

**KIKIRDAK DOKU REJENERASYONUNDA
KİTOSAN DOKU İSKELESİ DESTEKLİ
BİYOREAKTÖR PERFORMANSININ İNCELENMESİ**

**INVESTIGATION OF CHITOSAN SCAFFOLD CONTAINING
BIOREACTOR PERFORMANCES FOR
CARTILAGE TISSUE REGENERATION**

RAHİME SEDA TIĞLI

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim – Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

KİMYA MÜHENDİSLİĞİ Anabilim Dalı İçin Öngördüğü

DOKTORA TEZİ

olarak hazırlanmıştır.

2009

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Bu çalışma jürimiz tarafından **KİMYA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI** 'nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Başkan

.....
Prof. Dr. Vasıf Hasırcı

Üye (Danışman)

.....
Prof. Dr. Menemşe Gümüşderelioğlu

Üye

.....
Prof. Dr. Tülin Kutsal

Üye

.....
Prof. Dr. Vural Evren

Üye

.....
Prof. Dr. Tülay Durusoy

ONAY

Bu tez/...../..... tarihinde Enstitü Yönetim Kurulunca kabul edilmiştir.

Prof.Dr. Erdem YAZGAN
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ

Sevgili babam Doç. Dr. Ragıp Tıǵlı'nın anısına...

KIKIRDAK DOKU REJENERASYONUNDA KITOSAN DOKU İSKELESİ DESTEKLİ BİYOREAKTÖR PERFORMANSININ İNCELENMESİ

Rahime Seda TIĞLI

ÖZ

Sunulan tez çalışmasında, kıkırdak doku rejenerasyonunu destekleyecek kitosan doku iskelelerinin üretimi ve biyoreaktörlerin kıkırdak doku oluşumu üzerindeki etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Üç boyutlu, gözenekli kitosan doku iskeleleri çeşitli biyosinyal molekülleri ile fonksiyonel hale getirilmiş, hücre kültür çalışmaları önce durgun ortamda ve ardından döner duvarlı biyoreaktörlerde gerçekleştirilmiştir. Farklı kaynaklardan temin edilen hücrelerin kıkırdak doku oluşturma potansiyelleri incelenmiş ve ardından perfüzyon biyoreaktörlerde hücre kültür çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Son olarak, döner duvarlı biyoreaktörlerde ortam koşulları hesaplamalı akışkanlar dinamiği yazılımlarından biri olan FLUENT ile simüle edilmiştir.

Tez kapsamında yapılan çalışmaların ilk aşamasında, farklı deasetilasyon derecelerine (DD) (%75-85 ve %85) ve bileşimlere (%2 ve %3 (w/v)) sahip gözenekli kitosan doku iskeleleri dondurarak-kurutma tekniğiyle hazırlanmış ve hücresel etkileşimleri *in vitro* koşullarda incelenmiştir. %85 DD'ne ve %2 bileşime sahip olan kitosan doku iskelelerinin ~100 µm gözenek boyutuna sahip ve içsel bağlantıları olduğu ve 0.917 N/mm² sıkıştırma elastik modül değerine sahip olduğu belirlenmiştir. L929 fare fibroblastik hücreler ile yapılan hücre kültür çalışmaları fibroblastik hücre yapışması ve üremesinin DD'den etkilendiğini ortaya koymuştur. %85 DD'ne sahip olan kitosan doku iskelelerinin hücre yapışmasını ve üremesini daha güçlü biçimde desteklediği saptanmıştır. Çalışmalar sonucunda, en yüksek özgül üreme hızına (0.017 sa⁻¹) ulaşılan %85 DD ve %2 bileşimdeki kitosan doku iskelesinin tezin geri kalan kısmında yapılacak çalışmalar için uygun doku iskelesi olduğu saptanmıştır.

