

**T.C.
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
MOLEKÜLER BİYOLOJİ BİLİM DALI**

**ÇİFT FAZLI İSKELE ÜRETİMİ VE
KÖK HÜCRE İLE UYUMU**

Canan TÜRKOĞLU

**Danışman
Doç. Dr. Feyzan ÖZDAL KURT**



MANİSA-2017

Canan
TÜRKÖĞLÜ

ÇİFT FAZLI İSKELE ÜRETİMİ VE KÖK HÜCRE İLE UYUMU

2017

TEZ ONAYI

Canan TÜRKOĞLU tarafından hazırlanan "**Çift Fazlı İskele Üretimi ve Kök Hücre İle Uyumu**" adlı tez çalışması 12/07/2017 tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri önünde Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Biyoloji Anabilim Dalı**'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak başarı ile savunulmuştur.

Danışman

Doç. Dr. Feyzan ÖZDAL KURT

Manisa Celal Bayar Üniversitesi

Jüri Üyesi

Prof. Dr. Erdal BALCAN

Manisa Celal Bayar Üniversitesi

Jüri Üyesi

Yrd. Doç. Dr. Aylin ŞENDEMİR ÜRKMEZ

Ege Üniversitesi

TAAHHÜTNAME

Bu tezin Manisa Celal Bayar Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde, akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını ve kullanılan tüm literatür bilgilerinin referans gösterilerek tezde yer aldığını beyan ederim.

Canan TÜRKOĞLU



İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇİNDEKİLER	I
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	III
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	V
TEŞEKKÜR.....	VII
ÖZET.....	VIII
ABSTRACT.....	X
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kök Hücre	3
2.1.1. Kök Hücrenin Tarihçesi ve Tanımı	3
2.1.2. Kök Hücrenin Genel Özellikleri	3
2.1.2.1. Kendini Yenileme	3
2.1.2.2. Farklılaşma	4
2.1.2.3. Klonite	5
2.1.3. Kök Hücre Çeşitleri	5
2.1.3.1. Embriyonik Kök Hücreler	5
2.1.3.2. Embriyonik Olmayan Kök Hücreler	6
2.1.4. Mezenşimal Kök Hücrelerin Osteoblast ve Kondroblasta Farklılaştırılması	7
2.1.5. Mezenşimal Kök Hücre Kaynakları	8
2.1.6. Kök Hücrelerin Klinikte Uygulama Alanları	8
2.2. Kemik Doku	9
2.3. Kıkırdak Doku.....	11
2.4. Biyomateryal	11
2.4.1. Biyomateryal Çeşitleri	12
2.4.2. Çift Fazlı İskele.....	13
2.5. Tezin Amacı	14
3. MATERYAL VE YÖNTEMLER.....	15
3.1. Materyal.....	15
3.1.1. Deney Hayvanı	15
3.1.2. Solüsyonlar	15
3.2. Yöntemler.....	19
3.2.1. Kemik İliği ve Yağ Dokusundan Kök Hücre Eldesi	20
3.2.1.1. Kemik İliğinden Kök Hücre Eldesi	20
3.2.1.2. Yağ Dokudan Kök Hücre Eldesi	21
3.2.1.3. Hücrelerin Pasajlanması	23
3.2.1.4. Hücrelerin Sıvı Azotta Stoklanması	23
3.2.2. Elde Edilen Kök Hücrelerin Karakterizasyonları	24
3.2.3. Farklı Kaynaklardan Elde Edilen Kök Hücrelerin Farklılaştırılması	24
3.2.3.1. MTT	25
3.2.3.2. İmmunositokimyasal Yöntem	26
3.2.3.3. Histokimyasal Yöntemler.....	26
3.2.3.3.1. Alkalen Fosfataz / Von Kossa (ALP/VK) Boyaması ..	26
3.2.3.3.2. Alizarin Kırmızı (AK) Boyaması	27
3.2.3.3.3. Alcian Mavisi ile Boyama	27
3.2.4. Çok Katmanlı Doku İskelelerinin Üretimi	27

3.2.5. Doku İskelelerine Hücre Ekimi	32
3.2.6. Doku İskeleleri İçinde Hücre Karakterizasyonu.....	33
3.2.6.1. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)	33
3.2.7. İstatistik.....	34
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	35
4.1. Bulgular	35
4.1.1. Sıçan Kemik İliğinden ve Yağ Dokusundan Mezenşimal Kök Hücrelerin Eldesi ve Kültürü.....	35
4.1.2. Elde Edilen Kök Hücrelerin Karakterizasyonu	37
4.1.3. Farklı Kaynaklardan Elde Edilen Kök Hücrelerin Farklılaştırılması.....	38
4.1.4. İmmunositokimyasal Yöntem	41
4.1.5. Histokimyasal Yöntemler.....	50
4.1.6. Çok Katmanlı Doku İskelelerinin Üretimi	54
4.1.7. Doku İskeleleri İçinde Hücre Karakterizasyonu	55
4.2. Tartışma.....	58
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	63
KAYNAKLAR	66
ÖZGEÇMİŞ	71

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AdMKH	Adipoz Kaynaklı Mezenşimal Kök Hücre
AK	Alizarin Kırmızısı
ALG	Aljinat
ALP	Alkalen fosfataz
ALP/VK	Alkalen fosfataz / Von Kossa
AM	Alcian Mavisi
BAG	Biyoaktif Cam
bFGF	Bazik Fibroblast Büyüme Faktörü
BG	Biyocam
BMP	Kemik Morfojenik Proteinler
DMSO	Dimetilsülfoksit
EGF	Epidermal Büyüme Faktörü
FBS	Fötal Sığır Serum
GAG	Glikozaminoglikan
H₂O₂	Hidrojen Peroksit
HA	Hidroksiapatit
HA/TCP	Hidroksiapatit/Trikalsiyum Fosfat
HCl	Hidroklorik Asit
IL-6	İnterlökin 6
ITS	İnsülin-Transferrin-Selenyum Pirüvat
KİSKH	Kemik İliği Kökenli Mezenşimal Kök Hücre
Kol	Kollajen tip I
LIF	Lösemi İnhibitör Faktörü
MEM	Minimum Essential Medium Eagle
MKH	Mezenşimal Kök Hücre
OC	Osteokalsin
ON	Osteonektin
PBS	Fosfat Tamponlu Tuz Solüsyonu
PCL	Poliaprolakton
PFA	Paraformaldehit
PGA	Poli glikolik asit
PLGA	Polilaktik glikolik asit

PVA	Polivinil Alkol
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
SrBG	Strontium Katkılı Biyoaktif Cam
TGF-β1	Transforme Edici Büyüme Faktörü Beta-1



ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. Kök hücrelerin farklılaşma özelliklerine göre sınıflandırılması.	4
Şekil 2.2. <i>In vitro</i> ortamda embriyonik kök hücre kültürünün oluşturulması. ...	6
Şekil 2.3. Kök hücrelerin klinikte kullanım alanları.	9
Şekil 3.1. Çalışma planının şematik gösterimi.	19
Şekil 3.2. Servikal dislokasyon ile yaşamı sonlandırılan sıçanın üst derisi kesildi.	22
Şekil 3.3. Sıçandan elde edilen femur ve tibia kemikleri (A) ve sıçandan elde edilen retroperitoneal yağ dokusu (B).	22
Şekil 3.4. Kültürde hücre pasajı akış şeması.	23
Şekil 3.5. Üretilen doku iskelesinin şematik çizimi.	28
Şekil 3.6. 3 boyutlu yazıcıda PVA kalıp basımı.	29
Şekil 3.7. PVA kalıp.	29
Şekil 3.8. Biyocam ve sodyum aljinat basımı için hazırlanan PVA kalıplar.	30
Şekil 3.9. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan biyocam 45S5 ve sodyum aljinat çözeltileri.	30
Şekil 3.10. Farklı konsantrasyonlardaki iskele katmanlarının kalıba enjeksiyonu.	31
Şekil 3.11. Her bir konsantrasyonun enjeksiyonundan sonra santrifüj edilen kalıplar.	31
Şekil 3.12. Enjeksiyon işleminden sonra kalıplar 37,5°C'lik etüvün içinde bulunan 0,5 M CaCl ₂ çözelti içine alınmıştır.	32
Şekil 3.13. Besi ortamı ile 12 saat şartlandırılan doku iskelelerine hücre ekimi.	33
Şekil 4.1. Sıçan KİSKH (A, C, E) ve AdMKH'lerinin (B, D, F) 7.gün (A, B), 14. gün (C, D) ve 24 gün (E, F) ters faz-kontrast mikroskopta morfolojik olarak görüntüleri.	36
Şekil 4.2. Sıçan KİSKH (A, C, E) ve AdMKH'lerinin (B, D, F) kontrol (A, B), CD90 (C, D), ve CD45 (E, F) immunositokimyasal boyanmalarının ışık mikroskop görüntüleri.	37
Şekil 4.3. AdMKH'lerin kontrol (A, D, G, J), osteojenik (B, E, H, K) ve kondrojenik (C, F, I, L) farklılaşma sürecinde 5. (A, B, C), 7. (D, E, F), 9. (G, H, I) ve 14. (J, K, L) gün ters faz-kontrast mikroskopta morfolojik görüntüleri.	39
Şekil 4.4. KİSKH'lerin kontrol (A, D, G, J), osteojenik (B, E, H, K) ve kondrojenik (C, F, I, L) farklılaşma sürecinde 5. (A, B, C), 7. (D, E, F), 9. (G, H, I) ve 14. (J, K, L) gün ters faz-kontrast mikroskopta morfolojik görüntüleri.	40
Şekil 4.5. MTT yöntemi ile 1, 3, 7, 14 ve 21. günlerde farklılaşma ortamındaki hücrelerin çoğalma yeteneği incelendi.	41
Şekil 4.6. 7. gün KİSKH kontrol grubu (A, C, E) ve osteojenik olarak farklılaştırılan grubun (B, D, F) kontrol (A, B), ON (C, D), OC (E, F) immunositokimyasal boyamalarının 10X büyütmede çekilmiş görüntüleri.	42
Şekil 4.7. 7. gün AdMKH kontrol grubu (A, C, E) ve osteojenik olarak farklılaştırılan grubun (B, D, F) kontrol (A, B), ON (C, D), OC (E, F) immunositokimyasal boyamalarının 10X büyütmede çekilmiş görüntüleri.	43
Şekil 4.8. 14. gün KİSKH kontrol grubu (A, C, E) ve osteojenik olarak farklılaştırılan grubun (B, D, F) kontrol (A, B), ON (C, D), OC (E, F) immunositokimyasal boyamalarının 10X büyütmede çekilmiş görüntüleri.	44

Şekil 4.9. 14. gün AdMKH kontrol grubu (A, C, E) ve osteojenik olarak farklılaştırılan grubun (B, D, F) kontrol (A, B), ON (C, D), OC (E, F) immunositokimyasal boyamalarının 10X büyütmede çekilmiş görüntüleri.	45
Şekil 4.10. 7. gün KİSKH kontrol grubu (A, C, E) ve kondrojenik olarak farklılaştırılan grubun (B, D, F) kontrol (A, B), kollajen-II (C, D), Sox-9 (E, F) immunositokimyasal boyamalarının 10X büyütmede çekilmiş görüntüleri.	46
Şekil 4.11. 7. gün AdMKH kontrol grubu (A, C, E) ve kondrojenik olarak farklılaştırılan grubun (B, D, F) kontrol (A, B), kollajen-II (C, D), Sox-9 (E, F) immunositokimyasal boyamalarının 10X büyütmede çekilmiş görüntüleri.	47
Şekil 4.12. 14. gün KİSKH kontrol grubu (A, C, E) ve kondrojenik olarak farklılaştırılan grubun (B, D, F) kontrol (A, B), kollajen-II (C, D), Sox-9 (E, F) immunositokimyasal boyamalarının 10X büyütmede çekilmiş görüntüleri.	48
Şekil 4.13. 14. gün AdMKH kontrol grubu (A, C, E) ve kondrojenik olarak farklılaştırılan grubun (B, D, F) kontrol (A, B), kollajen-II (C, D), Sox-9 (E, F) immunositokimyasal boyamalarının 10X büyütmede çekilmiş görüntüleri.	49
Şekil 4.14. KİSKH (A, B) ve AdMKH'lerin (C, D) kontrol (A, C) ve osteojenik (B, D) farklılaşma sürecinde 7.gün ALP/VK boyamalarının ters faz-kontrast mikroskopta morfolojik görüntüleri.	51
Şekil 4.15. KİSKH (A, B) ve AdMKH'lerin (C, D) kontrol (A, C) ve osteojenik (B, D) farklılaşma sürecinde 14.gün ALP/VK boyamalarının ters faz-kontrast mikroskopta morfolojik görüntüleri.	51
Şekil 4.16. KİSKH (A, B) ve AdMKH'lerin (C, D) kontrol (A, C) ve osteojenik (B, D) farklılaşma sürecinde 7. gün AK boyamalarının ters faz-kontrast mikroskopta morfolojik görüntüleri.	52
Şekil 4.17. KİSKH (A, B) ve AdMKH'lerin (C, D) kontrol (A, C) ve osteojenik (B, D) farklılaşma sürecinde 14. gün AK boyamalarının ters faz-kontrast mikroskopta morfolojik görüntüleri.	52
Şekil 4.18. KİSKH (A, B) ve AdMKH'lerin (C, D) kontrol (A, C) ve osteojenik (B, D) farklılaşma sürecinde 7. gün AM boyamalarının ters faz-kontrast mikroskopta morfolojik görüntüleri.	53
Şekil 4.19. KİSKH (A, B) ve AdMKH'lerin (C, D) kontrol (A, C) ve osteojenik (B, D) farklılaşma sürecinde 14. gün AM boyamalarının ters faz-kontrast mikroskopta morfolojik görüntüleri.	53
Şekil 4.20. Kalıpların erimesinin ardından elde edilen iskeleler.	54
Şekil 4.21. Non-steril materyallerin yüzey morfolojisi (A, B). Steril materyallerin yüzey morfolojisi (C, D).	55
Şekil 4.22 KİSKH (A, B) ve AdMKH'lerin (C, D) osteojenik (A, C) ve kondrojenik (B, D) farklılaşma sürecinde 7. gün SEM görüntüleri.	56
Şekil 4.23 KİSKH (A, B) ve AdMKH'lerin (C, D) osteojenik (A, C) ve kondrojenik (B, D) farklılaşma sürecinde 14. gün SEM görüntüleri.	57

TEŞEKKÜR

Çalışmamın her aşamasında bana destek olan, bilgi ve deneyimleri ile yol gösteren, lisansüstü öğrenim hayatımın tüm zorlu aşamalarında maddi manevi her yönden yardımcı olan danışman hocam Sayın Doç. Dr. FEYZAN ÖZDAL KURT'a, bilgi ve tecrübeleri ile beni aydınlatan ve desteğini hiç eksik etmeyen, kendisini tanımaktan büyük onur duyduğum sevgili hocam Sayın Prof. Dr. H. SEDA VATANSEVER'e, yüksek lisans eğitimim sırasında 3 boyutlu yazıcı konusunda her türlü imkan ve desteği veren Sayın Yrd. Doç. Dr. AYLİN ŞENDEMİR ÜRKMEZ'e, 3 boyutlu yazıcı konusunda her zaman destek veren ve bilgilerini paylaşan arkadaşım HAKAN GÜRBÜZ'e, çalışmalarım sırasında manevi desteklerini her zaman hissettiğim değerli asistan arkadaşlarıma, öğrenim hayatım boyunca beni maddi ve manevi olarak destekleyen ve hep yanımda olan aileme, özellikle canım babam Dt. CENGİZ TÜRKOĞLU'na yürekten teşekkür ederim.

2016-106 nolu çalışmamı maddi olarak destekleyen Celal Bayar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimine teşekkür ederim.

Canan TÜRKOĞLU
Manisa, 2017

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Çift Fazlı İskele Üretimi ve Kök Hücre ile Uyumu

Canan TÜRKOĞLU

Celal Bayar Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Feyzan ÖZDAL KURT

Kök hücre için kaynak olarak kemik iliği stromal hücreleri ve yağ dokusu sıklıkla kullanılmakta ve farklılaşma süreçleri belirteçler eşliğinde incelenmektedir. Mezenşimal kök hücre kendini yenileme kapasitesi olan, birçok yöne farklılaşabilen, etik problemleri olmayan, doku mühendisliği ve rejeneratif tıp için bir kaynak olarak her geçen gün daha önemli hale gelen hücresel tedavi için bir seçenektir. Kemik ve kırık dokusu iskelet sistemindeki rolü nedeniyle insan ve hayvan sağlığında, özellikle yara onarımı ve iyileşmesinde yer aldığı patolojik olaylarda önemlidir. Bu amaçla hücre-biyomalzeme kullanımı ve kırık-kemik dokular gibi farklı yapılardaki dokuların bulunduğu organlarda tek fazlı iskelelerin kullanımı başarıyı azaltmaktadır. Bu nedenle çalışmada, çift fazlı hem kemik hem de kırık dokuyu uyumu olan iskele geliştirilmesi amaçlanmıştır.

Çalışmada mezenşimal kök hücreler kemik iliği ve yağ dokusundan elde edilmiştir. Her bir kök hücre eldesi ve kültürü için ayrı protokoller uygulandıktan sonra immunositokimyasal analiz ile mezenşimal kök hücre karakterizasyonu yapılmıştır. Daha sonra osteojenik ve kondrojenik farklılaştırma ortamları ile her bir kök hücre kaynağından kemik ve kırık öncü hücrelerine farklılaştırılma sağlanmıştır. Farklılaştırma süreci tamamlandıktan sonra kemik öncü hücrelerinde osteonektin ve osteokalsin, kırık öncü hücrelerinde kollajen-II ve Sox-9 dağılımları immunositokimyasal analiz ile incelenmiştir. Kültür çalışmaları ile eş zamanlı olarak kemikle entegrasyonun olacağı bölge için 45S5 biyocam ve sodyum aljinat kullanılarak, üç boyutlu bir yazıcı ile üretimine başlanan iskele, kırık entegrasyonu için, her bir katmanda biyocam oranı azaltılıp hidrojel oranı artırılarak en üst katmanda mineralsiz hidrojel yapısına geçecek şekilde üretilmiştir. Farklılaştırılan hücreler üretilen çift fazlı 45S5 biyocam iskeleler üzerine damla damla ekilerek hücrelerin iskele içine homojen dağılımı sağlanmıştır.

Çalışmanın sonucunda kemik iliğinden elde edilen kök hücrelerin yağ dokusundan elde edilen kök hücrelere göre çoğalma ve farklılaşma potansiyellerinin daha yüksek olduğu görülmüştür. Farklılaşmanın 7. günde başladığı 14. günden sonra artış gösterdiği belirlenmiştir. Çift fazlı doku iskelesi ile yapılan testlerde herhangi bir delaminasyona rastlanmamıştır. Doku iskelesinin kemik ve kırık yönünde farklılaştırılan kök hücreler ile başarılı bir uyum sağladığı görülmüştür. 3 boyutlu basılmış iskelelerden mevcut klinik problemlerin çözümü için işlevsel ve uygulanabilir çözümler sunma potansiyeli beklenmektedir. Geliştirilen iskeleler ile

hücre etkileşme mekanizmalarının anlaşılması, klinik rutin tedavide etkin kemik ve kırık oluşumu yönünden büyük önem taşımaktadır. Aynı zamanda, insan ve veteriner hekimliğinde kök hücresi uygulamalarının diğer tedavi yöntemlerine alternatif olduğu da göz önüne alınmalıdır.

Anahtar Kelimeler: Çift fazlı iskele, kök hücre, kemik, kırık, doku mühendisliği.

2017, 71 sayfa



ABSTRACT

M.Sc. Thesis

Biphasic Scaffold Production and Compliance with Stem Cells

Canan TÜRKOĞLU

**Celal Bayar University
Graduate School of Applied and Natural Sciences
Department of Biology**

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Feyzan ÖZDAL KURT

Bone marrow stromal cells and fat tissue are often used as a source of stem cells and differentiation processes are examined with markers. Mesenchymal stem cell is an option for cellular therapy that has self-renewal capacity, is distinguishable in many respects, carries no ethical problems, and is becoming increasingly important as a source for tissue engineering and regenerative medicine. Bone and cartilage tissue is important for pathological events in wound healing and healing due to its role in human and animal health, especially in the skeletal system. For this purpose, it has been found that the use of single-phase skeletons in the organs where cell-biomaterials are used and that the tissues of different structures such as cartilage-bone tissues reduce the success. For this reason, it aims to develop a dual-phase scaffold with both bone and cartilage tissue adaptation.

In the study, mesenchymal stem cells were obtained from bone marrow and fat tissue. After applying separate protocols for each stem cell culture and culture, mesenchymal stem cell characterization was performed by immunocytochemical analysis. Later, osteogenic and chondrogenic differentiation media were provided to distinguish bone and cartilage precursor cells from each stem cell source. After the differentiation process, osteonectin and osteocalcin in bone precursor cells and collagen-II and Sox-9 distributions in cartilage precursor cells were examined by immunocytochemical analysis. Simultaneously with the cell culture studies, scaffold production was optimized. The scaffolds were started to be produced with a three-dimensional printer using 45S5 bioglass and sodium alginate for the layer to be integrated with the bone and continued layer by layer with reduced bioglass and increased hydrogel amount until pure alginate layer that is intended to integrate with cartilage. The differentiated cells were seeded on the biphasic 45S5 biocompatible scaffold produced, and the cells were distributed homogeneously on the scaffold.

As a result of the study, the bone marrow stem cells were found to have higher proliferation and differentiation potentials than the stem cells obtained from fat tissue. It was determined that the differentiation increased exponentially after the 14th day, which started on the 7th day. No delamination was found in the tests made with biphasic tissue scaffolds. Tissue scaffolds allow for the assembly of differentiated stem cells in the direction of bone and cartilage. It has been shown that they provide the expected performance in tissue skeleton production and

determination of their compatibility with stem cells. It is expected that 3D printed scaffolds can be used to solve existing clinical problems and have potential to provide feasible solutions. Understanding of cell interactions with the enhanced scaffold is of great importance for effective bone and cartilage formation in clinical routine treatment. It should also be noted that stem cell applications are an alternative to other methods of treatment in human and veterinary applications.

Keywords: Biphasic scaffold, stem cells, bone, cartilage, tissue engineering.

2017, 71 pages



1. GİRİŞ

Destek dokunun bir çeşidi olan kıkırdak dokusu kondrosit adı verilen hücrelerden, matriks denilen zemin maddesinden ve fibrillerden oluşmaktadır. Kıkırdak oluşumunu gerçekleştiren öncü hücrelere kondroblast adı verilmektedir. Erişkin hücrelerinde hasarlı kıkırdak dokunun onarımı sınırlıdır ve yavaş gerçekleşmektedir. Kan damarlarının olmaması, kondrositlerin hareketsizliği ve zor çoğalmaları kıkırdak onarımını sınırlayan faktörlerdendir. Ancak hasarlı dokuda hücreler bozulmadan kaldığında doku yenilenmesinin gerçekleştiği görülmüştür. Destek dokuların bir diğer çeşidi kemik dokusudur. Kemik doku hücreler, zemin maddesi ve fibrillerden oluşmaktadır. Sert yapılı ve dayanıklı olan kemik doku erişkin bireylerde de yıkılıp yeniden yapılan, yara onarımı ve iyileşmesi yüksek, canlı ve dinamik bir dokudur. Kemik oluşumu (osteogenez), intramembranöz ve endokondral kemikleşmeyle gerçekleştirilir. Kemik dokusu olma yönünde koşullanmış ancak farklılaşmamış hücrelere osteojenik hücreler denilmektedir. Osteojenik hücreler erişkinlerde hareketsiz iken, yaralanma ve defekt tamirinde aktifleşerek mitozla çoğalmaktadırlar. Bölünen bu hücrelerin bir bölümü kemik yapımından sorumlu osteoblastlara dönüşmektedir [1].

Osteokondral tedavi amaçlı son yıllarda destek biyomateriyallerin kullanımı söz konusudur. Kök hücrelerin implant destekleyici materyallerle birleştirilmesi hem kemik iyileşmesini hem de oluşan kemiğin daha kaliteli olmasını sağlamaktadır [2]. Osteokondral doku mühendisliğinde karşılaşılan önemli problemlerden biri kemik ve kıkırdak bölgelerinde ilgili doku oluşumu ve bütünleşmesini sağlayacak iskele özelliklerinin birbirinden farklı olmasıdır. Kemik hücrelerinin tutunma ve gelişimi için biyocam, hidroksiapatit gibi mineral içerikli, daha yüksek sertliğe ve elastik modüle, yüksek gözeneklilik ve gözenek büyüklüğüne sahip iskeleler en başarılı uygulamaları sağlarken, kıkırdak doku mühendisliği çalışmalarında aljinat, hyaluronik asit gibi hidrojel yapısında, su tutma özellikleri yüksek, daha düşük gözenekli doku iskeleleri tercih edilmektedir. Son yıllarda özellikle çift katmanlı iskeleler ve kullanımı konusunda araştırmalar bulunmaktadır. Çift-fazlı iskelelerde amaç kemik gelişimi için optimize edilmiş bir iskele ile kıkırdak için optimize edilmiş bir iskelenin bir arada üretimi ve kullanımıdır [3].

Biyobozunur malzemelerin hücre uyumu kadar doku uyumu da önemli olup, dokunun normal yapısına katılması, kimyasal ve mekanik olarak uyum sağlaması ve gerekli durumlarda angiogenetik açıdan da desteklenmesi önemlidir. Hali hazırda *in vitro* ve hatta *in vivo* kullanılmakta olan biyomalzemeler olmasına rağmen, her bir biyomalzemenin kök hücreler ile uyumluluğu ve farklı kaynaklardan elde edilen kök hücrelerin farklı biyomalzemeler üzerindeki davranışları değişkenlik gösterebilmektedir [4].

Otolog kök hücre uygulamaları rejeksiyon problemi oluşturmayan ve kontrol edilebildiği takdirde istenilen fonksiyonu yapmak üzere hücrelerin yönlendirilebildiği bir tedavi şeklidir. Bu çalışmada doku ile uyumlu fakat kök hücre canlılığını devam ettirebilen çift fazlı 45S5 biyocam iskeleler üretilmiş, kemik iliği ve yağ dokusundan elde edilen mezenşimal kök hücreler ile uyumu, kemik ve kıkırdak öncü hücrelerine farklılaştırma potansiyelleri incelenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kök Hücre

2.1.1. Kök Hücrenin Tarihçesi ve Tanımı

Kendini yenileyebilen, farklı hücrelere dönüşebilme yeteneğine sahip (potensi), klon yani koloni oluşturabilen (klonalite) farklılaşmamış hücrelere “kök hücre” denilmektedir [5]. Bir dokuya ait kök hücre, fonksiyonel olarak farklılaşmamış ve potansiyel olarak heterojen hücre olup, kendini sınırsız yenileyebilir ve özelleşmiş hücreler ve doku tipleri oluşturabilir. Kök hücrelerin sonsuz çoğalma yeteneği ve birçok farklı hücre tipine farklılaşabilme özelliği bu hücreleri benzersiz yapar. Uzun zaman dilimleri boyunca bölünebilme, kendini yenileyebilme yeteneğine ve yüksek telomeras aktivitesine sahiptir [6]. Kök hücreler aldıkları uyarılara göre farklı hücre tiplerine dönüşebilme potansiyeline sahip hücrelerdir. Hasarlı dokuya verildiklerinde hedef dokuyu yenileyebilirler [7]. Kök hücreler çok farklı kaynaklardan elde edilebilmektedir. Genellikle embriyonik ve somatik kök hücreler olmak üzere iki gruptan elde edilir. Ancak embriyodan elde edilen kök hücreler etik açıdan oldukça tartışmalıdır [8].

Tarih boyunca insanoğlu hastalıklara çare bulmak için çeşitli yollar aramışlardır. Hasarlı doku ve organların tamiri için kök hücre uygulamalarında ilk adımı Prof. Dr. Süreyya Tahsin Aygün 1950-1960’lı yıllarda plesanta ve kordon kanı hücrelerinde çeşitli çalışmalar yaparak atmıştır. 1967 yılında embriyonel karsinoma hücrelerinin kültüre edilmesiyle birçok karsinoma hücre dizisi tanımlanmıştır. 1998 yılında insan embriyonik kök hücrelerinin kültür ortamında çoğaltılması ile kök hücre çalışmaları ve kök hücre temelli tedavi araştırmaları hız kazanmıştır [7].

2.1.2. Kök Hücrenin Genel Özellikleri

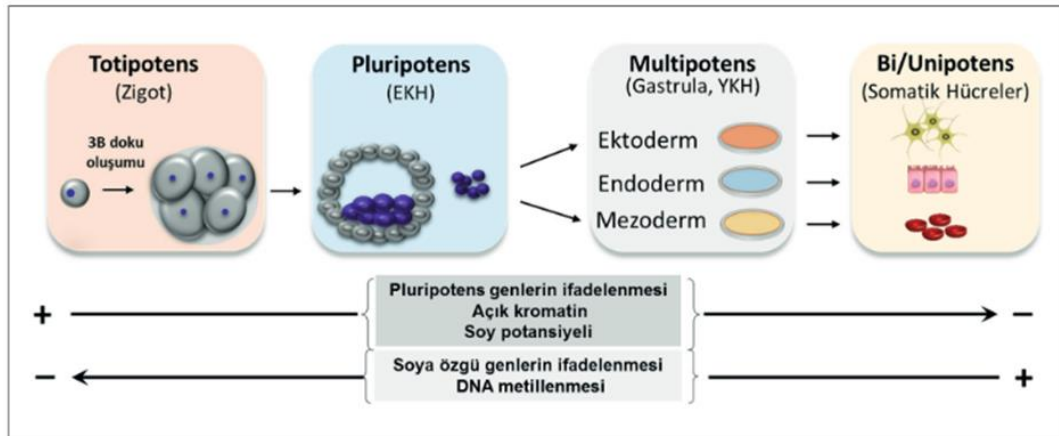
2.1.2.1. Kendini Yenileme

Kök hücrelerin kendini yenilemesi organizmanın yaşamı süresince sayılarını korumak üzere çoğalmalarını ifade etmektedir. Kök hücrelerin kendini yenilemesi somatik hücrelerdeki mitozdan farklı olarak hücrenin farklılaşmadan çoğalması anlamına gelir. Hücrenin kendini yenilemesi iki ana mekanizma ile kontrol edilir. Bu mekanizmalar proto-onkogenler yani uyarıcılar ve tümör baskılayıcılar yani sınırlayıcılarıdır. Bu mekanizmalar dışarıdan, hücre nişinden hücrenel veya hücre dışı etmenlerden aldıkları uyarılara göre düzenlenirler. Uyarıcı ve sınırlayıcı faktörler

arasındaki dengesizlikler tümör hücrelerinin oluşmasına neden olmaktadır. Kök hücreler için sınırsız çoğalma yeteneğine sahip hücrelerdir demek doğru bir tanım değildir. Bunun yerine kök hücreler ileri derecede kendini yenileyebilen hücrelerdir demek daha doğrudur [5].

