm^{-1} , C=O ester grubu bağ titreşimi 1718 cm^{-1} pozisyonunda, C-O (karbonil) grubuna ait bağ titreşimleri, 1372 cm^{-1} ve 1153 cm^{-1} pozisyonu olarak belirlendi. Karakteristik CH_2 gerilme bağ titreşim bandı 1452 cm^{-1} pozisyonu şeklinde görüldü.



Şekil 3.4. PHEMA FTIR Spektrumu

3.3.2. Kitosan FTIR Karakterizasyonu

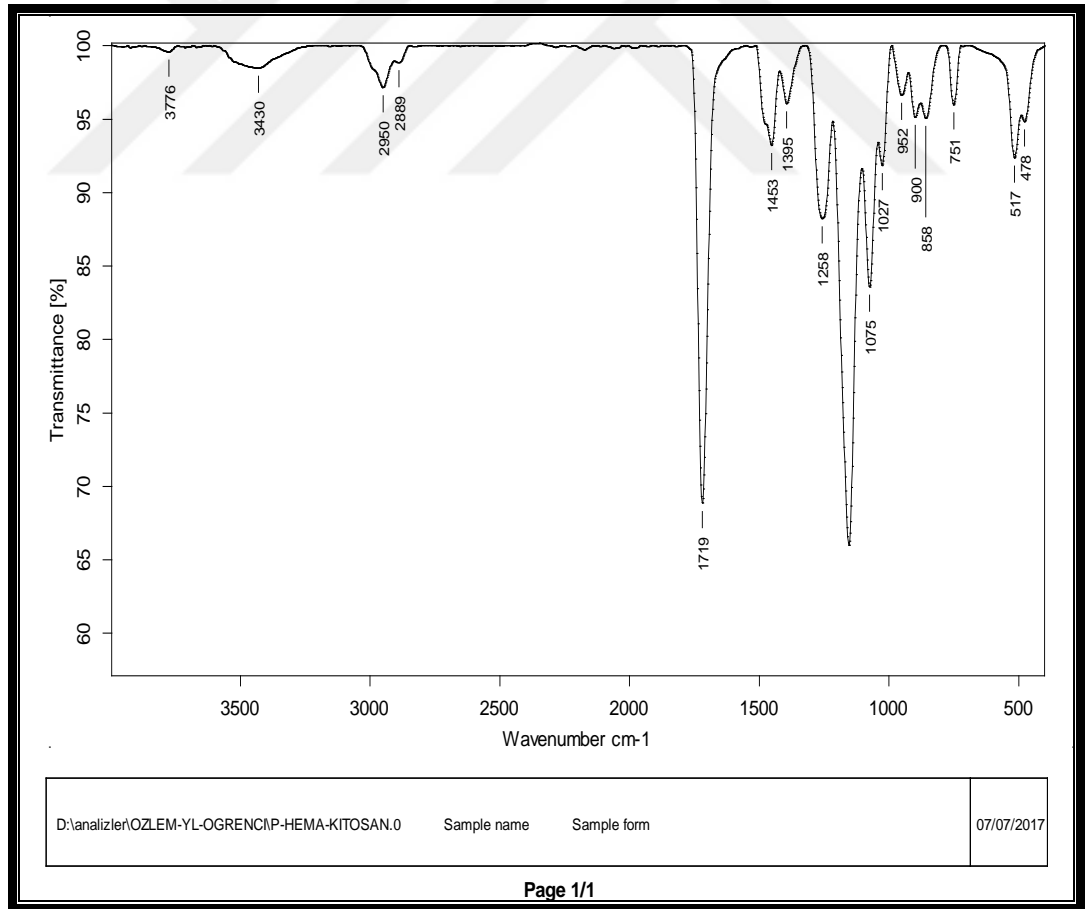
FTIR spektrumuna göre kitosana ait OH bağ titreşimi literatür taramasına göre 3429 cm^{-1} pozisyonunda iken bizim sonucumuzda 3364 cm^{-1} pozisyonunda gözlemlendi. Yoğun CH gerilme bağ titreşimi 2874 cm^{-1} pozisyonunda belirlendi. Güçlü amid I ve amid II bağ titreşimleri sırasıyla 1656 cm^{-1} ve biraz daha güçlenmiş 1589 cm^{-1} pozisyonunda görüldü. C-H gerilme bağ titreşimi 1417 cm^{-1} pozisyonunda ve C-O-C asimetrik bağ titreşimi 1314 cm^{-1} pozisyonunda gözlemlendi



Şekil 3.5. Kitosan'a ait FTIR spektrumu

3.3.3. PoliHEMA-Kitosan Nanofiberinin FTIR Karakterizasyonu

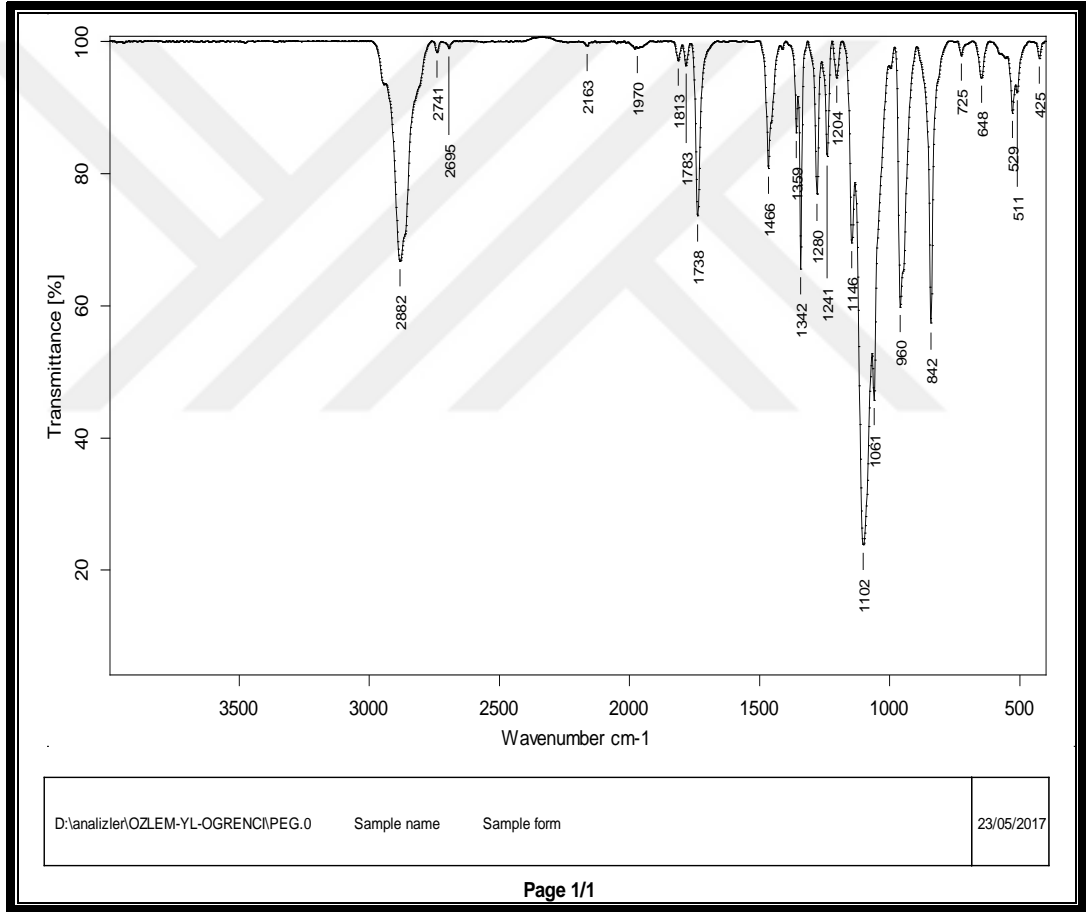
Nanofibere ait FTIR spektrumunda kitosana ait OH bağ titreşimi 3430 cm^{-1} pozisyonu ile belirlendi. CH bağ titreşimi 1380 cm^{-1} iken 1395 cm^{-1} pozisyonuna yükselerek güçlendiği görüldü. C-O bağ titreşimi 1080 cm^{-1} pozisyonundan 1075 cm^{-1} pozisyonuna az da olsa inerek zayıflama gözlemlendi. 2800 cm^{-1} ve 3000 cm^{-1} yoğun absorpsiyon bantları olan C-H bağ titreşimi 2889 cm^{-1} pozisyonu olarak belirlendi. PoliHEMA 'ya ait CH_2 düzlem dışı bükülme bağ titreşimi 1453 cm^{-1} ve C-O gerilme bağ titreşimi 1158 cm^{-1} olarak belirlendi. PoliHEMA OH bağ titreşimi 3339 cm^{-1} iken 2950 cm^{-1} olarak gözlemlenerek bağ titreşiminde azalma olduğu belirlendi.



Şekil 3.6. Kitosan-poliHEMAFTIR Spektrumu

3.3.4. 4S-PEG FTIR Karakterizasyonu

Bu spektrumlara göre PEG'in C-H bağ titreşimine ait iki tepe noktası görüldü. Bunlar sırasıyla 2882 cm^{-1} pozisyonunda ve güçlenmiş 1466 cm^{-1} pozisyonu olarak belirlendi. OH bağ titreşimi 3400 cm^{-1} pozisyonunda tespit edildi. 4S-PEG C-O (karbonil) bağ titreşimi 1102 cm^{-1} ve 1738 cm^{-1} pozisyonunda gözlemlendi.



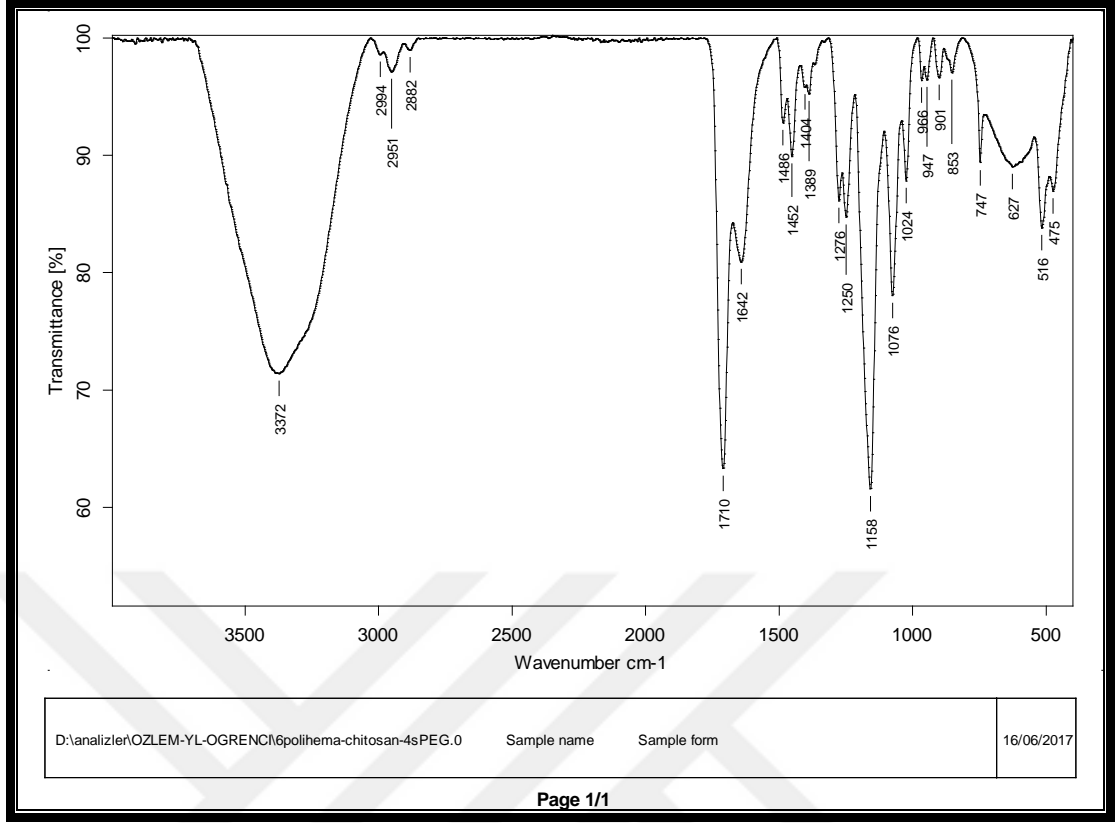
Şekil 3.7. 4S-PEG 'e ait FTIR spektrumu

3.3.5. Aminoasitsiz ve Antikorsuz 4S-PEG ile Çapraz Bağlı PoliHEMA-Kitosan Nanofiberinin Karakterizasyonu

Kitosana ait OH bağ titreşimi 3429 cm^{-1} iken 3372 cm^{-1} pozisyonunayükseltgendiği görüldü. C-H bağ titreşimine ait 1380 cm^{-1} pozisyonu 1389 cm^{-1} pozisyonuna yükseltgenerek güçlenmiştir. Kitosana ait görülmesi beklenen 1569 cm^{-1} pozisyonundaamid I bağ titreşimi kısmen zayıf olarak ta olsa 1542 cm^{-1} pozisyonunda görüldü.

PoliHEMA 'ya ait 1716 cm^{-1} deki C-O bağ titreşimi ve yine C-O ester grubuna ait bağ titreşiminin 1162 cm^{-1} pozisyonunda gözlemlenmesi beklenirken sırasıyla 1710 cm^{-1} ve hafif güçlü 1158 cm^{-1} pozisyonunda C-O bağ titreşimleri görüldü.

PEG polimerine ait 2876 cm^{-1} ve 1456 cm^{-1} pozisyonundaki iki tepe noktası bulunanC-H bağ titreşimi 1452 cm^{-1} ve hafif güçlü 2882 cm^{-1} pozisyonunda C-H bağ titreşimi görüldü. Son olarak 4S-PEG 'e ait FTIR spektrum ölçümlerimizde elde ettiğimiz sonuçlara göre 1061 cm^{-1} C-O gerilme titreşim bağı görülmüştür. Bizim sunucumuza göre 4S-PEG 'e ait C-O bağ titreşimi 1024 cm^{-1} olarak gözlemlendi. C-O bağ titreşimi 1242 cm^{-1} pozisyonu görülen PEG FTIR spektrumuna göre elde ettiğimiz sonuçlar doğrultusunda bu pozisyon 1250 cm^{-1} olarak tespit edildi.

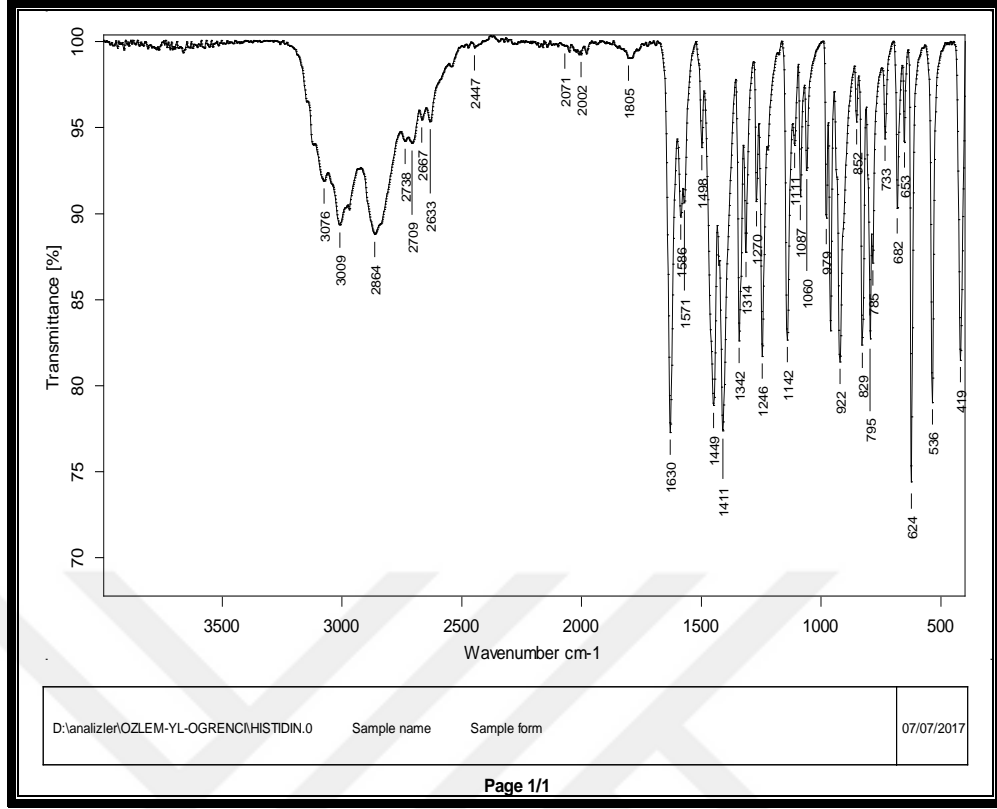


Şekil 3.8. Aminoasitsiz ve CD44 antikorlu olmadan 4S-PEG ile Çapraz Bağlı PoliHEMA-Kitosan Nanofiberinin FTIR spektrumu

3.3.6. Aminoasitlerin Karakterizasyonu

3.3.6.1. Histidin FTIR karakterizasyonu

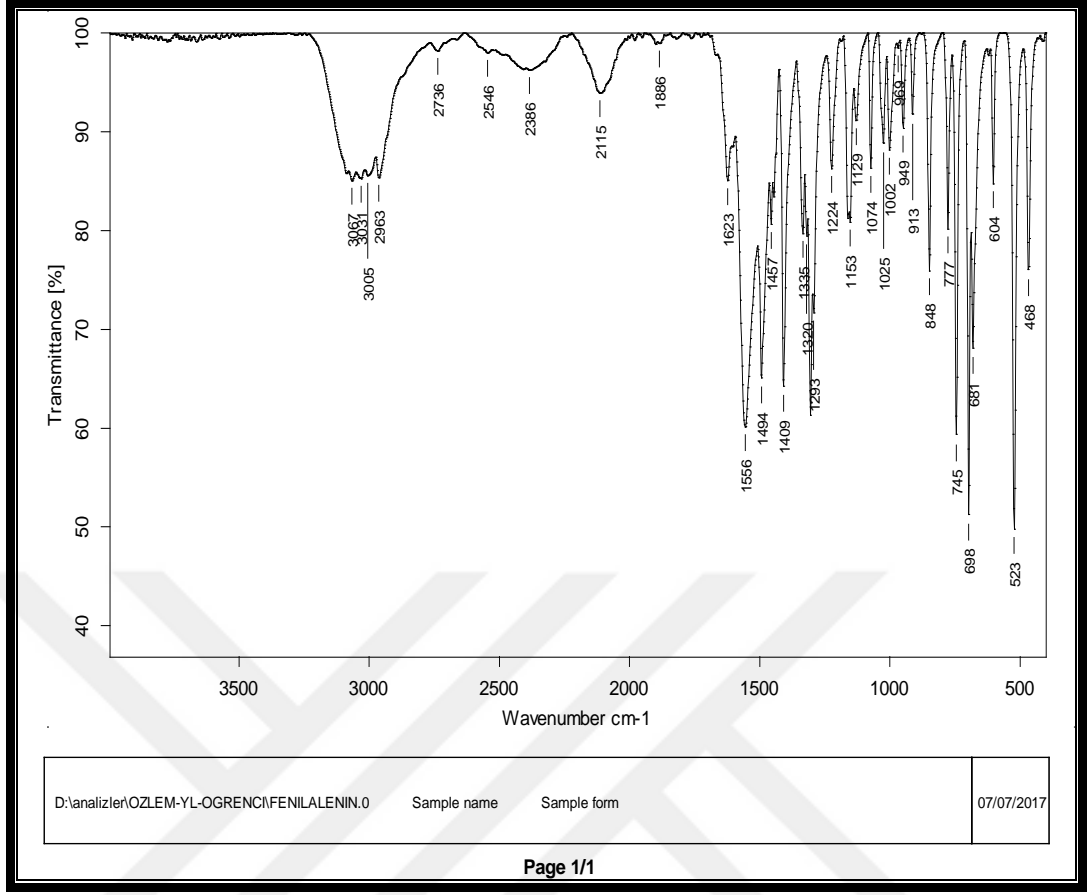
Bu spektrumun doğrultusunda 922 cm^{-1} ve 979 cm^{-1} pozisyonu belirlendi. Benzen halkasına ait bağ titreşimi 1086 cm^{-1} pozisyonunda ve 731 cm^{-1} CH_2 salınımını ortaya koyan bant tespit edildi. Bunların dışında tüm diğer bantlar histidine ait özgü bantlar olduğu ifade edildi.



Şekil 3.9. Histidin aminoasitine ait FTIR spektrumu

3.3.6.2. Fenilalanin FTIR karakterizasyonu

Bu spektrumlara göre OH bğ titreşimi 3031 cm^{-1} , güçlü C-H bağ titreşimi 2963 cm^{-1} , C-C bağ titreşimi 1957 cm^{-1} , 1074 cm^{-1} benzen halkası, COO gerilme bağ titreşimi 1494 cm^{-1} ve C-C bağ titreşimi 1153 cm^{-1} pozisyonlarında belirlendi. Bunların dışında tüm piple fenilalanine ait özgü pigler olduğu ifade edildi.

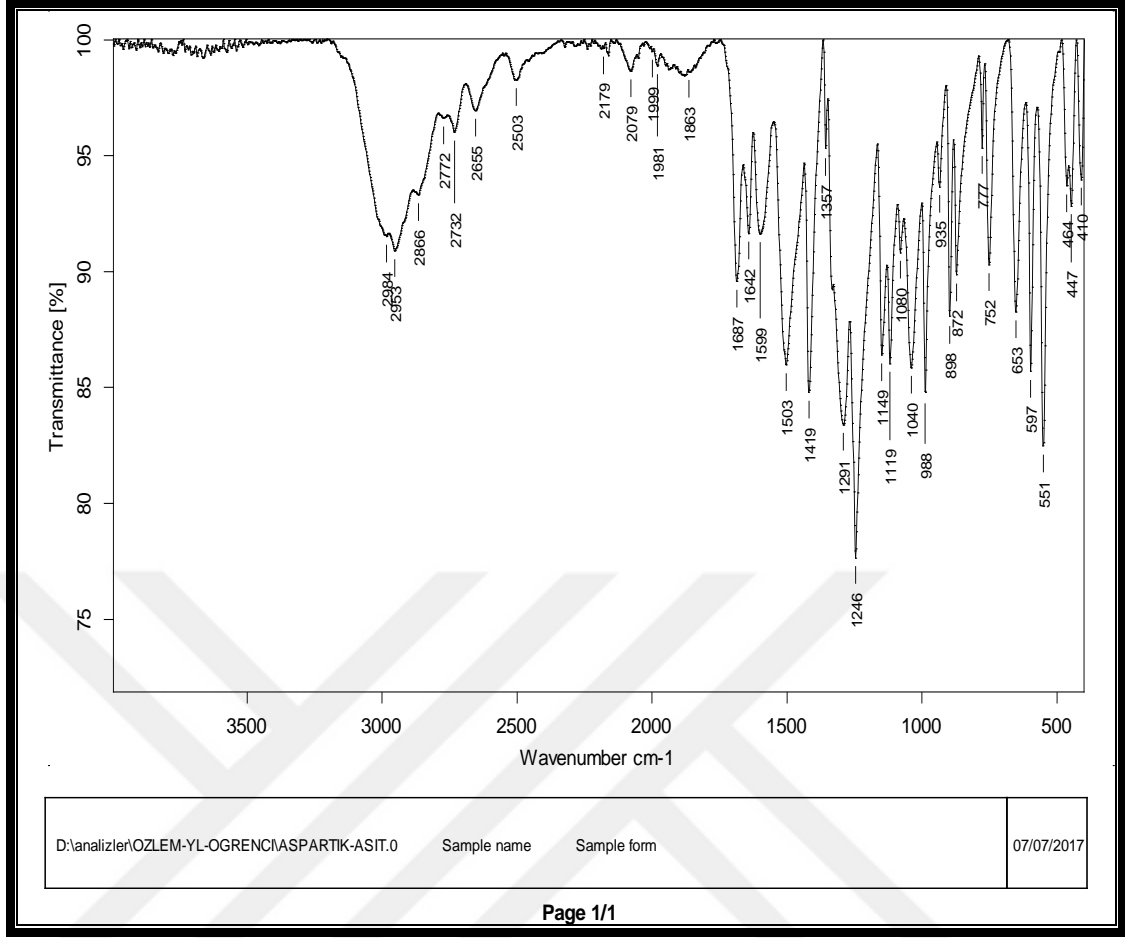


Şekil 3.10. Fenilalanine ait FTIR spektrumu

3.3.6.3. Aspartikasit FTIR karakterizasyonu

551 cm^{-1} - 1540 cm^{-1} arası bantları diğer histidin ve fenilalanin aminoasitleri ile moleküler yapılarının benzerliğiden de kaynaklı sebeple örtüşmektedir.

Bunların dışında C-O bağ titreşimine ait 1567 cm^{-1} -1597 cm^{-1} arası pozisyonlar belirlendi. 1675 cm^{-1} ve 1705 cm^{-1} pozisyon aralıklarında bağ titreşimleri gözlemlendi. Bunların dışında tüm pigle aspartik asite ait özgü pigler olduğu ifade edildi.



Şekil 3.11. Aspartikasite ait FTIR spektrumu

3.3.7. Aminoasitli ve Antikorlu 4S-PEG ile Çapraz Bağlı PoliHEMA-Kitosan Nanofiberinin Karakterizasyonu

Elde ettiğimiz sonuçlara göre PoliHEMA'ya ait FTIR spektrumuna göre 1716 cm⁻¹ pozisyonunda görülmesi beklene C-O ester bağ titreşimi ve 1453 cm⁻¹ pozisyonunda görülmesi beklenen CH₂ bağ titreşimi sırasıyla 1719 cm⁻¹ ve güçlenmiş 1488 cm⁻¹ pozisyonu olarak gözlemlendi. C-O bağ titreşimine ait 1161 cm⁻¹ ve 1076 cm⁻¹ pozisyonuna ait bağ titreşimleri sırasıylazayıflamış 1151 cm⁻¹ ve 1074 cm⁻¹ pozisyonu olarak belirlendi.