Çalışmanın bir sonraki aşamasında, kitosan doku iskeleleri Arg-Gly-Asp (RGD) dizisi ve epidermal büyüme faktörü (EGF) ile kovalent immobilizasyonla; kemik morfogenetik protein-6 (BMP-6) ise emdirme yöntemiyle işlevsel hale getirilmiştir. FTIR, floresan mikroskop gözlemleri ve kantitatif ölçümler, biyosinyal moleküllerinin kitosan doku iskelelerine başarıyla immobilize edildiğini göstermiştir. ATDC5 fare kondrojenik hücreleri 28 gün süresince durgun koşullarda, kitosan doku iskeleleri üzerinde kültüre edilmiştir. RGD immobilize edilmiş kitosan iskelelerdeki hücrelerin 24 saat sonunda en yüksek özgül üreme hızlarına (0.049 sa⁻¹) sahip olduğu saptanmıştır. MTT analizi sonucunda EGF-kitosan doku iskelelerinde hücrelerin yüksek üreme eğilimlerine sahip oldukları belirlenmiştir. Bununla beraber, RGD ve EGF immobilize edilmiş kitosan doku iskelelerinde hücre fenotiplerinin korunamadığı belirlenmiştir. 4 haftalık durgun inkübasyon sonunda BMP-6 yüklü kitosan doku iskelelerinin yüksek glikozaminoglikan (GAG) (16.97 mg GAG/g kuru doku iskelesi) içeriğine sahip olduğu ve kollajen II içeriklerinin kitosan iskelelerle karşılaştırıldığında belirgin derecede yüksek olduğu belirlenmiştir (p=0.0003). BMP-6 yüklü kitosan doku iskelelerinde, hücrelerin farklılaşmasından sonra hücre morfolojilerinde gözlemlenen hipertrofiye karşın

kondrojenik fenotiplerin korunarak kondrogenezin desteklendiği saptanmıştır. Döner duvarlı bioreaktörlerde inkübe edilen BMP-6 yüklü kitosan doku iskelelerindeki yüksek GAG ve kollajen II miktarlarına bağımlı olarak erken kondrogenezin desteklendiği saptanmış ve ATDC5 hücrelerinin hipertrofik morfolojiden yoksun bir şekilde kondrojenik fenotiplerini korudukları sonucuna varılmıştır.

Tez çalışması kapsamında farklı kaynaklardan elde edilen insan kökenli hücrelerin kitosan doku iskeleleri üzerinde kıkırdak doku oluşturma potansiyelleri incelenmiştir. Çalışılan hücre kaynaklarından embriyonik kök hücrelerden türetilmiş mezenkimal kök hücrelerin (ED1 MSCs) yüksek agregan (AGC) ve kollajen II (Col II) ve düşük kollajen I (Col-I) transkripsiyon seviyeleri ile farklılaşma potansiyellerinin yüksek olduğu saptanmıştır. ED1 MSCs'in kullanıldığı hücre kültür çalışmalarında, dinamik koşulların incelenmesi amacıyla perfüzyon biyoreaktörler kullanılmıştır. Yapılan biyokimyasal testlerin sonucunda, perfüzyon biyoreaktörlerin iskelelerdeki GAG, Kollajen II, DNA içeriklerini arttırdığı saptanmış ve ek olarak perfüzyon biyoreaktörlerde kültüre edilen hücrelerinde tüm kıkırdak-bağımlı genlerin transkripsiyon seviyeleri yüksek bulunmuştur. Dinamik koşullarda kültüre edilen hücre-iskele yapılarının sıkıştırma elastik modüllerinin ise statik ortamda kültüre edilen hücre-iskele yapılarıyla karşılaştırıldığında ~2 kat daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

Hesaplamalı Akışkanlar Dinamiği (CFD) modeli kullanılarak döner duvarlı biyoreaktörlerde yapılan simülasyon çalışmalarında, doku iskelelerine etki eden kayma gerilimleri 0.276-0.755 dyne/cm² olarak hesaplanmıştır. Simülasyon çalışmaları sonucunda, döner duvarlı biyoreaktördeki oksijen kontuarlarının, sadece doku iskeleleri çevresinde değiştiği belirlenmiştir. Dolayısıyla, biyoreaktörün sürekli sistemde çalışmasının doku oluşumu açısından bir avantaj olduğu saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Kıkırdak doku mühendisliği, kitosan, RGD, EGF, BMP-6, döner duvarlı biyoreaktör, perfüzyon biyoreaktör, FLUENT, CFD.