2.1.2.2. Farklılaşma

Kök hücrelerin farklılaşma yeteneği ile ilgili bu kavram köklülük olarak da tanımlanmaktadır. Kök hücrelerin farklılaşma yetenekleri birbirinden farklıdır. Bazı kök hücreler birden fazla hücre tipine dönüşebilirken bazıları ise sadece tek bir hücre tipine dönüşebilirler. Kök hücrelerin farklılaşmasında en önemli etken epigenetik mekanizmalardır. Kemik iliği hematopoetik kök hücreleri farklılaşmanın en iyi örneklerindendir. Aldıkları sinyaller ile kemik ve kıkırdak başta olmak üzere birçok hücre tipine dönüşebilirler [5]. Farklılaşma özelliklerine göre kök hücreler totipotent, pluripotent, multipotent ve unipotent olmak üzere 4 gruba ayrılır (Şekil 2.1.) [9].



Şekil 2.1.: Kök hücrelerin farklılaşma özelliklerine göre sınıflandırılması [10].

Totipotent Kök Hücre: Döllenme meydana geldiğinde oluşan hücre (zigot) totipotent kök hücredir. 2-16 hücreli embriyo (2-3. günler) ve morula evresindeki embriyo (4.gün) totipotent kök hücre olarak tanımlanmaktadır [5]. Tüm organ ve dokulara farklılaşma özelliği olan hücrelerdir. Bu hücreler tüm organizmayı tek başına meydana getirebilecek genetik bilgiye ve yeteneğe sahiptir [9].

Pluripotent Kök Hücre: Döllenmeden sonraki 5. günden itibaren blastula aşamasında oluşan blastosist küresinin içindeki hücelere pluripotent kök hücre

denilmektedir. Bu hücreler endoderm, mezoderm, ektoderm hücrelerine farklılaşabilirler [5].

Multipotent Kök Hücre: Embriyonun 16. günden sonraki gelişim aşamalarındaki hücrelere denir. Bulundukları organa özgü hücrelere dönüşebilir [5].

Unipotent Kök Hücre: Multipotent kök hücre ve bu hücrelerin bölünmesi ile oluşmuş bir hücre tipine dönüşebilen hücrelerdir [9].

2.1.2.3. Klonite

Klonite yani koloni oluşturma kök hücrelerin temel özelliklerindendir. Bir hücreden birçok hücre meydana gelebilmektedir. Hücre üremesi olarak tanımlanan klonite klon içeriği ve hücrelerin üreme hızı ile belirlenir. Hücrelerin canlı kalması, çoğalıp pasajlanmaları ve dondurulup çözündürülmeleri gerekmektedir. Bu ölçütler klonitenin temel özellikleridir [5].

2.1.3. Kök Hücre Çeşitleri

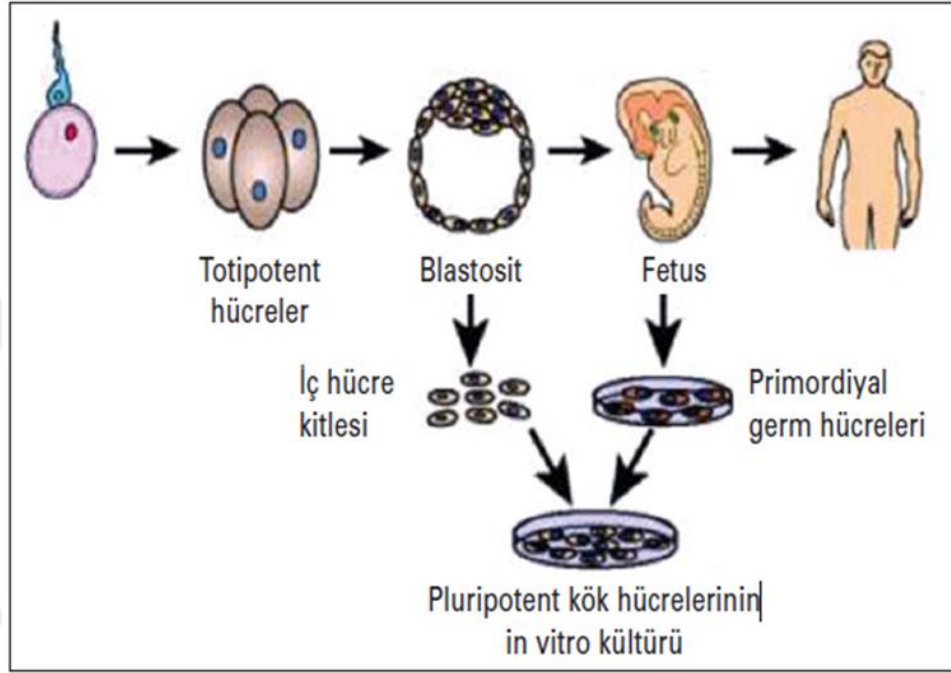
Kök hücreler elde edilme şekillerine göre embriyonik kök hücreler ve embriyonik olmayan kök hücreler olmak üzere 2 gruba ayrılmaktadır. Embriyonik kök hücrelerin etik problemlerinden dolayı günümüzde daha çok embriyonik olmayan (somatik) kök hücrelere ait çalışmalar olup, henüz tüm hücre türleri elde edilememektedir. Ait oldukları dokuların hücre türleri dışında farklı hücre türüne dönüştürülebilirler de vücuttaki tüm hücreler somatik kök hücresinden elde edilememektedir. Günümüzde beyin, kemik iliği, kan, iskelet kası, deri, sindirim sistemi, diş, göz ve pankreas gibi birçok organdan somatik kök hücreleri tespit edilebilmiştir [11]. Somatik kök hücre uygulamaları kişinin kendisinden alınması nedeniyle rejeksiyon problemi oluşturmeyen ve kontrol edilebildiği takdirde istenilen görevi yapmak üzere hücrelerin yönlendirilebildiği ve hücresel tedavi amaçlı kullanılması en muhtemel hücre türüdür.

2.1.3.1.Embriyonik Kök Hücreler

Pluripotent özellikteki kök hücrelerdir. Blastosist içindeki hücre kitlesindeki hücrelerden elde edilirler. Bu hücreler tek başlarına tüm organizmayı oluşturmazlar. Ancak tüm hücre tiplerine dönüşebilirler. 1981 yılında fare blastosistinden ilk defa embriyonik kök hücreler elde edilmiştir. 1998 yılında ise Thomson ve ark. tarafından ilk insan embriyonik kök hücresi elde edilmiştir. İnsan embriyonik kök hücreler ile etik gereğince pek çok alanda çalışma yapılamamaktadır. Fare embriyonik kök

hücreler ile yapılan çalışmalar bazı kronik hastalıkların tedavisinde kullanılma potansiyellerini ortaya koymuştur [12].

Günümüzde embriyonik kök hücreler fertilizasyon tedavisi gören bireylerin ihtiyaç fazlası embriyolarından ve istemli sonlandırılmış gebeliklerden elde edilmektedirler (Şekil 2.2.) [9].



Şekil 2.2.: *In vitro* ortamda embriyonik kök hücre kültürünün oluşturulması [9].

2.1.3.2. Embriyonik Olmayan Kök Hücreler

Somatik kök hücreler olarak da ifade edilen erişkin kök hücreler embriyo gelişimi tamamlandıktan sonraki kök hücreleri tanımlar. Hematopoetik kök hücreler, mezenşimal kök hücreler, nöral kök hücreler, bağırsak kök hücreleri ve endotel kök hücreleri en fazla çalışılan erişkin kök hücre tipleridir. Multipotent ve unipotent özellikteki kök hücrelerdir. Erişkin kök hücreler doğrudan farklılaşamazlar [1].

Rejeneratif tıp hasarlı dokuları onarmak için kök hücreleri kullanan çok sayıda teknolojik yöntemleri içeren bir araştırma gelişen disiplinler arası bir konudur. Özellikle, mezenşimal kök hücreler (MKH) rejeneratif tıpta harika bir araçtır. Çünkü onların tümör geliştirme özelliği yoktur, bağışıklık kazandırma ve immünomodülasyon yanı sıra anti-inflamatuar işlevleri gerçekleştirme yeteneğine sahiptirler. Çok sayıda çalışmada, doku tamirinde MKH rolü ve allogenetik

başıklık tepkilerindeki modülasyon araştırılmıştır. Farklı kaynaklardan elde edilen MKH'ler benzersiz rejeneratif potansiyele sahiptir; kendilerini yenileyebilir ve kondrositlere, osteoblastlara, adipositlere, kardiyomiyositlere, hepatositlere, endotelial ve nöronal hücelere farklılaşabilirler. MKH'ler yaralı hücelerin iyileştirilmesi ve enflamasyonun durdurulmasını sağlayan birden fazla biyoaktif molekülün salgılanması yeteneğine sahiptir [11].

2.1.4. Mezenşimal Kök Hücelerin Osteoblast ve Kondroblasta Farklılaştırılması

Birçok hücre tipine farklılaşabilen, *in vitro* çoğalma özelliğine sahip, plastik yüzeylere yapışmalarıyla tanımlanan MKH'ler ilk olarak Friedenstein ve ark. tarafından 70'li yıllarda tanımlanmıştır. Friedenstein ve ark.'ları kemik iliğinde hematopoetik kök hücelerin dışında plastik yüzeye yapışan, multipotent ve kendi yenileme özelliği taşıyan bu hücre grubunu tanımlamıştır. Kemik iliği, yağ dokusu, göbek kordonu stroması mezenşimal kök hücre kaynaklarının başında gelmektedir [5].

MKH'ler kültür ortamı içeriğine eklenen serum ve büyüme faktörlerinin etkisi ile farklı hücre tiplerine dönüşebilme yeteneğine sahiptirler. Osteojenik farklılaştırma için kullanılan büyüme faktörleri deksametazon, askorbik asit ve β -gliserofosfatdır. Kondrojenik farklılaşma için ise deksametazon, askorbik asit, transforme edici büyüme faktörü β -1 (TGF- β 1) ve insülin-transferrin-selenyum (ITS) kullanılmaktadır [5].

Mezenşimal kök hüceler yerel hücre popülasyonları, salgı molekülleri ve hücre yüzey moleküllerini içeren mikro çevre nişinde bulunmaktadır. Mikro çevre Notch, Wnt, Hedgehog sinyal yollarını, hücre ve hücre ekstrasellüler matriksini, kaderin ve integrinleri etkileyen bileşenler içermektedir. Bu bileşenler hücre döngüsü, proliferasyonu ve transkripsiyon faktörleri üzerine etki eder. MKH'lerin kendini yenilemeye devam edebilmesi için apoptozdan ve farklılaşma sinyallerinden kaçınması gerekir. Hücre nişi bunu dengeleyen bir bileşendir. MKH'lerin kendini yenilemesi için gerekli sinyal yolları ERK1/2, MAPK ve PI-3K olarak tanımlanmakla beraber sinyal molekülleri ve transkripsiyon faktörleri tam olarak belirlenmemiştir. Epidermal büyüme faktörü EGF, PI-3K sinyal yolağını inhibe eder ve MKH'lerde yüksek seviyelerdeki ekspresyonu ile osteojenik farklılaşmayı uyarır.

PI-3K kaskadının MAP kinazları tarafından uyarılmasının ardından, EGF'in yanı sıra bazik fibroblast büyüme faktörü (bFGF), lösemi inhibitör faktörü (LIF), interlökin 6 (IL-6), Wnt, Smad ve Stat3 de farklılaşma ve hücre yenilenmesini düzenler. MKH'lerin salgıladıkları bazı faktörler hücreleri kendiliğinden farklılaşmaya yönlendirir. Kemik morfojenik faktörleri (BMP) ve bFGF osteojenik farklılaşma, TGF- β kondrojenik farklılaşma için gerekli faktörlerdir [13].

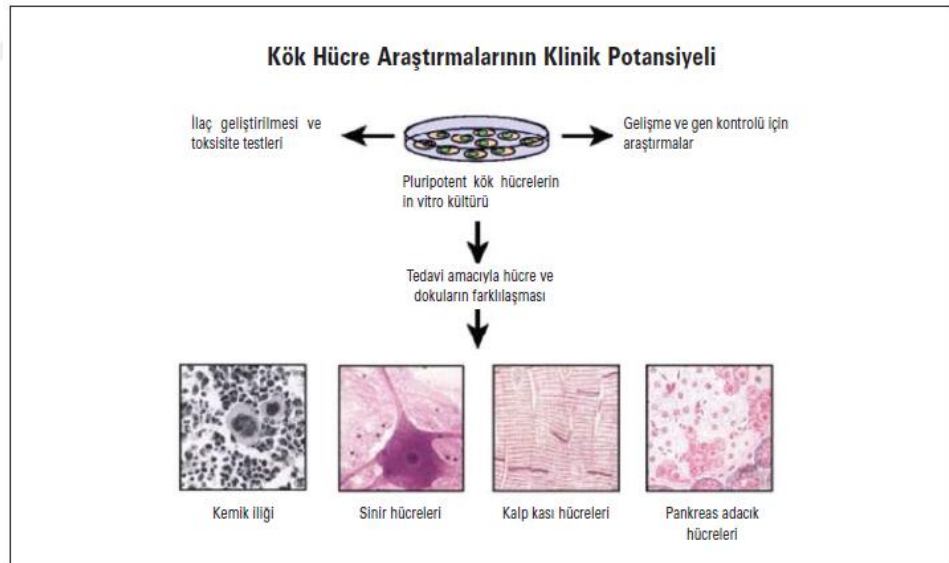
2.1.5. Mezenşimal Kök Hücre Kaynakları

Kemik iliği, yağ dokusu, göbek kordonu stroması mezenşimal kök hücre kaynaklarının başında gelmektedir. Kemik iliği kaynaklı mezenşimal kök hücreler klinikte en yaygın kullanılan kök hücrelerdir. Kemik iliğinde mezenşimal kök hücreler ve hematopoetik kök hücreler bulunmaktadır. Mezenşimal kök hücrelerin plastik yüzeylere yapışma potansiyellerinin fazla olması kemik iliği kaynaklı mezenşimal kök hücrelerin ayrıştırılmasında en önemli unsurdur. Besi ortam değiştirilirken hematopoetik kök hücreler yapışmayan hücreler olduğu için kültür ortamından uzaklaşırken mezenşimal kök hücreler kültür kabında kalır ve bu şekilde izole edilmiş olurlar. Hayvanlarda kemik iliği mezenşimal kök hücre eldesi kemik metafizel uçlarının kesilerek, kemiğin içinden besi ortamı akıtılıp yıkanmasıyla gerçekleştirilir. İnsan kemik iliği mezenşimal kök hücreleri 60-80 defa, fare kemik iliği mezenşimal kök hücreleri ise 100 defadan fazla bölünüp çoğalabilirler. Kordon kanı mezenşimal kök hücreleri kemik iliğinin alternatifi olarak düşünülmektedir. Kordon kanı mezenşimal kök hücreleri kemik iliği ve yağ dokusuna göre kültür ortamında daha hızlı çoğalırlar. Yağ dokusu kaynaklı mezenşimal kök hücreler multipotent özellikte, plastik yüzeye yapışma potansiyeli yüksek hücrelerdir. Yağ doku kaynaklı kök hücreler veya adipoz kökenli kök hücrelerin kültür ortamındaki çoğalma hızı elde edilen bireyin yaşıyla ters orantılıdır. Mezenşimal kök hücrelerin ayırımında yüzey reseptörleri aracılığıyla pozitif ve negatif belirteçler kullanılmaktadır. Mezenşimal kök hücrelerin hepsinde ortak olan pozitif belirteçler CD44, CD90, CD105, CD166, negatif belirteçler ise CD14, CD31, CD34, CD45'dir [5].

2.1.6. Kök Hücrelerin Klinikte Uygulama Alanları

Kök hücreler organ ve doku nakli, sinir sistemi hastalıkları, miyokard infarktüsü, kemik ve kıkırdak hastalıkları, şeker hastalığı, kanser ve immün hastalıklar gibi pek çok alanda klinik uygulamalarda kullanılmaktadır (Şekil 2.3.) Günümüzde organ ve doku nakillerinde doku reddi önemli bir sorundur. Otolog kök

hücre uygulamaları ile doku uyumsuzluğu sorunu ortadan kaldırılabilmektedir. Sinir sistemi hastalıklarının çoğunda tam olarak tedavi edici yöntemler geliştirilememiştir. Parkinson, Alzheimer, multipl skleroz, nörodejeneratif hastalıklar ve travmatik sinir kesileri sinir sistemi hastalıklarının başında gelmektedir. Embriyonik kök hücrelerin nörona farklılaştırılması ile sinir sistemi hastalıklarının tedavisi mümkün olabilir. Geçmiş yıllarda yapılan bir çalışmada Parkinson hastalığının tedavisinde alınan başarılı sonuçlar gelecek çalışmalara zemin hazırlamaktadır. Miyokard infarktüsü çok ciddi bir hastalık olup önemli kayıplara sebep olmaktadır. Kök hücrelerin hasarlı dokuya verilmesi ile kalp dokusunun kendini yenileyebileceği düşünülmektedir. Kemik ve kırık dokusu hasarlarının tedavisinde hali hazırda kullanılmakta olan bir yöntem olan kök hücre temelli tedavi üzerinde birçok çalışma yapılmaktadır. Osteoartrit gibi dejeneratif eklem hastalıkları kırık yönüne farklılaştırılmış kök hücrelerin hasarlı dokuya verilmesi ile tedavi edilebilmektedir. Şeker hastalığı tedavisinde başarılı sonuçlar alınmış, ancak bazı riskler sebebiyle klinik kullanımı yaygınlaşmamıştır. Otolog kök hücre uygulamaları kanser ve immün hastalıkların tedavisinde immüngenetik açıdan avantajlı bir yöntemdir [9].



Şekil 2.3.: Kök hücrelerin klinikte kullanım alanları [9].

2.2.Kemik Doku

Kemikte yara iyileşmesi tüm insanlar için bir problemdir. Kemik grefti, kırık iyileşmesi ve tümör cerrahisinde büyük hacimli kaplama işlemleri için her geçen gün

artan bir şekilde yeni teknolojilere ihtiyaç duyulmaktadır. Doku mühendisliğinin son zamanlarda ilgi duyduğu alanlardan biri de büyük kemik kayıplarının tamirinde kök hücrelerin kullanımıdır. Bu alan kültürde yaşatılan ve yönlendirilen hücrelerin yaralı bölgelere ulaştırılması avantajını kullanabilmekte ve örneğin kemik iliği stromal hücreleri osteoblast prekürsörü haline getirilip kemikte yara iyileşmesinde kullanılabilmektedir. Bu amaçla kullanılan sentetik implantlar verildikleri dokular ile ilişki içerisine girmekte ve bu nedenle birçok sorun ortaya çıkmaktadır. Bu sorunların engellenmesi için kök hücre, biyomateryal ve büyüme faktörleri gibi araçlar ile doku mühendisliği yeni çözümler üretmektedir. Örneğin kırık iyileşmesi ve geniş çaplı kemik defeklerinde kök hücre ile sorun çözülmeye çalışılmaktadır [14, 15]. Bu amaçla implant maddeleri olarak kullanılan biyomateryaller ve matriks molekülerinin görevi kemik iliği stromal hücreleri için osteoblastlara dönüşebilecekleri ve mineralize doku oluşumunu sağlayabilecekleri bir ortam oluşturmalarıdır. Daha da önemlisi osteoblast prekürsörlerinin implant yüzeyine adezyonu yani tutunmalarının sağlanmasıdır. Bu materyallerin kompozisyonlarında yapılan değişiklikler farklı etkilere neden olmaktadır [16]. Ayrıca adezyon molekülleri de bu maddelerle farklı şekillerde etkileşerek hücre yönlendirmesini değiştirebilmektedir [17].

Doku mühendisliğinin son yıllarda kullandığı başka bir araç ise polimerize mikroyapılar olup hücreye benzer şekilde yüzeysel özellikler içermektedir. Osteoblast büyümesi için ideale yakın bir yüzeysel ortam oluşturmaktadır. Osteoindüksiyon için ise biyoseramikler veya kemik morfojenik protein (BMP) gibi protein eklenmelerine ihtiyaç vardır. Son zamanlarda polimerize nano yapılar geliştirilmektedir [18, 19]. Elektro-eğirme yöntemi ile üretilen nanofibröz materyalin kök hücre ve osteoblastları üç boyutlu yapılandırılan yüzeyler ile daha etkin yönlendirebildiği gösterilmiştir [20].

Kemiğin kaynaması veya hasarının tamirinde esas rol oynayan hücreler pluripotent etkiye sahip mezenşimal kök hücrelerdir. Kemik uçlarının temas ettiği, kırık bölgesinin kanlanması bozulmadığı koşullarda kırığın oluşumundan itibaren şekillenen hematoma ve yankasal cevap bu hücrelerin bu bölgeye göç etmesini, çoğalmasını, farklılaşarak osteoblastlara dönüşmesini sağlamak ve sonuç olarak kırık problemsiz olarak iyileşmektedir. Mezenşimal kök hücreler kas, yağ dokusu ve

sinovyumdan da elde edilebilir. Fakat kemik iliği mezenşimal kök hücre yönünden daha yoğun bir içeriğe sahip olup elde edilmesi daha kolaydır [21, 22]. Kök hücreler yara iyileşmesi sürecinde ürettikleri kollajen, laminin ve fibronektin gibi matriks molekülleri ile oluşturdukları 3 boyutlu ortamda istenilen doku mühendisliği etkisini gösterir. Bu etkiyi göstermede biyomateryalin besin maddeleri, büyüme faktörleri ve metabolitleri oldukça poröz olan ortamlarında hücreye aktarabildiği ve oluşan çevresel dengenin hücreyi koruduğu gösterilmiştir [23].

2.3.Kıkırdak Doku

Kıkırdakta kalsifikasyon yine ekstrasellüler olarak ve özellikle de büyük kan damarlarının dokuya girişine yakın iri kondrositlerin bulunduğu bölgede meydana gelmektedir. Kıkırdaktaki kalsifikasyon, kalsiyum biriktirdikleri, lipid ve ALP ihtiva ettikleri gözlenen hücrelerin membranlarından meydana gelen ve çoğunlukla “matriks vezikülleri” olarak adlandırılan veziküller tarafından oluşturulur. Bu veziküllerin kıkırdak hücrelerinden kalsifikasyonu başlatmak üzere mi salındığı yoksa ölen hücrelerin artıkları mı oldukları tam olarak kesinleşmemiştir. Kıkırdak dokusundaki kalsifikasyon ve ossifikasyon, süngerimsi veya periosteal kemik olmak üzere oluşan dokulardakinden daha dolaylı bir olay olarak görünmektedir. Bununla beraber kıkırdak dokusu içinde kemik oluşabilmesi için matriks veziküllerinin gerekli olup olmadığı bilinmemektedir [24].

2.4.Biyomateryal

Biyomalzemelerin temel özellikleri biyolojik sistemlerle etkileşiminde uyum sağlayabilen ve yan etki oluşturmeyen malzemeler olmasıdır. Bu temel özellikler biyoyumluluk olarak da tanımlanmaktadır. Her geçen gün önemi ve uygulama alanları artan biyomalzemeler, hasarlı organ ya da dokuların işlevlerini yerine getirmek veya desteklemek amacıyla kullanılmakta olup klinik potansiyelleri oldukça yüksektir. Günümüzde yeni bir kavram olmasına rağmen biyomalzemeler tarihin çok eski dönemlerinden beri kullanılmaktadır. Bunun en güzel örnekleri Mısır mumyalarında bulunan yapay göz, burun ve dişlerdir. Diş hekimliğinde altın kullanımı 2000 yıl öncesine, bronz ve bakır kemik protezlerin kullanımı milattan öncesine dayanmaktadır. 19. yüzyıl ortalarına kadar bakırın zehirleyici etkisine rağmen yerine kullanılacak bir alternatifi olmadığı için kullanılmış ve bu dönemden

sonra biyomateryal çalışmaları hız kazanmıştır. İnsanlardan kullanılan ilk materyal 1938 yılında geliştirilmiş ve kemik defektlerinde kullanılmıştır. Plaka ve vida olarak kullanılan bu materyal metal içeriklidir. 1960'lı yıllara kadar kullanılan bu materyalin biyoyumlu olmadığı anlaşılmıştır. İlerleyen yıllarda biyomateryal geliştirmeye yönelik çalışmalar hız kesmeden devam etmiştir. Kalsiyum ve fosfat içeren kemik dokusunun cam, seramik ve cam seramikleri ile uyum sağlayacağını düşünen Hench biyocam (45S5-Bioglass®) ve hidroksiapatit (HA) gibi biyoaktif seramikleri üretmiştir. Hench ve arkadaşları 4S55 biyocam adı verilen biyoaktif malzemeyi geliştirmiş ve 1972 yılında yaptıkları çalışma ile bu konuda önemli bir adım atmışlardır [4].

Biyoyumluluk: Biyoyumluluk, biyomalzemelerin performanslarını ifade etmektedir. Biyoyumluluk, malzemenin vücut ile uyum sağlaması yani toksik etki göstermemesi olarak tanımlanmaktadır [4].

2.4.1. Biyomateryal Çeşitleri

4 grup altında toplanan biyomalzemeler metaller, seramikler, polimerler ve kompozitlerdir. Uygulama yapılacak bölgeye göre biyomalzemeleri sert dokuya uygulanacak biyomalzemeler ve yumuşak dokuya uygulanacak biyomalzemeler olarak da sınıflayabiliriz [4].

Çelikler, kobalt ve alaşımları, dental amalgam, altın, nikel-titanyum alaşımları, titanyum ve titanyum alaşımları metal biyomalzemelerdendir. Biyoyumluluğu zayıf, doku yapısından daha sert, aşınma ve alerjik tepkiler oluşturma dezavantajları nedeniyle biyomalzeme olarak kullanımından daha çok biyomedikal ürünlerin kaplanmasında kullanılırlar. Seramik biyomalzemeler alümina, zirkonya, kalsiyum-fosfat seramikler, cam ve cam seramiklerdir. Polietilen, poliüretan, politetrafloroetilen, poliasetal, polimetilmetakrilat, polietilenteraftalat, silikon kauçuk, polisülfon, polilaktik asit ve poliglikolik asit polimer yapıdaki biyomalzemelerdir. Lif, film, jel, boncuk, nanopartikül gibi farklı biçimlerde üretilibilmeleri sayesinde çeşitli alanlarda kullanılabilirler. Basma dayanımlarının zayıf olması ve toksik etki oluşturmaları dezavantajlarıdır. Bir diğer dezavantaj ise sterilizasyonları sırasında polimer yapının bozulmasıdır. Kompozitler birden fazla biyomalzeme türünün birlikte kullanımıyla oluşturulan biyomalzemelerdir [4].

Biyoaktif seramikler kemik dokusuna bağlanabilen implant yüzeylerinin kaplanmasında kullanılan seramiklerdir. Hidroksiapatit (HA) ve biyoaktif camlar (BAG) bu grupta yer alan seramiklerdir. 45S5 biyocam biyoaktif camların en bilinenlerindendir ve yapısında %45 SiO₂, %24,5 CaO, %6 P₂O₅, %24,5 Na₂O bulundurmaktadır. Cam yüzeyinde oluşan hidroksikarbonat apatit tabaka ile kemiğe bağlanır [25].

Biyocam 45S5 kemik tamirini uyaran biyoaktif bir implant materyalidir. Sulu bir ortamda, bu malzeme, hidroksiapatit ve/veya hidroksikarbonat apatitten yapılmış bir yüzey tabakasının oluşumu ile sonuçlanan bir dizi reaksiyonlara maruz kalmıştır. Biyocam 45S5 hem kemik hem de yumuşak bağ dokusunu birbirine bağlar ve yüksek biyoaktif indeks gösterir. Hali hazırda hem kemik hem de diş implantları için biyocam protez cihazlar kullanılmaktadır. Çünkü bu cihazlar diş ve vücut çevresinde bulunan sert dokular ile benzerliklere sahiptir [26, 27]. 45S5 biyocam vücut sıvılarına daldırıldığında, camın yüzeyinde hidroksil karbonat apatit tabakasını biriktirebilme özelliğine sahip bir silika-tabanlı biyoaktif camdır [28].