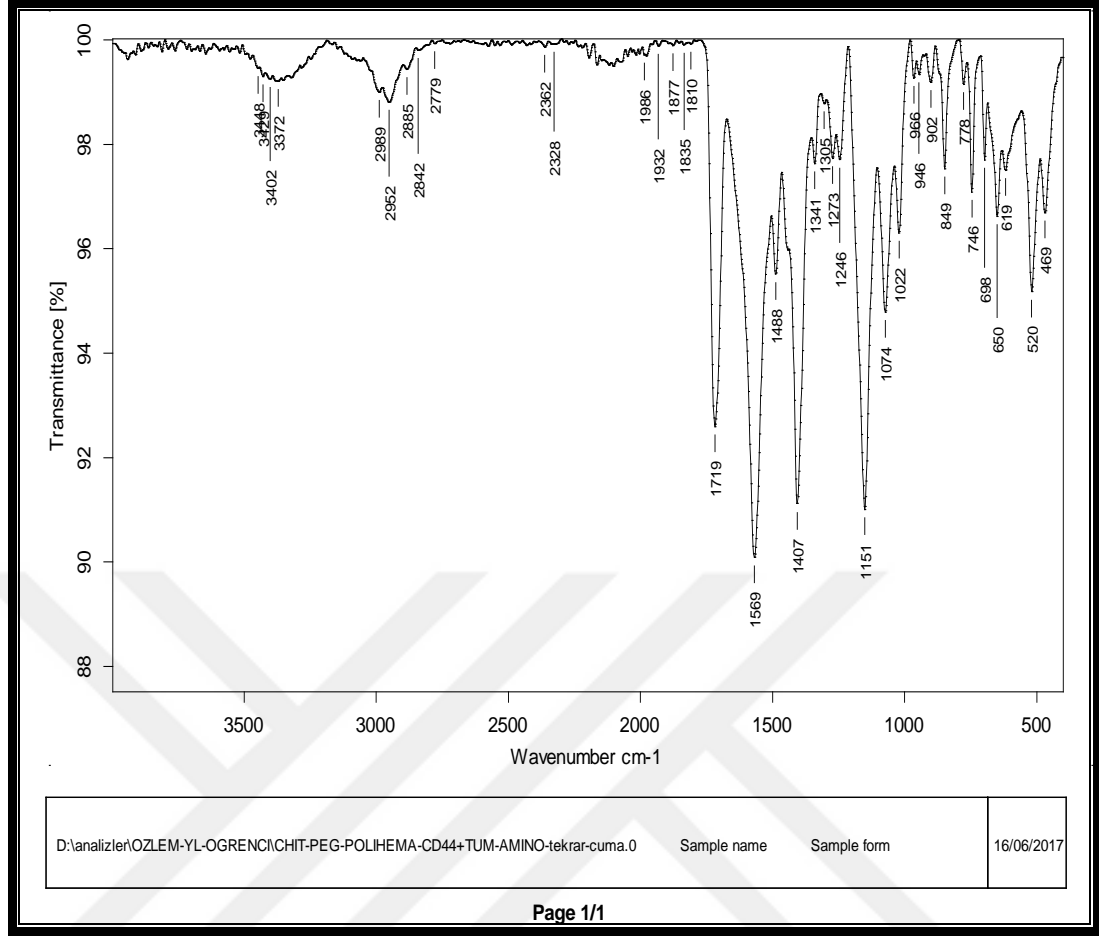
Literatür taramalarına göre kitosana ait OH bağ titreşimine ait 3429 cm⁻¹ pozisyonu aynen sonuçlarımızda görülmüştür. C-O-C bağ titreşimine ait 1310 cm⁻¹ pozisyonu bilinirken bizim sonucumuzda o bağ titreşimine ait pozisyon

güçlenmiş 1341 cm^{-1} olarak belirlendi. Amid I 'e ait bağ titreşimi ortadan kaybolmuş onun yerine amid II bağ titreşimi görülmüştür. 1560 cm^{-1} pozisyonunda görülmesi beklenen amid II bağ titreşimi hafif güçlenmiş 1569 cm^{-1} olarak görüldü. Kitosana ait 1589 cm^{-1} pozisyonundaki NH_2 bağ titreşimi tamamen ortadan kaybolduğu gözlemlendi.

4S-PEG ve PEG polimerlerinin kimyasal yapısının benzerliğinden dolayı sonuçlarımızda PEG polimerine ait bağ titreşimleri de gözlemlendi. 3416 cm^{-1} pozisyonunda olan OH bağ titreşimi zayıflamış olarak 3402 cm^{-1} pozisyonunda görüldü. 2882 cm^{-1} pozisyonunda C-H bağ titreşimi olarak bilinen bant 2885 cm^{-1} olarak görüldü. 4S-PEG 'e ait 1735 cm^{-1} pozisyonunda görülmesi beklenen C-O bağ titreşimi güçlenmiş bant olarak 1810 cm^{-1} pozisyonunda görüldü. Ayrıca 4S-PEG spektrumuna ait 1061 cm^{-1} pozisyonundaki C-O gerilme bağ titreşimi indirgenerek zayıf 1022 cm^{-1} pozisyonunu gösterdi.

Eklediğimiz aminoasitlere göre literatürdeki fenilalanine ait 1957 cm^{-1} pozisyonundaki C-C bağ titreşimine ait pozisyon güçlenmiş olarak 1986 cm^{-1} olarak görüldü. Bunların yanı sıra ayrı ayrı FTIR spektrumlarına baktığımız aminoasitler ile sonuçlarımızı kıyaslandığında 849 cm^{-1} pozisyonundaki NH_3 bağ titreşimi hem histidin hem fenilalaninden geldiği görüldü. Aynı FTIR spektrumuna göre aspartik asit ve histidinden gelen C-O-C bağ titreşimine ait 1246 cm^{-1} pozisyonu görüldü. Bağ titreşimleri fenilalanin, histidin ve aspartik asit aminoasitlerinin üçünde de 650 cm^{-1} ile 988 cm^{-1} aralığında belirli titreşimler gözlemlendi. Bu bağ titreşimleri üç aminoasitin bulunduğu nanofiber yapısının FTIR spektrumunda 650 cm^{-1} - 966 cm^{-1} aralığında belirlendi.

CD44 antikoruna ait C-C bağ titreşimi diğer tüm gruplardan farklı olarak 1488 cm^{-1} pozisyonunda belirlendi.



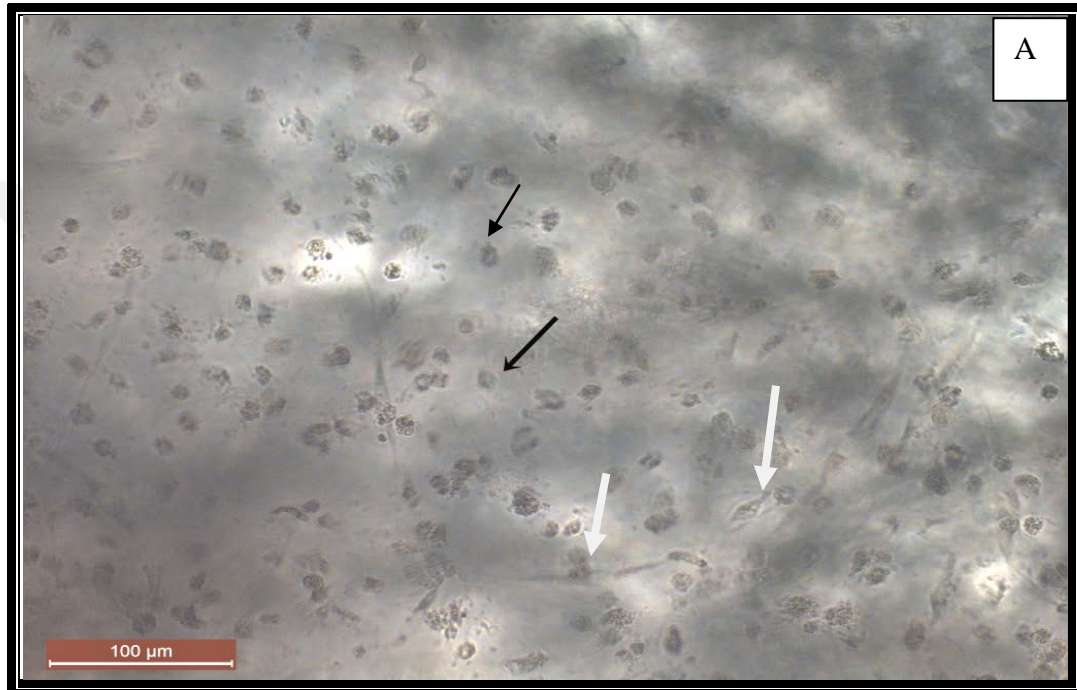
Şekil 3.12. 4S-PEG ile çapraz Bağlı PoliHEMA-Kitosan Nanofiberinin içerisinde bulunan polimerlere, aminoasitlere ve CD44 kondrosit yüzey reseptörüne ait bağ titreşimleri aşağıda şekilde verildi.

3.4. 4S-PEG ile Çapraz Bağlı PoliHEMA-Kitosan Nanofiberinin Hücre Kültürü Işık Mikroskop Görüntüleri

Kondrosit hücreleri sınırlı pasaj yapılması gerekmektedir Pasaj sayısı arttıkça kondrositler iki boyutlu kültür ortamında (monolayer) de-diferansiye olup fibroblast karakteristiği gösterdiği bilinmektedir. Bu nedenle kondrositlerin kondrojenik özelliklerini tekrar geri kazanabilmeleri için 3 boyutlu ortamda yani polimer üzerine ekim yapılarak fenotiplerini korudukları bilinmektedir.

Yapılan çalışmada farklı zaman aralıklarıyla takip edilen polimer üzerine ekimi yapılmış kondrosit hücreleri 5. günden 15. güne kadar takip edildi ve bu farklı

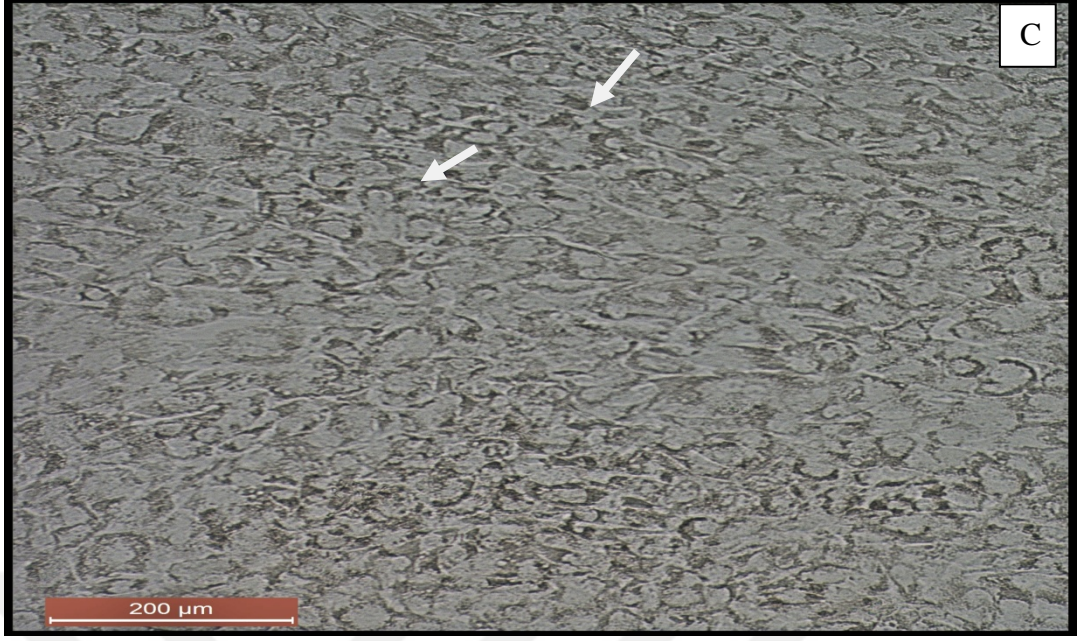
zaman aralıkları boyunca kendi morfolojik yapılarına dönüşmeye çalışmaları yani re-diferansiye olmaları beklenmiştir ve 15. günlük süreç içerisinde re-diferansiyasyon gözlemlendi. Kıkırdak dokudan primer hücre kültürü sonucu elde edilen kondrositlerin 4S-PEG ile çapraz Bağlı PoliHEMA-Kitosan Nanofiber üzerindeki mikroskop görüntüleri Şekil 3. 12. 'de gösterilmiştir.



Şekil 3.13. 4S-PEG ile çapraz Bağlı PoliHEMA-Kitosan Nanofiberinin üzerine kondrosit ekimi 5. gün ışık mikroskop görüntüsü. Tam morfolojisi görülen kondrositler siyah oklar ile, henüz fenotipik özelliğini kazanmamış olan kondrositler beyaz oklar ile gösterilmiştir. (Bar=200µm-10x büyütme, LeicaDM6000 İverted Mikroskop ile görüntülenmiştir.)



Şekil 3.14. 4S-PEG ile çapraz Bağlı PoliHEMA-Kitosan Nanofiberinin üzerine kondrosit ekimi 10. gün ışık mikroskop görüntüsü. Yuvarlak morfolojiye sahip kondrositler beyaz oklar ile gösterilmiştir. (Bar=200µm-10x büyütme, LeicaDM6000 İverted Mikroskop ile görüntülenmiştir).

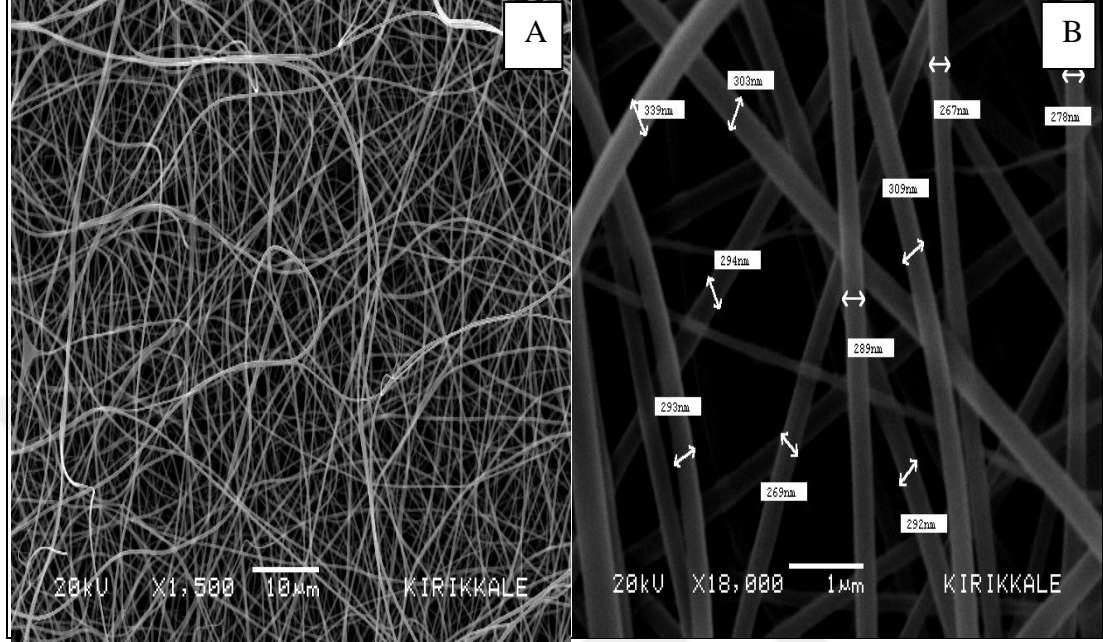


Şekil 3.15. 4S-PEG ile çapraz Bağlı PoliHEMA-Kitosan Nanofiberinin üzerine kondrosit ekimi 15. gün ışık mikroskop görüntüsü. Yuvarlak morfolojiye sahip kondrositler oklar ile gösterilmiştir. (Bar=200µm-10x büyütme, LeicaDM6000 İverted Mikroskop ile görüntülenmiştir).

3.5. 4S-PEG ile çapraz Bağlı PoliHEMA-Kitosan Nanofiberinin SEM Görüntüleri

Her bir nanofiberhazırlanırken ilk önce soğuk 1X PBS ile yıkandı%2, 5'lik gluteraldehitte 30 dk bekletildi ve ardından 10 dk kurutulduktan sonra SEM analizi için altın kaplandı. Ardından altın kaplı örnekler stap üzerine konuldu ve mikroskopa yerleştirilerek görüntülere bakıldı.

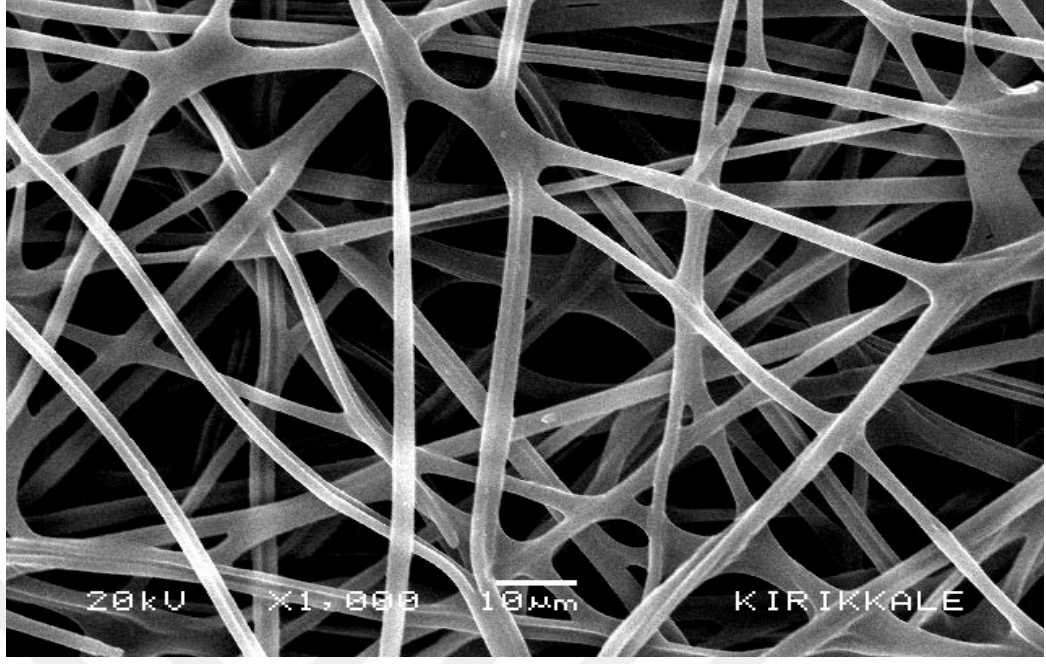
3.5.1. PoliHEMA Nanofiberinin SEM görüntüsü



Şekil 3.16. A)(1, 500x büyütme, (Scanning Electron Mikroskope ile görüntülenmiştir. B) PoliHEMA Nanofiberinin SEM ile çaplarının görüntüsü (18, 000 X büyütme Scanning Electron Mikroskope ile görüntülenmiştir).

3.5.2. PoliHEMA – Kitosan Nanofiberinin SEM görüntüsü

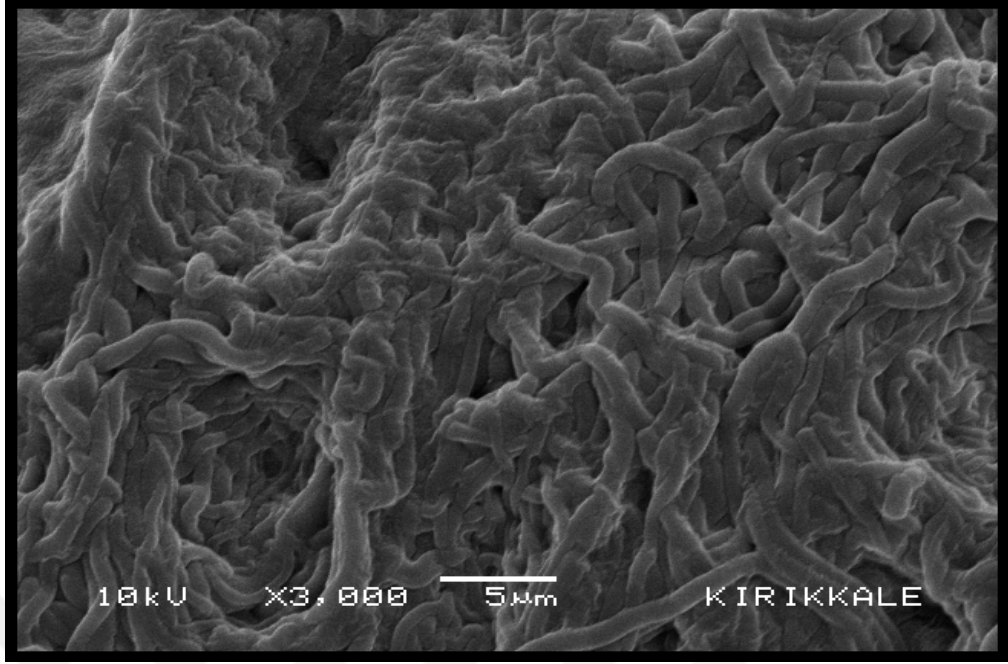
Aşağıdaki PHEMA-Kitosan nanofiberinde, kitosanın poliHEMA fiber yüzeyini farklı boyutlarda olacak şekilde kapladığı SEM analizi ile gösterildi.



Şekil 3.17. PoliHEMA – Kitosan Nanofiberinin SEM görüntüsü(5, 000X büyütme, Scanning Electron Mikroscope ile görüntülenmiştir).

3.5.3. 4S-PEG Çapraz Bağlı PoliHEMA – Kitosan Nanofiberinin SEM görüntüsü

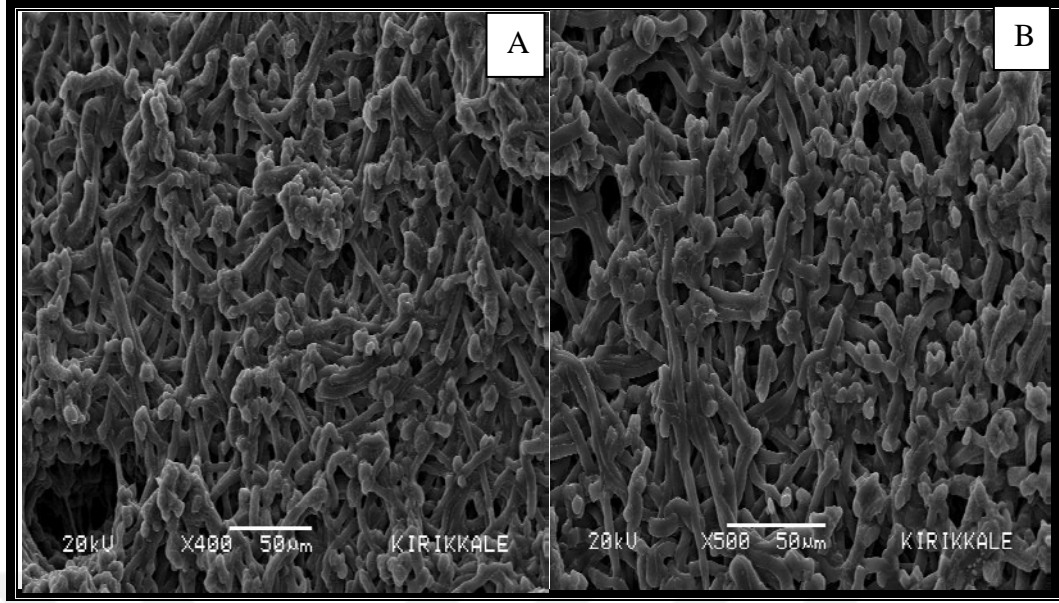
Aşağıda 4S-PEG Çapraz Bağlı PoliHEMA – Kitosan Nanofiberinin SEM görüntüsü verilmiştir. Fiziksel olarak çapraz bağlanmanın gerçekleştiğini fiber yapısındaki bozunmalardan anlamaktayız.



Şekil 3.18. 4S-PEG Çapraz Bağlı PoliHEMA – Kitosan Nanofiberinin SEM görüntüsü (3, 000 X büyütme, Scanning Electron Mikroscope ile görüntülendi).

3.5.4. Kondrosit Ekili 4S-PEG Çapraz Bağlı Antikorlu ve Aminoasitli PoliHEMA – Kitosan Nanofiberinin SEM Görüntüsü

Elde ettiğimiz SEM görüntülerine göre hücreler yüzeye oldukça iyi tutunmuş görünmektedirler. Ancak bu büyütmede nanofiber çap yapısı görünmemektedir. Ayrıca kondrosit hücrelerinin lakün içerisinde bulunmalarından dolayı diğer doku hücrelerinde olduğu gibi nanofiberin yüzeyinin tamamına eşit sayılabilecek şekilde yayılmadığı gözlemlendi.