Danışman: Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU, Hacettepe Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Bölümü.

INVESTIGATION OF CHITOSAN SCAFFOLD CONTAINING BIOREACTOR PERFORMANCES FOR CARTILAGE TISSUE REGENERATION

Rahime Seda TIĞLI

ABSTRACT

The aim of the present study was to fabricate chitosan scaffolds to support cartilage tissue regeneration and to investigate the effects of bioreactors on cartilage tissue formation. Three dimensional and porous chitosan scaffolds were functionalized by three biosignal molecules i.e. Arg-Gly-Asp (RGD), epidermal growth factor (EGF) or bone morphogenetic protein-6 (BMP-6). The cell culture studies were performed under static conditions and then in rotating wall bioreactors. The cartilage tissue formation potential of cells, which were obtained from several sources, was investigated and then cell culture studies were performed in perfusion bioreactors. In the last part of the study, the environmental conditions of rotating wall bioreactors were simulated by computational fluid dynamics software, FLUENT.

In the first part of the study, chitosan scaffolds, having different deacetylation degrees (DD) (75-85% and 85%) and compositions (2% and 3% w/v), were prepared by freeze-drying technique and *in vitro* cellular interactions were investigated. 85% deacetylated chitosan scaffolds in 2% (w/v) composition were found to be having ~100 μm pores with interconnected structure and having 0.917 N/mm² elastic modulus. Cell culture studies, performed by L929 fibroblasts, resulted that DD strongly affected cell attachment and growth. Results concluded that chitosan scaffolds (85% DD and 2% composition) in which the highest specific growth rate (0.017h⁻¹) was reached, were selected as the most appropriate scaffold for the rest of the study.

In the next part of the study, chitosan scaffolds were functionalized with fibronectin sequence of RGD or EGF by covalent immobilization technique; with BMP-6 by embedding method. The results obtained from FTIR, fluorescence microscope observations and quantitative analysis showed that biosignal molecules were successfully immobilized to the chitosan scaffolds. ATDC5 murine chondrogenic cells were cultured in chitosan scaffolds for 28 days under static conditions. Cells cultured in RGD immobilized chitosan scaffolds showed the highest specific growth rate (0.049 h⁻¹) after 24 h of incubation. According to the results of MTT analysis, considerable increase in cell proliferation was only detected in EGF-chitosan scaffolds. However, cells could not preserve their phenotypes in RGD and/or EGF immobilized chitosan scaffolds. After 4 weeks of incubation period, BMP-6 loaded chitosan scaffolds showed high glycosaminoglycan (GAG) contents(16.97 mg GAG/g dry scaffold). In addition, collagen II contents were found to be considerably higher (p=0.0003) than that of chitosan scaffolds. Results showed that BMP-6 loaded chitosan scaffolds supported chondrogenesis. However, the results obtained from morphological observations suggested hypertrophic differentiation of ATDC5 cells in the presence of BMP-6 under stationary conditions. The influence of mechanical stimulation appeared significantly with differentiated cells, cultured in rotating wall bioreactors, showing

the effect of retaining their phenotypes without hypertrophy. Regarding to biochemical analysis of engineered constructs for GAG, collagen II and DNA assays, the results emphasize that dynamic culture conditions strongly supported early chondrogenesis.

In the next part of this study, cellular responses of human cells obtained from different sources were assessed for chondrogenic potential in 3D culture. Embryonic stem cells derived from MSCs (ED1 MSCs) showed unique characteristics with preserved chondrogenic phenotype in chitosan scaffolds with regard to chondrogenesis, as determined by having high aggrecan (AGC) and collagen II (Col II) but low collagen I (Col I) transcription levels. In order to investigate dynamic conditions in cell culture studies, ED1 MSCs in chitosan scaffolds were cultured in perfusion bioreactors. According to the biochemical analysis, GAG, DNA and collagen II contents of scaffolds were found to be increased in perfusion bioreactors. Moreover, all cartilage-related genes in cells showed higher transcription levels in perfusion bioreactors than in cells cultured under static conditions. Elastic modulus of cell-scaffold constructs cultured in perfusion bioreactors increased ~2 fold.