2.4.2. Çift Fazlı İskele

Çalışmada üretilmesi planlanan çift-fazlı iskelelerde amaç, kemik gelişimi için optimize edilmiş bir iskele ile kıkırdak için optimize edilmiş bir iskelenin bir arada üretimi ve kullanımıdır. Piyasaya çıkmış iki tane çift-fazlı ürün bulunmaktadır. Bunlardan ChondroMimetic™, kollajen ve GAG-fosfat katmanlarından, Trufit™ ise PLGA/PGA (Polilaktik glikolik asit / Poli glikolik asit) katmanlarından oluşmaktadır. Halen faz II çalışmaları devam eden ürünler de mevcuttur. Ancak iki katmanlı ürünlerin çoğunluğunda bir fazdan diğerine geçiş ani olduğu için arayüzde kullanım sırasında stres yoğunlaşması olmakta ve dolayısıyla delaminasyon riski çok yüksektir [29, 30, 31]. Bu nedenle önerilen çalışmada kemikten kıkırdağa aşamalı geçiş sağlayacak, tek parça üretilecek bir iskele tasarımı düşünülmüştür [32, 33, 34, 35]. Bu tasarımda kemikle entegrasyonun olacağı bölge için 45S5 biyocam ve sodyum aljinat ile, E.Ü. Biyomühendislik Bölümü'nde mevcut olan üç boyutlu, eritilmiş malzeme yığma (fused deposition modelling – FDM) yöntemine dayalı bir yazıcının (Ultimaker2) laboratuvarında modifikasyonu sonucu elde edilecek eklemeli üretim cihazı kullanılarak üretimine başlanacak iskele, her bir katmanda biyocam oranı azaltılıp hidrojel oranı arttırılarak en üst katmanda mineralsiz hidrojel yapısına geçecek şekilde tasarlanmıştır. Toplam gözeneklilik oranının %90'ın üzerinde olması hedeflenmektedir. Kıkırdak entegrasyonu için, ilgili mikroçevreyi başarıyla taklit

ettiği bilinen aljinat bazlı hidrojeller kullanılacak ve bu hidrojellerin Ca^{+2} iyon değişimi ile fiziksel çapraz bağlanması ile yapı stabilize edilecektir [36, 37]. Önerilen iskele yapısının farklı katmanları yapıştıracak bir mekanizmaya gerek duymadan, fizyolojik kemik-kıkırdak arayüzünün karmaşık uzaysal mikroyapısını daha iyi taklit ederek başarılı bir doku mühendisliği ürününe olanak sağlaması beklenmektedir. İskele üretiminde biyocam içeriğinin yanı sıra gözeneklilik oranı ve gözenek büyüklüğünde de aşamalı değişim oranları denenecektir.

2.5.Tezin Amacı

Yağ dokudan elde edilen kök hücrelerin performans olarak daha etkili olduğu bilinmektedir. Kemik iliğinden elde edilen mezenşimal kök hücrelerin kolay elde edilebilirliği, çoğalma ve farklılaşma yönünden de iyi olduğu bilinmesi üzerine proje kapsamında iki farklı dokudan kök hücre eldesi amaçlanmıştır. Elde edilen kök hücrelerin farklılaşma potansiyellerinin incelenmesi ve üretilen çift fazlı iskele ile uyumlarının belirlenmesi hedeflenmiştir.

Planlanan yeni iskele ile kemik iliği ve yağ dokusundan elde edilecek olan mezenşimal kök hücrelerin kemik ve kıkırdak öncü hücrelerine farklılaştırılmasından sonra iskeler ile hücrelerin uyumu *in vitro* olarak analiz edilecektir.

Çalışmada doku rejenerasyonunu hedefleyen hücreli ve hücresiz, biyoaktif özellikli, biyobozunur ve biyouyumlu biyomalzemelerin ve doku mühendisliği ürünlerinin geliştirilmesi ve ilerleyen aşamalarda klinik çalışmalarının da yapılması amaçlanmaktadır.

3. MATERİYAL VE YÖNTEMLER

3.1. Materyal

3.1.1. Deney Hayvanı

Çalışmada kemik iliği ve yağ dokusu eldesi için Manisa Celal Bayar Üniversitesi Deney Hayvanları Laboratuvarı'ndan temin edilen 1 adet sıçan kullanılmıştır.

3.1.2. Solüsyonlar

1. Primer besi ortamı:

MEM Alpha Modification (Capricorn Scientific, Lot No: CP15-1157)

%15 Fetal Bovine Serum (Capricorn Scientific, Lot No: CP14-1114)

%1 L-glutamin (Gibco, Lot No: 1230909)

%1 Penisilin-streptomisin (Gibco, Lot No: 1780182)

%1 Gentamisin (Capricorn Scientific, Lot No: CP15-1393)

%0,1 Amfoterisin-B (Capricorn Scientific, Lot No: CP15-1023)

2. Fosfat tamponlu tuz solüsyonu:

1 tablet PBS (Sigma, P4417)

200 ml Distile su

3. %0,0075'lik Kollegenaz tip I solüsyonu:

0,0075 ml Kollegenaz tip I (Sigma, C0130-500MG, Lot No: 080M1539V)

100 ml Ca^{+2} ve Mg^{+2} içermeyen PBS (Biological Industries, Cat: 02-023-1A)

4. %4'lük Paraformaldehit (PFA) solüsyonu:

100 ml PBS

4 gr Paraformaldehit (Merck, A.B.D)

5. Triton x-100 solüsyonu:

10 ml Triton x-100 (AppliChem., Lot No: 4L003808)

10 µl PBS

6. %3 Hidrojen Peroksit (H_2O_2) solüsyonu:

90 ml Methanol

1 ml %37'lik H_2O_2

7. Osteojenik Farklılaştırma Ortamı:

50 ml primer besi ortamı içerisine;

50 µg/ml Askorbik asit,

10⁻⁸ M Deksametazon

10 mM β-gliserofosfat

8. Kondrojenik Farklılaştırma Ortamı:

50 ml primer besi ortamı içerisine

2,5 µg/ml TGF-β1

%1 ITS-A (Gibco, Cat. No:51300-044, Lot No: 759771)

5 mM Askorbik asit

10⁻⁷ M Deksamatazon

9. MTT solüsyonları:

5 mg/ml stok solüyon:

50 gr MTT (Sigma, M5655)

10 ml PBS

MTT kullanma solüsyonu:

Stok solüsyon besi ortam ile 1/10 oranında dilüe edilerek kullanma solüyonu hazırlanır.

10. ALP/VK (Alkalen fosfataz/Von Kossa) boyama solüsyonları:

%10 nötral formalin:

0,065 gr Na₂HPO₄ (0306, J. T. Baker, Hollanda)

0,04 gr NaH₂PO₄.H₂O (5266437, Merck, Almanya)

1 ml %37,5'luk stok formalin (1.04002.2500, Merck, Almanya)

9 ml Distile su

Taze substrat solüsyonu:

5 mg Naphthol AS-MX fosfat (Sigma, N4875, A.B.D) + 200 µl N,N DMF (D4551, Sigma, A.B.D)

25 ml 0,2 M Tris HCl (A2264.010, Applichem, Almanya)

25 ml Distile su

30 mg Fast Red Violet LB Salt (Sigma, F3381)

Hepsini karıştırıp daha sonra 0,45'lik filtre ile süzuyoruz.

0,2 M Tris HCl solüsyonu:

554 µl %37,5'luk stok HCl

1,61 gr Tris

100 ml Distile su

%2,5 luk gümüş nitrat solüsyonu:

0,25 gr Gümüş nitrat (Sigma, 209139)

10 ml Distile su

11. Alizarin Kırmızısı boyama solüsyonları:**%1'lik stok alizarin kırmızısı solüsyonu:**

0,10 gr Alizarin kırmızısı

10 ml Distile su

Alizarin kırmızısı Kullanma solüsyonu:

%1'lik stok solüsyon distile su ile 1/10 oranında dilüe edilerek hazırlanır.

%70'lik etanol:

70 ml %98'lik stok etil alkol

30 ml Distile su

12. Alcian Mavisi boyama solüsyonları:**%1'lik stok alcian mavisi solüsyonu:**

0,10 gr Alcian mavisi

10 ml Distile su

0,1 N HCl solüsyonu:

83 µl %37'lik stok HCl

10 ml Distile su

13. Biyocam solüsyonlar:**%50 Biyocam:**

0,4 gr aljinat

0,2 gr biyocam 45S5

20 ml ultrapur su

%40 Biyocam:

0,4 gr aljinat

0,16 gr biyocam 45S5

20 ml ultrapur su

%30 Biyocam:

0,4 gr aljinat
0,12 gr biyocam 45S5
20 ml ultrapur su

%20 Biyocam:

0,4 gr aljinat
0,08 gr biyocam 45S5
20 ml ultrapür su

%10 Biyocam:

0,4 gr aljinat
0,04 gr biyocam 45S5
20 ml ultrapur su

%2 Sodyum aljinat:

0,4 gr alijant
20 ml ultrapur su

14. 0,5 M CaCl₂ solüsyonu:

8,32 g CaCl₂
150 ml ultrapur su

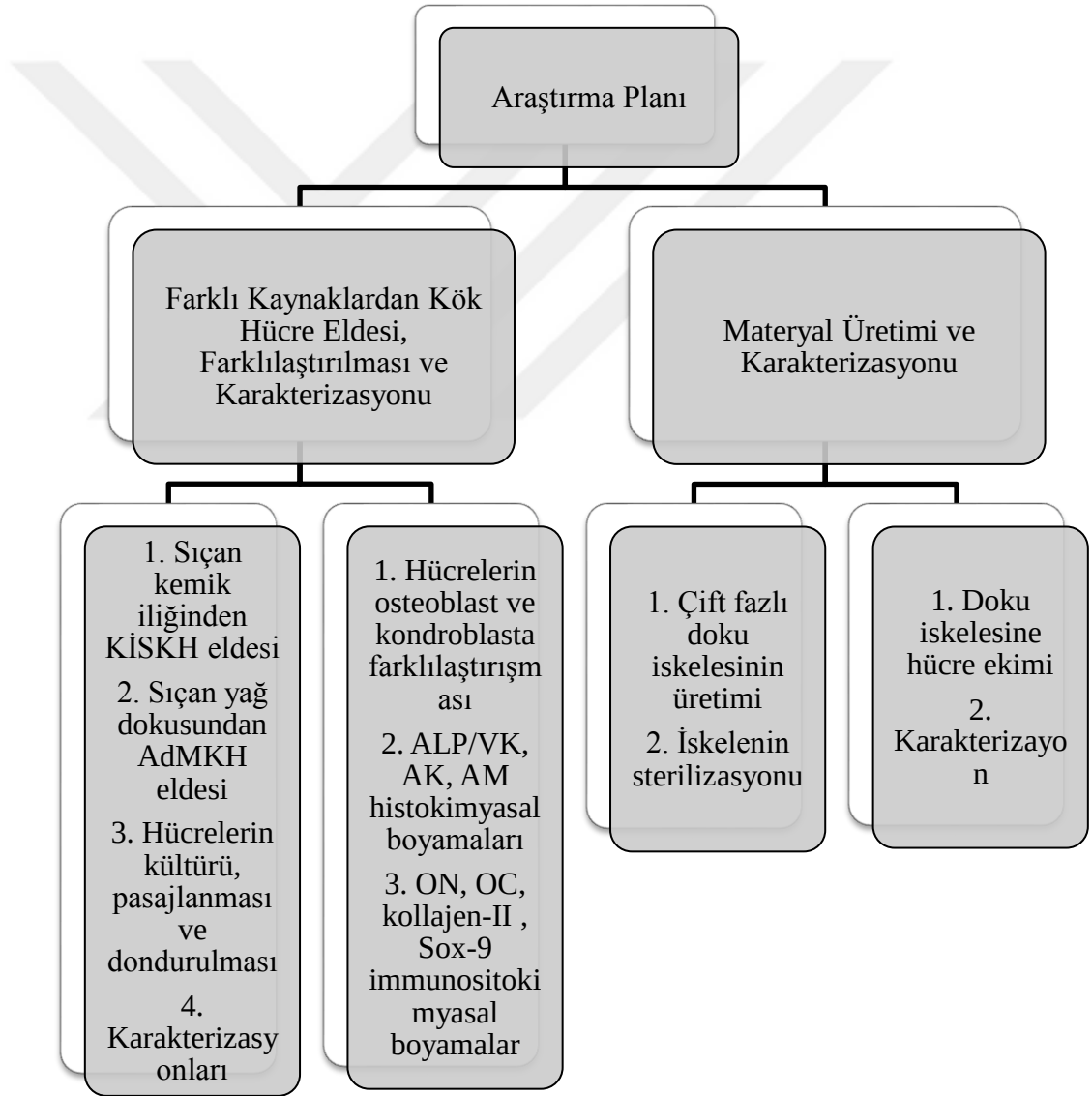
15. SEM tamponları:

0,1 M kakodilat (C0250, Sigma, A.B.D) ile tamponlanmış, %2,5'luk glutaraldehit (8.20603.1000, Merck, A.B.D) solüsyonu.

0,1 M kakodilat (C0250, Sigma, A.B.D) ile tamponlanmış, %0,2'lik ozmiyum tetroksit solüsyonu.

3.2. Yöntemler

Çalışma planı 2 aşamada gerçekleştirilmiştir. İlk aşamada sıçan kemik iliği ve yağ dokusundan kök hücreler elde edilmiş, elde edilen kök hücreler osteoblast ve kondroblastlara farklılaştırılıp karakterizasyonları gerçekleştirilmiştir. İkinci aşamada ise kök hücre eldesi ve farklılaşmayla eş zamanlı olarak çift fazlı doku iskelesi üretilmiş ve karakterizasyonu yapılmıştır. Son olarak osteojenik ve kondrojenik farklılaştırılmış kök hücreler iskele üzerine ekilmiş ve hücrelerin iskele üzerinde tutunduğu gözlemlenmiştir (Şekil 31.).



Şekil 3.1.: Çalışma planının şematik gösterimi.

Bu çalışmanın hücre kültürü aşamaları Manisa Celal Bayar Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji-Embriyoloji AD, Hücre Kültürü Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Deney hayvanları, Celal Bayar Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi (CBÜ-DEHAM) ünitesinden temin edilmiştir. Bu onay bazında çalışmada toplam 1 denek kullanılmıştır. Çalışmanın çift fazlı iskele üretimi aşaması Ege Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü, Hayvan Hücre Kültürü ve Doku Mühendisliği Laboratuvarında yapılmıştır.

3.2.1. Kemik İliği ve Yağ Dokusundan Kök Hücre Eldesi

Çalışmada farklı dokulardan elde edilen mezenşimal kök hücrelerin farklılaşma potansiyellerinin değişkenlik göstermesi ve farklı biyomalzemeler ile uyumlarının aynı olmamasından dolayı, çift fazlı iskelenin kök hücrelerden hangisi ile daha uyumlu olduğunun anlaşılması açısından iki farklı dokudan kök hücre eldesi için 1 hayvan kullanılmıştır.

3.2.1.1. Kemik İliğinden Kök Hücre Eldesi

Sıçanın deney hayvanları etik kurul yönergesine uygun olarak ketamin/ksilazin anestezisi altında servikal dislokasyon yapılarak yaşamı sonlandırılmıştır. Vücudun dış yüzeyinin dezenfeksiyonu için hayvan bir pens ile kuyruğundan tutulup derin bir kap içerisindeki alkole tamamen daldırılıp, 5 dakika bekletilmiştir. Alkol banyosundan çıkartılan sıçan ameliyat bezi üzerine sırtı alta gelecek şekilde yerleştirilmiştir (Şekil 3.2). Her iki arka bacak derisi steril makas, pens ve bisturi yardımıyla sırayla sıyrılıp, ayakları kesilerek uzaklaştırılmıştır. Bacaklar steril bir petri kabına yerleştirilerek, laminar hava akış kabini içerisine alınarak kemikler üzerindeki kaslar steril pens ve makas yardımıyla ayrılarak uzaklaştırılmıştır (Şekil 3.3A.). Tibia ve femur kemikleri çıkartılarak primer besi ortamı [α -MEM + %15 fetal sıçır serumu (FBS) + %1 penisilin-streptomisin + %1 gentamisin + %1 L-glutamin + %0,1 amfoterisin B] içine alınmıştır. Steril makas yardımıyla kemiklerin metafizel uçları kesilerek ve insulin enjektörü ile kemik iliği boşluğuna primer besi ortamı verilerek, içerisinde 5 ml primer besi ortamı bulunan tüp içerisine alınmıştır. Hücre süspansiyonu pipetleme ile sağlandıktan sonra 5 dakika 1000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant atılarak tekrar taze 5 ml besi ortamı ilave edilerek 2 kez yıkama yapılmıştır. Santrifüj sonunda süpernatant dökülerek elde edilen hücreler aynı tüpe toplanmış ve besi ortamı ile süspanse edilerek 25 cm² yüzeyli hücre kültür kabında 37°C'de ve %5 CO₂'li inkübatöre kaldırılmıştır. Hücrelerin üremesine göre 2-3 günde bir besi ortamı

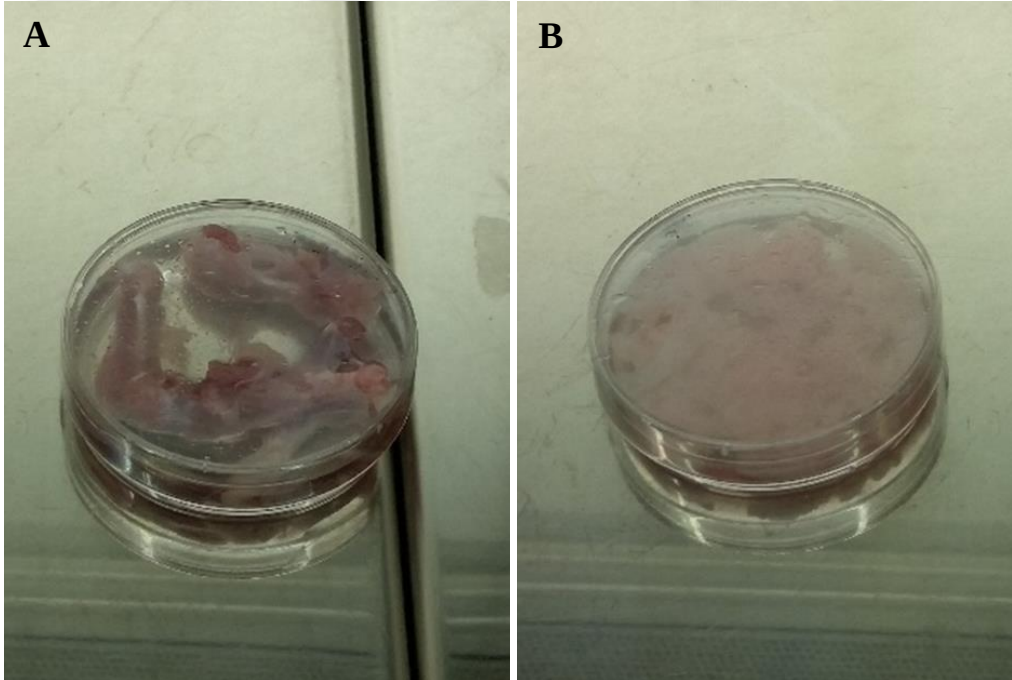
değiştirilerek hücrelerin üremesi 24-48 saat aralıklarla inverted faz kontrast mikroskopta gözlenmiştir. Besi ortamı kemik iliği stromal kök hücrelerin kültür kabı yüzeyine tutunmasını sağlar iken, hematopoetik hücreler yüzen hücreler olduğundan her bes ortamı değişiminde kültür ortamından uzaklaştırılması sağlanmıştır. Kök hücre kültürü, hücreler %80 konfluent oluncaya kadar devam ettirilmiştir [38]. Konfluent olan hücrelerden pasaj yapılarak hücrelerin çoğaltılması sağlanmış ve hücreler 3. pasajda deneylerde kullanılmak amaçlı dondurularak stoklanmıştır.

3.2.1.2. Yağ Dokudan Kök Hücre Eldesi

Kemik iliğinin alındığı hayvandan retroperitoneal yağ dokusu steril PBS bulunan petri içersine alınmıştır (Şekil 3.3B). Doku mekanik disseksiyon amacı için her yıkamada steril makas ile 1 cm'lik küçük parçalara ayrılmıştır. Yıkama işleminden sonra dokular, Ca^{+2} ve Mg^{+2} içermeyen PBS içerisinde hazırlanan %0,075'lik kollajenaz tip I bulunan petriye alınarak ve steril bistüri ile küçük parçalara ayrılmıştır. Doku örnekleri 15 ml'lik santrifüj tüplerine alınarak üzerine 3 ml %0,075'lik kollajenaz tip I solüsyonundan ilave edilmiştir. Çalkalamalı su banyosunda 60 dakika bekletilen örnekler üzerine kollajenazı nötralizasyon için 5 ml steril Ca^{+2} ve Mg^{+2} içeren PBS eklenip, 1800 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Bu işlem iki kez daha tekrarlanmıştır. Yıkamalardan sonra süpernatant atılarak ve pellet üzerine 1 ml primer bes ortamından [α -MEM + %15 fetal sıgır serumu (FBS) + %1 penisilin-streptomisin + %1 gentamisin + %1 L-glutamin + %0,1 amfoterisin B] ilave edilmiştir. Her bir denekten elde edilen hücreler aynı tüpe toplanarak ve pipetleme işleminden sonra hücreler 25 cm² yüzeyli hücre kültür kabında 37°C'de ve %5 CO₂'li inkübatöre kaldırılmıştır. Her 3 günde bir bes ortamı değiştirilerek %80 konfluent oluncaya kadar kültüre devam edilmiştir [39]. Konfluent olan hücrelerden pasaj yapılarak hücrelerin çoğaltılması sağlanmış ve hücreler 3. pasajda deneylerde kullanılmak amaçlı dondurularak stoklanmıştır.



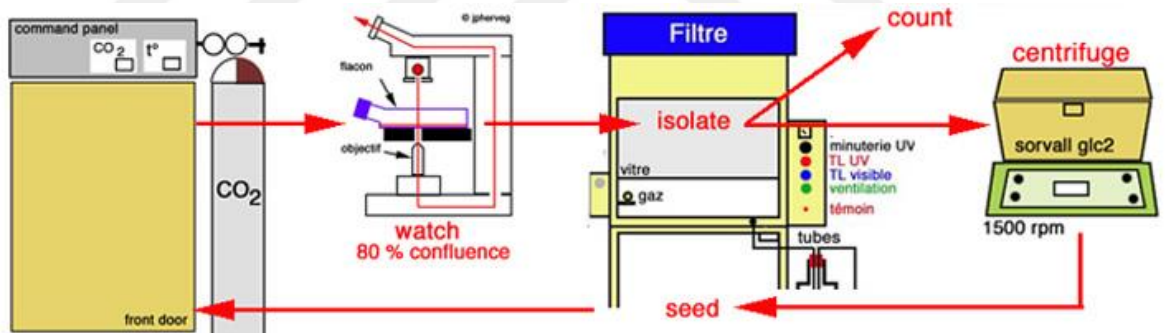
Şekil 3.2: Servikal dislokasyon ile yaşamı sonlandırılan sıçanın üst derisi kesildi.



Şekil 3.3: Sıçandan elde edilen femur ve tibia kemikleri (A) ve aynı sıçandan elde edilen retroperitoneal yağ dokusu (B).

3.2.1.3. Hücrelerin Pasajlanması

Hücelere inverted faz kontrast mikroskopta bakılarak %80 konfluent olunca pasajlanmıştır. Hücre kültüründe kullanılmış besi ortamı boşaltılmıştır. 25 cm²'lik kültür kabındaki hücreler 3 ml PBS ile yıkandıktan sonra %0.25'lik tripsin/EDTA (Gibco, 25200-056) solüsyonundan 3 ml kültür kabına eklenmiş ve kültür kabı etüve kaldırılıp 5-10 dakika (hücreler yuvarlaklaşınca kadar) beklenmiştir. Süre sonunda kültür kabında bulunan hücelere tripsin/EDTA'nın zarar verici etkisini inhibe etmek için aynı miktarda FBS içeren primer besi ortamı eklenmiştir. Daha sonra pipetleme ile hücrelerin tamamı santrifüj tüplerine alınarak, 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda süpernatant uzaklaştırılarak, pellet 5 ml kültür ortamı ile yıkanmıştır. Thoma lamında hücre sayısı tespit edilerek, kültür kaplarına istenilen yoğunlukta hücre üremesi için ekilmesi gereken hücre sayısı hesaplanarak, 25 cm²'lik kültür kabı için 5 ml primer besi ortamı konulmuş ve kültür kaplarına hesaplanan miktar ekilmiştir. Kültür kapları 37°C'de ve %5 CO₂'li etüvde inkübe edilmiştir (Şekil 3.4.).



Şekil 3.4.: Kültürde hücre pasajı akış şeması.

3.2.1.4. Hücrelerin Sıvı Azotta Stoklanması

Elde edilen hücrelerin özelliklerini değiştirmeksizin uzun süreli saklanması amaçlanmıştır. Hücrelerin pasajını yaptıktan sonra, süspanse hücre kültürlerinin canlılık oranı ve hücre yoğunluğu belirlenmiştir. Hücre süspansiyonu santrifüj tüpüne aktarılarak, üzerine 5 ml serumlu besi ortamı eklenerek, 1000 rpm, 5 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant dökülmüştür. Santrifüj tüpünün içindeki hücre

sedimentini hafif parmak vuruşları ile homojenize ettikten sonra uygun miktarda soğuk dondurma vasatı (%90 fetal sıgır serumu + %10 Dimetil sülfoksit (DMSO), ilave edilmiştir. Monolayer kültürler için: hücrenin bilinen pasaj oranı göz önüne alınarak 1 ampulde 1 kültür kabına yetecek miktarda hücre olacak şekilde, her ampul için 1 ml dondurma vasatı ilave edilmiştir. Dondurma ortamı içerisinde homojenize edilen hücre süspansiyonu, önceden üzerlerini uygun kalemle etiketlemiş ve buz üzerindeki sehpaye dizmiş olduğumuz ampullere konulmuştur. Ampulleri, vidalı kapaklarını sıkıca kapattıktan sonra polistiren köpük kutuya yerleştirerek -80°C derin dondurucuda 1 gece bekletildikten sonra ampuller derin dondurucudan alınarak sıvı azot tankına transfer edilmiştir.

3.2.2. Elde Edilen Kök Hücrelerin Karakterizasyonları

Kemik iliği ve yağ dokusundan elde edilen mezenşimal kök hücrelerin karakterizasyonları için kültürler MKH için pozitif CD90 ve negatif CD45 immunositokimya protokolü uygulanmıştır. Bu amaç ile proteinlere karşı antikorları kullanılarak immunositokimyasal olarak tayin edilmiştir. Örnekler PBS’de hazırlanmış %4’lük paraformaldehid (PFA) solüsyonu (pH 7,4) ile fikse edildikten sonra 3 defa 5’er dakika PBS ile yıkanmıştır. Daha sonra triton x-100 solüsyonu ile 5 dakika inkübe edildikten sonra yukarıda tarif edilen şekilde yıkama işlemi yapılmış ve %3 hidrojen peroksit (H₂O₂) ile 30 dakika beklenmiştir. 1 saat bloklama serumu ile inkübe edilen hücreler yıkanmadan sadece serumun alınmasından sonra anti-CD90 (Santa Cruz, sc-53456, Lot: F0816) ve anti-CD45 (Abcam, ab10558, Lot No: GR269008-1) antikorları ile bütün gece inkübe edilmiştir. Yıkama işleminden sonra “biotinlayted anti-mouse/antihuman” konjuge edilmiş streptavidin-horsedish peroksidaz solüsyonları ile 30 dakika boyanmıştır (85-9043, Zymed Histostain kit San Fransisco, A.B.D). Her bir ikincil antikor 3 defa 5 dakika PBS ile yıkanmıştır. İmmunreaktiviteyi görünür halde saptamak amacıyla diaminobenzidin (DAB, 00-2020, Zymed, San Fransisco, A.B.D) ile 5 dakika boyanmıştır. Primer antikorun yerine PBS konarak negatif kontrolleri yapılmıştır. Distile su ile yıkama işleminden sonra kapatma solusyonu (00-8030, Histomount mounting solution, Sanfransisco, ABD) ile kapatılmıştır [38].

3.2.3. Farklı Kaynaklardan Elde Edilen Kök Hücrelerin Farklılaştırılması

Her bir farklı kaynaktan elde edilen kök hücreler osteoblastik farklılaşma için osteojenik farklılaştırma ortamında, kondrojenik farklılaşma için ise kondrojenik farklılaştırma ortamında kültüre edilmiştir. Osteojenik farklılaştırma ortamı primer besi ortamına 50 µg/ml askorbik asit, 10^{-8} M deksametazon ve 10 mM β-gliserofosfat eklenerek hazırlanmıştır. Kondrojenik farklılaştırma ortamı ise primer besi ortamına 2,5 µg/ml TGF-β1, %1 Insulin-Transferrin-Selenium-Sodium Piruvat (ITS-A, Gibco, Cat. No:51300-044, Lot No: 759771), 5 mM askorbik asit, 10^{-7} M deksametazon eklenerek hazırlanmıştır [5].

Farklılaştırma ortamına alınan her bir farklı kök hücre konsantrasyonu MTT analizi için 1×10^4 hücre/ml olacak şekilde 96 gözlü kültür kaplarına, immunositokimyasal ve histokimyasal analizler için ise 3×10^4 hücre/ml olacak şekilde 24 gözlü kültür kaplarına 3 tekrarlı olacak şekilde pasajlanmıştır. 1. grup kontrol grubu olup, her bir kök hücre grubu için kendi besi ortamında devam edilmiştir. 2. grup osteojenik grup olup, her bir kök hücre grubu osteojenik farklılaştırma besi ortamında kültüre edilmiştir [38]. 3. grup kondrojenik grup olup, her bir kök hücre grubu kondrojenik farklılaştırma besi ortamında kültüre edilmiştir [40]. Farklılaşma ortamındaki hücrelerin çoğalma yeteneği 1, 3, 7, 14 ve 21. günlerde MTT yöntemi ile spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Hücre karakterizasyonları immunositokimyal ve histokimyasal yöntemler ile değerlendirilmiştir.