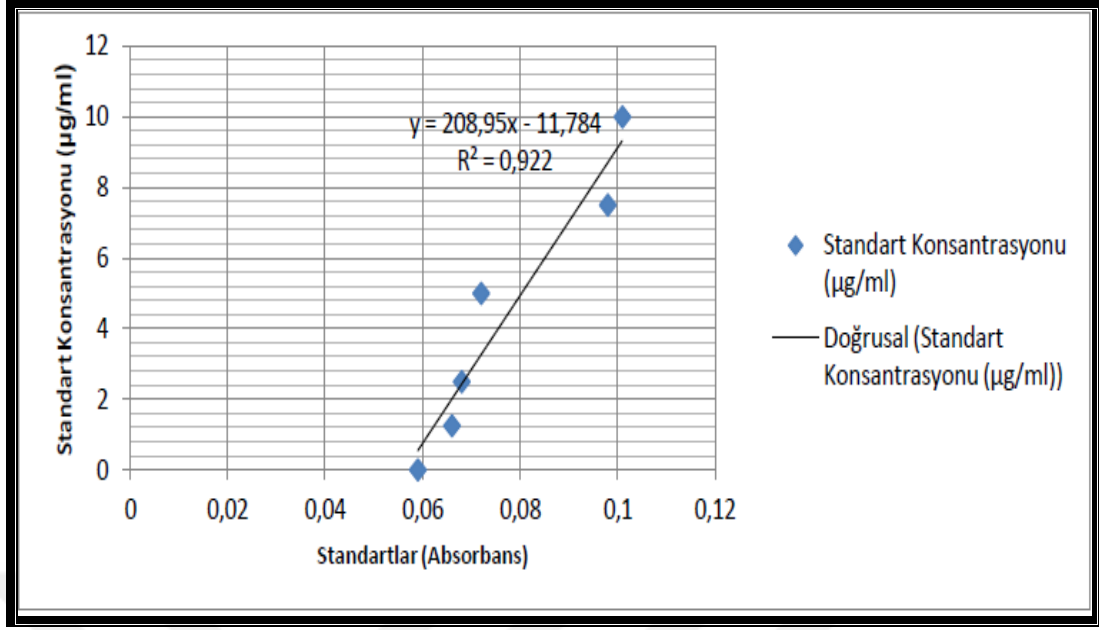


Şekil 3.19. A-B) Kondrosit ekili 4S-PEG Çapraz Bağlı PoliHEMA – Kitosan Nanofiberinin SEM (Scanning Electron Microscope) görüntüsü(400X ve 500X büyütme)

3.6. Glikozaminoglikan Değerlendirilmesi

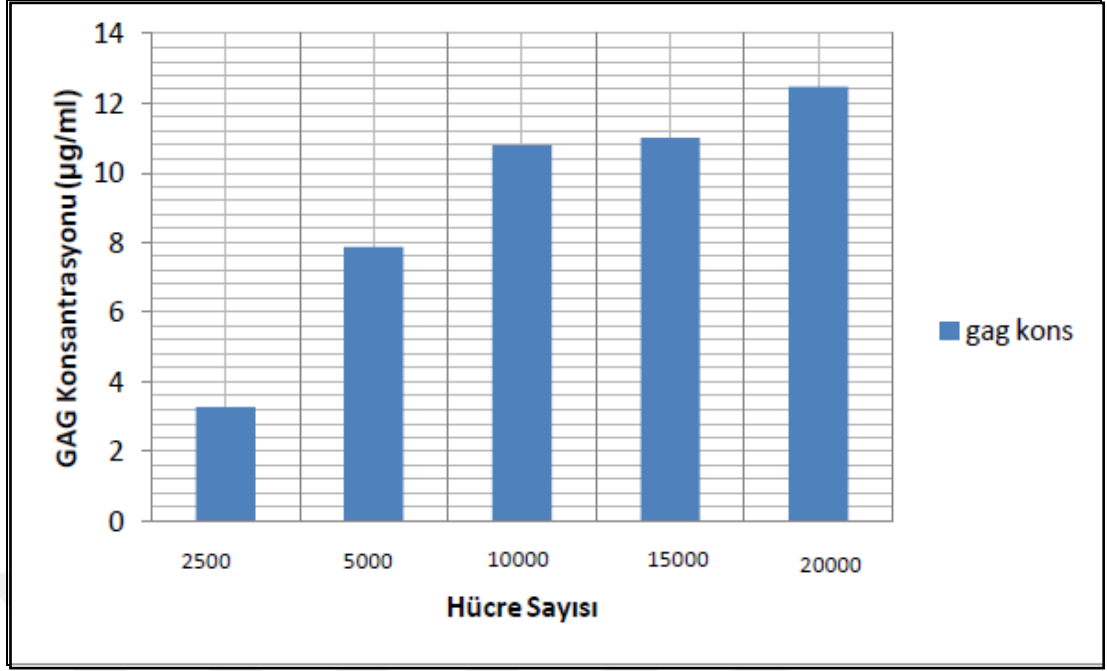
Hücre yüzeyinde ve ekstraselüler matrikste bol miktarda bulunan GAG'lar kollojene bağlanarak ekstraselüler matriks yapısını belirlemektedir. Biz çalışmamızda kollojeni bağlayan ve kuvvetli bir ağ oluşumunu sağlayan sülfatlanmış olan ve proteoglikan kümelerini oluşturan kondrotin sülfat ile GAG miktarını belirlemiş oldu. GAG'ın bulunduğu kültür ortamında mor renk görüldü.

Kondrositlerin ekili olduğu nanofiber yapılarındaki GAG miktarları temel olarak Enobakhare ve ark. (1996)'ın kullandığı metot takip edilerek yapıldı). ELİSA cihazında 525 nm'de ölçüm yapılarak absorbans değerlerine karşı çizilen standart grafiği ve belirlenen zaman noktalarına karşı grafikleri aşağıda verildi.



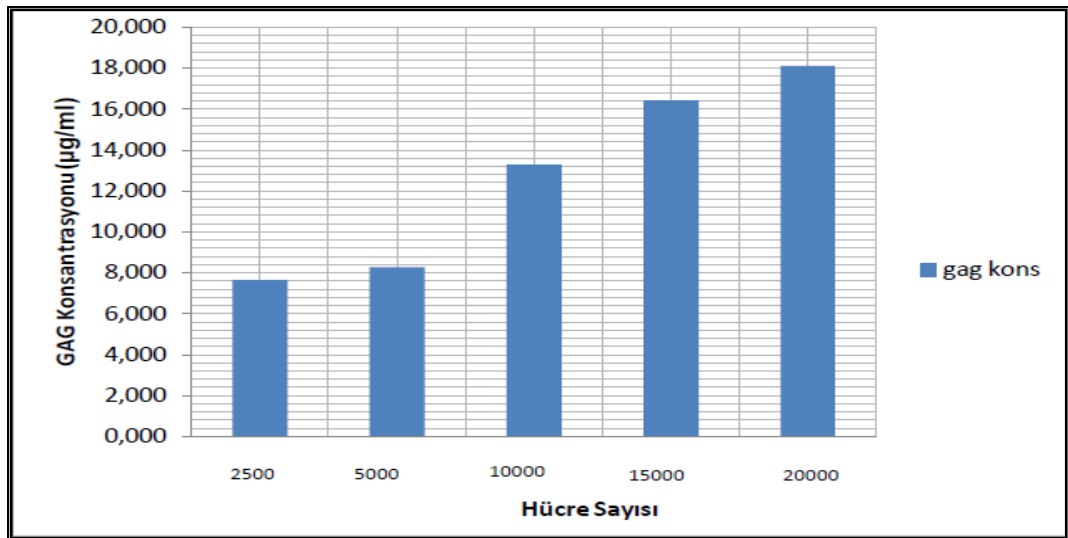
Şekil 3.20. Nanofiber üzerine ekilen kondrositlerdeki GAG tayini için hazırlanan standart grafiği

Farklı zaman aralıklarında nanofiber üzerine ekili kondrosit hücreleri tarafından salınan toplam sülfatlanmış glikozaminoglikan (GAG) miktarına ait grafikler aşağıda verildi.



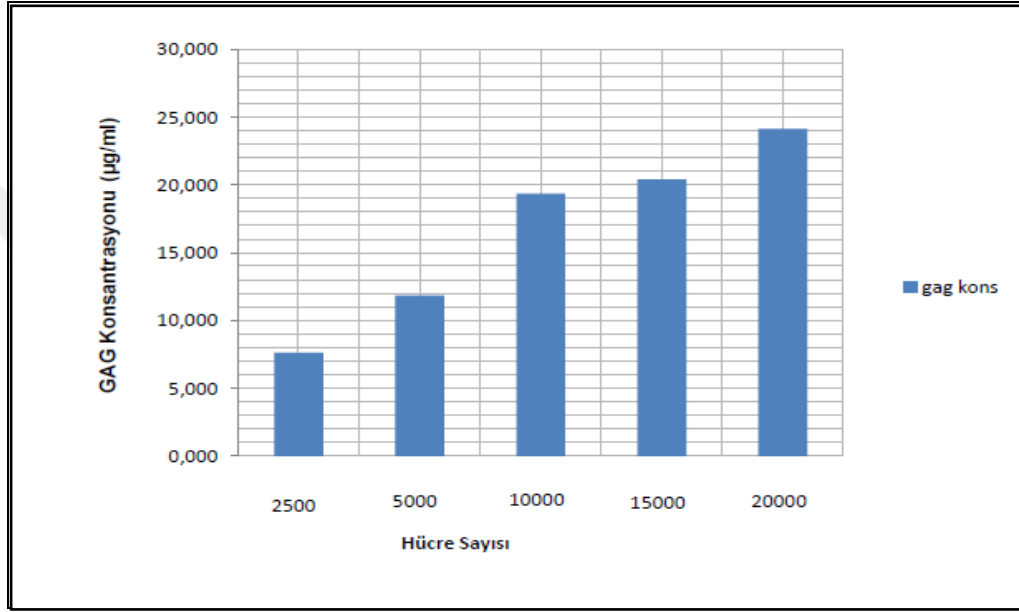
Şekil 3.21. Nanofiber üzerine ekilen kondrositlerdeki 5. gün GAG konsantrasyon hücre sayısı grafiği

Nanofiber üzerine ekili hücrelerin sayısında artış gözlemlenirken GAG miktarında da artış gözlemlendi.

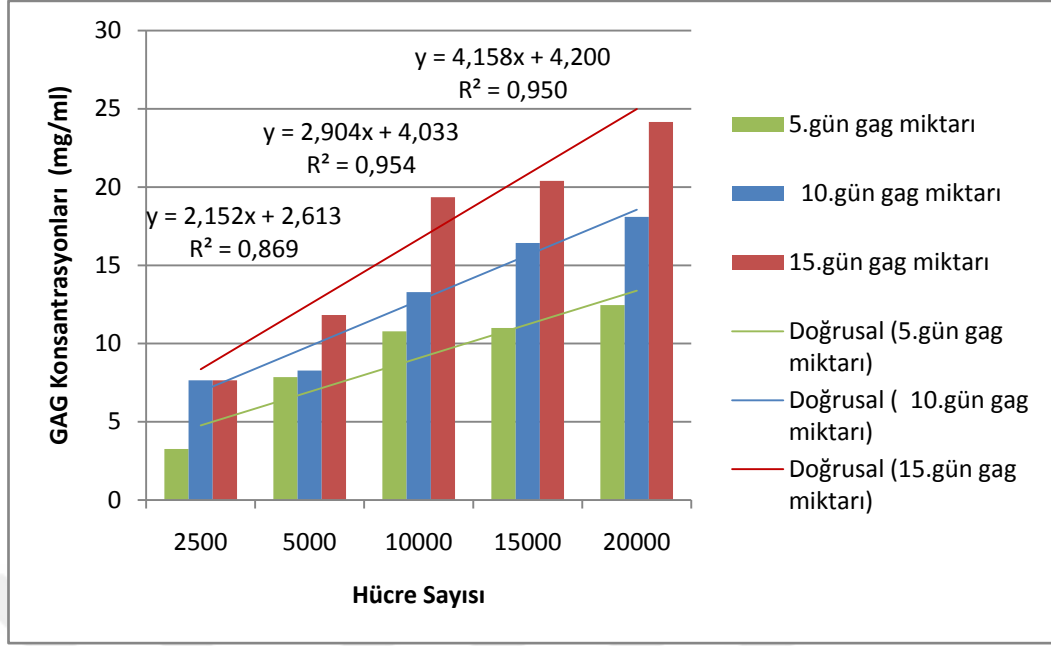


Şekil 3.22. Nanofiber üzerine ekilen kondrositlerdeki 10. gün GAG konsantrasyon hücre sayısı grafiği

Kondrosit ekiminin 6 ve 7 gününde paralel giden GAG miktarı 8. günden itibaren hücre sayısı ile birlikte arttığı gözlemlendi.



Şekil 3.23. Nanofiber üzerine ekilen kondrositlerdeki 15. gün GAG konsantrasyon hücre sayısı grafiği



Şekil 3.24. Tüm zaman aralıklarının birlikte bulunduğu GAG konsantrasyon grafiği

Zaman aralığı arttıkça hücre sayısında ve GAG miktarında doğru orantılı bir şekilde artış meydana geldi. Kondrosit ekili nanofiberlerde GAG tayini yapılırken, nanofiber üzerine ekili hücrelerden protein izole edildikten (5. , 10. ve 15. gün) sonra proteinler -80°C 'de muhafaza edildi ve 5. , 10. ve 15. günün örnekleri aynı anda GAG tayini yapıldı. Bu sebeple tek bir standart ile tüm kondrositlerin GAG miktarı belirlendi. Kültüre etme süresince hücrelerden salınan GAG miktarında belirgin bir artışın meydana geldiği görülmüştür. 5. gün GAG miktarı $12,45 \mu\text{g/ml}$, 10. gün GAG miktarı $18,09 \mu\text{g/ml}$, 15. gün GAG miktarı $24,16 \mu\text{g/ml}$ olarak belirlendi. Yanı gün sayısı arttıkça hücre sayısında artış meydana geldiği içinglikozaminoglikan (GAG) miktarı attığı gözlemlendi. Ayrıca R^2 değeri inkübasyon günlerinde düşük bir eğri gösterdiği için GAG miktarının yüksek olduğu yorumu yapıldı.

3.7. DNA Miktar Tayin Sonucu

Kondrosit hücreleri 5. , 10. ve 15. Gün olmak koşuluyla farklı sürelerde kültüre edilmiştir. Elde edilen sonuçlar tabloda gösterilmiştir. DNA miktarı gün geçtikçe artmış ve en büyük artış 10. gün ile 15. gün arasında gerçekleşmiştir.

Zamana karşı hücre sayısında azalmaların olduğu tespit edilmiştir. Fakat bununla birlikte GAG/DNA oranı, 10. günde en yüksek değerine ulaşmıştır. Bu değerlere göre 5. günden 10. güne kadar kondrojenezin hızla arttığı, 10. günden 15. güne kadar ise yavaşladığı yorumu yapılabilir.

Çizelge 3.1. 4S-PEG ile çapraz bağlı PHEMA-Kitosan nanofiberi üzerine kültüre edilen 6×10^5 kondrositin 5. , 10. ve 15. günlerdeki DNA miktarları

5. Gün	10. Gün	15. Gün
175, 7 ng/ml	189, 7 ng/ml	313, 7 ng/ml

Çizelge 3.2. 4S-PEG çapraz bağlı PHEMA-Kitosan nanofiberi üzerine kültüre edilen 2×10^4 adet kondrosit hücresinin 5. , 10. ve 15. günlerdeki GAG ve DNA miktarları ile GAG/DNA oranları

	GAG MİKTARI	DNA MİKTARI	GAG/DNA ORANI
5. GÜN	12, 45 $\mu\text{g/ml}$	5, 92 ng/ml	$21, 03 \times 10^2$ ng/ng
10. GÜN	18, 09 $\mu\text{g/ml}$	6, 31 ng/ml	$28, 67 \times 10^2$ ng/ng
15. GÜN	24, 16 $\mu\text{g/ml}$	10, 53 ng/ml	$22, 94 \times 10^2$ ng/ng

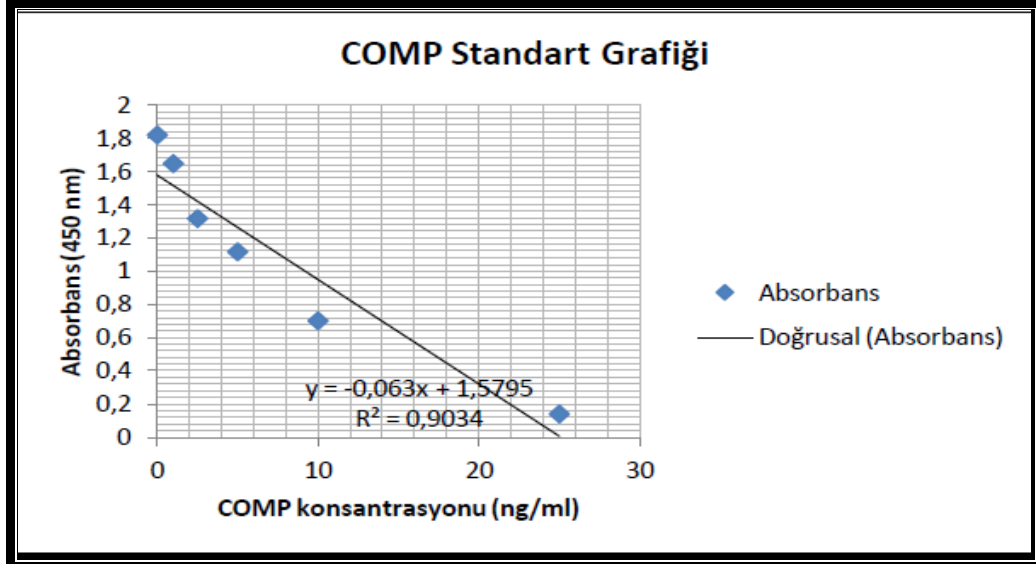
3.8. Kıkırdak Oligomerik Matris Proteini COMP Belirlenmesi

Matriks gelişiminde özellikle kollajen liflerinin sentezinde önemli rol oynayan COMP proteini kıkırdak dokuda bol miktarda bulunmaktadır. Ancak COMP molekülünün matriks içerisindeki miktarında bir azalma olması durumunda erken dönemde eklem hastalığı olan osteoartrit gözlenmektedir.

Bizim çalışmamızda COMP konsantrasyonunda en iyi artışın 10. Günde gerçekleştiği görüldü. Bunun sebebi olarak ise hücre canlılığı bağlı olarak 15. Günde, 10. Güne oranla daha düşük seviyede olduğu gözlemlendi. Çalışmamızda, COMP'un ekspresyonu üzerine konsantrasyon ve zamana bağlı etkiler gösterdi.

Çizelge 3.3. 4S-PEG çapraz bağlı PHEMA-Kitosan nanofiberine yapılan COMP uygulamasına ait standartlar, konsantrasyon ve absorbands değerleri aşağıda verildi. Bu değerler ELISA kitinde bulunan standartlar ve 450 nm' de okunan absorbands değerleri

Standartlar	COMP konsantrasyonu (ng/ml)	Absorbans (450 nm)
A	0	1,818
B	1	1,647
C	2,5	1,316
D	5	1,116
E	10	0,701
F	25	0,14



Şekil 3.25. COMPkitinde bulunan standart solüsyonların içeriğine göre hazırlanan COMP standart grafiği

Yukarıda verilen COMP standart grafiğine göre kontrol grubu ve nanofiber grubu değerlendirildi

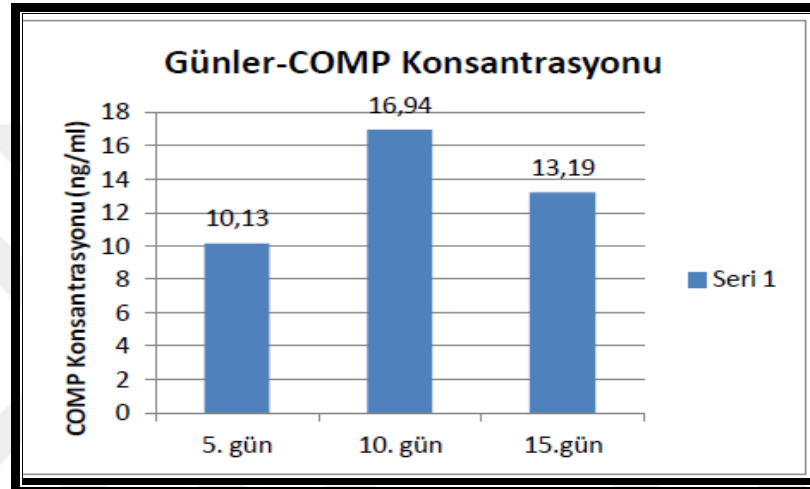
Çizelge 3.4. 4S-PEG PHEMA-Kitosan nanofiberi üzerine ekilen kondrositlerin 5. , 10. Ve 15. Gün örneklerinin ortalama absorbans

	5. gün örnekleri	10. gün örnekleri	15. gün örnekleri
Ortalama absorbans değerleri	1,2125	0,6455	1,164

ELİSA'da okuması gerçekleştirilen absorbans değerleri verildi. Bu değerler doğrultusunda hem örnek hem kontrol grafikleri çıkarıldı ve iki grup arası karşılaştırma yapıldı.

Ölçülen örneklerin absorbans değerlerine bakılarak, standart grafiğindeki eğim doğrusunun formülüne göre, her bir örneğin COMP (Cartilage Oligomeric Matrix Protein) içeriği ng/ml cinsinden hesaplanıp aşağıdaki grafikte gösterildi(Şekil 3. 25).

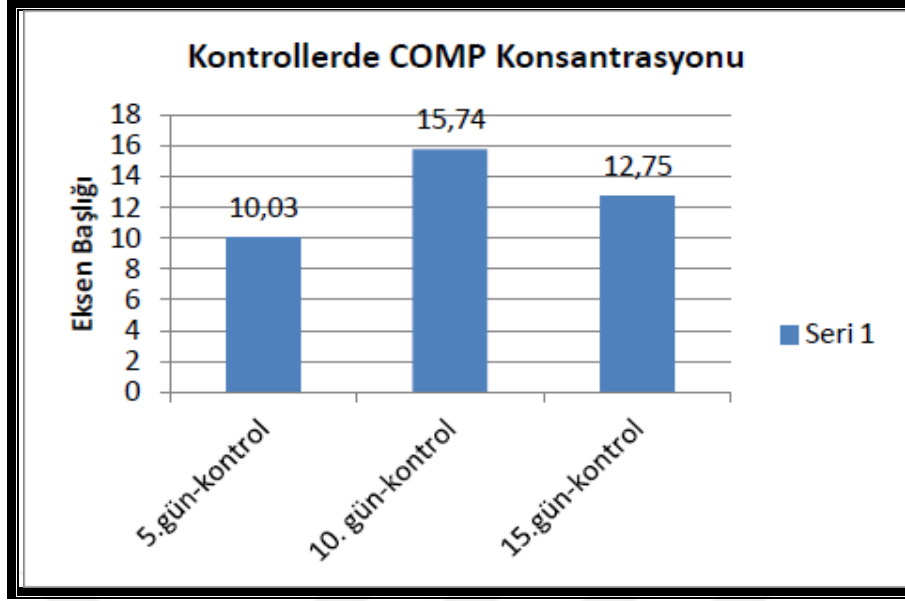
Farklı zaman aralıklarına göre değerlendirilen COMP konsantrasyonu 5. Günde hücre sayısında çok fazla artış olmadığından dolayı COMP miktarında fazla bir artış gözlemlenmedi. Ardından 10. Güne bakıldığında ise hücre yoğunluğu arttı ve COMP miktarında en yüksek artışın olduğu belirlendi. 15. günde ise hücrelerde canlılık kaybı olduğu göz önüne alındığında COMP miktarında 10. Güne oranla azalma meydana geldiği ifade edildi.



Şekil 3. 26. 4S-PEG PHEMA-Kitosan nanofiberi üzerine ekilen kondrositlerin 5. , 10. Ve 15. Gün örneklerinin COMP konsantrasyon grafiği

Farklı zaman aralıklarındaki COMP konsantrasyon sonuçlarına göre sırasıyla 5. Gün 10. 13, 10. Gün 16. 94, 15. Gün 13. 19 gösterildi.

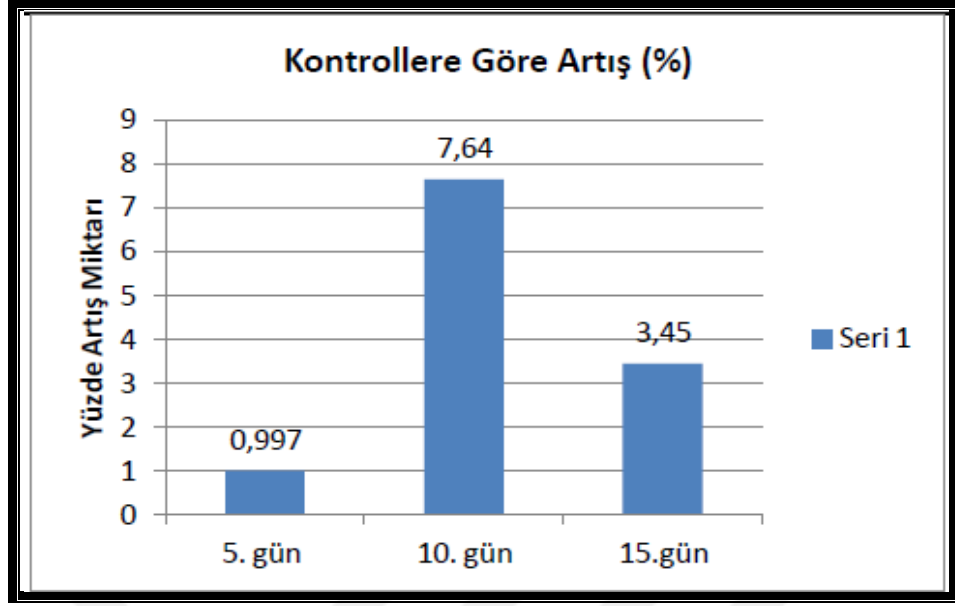
Aşağıda COMP miktarı nanofiber grubunun karşılaştırılacağı kontrol grubu verildi. Kontrol grubunda yine nanofiberle paralel olarak 10. Günde en iyi sonuca ulaşıldığı belirlendi.