According to simulation studies, which were performed by computational fluid dynamics (CFD) model in rotating wall bioreactors, the shear stress values on chitosan scaffolds were calculated as in the range of 0.276-0.755 dyne/cm². Results showed that oxygen contours in rotating wall bioreactors were only changed around the scaffolds. Therefore, it was concluded that using continuous system operating conditions in rotating wall bioreactors have been crucial advantages with regard to tissue formation.

Key words: Cartilage tissue engineering, chitosan, RGD, EGF, BMP-6, rotating wall bioreactor, perfusion bioreactor, FLUENT, CFD.

Advisor: Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU, Hacettepe University, Chemical Engineering Department.

TEŞEKKÜR

Bilgi ve tecrübeleriyle çalışmalarımın yönlendirilmesi ve yürütülmesi konusunda beni sonsuz destekleyen, iş disiplininin bilimsel etiğe kadar gerçek bir bilim insanı kimliğini kazandıran ve hayatım boyunca örnek almaya devam edeceğim çok değerli hocam Prof. Dr. Menemşe Gümüşderelioğlu'na sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam boyunca 105M097 no'lu Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Projesi kapsamında maddi destek sağlayan TÜBİTAK'a ve Yurtdışı Araştırma Burs Programı çerçevesinde maddi destek sağlayan TÜBİTAK Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı'na teşekkürlerimi sunarım.

Deneyisel çalışmalarımın bir bölümünün yürütülmesinde büyük emeği olan Tufts Üniversitesi Biyomedikal Mühendisliği (Boston, ABD) bölüm başkanı Prof. Dr. David L. Kaplan ve tüm çalışma ekibine ve çalışmalarına maddi destek sağlayan NIH P41 pojesi kapsamında destek alan "Tissue Engineering Resource Center" kuruluşuna teşekkürlerimi sunarım.

Tez izleme komitemde yer alan değerli hocalarım Prof. Dr. Tülin Kutsal ve Prof. Dr. Vural Evren'e teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamda kullandığım FLUENT yazılımları ile yapılan simülasyonlarda deneyim ve birikimlerini esirgemeyen Arş. Gör. Mahmut Cinbiz'e teşekkürlerimi sunarım.

Sevgilerini ve desteklerini esirgemeyen çok sevgili çalışma arkadaşlarım Dr. Ayşe Karakeçili, Tolga Demirtaş, Arş. Gör. Işıl Beşkardeş, Anıl Sera Kahraman ve Arş. Gör. Soner Çakmak'a, beni hiç yalnız bırakmayan canım dostum Dr. Berna Saraçoğlu'na ve hayat parçam Arş. Gör. N. Özgür Aydın'a çok teşekkür ederim.

Tüm hayatım boyunca evlatları olmaktan gurur ve onur duyacağım ve varlıklarını hep kalbimde hissettiğim eşsiz babam ve anneme, biricik kardeşim Melike Tıǧlı'ya, attığım her adımda bana güvenen ve desteklerini hiç esirgemeyen başta Hümeysra Çelik ve Hüseyin Tıǧlı olmak üzere kocaman canım aileme en içten teşekkürlerimi sunarım.