3.2.3.1. MTT

Kemik ve kıkırdak öncü hücresine farklılaştırılan hücreler mitokondrial fonksiyonları, dolayısıyla canlı hücre yoğunluğu kolorimetrik bir test yöntemi olan MTT testi ile belirlenmiştir. Bu test, sarı, suda çözünebilen MTT boyasının aktif mitokondrilerdeki elektron akımı yoluyla mor formazan ürünlerine dönüşmesini ölçmektedir. MTT denemesi, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromid'in mor renkli formazan ürünlerinin azalması hücre yaşama ve çoğalmasında fikir vermektedir. 5 mg/ml olacak şekilde PBS içerisinde MTT (M5655, Sigma, A.B.D) stok solüsyonu hazırlanmıştır. Bu stok solüsyon, hücre besi ortamı ile 1/10 oranında seyreltilerek kullanma solüsyonu hazırlanmıştır. Hücreler MTT kullanma solüsyonu ile 4 saat karanlıkta inkübe edilmiştir. Daha sonra solüsyon uzaklaştırıldıktan sonra kültür kabının her gözüne dimetilsülfoksit (DMSO, D2650, Sigma, A.B.D) eklenmiştir. Formazan tuzları DMSO ile çözülerek ve absorbands 570

nm’de spektrofotometre (UNICAM, Uv visible Spektrofotometre, İngiltere) de ölçülmüştür [38].

3.2.3.2. İmmunositokimyasal Yöntem

Kültürlere kıkırdak farklılaşması için kollajen II ve Sox-9 tanımlama faktörleri, osteoblast farklılaşması için ise osteonektin ve osteokalsin immunositokimya protokolü uygulanmıştır. Bu amaç ile proteinlere karşı antikorları kullanılarak immunositokimyasal olarak tayin edilmiştir. Örnekler PBS’de hazırlanmış %4’lük paraformaldehid solüsyonu (pH 7,4) ile fikse edildikten sonra 3 defa 5’er dakika PBS ile yıkanmıştır. Daha sonra triton x-100 solüsyonu ile 5 dakika inkübe edildikten sonra yukarıda tarif edilen şekilde yıkama işlemi yapılmış ve %3 hidrojen peroksit (H₂O₂) ile 30 dakika beklenmiştir. 1 saat bloklama serumu ile inkübe edilen hücreler yıkanmadan sadece serumun alınmasından sonra anti-osteonektin (Santa Cruz, sc-73472, Lot No: F0816) ve anti-osteokalsin (Santa Cruz, sc-365797, Lot No: A2617), anti-kollajen II (Santa Cruz, sc-52658, Lot No: K1716) ve anti-Sox-9 (Biorbyt, Cat. No: orb186234) antikorları ile bütün gece inkübe edilmiştir. Yıkama işleminden sonra “biotinlayted anti-mouse/antihuman” konjuge edilmiş streptavidin-horsedish peroksidaz solüsyonları ile 30 dakika boyanmıştır (85-9043, Zymed Histostain kit San Fransisco, A.B.D). Her bir ikincil antikor 3 defa 5 dakika PBS ile yıkanmıştır. İmmunreaktiviteleri görünür halde saptamak amacıyla diaminobenzidin (DAB, 00-2020, Zymed, San Fransisco, A.B.D) ile 5 dakika boyanmıştır. Primer antikorun yerine PBS konarak negatif kontrolleri yapılmıştır. Distile su ile yıkama işleminden sonra kapatma solusyonu (00-8030, Histomount mounting solution, Sanfransisco, ABD) ile kapatılmıştır [38].

3.2.3.3. Histokimyasal Yöntemler

3.2.3.3.1. Alkalen Fosfataz / Von Kossa (ALP/VK) Boyaması:

Hücreler 24 gözlü kültür kaplarında inkübe edilerek, alkalen fosfataz (ALP) aktivitesi ve nodüllü alanlar gözlenmiştir. Kültür kaplarındaki besi ortamı uzaklaştırılarak, soğuk PBS ile yıkanmıştır. Daha sonra %10’luk soğuk nötral formalin tamponda 15 dakkika fikse edilmiştir. Süre sonunda tüm tampon uzaklaştırılarak ve bir kere distile su ile yıkanarak, 15 dakika distile suda bırakılmıştır. Daha sonra taze substrat (Naphthol AS MX-PO₄, N,N-Dimethylformamide (DMF), Tris-HCl pH 8.3, Red Violet LB salt, distile su) ile kültür kapları 45 dakika inkübe edilmiş, ardından 4 kez distile su ile yıkanmıştır. Son

olarak %2,5'luk gümüş nitrat ile 30 dakika boyanmış, bütün gümüş nitrati uzaklaştırmak amacıyla 3 kez distile su ile yıkanmıştır. Gümüş nitrat tamamen uzaklaştırıldıktan sonra mikroskop altında incelenerek kurumaya bırakılmıştır. Tutunan hücrelerde ALP enzim aktivitesinin olduğu alanların kırmızı, mineralize nodüllü alanların kahverengi veya siyah boyandığı gözlenmiştir [16].

3.2.3.3.2. Alizarin Kırmızı (AK) Boyaması:

Farklılaşan hücrelerin kalsiyum içeriğinin belirlenmesi için AK boyaması yapılmıştır. AK'sının %1'lik stok solüsyonu distile su ile hazırlanmış ve bu solüsyon distile su ile 1/10 dilüe edilerek kullanılmıştır. Kültür kabındaki besi ortamı dikkatli bir şekilde uzaklaştırılarak hücreler %70'lik soğuk etanol ile oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilmiştir. Süre sonunda alkol dikkatlice uzaklaştırılarak 5 dakikalık sürelerle 2 defa distile su ile yıkanmıştır. Suyu uzaklaştırıp hücreleri kaplayacak şekilde AK'sı eklenerek 30 dakika inkübe edilmiştir. Daha sonra AK'sı alınıp 4 defa distile su ile yıkanarak mikroskop altında incelenmiştir. Kalsiyum birikimi olan alanlar kırmızı kahverengi boyanmış olarak gözlenmiştir [16].

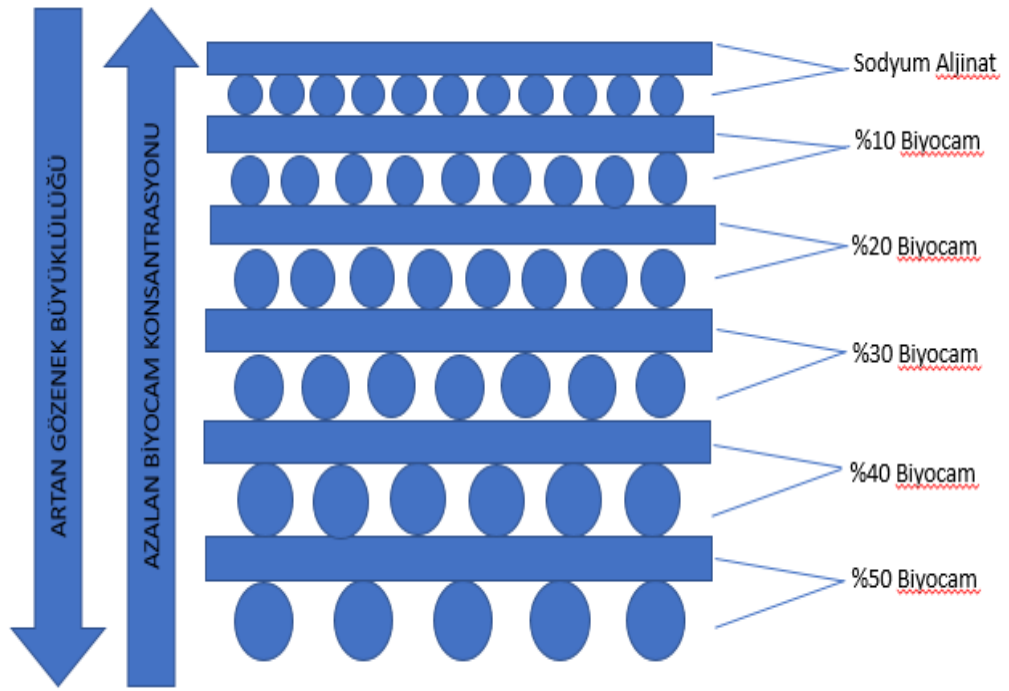
3.2.3.3.3. Alcian Mavisi ile Boyama:

Kondrojenik farklılaştırma besi ortamı içerisinde kültüre edilen hücrelerden besi ortamı çekilmiştir. Kültür kabı Ca^{+2} , Mg^{+2} içermeyen PBS ile 2 kez yıkanarak kültür ortamının tamamen uzaklaştırılması sağlanmıştır. Hücrelerin üzerine 500 µl %4'lük paraformaldehit ile 30 dakika fiksasyon yapılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda paraformaldehitin tamamen uzaklaşması için 3 kez Ca^{+2} , Mg^{+2} içermeyen PBS ile yıkanmıştır. Kültür kabına %1 alcian mavisi solüsyonu eklenerek, 30 dakika karanlıkta inkübe edilmiştir. %1 alcian mavisi solüsyonu 0.1N HCl ile hazırlanıp, çözelti karanlıkta saklanmıştır. Örnekler 0.1N HCl ile 3 kez yıkanmıştır. Nötralizasyon için distile su ilave edilmiştir. Kuyucukların kurummasını engellemek için az miktarda distile su eklenerek gözlem yapılmıştır. Kondrojenik birikim olan alanlar mavi boyanmış olarak gözlenmiştir [41].

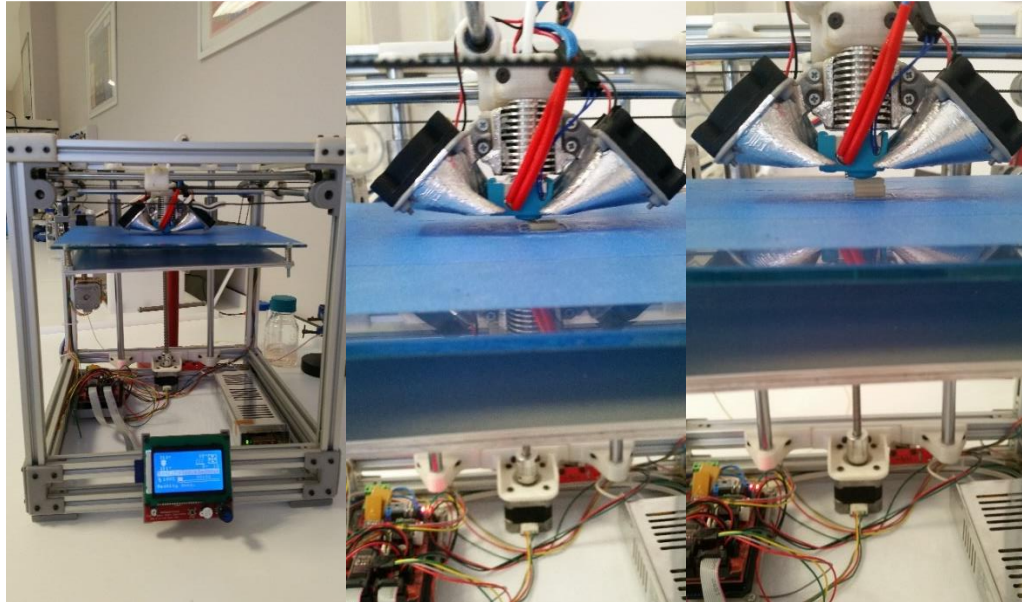
3.2.4. Çok Katmanlı Doku İskelelerinin Üretimi

Mevcut 3 boyutlu yazıcı eritilmiş malzeme yığma yöntemiyle çalışmaktadır. Bu yöntemde polimerin yüksek sıcaklık ile eritiliyor olması hidrojel yapısını bozabilir. Bu sebeple polivinil alkol (PVA) filament (Esun, 3D filament PVA) kullanarak kalıp hazırlanmış, biyocam ve sodyum aljinat katmanları bu kalıp içine enjeksiyon yöntemi ile basılmıştır [42, 43]. Cihazın CAD programı (Autodesk Inventor) ile alt yüzeyde 150 µm gözenek büyüklüğü ile başlanıp her iki katmanda

bir gözenek çapı azalarak 50 µm'ye inecek şekilde baskı programı hazırlanmıştır (Şekil 3.5.). Kemik ile entegrasyonu hedeflenen alt yüzeyde büyük ve bağlantılı gözenekler hem kemik hücrelerinin kendi kollajen ekstrasellüler matrislerini oluşturmalarına, hem de implantasyondan sonra hızla damarlanma sağlanmasına destek olmuştur. Hazırlanan program kullanılarak 3 boyutlu yazıcıda PVA kalıp basılmıştır (Şekil 3.6., 3.7., 3.8.). İskele kalıbının toplam hacmi 1500 µl olduğu için kalıba her bir konsantrasyondan 250 µl enjekte edilmiştir. Yoğunluğu en fazla olan en alta çökeceği için kalıba aktarırken en yüksek konsantrasyon olan %50 biyocamdan başlanmıştır. Daha sonra %50, %40, %30, %20, %10 biyocam ve son olarak sodyum aljinat olmak üzere sırasıyla her bir katmandan 250 µl olacak şekilde kalıba enjekte edilmiştir (Şekil 3.9., 3.10.). Her bir yoğunluk enjekte edildikten sonra 1000 rpm'de 25°C'de 2 dakika santrifüj edilmiştir (Şekil 3.11.). Son konsantrasyon enjekte edildikten sonra kalıplar 37,5°C'lik etüvün içinde bulunan 0,5 M CaCl₂ çözeltisinin içine alınarak 12 saat kalıpların erimesi için inkübe edilmiştir (Şekil 3.12.). 0,5 M CaCl₂ çözeltisi içinde PVA kalıplar erirken aynı zamanda iskelelerin çapraz bağlanması sağlanmıştır. Çapraz bağlanması tamamlanan iskeleler %70 etil alkol ile 20 dakika steril edilmiştir. Daha sonra steril ultrapur su ile yıkanarak alkol iskele üzerinden uzaklaştırılmıştır. Sterilizasyonu tamamlanan iskeleler steril CaCl₂ çözeltisi içinde saklanmıştır [44].



Şekil 3.5.: Üretilen doku iskelesinin şematik çizimi.



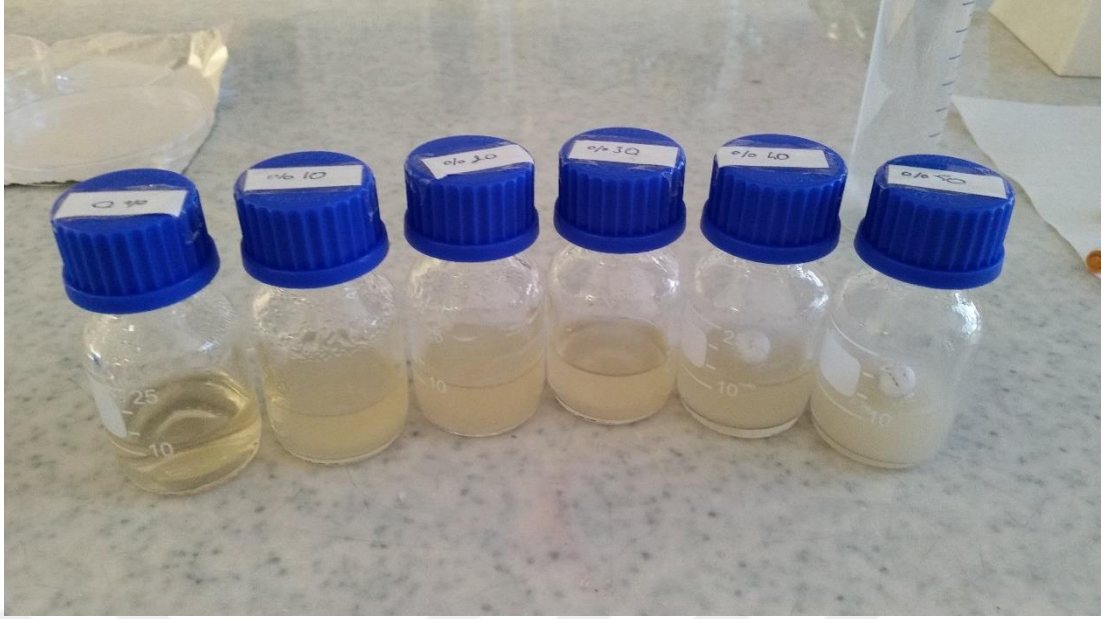
Şekil 3.6.: 3 boyutlu yazıcıda PVA kalıp basımı.



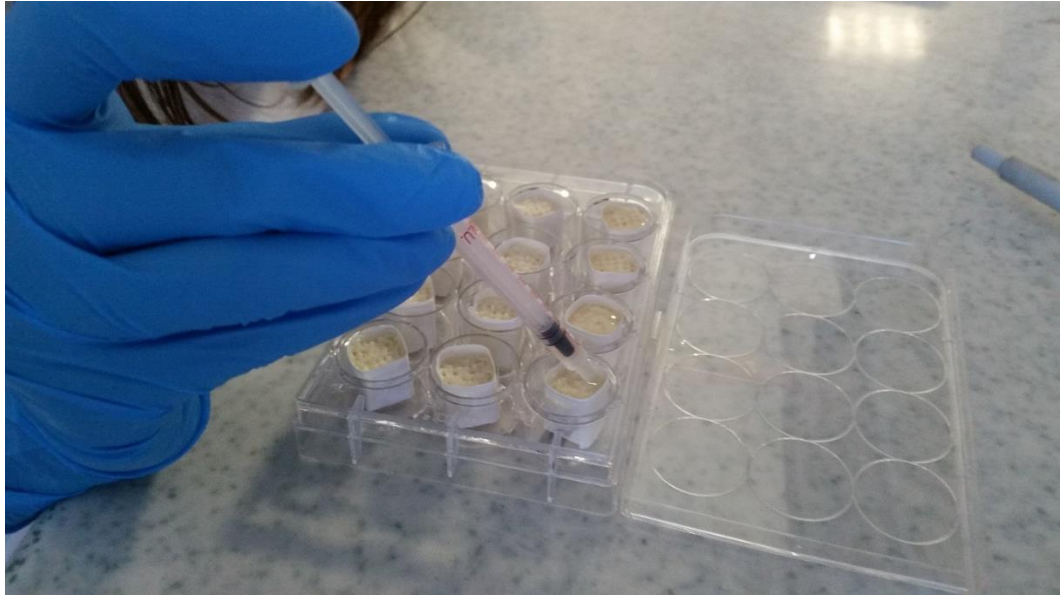
Şekil 3.7.: PVA kalıp.



Şekil 3.8.: Biyocam ve sodyum aljinat basımı için hazırlanan PVA kalıplar.



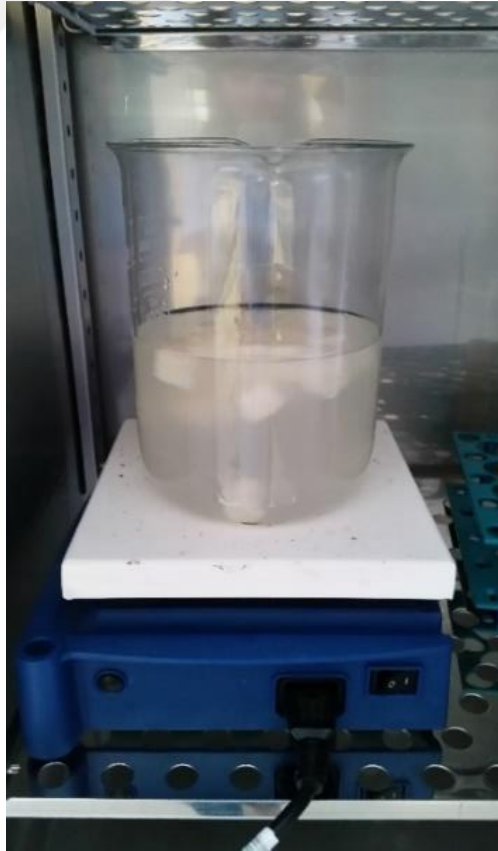
Şekil 3.9.: Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan biyocam 45S5 ve sodyum aljinat çözeltileri. %0 biyocam içermeyen sodyum aljinat konsantrasyonunu, %10, %20, %30, %40 ve %50 ise farklı miktarlarda biyocam içeren konsantrasyonları ifade etmektedir.



Şekil 3.10.: Farklı konsantrasyonlardaki iskele katmanlarının kalıba enjeksiyonu.



Şekil 3.11.: Her bir konsantrasyonun enjeksiyonundan sonra santrifüj edilen kalıplar.



Şekil 3.12.: Enjeksiyon işleminden sonra kalıplar 37,5°C'lik etüvün içinde bulunan 0,5 M CaCl₂ çözelti içine alınmıştır.

3.2.5. Doku İskelelerine Hücre Ekimi

İskeleler 12 saat besi ortamında şartlandırılmıştır. *In vitro* kemik veya kıkırdak yönünde farklılaştırılmış hücreler tripsin ile flask yüzeyinden kaldırılarak, süspansiyon içindeki hücreler iskelelere ekilmiştir. Kıkırdak ve kemiğe farklılaştırılan hücrelerin büyüme eğrileri eldesi sonrasında aynı çoğalma evresinde oldukları dönemde iskeleler üzerine toplam 3×10^4 hücre/cm³ yoğunlukta olacak şekilde birlikte ekilmiştir. Hücrelerin homojen dağılması için iskelenin yatay yerleştirilip hücre süspansiyonunun bütün iskele içine damla damla verilerek emildiğinden emin olunmuştur (Şekil 3.13.). 24 saat nemli inkübatör içinde hücre tutunması beklenmiştir [45].



Şekil 3.13.: Besi ortamı ile 12 saat şartlandırılan doku iskelelerine hücre ekimi.

3.2.6. Doku İskeleleri İçinde Hücre Karakterizasyonu

Uygulanacak bütün parametreler etkisiyle hücrelerin üç boyutlu iskeleler üzerinde tutunmaları ve alacakları morfolojiler, iskele yüzeyinde ve içinde taramalı elektron mikroskopisi ile gözlenmiştir [45].

3.2.6.1. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)

Hücre ekili iskeleler, 0.1 mol/l sodyum kakodilat ile tamponlanmış %2,5'lik glutaraldehit solüsyonu içine yerleştirilerek buz üzerinde 30 dakika bekletilmiştir. Daha sonra örnekler, sodyum kakodilat tamponu içinde 30 dakika yıkandıktan sonra, 0,1 mol/l sodyum kakodilat ile tamponlanmış %2'lik ozmiyum tetroksit içinde postfiksasyon sürecine tabi tutulmuştur. Bu süreç sonunda, distile su ile iki kez 5'er dakika yıkanan örnekler, alkol serisi içinde (%35, %50, %70, %85, %95 ve %100) 5'er dakika dehidrate edilerek kurutma amacı ile 5 dakika heksametildisilazan (Sigma, 52619, A.B.D) solüsyonu içine konulmuştur. 30 dakika süre ile havalandırılarak kurutulduktan sonra pirinç taşıyıcılar üzerine yerleştirilen örnekler yaklaşık 200 Å kalınlığında altın ile kaplanarak SEM'da incelenmiştir [38].

Yukarıda anlatılan şekilde sabitlenen doku iskelelerinin yüzeyleri üzerinde taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile hücre morfolojileri görüntülenerek ve hücre tutunmasının sağlandığı gerçekleşmiştir.

3.2.7. İstatistik

Çalışmada 3 tekrarlı kültür sonuçları analizleri Graphpad İstatistik programı kullanılarak tek yönlü ANOVA analizi ile yapılmıştır. Ortalama ve standart sapmalar karşılaştırılarak bulunan değerler az anlamlı ($p < 0,05$), anlamlı ($p < 0,01$), çok anlamlı ($p < 0,001$) veya anlamsız ($p > 0,05$) olarak değerlendirilmiştir [46].

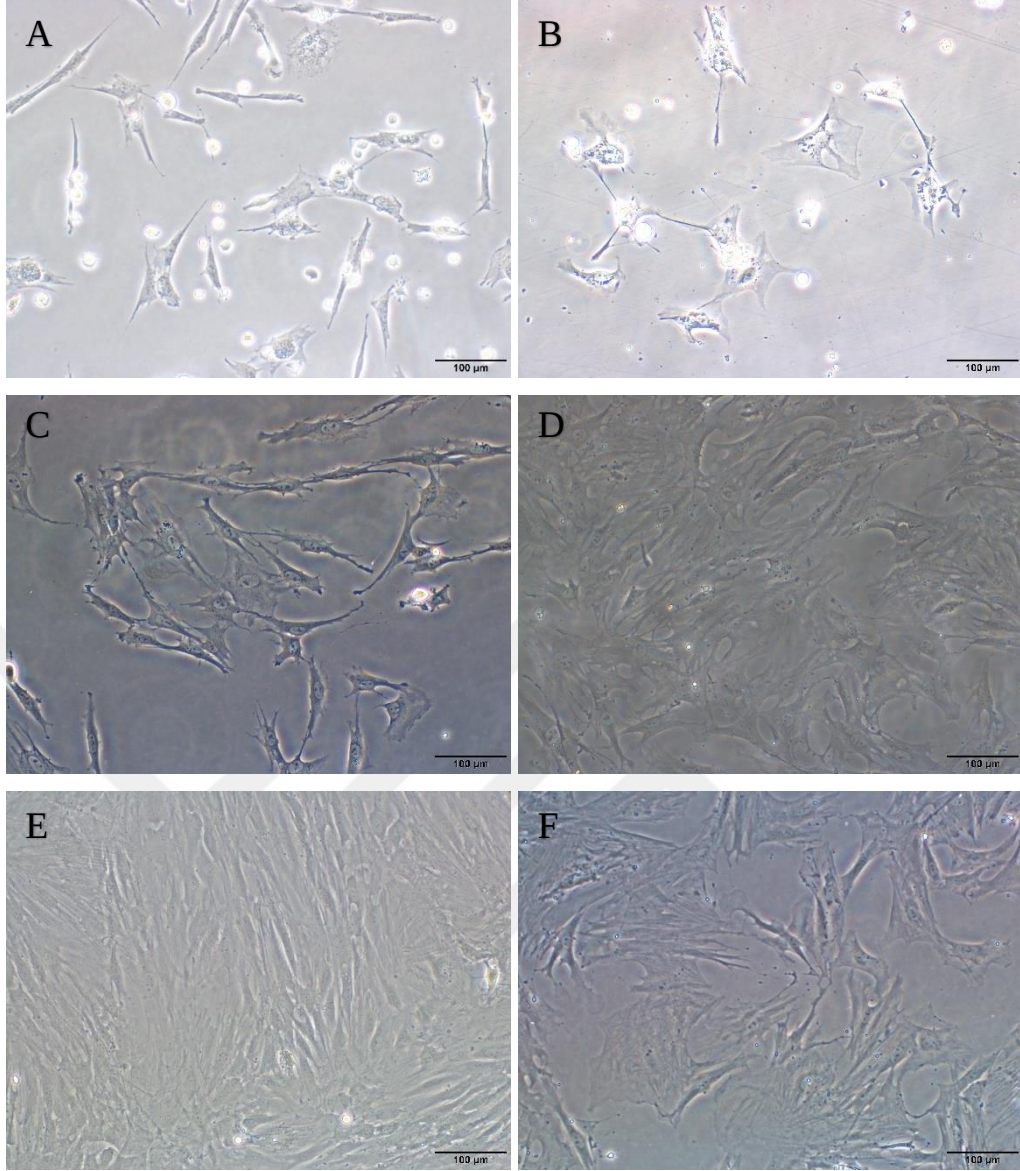
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. Bulgular

4.1.1. Sıçan Kemik İliğinden ve Yağ Dokusundan Mezenşimal Kök Hücrelerin Eldesi ve Kültürü

Sıçandan elde edilen KİSKH ve AdMKH'ler kültür kabına tutunma özellikleri ile süspanse olarak üreyen hematopoetik kök hücrelerden besi ortamının değiştirilmesi ile uzaklaştırıldılar (Şekil 4.1.). Hücreler besi ortamında 24 gün boyunca kültüre edildiler.