Şekil 3.27. Kontrol olarak ekimi yapılan kondrositlerin 5. , 10. Ve 15. Gün örneklerinin COMP konsantrasyon grafiği

Farklı zaman aralıklarındaki COMP konsantrasyon sonuçlarına göre sırasıyla 5. Gün kontrol 10. 03, 10. Gün kontrol 15. 74, 15. Gün kontrol 12. 75 gösterildi.

Kontrollere göre COMP miktarının yüzde artışının gösterildiği grafiğebaktığımızda 5. Gün % artış miktarı 0. 997, 10. Güne göre artış miktarı 7. 64, 15. Güne göre artış miktarı 3. 45 olarak belirlendi. COMP konsantrasyonunda en iyi artışın 10. Günde gerçekleştiği görülmektedir. 15. Günde ise kontrol olarak ekimi yapılan kondrosit hücrelerinin zamana bağlı olarakcanlılığında azalma olduğu düşünüldüğü için 10. Güne oranla daha düşük seviyede bir artış meydana geldiği belirlendi.

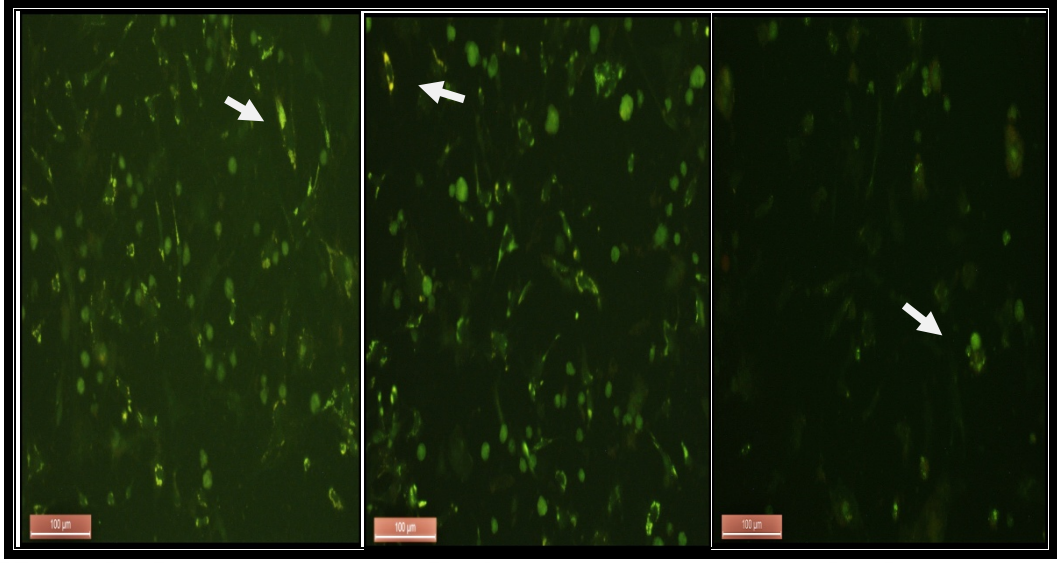


Şekil 3.28. COMP'un kontrole göre artış grafiği

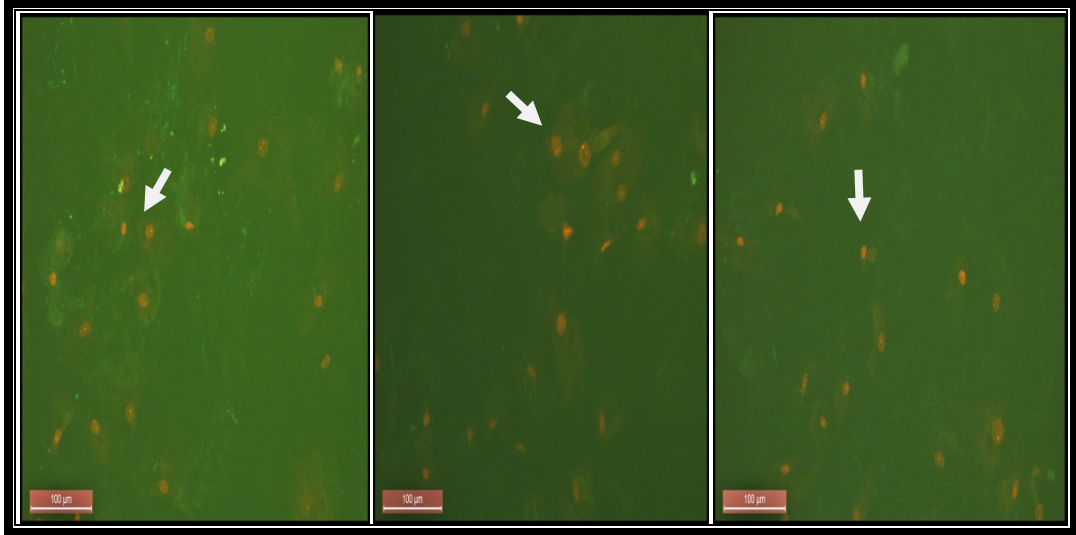
3.9. Annexin V İle Apoptoz-Nekroz Sonuçları

Annexin-V canlılık testi metodu ile apoptoz belirlenebilmektedir. Şekil 3.26'da gösterildiği gibi Annexin-v boyası apoptotik hücreleri membranlarındaki antikorlar ile reaksiyonundan dolayı apoptotik hücreler yeşil olarak gözlemlenmiştir. Nekrotik hücrelerin tespiti için ayrıca propotiyum iodid (PI) boyası kullanılmıştır. PI boyası ölü hücrelere ve plazma mebranı zarar görmüş hücrelere direk olarak girer ve bu hücrelerin çekirdeklerinin floresan ışığı altında kırmızı gözükmesini sağlar. Bunun da nedeni hasarlı ve ölü hücrelerin membranlarının geçirgen olmasıdır. Yani kısaca; Ölü Hücreler: PI ile çok iyi boyanır, Annexin V ile boyama zayıftır. Canlı Hücreler: PI ile boyanmaz, Annexin V ile hafif silik boyanır. Geç Apoptotik hücreler: PI ve Annexin V ile boyanabilir ancak çok geç evrelerde annexin V ile boyama gerçekleşmez. Erken Apoptotik Hücreler: PI ile hiç boyanmaz, Annexin V ile iyi boyanır.

Aşağıda Nekrotik hücrelerin çekirdekleri kırmızı, sağlıklı ya da apoptotik hücrelerin çekirdekleri yeşil olarak farklı zaman aralıklarında gözlemlenen floresan ataçmanlı inverted mikroskop görüntüleri verildi. Annexin V ile boyanan hücrelerin nükleusları parlak yeşile boyanmaktadır.

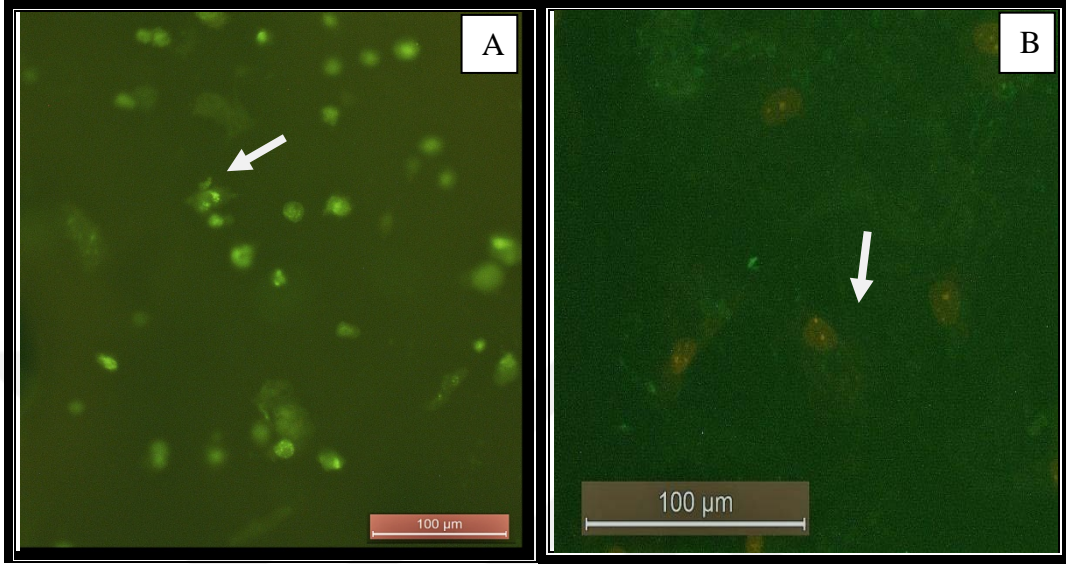


Şekil 3.29. Kondrositlerin kütürün kontrol grubunun sırasıyla 5. , 10. Ve 15. günlerine ait Annevin-V FITC ile apoptoz mikrograf görüntüleri.(Bar=100µm, büyütme 20x, Floresan ataçmanlı inverted mikroskop Leica DM6000B ile görüntülendi). Annexin V ile boyanan ve Parlak yeşil olarak görülen, ok yardımıyla belirtilen hücreler apoptozu ifade etmektedir.

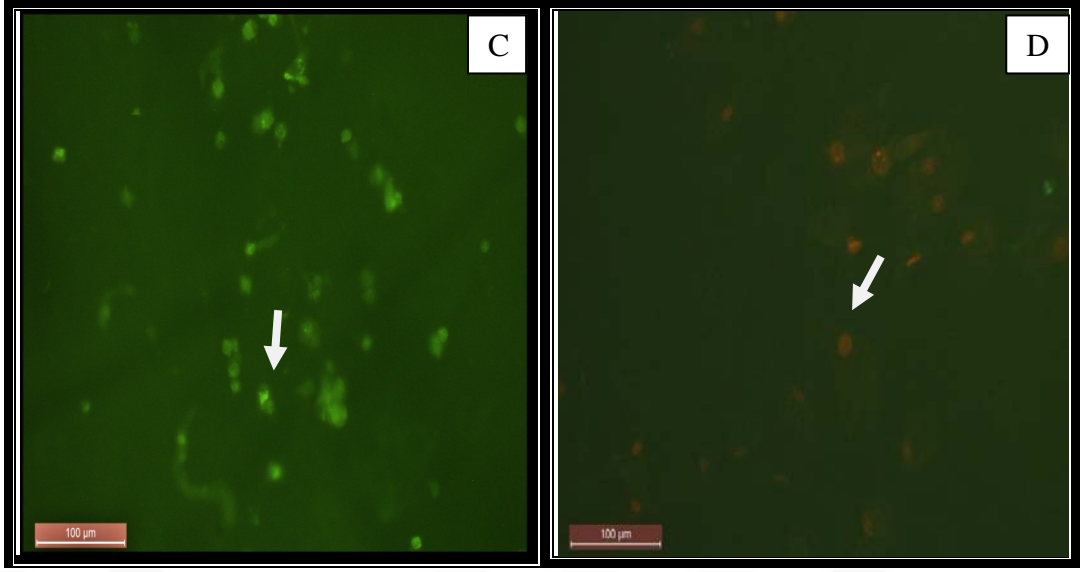


Şekil 3.30. Kondrositlerin kütürün sırasıyla kontrol grubunun 5. , 10. Ve 15. günlerine ait propidyum iodid ile nekroz mikrograf görünüşleri (Bar=100µm, büyütme 20x) Annexin V ile boyanan ve Parlak kırmızı

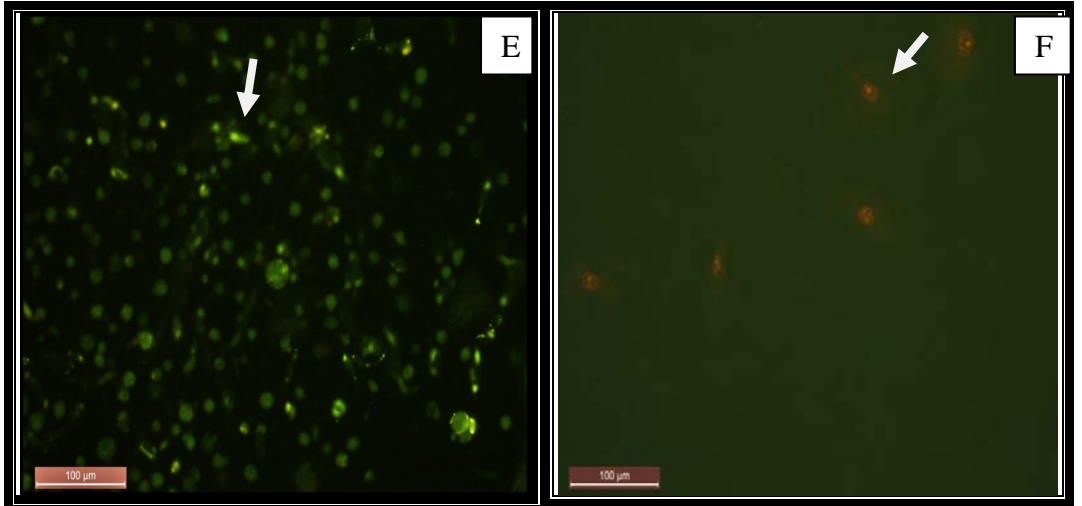
olarak görülen, ok yardımıyla belirtilen hücreler nekrozu ifade etmektedir.



Şekil 3.31. Nanofiber üzerine ekilen kondrositlerin kültürün 5. Gününde Annexin-V ile canlılıklarının mikrograf görüntüleri(Bar=100µm, büyütme 20x, Floresan ataçmanlı inverted mikroskop Leica DM6000B ile görüntülendi) **A)**Annexin V ile boyanan ve Parlak yeşil olarak görülen, ok yardımıyla belirtilen hücreler apoptozu ifade etmektedir. **B)** Propidyum iodid ile boyanan ve kırmızı olarak görülen ok yardımıyla belirtilen hücreler nekrozu ifade etmektedir.



Şekil 3.32. Nanofiber üzerine ekilen kondrositlerin kültürün 10. Gününde Annevin-V ile canlılıklarının mikrograf görüntüleri(Bar=100m, büyütme 20x, Floresan ataçmanlı inverted mikroskop Leica DM6000B ile görüntülendi) **C)**Annexin V ile boyanan ve Parlak yeşil olarak görülen, ok yardımıyla belirtilen hücreler apoptozu ifade etmektedir. **D)** Propidyum iodid ile boyanan ve kırmızı olarak görülen ok yardımıyla belirtilen hücreler nekrozu ifade etmektedir.



Şekil 3.33. Nanofiber üzerine ekilen kondrositlerin kültürün 15. Gününde Annexin-V ile canlılıklarının mikroskop görüntüleri (Bar=100µm, büyütme 20x, Floresan ataçmanlı inverted mikroskop Leica DM6000B ile görüntülendi) **E)** Annexin V ile boyanan ve Parlak yeşil olarak görülen, ok yardımıyla belirtilen hücreler apoptozu ifade etmektedir. **F)** Propidyum iodyum ile boyanan ve kırmızı olarak görülen ok yardımıyla belirtilen hücreler nekrozu ifade etmektedir.

Kontrol grubunda 5.gün %14,52 apoptoz ile 12,58 nekroz oranı, 10.gün 12,34 apoptoz ile 8,75 nekroz oranı, 15.gün % 8,40 apoptoz ile 9,02 nekroz oranı belirlendi.

Annexin V boyama sonucuna göre nanofiber üzerine ekili hücrelerde 5. gün %12, 72 apoptoz ile %9, 09 nekroz oranı, 10. gün %10, 81 apoptoz ile % 6, 75 nekroz oranı, 15. gün ise % 6. 25 apoptoz ile %7, 81 nekroz oranı belirlendi. kontrol gruplarına göre 3 boyutlu kültür ortamında hücre çoğalmasında ve hücre canlılığında artış gözlemlendi.

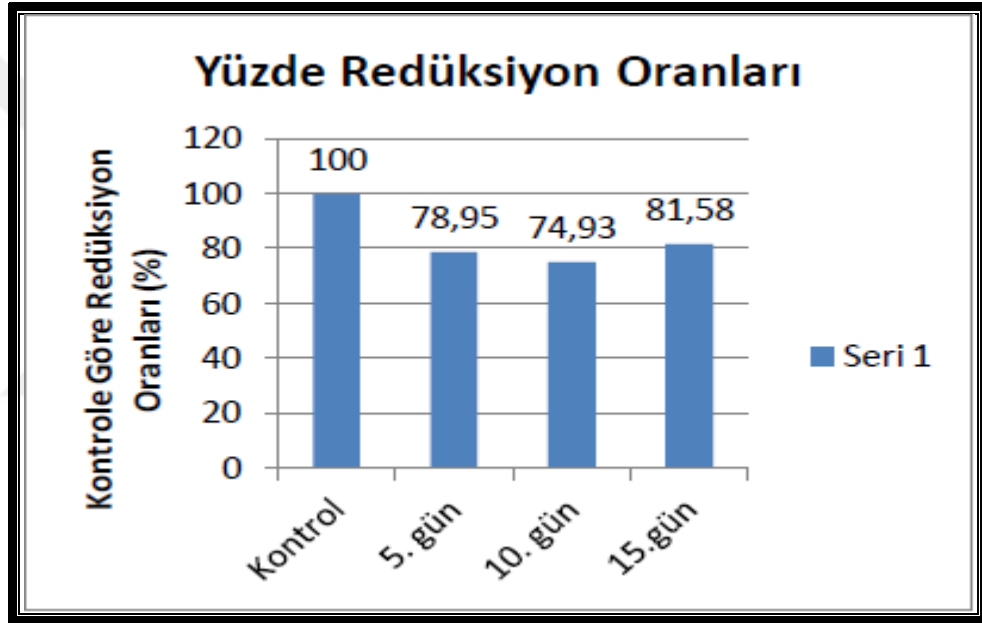
3. 10. Alamar Blue Sonuç

Elimizde olan protokol doğrultusunda, Alamar blue boyasının yüzde kaçının redüklendiği yani alamar mavisinde azalma olduğu , nanofiber olmadan kültür plağının kuyucuğuna ekili hücrelerin pozitif kontrol olarak kullanılarak, hem nanofibere hücre ekili kuyucukların hem de kontroller arasındaki farkın ifade edilerek sitotoksitesinin ölçümü yapıldı. Yapılan işlemler ve elde edilen grafik, aşağıda gösterildi.

Alamar Blue'ın uzun bir inkübasyon periyodundan sonra bile hücreler üzerinde toksik etkileri olmadığı ve çok çeşitli hücre konsantrasyonları üzerinde doğrusal bir eğri verdiği söylenmektedir.

Çizelge 3.5. 4S-PEG PHEMA-Kitosan nanofiberi üzerinde ekili olan kondrosit hücrelerinin ve kontrollerin 5. , 10. Ve 15. gün örneklerinin 570 ve 600 nm ‘deki ortalama değerleri

	5. gün (570 nm)	5. gün (600)	10 gün (570 nm)	10. gün (600 nm)	15. gün (570 nm)	15. gün (600 nm)
Örnekler	0,5045	0,2445	0,3865	0,178	1,75	1,35
Kontroller	0,51	0,122	0,545	0,28	3,413	3,499



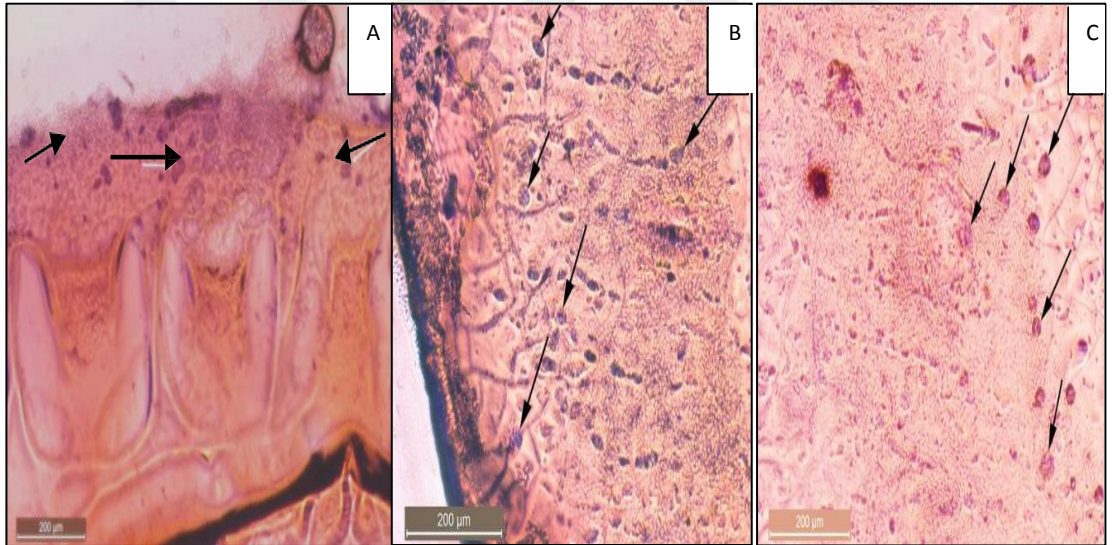
Şekil 3.34. Alamar blue yüzde redüksiyon grafiği

Kontrollerin redüksiyon oranının % 100 olduğu durumda, 5. Gün örneği %**78, 95**; 10. Gün örneği %**74, 93**; 15. Gün örneği %**81, 58** redüksiyon oranı verildi(Şekil 3. 31). Sonuçlara göre, 5. , 10. ve 15. Gün örnekleri arasında, hücre canlılığı açısından önemli bir fark görülmemektedir. Aynı zamanda tüm örneklerde canlılığın %70 üzerinde olduğu sonucuna da ulaşıldı.

3. 11. Hematoksilen-Eozin Boyama Sonucu

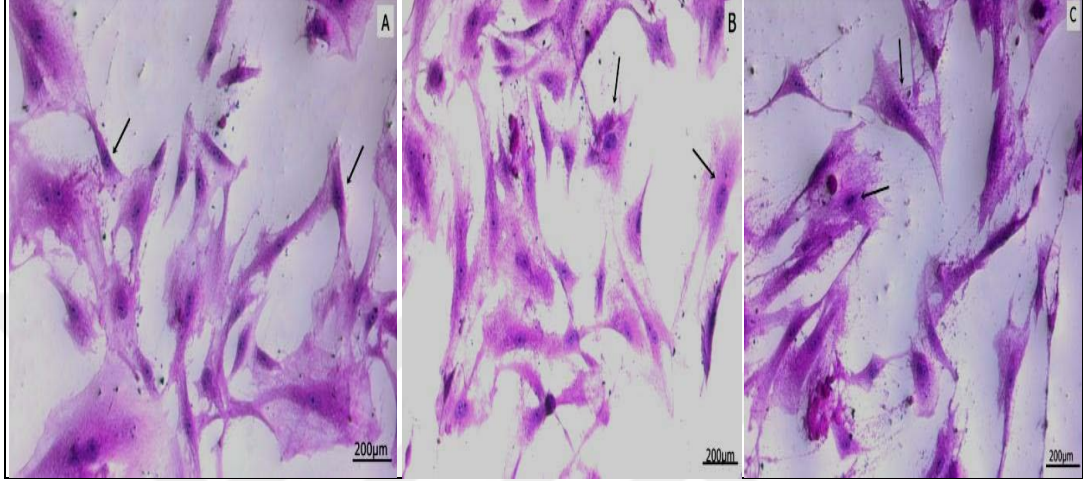
Hematoksilen alkali pH'da bir boya maddesi olup hücre çekirdeğini ve kalsiyum çöküntülerini kırmızıya boyamaktadır. Eozin ise sitoplazma, protein birikimi gibi yapıları pembeye boyadığı bilinmektedir. Kısaca çalışmamızda, kondrosit ekili 4S-PEG çapraz bağlı PHEMA nanofiberinin hematoksilen-eozin boyaması farklı zaman aralıklarında yapılmıştır. Hücrelerin çekirdek ve sitoplazmalarının boyandığı gözlemlenmektedir.

Aşağıda 5. , 10. ve 15. gün için hücre ekimi yapılan nanofiberlere hematoksilen-eozin boyama görülmektedir. Hücrelerin şekilleri yuvarlak olarak değerlendirilebilmektedir. Gün sayısı arttıkça daha iyi boyanma göze çarpmaktadır. 5. , 10. Ve 15. günlerdeki hücrelerin nanofiber üzerine ekili ve gömülü bir halde olmasından dolayı boyama görülmektedir.



Şekil 3.35. 4S-PEG ile çapraz bağlı pHEMA nanofiberleri üzerinde ekilen kondrositlerin Hematoksilen-Eozin boyamasından sonra ışık mikroskop görüntüleri (Bar=200µm, büyütme 10x, İverted mikroskop Leica DM6000B ile görüntülendi). **A)** kültürün 5. , **B)** 10. , ve **C)** 15. günlerine ait fotoğraflar . Hematoksilen-eozin ile boyanan hücreler ok yardımıyla gösterildi.

Ayrıca kontrol amaçlı olarak boyamaların karşılaştırılması için 2-boyulu kültür ortamına kondrosit ekilerek farklı zaman aralıklarında (5. , 10. , 15. gün) hematoxilen eozin boyamaları yapıldı.