ÖZ.....	i
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xx
1. GİRİŞ ve ÇALIŞMANIN AMACI.....	1
2. TEMEL BİLGİLER.....	5
2.1. Kıkırdak Doku Mühendisliği.....	5
2.1.1. Kıkırdak dokusunun yapısı ve türleri.....	6
2.1.1.1. Hiyalin kıkırdak.....	10
2.1.1.2. Elastik kıkırdak.....	13
2.1.1.3. Fibröz kıkırdak (Fibro kıkırdak).....	14
2.1.2. Kıkırdak doku oluşumu ve gelişimi.....	14
2.1.3. Kıkırdak doku onarımı ve rejenerasyonuna yönelik doku mühendisliği yaklaşımları.....	16
2.1.3.1. Kondrosit transplantasyonu (Autologous chondrocyte implantation: ACI).....	18
2.1.3.2. Hücre-doku iskelesi-biyosinyal molekülü modeliyle kıkırdak doku mühendisliği yaklaşımları.....	21
2.1.3.3. Gen terapi.....	22
2.2. Kıkırdak Doku Mühendisliğinde Kullanılan Hücre Kaynakları, Biyosinyal Moleküller ve Doku İskeleleri.....	22
2.2.1. Kaynaklarına göre hücreler.....	22
2.2.1.1. Kondrositler.....	23
2.2.1.2. Embriyonik kök hücreler.....	24
2.2.1.3. Mezenkimal kök hücreler.....	25
2.2.4.1. ATDC5 kondrojenik hücre hattı (fare embriyonel karsinoma hücre hattı).....	26
2.2.2. Kıkırdak doku mühendisliğinde kullanılan biyosinyal	

moleküller.....	26
2.2.2.1. Arjinin-Glisin-Aspartik asit (Arg-Gly-Asp, RGD).....	28
2.2.2.2. Epidermal büyüme faktörü (EGF).....	29
2.2.2.3. Kemik morfogenetik protein-6 (BMP-6).....	30
2.2.3. Kıkırdak doku mühendisliğinde kullanılan dokuiiskeleleri.....	31
2.2.3.1. Doku iskelesi fabrikasyon yöntemleri.....	33
2.2.3.2. Doku iskelesi üretiminde kullanılan biyomalzemeler	34
2.3. Kitosan ve Kitosan-Temelli Doku İskeleleri.....	36
2.3.1. Kitosan ve özellikleri.....	36
2.3.2. Kitosan-temelli doku iskelesi fabrikasyonu.....	39
2.3.3. Doku mühendisliği uygulamalarında kitosan doku iskeleleri..	41
2.3.4. Kıkırdak doku mühendisliği için kitosan doku iskeleleri.....	44
2.4. Biyoreaktörler.....	46
2.4.1. Tanım ve işlevler.....	46
2.4.2. Biyoreaktör türleri ve işletim koşulları.....	49
2.4.2.1. Hücre kültür kapları.....	51
2.4.2.2. Karıştırmalı kaplar.....	51
2.4.2.3. Perfüzyon biyoreaktörler.....	52
2.4.2.4. Döner duvarlı biyoreaktörler.....	54
2.4.3. Kıkırdak doku mühendisliğinde kullanılan biyoreaktörler.....	58
2.4.4. Simülasyon çalışmaları.....	61
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	63
3.1. Kitosan-Temelli Doku İskelelerinin Hazırlanması.....	63
3.1.1. Kitosan doku iskelelerinin karakterizasyonu.....	64
3.1.1.1. Gözenek boyut dağılımı.....	64
3.1.1.2. Taramalı elektron mikroskop (SEM) ile analiz.....	64
3.1.1.3. Şişme çalışmaları.....	64
3.1.1.4. Kitosan iskelelerin mekanik dayanım testleri.....	64
3.1.1.5. Biyobozunurluk testleri.....	65
3.1.2. Hücre-doku iskelesi etkileşiminin belirlenmesi.....	65
3.1.2.1. Kitosan iskelelere hücre ekimi.....	66
3.1.2.2. Hücre yapışma deneyleri.....	66
3.1.2.3. Hücre üreme kinetiği ve fibroblastik çoğalma.....	66
3.1.2.4. İskele içerisindeki hücrelerin mikroskopik olarak	