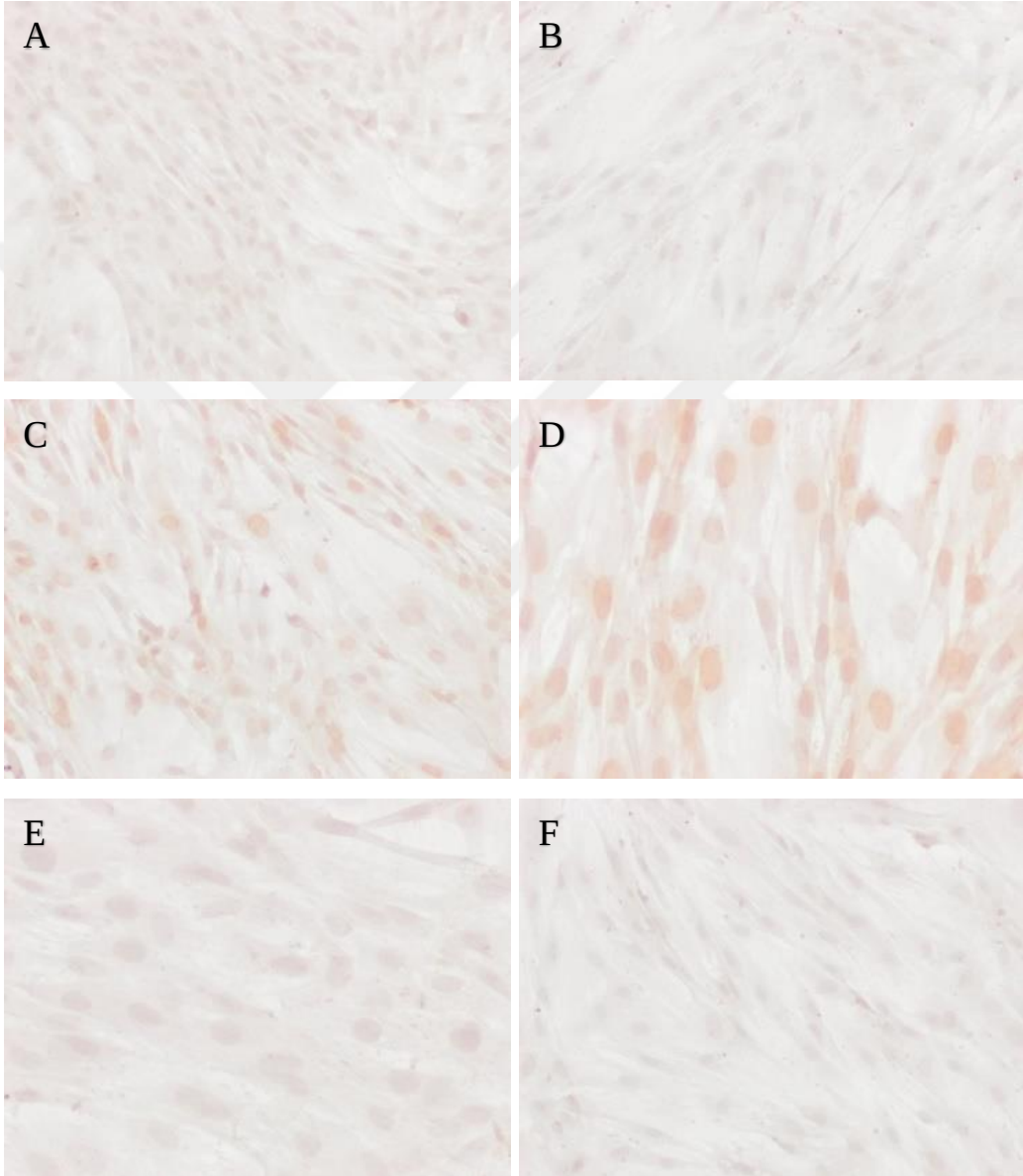




Şekil 4.1.: Sıçan KİSKH (A, C, E) ve AdMKH'lerinin (B, D, F) 7.gün (A, B), 14. gün (C, D) ve 24 gün (E, F) ters faz-kontrast mikroskopta morfolojik olarak görüntüleri. Kültürde her iki hücrede ilk başlangıçta morfolojik olarak benzer özellikler gösterdiler. AdMKH'ler KİSKH'lere göre daha ince iğsi yapı sergilerken hücreler çoğaldıkça AdMKH'ler yüzeye mekik şeklinde daha fazla yayıldı.

4.1.2. Elde Edilen Kök Hücrelerin Karakterizasyonu

Elde edilen KİSKH ve AdMKH'lerin karakterizasyonları için pozitif markır CD90 ve negatif markır CD45 ile immunositokimyasal analizleri yapıldı. Analiz sonunda kemik iliği ve yağ dokusu mezenşimal kök hücrelerinin başarılı bir şekilde elde edildiği görüldü (Şekil 4.2.).



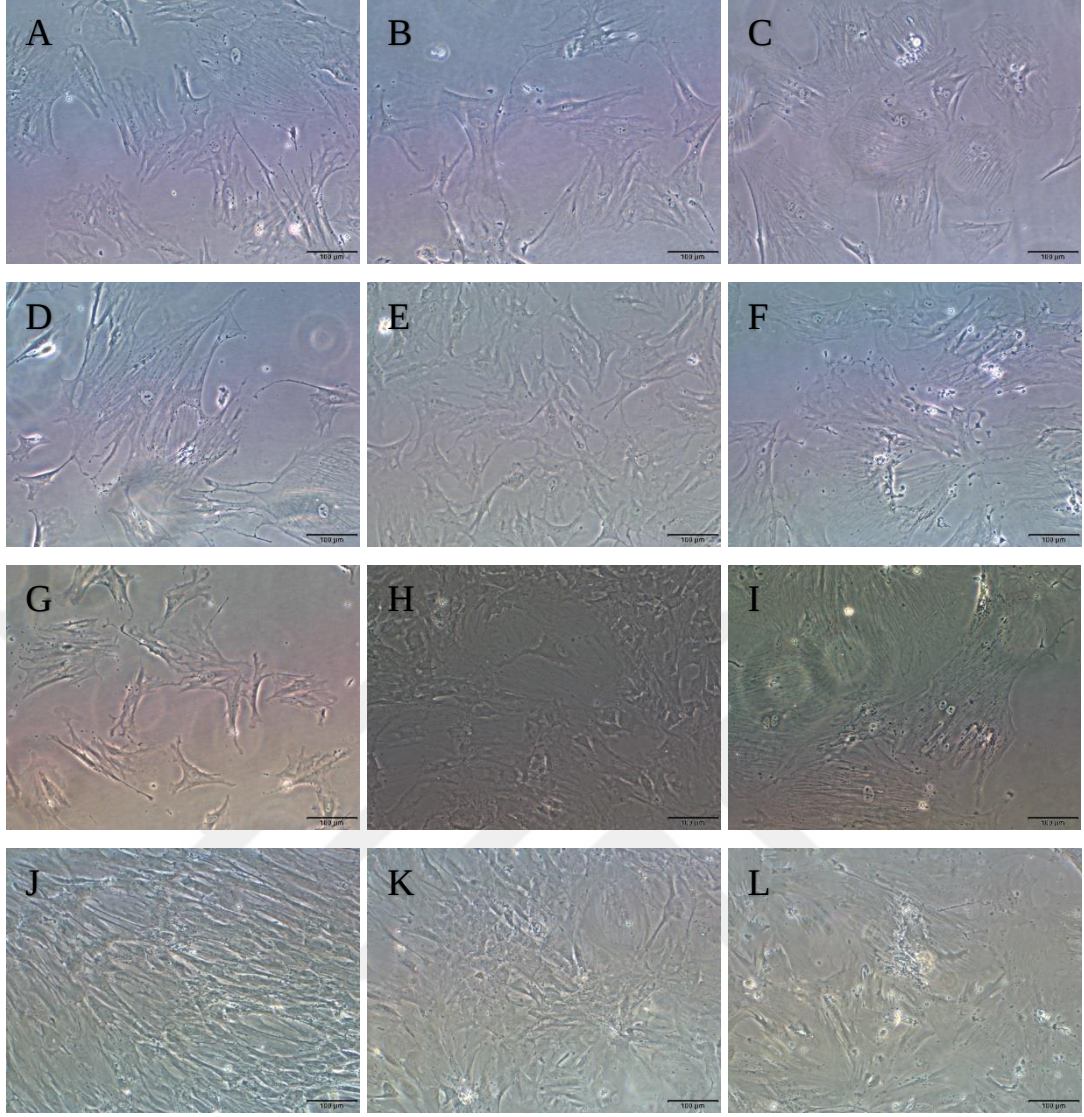
Şekil 4.2.: Sıçan KİSKH (A, C, E) ve AdMKH'lerinin (B, D, F) kontrol (A, B), CD90 (C, D), ve CD45 (E, F) immunositokimyasal boyanmalarının ışık mikroskop görüntüleri. Her iki hücre grubunda da yüksek oranda CD90 pozitifliği bulunurken negatif markır CD45'te boyama bulunmadı.

4.1.3. Farklı Kaynaklardan Elde Edilen Kök Hücrelerin Farklılaştırılması

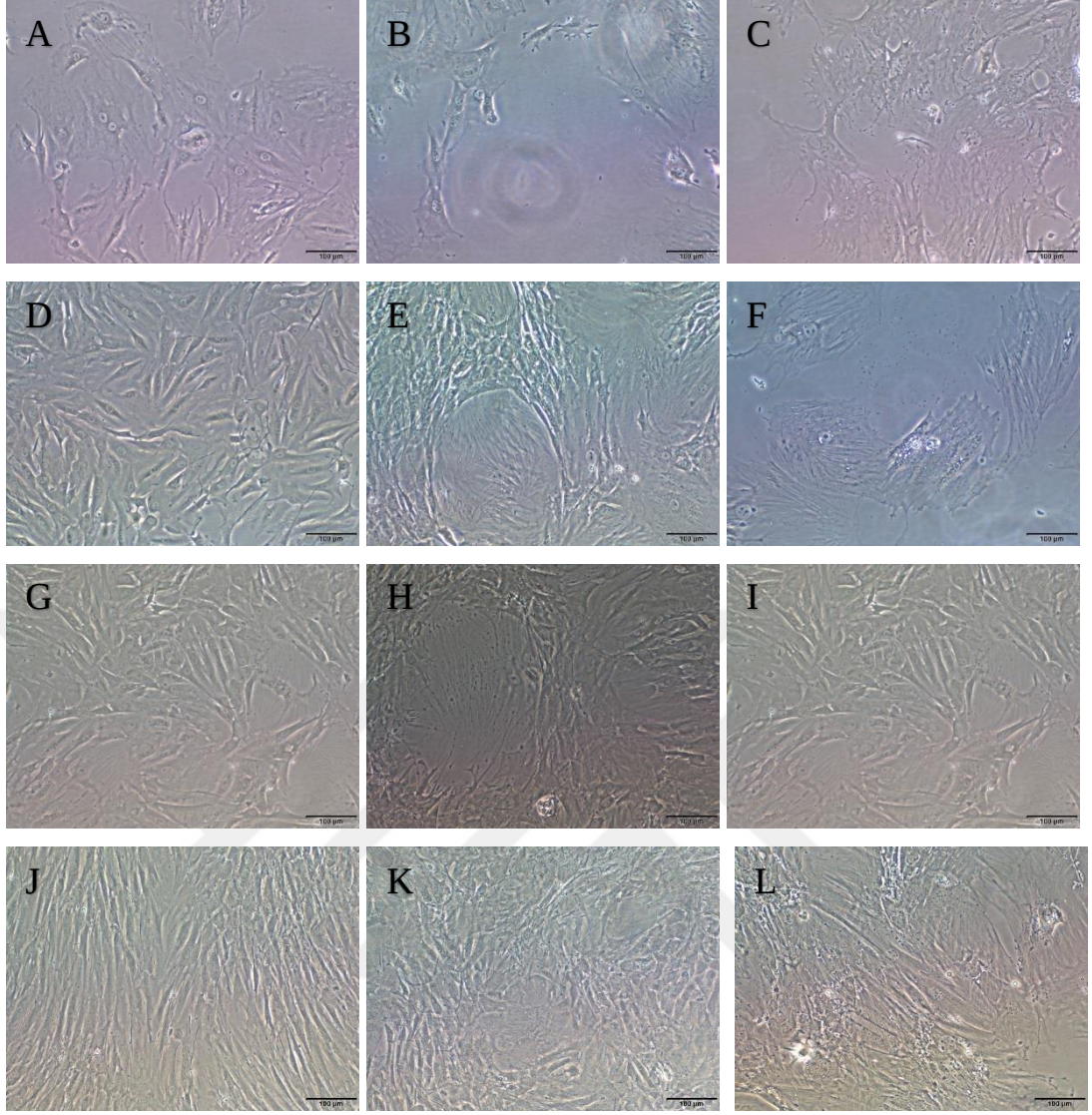
Her bir farklı kaynaktan elde edilen kök hücreler osteojenik ve kondrojenik farklılaştırma ortamlarına alındı. Hücrelerin konsantasyonu 3×10^4 hücre/ml olacak şekilde pasajlanmıştır. Hücrelerin 7. günden itibaren osteoblast ve kondroblasta farklılaşma gösterdiği gözlemlendi (Şekil 4.3. (E, F), 4.4. (E, F)). Farklılaştıktan sonra osteojenik hücreler kübik ve kondrojenik hücreler ise epiteloïdal morfoloji ile tanımlandı (Şekil 4.3., 4.4.). Osteojenik medium etkisinde hücreler koloni şeklinde üreme gösterdi. Kontrol olarak primer besi ortamındaki hücreler ise fibroblast morfolojilerini 14 günlük kültürde sürdürdükleri gözlemlendi (Şekil 4.3. (J), 4.4. (J)).

Adezyon ve tutunma bakımından kültüre aynı miktarda hücre ile başlanarak sıçan KİSKH'lerinin ve AdMKH'lerinin yaşama kabiliyeti ve çoğalması, 21 gün için osteojenik ve kondrojenik medyum varlığında ve yokluğunda MTT testi kullanılarak tanımlandı. 7. günde başlayan hücre çoğalması 14. ve 21. günde katlanan şekilde hücre sayısı ($p < 0.001$) önemli artış gösterdi (Şekil 4.5.). KİSKH'lerin AdMKH'lerine göre anlamlı bir şekilde daha fazla çoğaldıkları görüldü.

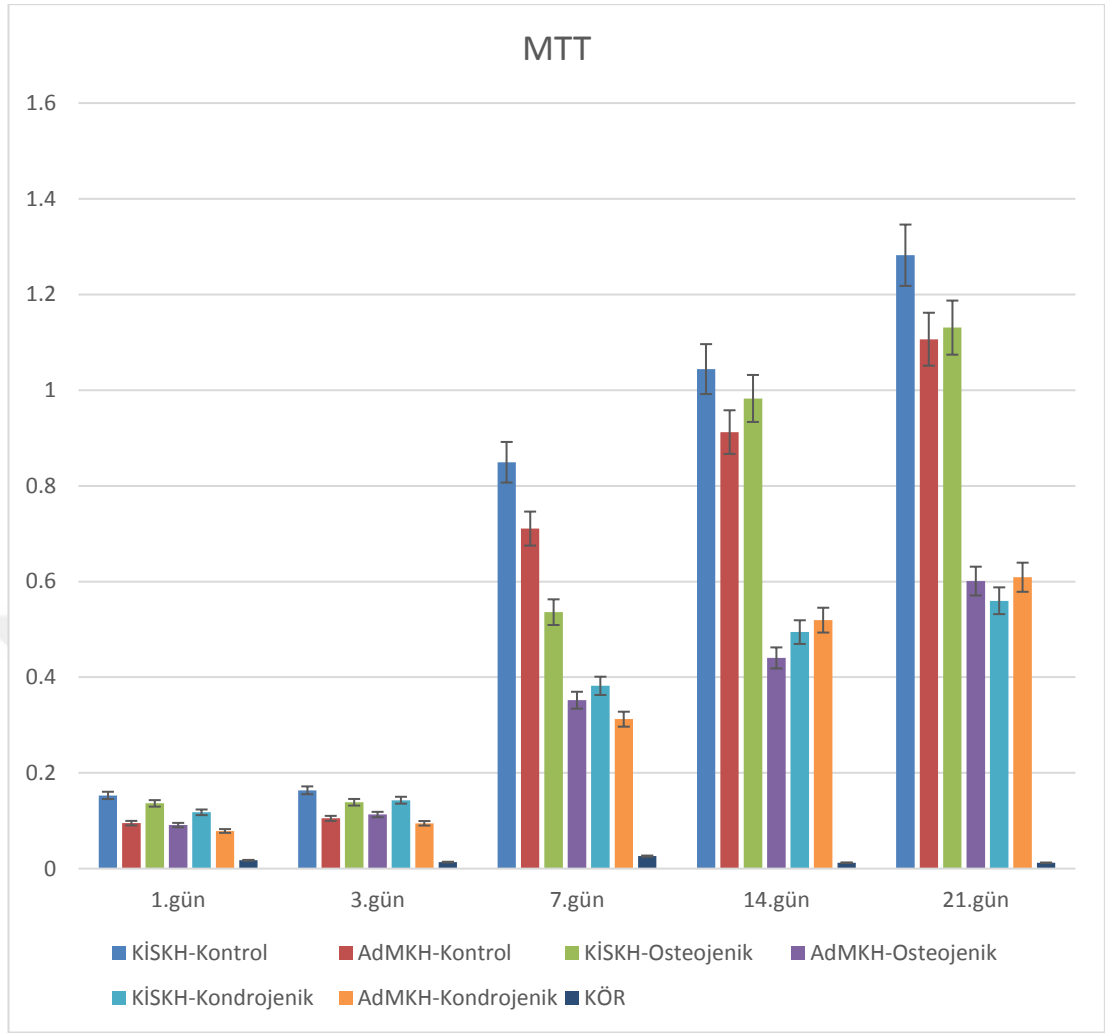
KİSKH'lerin AdMKH'lerinden biraz daha artmış osteoblastik morfoloji gösterdiği gözlemlendi. Kondrojenik farklılaşma açısından anlamlı bir farklılık gözlenmedi.



Şekil 4.3.: AdMKH'lerin kontrol (A, D, G, J), osteojenik (B, E, H, K) ve kondrojenik (C, F, I, L) farklılaşma sürecinde 5. (A, B, C), 7. (D, E, F), 9. (G, H, I) ve 14. (J, K, L) gün ters faz-kontrast mikroskopta morfolojik görüntüleri. Hücrelerin 7. günden itibaren osteoblast ve kondroblasta farklılaşma gösterdiği gözlemlendi (E, F). Farklılaştıktan sonra osteojenik hücreler kübik ve kondrojenik hücreler ise epiteloidal morfoloji ile tanımlandı. Kontrol olarak primer besi ortamındaki hücreler ise fibroblast morfolojilerini 14 günlük kültürde sürdürdükleri gözlemlendi (J).



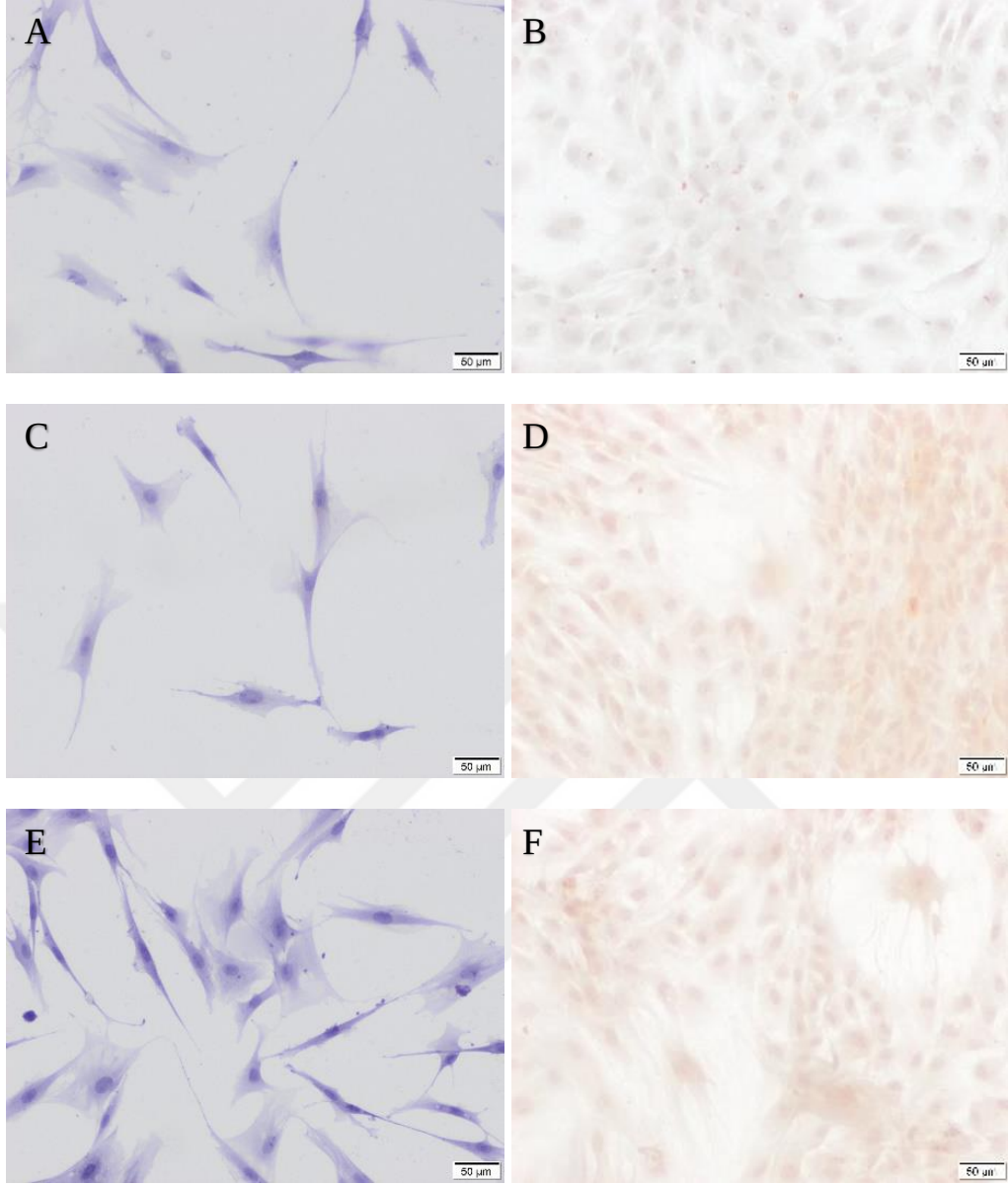
Şekil 4.4.: KİSKH'lerin kontrol (A, D, G, J), osteojenik (B, E, H, K) ve kondrojenik (C, F, I, L) farklılaşma sürecinde 5. (A, B, C), 7. (D, E, F), 9. (G, H, I) ve 14. (J, K, L) gün ters faz-kontrast mikroskopta morfolojik görüntüleri. Hücrelerin 7. günden itibaren osteoblast ve kondroblasta farklılaşma gösterdiği gözlemlendi (E, F). Farklılaştıktan sonra osteojenik hücreler kübik ve kondrojenik hücreler ise epiteloïdal morfoloji ile tanımlandı. Kontrol olarak primer besi ortamındaki hücreler ise fibroblast morfolojilerini 14 günlük kültürde sürdürdükleri gözlemlendi (J).



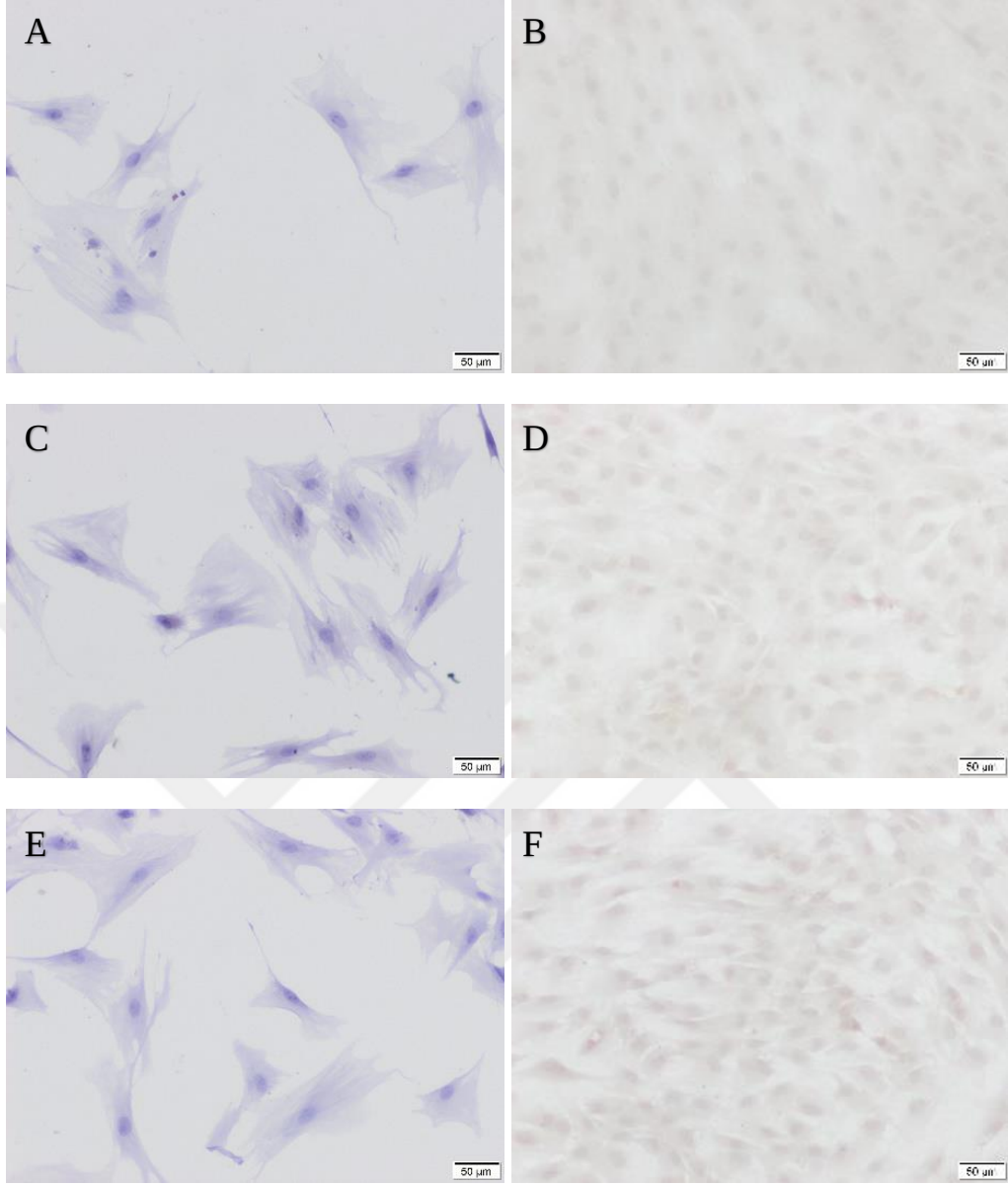
Şekil 4.5.: MTT yöntemi ile 1, 3, 7, 14 ve 21. günlerde farklılaşma ortamındaki hücrelerin çoğalma yeteneği incelendi. 7. günde başlayan hücre çoğalması 14. ve 21. günde katlanan şekilde hücre sayısı ($p < 0.001$) önemli artış gösterdi.

4.1.4. İmmunositokimyasal Yöntem

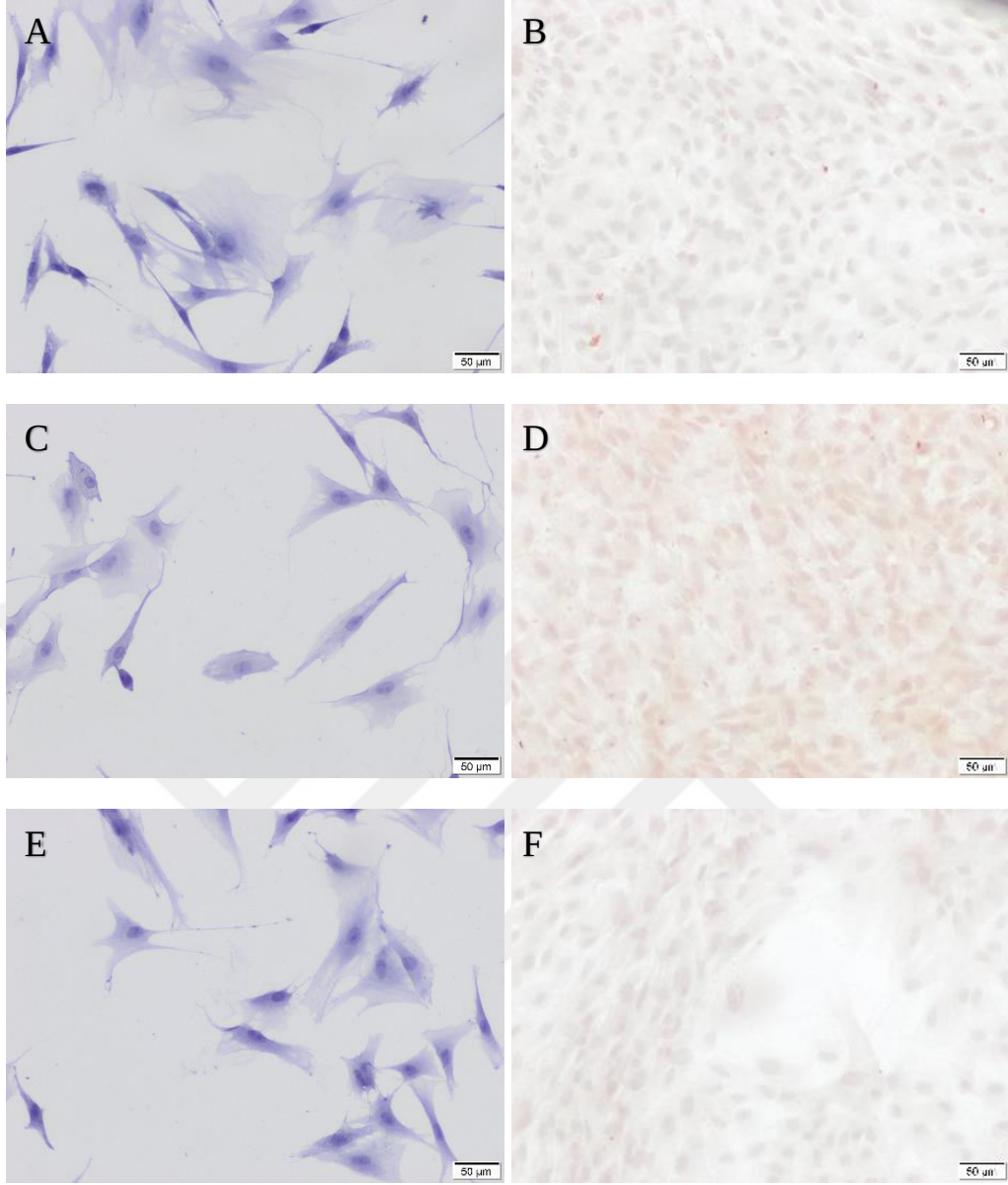
Kültürlere kıkırdak farklılaşması için kollajen II ve Sox-9, osteoblast farklılaşması için ise osteonektin (ON) ve osteokalsin (OC) tanımlama faktörleri immunositokimyasal yöntem ile incelendi. Kontrol besi ortamındaki hücreler daha çok fibroblastik morfoloji ile osteonektin, osteokalsin, kollajen II ve Sox-9 için zayıf immunreaktivite göstermişlerdir. KSKH ve AdMKH'lerin osteojenik farklılaşmasında ON, kondrojenik farklılaşmasında da Sox-9 pozitifliğinin daha yüksek olduğu gözlemlendi. 14. güne kadar farklılaşmada artış gözlenmiştir. Osteoblastik hücrelerin koloni oluşumu gösterdiği saptanmıştır (Şekil 4.6., 4.7., 4.8., 4.9., 4.10., 4.11., 4.12., 4.13.).