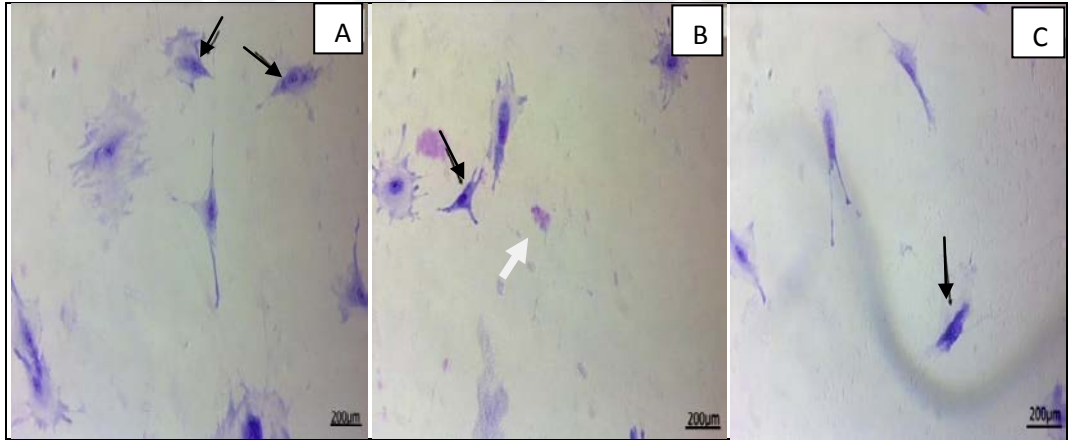
Şekil 3.36. 4S-PEG ile çapraz bağlı pHEMA nanofiberleri üzerinde ekilen kondrositlerin Hematoxilen-Eozin boyamasından sonra ışık mikroskop görüntüleri (Bar=200μm büyütmeye 20x, İverted mikroskop Leica DM6000B ile görüntülendi). **A)** kültürün 5. , **B)** 10. , ve **C)** 15. günlerine ait fotoğraflar . Hematoxilen-eozin ile boyanan hücreler ok yardımıyla gösterildi.

2-boyutlu kültür ortamındaki hücrelerde de hematoxilen eozin boyaması gözlemlendi ancak hücre morfolojilerinin fenotipik özelliklerini kaybetmeye başladıkları sonucuna ulaşıldı. 3-boyutlu kültür ortamında bulunan kondrositlerin morfolojilerinin kendilerine has yapılarını yani yuvarlıklarını korudukları gözlemlendi.

3.12. Toluidin Blue Boyama Sonucu

Kondrositlerin GAG sentezlerini ve mitotik aktivitelerini belirlemek adına toluidin blue boyaması yapılmıştır. Bu boya bazik bir boyadır ve sülfat gruplarını mavi renge boyamaktadır. Kondrositlerin GAG sentezini ayırt etmek için kullanılmıştır. Yapılan toluidin blue tekniği kondrositlerin GAG sentezini ayırt etmek için kullanılmıştır. GAG sentezleyebilen hücrelerin sitoplazmalarının etrafında daha koyu mavi renkte çember oluşması beklenmektedir.

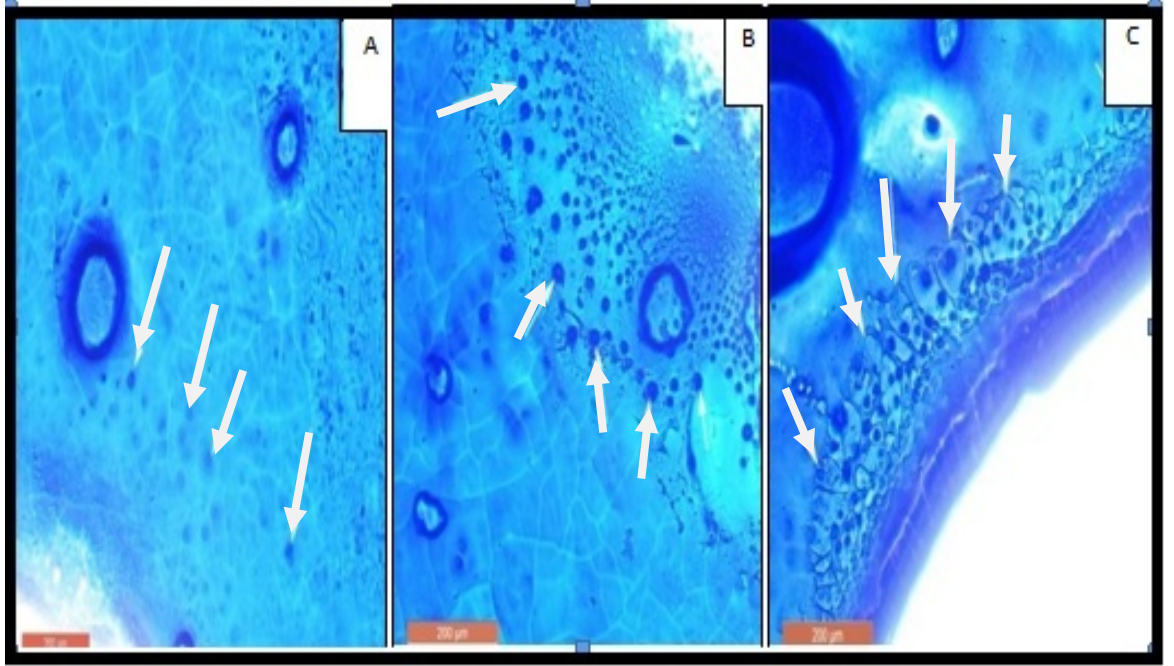
Kontrol amaçlı nanofiber olmadan 5. , 10. ve 15. gün için hücre ekimi yapılan kuyucuklarda boyama tekniğinin çalıştığı sitoplazmanın etrafında oluşan koyu mavi renkli boyamaların görülmesiyle belirlenmiştir. Aşağıda 2-boyutlu kültür ortamında ekilen kondrositlerin toluidin blue boyamasına ait fotoğraflar verildi.



Şekil 3.37. 4S-PEG ile çapraz bağlı pHEMA nanofiberleri üzerinde ekilen kondrositlerin Hematoksilen-Eozin boyamasından sonra ışık mikroskop görüntüleri(Bar=200µm, Büyütme 20x, İverted mikroskop Leica DM6000B ile görüntülendi)**A)** kültürün 5. , **B)** 10. , ve **C)** 15. günlerine ait fotoğraflar . Toluidin blue ile boyanan hücreler ok yardımıyla gösterildi. Beyaz ok ile gösterilen boyamalar metakromatik boyamaları ifade etmektedir.

Boyamanın görüldüğü yerlerde metakromotik boyamalarda rastlandı. Bunun yanında hücre morfolojilerinde değişme olduğu fenotipik özelliklerini kaybetmeye başladıkları gözlemlendi. Ayrıca 5. , 10. ve 15. güne ait nanofiber üzerine ekili ve hapsolan hücrelerin sitoplazma etrafındaki koyu mavi GAG boyanması görülmektedir. Toluidien boyamaları sonucunda kondrositlerin çoğalmaya başladığı, GAG sentezine başlayarak kendi matrikslerini oluşturmaya başladıkları gözlemlendi.

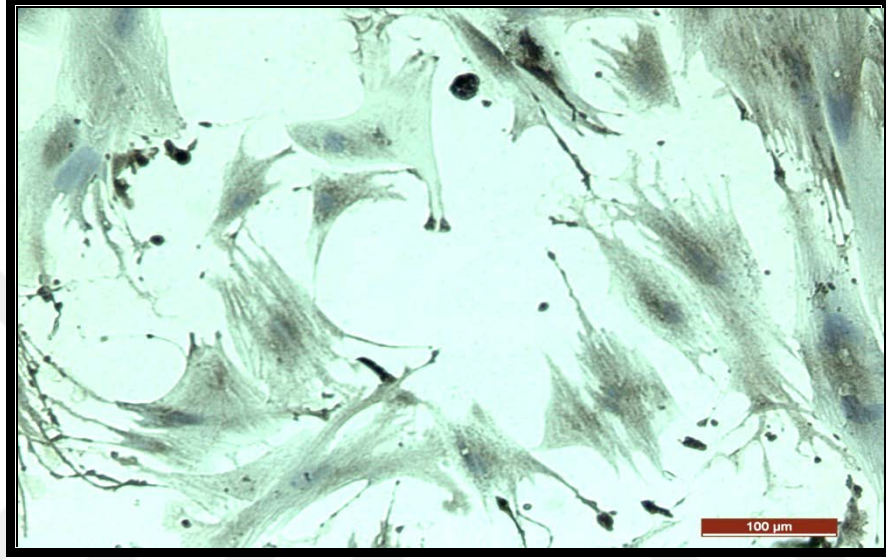
Aşağıda nanofiberler üzerine ekilmiş olan hücrelerdeki toluidin blue boyama resimleri verildi.



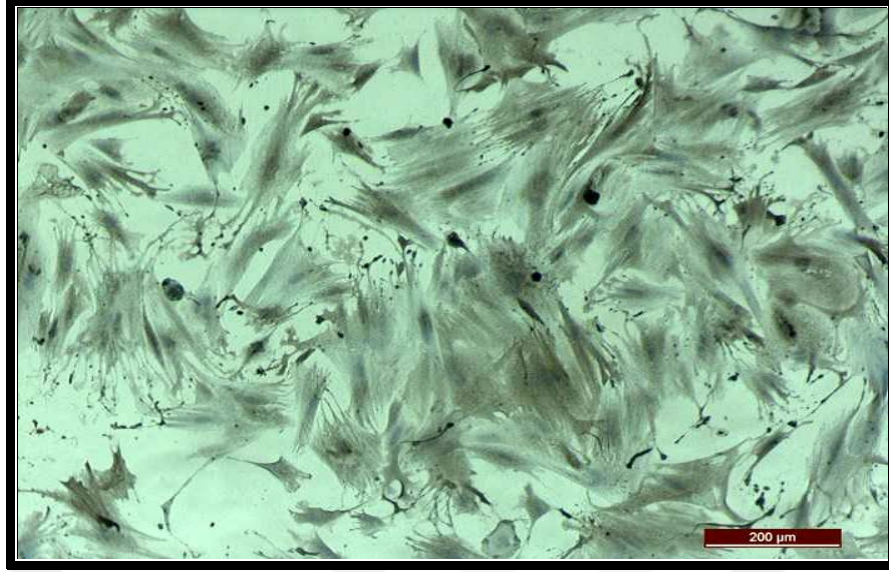
Şekil 3.38. 4S-PEG ile çapraz bağlı pHEMA nanofiberleri üzerinde ekilen kondrosit hücrelerinin toluidin blue boyamasından sonra ışık mikroskop görüntüleri (Bar=200µm, büyütme 20x, Inverted mikroskop Leica DM6000B ile görüntülendi) **A)** kültürün 5. , **B)** 10. , ve **C)** 15. günlerine ait fotoğraflar

3.13. İmmüsitokimyasal Analiz

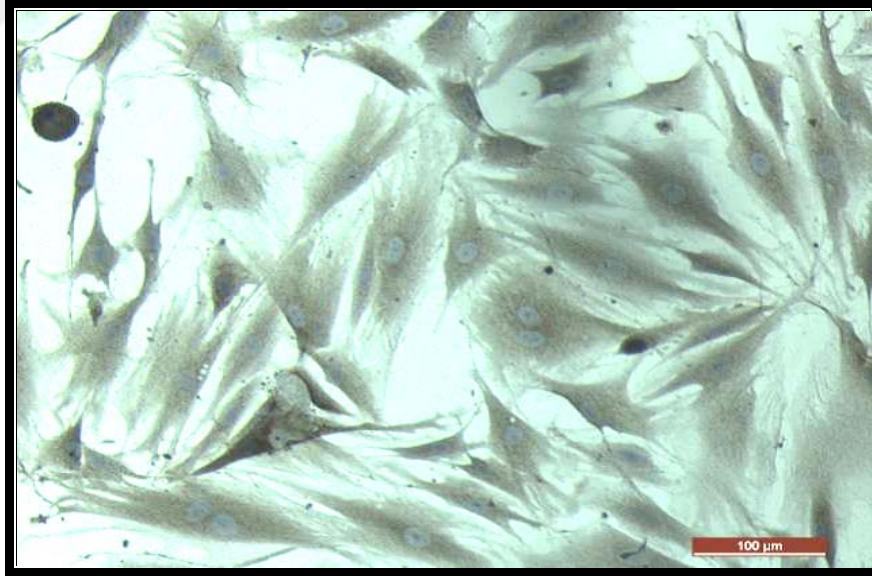
Aşağıda kondrosit hücrelerinin farklı zaman aralıklarına bağlı olarak kollagen tip II antikoruyla boyanmaları verildi. Boyanma sonuçlarına göre gün sayısı arttıkça kondrositlerin kendi morfolojilerini kazanmalarına bağlı olarak kısmen de olsa kollogen tip II boyamasının gerçekleşmeye başladığı görüldü.



Şekil 3.39. 4S-PEG ile çapraz bağlı pHEMA nanofiberleri üzerinde ekilen kondrosit hücrelerinin İmmüsitokimyasal analizi ile collagen tip II ile boyama sonrasında ışık mikroskop görüntüleri kültürün 5. günü (Bar=200μm, büyütme 20x, Inverted mikroskop Leica DM6000B ile görüntülendi)



Şekil 3. 40. 4S-PEG ile çapraz bağlı pHEMA nanofiberleri üzerinde ekilen kondrosit hücrelerinin İmmünsitokimyasal analizi ile collagen tip II ile boyama sonrasındaışık mikroskop görüntüleri kültürün 10. günü(Bar=200μm, büyütme 20x, Inverted mikroskop Leica DM6000B ile görüntülendi).

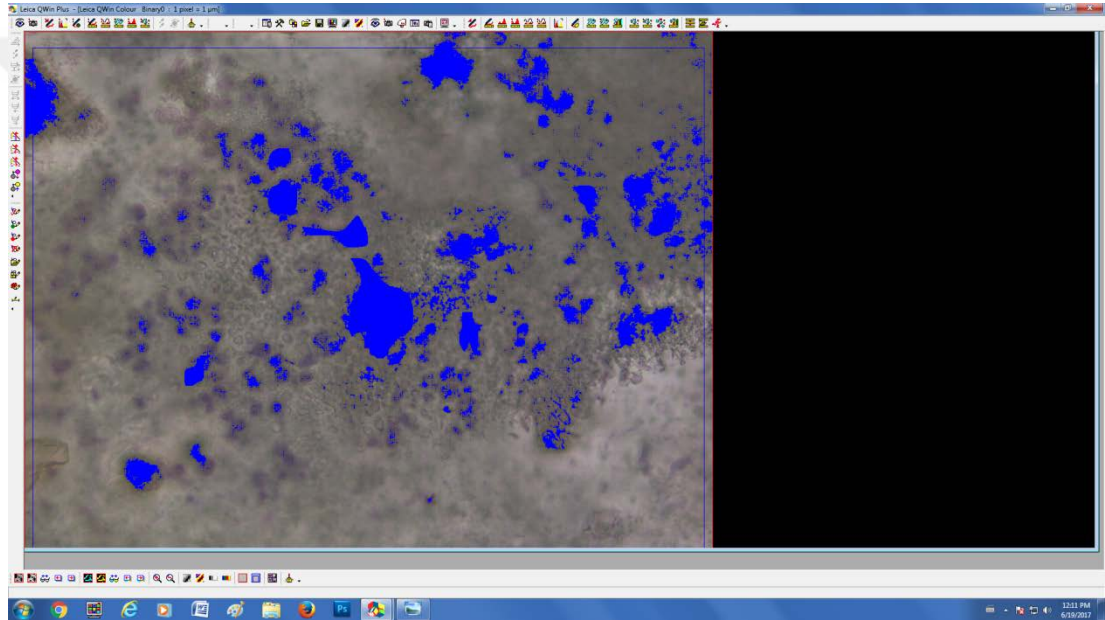
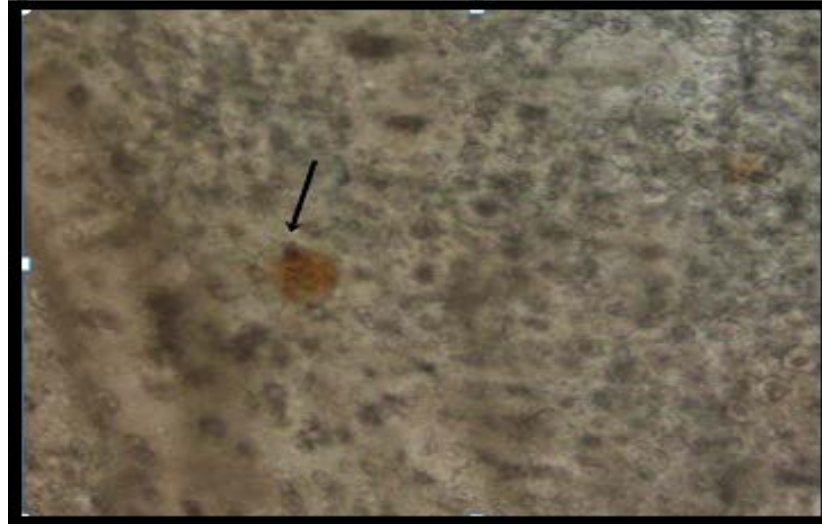


Şekil 3.41. 4S-PEG ile çapraz bağlı pHEMA nanofiberleri üzerinde ekilen kondrosit hücrelerinin İmmünsitokimyasal analizi ile collagen tip II ile boyama sonrasındaışık mikroskop görüntüleri kültürün

15. günü(Bar=200µm, büyütme 20x, İnverted mikroskop Leica DM6000B ile görüntülendi).

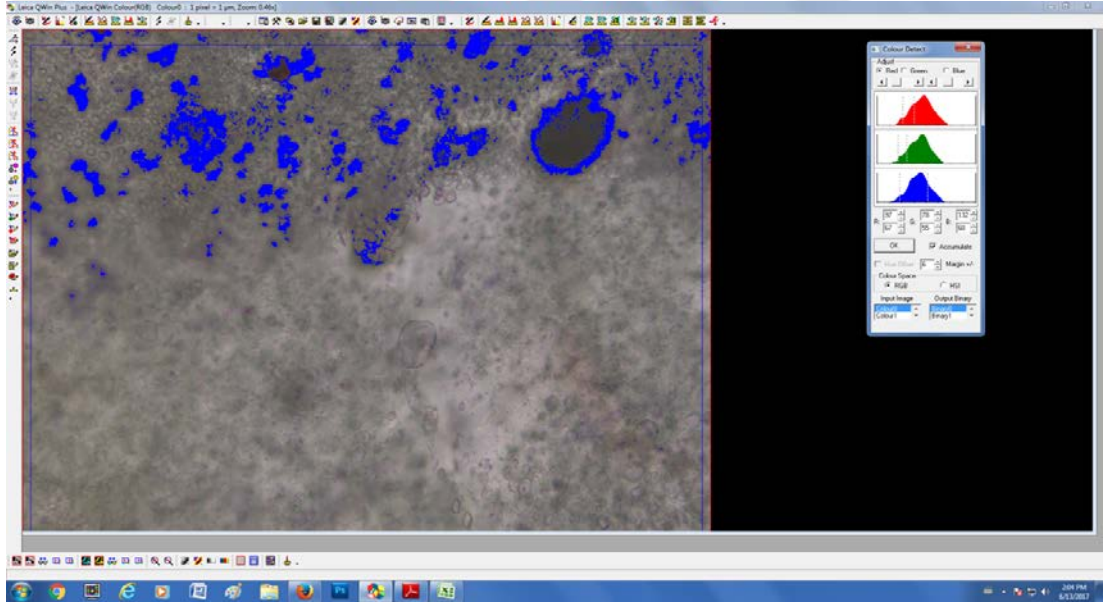
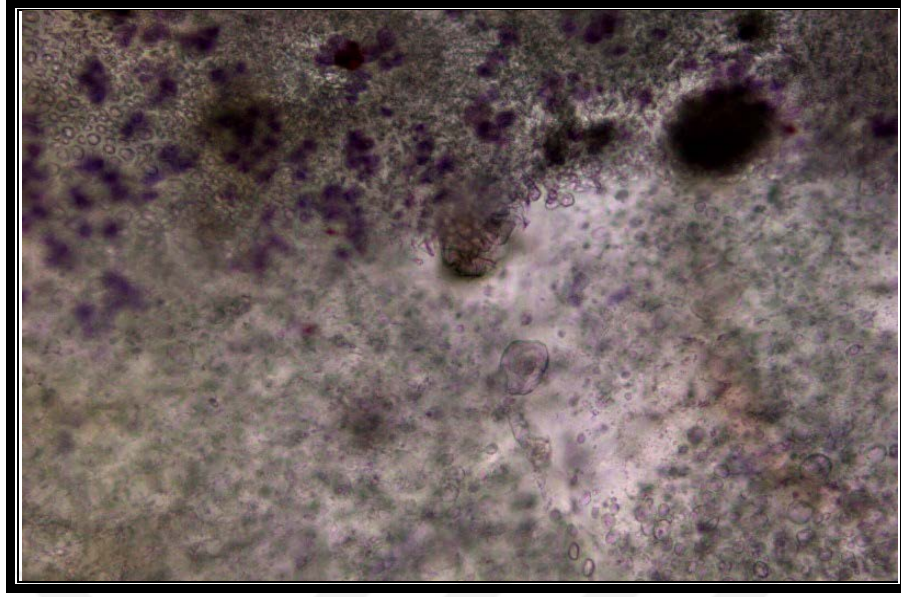
3.14. İmmünohistokimyasal analiz sonucu

İmmünohistokimya çalışmalarımızda kollogen tip II (NBP2-33343, Novus)'nin kondrositleri boyadığı bilinmektedir. Ancak çalışmamızda kondrosit hücrelerinin nanofiber yüzeyinde sınırlı sayıda görülmesine rağmen boyama gerçekleşti. Boyamanın ardından % kaç boyama olduğu (Leica CTR6000) Inverted mikroskopta yapıldı.Aşağıda nanofiberin kollagen tip II boyamasına ait görüntüleri verilmektedir.



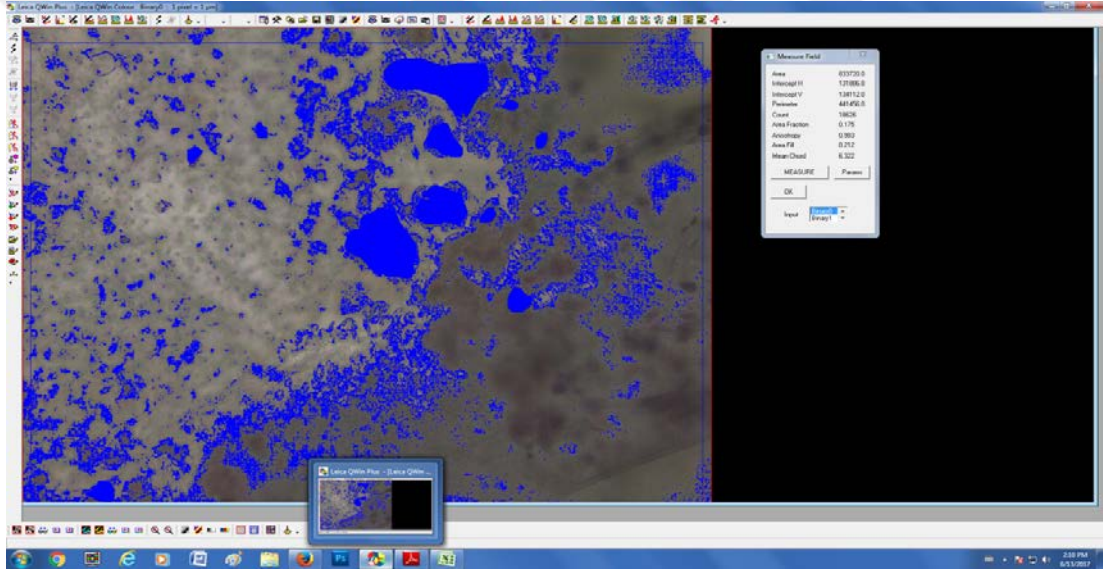
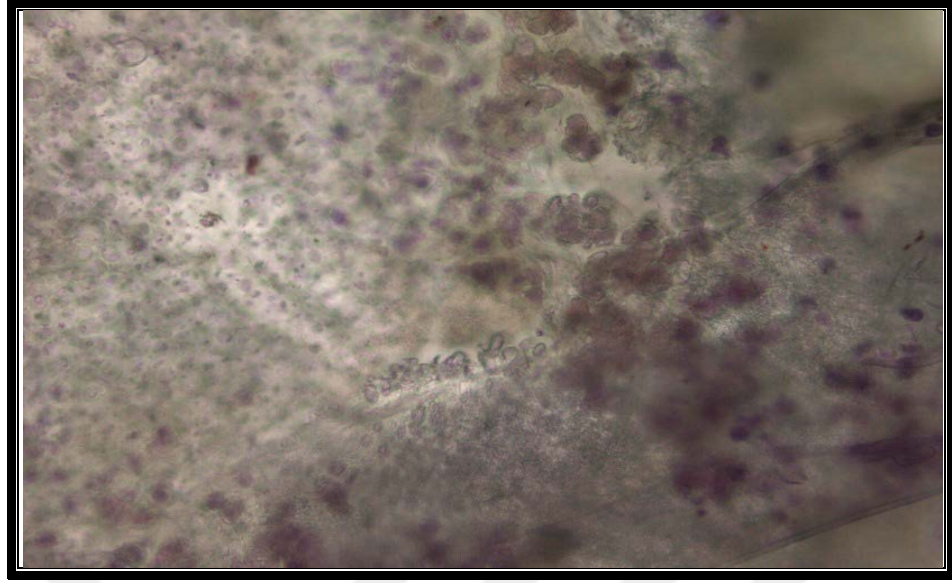
Şekil 3.42. 4S-PEG ile çapraz bağlı pHEMA nanofiberleri üzerinde ekilen kondrosit hücrelerinin İmmünohistokimyasal analizi ile collagen tip II ile boyama sonrasında ışık mikroskop görüntüsü kontrol grubu

Yapılan kollogen tip II boyama sonucu nanofiber üzerinde ekili kondrositlerde %8.02 boyamanın gerçekleştiği görüldü.