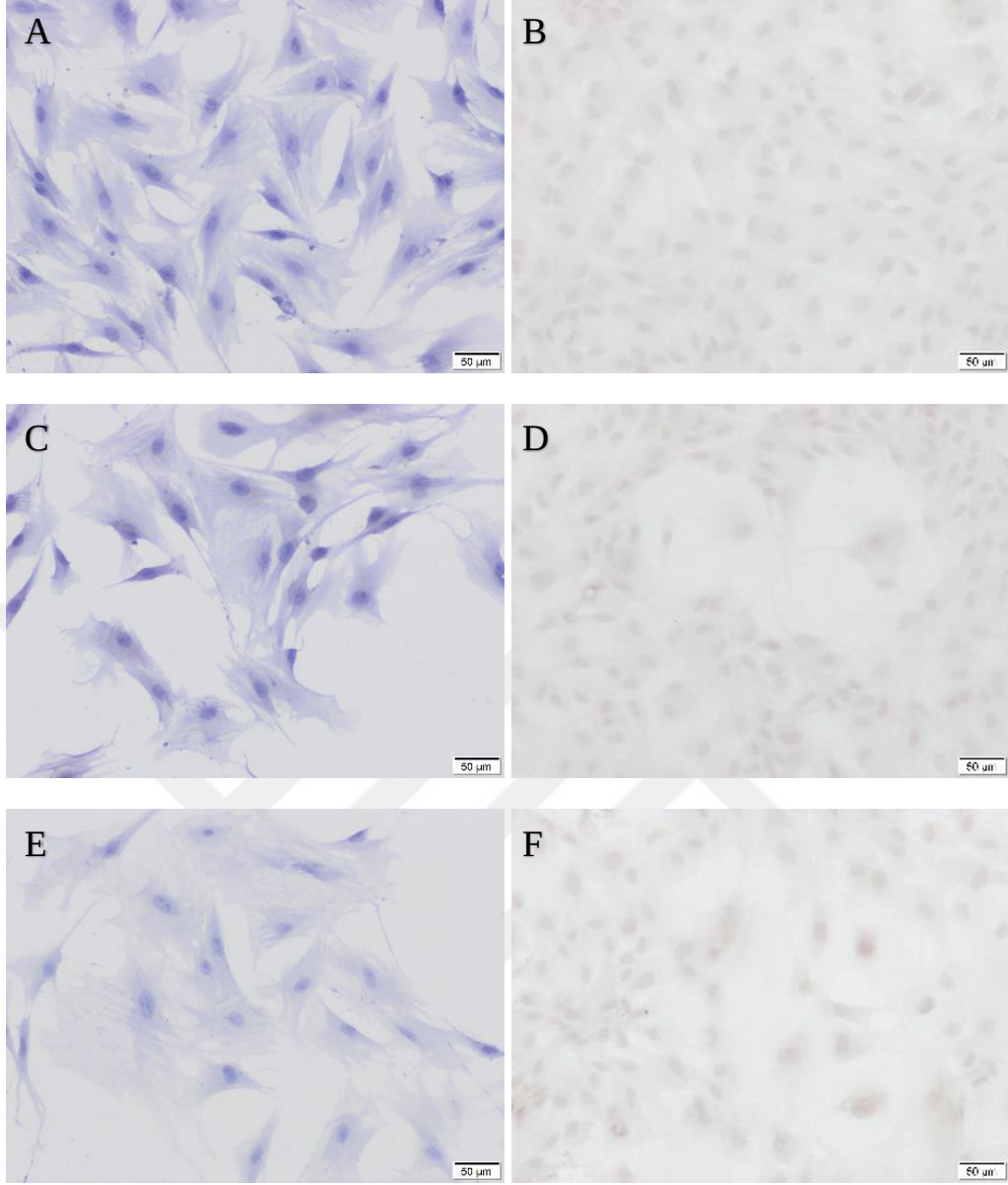
Şekil 4.6.: 7. gün KISKH kontrol grubu (A, C, E) ve osteojenik olarak farklılaştırılan grubun (B, D, F) kontrol (A, B), ON (C, D), OC (E, F) immunositokimyasal boyamalarının 10X büyütmede çekilmiş görüntüleri. Farklılaşmanın 7. günde başladığı ON ekspresyonunun daha fazla olduğu gözlemlenmiştir. Kontrol gruplarında boyanma gözlenmemiştir.



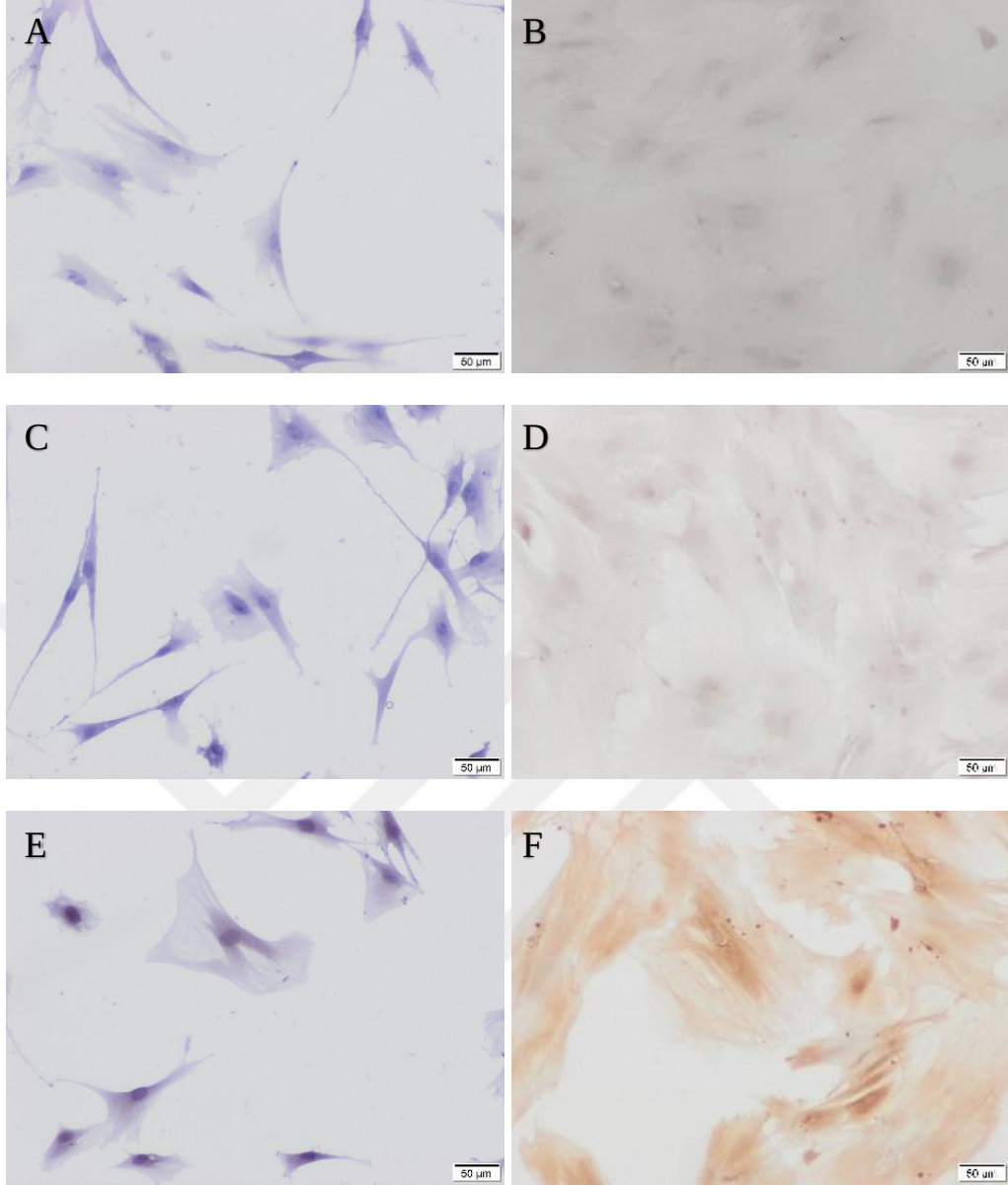
Şekil 4.7.: 7. gün AdMKH kontrol grubu (A, C, E) ve osteojenik olarak farklılaştırılan grubun (B, D, F) kontrol (A, B), ON (C, D), OC (E, F) immunositokimyasal boyamalarının 10X büyütmede çekilmiş görüntüleri. Farklılaşmanın 7. günde başladığı ON ekspresyonunun daha fazla olduğu gözlemlenmiştir. Kontrol gruplarında boyanma gözlenmemiştir.



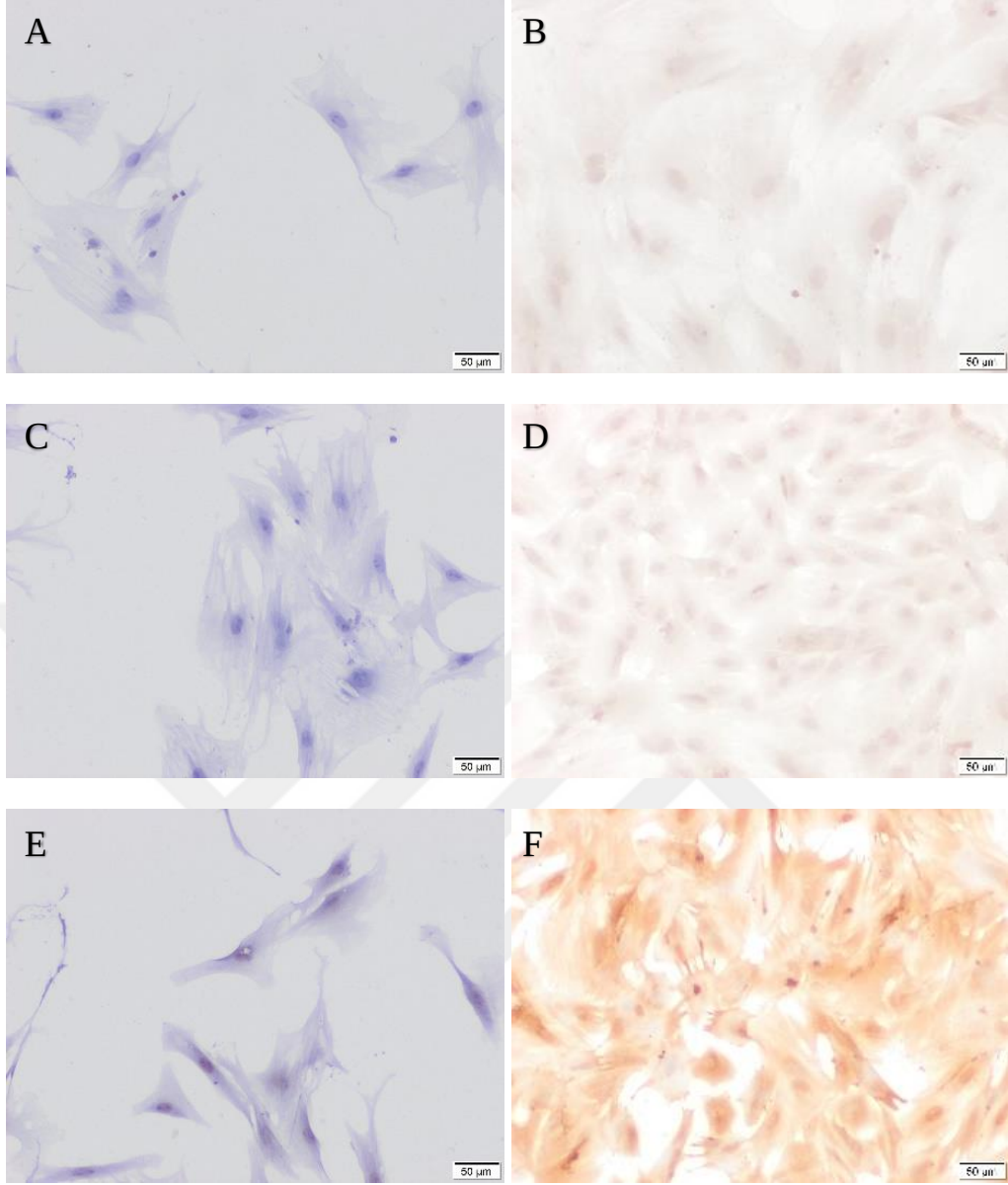
Şekil 4.8.: 14. gün KİSKH kontrol grubu (A, C, E) ve osteojenik olarak farklılaştırılan grubun (B, D, F) kontrol (A, B), ON (C, D), OC (E, F) immunositokimyasal boyamalarının 10X büyütmede çekilmiş görüntüleri. 14. günde farklılaşmanın şiddetli atışı gösterdiği görülmüştür. ON ekspresyonunun daha fazla olduğu gözlemlenmiştir. Kontrol gruplarında boyanma gözlenmemiştir.



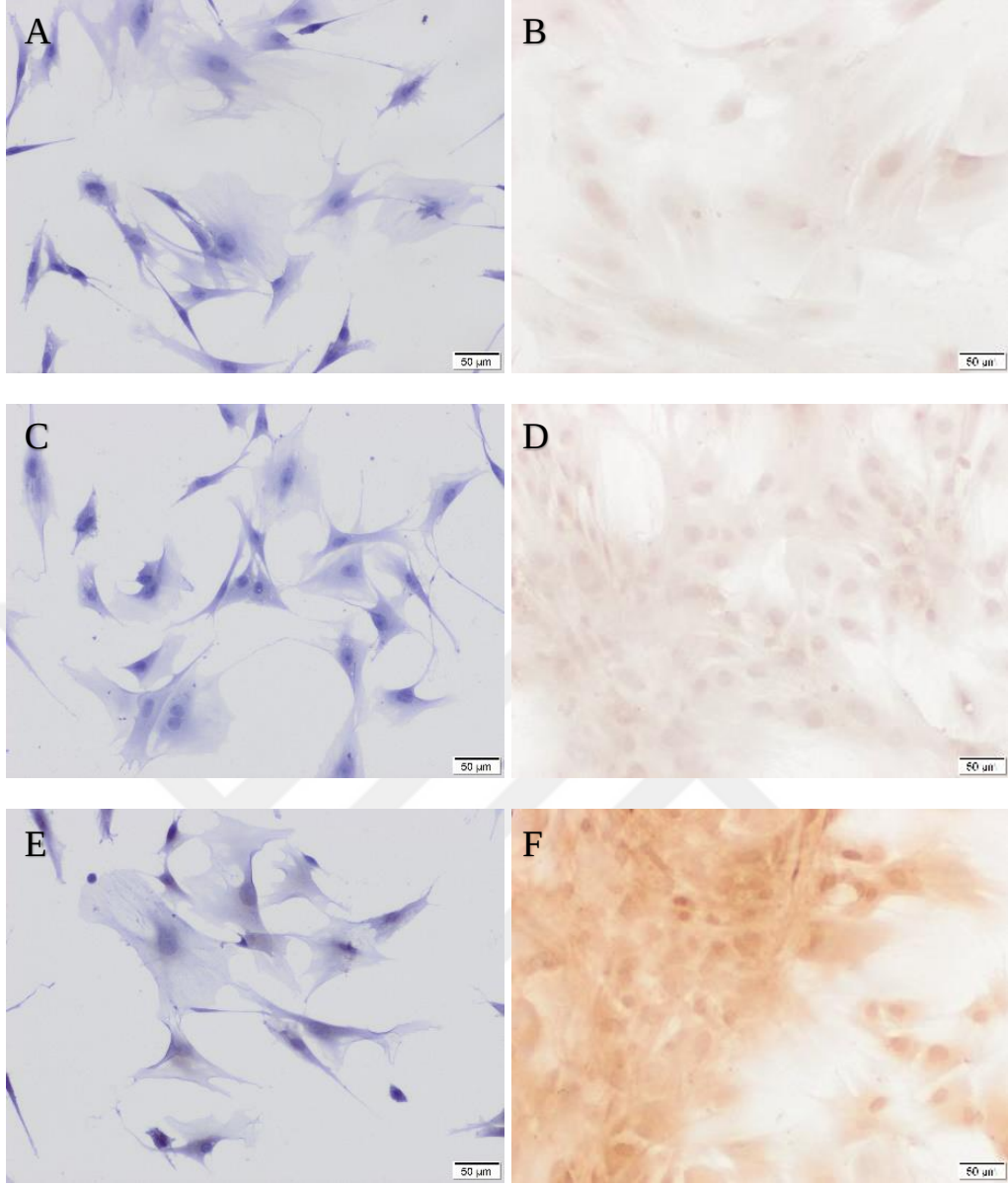
Şekil 4.9.: 14. gün AdMKH kontrol grubu (A, C, E) ve osteojenik olarak farklılaştırılan grubun (B, D, F) kontrol (A, B), ON (C, D), OC (E, F) immunositokimyasal boyamalarının 10X büyütmede çekilmiş görüntüleri. 14. günde farklılaşmanın şiddetli atışı gösterdiği görülmüştür. ON ekspresyonunun daha fazla olduğu gözlemlenmiştir. Kontrol gruplarında boyanma gözlenmemiştir.



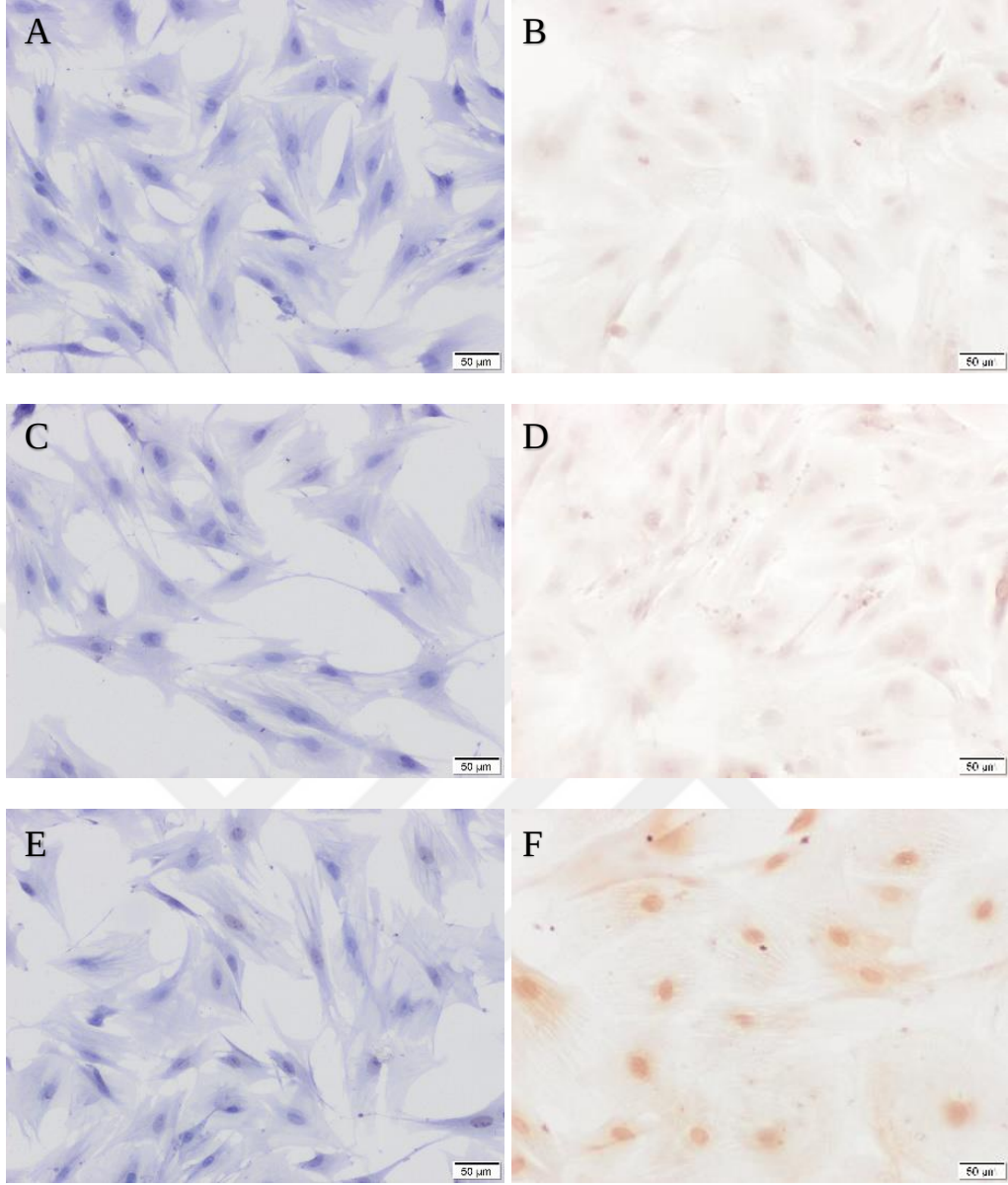
Şekil 4.10.: 7. gün KISKH kontrol grubu (A, C, E) ve kondrojenik olarak farklılaştırılan grubun (B, D, F) kontrol (A, B), kollajen-II (C, D), Sox-9 (E, F) immunositokimyasal boyamalarının 10X büyütmede çekilmiş görüntüleri. Farklılaşmanın 7. günde başladığı Sox-9 ekspresyonunun daha fazla olduğu gözlemlenmiştir. Kontrol gruplarında boyanma gözlenmemiştir.



Şekil 4.11.: 7. gün AdMKH kontrol grubu (A, C, E) ve kondrojenik olarak farklılaştırılan grubun (B, D, F) kontrol (A, B), kollajen-II (C, D), Sox-9 (E, F) immunositokimyasal boyamalarının 10X büyütmede çekilmiş görüntüleri. Farklılaşmanın 7. günde başladığı Sox-9 ekspresyonunun daha fazla olduğu gözlemlenmiştir. Kontrol gruplarında boyanma gözlenmemiştir.



Şekil 4.12.: 14. gün KİSKH kontrol grubu (A, C, E) ve kondrojenik olarak farklılaştırılan grubun (B, D, F) kontrol (A, B), kollajen-II (C, D), Sox-9 (E, F) immunositokimyasal boyamalarının 10X büyütmede çekilmiş görüntüleri. 14. günde farklılaşmanın şiddetli artış gösterdiği görülmüştür. Sox-9 ekspresyonunun daha fazla olduğu gözlemlenmiştir. Kontrol gruplarında boyanma gözlenmemiştir.



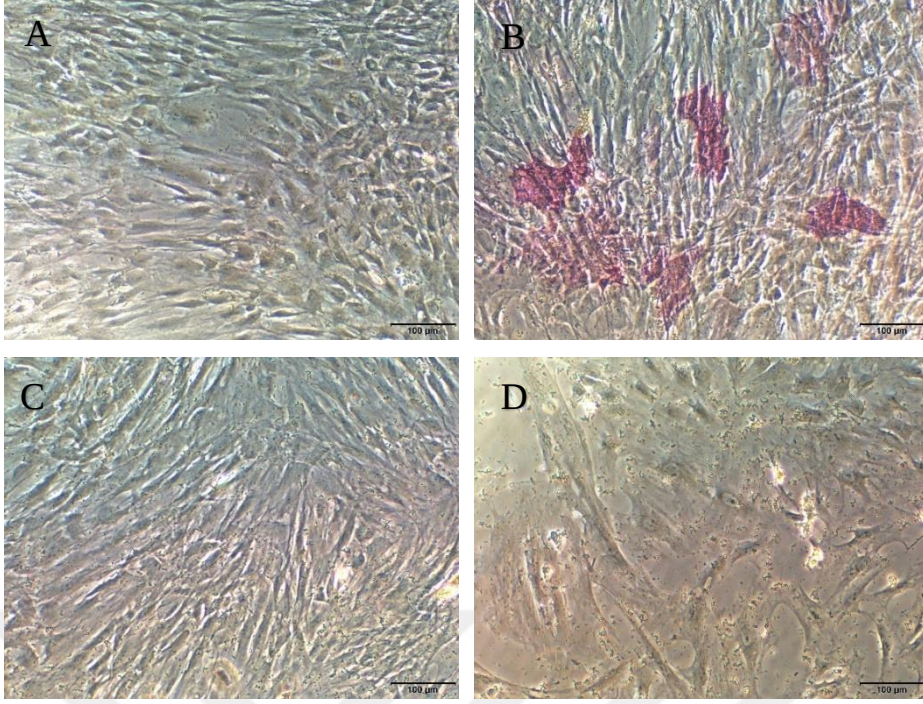
Şekil 4.13: 14. gün AdMKH kontrol grubu (A, C, E) ve kondrojenik olarak farklılaştırılan grubun (B, D, F) kontrol (A, B), kollajen-II (C, D), Sox-9 (E, F) immunositokimyasal boyamalarının 10X büyütmede çekilmiş görüntüleri. 14. günde farklılaşmanın şiddetli atış gösterdiği görülmüştür. Sox-9 ekspresyonunun daha fazla olduğu gözlemlenmiştir. Kontrol gruplarında boyanma gözlenmemiştir.

4.1.5. Histokimyasal Yöntemler

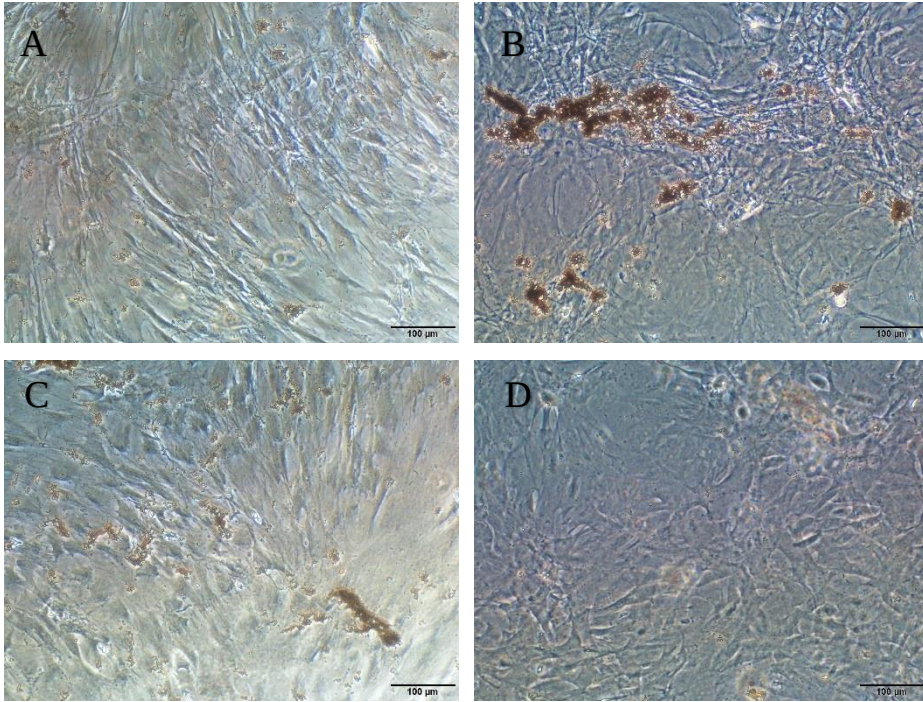
Alkalen Fosfataz / Von Kossa (ALP/VK) Boyaması: Tutunan hücrelerde ALP enzim aktivitesinin olduğu alanların kırmızı, mineralize nodüllü alanların kahverengi/siyah boyandığı gözlemlendi (Şekil 4.14., 4.15). ALP/VK boyamasında 7. günde osteojenik farklılaşmada bir artış gözlenirken, 14. günde kolonilerin boyandığı saptanmıştır.

Alizarin Kırmızısı (AK) Boyaması: Kalsiyum içeriği için AK boyamasının ALP/VK boyaması ile benzerlik gösterdiği saptanmıştır. AK boyamasında da belirgin bir şekilde her iki hücre grubunda da 14. günde artış saptanmıştır (Şekil 4.16., 4.17.).

Alcian Mavisi (AM) ile Boyama: Kondrojenik birikim olan alanlar mavi boyanmış olarak gözlemlendi. Kontrol besi ortamındaki hücrelerde herhangi bir boyamaya rastlanmadı (Şekil 4.18., 4.19.). 14. günde AM boyamasının arttığı her iki hücre grubunda da arttığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.19.).

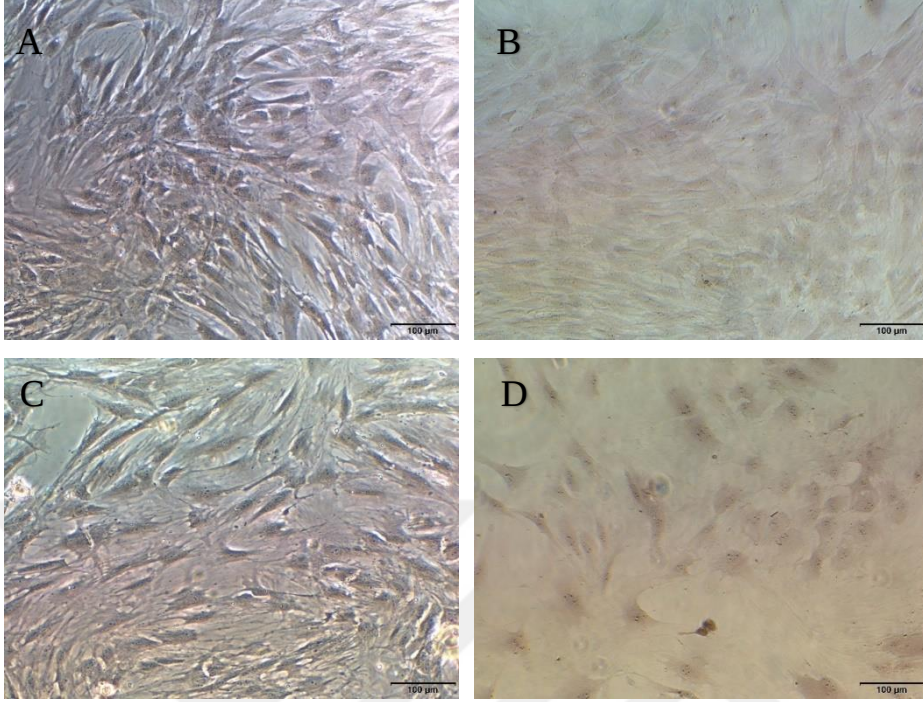


Şekil 4.14.: KİSKH (A, B) ve AdMKH'lerin (C, D) kontrol (A, C) ve osteojenik (B, D) farklılaşma sürecinde 7. gün ALP/VK boyamalarının ters faz-kontrast mikroskopta morfolojik görüntüleri. ALP/VK enzim aktivasyonunun olduğu görülmüştür.