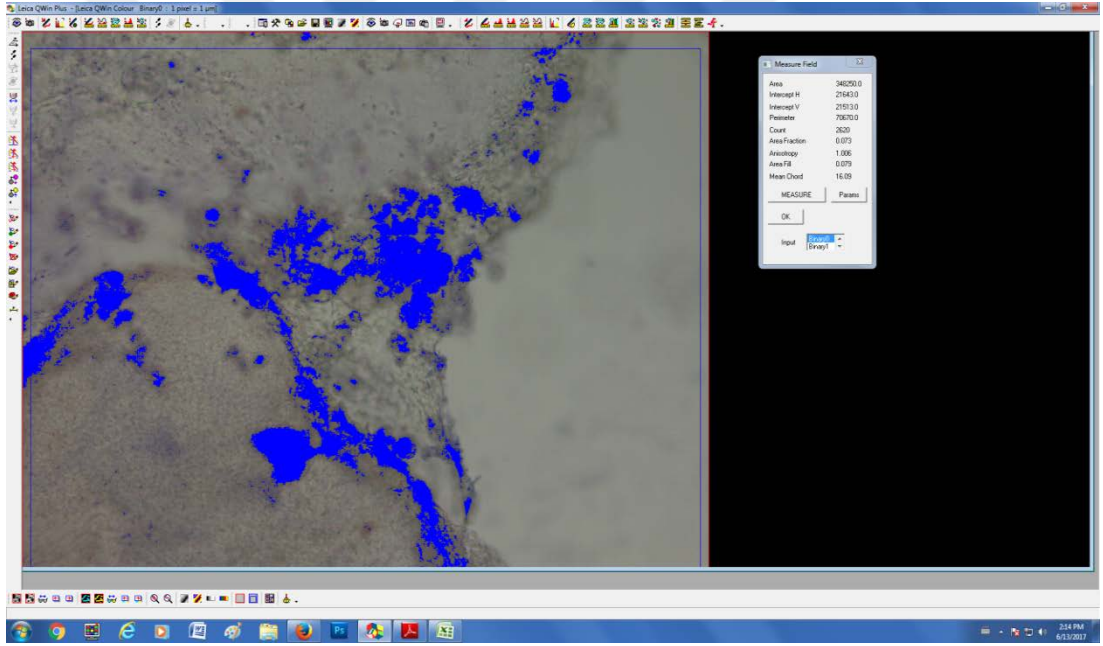
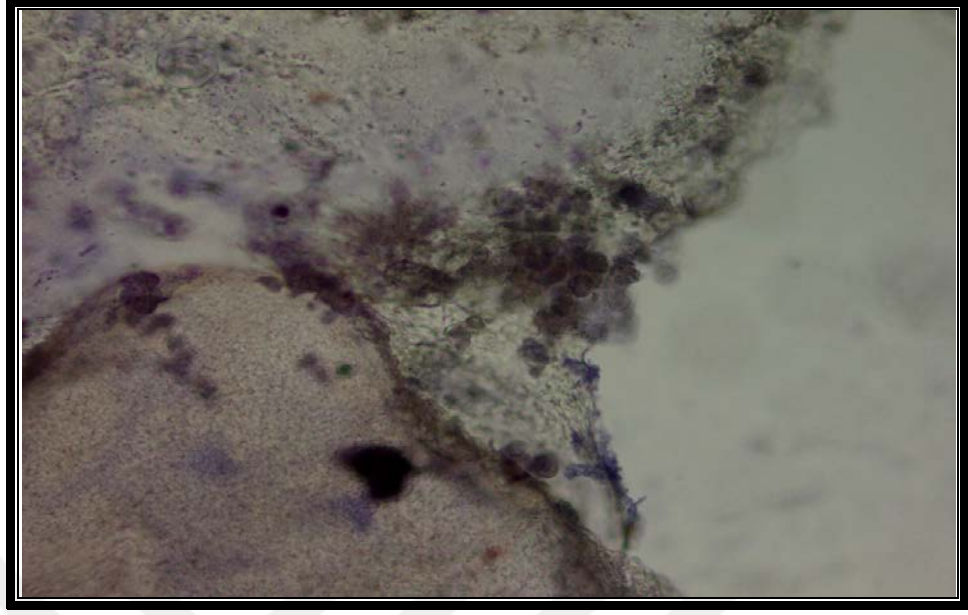
Şekil 3.43. 4S-PEG ile çapraz bağlı pHEMA nanofiberleri üzerinde ekilen kondrosit hücrelerinin 5. günde İmmünohistokimyasal analizi ile collagen tip II ile boyama sonrasındaişik mikroskop görüntüsü ve yapılan analiz sonucu

Yapılan kollogen tip II boyama sonucu nanofiber üzerinde ekili kondrositlerde % 4, 81 boyamanın gerçekleştiği görüldü. Bu durumda nanofiber üzerine ekili kondrositlerin henüz tam olarak re-diferansiye olmadıkları kanısına varıldı.



Şekil 3.44. 4S-PEG ile çapraz bağlı pHEMA nanofiberleri üzerinde ekilen kondrosit hücrelerinin 10. günde İmmünohistokimyasal analizi ile collagen tip II ile boyama sonrasında ışık mikroskop görüntüsü ve yapılan analiz sonucu

Yapılan kollogen tip II boyama sonucu nanofiber üzerinde ekili kondrositlerde % 13. 90 boyamanın gerçekleştiği görüldü. Bu durumda nanofiber üzerine ekili kondrositlerin zaman aralıkları boyunca re-diferansiyonlarının gerçekleştiği sonucuna ulaşıldı.



Şekil 3.45. 4S-PEG ile çapraz bağlı pHEMA nanofiberleri üzerinde ekilen kondrosit hücrelerinin 15. günde İmmünohistokimyasal analizi ile collagen tip II ile boyama sonrasında ışık mikroskop görüntüsü ve yapılan analiz sonucu

Yapılan kollogen tip II boyama sonucu nanofiber üzerinde ekili kondrositlerde % 17. 51 boyamanın gerçekleştiği görüldü. Bu durumda nanofiber

üzerine ekili kondrositlerin kendi morfolojilerini kazandıkları yani re-diferansiye oldukları belirlendi.

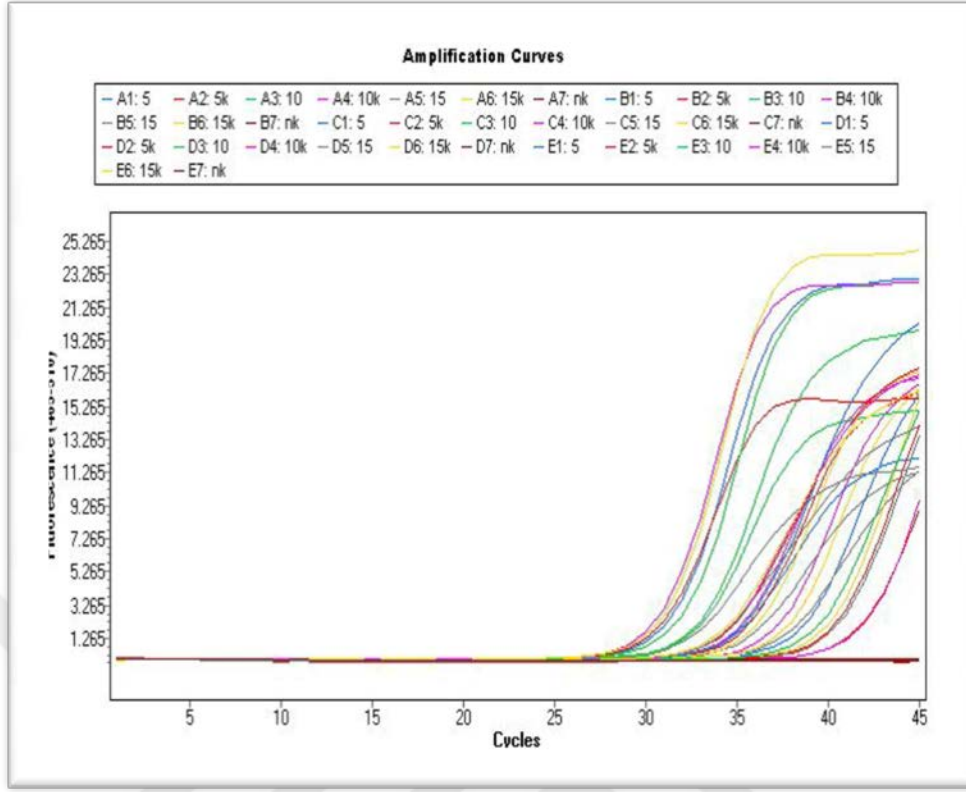
Farklı zaman aralıklarına göre gerçekleştirilen kollogen tip II boyamalarının kontrole göre artış göstererek meydana geldiği belirlendi. Bunun sonucunda zaman aralıklarıyla kondrositlerin kendi morfolojik yapılarına dönüştükleri saptandı.

3. 15. Polimer Zincir Reaksiyonu (Pzr) Kondrosit Fenotipinin Belirlenmesinden Elde Edilen Sonuçlar

Kondrosit fenotipinin belirlenmesi için en önemli parametrelerden biri kollogen tip II, SOX9 ve aggrecan sentezinin belirlenmesidir. Bu durumun sonucunda kondrositlerin 3-boyutlu kültür ortamında fenotiplerinin kaybedip kaybetmedikleri anlaşılacaktır.

Farklı zaman aralıklarında 3-boyutlu kültür ortamında tohumlanan kondrositlerden ilk önce m-RNA izole edildi. Daha sonra elde edilen mRNA'lardan kollogen tip I, kollogen tip II, SOX9, aggrecan ve GADPH (housekeeping gen) 'dan cDNA senteziyle karakterizasyonlarına bakıldı.

Çalışma sonucunda nanofiber üzerine ekili hücrelerin düz hücre kültürüne göre farklı zaman aralıklarındaki inkübasyon sürelerinde gün sayısı arttıkça kısmen de olsa sentezlerde artış olduğu belirlendi. Sırasıyla amplifikasyon eğrisine göre A değeri GADPH referans genini, B değeri aggrecan hedef genini, C değeri kollogen tip I hedef genini, D değeri Kollogen tip II hedef genini ve E değeri ise SOX9 hedef genini gösterdi.



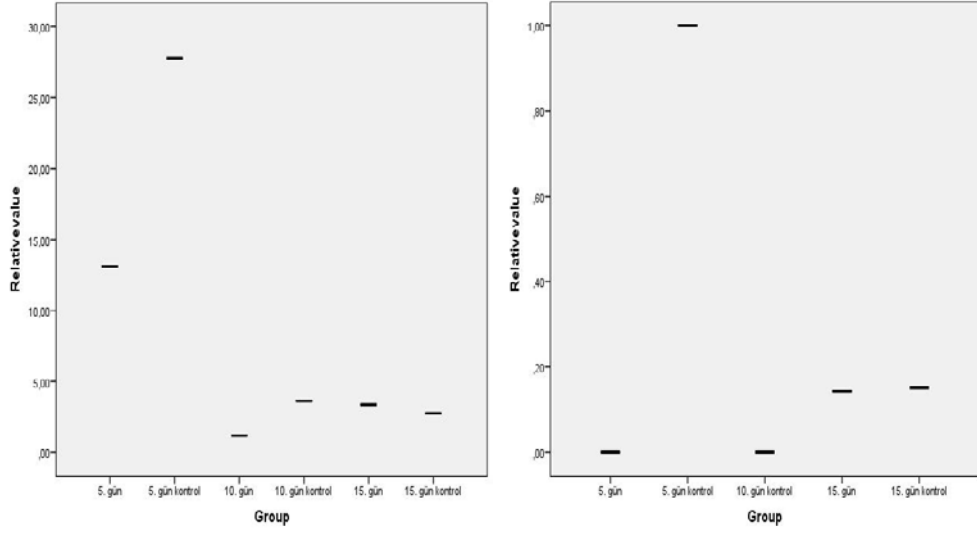
Şekil 3.46. Real Time PCR sonucu elde edilen Amplifikasyon Eğrisi Grafiği

Gerçek zamanlı PCR analizinde target oranı ne kadar düşük olursa kullanılan örnekte o kadar çok Nükleik asit oranı var demektir. Buna göre elde edilen hedef gen ve referans gen sonuçlarına göre; Genel itibariyle referans genin tüm örneklerde birbirine yakın olduğu belirlendi. Agrecann primeri ile GADPH referans geni kıyaslandığında hedef gen ile referans gen oranlarının ve sayılma sayılarının arasında çok fazla fark olmadığı görüldü. Kollogen I hedef gen ile GADPH referans gen kıyaslandığında hemen hemen aynı değerler görüldü ve spesifik bir bağlanma olmadığı belirlendi. Kollogen II hedef gen ile GADPH referans gen kıyaslandığında maksimum referans gen 40.00 çıktığında hedef gendeki nanofibere ait 5. ve 10. günlerdeki örneklerin değeri maksimum 31.20 oranında olduğu görüldü. Bu durumda hedef gen hem düz hücre kültürüne göre hem de referans gene göre az da olsa artış gösterdiği belirlendi. Son olarak SOX9 hedef gen ile referans gen kıyaslandığında 10. gün hariç diğer gün aralıklarında nanofibere ait günlerde düz hücre kültürüne göre az da olsa referans gene kıyasla artış görüldü.

Bar Chart	Pairing	Sample Name	Target Name		Tgt Cp Mean	Ref. Cp Mean	Ratios		Corr/Multi Factor	Status
			Targets	References			Tgt/Ref.	Norm		
<input checked="" type="checkbox"/>	B1/A1	5	agrecann	gadph	34.66	38.38	13.11		1/1	
<input checked="" type="checkbox"/>	B2/A2	5k	agrecann	gadph	35.20	40.00	27.79		1/1	
<input checked="" type="checkbox"/>	B3/A3	10	agrecann	gadph	32.49	32.72	1.177		1/1	
<input checked="" type="checkbox"/>	B4/A4	10k	agrecann	gadph	34.96	36.82	3.622		1/1	
<input checked="" type="checkbox"/>	B5/A5	15	agrecann	gadph	35.45	37.20	3.362		1/1	
<input checked="" type="checkbox"/>	B6/A6	15k	agrecann	gadph	35.81	37.27	2.744		1/1	
<input checked="" type="checkbox"/>	C1/A1	5	kol I	gadph		38.38	0		1/1	
<input checked="" type="checkbox"/>	C2/A2	5k	kol I	gadph	40.00	40.00	1.000		1/1	
<input checked="" type="checkbox"/>	C3/A3	10	koll	gadph		32.72	0		1/1	
<input checked="" type="checkbox"/>	C5/A5	15	koll	gadph	40.00	37.20	0.1435		1/1	
<input checked="" type="checkbox"/>	C6/A6	15k	koll	gadph	40.00	37.27	0.1505		1/1	
<input checked="" type="checkbox"/>	D1/A1	5	kolll	gadph	31.20	38.38	144.6		1/1	
<input checked="" type="checkbox"/>	D2/A2	5k	kolll	gadph	30.46	40.00	742.1		1/1	
<input checked="" type="checkbox"/>	D3/A3	10	kolll	gadph	31.77	32.72	1.940		1/1	
<input checked="" type="checkbox"/>	D4/A4	10k	kolll	gadph	30.54	36.82	77.35		1/1	
<input checked="" type="checkbox"/>	D5/A5	15	kolll	gadph	32.11	37.20	33.96		1/1	
<input checked="" type="checkbox"/>	D6/A6	15k	kol II	gadph	30.89	37.27	83.14		1/1	
<input checked="" type="checkbox"/>	E1/A1	5	sox9	gadph	35.47	38.38	7.490		1/1	
<input checked="" type="checkbox"/>	E2/A2	5k	sox9	gadph	34.60	40.00	42.09		1/1	
<input checked="" type="checkbox"/>	E3/A3	10	sox9	gadph	40.00	32.72	6.45E-3		1/1	
<input checked="" type="checkbox"/>	E4/A4	10k	sox9	gadph	34.45	36.82	5.160		1/1	
<input checked="" type="checkbox"/>	E5/A5	15	sox9	gadph	33.83	37.20	10.30		1/1	
<input checked="" type="checkbox"/>	E6/A6	15k	sox9	gadph	34.09	37.27	9.071		1/1	

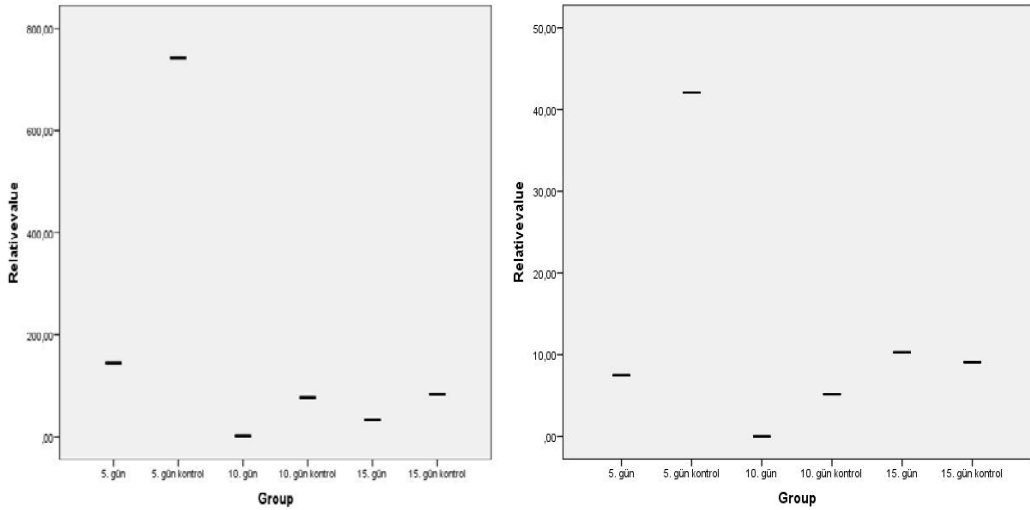
Şekil 3.47. Real Time PCR hedef gen ve referans gen sonuçları

Agrecangen ve Collagen tip I için Mann Whitney U testi yapıldı ve grupların karşılaştırmalı matriks değerleri($p < 0.05$) oranındabelirildi. bu durumda çok anlamlı bir fark olmadığı yorumu yapıldı ve analiz Ct değerleri baz alınarak değerlendirildi.



Şekil 3.48. Agrecan ve Collagen tip I geni için relative değerlerin karşılaştırma grafiği

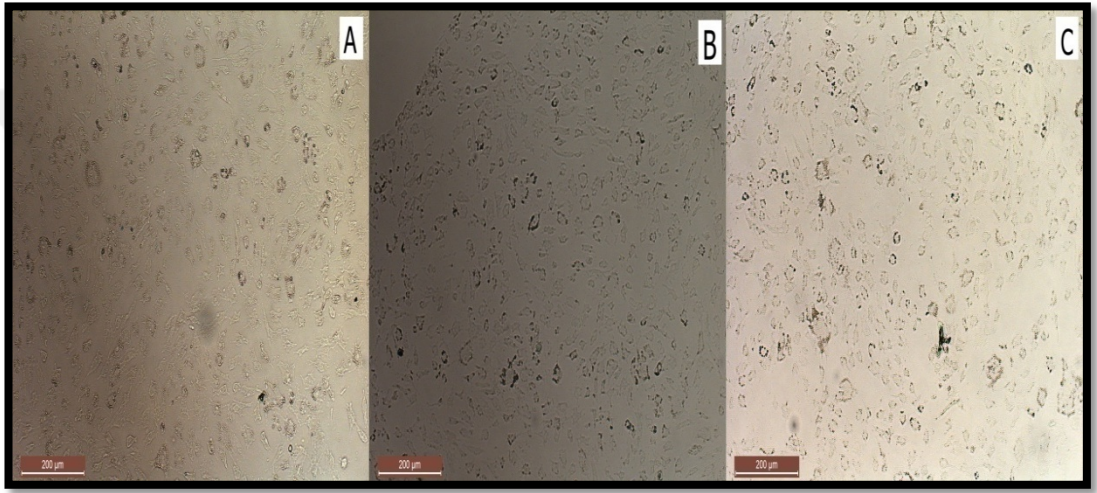
SOX9 ve Collagen tip II genleri için Mann Whitney U testi yapıldı ve grupların karşılaştırmalı matris değerleri ($p < 0.05$) oranında belirlendi. Bu durumda çok büyük bir fark olmadığı yorumu yapıldı ve analiz Ct değerleri baz alınarak değerlendirildi.



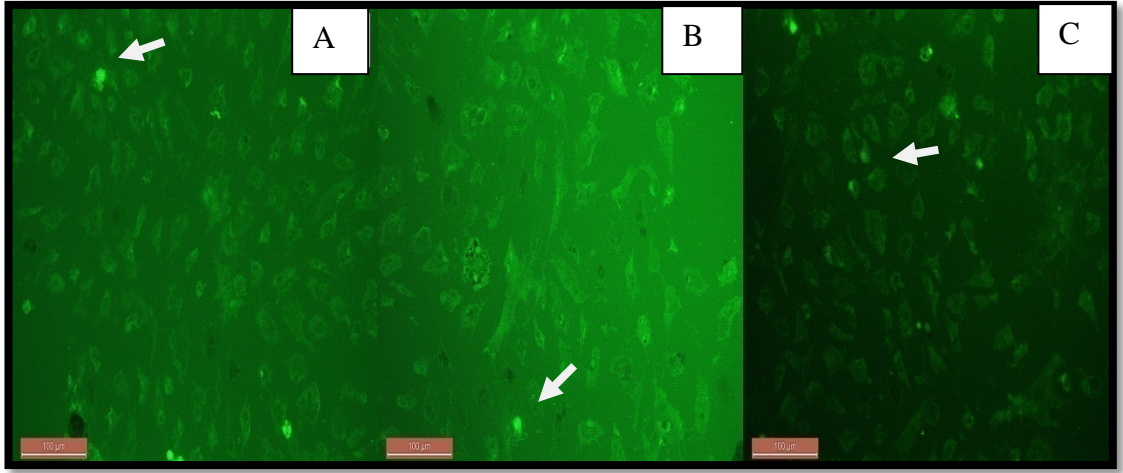
Şekil 3.49. SOX9 ve Collagen tip II geni için relative değerlerin karşılaştırma grafiği

3. 16. İmmüno Floresan İle Cd44 Antikoru İşaretlenmesi

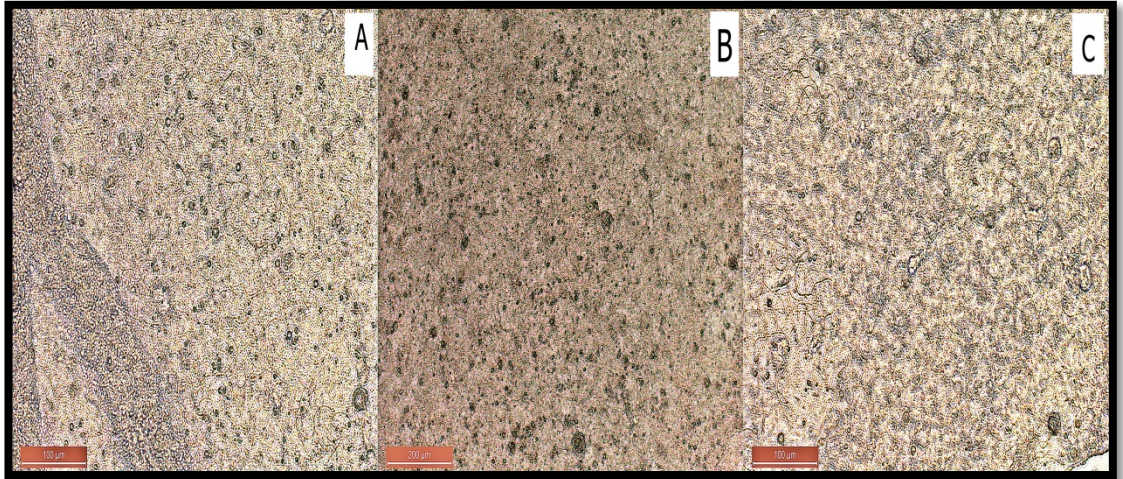
İmmüno Floresan boyama hem iki boyutlu kültür ortamında hem de üç boyutlu yani nanofiber üzerinde kültür yapılan kondrositler üzerine gerçekleştirildi. Floresan boyama için kondrosit yüzey markırı olan CD44 FITC işaretli antikoru (NBP2-22530F) kullanıldı. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda FITC işaretli antikor olan CD44 antikorunun kondrositler üzerinde ışığa yaptığı belirlendi.