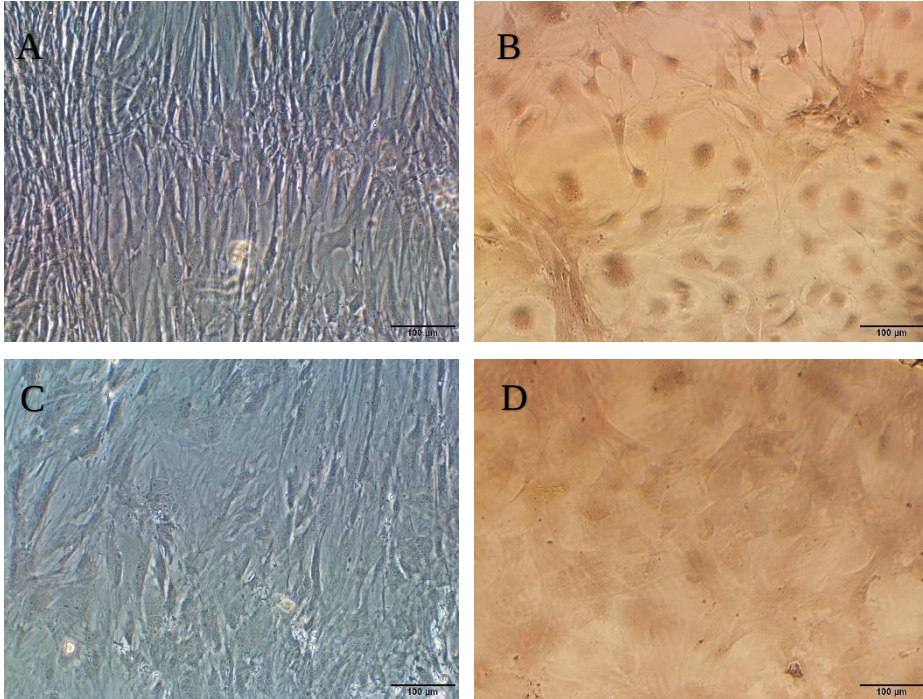


Şekil 4.15.: KİSKH (A, B) ve AdMKH'lerin (C, D) kontrol (A, C) ve osteojenik (B, D) farklılaşma sürecinde 14.gün ALP/VK boyamalarının ters faz-kontrast

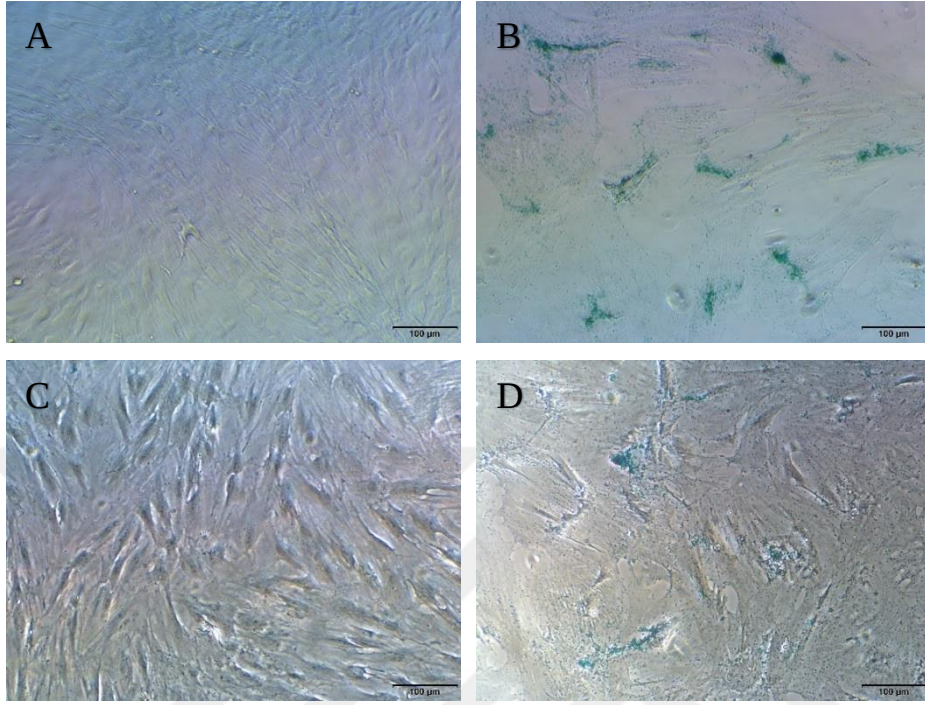
mikroskopta morfolojik görüntüleri. ALP/VK enzim aktivasyonunda artış olduğu görülmüştür.



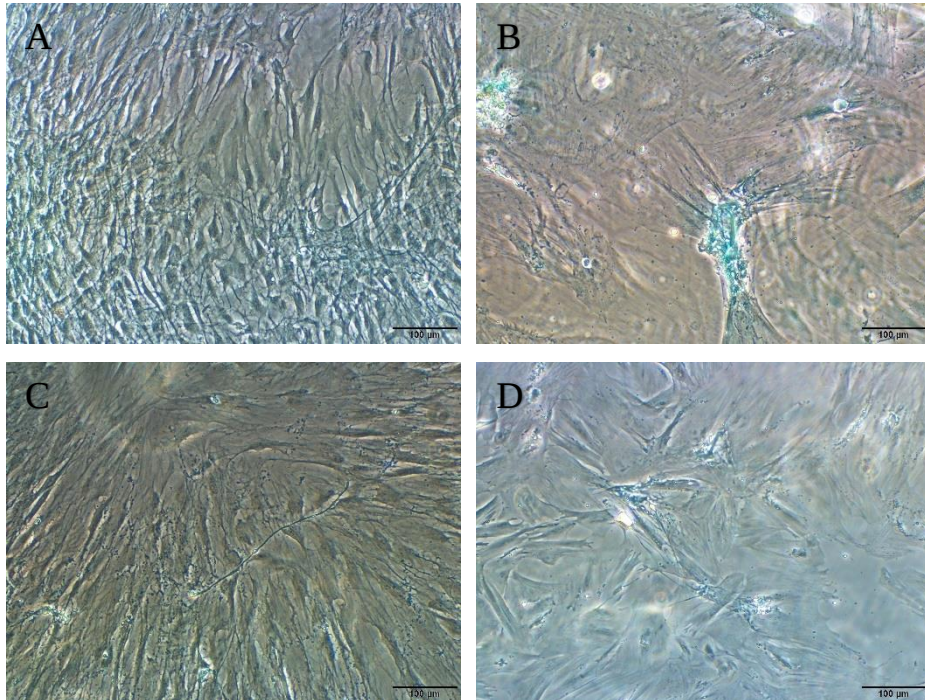
Şekil 4.16.: KSKH (A, B) ve AdMKH'lerin (C, D) kontrol (A, C) ve osteojenik (B, D) farklılaşma sürecinde 7. gün AK boyamalarının ters faz-kontrast mikroskopta morfolojik görüntüleri. AK boyamasında az miktarda boyanma belirlenmiştir.



Şekil 4.17.: KİSKH (A, B) ve AdMKH'lerin (C, D) kontrol (A, C) ve osteojenik (B, D) farklılaşma sürecinde 14. gün AK boyamalarının ters faz-kontrast mikroskopta morfolojik görüntüleri. Her iki hücre grubunda da 14. günde artış saptanmıştır.



Şekil 4.18.: KİSKH (A, B) ve AdMKH'lerin (C, D) kontrol (A, C) ve osteojenik (B, D) farklılaşma sürecinde 7. gün AM boyamalarının ters faz-kontrast mikroskopta morfolojik görüntüleri. AM boyamasında belirgin olarak boyanma görülmüştür.



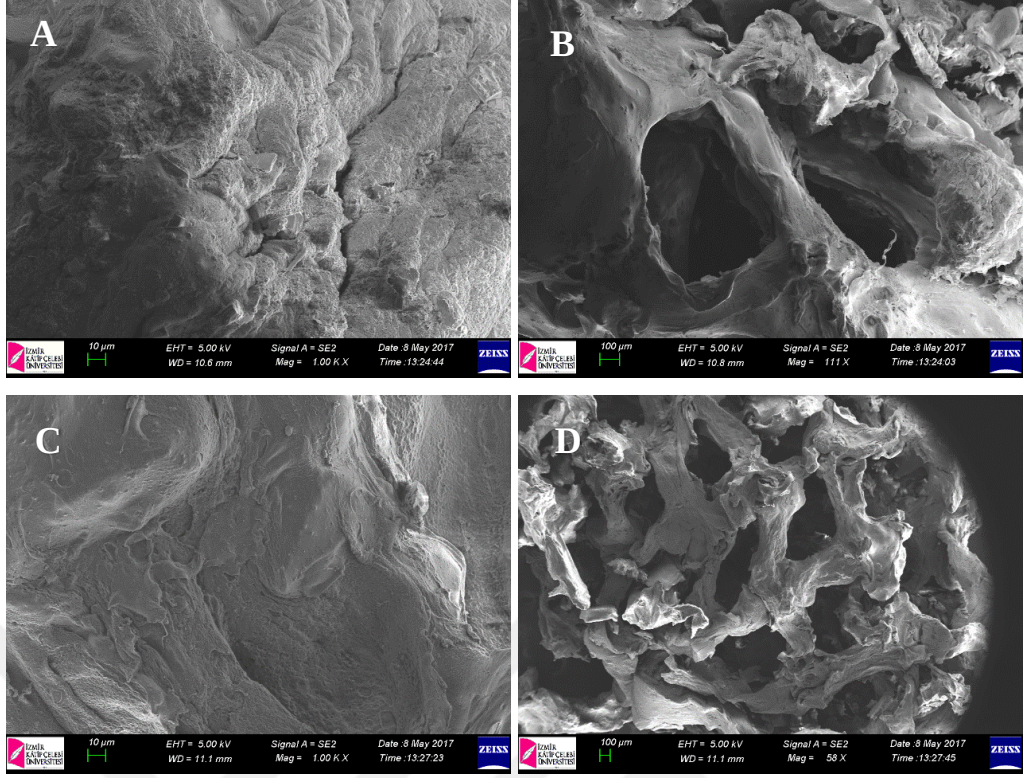
Şekil 4.19.: KİSKH (A, B) ve AdMKH'lerin (C, D) kontrol (A, C) ve osteojenik (B, D) farklılaşma sürecinde 14. gün AM boyamalarının ters faz-kontrast mikroskopta morfolojik görüntüleri. Her iki hücre grubunda da 14. günde artış saptanmıştır.

4.1.6 Çok Katmanlı Doku İskelelerinin Üretimi

45S5 biyocam çift fazlı iskeleler başarılı bir şekilde elde edildi (Şekil 4.20.). Çift fazlı iskelenin katmanları arasında üç gün boyunca çalkalamalı banyoda herhangi bir delaminasyona rastlanmamıştır. SEM incelemeleri iskelenin mikro ve makro gözenekli, hibrit bir mikro yapıya sahip olduğunu göstermiştir. Uygulanan sterilizasyon yönteminin iskelenin yüzey morfolojisinde bir değişikliğe neden olmadığı SEM görüntüleriyle gerçekleşti (Şekil 4.21.).



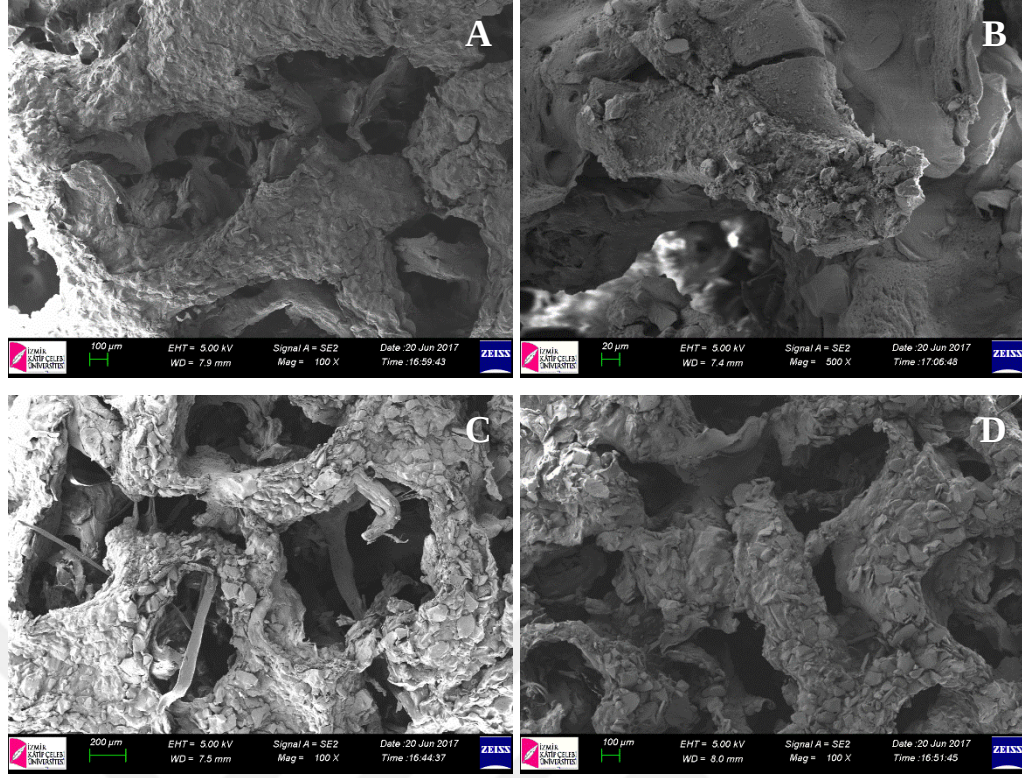
Şekil 4.20.: Kalıpların erimesinin ardından elde edilen iskeleler.



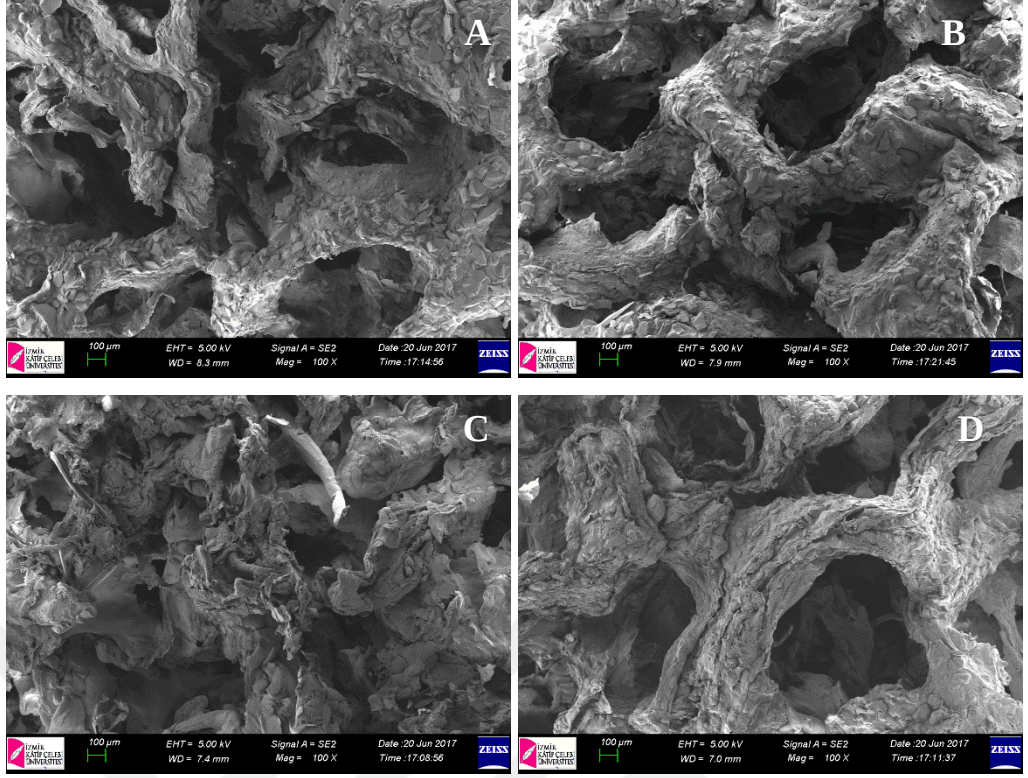
Şekil 4.21.: Non-steril materyallerin yüzey morfoljisi (A, B). Steril materyallerin yüzey morfoljisi (C, D). Uygulanan sterilizasyon yönteminin iskelelenin yüzey morfoljisinde bir değişikliğe neden olmadığı SEM görüntüleriyle belirlenmiştir.

4.1.7. Doku İskeleleri İçinde Hücre Karakterizasyonu

Uygulanacak bütün parametreler etkisiyle hücrelerin üç boyutlu iskeleler üzerinde tutunmaları ve alacakları morfolojiler, iskele yüzeyinde ve içinde taramalı elektron mikroskopisi (SEM) ile gözlemlendi (Şekil 4.22., 4.23.). Çift fazlı iskeleler üzerine ekilen kondroblast ve osteojenik farklılaştırma yapılan hücrelerin 7. ve 14. günde iskele yüzeyine tutundukları ve çoğaldıkları saptanmıştır. Hücrelerin sitoplazmik uzantıları gözlenmiştir.



Şekil 4.22.: KİSKH (A, B) ve AdMKH'lerin (C, D) osteojenik (A, C) ve kondrojenik (B, D) farklılaşma sürecinde 7. gün SEM görüntüleri. Doku iskelesi üzerinde hücrelerin tutunduğu görülmüştür.



Şekil 4.23.: KİSKH (A, B) ve AdMKH'lerin (C, D) osteojenik (A, C) ve kondrojenik (B, D) farklılaşma sürecinde 14. gün SEM görüntüleri. Doku iskelesi üzerinde tutunan hücrelerin çoğaldıkları görülmüştür.

4.2. Tartışma

KİSKH ve AdMKH'ler kolay elde edilmeleri, kültürde çoğaltılabilmeleri ve birçok hücreye farklılaşabilme özelliklerinden dolayı çok önem kazanmış hücrelerdendir. MKH'lerin kemik ve kıkırdak doku mühendisliğinde de son zamanlarda kullanımı hızla artmaktadır.

Mezenşimal kök hücrelerin kondrositlere farklılaşmasında mikrokütle, pellet ve süspanse veya yüzeye tutunan kültür yöntemleri olmak üzere farklı yöntemler kullanılmaktadır. Mikrokütle kültür yönteminin pellet kültür yöntemi ile karşılaştırıldığı bir çalışmada mikro kütle kültür yöntemi ile kondrosite spesifik kollajen-II markırının daha homojen ve çok olduğu gözlenmiştir. Böylece mikro kütle yönteminin *in vitro* kondrojenik çalışmalar için umut verici bir araç olduğunu gözlemlemişlerdir [47]. Bir başka çalışmada pellet yöntemi ile MKH'lerin kondrojenik farklılaştırılmasında TGF- β 'nın önemli olduğunu vurgulamışlardır [48].

Sıçan kalvariasından elde edilen MKH'lerde yüzeye tutunarak çoğalmışlardır. Kondrosite farklılaştırılan hücreler kültür kabının yüzeyini tam kaplamadığında kondrosit fenotiplerinin tipik markırlarını eksprese etmezler. Fakat hücreler yüzeyi tam kapladığında kartilaj matriks tarafından ayrılan kondrositik hücrelerin nodülleri şekillenmeye başlamıştır. Hem nodüller hem de agregatlardaki matriks kollajen tip II, XI ve aggrecan için boyandı. Hücreler farklılaşmadan iki hafta sonra yüksek miktarda mineralizasyon göstermişlerdir [49]. Bizim çalışmamızda da farklılaşma ortamında TGF- β varlığında 14. günde kondroblastik farklılaşmada nodül oluşumu ile daha iyi kollajen-II ve Sox-9 boyaması gözlenmiştir.

KİSKH ve AdMKH kültürlerinde osteojenik besi ortamı etkisi ile epiteloid morfoloji kazanan hücrelerin ON ve OK ile boyanarak mineralizasyona başladıkları ve nodül oluşumu gösterdikleri saptandı. ON boyaması her iki hücre türünde de biraz daha belirgin boyandı.

Önceki çalışmalarda gösterilen osteoblastik olan hücreler epiteloid morfolojide olup mineralize bir matriks etrafında kemik hattı oluşturmaktadırlar. Önceki çalışmalarda yüksek yoğunluktaki kültürlerde ON, ALP, OP, BSP ve OK aktivitesi gözlenmiştir [50, 51, 52]. Yapılan kültür deneylerinde alınan sonuçlar

göstermektedir ki sıçan KİSKH'leri ve AdMKH'ler heterojen bir karışım olup bunun içersinde osteoblast markırlarını içeren bir kısım hücre büyüme faktörleri ilavesi ile sinyal yollarının aktive olması ile mineralize olmuş nodül formasyonunu oluşturmaktadır. Bu çalışmalara benzer şekilde bizim çalışmamızda osteojenik besi ortamı etkisi ile farklılaştırılan KİSKH'lerinde tutunma ve çoğalma AdMKH'lere göre daha iyi gözlenmiştir. Hücreler yüzeyi tam kapladığında daha iyi bir osteojenik farklılaşma ile ON ve OK seviyelerinde 14. günde artış gözlenmiştir.

Tek katmanlı kültürlerde oluşan nodüller, daha önceki çalışmalarda tanımlanan aşırı kıkırdak büyümlerine benzer bir morfolojik görünüşe sahiptir [53]. Kıkırdak matriks unsurlarının varlığı, kollajen tip II, XI ve aggrecan'a karşı antikorlarla immünofloresan boyama ile gösterildi. Nodüller arasındaki tek tabakalardaki hücrelerde ise herhangi bir boyama gözlemlenmemiştir. Nodüllerdeki hücrelerin birçoğu kollajen tip X için pozitif boyandı ve mineralizasyon sergiledi. Bizim çalışmamızda da kıkırdak matriks oluşumu AM boyamalarla ve aynı zamanda kollajen II ve Sox-9 pozitifliği immunositokimyasal yöntem ile gözlenmiştir.

Çalışmalarda kültür ortamında çoğalan hücreler kübik morfoloji sergilemiştir. Hücreler kültür kabına tutunduktan sonraki bir hafta içinde ve β -gliserofosfat ve askorbik asit ile tedaviye başlandıktan sonra, kültürlerde büyük ölçüde nodüle oluşumu gözlemlendi. Hücreler çoğaldıktan sonra, birkaç saat içinde agregatlar oluşturdu, bu da 2 hafta sonra yüksek düzeyde mineralleşmeye sebep oldu. Kültüre TGF- β 1 eklendiğinde kıkırdak markırlarını ekspresse ettiği birçok çalışmada gösterilmiştir. Buna karşılık, TGF- β 1 ilavesi ile, 10^{-7} M deksametazon varlığında veya yokluğunda, tüm kemik iliği hücre preparatlarında kondrojenez başlattığı görülmüştür. Kondrojenezin indüksiyonu, biriken hücrelerin ALP aktivitesinde bir artışa neden olmuştur [54, 55]. Bizim çalışmamızda da kondroblastik farklılaşma ortamına TGF- β 1 ve aynı oranda deksametazon ilavesi ile farklılaşma sağlanmıştır.

Köpek kemik iliği ve yağ dokusundan elde edilen MKH'ler CD90 yüzey markırı için pozitif ve CD45 yüzey markırı için negatif ekspresyon göstermiştir [56]. Bizim çalışmamızda da benzer sonuçlar bulunmuştur.

Farklı kıkırdak ve kemik tabakalarından oluşan çift fazlı sentetik doku mühendisliği implantları araştırmaları artan bir şekilde devam etmektedir [57, 58, 59,

60, 61, 62]. Çift fazlı iskele hem mekanik hem de biyolojik özelliklerinden dolayı osteokondral greftlerin yapımında tercih edilir. Böyle iskeleler üstteki kırıkdağı destekleyerek bulunduğu yerdeki kemik ile entegre olabilir. Sentetik ekstrasellüler matriksin primer yapısal proteini olan kollajen tip I iskele yapımı için doğal polimer olarak çok yaygın kullanılır. Osteoartrit veya hasar sonrası iyileşme sürecinde kırıkta dokunun tamir mekanizması klinik olarak zordur. Duan ve ark. yaptığı çalışmada tip I kollajen / glikozaminoglikan (Kol/GAG) ile gözenekli titanyumdan oluşan çift fazlı iskele geliştirilmiş ve hayvan modelinde kemik ve kırıkdağa ait defektlerin tamirinde kemik iliği stromal kök hücreleri ile birlikte etkili olduğunu göstermişlerdir. Çift fazlı iskele kondral faz olarak Kol/GAG ve subkondral faz olarak gözenekli titanyumdan oluşur. Üzerine osteoblast iliği stromal kök hücreleri ekilen çift fazlı iskelelerin köpek modelinde osteokondral defektlerin tamirinde yüksek bir potansiyel gösterdiği bildirilmiştir [3].

Kök hücrelerin implant destekleyici materyallerle birleştirilmesi hem kemik iyileşmesine hem de oluşan kemiğin daha kaliteli olmasına yardım edecektir. Yağ doku ve kemik iliğinden elde edilen kök hücreler yüksek poröz 3 boyutlu 45S5 biyocam iskelelerde osteoblasta farklılaştırılarak incelendiği bir çalışmada 2 ve 4 hafta sonra hücre tutunması, canlılığı, ALP aktivitesi ve osteojenik gen ekspresyonu analiz edilmiştir. Yağ dokudan elde edilen kök hücreler ile kemik iliğinden elde edilen kök hücrelerin osteoblasta farklılaşma potansiyelleri ve farklılaştıktan sonra iskeleler üzerindeki tutunmaları ve çoğalmalarının daha fazla olduğu görülmüştür. Özetle yağ doku kökenli kök hücre ekili 45S5 biyocam iskelelerin kemik doku mühendisliği uygulamaları için çok uygun olduğu bildirilmiştir [2]. Sonuç olarak farklı kök hücre kaynaklarının iskeleler üzerindeki davranışları ve uyumunun farklı olmasından dolayı, yeni iskele modelleri geliştirilmesinde farklı kök hücrelerin analizlerinin yapılmasının ileride klinik kullanım açısından önemli olduğu düşünülmektedir.

3 boyutlu biyoçözünabilir poröz polimer ağ olan iskele bir matriks ortamı oluşturarak hücrenin tutunmasını, yayılmasını, çoğalmasını ve yaşamasını sağlayarak tedavi amaçlı kullanılmalarında büyük avantajlar sağlamaktadır. Bu iskele uygun porozite ve biyouyumluluk ile iyi fiziksel ve mekaniksel bir yüzey oluşturmaktadır. Böylece hem hücreye hem de verildiği dokuya önemli destek sağlamaktadır. Bu

iskeleler arasında glikokalik asit ve laktik asite çözünen polyester materyaller ile hidrojel, kalsiyum fosfat, camlar ve kompozitler gibi diğer materyaller bulunmaktadır. Kalsiyum fosfat iskeleler, β trikalsiyum fosfat ve hidroksi apatit içermekte olup doğal mineralize dokuya benzerler. Biyouyumlu ve osteokonduktif olarak bilinirler. Doğal iskeleler, kollajen veya fibrin, kitosan veya glikozaminoglikanlar gibi polisakkaritler ve aljinalardır [63]. Hücre taşıyıcı, hücre tedavisi veya doku rejenerasyonu için belirli bir bölgedeki hücrelerin özel bir doku içine taşınması için bir araçtır. Zeng ve ark. yaptığı çalışmada, 45S5 biyocam (BG) hücre taşıyıcılar olarak BG/ALG bileşik hidrojel boncuklar oluşturmak için aljinat (ALG) kullanılmıştır. İyonlardan salınan davranış, boyutsal stabilite ve boncukların *in vitro* biyoaktivitesi incelenmiştir. BG/ALG boncuklar endotel hücrelerinin anjiyogenezisin yanı sıra mezenşimal kök hücrelerinin osteojenik farklılaşmasını ve çoğalmasını desteklediği gösterilmiştir [64].

Biyoaktif camların hidrokiapatit/trikalsiyum fosfata (HA/TCP) olan üstünlükleri, üstün biyomekanik dirençten ve kemik ile güçlü kimyasal bağların oluşmasını sağlamasından kaynaklanır. Apatit ile birleşmiş hallerinde kortikal kemikten daha güçlü olduğu bulunmuştur. SiO_2 eklenmesi ile asidik bir ortam oluşturarak doku sıvısı ile ilişki kurmakta ve bir ağ oluşumu sağlamaktadır. Geleneksel biyoaktif camlar ile kontrollü salım yapanlar arasındaki en büyük fark bunların tamamen çözünebilmeleridir. Bu camlar otograft uygulamasına benzer bir şekilde biyouyumluluk gösterip özellikle artroplasti çalışmalarında kullanılmaktadır [65].