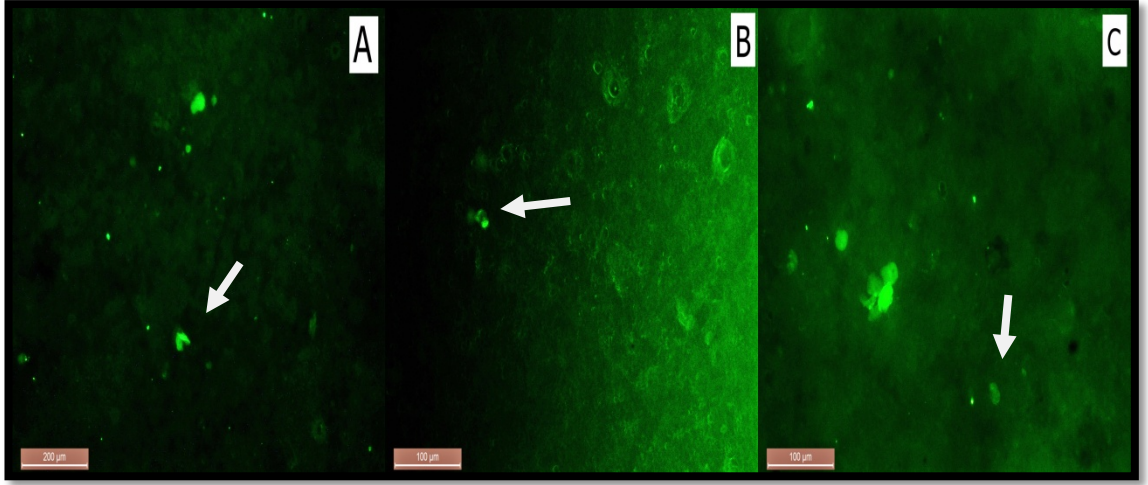
Şekil 3.50. Kondrositlerin iki boyutlu kültür ortamında ışık mikroskop görüntüsü (bar=200µm, büyütme 10x, Floresan ataçmanlı inverted mikroskop Leica DM6000B ile görüntülendi) **A**-5. gün kondrosit kültürü **B**-10. gün kondrosit kültürü **C**-15. gün kondrosit kültürü



Şekil 3.51. Kondrositlerin iki boyutlu kültür ortamındaki kullanılan FITC işaretli CD44 antikoruna ile yapılan floresan boyama mikroskop görüntüsü (bar=200µm, büyütme 10x, Floresan ataçmanlı inverted mikroskop Leica DM6000B ile görüntülendi).Antikor ışması ok ile gösterildi. **A**-5. gün kondrosit kültürü **B**-10. gün kondrosit kültürü **C**-15. gün kondrosit kültürü



Şekil 3.52. Kondrositlerin 4S-PEG çapraz bağlı PHEMA-Kitosan nanofiber üzerinde kültürü sonucu mikroskop görüntüsü (bar=200µm, büyütme 10x, Inverted mikroskop Leica DM6000B ile görüntülendi) **A**-5. gün kondrosit kültürü **B**-10. gün kondrosit kültürü **C**-15. gün kondrosit kültürü



Şekil 3.53. Kondrositlerin 4S-PEG çapraz bağlı PHEMA-Kitosan nanofiber üzerinde kültürü sonucu kullanılan FITC işaretli CD44 antikoruna ile yapılan floresan boyama mikroskop görüntüsü. (Bar=200μm, büyütme 10x, Floresan ataçmanlı inverted mikroskop Leica DM6000B ile görüntülendi).Antikor ışınması ok ile gösterildi. **A**-5. gün kondrosit kültürü **B**-10. gün kondrosit kültürü **C**-15. gün kondrosit kültürü.

4. TARTIŞMA

Kıkırdak doku insan hayatı boyunca sürekli stres altındadır ve bu nedenle doku hasarına neden olmaktadır. Kıkırdak doku, avasküler bir doku olduğu için kıkırdağın kendi kendine onarım için çok sınırlı bir kapasiteye sahip olduğundan ihtiyaç duyulduğunda büyüme faktörlerine sahip olmaması ile hasar sorunu daha da kötüleşmektedir (Hunziker., 2002).

In vitro ortamda kıkırdak dokudan izole edilen kondrositlerin 2-boyutlu kültür ortamında varlıkları inverted ışık mikroskobunda incelendiğinde karakteristik olan yuvarlak şekillerinin zaman içerisinde ovalleştikleri yani fenotipik özelliklerini kaybettikleri gözlemlenmiştir. 2-boyutlu kültür ortamında kondrositlerin dediferansiye oldukları görülmüştür. Bu nedenle destek malzemesinin 3-boyutlu olarak seçilmesi kondrositin gelişimi ve morfolojik özelliklerini koruyabilmesi için oldukça önemli bir unsurdur.

Furukawa ve ark., 2003 yılında yaptığı çalışmaya istinaden 2-boyutlu invitro kültürde kondrositin fenotipik özelliğini kaybettiği kanıtlanmıştır. Bu durumu önlemek amacıyla 3-boyutlu invitro kültür ortamı için, kondrositlerin kendi doğal ortamlarına benzeyen yeni kültür ortamları geliştirilmeye başlanmıştır (Frukawa ve ark., 2003).

Rotter ve ark., 1998 yılında yaptıkları bir çalışmayla kondrositin 3-boyutlu invitro kültür ortamında kendi ekstraseller matrikslerini oluşturmaya kıkırdaklaşmaya başladıklarını gözlemlemişlerdir (Rother ve ark., 1998).

Sentetik ve doğal biyomalzemeler üzerine yerleştirilen kıkırdak hücrelerinin uygun buldukları ortamlara bağlanıp geliştikleri ve buldukları polimerik yapıyı yapay ekstraselüler matriks olarak benimsedikleri bilinmektedir.

Biyomalzemelerin bazı hasarlı dokuların yerini alması için vücuda implante edilmesi beklenmektedir. Araştırmalar göre, hücrelerin çoğalmasını, farklılaşmasını, kimyasal ve fiziksel işlevselliklerle yeni nesil bir biyomateryal geliştirildi. Bu durumun, dokuların ve organların kontrollü olarak onarılmasına neden olabileceği düşünülmektedir. Bu nedenle biyomalzemeler, rejeneratif tıp ve doku mühendisliği için iyi bir potansiyel sergilemektedirler. Özellikle, biyomedikal ürünleri *in vitro* olarak yeniden üretmek için kullanılabilirler.

Sentetik biyolojik olarak parçalanabilir polimerlerin işlevselleştirilmesi, bu biyomalzemelerin uygulama kapsamını genişlettiği ve biyomedikal alanındaki ilerlemeleri büyük ölçüde teşvik ettiği düşünülmektedir.

Gao ve ark., 2004 yılında HEMA, poliüretanın metakrilik asit, akrilamid, hidroksietil metakrilat veya *N,N*-dimetilaminoetil metakrilat aşılama polimerizasyonu ile modifiye edilmiştir. Modifiye poliüretan iskeletlerinin *in vitro* insan endotel hücre kültürleri, modifiye edilmemiş kontrol matrisine kıyasla gelişmiş hidrofilitik ve endotel hücre adezyonu gösterilmiştir (Gao ve ark., 2004; Mao ve ark., 2007).

Elektrospining geleneksel olarak lif üretimi yapılan yöntemlere göre daha iyi sonuç vermekte ve maliyet olarak oldukça düşük olduğu bilinmektedir. Literatüre göre normal şartlar altında sentetik polimerlerden fiber, üretimi üstten aşağı püskürtmeyle olurken, çalışmamızda PHEMA çözeltisini soldan sağa doğru püskürtme yaparak nanofiber boyutunda lif üretimini gerçekleştirildi (Li ve ark., 2009). Çalışmamızda PHEMA üzerine kitosan polimerini elektroçirme yaparak daha verimli daha dayanıklı bir polimer elde etme çalışmaları yapıldı.

Kitosanın pozitif yüzey yükü ve biyoyumluluk, hücrenin büyümesini etkin bir şekilde desteklemesini sağladığı bilinmektedir. Fakat sulu ortamda sadece asit varlığında çözündüğünden biyomedikal uygulamalar için kullanımında tereddüt yaşanmıştır. Bu nedenle birçok araştırmacı özelliklerini değiştirme yoluna gitmiştir (Casimiro ve ark., 2005).

Casimiro (2005) yılında yaptığı bir çalışmaya göre homojen koşullar altında foto-polimerizasyon yaparak elde ettiği pHEMA'yı kitosan üzerine aşılama yapmıştır. Bu aşılamanın varlığını FTIR spektrumları ile kanıtlamıştır. Ancak yaptığı çalışmada reaksiyonlarının verimliliğini destekleyen birkaç özelliğe vurgulama yapmıştır. Bunlardan başlatıcı konsantrasyonu, başlangıç monomer konsantrasyonu ve doz oranının etkisi olarak söz edilmiştir.

Plieva ve ark., 2006 yılında yaptıkları çalışmaya göre serbest radikal polimerleşme reaksiyonu polimer zincirlerini çapraz bağlamak amacıyla başlatıcı olarak Amonyum persülfat kullanılmıştır. Kullanılan başlatıcı miktarının polimer hızını etkilediği bilinmektedir (Plieva ve ark., 2006).

Çalışmamızda öncelik olarak ısı polimerizasyonu ile HEMA monomerini polimerizasyon için başlatıcı olarak APS (Amonyum persülfat) kullanımıyla polimerleştirilerek PHEMA haline getirilerek 500 ml steril distile suda elde edilen polimer çöktürülerek 1 gün liyofilizasyon işlemine tabii tutuldu. Sonra 10 gr şeffaf katı bir madde elde edildi.

PHEMA, mekanik dayanımı, esnekliği, hidrofilikliği, biyouyumluluğu, kimyasal çok yönlülüğü ve tıpta başarılı bir şekilde kullanılan uzun geçmişe sahip olmasından dolayı sayısız konfigürasyonda kolayca imal edilebileceği için iskele materyali olarak birçok çalışmada seçildi.

Martin ve ark.(2007) yılında yaptığı çalışmaya göre; PHEMA elyafların oluşturulması için başarıyla elektrospleme yapılacak hale getirdi. PCL ve PHEMA-g-PANI'nin elektrospleming tekniği ile harmanlanmasıyla nanofiberler elde edildi. PHEMA-g-PANI'nin PCL ile harmanlanması, biyolojik bozunabilirliği arttırdığı ve PHEMA-g-PANI liflerinin eğrilmesine yardımcı olabileceği ve ayrıca nanofiber için bir destek malzemesi olarak işlev görmesi nedeniyle tercih edildi. Çözünürlüğü ve biyolojik olarak parçalanabilir olması nedeniyle, bu harmanlar doku mühendisliğinde elektrostatik iskele gibi bir dizi biyomedikal uygulama potansiyeline sahip olduğundan elektroçizme ile fibröz iskeletlerin yapısı ve morfolojisi taramalı elektron mikroskopu (SEM) kullanılarak araştırılmıştır (Pradna ve ark., 2007).

Bilindiği üzere PHEMA nanofiberi aşırı derecede su emme yeteneği olduğunu yaptığımız çalışmalar sonucu bize kanıtlamıştır. Bunun nedeni olarak ta poliHEMA moleküllerinin dallarının ucundaki hidroksifonksiyonel grubunun suyu emme ve şişmeye neden olduğuna inanılmaktadır. Bu nedenle biz çalışmamızda PHEMA nanofiberimizi kitosan gibi parçalanabilir doğal polimerle kaplama yaparak modifiye edip çapraz bağlayıcı olarak ta 4S-PEG'i kullanarak PHEMA nanofiberini iyileştirme yoluna gidildi.

PEG'ler, biyouyumluluk ve minimum toksisite ve suda veya diğer yaygın solventlerde iyi çözünürlüğü nedeniyle sıklıkla kullanım için seçildi. Kitosan ve PEG'in iyi biyolojik aktiviteleri nedeniyle kombinasyonu, kompleks zarların biyolojik özellikleri üzerinde faydalı etkilere sahip olabileceği çalışmalardan bilinmektedir (Wong ve Chu., 1998).

Zhang ve ark., (2002) yılında yaptıkları bir çalışmaya göre kitosan farklı tipte polietilen glikol (PEG) ile harmanlanarak üretilen beş çeşit malzemenin özelliklerini incelemişlerdir. Yaptıkları çalışmalarda hücrelerin kültürleri ve adsorbe edilen proteinlerin miktarları ve yapıları, farklı malzemeler üzerinde, PEG'in materyallerin biyolojik uyumluluğunu etkili bir şekilde geliştirdiğini göstermişlerdir. Ayrıca PEG ile hücre poliriferasyonu arttığı ve çoğaldığı belirlendi.

Elektroegirme yöntemiyle elde ettiğimiz PHEMA nanofiberini, dayanıklılığını daha fazla arttırmak amacıyla doğal polimer olan kitosan ile kaplama yapılarak degradasyonu en aza indirmek için ise 4S-PEG polimeri ile çapraz bağlama çalışmaları yapıldı. Bu çalışma ile çapraz bağlayıcı olan 4S-PEG'in aktif ester grupları ile hücre yüzey proteinlerinin aminogruplarının reaksiyona girmesi beklendi. Ester bağ titreşimi 1305cm^{-1} olarak gözlemlendi ve elde edilen nanofiberin hücre canlılığına, proliferasyonuna, tutunmasına etkili olduğu gözlemlendi.

4S-PEG çapraz bağlı PoliHEMA-Kitosan naofiberine yapmış olduğumuz EDAC/NHS yöntemi çalışmalarda karbodiimid grubu ile amino grubunu birbirine bağlamak amaçlı kullanıldı (Hermanson., 2010)

EDAC/NHS ile yapmış olduğumuz antikor immobilizasyonunda kullanılan polimerin karboksil grubu ile antikorun amin grubunu oda sıcaklığında bağlamaya çalışıldı. Geri kalan ester gruplarının çalışma sonrasında ise etanolamin eklenmesi ile ortadan kaybolması beklendi.

Hazırlanan nanofibere önce fiziksel ve kimyasal karakterizasyonuna bakıldı ardından primer hücre kültürü ile elde edilen kondrositlerin nanofiberler üzerine kültürü yapılarak histokimyasal, biyokimyasal, morfolojik ve moleküler biyolojik özellikleri araştırıldı.

Yapılan kondrositlerde pozitif kondrosit markerı ayırımında CD44 ile yapılan boyamada kondrosit varlığı %45 oranında tespit edildi.

Alamar blue kondrosit metabolik aktivitesi testinde yani, kondrositlerin kontrol %100 kabul edildiğinde polimere ekili hücrelerde çoğalma meydana gelmesiyle kontrol grubuna göre 10. günde çok azalma varken 15. günde oran da biraz artış meydana geldiği görüldü. Bu durumda 15. günde polimerde metabolik aktivitenin az da olsa artış olduğu ifade edildi.

FTIR sonucuna göre; Budnyak ve ark., (2015) yılında yaptıkları çalışmaya göre Kitosana ait belirtilen FTIR spektrumları ile yapılan çalışma sonucu elde edilen kitosan spektrumlarında OH, CH gerilme, C-O-C, NH₂ deformasyon titreşimi, CH gerilme bağ titreşimleri ile örtüştüğü belirlendi.

Nithya ve ark. (2013) yılında yaptıkları çalışmayla PHEMA FTIR spektrumları yapılan çalışmada C-O, C=O, CH₂, OH spektrumlarının örtüştüğü görüldü.

Zendeudel ve ark., (2014) yılında yapılan araştırmayla benzer olan 4S-PEG FTIR spektrumları OH, CH'a ait iki tepe noktası, C-O karbonil gerilme bağ titreşimlerinin örtüştüğü ifade edildi. aynı zamanda üç polimerin bulunduğu FTIR spektrumundaki C-O, OH, CH bağ titreşimleri literatürle örtüştüğü görüldü.

Aminoasitli, antikoru, 4S-PEG çapraz bağlı PHEMA-Kitosan nanofiberine ait FTIR spektrumlarına ait bağ titreşim pikleri belirlendi ve literatür ile örtüştüğü ifade edildi. Ayrıca aminoasitlere ait pikler literatürle uyduğu çalışmalarla desteklendi.

SEM görüntülenmesi ile nanofiberin yüeyi incenerek, lif çaplarının 260-350nm arasında değişim gösterdiği belirlendi. (Şekil 3.16).

Ruckh ve ark., (2010) yılında lif içeren biyomalzemelerin nano ve yamıkro boyutta olmalarının hücrenin yayılımına ve adezyonuna katkı sağlandığı tespit edildi. 4S-PEG çapraz bağlaıcısının sitotoksitesitesi oldukça düşük olduğu bilinmektedir. Bu yüzden çalışmamızda 4S-PEG polimerini kullanarak fiziksel koşullar altında üretilen Kitosan kaplı PHEMA nanofiberini degradasyonunu düşürmek amaçlı çapraz bağlama yoluna gidildi.

Kitosan, toksik olmayan, alerjenik olmayan , biyolojik olarak uyumlu ve biyolojik olarak parçalanabilir olması ve aynı zamanda hücre çoğalmasını hızlandırması gibi olumlu özelliklerinden dolayı doku mühendisliği için umut verici bir polimerdir. Kitosan ve glikozaminoglikanlar (GAG) bazı yapısal özellikleri paylaştıkları çalışmalar araştırılarak belirlendi.

Glikozaminoglikan sonucumuza göre 5., 10., 15. günlerdeki GAG miktarın artışı kitosanın etkili olduğu düşünülmektedir (Sionkowska ve ark., 2004). GAG miktarında inkübasyon süresi arttıkça nanofiber üzerine ekli olan hücrelerde artış gözlemlendi için doğru orantılı olacak şekilde GAG miktarında da artış gözlemlendi. Bu duruma etkin olarak bir diğer sebep olarak ise kitosan polimerinin etkili olduğu düşünüldü.

Sionkowska ve ark., 2004 yılında yaptığı çalışmaya göre Kitosanın hücre çoğalmasını olumlu yönde etkilediği ve glikozaminoglikanlar ile bazı yapısal özelliklerinin olduğu tespit edildi. Özellikle iskelelerde belirgin etkileri tespit edildi. Kitosan molekül ağırlığının şişme ve biyolojik bozunma özelliklerini ve hücre proliferasyonunu etkilediği gösterilmiştir (Thein-Han ve Kitiyanant., 2007). Moleküler ağırlığın azalması, su alımı oranının düşmesine ve çözünme oranının düşmesine neden olmuştur (Oliveira ve ark., 2006)

DNA miktarına bakıldığında zamana bağlı inkübasyon sürelerinde belirlenen DNA miktarlarında gün sayısı arttıkça hücre miktarına bağlı olarak artış gözlemlendi.

Toluidin Blue sonuçlarına göre, kondrositlerin nanofiber yüzeyinde içerisinde çoğaldıklarını, kendi matrikslerini oluşturmaya başlamış olmalarının göstergesinin ise GAG sentezine başlamış olmalarının neden olduğu belirlendi. 5., 10. ve 15. güne ait nanofiber üzerine ekli ve hapsolan hücrelerin sitoplazma etrafındaki koyu mavi GAG boyanması görüldü. GAG'lar karboksil, hidroksil ve sülfatların yan zincirlerinden dolayı tamamen negatif yüke sahiptirler. Bu nedenle sitoplazmadaki tüm katyonları bağladıklarından dolayı hücrelerde sitoplazmadaki dengeyi sağlamak az miktarda da olsa artış gösterdikleri belirlendi. Ayrıca hücrelerin nanofiber içerisine gömülü olduklarından dolayı da az boyanma olduğu öngörüldü. Ayrıca toluidin blue boyaması için kontrol amaçlı 2-boyutlu kültür ortamında da boyama işlemi gerçekleştirildi. Boyama sonuçlarına göre bazı metakromotik boyamalara rastlandı ve kondrosit fenotipik özelliklerini kaybetmeye başladığı gözlemlendi.

Hematoksilen-Eozin boyama sonuçlarımıza göre, 2-boyutlu kültür ortamındaki hücrelerde de hematoksilen eozin boyaması çekirdek mavi, genel sitoplazma pembe olarak gözlemlendi ancak hücre morfolojilerinin fenotipik özelliklerini kaybetmeye başladıkları sonucuna ulaşıldı. 3-boyutlu kültür ortamında

bulunan kondrositlerin morfolojilerinin kendilerine has yapılarını yani yuvarlıklarını korudukları gözlemlendi.

İmmünohistokimya analizi kollogen tip II boyaması nanofiber üzerinde farklı zaman süreçlerinde gerçekleştirildi. Bu süreçler doğrultusunda zaman ilerledikçe kondrositlerin kendi morfolojik özelliklerine sahip olduğu gözlemlendi.

İmmünohistokimya analizinde ise 2 boyutlu kültür ortamında ekimi yapılan hücrelerin kollogen tip II boyamaları kısmen de olsa görüldü. Bunun sebebinin ise 2. boyutlu kültür ortamındaki kondrositlerin zamanla pasaj sayısından kaynaklanan fibroblast yapılarına dönüştüğü düşünüldü.

Yaptığımız önemli çalışmalardan biri de karakteristik olan SOX9, Aggrecan ve kollogen tip II 'nin kondrosit fenotipi adına belirleme analizi olan gerçek zamanlı kantitatif real time PCR çalışması yapıldı. Wong ve Medrano tarafından(2005) yılında yapılan . çalışma sonucu elde edilen veriler amplifikasyon sırasında saptanan ve floresan ışımaya yapılan eşik değerinin döngü sayısına (Ct değeri) göre yapılabileceği belirlendi. Yapılan bu tez çalışmasında elde edilen veriler hedef gen ve referans genin Ct oranları baz alınarak değerlendirildi.

Farklı zaman aralıklarında olan inkübasyon süreleri arttırıldığında kollogen tip II, SOX9 ve aggrecan hedef genlerinin referans gen olan GAPDH genine göre az da olsa ifadelenmesinin olduğu belirlendi. Kollogen tip I ifadelenmesinde artış olduğu saptanmadı. Normal şartlarda 3-boyutlu polimerik biyomalzeme üzerinde kültüre edilen kondrositlerin diğer hücre proliferasyon analizlerinde fazla çıkmasına rağmen real time PCR analizinde çok büyük farklılıklar görülmedi. Ancak yine de 4S-PEG çapraz bağlı PHEMA-Kitosan nanofiberinin sitotoksik etkisinin olmadığı daha önceki analizlerde ve çalışmalarda hem birlikte hem ayrı ayrı olarak belirlendi.

Yapılan analiz sonucunda nanofiber üzerine ekili olan kondrositlerin farklı zaman aralıklarındaki gen ifdesinde kontrol gruplarına oranla hedef genlerde referans gene göre az da olsa artış olduğu belirlendi. Böylece kullanılan polimerik yapı için hücrelere sitotoksik etki yaparak zarar vermediği anlaşıldı. Bir neden olarak kondrositleri farklı zaman aralıklarında farklı tavşanlardan elde ettiğimiz düşünülürse, donörün yaşı, genetik faktörlerin analiz için zorlu sonuçlar doğurduğu göz önüne alındı.

Polimerik skafoldlarda besin ve oksijen miktarı çözelti miktarına bağlı olarak azalma gerçekleşir. Düşük miktarda hazırlanan polimerik skafoldlarda besin ve oksijen miktarında azalma görülmektedir. Bu sebeple hücre belirli bir sayıya geldiğinde kullanılan polimer yüzeyi yeterli gelmeyeceği için besin ve oksijen transferi düşmesine bağlı olarak sentezlerde kısmen bir artış olduğu düşünüldü.

Marsich ve ark., (2012) yılında yaptıkları çalışmaya göre aljinat/laktozlu modifiye edilmiş kitosan biyomalzemesi üzerine ekilmiş olan kondrositler de gün sayısı arttıkça kollogen tip II, aggrecan sentezi görülmüş ancak kollogen tip I sentezine ulaşıldı. .

Cai ve arkadaşları, bağlayıcı olarak PEG'yi kullanarak arginin-glisin-aspartik asit (RGD) peptidi ile etiketlenmiş bir biyopolimer esaslı probu bildirdi. Probu *in vitro*, *ex vivo* ve canlı farelerde tümör vaskülatürünün çoğunluğu tarafından aşırı eksprese edilen integrini hedeflediği gösterildi. QD705-PEG-RGD probunun enjeksiyonundan altı saat geçtikten sonra, maksimum floresan ışımının olduğu tümör dokusunda görüldü.

Kullanılan biyomaleme de bulunan amin grupları immünofloresan boyama için kullanılan kondrosit yüzey markırı olarak FITC işaretli CD44 antikörünün her iki kültür ortamında da ışımaya yaptığı görüldü. Polimerik biyomalzeme üzerinde kısmen de olsa ışımaya oranında artış belirlendi.

Rombouts ve Ploemacher., (2003), Karp ve Teo., (2009), Morikawa ve ark., (2009) yıllarında 3-boyutlu polimerik biyomalzeme yapılarının biyoyumluluğunu belirlemek ve anlamak adına hücreler ile tohumlandırmışlardır. Aynı olarak 2-boyutlu tohumlanan hücrelerin yanı sıra 3-boyutlu ortamda tohumlanan hücrelerin biyomalzeme üzerinde göç etmelerinin ve fenotiplerinin değiştiği kendi morfoloji özelliklerine sahip oldukları gözlemlediklerini belirtmişlerdir.

Hücreli – polimerik iskele yapıları biyomalzemelerin kıkırdak doku mühendisliği yaklaşımlarıyla varolan rejeneratif tedavilere göre daha iyi sonuçlara ev sahipliği yapacak yeni tedavilerle yer değiştirme ürünü olarak kullanılabilir olacak oldukça iyi bir potansiyeli gösterildi.

Sonuç olarak; sentetik polimer esaslı malzemelerin biyolojik olarak parçalanabilir olması verici olmakla birlikte *in vivo* uygulamalarda da dikkat çekmektedir. Bu nedenle, biyopolimerleri değiştirmek için uygun ve etkili sentetik

stratejiler tasarlanarak, biyomedikal materyallerin ilerlemedesinde önemli olduğu görölmektedir.



KAYNAKLAR

- Akay, T. , Genel Histoloji, Palme Yayınları, ISDN:975-7477-92-3, 262s, . D26D4:D28D4:D30D4:D88, Ankara, 2006
- Akman, A. C. , Periodontal doku mühendisliği uygulamaları için kitosan temelli doku iskelelerinin üretilmesi, kemik morfojenik protein-2 (BMP-2), bazik fibroblast büyüme faktörü (bFGF), deksametazon (DEX) salım kinetiklerinin ve in vitro etkinliklerinin tayini, Doktora tezi, Hacettepe Üniversitesi, Ankara, 2007.
- Altman, G. H. , Diaz, F. , Jakuba, C. , Calabro, T. , Horan, R. L. , Chen, J. , et al. , Silk-based biomaterials. *Biomaterials* 24:401–416, 2003.
- Bahçecioğlu, G. , Poly (L-Lactic Acid)(PLLA)-Based Meniscus Tissue Engineering, Middle East Technical University. Biotechnology Department, Ankara, 2011.
- Baker, B. M. , Meniscus Tissue Engineering With Nanofibrous Scaffolds. University of Pennsylvania, Pennsylvania, 2010.
- Balakrishnan, B. and Banerjee, R. , Biopolymer-based hydrogels for cartilage tissue engineering. *Chem Rev* 111:4453–4474, 2011.
- Bergshoef, M. M. , Vancso, G. J. , Transparent Nanocomposites with Ultrathin, Electrospun Nylon-4, 6 Fiber Reinforceme. *Advanced materials*, Volume 11, November 1999, p 1362–1365, 1999, bioprocesses. *Tissue Engineering*, 9 (1): 9-26, 2003.
- Bisceglie, V. , Uber die antineoplastische immunitat; heterologe Einpflanzung von Tumoren in Huhner-embryonen. *Ztschr. Krebsforsch.* 40, 122–140, 1933.
- Brauchle, E. , Thudel, S. , Brucker, S. Y. , Layland, K. S. , Cell death stages in single apoptotic and necrotic cells monitored by Ramanmicrospectroscopy. *Sci Rep.* 4: 4698, 2014.
- Brittberg, M. , Lindahl, A. , Nilsson, A. , Ohlsson, C. , Isaksson, O. , Peterson, L. , Treatment of deep cartilage defects in the kneewith autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med* 331(14):889-95, 1994.
- Budnyak, TM. , Pylypchuk, L. V. , Tertykh, V. A. , Yanovska, E. S. , Kolodynska, D. , Synthesis and adsorption properties of chitosan-silica nanocomposite prepared by sol-gel method. *Nanoscale Research Letters.* 10:87, 2015.
- Bustin, S. A. , Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J Mol Endocrinol*, 29(1); 23-39, 2002.

- Cai, W. B. , Shin, D. W. , Chen, K. , Gheysens, O. , Cao, Qizhen. , Wang, X. W. , Gambhir, S. S. , Chen, X. , Peptide-labeled near-infrared quantum dots for imaging tumor vasculature in living subjects *Nano Lett*, 6(4):669–676, 2006.
- Casimiroa, M. H. , Botelhoa, M. L. , Lealb, J. P. , Gil, M. H. , Study on chemical, UV and gamma radiation-induced grafting of 2-hydroxyethyl methacrylate onto chitosan *Radiation Physics and Chemistry* 72 : 731–735, 2005.
- Chang, C. H. , Lin, F. H. , Lin, C. C. , Chou, C. H. and Liu, H. C. , Cartilage tissue engineering on the surface of a novel gelatin–calcium-phosphate biphasic scaffold in a double-chamber bioreactor. *J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater* 71B:313–321, 2004.
- Chapekar, M. S. , *Journal of biomedical materials research*, Citeseer, 2000.
- Chen, F. H. , Rousche, K. T. , Tuan, R. S. , Technology Insight: adult stem cells in cartilage regeneration and tissue engineering. *Nature Clinical Practice. Rheumatology*; London. Vol 2: 373–82, 2006.
- Chuang, W. J. & Chiu, W. Y. , Thermo-responsive nanofibers prepared from poly(Nisopropylacrylamide-co-N-methylol acrylamide). *Polymer* 53, 2829–2838, 2012.
- D, Harris. , Kim, B. S. , Mooney, D. J. , Open pore biodegradable matrices formed with gas foaming *Leatrese* . *J biomed mater res* , 5:396-402, 1998.
- Daley, W. P. , Peters, S. B. , Larsen, M. , Extracellular matrix dynamics in development and regenerative medicine. *J Cell Sci*, 121. 255–264, 2008.
- Darlig, E. M. and Athanasiou, K. A. , Articular cartilage bioreactor and DeBelle, L. , Tamburro, A. M. , Elastin: molecular description and function. *Int J Biochem Cell Biol*, 31. 261–272, 1999.
- DeBelle, L., Tamburro, A.M., Elastin: molecular description and function. *Int J Biochem Cell Biol*, 31 pp. 261–272, 1999.
- Deitzel, J. M. , Kleinmeyer, J. , Harris, D. , Tan-Beck, N. C. , The effect of processing variables on the morphology of electrospun nanofibers and textiles, *Polymer*, 42, s. 261-272, 2001.
- Doral, M. N. , Dönmez, G. , Atay, Ö. A. , Leblebicioğlu, G. , Üzümcügil, A. , Bozkurt, M. , Akdağ, T. , Dejeneratif Eklem Hastalıkları. *Türk Ortopedi ve Travmatoloji Derneği*, cilt 6, S1-2, 2007.
- Emin, N. , Elçin, A. E. and Elçin, Y. M. , 2004. Engineering of cartilage tissue by using isolated rat chondrocytes seeded on a macroporous polymeric scaffold in a NASA-STLV bioreactor. *BIOMED XI*, Ankara Turkey , 81, 2005.

- Feng, Z. Q. , Chu, X. , Huang, N. P. , Wang, T. , Wang, Y. , Shi, X. , Ding, Y. , Gu, Z. Z. , Nanofiber galaktosillenmiş kitosan iskeletlerinin fare primer hepatosit agregatlarının oluşumu ve karaciğer fonksiyonunun korunması üzerindeki etkisi. *Biomalzemeler* 30: 2753-2763, 2009.
- Fox, T. G. , Goode, W. E. , Gratch, S. , Huggett, C. M. , Kincaid, J. F. , Spell, A. and Stroupe, J. D. J. *Polym. ScL* 3, 575, 1958.
- Freed, L. E. , Marquis, J. C. , Vunjak-Novakovic, G. and Langer, R. , Kinetics of chondrocyte growth in cell polymer implants. *Biotechnology and Bioengineering*, 43, pg. 597-604, 1994.
- Furukawa, K. S. , Suenaga, H, Toita, K. , Numata, A. , Tanaka, J. , Ushida, T. , Sakai, Y. and Tateishi, T. , Rapid and large-scale formation of chondrocyte aggregates by rotational culture. *Cell Transplantation*, 12, 475-479, 2003.
- Gartner, L. P. , Hiatt, J. L. , *Color atlas of histology*, Fourth Edition, Baltimore, Maryland, Lippincott Williams and Wilkins. , 2006.
- Gartner, L. P. , Hiatt, J. L. , *Color textbook of histology*. First Edition, Philadelphia, W. B. Saunders Company, 1997.
- Gong, J. P. , Friction and lubrication of hydrogelsits richness and complexity. *Soft Matter* 2:544–552, 2006.
- Grande, D. A. , Halberstadt, C. , Naughton, G. , Scwartz, R. and Manji R. Evaluation of matrix scaffolds for tissue engineering of articular cartilage grafts. *J Biomed Mat Res*, 24: 211-220, 1997.
- Green WT. , Articular Cartilage Repair: Behavior of rabbit chondrocytes during tissue culture and subsequent allografting. *Clin Orthop*, 124:237-50, 1977.
- Griffith, L. G. , Swartz, M. A. , Capturing complex 3D tissue physiology in vitro. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7, 211–224, 2006.
- Guilak, F. , Jones, W. R. and Ting-Beall, H. P. , The deformation behaviour and mechanical properties of chondrocytes in articular cartilage, 1999.
- Hall, B. K. , Earliest evidence of cartilage and bone development in embryonic life. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 255–72, 1987.
- Hall, K. B. , *Bones and Cartilage: Developmental and Evolutionary Skeletal Biology*, Elsevier Academic Press, ISDN:0-12-31906-06, ABD, 760s, 2005.
- Hardy, J. G. And Scheibel, T. R. , Composite materials based on silk proteins. *Prog Polym Sci* 35:1093–1115, 2010.

- Holland, T. A. , Mikos, A. G. , Advances in drug delivery for articular cartilage. *Journal of Controlled Release*. 86: 1–14, 2003.
- Hollander, A. P. , Dickinson, S. C. , and Kafienah, W. , Stem cells and cartilage development: complexities of a simple tissue, *Stem Cells*. 28:1992–1996.
- Huanga, Z. M. , Zhang, Y. Z. , Kotakic, M. , Ramakrishna, S. , A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites, Elsevier, 2003.
- Hunziker, E. B. , Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects. *Osteoarthr. Cartil.* 10, 432–63, 2002.
- Hutson, C. B. , et al. Synthesis and characterization of tunable poly(ethylene glycol): gelatin methacrylate composite hydrogels. *Tissue Eng. Part A* 17, 1713–23, 2011.
- Jackson, D. W. , Simon, T. M. , Tissue engineering principles in orthopaedic surgery. *Clinical Orthopaedics & Related Research*. 367: 31–45, 1999.
- Junqueira, C. L. , Carneiro, J. and Kelley, R. O. *Temel Histoloji*, 7. Baskı. a Lange Medical Book. Barış Kitabevi. 158-169. İstanbul, 1993.
- Junqueira, L. C. , Carneiro, J. , Long, J. A. , *Basic Histology*. Fifth Edition, Los Altos, California, Lange Medical Publication, 1986.
- Kadler, K. E. , Baldock, C. J. , Bella, R. P. , Boot-Handford Collagens at a glance . *J Cell Sci*, 120 . 1955–1958, 2007.
- Karp, J. M. , Leng Teo G. S. , Mesenchymal stem cell homing: the devil is in the details. *Cell Stem Cell*, 4: 206-216, 2009.
- Kato, Y. , Iwamoto, M. , Kolke, T. , Suzuli, F. and Takano, Y. , Terminal differentiation and calcification in rabbit chondrocyte cultures grown in centrifuge tubes: Regulation by transforming growth factor beta and serum factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:9552-9556, 1988.
- Kierszenbaum, A. L. , Tres, L. L. , *Histology And Cell Biology An Introduction to Pathology*, Third Edition, Philadelphia, Elsevier Saunders, 2012.
- Kim, I. L. , Mauck, R. L. , Burdick, J. A. , Hydrogel design for cartilage tissue engineering: a case study with hyaluronic acid. *Biomaterials* 32, 8771–82, 2011.
- Kim, U. J. , Park, J. , Kim, H. , Wada, M. and Kaplan, D. L. , Three-dimensional aqueous-derived biomaterial scaffolds from silk fibroin. *Biomaterials* 26:2775–2785, 2005.

- Kock, L. , van Donkelaar, C. C. & Ito, K. , Tissue engineering of functional articular cartilage: the current status. *Cell Tissue Res.* 347, 613–27, 2012.
- Lee, J. , Cuddihy, M. J. and Kotov, N. A. , Three-dimensional cell culture matrices: state of the art. *Tissue Eng Part B - Rev*14:61–86, 2008.
- Li, X. , Su, Y. , He, C. , Wang, H. , Fong, H. , Mo, X. , Sorbitan monooleate and poly(L-lactide-co-caprolactone) electrospun nanofibers for endothelial cell interactions. *J Biomed Mater Res*, 91, 878- 885, 2009.
- Li, X. , Su, Y. , Zhou, X. , Mo, X. , Distribution of sorbitan monooleate in poly(L-lactide-co-caprolactone)nanofibers from emulsion electrospinning. *ColloidSurface B*, 69, 221-224, 2009.
- Lien, S. M. , Ko, L. Y. And Huang, T. J. , Effect of pore size on ECM secretion and cell growth in gelatin scaffold for articular cartilage tissue engineering. *Acta Biomaterialia* 5:670–679, 2009.
- Lu, H. X. , Ko, Y. G. , Kawazoe, N. And Chen, G. P. , Cartilage tissue engineering using funnel-like collagen sponges prepared with embossing ice particulate templates. *Biomaterials* 31:5825–5835, 2010.
- Lu, L. and Mikos, A. G. , The Importance of New Processing Techniques in Tissue Engineering, 21, Issue 11, pp. 28-32, 1996.
- Ma, Z. W. , Mao, Z. W. , Gao, C. Y. , Surface modification and property analysis of biomedical polymers used for tissue engineering. *Colloids Surf, B*, 60, 137–157, 2007.
- Mano, J. F. , Silva, G. A. , Azevedo, H. S. , Malafaya, P. B. , Sousa, R. A. , Silva, S. S. , et al. , Natural origin biodegradable systems in tissue engineering and regenerative medicine: present status and some moving trends. *J Royal Soc Interface* 4:999–1030, 2007.
- Meinel, L. , Hofmann, S. , Karageorgiou, V. , Zichner, L. , Langer, R. , Kaplan, D. , et al. , Engineering cartilage-like tissue using human mesenchymal stem cells and silk protein scaffolds. *Biotechnol Bioeng* 88:379–391, 2004.
- Melrose, J. , Chuang, C. and Whitelock, J. , Tissue engineering of cartilages using biomatrices. *J Chem Technol Biotechnol* 83:444–463, 2008.
- Mescher, LA. , Junqueira's Basic Histology. Twelfth Edition, Chapter 7 Cartilage, 2010 .
- Meyer, U. , Wiesmann, H. P. , Bone and Cartilage Engineering. Springer, (62), 442 p, 2006.

- Mimura, T. , Imai, S. , Okumura, N. , Li, L. , Nishizawa, K. , Araki S, et al. , Spatiotemporal control of proliferation and differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells recruited using collagen hydrogel for repair of articular cartilage defects. *J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater* 98B:360–368, 2011.
- Morikawa, S. , Mabuchi, Y. , Kubota, Y. , Nagai, Y. , Niibe, K. , Hiratsu, E. , Suzuki, S. , Miyauhara, C. , Nagoshi, N. , Sunabori, T. , Shimmura, S. , Miyawaki, A. , Nakagawa, T. , Suda, T. , Okano, H. and Matsuzaki, Y. Prospective identification, isolation, and systemic transplantation of multipotent mesenchymal stem cells in murine bone marrow. *J Exp Med*, 206, 2483-2496, 2009.
- Mueller, M. B. , Tuan, R. S. , Anabolic/Catabolic Balance in Pathogenesis of Osteoarthritis: Identifying Molecular Targets. *PM&R* 3, S3–S11, 2011.
- Murathanoğlu, O. , *Histoloji. İstanbul Üniversitesi Yayınevi.* 75-82, İstanbul, 1996.
- Muzzarelli, R. A. A. , *Yaralı cilt, sinir, kıkırdak ve kemiğin tamiri için kitinler ve kitozanlar. Carbohydr Polym* 76: 167-182, 2009.
- <http://veterinerhistoloji.atauni.edu.tr>
- Ofek, G. , Natoli, R. M. and Athanasiou, K. A. , In situ mechanical properties of the chondrocyte cytoplasm and nucleus. *Journal of Biomechanic*, 42:873–877, 2009.
- Ohyabu, Y. , Adegawa, T. , Yoshioka, T. , Ikoma, T. , Uemura, T. and Tanaka, J. , Cartilage regeneration using a porous scaffold, a collagen sponge incorporating a hydroxyapatite/chondroitinsulfate composite. *Mater Sci Eng B - Adv Funct Solid-State Mater* 173:204–207, 2010.
- Oliveira, J. M. , Rodrigues, M. T. , Silva, S. S. , Malafaya, P. B. , Gomes, M. E. , Viegas, C. A. , Dias, I. R. , Azevedo, J. T. , Mano, J. F. , Reis, R. L. , Novel hydroxyapatite/ chitosan bilayered scaffold for osteochondral tissue-engineering applications: Scaffold design and its performance when seeded with goat bone marrow stromal cells. *Biomaterials* 27: 6123- 6137, 2006.
- Parenteau-Bareil, R. , Gauvin, R. and Berthod, F. , Collagen-based biomaterials for tissue engineering applications. *Materials* 3:1863–1887, 2010.
- Pathology. Third Edition, Philadelphia, Elsevier Saunders, 2012.
- Paulsen, D. F. , *Histology and Cell Biology. Fifth Edition, International Edition* Singapore, McGraw-Hill, 2010.
- Paulsen, D. F. , *Histology and Cell Biology, Fifth Edition. International Edition* Singapore, McGraw-Hill, 2010.

- Philadelphia, W. B. , Saunders Company, 1988.
- Plieva, F. , Huiting, X. , Galaev, I. Y. , Bergensthl, B. , Mattiasson, B. J. Mater. Chem. 16, 4065–4073, 2006.
- Prádná, M. , Martinová, L. , Michálek, J. , Fenclová, T. , Krumbholcová, E. , Hidrofilik poli (2-hidroksietil metakrilat) ve bunun kopolimerlerini 2-etoksietil metakrilat ile elektrospinleme. Centr. Euro. J. Chem. 5, 779-792, 2007.
- Ramalingam, N. , Natarajan, S. T. , Rajiv, S. , Development and characterization of electrospun poly(2-Hydroxy ethyl methacrylate) for tissue engineering application. Advances In Polymer Technology, 2013.
- Reinholz, G. G. , Lu, L. , Saris, D. B. F. , Yaszemski M. J. and O’Driscoll S. W. , Animal model for cartilage reconstruction. Biomaterials, 1-11, 2003.
- Rombouts, W. J. , Ploemacher, R. E. , Primary murine MSC show highly efficient homing to the bone marrow but lose homing ability following culture. Leukemia, 17, 160-170, 2003.
- Ross, M. & Wojciech, P. Histology: A Text and Atlas. Lippincott, Williams, & Wilkins, 2010.
- Ross, M. H. , Pawlina, W. , Histology: A text and atlas 6/E (Histoloji konu anlatımı ROSS, M. H. , PAWLINA, W. , Çevirmen: BAYKAL B, 6. baskı, Palme Yayıncılık, Ankara, 198–208, 2013.
- Rosso, F. A. , Giordano, M. , Barbarisi, A. , Barbarisi From cell–ECM interactions to tissue engineering. J Cell Physiol, 199, pp. 174–180, 2004.
- Rotter, N. , Aigner, J. , Naumann, A. , Planck, H. , Hammer, C. , Burmester, G. And Sittinger M. , Cartilage Reconstruction in Head And Neck Surgery :Comparison of Resorbable Polymer Scaffolds for Tissue Engineering of Human Septal Cartilage. J Biomed Mater Res. , 42 (3) 347-56, 1998.
- Rutherford, R. B. , Gu, K. , Racenis, P. and Krebsbach, P. H. , Early events: the invitro conversion of BMP transduced fibroblasts to chondroblasts. Connective Tissue Res 44:117 123, 2003.
- Sağlam, M. , Aştı, R. ve Özer, A. , Genel Histoloji. Yorum Matbaacılık, Ankara. , 2001.
- Sandell, L. J. , Chansky, H. , Zaniparo, O. , Hering, T. M. , Molecular biology of cartilage proteoglycans and link protein. In Osteoarthritic Disorders, 117-130, 1995.
- Senel, S. , McClure, S. J. , Veteriner tıbbında potasyum kitosan uygulamaları. Adv Drug Deliv Rev 56: 1467-1480, 2004.

- Sionkowska, A. , Wisniewsk, M. , Skopinska, J. , Kennedy, C. J. , Wess, T. J. , Molecular interactions in collagen and chitosan blends. *Biomateri-als*;25:795–807, 2004.
- Soleimani, R. J. , *Histology For Medical Students, Fifth Edition*, Tehran, Golban Medical Publications. 2011.
- Spector, M. , Kas-iskelet problemlerine biyomalzemelere dayalı Doku Mühendisliği ve Rejeneratif tıp çözümleri. *Swiss Med Wkly*, 136: 293-301, 2006.
- Spiller, K. L. , Maher, S. A. & Lowman, A. M. , Hydrogels for the Repair of Articular Cartilage Defects. *Tissue Eng. Part B* 17, 281–299, 2011.
- Stock, U. A. and Vacanti, J. P. , *TISSUE ENGINEERING: Current State and Prospects. Annual Review of Medicine, Vol. 52*, pp. 443-451, 2001.
- Stuart, M. , Surgical sealants: Is there a cohesive strategy? *Start-Up (Windhover Information, Inc.)*;16–25, 1999.
- Su, Y. , Li, X. , Tan, L. , Huang, C. , Mo, X. , Poly(L-lactide-co-3-caprolactone) electrospun nanofibers for encapsulating and sustained releasing proteins. *Polymer*, 50, 4212-4219, 2009.
- Şenköylü A. , Tavsanların diz eklemlerinde oluşturulan osteok ondral kayıpların yapay kırıldak dokusu ile tedavisinde ağ olarak kitosan kullanımı. *Uzmanlık Tezi*, 2001.
- Temenoff, J. S. and Mikos, A. G. , Tissue engineering for regeneration of articular Thein-Han, W. W. , Kitiyanant, Y. , Chitosan scaffolds for in vitro buffalo embryonic stem-like cell culture: an approach to tissue engineering. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 80: 92-101, 2007.
- Thomson, R. C. , Wake, M. C. , Yaszemski, M. J. and Mikos, A. G. , Biodegradable polymer scaffolds to regenerate organs. *Advances in Polymer Science*, 122, 245-274, 1995.
- Tıgılı, R. S. Kırıldak doku rejenerasyonunda kitosan doku iskelesi destekli biyoreaktör performansının incelenmesi (Doktora Tezi). *Hacettepe Üniversitesi, Ankara*, 2009.
- Tibbitt, M. W. , Anseth, K. S. , Hydrogels as extracellular matrix mimics for 3D cell culture *Biotechnol Bioeng.* 103, pp. 655–663, 2009.
- Vacanti, C. A. , Vacanti, J. P. , *Principles of Tissue Engineering*, Edit by Lanza R. , Langer R. , Chick W. Landes Company, 619-630. 1997.
- Vepari, C. and Kaplan, D. L. , Silk as a biomaterial. *Prog Polym Sci* 32(8–9):991–1007, 2007.

- Vermes, I. , Haanen, C. , Steffens-Nakken, H. , Reutellingsperger, C. , A novel assay for apoptosis Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V . 39-51, 17 July 1995.
- Vinatier, C. , Bouffi, C. , Merceron, C. , Gordeladze, J. , Brondello, J. M. , Jorgensen, C. , Weiss, P. , Guicheux, J. and Noël, D. , Cartilage tissue engineering: towards a biomaterial-assisted mesenchymal stem cell therapy. *Curr Stem Cell Res Ther*, 4(4):318–329, 2009.
- Vunjak-Novakovic, G. , Martin, I. , Obradovic, B. , Treppo, S. , Grodzinsky, A. J. , Langer, R. and Freed, L. E. , Bioreactor cultivation conditions modulate the composition and mechanical properties of tissue-engineered cartilage. *J Orthop Res*, 17:130-138, 1999.
- W. B. , Saunders Company, 1997.
- Wang, M. B. , Li, Y. B. , Wu, J. Q. , Xu, F. L. , Zuo, Y. And Jansen, J. A. , In vitro and in vivo study to the biocompatibility and biodegradation of hydroxyapatite/poly(vinyl alcohol)/gelatin composite. *J Biomed Mater Res Part A*85A:418–426, 2008.
- Wang, Y. , Kim, U. J. , Blasioli, D. J. , Kim, H. J. And Kaplan, D. L. , In vitro cartilage tissue engineering with 3D porous aqueous-derived silk scaffolds and mesenchymal stem cells. *Biomaterials* 26:7082–7094, 2005.
- Weinand, C. , Gupta, R. , Huang, A. Y. , Weinberg, E. , Madisch, I. , Qudsi, R. A. , et al. , Comparison of hydrogels in the in vivo formation of tissue-engineered bone using mesenchymal stem cells and beta-tricalcium phosphate. *Tissue Eng* 13:757–765, 2007.
- Weinand, C. , Pomerantseva, I. , Neville, C. M. , Gupta, R. , Weinberg, E. , Madisch, I. , et al. , Hydrogel-beta-TCP scaffolds and stem cells for tissue engineering bone. *Bone* 38:555–563, 2006.
- Wichterle, O . and Lim, D. *Nature*, 117-185, 1960.
- Williams, P. L. , *Gray's Anatomy, Thirty-Eight Edition*, Great Britain, Churchill Livingstone, 1995.
- Won, C. Y. , Chu, C. C. , Lee, J. D. , Synthesis and characterization of biodegradable poly(l-aspartic acid-co-PEG). *J Polym Sci: Part A: Polym Chem*, 36, 2949-2959, 1998
- Wong, M. L. , Medrano, J. F. Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques*, 39(1); 75-85, 2005.

- Wu, Y. , Chu, Q. , Tan, S. , Zhuang, X. , Bao, Y. , Wu, T. , Zhang, Z. , D- α -tocopherol polyethylene glycol succinate-based derivative nanoparticles as a novel carrier for paclitaxel delivery. *Int J Nanomedicine*. 10: 5219–5235, 2015.
- Yamaoka, H. , Asato, H. , Ogasawara, T. , Nishizawa, S. , Takahashi, T. , Nakatsuka, T. , et al. , Cartilage tissue engineering chondrocytes embedded in using human auricular different hydrogel materials. *J Biomed Mater Res Part A*78A:1–11, 2006.
- Yang, Y. , Liu, M. , Gu, Y. , Lin, S. , Ding, F. , Gu, X. , PC-12 hücrelerinin nöronal farklılaşmasına chitoooligosaccharide etkisi. *Cell Biol Int* 33: 352-356, 2009.
- Yoldaş, H. , Erişkin Tibia Cisim Kırıklarında Kilitli İntramedüller Çivi Uygulamaları. Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi Ortopedi ve Travmatoloji Kliniği. İstanbul, T. C. Sağlık Bakanlığı, 2008.
- Zendehtel, M. , Cruciani, G. , Kar, F. S. , Barati, A. , Synthesis and study the controlled release of etronidazole from the new PEG/NaY and PEG/MCM-41 nanocomposites. *Journal of Environmental Health Science and Engineering*. 12:35, 2014.
- Zhao, W. , Jin, X. , Cong, Y. , Liu, Y. & Fu, J. , Degradable natural polymer hydrogels for articular cartilage tissue engineering. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 88, 327–339, 2013.
- Zhu, . Y. B. , Gao, C. Y. , Guan, J. J. , Shen, J. C. , Promoting the cytocompatibility of polyurethane scaffolds via surface photo-grafting polymerization of acrylamide. *J Mater Sci Mater Med*, 15, 283–289, 2004.