Kemik doku mühendisliği için üretilen biyoaktif kompozit iskeleler, 45S5 biyocam veya strontium-katkılı biyoaktif cam (SrBG) lar polikaprolakton (PCL) ile birleştirilmiş ve 3 boyutlu olarak imal edilmiştir. Micro-CT analizler BG parçacıklarını iskeleler boyunca homojen olarak tanımlamıştır. Biyoaktif cam içeren bütün iskeleler PCL iskeleler ile karşılaştırıldığında, erken hücre farklılaşması ve matriks mineralizasyonuna sebep olan iskeleler yüzeyinde kalsiyum fosfat çökmesinin daha fazla olduğu görülmüştür. Bu sonuçlar göstermektedir ki PCL/45S5 ve PCL/SrBG kompozit bileşikler gelecekte kemik iskeleleri modellerinde kullanılabilecek en olası potansiyele sahip iskelelerdir [66].

Kıkırdak hücrelerinin ve kondrosite farklılaştırılmış kök hücrelerin biyomalzemeler üzerinde ya da implantasyondan sonra dediferansiye olup fibroblastik özellik gösterebildikleri farklı kaynaklarda verilmiştir [67, 68]. Bu sorunun en aza indirgenmesi için kıkırdak hücrelerinin fenotipik özelliklerini korumasını sağladığı bilinen ve yüksek su tutma kapasitesi ile doğal kıkırdak ekstraselüler matrisine benzeyen aljinat hidrojel­leri özellikle seçilmiştir [69-70]. Kıkırdak matriksinde bulunan proteoglikanlara bağlı GAG yüksek negatif yükleri sayesinde katyonik iyonları ve suyu bağlayarak kıkırdak matriksinin yüksek su tutuculuğunu ve basma dayanımını sağlar [31]. Aljinat da benzer şekilde %60'a varan su tutma özelliğine sahiptir [71]. Derin katmanda bulunan kalsifiye kıkırdak ise subkondral kemik ile mekanik uyumsuzluk olmasını engeller. Bu sebeple üretilecek iskelenin alt katmanlarına inildikçe artan oranlarda kemikle kimyasal ve mekanik biyouyumluluğu arttıracak 45S5 biyocam bulunacaktır. Ayrıca bu bölgede subkondral kemik ile entegrasyonun en hızlı şekilde sağlanabilmesi için damarlanmanın rahatça ilerleyebileceği büyük gözenek ölçüleri ve özellikle bağlantılı (interconnected) ve dikey gözenek yapısı kullanılacaktır [72, 73]. Üç boyutlu eklemeli üretilecek iskelelerin sodyum aljinat jellerin kalsiyum iyonları ile fiziksel çapraz bağlanması ardından liyofilize edilmesi ile üretim tamamlanacaktır. Liyofilizasyon sayesinde jel katmanların içinde çözgen sublimasyonuna bağlı mikro gözenekler oluşacaktır. Bu iki aşamalı üretim sayesinde hem makro- hem de mezo/mikro-gözenekli, hiyerarşik bir mikroyapı elde edilecektir [37, 74]. Bu yapı gözeneklilik oranının ve su tutma kabiliyetinin artmasına hizmet edecektir. Çok farklı çalışmalarla çeşitli kaynaklardan alınan kök hücrelerin farklı kompozitte hazırlanmış iskeleler ile uyumu söz konusudur. Özellikle hücrelerin bu şekilde klinikte kullanımı günümüzde son derece önem kazanmıştır. Bizim çalışmamızdaki çift fazlı biyoiskelede hem kıkırdak hem de osteoblasta farklılaştırılan hücreler ile uyumlu olması önem kazandırmıştır. Kemik ve kıkırdak defektlerinde kullanılması planlanan iskelenin *in vitro* analizlerinden sonra *in vivo* analizlerinin de yapılması önemlidir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Elde edilen KİSKH ve AdMKH'lerin immunositokimyasal analizleri sonucunda CD90 pozitif ve CD45 negatif boyandığı görülmüştür. MKH'lerin başarılı bir şekilde elde edildiği belirlenmiştir.

KİSKH ve AdMKH'ler kontrol, osteojenik ve kondrojenik besi ortamları ile kültüre edilmiştir. Hücrelerin 7. günden itibaren osteoblast ve kondroblasta farklılaşma gösterdiği gözlemlendi. Kontrol olarak primer besi ortamındaki hücreler ise fibroblast morfolojilerini 14 günlük kültürde sürdürdükleri gözlemlendi. KİSKH'lerin AdMKH'lerinden biraz daha artmış osteoblastik morfoloji gösterdiği gözlemlendi. Kondrojenik farklılaşma açısından anlamlı bir farklılık gözlemlenmedi.

KİSKH ve AdMKH'lerin aynı miktarda hücre sayısı ile başlatılan ve 21 gün devam ettirilen kültürlerinde MTT yöntemi kullanılarak 7. günde başlayan hücre çoğalmasının 14. ve 21. günlerde hücre sayısında ($p<0.001$) önemli artış gösterdiği belirlenmiştir. KİSKH'lerin AdMKH'lerine göre anlamlı bir şekilde daha fazla çoğaldıkları görüldü.

KİSKH'lerinin ve AdMKH'lerin osteojenik farklılaştırmalarında 7. ve 14. günlerde ON ekspresyonun yüksek seviyelerde OC ekspresyonunun ise daha düşük seviyelerde olduğu görülmüştür. Kondrojenik farklılaştırmalarında ise 7. ve 14. günlerde Sox-9 ekspresyonun yüksek seviyelerde kollajen-II ekspresyonunun ise daha düşük seviyelerde olduğu görülmüştür. KİSKH'lerin AdMKH'lere göre daha belirgin farklılaşma gösterdiği belirlenmiştir.

KİSKH ve AdMKH'lerin histokimyasal analizlerinde ALP/VK, AK ve AM boyamalarında benzer sonuçlar görüldü. Osteojenik farklılaşmayı gösteren ALP/VK ve AK boyamalarında her iki hücre grubunda da 7. günlerde düşük 14. günlerde yüksek seviyelerde boyanma görüldü. Kondrojenik farklılaşmayı gösteren AM boyamasında da aynı sonuçlar görüldü. KİSKH'lerin farklılaşma potansiyellerinin daha yüksek olduğu belirlendi.

Çok katmanlı doku iskelesinin üretimi başarıyla sağlandı. İskelede bir fazdan diğerine geçişte stres kırılmalarına rastlanmadı, iskele bütünlüğünün korunduğu görüldü. İskele üzerinde yapılan denemelerde delaminasyona rastlanmadı. Kültür

ortamında yapılan analizler sırasında iskelenin yapısal bütünlüğünü koruduğu görüldü. Sterilizasyon yöntemi başarıyla uygulandı ve iskelenin yüzey morfolojisinde herhangi bir değişikliğe neden olmadığı görüldü. Aynı zamanda sterilizasyon yöntemi uygulaması sırasında da delaminasyona rastlanmadı. Uygulanan tüm yöntem ve parametrelerin etkisi altında doku iskelesinin kültür ortamında çalışmaya elverişli olduğu görülmüştür.

Doku iskelesi üzerinde osteojenik ve kondrojenik farklılaştırmaları yapılan hücrelerin tutunduğu 7. ve 14. günlerde SEM görüntüleriyle belirlenmiştir. 14. günde hücre sayısında artış olduğu görülmüştür. Doku iskelesinin klinik uygulamalar için gelecek vaad eden hücre ile uyumlu biyoaktif bir biyomateryal olduğu belirlenmiştir.

Kök hücreler ve uygulamaları son zamanlarda, tedavideki yararları nedeniyle önemli olduğu kabul edilen bir konudur. Kemik ve kıkırdak dokusu iskelet sistemindeki rolü nedeniyle insan ve hayvan sağlığında, özellikle yara onarımı ve iyileşmesinde yer aldığı patolojik olaylarda önemlidir. Bununla beraber kök hücrelerden farklılaştırılan kıkırdak veya kemik öncü hücrelerinin *in vitro* uyumluluğunun *in vivo* olarak da devam etmesi yeni oluşacak kıkırdak veya kemik yapısına katılması açısından önemlidir. Bu amaçla kullanılan biyobozunur malzemeler *in vitro* ortamda hücrenin uyumunu sağlamakta, hücrenin farklılaşmasını, çoğalmasını ve hatta canlı kalmasını desteklemektedir.

Çalışmada, kültür ortamında kemik iliği ve yağ dokusundan elde edilen kök hücrelerin osteoblast ve kondroblast öncü hücrelerine farklılaştırılarak, üretilen çift fazlı iskeleler üzerindeki davranışları, farklılaşma ve çoğalma mekanizmaları ile bu süreçte hücre davranışını etkileyen faktörler incelenmiştir. KİSKH'lerin AdMKH'lere göre farklılaşma ve çoğalma potansiyellerinin daha yüksek olduğu görülmüştür.

Osteokondral doku mühendisliğinde karşılaşılan önemli problemlerden biri kemik ve kıkırdak bölgelerinde ilgili doku oluşumu ve bütünleşmesini sağlayacak iskele özelliklerinin birbirinden farklı olmasıdır. Bu çalışmada 45S5 biyocam çift fazlı iskelelerin kademeli geçiş ile oluşturulması, çift fazlı iskelelerin içeriğinde aljinat hidrojel olması, ayrıca kemikten kıkırdağa aşamalı geçiş sağlayacak tek parça bir iskele üretiminden dolayı diğer çift fazlı iskelelerden farklı özelliklere sahip

olması sağlanmıştır. Oluşturulan bu çift fazlı iskele yapısının hücre tutunması ve çoğalmasını desteklediği görülmüştür.

Çalışmanın kemik ve kırık dokusu mühendisliği klinik uygulamaları için özellikle ümit vaat etmekle beraber, doğru kimyasal, mekanik ve mikro yapısal özelliklere sahip osteo-kondral iskele üretiminin ve bu iskelelerin üzerinde kemik ve kırık dokusu oluşumunun hızlandırılması konusunda ihtiyaç duyulan gelişmeler için önemli bir adım olduğu düşünülmektedir.

Çalışmada başarılı bir şekilde elde edilen çift fazlı doku iskelelerin hücre ile uyumunda beklenen performansı sağladıkları görülmüştür. Kemik-kırık dokusu defekt tedavisinde klinik denemelerinin gerçekleştirilmesi yakın zamanda mevcut klinik problemlerin çözümü için işlevsel ve uygulanabilir çözümler sunma potansiyeli vaat etmektedir. Klinik uygulamaların başarılı olmaları durumunda, 3 boyutlu iskeleler, klinik rutin tedavide etkin kemik ve kırık dokusu oluşumu yönünden büyük önem taşıyacaktır.

Ülkemizin ekonomik koşullarında oldukça pahalı olan kemik veya kırık dokusu, yara ve kırıklarının sağaltım masraflarının azaltılması, klasik yöntemler ile tedavi edilemeyecek kırık iyileşmelerine alternatif yöntem sunulması ve iyileşme süresinin etkin hücre grubu ve kompozit malzemeler ile kısaltılması beklenmektedir. Aynı zamanda, insan ve veteriner hekimliğinde kök hücre uygulamalarının diğer yöntemlere alternatif tedavi yöntemi olduğu da göz önüne alınmalıdır. Yeni geliştirilen iskelelerin kullanılabilirliğinin test edilmesi ile sadece kemik ve kırık dokusu defektlerinde değil, diğer dokuların tedavisinde de kullanılabilecek olması ülkemizin ekonomik koşullarında pahalı olan tedavi masraflarını azaltmaya ve süreyi kısaltmaya alternatif yöntem olabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Akay T. Genel Histoloji, Palme Yayıncılık, Ankara, 2008, 139-171 s.
2. Rath, S.N., Noeaid, P., Arkudas, A., Beier, J.P., Strobel, L.A., Brandl, A., Roether, J.A., Horch, R.E., Boccaccini, A.R., Kneser, U. "Adipose- and bone marrow-derived mesenchymal stem cells display different osteogenic differentiation patterns in 3D bioactive glass-based scaffolds", J Tissue Eng Regen Med. 2013, Dec 3. doi:10.1002/term.1849.
3. Duan, X., Zhu, X., Dong, X., Yang, J., Huang, F., Cen, S., Leung, F., Fan, H., Xiang, Z. "Repair of large osteochondral defects in a beagle model with a novel type I collagen/glycosaminoglycan-porous titanium biphasic scaffold", Mater Sci Eng C Mater Biol Appl. 2013, 33, 3951-7.
4. Pasinli, A. Biyomedikal uygulamalarda kullanılan biyomalzemeler. Teknolojik Araştırmalar. 2014, 4, 25-34.
5. Can, A. Kök Hücre Biyolojisi, Türleri ve Tedavide Kullanımları, Akademisyen Tıp Kitapevi, Anlara, 2014, 41, 46, 164, 327-330, 364-376, 379-396, 380-386 s.
6. Benten, D., Cheng, K. and Gupta, S. Identification of transplanted human cells in animal tissues. Methods Mol Biol. 2006. 326:189–201.
7. Şahin, F., Saydam G., Omay, S.B. Kök Hücre Plastisitesi ve Klinik Pratikte Kök Hücre Tedavisi. Türk Hematoloji-Onkoloji Dergisi. 2005, 15, 49-56.
8. Semb, H. "Human embryonic stem cells: origin, properties and applications", APMIS. 2005, 113, 743–50.
9. Kansu, E. Kök Hücre Biyoloji ve Plastisitesinde Güncel Kavramlar. Hacettepe Tıp Dergisi. 2005, 36, 191-197.
10. <http://www.biyologlar.com/kok-hucrelere-bakistanimlar-kavramlar-ve-siniflandirmalar>.
11. Taran, R., Mamidi, M.K., Singh, G., Dutta, S., Parhar, I.S., John, J.P., Bhonde, R., Pal, R., Das, A.K. "In vitro and in vivo neurogenic potential of mesenchymal stem cells isolated from different sources", J Biosci. 2014, 39, 157-69.
12. Özel, B., Ozan, E., Dabak Ö. Embriyonik Kök Hüceleri. Türkiye Klinikleri. 2008, 28, 333-341.
13. Özdal Kurt, F., Vatansever, H.S. Potential Clinical Use of Differentiated Cells From Embryonic or Mesenchymal Stem Cells in Orthopaedic Problems. Current Stem Cell Research & Therapy, 2016, 11, 522-529.
14. Siddiqui N.A., Owen, J.M. "Clinical advances in bone regeneration", Curr Stem Cell Res Ther. 2013, 8, 192-200.
15. Ambikaipalan, A., Wong, J.M., Khan, W.S. "Preclinical and clinical studies on the use of stem cells for bone repair: a systematic review", Curr Stem Cell Res Ther. 2013, 8, 210-6.
16. Özdal-Kurt, F. Tuğlu, I. Vatansever, H.S. Tong, S. Deliloğlu-Gürhan. S.I. "The Effect of Autologous Bone Marrow Stromal Cells differentiated on the scaffolds for the Canine Tibial Bone Reconstruction", Biotechnic & Histochemistry, Yayına kabul edildi. 2014.
17. Adams, J.C. and Watt, F.M. "Regulation of development and differentiation by the extracellular matrix", Development. 1993, 117, 1183–98.
18. Homma, Y., Zimmermann, G., Hernigou, P. "Cellular therapies for the treatment of non-union: the past, present and future", Injury. 2013, 44, 46-9.
19. Ozdemir, T., Higgins, A.M., Brown, J.L. "Osteoinductive biomaterial geometries for bone regenerative engineering", Curr Pharm Des. 2013, 19, 3446-55.

20. Jang, J.H., Castano, O., Kim, H.W. "Electro spun materials as potential platforms for bone tissue engineering", *Adv Drug Deliv Rev.* 2009, 61, 1065-83.
21. Yoo, J.U., Johnstone, B. "Johnstone B: The role of osteochondral progenitor cells in fracture repair", *Clin Orthop Relat Res.* 1998, 355, S73–S81.
22. Yoo, J.U., Barthel, T.S., Nishimura, K., Solchaga, L., Caplan, A.I., Goldberg, V.M., Johnstone, B. "The chondrogenic potential of human bone-marrow-derived mesenchymal progenitor cells", *J Bone Jt Surg Am.* 1998, 80, 1745–1757.
23. Liu, N., Lyu, X., Fan, H., Shi, J., Hu, J., Luo, E. "Animal Models For Craniofacial Reconstruction by Stem/stromal Cells", *Curr Stem Cell Res Ther.* 2014, 9, 174-86.
24. Young, M.F., Kerr, J.M., Ibaraki, K., Heegaard, A.M. and Robey, P.G. "Structure, expression, and regulation of the major noncollagenous matrix proteins of bone" *Clin Orthop Relat Res.* 1992, 281, 275-94.
25. Kömürcü, E., İnanmaz, M.E., Işık, C., Akan, B., Köse, K.Ç. Kemik Yerine Geçen Biyomateryaler 2. Kısım: Hayvansal ve Sentetik Greftler. *Düzce Tıp Dergisi.* 2011. 13(3), 46-52.
26. Nganga, S., Zhang, D., Moritz, N., Vallittu, P.K., Hupa, L. "Multi-layer porous fiber-reinforced composites for implants: *in vitro* calcium phosphate formation in the presence of bioactive glass", *Dent Mater.* 2012, 28, 1134–1145.
27. Hench, L.L. "Bioceramics—from concept to clinic", *J Am Ceram Soc.* 1991, 74, 1487–1510.
28. Bakry, A.S., Takahashi, H., Otsuki, M., Tagami, J. "Evaluation of new treatment for incipient enamel demineralization using 45S5 bioglass", *Dent Mater.* 2014, 30, 314-20.
29. Keeney, M., Pandit, A. "The Osteochondral Junction and Its Repair via Bi-Phasic Tissue Engineering Scaffolds", *Tissue Engineering: Part B.* 2009, 15, 55-7.
30. Liverani, L., Roether, J.A., Nooeaid, P., Trombetta, M., Schubert, D.W., Boccaccini, A.R. "Simple fabrication technique for multilayered stratified composite scaffolds suitable for interface tissue engineering", *Materials Science & Engineering A*, 557, 54–58.-2012
31. Nukavarapu, S.P. and Dorcenus, D.L. "Osteochondral tissue engineering: Current strategies and challenges", *Biotechnology Advances.* 2013, 31, 706–721.
32. Mohan, N., Dormer, N.H., Caldwell, K.L., Key, V.H., Berklund, C.J., Detamore, M.S. "Continuous gradients of material composition and growth factors for effective regeneration of the osteochondral interface", *Tissue Eng Part A.* 2011, 17.
33. Tang, G., Zhang, H., Zhao, Y., Zhang, Y., Li, X., Yuan, X. "Preparation of PLGA scaffolds with graded pores by using a gelatin-microsphere template as porogen", *J Biomater Sci Polym Ed*, Dec. 2011.
34. Getgood, A.M.J. Kew, S.J., Brooks, R., Aberman, H., Simon, T. Lynn, A.K. Rushton, N. "Evaluation of early-stage osteochondral defect repair using a biphasic scaffold based on a collagen–glycosaminoglycan biopolymer in a caprine model", *The Knee.* 2012, 19, 422–430.
35. Shimomura, K. Moriguchi, Y., Murawski, C.D., Yoshikawa, H., Nakamura, N. "Osteochondral Tissue Engineering with Biphasic Scaffold: Current Strategies and Techniques", *Tissue Engineering: Part B*, 2014, Feb 26.
36. Bonino, C.A., Krebs, M.D., Saquing, C.D., Jeong, S.I., Shearer, K.L., Alsberg, E., Khan, S.A. "Electrospinning alginate-based nanofibers: From blends to crosslinked low molecular weight alginate-only systems", *Carbohydrate Polymers.* 2011, 85, 111–119.

37. Luo, Y., Wu, C. Lode, A., Gelinsky, M. "Hierarchical mesoporous bioactive glass/alginate composite scaffolds fabricated by three- dimensional plotting for bone tissue engineering", *Biofabrication*. 2013, 5, 015005.
38. Deliloglu-Gürhan, S.I., Vatansever, H.S., Özdal-Kurt, F., Tuğlu, I. "Characterization of osteoblasts derived from bone marrow stromal cells in a modified cell culture system", *Acta Histochem*, 2006, 108, 49–57.
39. Çapkın, M., Çakmak, S., Özdal Kurt, F., Gümüşderelioğlu, M., Şen, B.H, Türk, B.T., Deliloğlu-Gürhan, S.İ. 2012. "Random/aligned electrospun PCL/PCL-collagen nanofibrous membranes: comparison of neural differentiation of rat AdMSCs and BMSCs", *Biomed Mater*, 7, 045013.
40. Huang, H., Zhang, X., Hu, X., Dai, L., Zhu, J., Man, Z., Chen, H., Zhou, C., Ao, Y. 2014. "Directing chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells with a solid-supported chitosan thermogel for cartilage tissue engineering", *Biomed Mater*, 9(3), 035008.
41. Yuan, H., Zhang, J., Zhang, R. 2013 "Experimental study on adipose-derived stem cells transfected by bone morphogenetic protein 14 co-culture with chondrocytes", *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi*, 27, 353-7.
42. Lee, W., Debasitis, J.C., Lee, V.K., Lee, J.H., Fischer, K., Edminster, K., Park, J.K., Yoo, S.S. 2009. "Multi-layered culture of human skin fibroblasts and keratinocytes through three-dimensional freeform fabrication", *Biomaterials*, 30, 1587-95.
43. Song, S.J., Choi, J., Park, Y.D., Lee, J.J., Hong, S.Y., Sun, K. 2010. "A three-dimensional bioprinting system for use with a hydrogel-based biomaterial and printing parameter characterization", *Artif Organs*, 34, 1044-8.
44. Stoppel, W.L., White, J.C., Horava, S.D., Henry, A.C., Roberts, S.C., Bhatia, S.R. Terminal sterilization of alginate hydrogels: Efficacy and impact on mechanical properties. *Society For Biomaterials*. 2013, doi: 002/jbm.b.33070, 877-884.
45. Sendemir-Urkmez, A., Clark, S.G., Wheeler, M.B., Goldwasser, M.S., Jamison, R.D. 2008. "Evaluation of Chitosan/Biphasic Calcium Phosphate Scaffolds for Maxillofacial Bone Tissue Engineering", *Macromolecular Symposia*, 269(1), 100-105.
46. Beresford, J.N., Bennett, J.H., Devlin, C., Leboy, P.S., Owen, M.E. 1992. "Evidence for an inverse relationship between the differentiation of adipocytic and osteogenic cells in rat marrow stromal cell cultures", *J Cell Sci*, 102, 341-51.
47. Zhang L1, Su P, Xu C, Yang J, Yu W, Huang D. Chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells: a comparison between micromass and pellet culture systems. *Biotechnol Lett*. 2010 Sep;32(9):1339-46.
48. Ng F1, Boucher S, Koh S, Sastry KS, Chase L, Lakshmipathy U, Choong C, Yang Z, Vemuri MC, Rao MS, Tanavde VPDGF, TGF- β , and FGF signaling is important for differentiation and growth of mesenchymal stem cells (MSCs): transcriptional profiling can identify markers and signaling pathways important in differentiation of MSCs into adipogenic, chondrogenic, and osteogenic lineages. *Blood*. 2008 Jul 15;112(2):295-307.
49. Lunstrum GP, Keene DR, Weksler NB, Cho YJ, Cornwall M, Horton WA, Chondrocyte differentiation in a rat mesenchymal cell line. *J Histochem Cytochem* 1999, 47:1–6).
50. Herbertson, A. and Aubin, J.E. Dexamethasone alters the subpopulation make-up of rat bone marrow stromal cell cultures. *J Bone Miner Res.*, 1995. Feb;10(2):285–94.

51. Malaval, L., Modrowski, D., Gupta, A.K. and Aubin, J.E. Cellular expression of bone-related proteins during *in vitro* osteogenesis in rat bone marrow stromal cell cultures. *J Cell Physiol.*, 1994. Mar;158(3):555-72.
52. Maniatopoulos, C., Sodek, J. and Melcher, A.H. Bone formation *in vitro* by stromal cells obtained from bone marrow of young adult rats. *Cell Tissue Res.*, 1988. Nov;254(2):317-30.
53. Ghezzi CE, Marelli B, Donelli I, Alessandrino A, Freddi G, Nazhat SN. Multilayered dense collagen-silk fibroin hybrid: a platform for mesenchymal stem cell differentiation towards chondrogenic and osteogenic lineages. *J Tissue Eng Regen Med.* 2015 Nov 9. doi: 10.1002/term.2100. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 26549403.
54. Erickson GR, Gimble JM, Franklin DM, Rice HE, Awad H, Guilak F. Chondrogenic potential of adipose tissue-derived stromal cells *in vitro* and *in vivo*. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002 Jan 18;290(2):763-9.
55. Topoluk N, Hawkins R, Tokish J, Mercuri J. Amniotic Mesenchymal Stromal Cells Exhibit Preferential Osteogenic and Chondrogenic Differentiation and Enhanced Matrix Production Compared With Adipose Mesenchymal Stromal Cells. *Am J Sports Med.* 2017 May 1;363546517706138. doi: 10.1177/0363546517706138. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 28541092.
56. Russell KA, Chow NH, Dukoff D, Gibson TW, LaMarre J, Betts DH, Koch TG. Characterization and Immunomodulatory Effects of Canine Adipose Tissue- and Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells. *PLoS One.* 2016 Dec 1;11(12):e0167442.
57. Yang, Q., Peng, J., Lu, S.B., Guo, Q.Y., Zhao, B., Zhang, L., Wang, A.Y., Xu, W.J., Xia, Q., Ma, X.L., Hu, Y.C., Xu B.S. "Evaluation of an extracellular matrix-derived acellular biphasic scaffold/cell construct in the repair of a large articular high-load-bearing osteochondral defect in a canine model", *Chin Med J (Engl)*. 2011, 124, 3930–3938.
58. Holland, T.A., Bodde, E.W., Baggett, L.S., Tabata, Y., Mikos, A.G., Jansen, J.A. "Osteochondral repair in the rabbit model utilizing bilayered, degradable oligo (poly(ethylene glycol) fumarate) hydrogel scaffolds", *J Biomed Mater Res A.* 2005, 75, 156-67.
59. Jiang, C.C., Chiang, H., Liao, C.J., Lin, Y.J., Kuo, T.F., Shieh, C.S., Huang, Y.Y., Tuan, R.S. "Repair of porcine articular cartilage defect with a biphasic osteochondral composite", *J Orthop Res.* 2007, 25, 1277-90.
60. Hung, C.T., Lima, E.G., Mauck, R.L., Takai, E., LeRoux, M.A., Lu, H.H., Stark, R.G., Guo, X.E. Ateshian GA. "Anatomically shaped osteochondral constructs for articular cartilage repair", *J Biomech.* 2003, 36, 1853-64.
61. 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.* 2006, 27, 6123-37.
62. Sherwood, J.K., Riley, S.L., Palazzolo, R., Brown, S.C., Monkhouse, D.C., Coates, M., Griffith, L.G., Landeen, L.K., Ratcliffe, A. A. "Three-dimensional osteochondral composite scaffold for articular cartilage repair", *Biomaterials.* 2002, 23, 4739-51.
63. Brar, G. S., Toor, R. S. "Dental stem cells: dentinogenic, osteogenic, and neurogenic differentiation and its clinical cell based therapies", *Indian J Dent Res.* 2012, 23, 393-7.

64. Zeng, Q., Han, Y., Li, H., Chang, J. "Bioglass/alginate composite hydrogel beads as cell carriers for bone regeneration", *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2014, 102, 42-51.
65. Kasuga, T. "Bioactive calcium pyrophosphate glasses and glass-ceramics", *Acta Biomater*. 2005, 1, 55-64.
66. Poh, P.S., Hutmacher, D.W., Stevens, M.M., Woodruff, M.A. "Fabrication and *in vitro* characterization of bioactive glass composite scaffolds for bone regeneration", *Biofabrication*. 2013, 5, 045005.
67. Csaki, C., Schneider, P.R., Shakibaei, M. "Mesenchymal stem cells as a potential pool for cartilage tissue engineering", *Ann Anat*. 2008, 190, 395-412.
68. Vinardell, T, Sheehy, E.J., Buckley, C.T., Kelly, D.J. "A comparison of the functionality and *in vivo* phenotypic stability of cartilaginous tissues engineered from different stem cell sources", *Tissue Eng Part A*. 2012, 18, 1161-70.
69. Kurth, T., Hedbom, E., Shintani, N., Sugimoto, M., Chen, F.H., Haspl, M., Martinovic, S., Hunziker, E.B. "Chondrogenic potential of human synovial mesenchymal stem cells in alginate", *Osteo- arthr Cartil*. 2007, 15, 1178–1189.
70. Lin, Y.L., Yen, C. Hu, Y. "Chondrocytes culture in three-dimensional porous alginate scaffolds enhanced cell proliferation, matrix synthesis and gene expression", *Journal of Biomedical Materials Research PartA*. 2009, 88A, 23-33.
71. Bajpai, S.K. and Sharma, S. "Investigation of swelling/degradation behaviour of alginate beads crosslinked with Ca²⁺ and Ba²⁺ ions", *Reactive and Functional Polymers*. 2004, 59, 129–140.
72. Castro, N.J., Hacking, S.A., Zhang, L.A. "Recent Progress in Interfacial Tissue Engineering Approaches for Osteochondral Defects", *Annals of Biomedical Engineering*. 2012, 40, 1628–1640.
73. Noeaid, P., Salih, V., Beier, J.P., Boccaccini, A.R. "Osteochondral tissue engineering: scaffolds, stem cells and applications", *J Cell Mol Med*. 2012, 16, 2247-2270.
74. Chae, T., Yang, H., Leung, V., Ko, F., Troczynski, T. "Novel biomimetic hydroxyapatite/alginate nanocomposite fibrous scaffolds for bone tissue regeneration", *J Mater Sci: Mater Med*. 2013, 24, 1885–1894.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Canan TÜRKOĞLU

Doğum Yeri ve Yılı : İzmir, 1991

Medeni Hali : Bekar

Yabancı Dili : İngilizce

E-posta : caananturkoglu@gmail.com

Eğitim Durumu

Lise : Mustafa Kemal Lisesi, 2009

Lisans : Manisa Celal Bayar Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, 2014