görüntülenmesi.....	67
3.2. Kitosan Doku İskelelerinin Biyomodifikasyonu.....	68
3.2.1. Kitosan doku iskelelerine RGD ve EGF immobilizasyonu.....	68
3.2.2. RGD ve EGF ile immobilize edilen doku iskelelerinin karakterizasyonu.....	68
3.2.2.1. FTIR spektroskopisi.....	68
3.2.2.2. RGD immobilizasyonunun floresan mikroskop ile doğrulanması.....	68
3.2.2.3. EGF immobilize edilen kitosan doku iskelelerinin immünolojik-boyanması.....	69
3.2.2.4. RGD ve EGF immobilize edilen kitosan doku iskelelerinin kantitatif analizi.....	69
3.2.3. Kitosan doku iskelelerine BMP-6 yüklenmesi.....	71
3.2.3.1. Kitosan doku iskelelerindeki BMP-6'nın görüntülenmesi.....	71
3.3. ATDC5 Kondrojenik Hücre Hattı ile Doku Mühendisliği Çalışmaları....	72
3.3.1. Durgun koşullardaki çalışmalar.....	72
3.3.2. Dinamik koşullardaki çalışmalar.....	73
3.3.3. Hücre üremesi ve mitokondriyal aktivite analizi (MTT yöntemi).....	74
3.3.4. İmmüno-floresan boyama ve mikroskopik analiz.....	75
3.3.5. Biyokimyasal analiz.....	75
3.4. Farklı Kaynaklardan Sağlanan Hücrelerle Durgun Ortam Koşullarında Yapılan Çalışmalar.....	76
3.4.1. Floresan aktive edilmiş hücre ayırma (Fluorescence Activated Cell Sorting, FACS) analizi.....	79
3.4.2. Hücre metabolik aktivite tayini (MTT analizi) ve hücre proliferasyonu.....	79
3.4.3. Polimerik zincir analizi (PCR), RNA ekstraksiyonu, cDNA sentezi.....	79
3.4.4. Histoloji ve SEM.....	81
3.5. Perfüzyon Biyoreaktördeki Mezenkimal Kök Hücreler (ED1 MSC) ile Yapılan Çalışmalar	82
3.5.1. Perfüzyon biyoreaktörü.....	82

3.5.2. Metabolik aktivite ve biyokimyasal analizler.....	83
3.5.3. PCR analizleri.....	83
3.5.4. Mekanik dayanım testi.....	83
3.6. İstatistiksel Analiz.....	84
3.7. Döner Duvarlı Biyoreaktörlerde Simülasyon Çalışmaları.....	84
3.7.1. Yöntem.....	84
3.7.2. Simülasyon koşulları.....	86
3.7.3. Hız alanları ve kayma gerilimi profilleri için yapılan hesaplamalar.....	86
3.7.4. Oksijen profilleri için yapılan hesaplamalar.....	88
4. DENEYSEL SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	89
4.1. Gözenekli Kitosan Doku İskelelerinin Hazırlanması ve Karakterizasyonu.....	89
4.1.1. Kitosan doku iskelelerinin hazırlanması.....	90
4.1.2. Gözenek boyutu dağılımı ve gözeneklilik.....	94
4.1.3. Şişme özellikleri.....	95
4.1.4. Mekanik dayanım.....	96
4.1.5. Biyobozunurluk.....	98
4.1.6. Hücre-doku iskelesi etkileşimleri.....	98
4.1.6.1. Deasetilasyon derecesinin hücre yapışması üzerine etkisi.....	99
4.1.6.2. Hücre üreme kinetiği ve fibroblastik çoğalma.....	100
4.1.6.3. Kitosan iskelelerdeki hücrelerin floresan görüntülemesi ve morfoloji takibi.....	101
4.2. Kitosan Doku İskelelerinin RGD veya EGF ile İmmobilizasyonu ve Kondrojenik Aktivitelerinin Belirlenmesi.....	103
4.2.1. Kitosan doku iskelelerine RGD veya EGF immobilizasyonu.....	103
4.2.1.1. FTIR analizi.....	105
4.2.1.2. RGD veya EGF immobilize edilmiş kitosan doku iskelelerinin kalitatif analizi.....	106
4.2.1.3. RGD veya EGF immobilize edilmiş kitosan doku iskelelerinin kantitatif analizi.....	108
4.2.2. RGD veya EGF immobilize edilmiş kitosan doku iskelelerinin	

kondrojenik aktivitelerinin belirlenmesi.....	109
4.2.2.1. Kondrojenik hücre yapışması ve üremesi.....	110
4.2.2.2. Hücre canlılığı ve hücre iskelet organizasyonu için floresan görüntüleme.....	113
4.2.2.3. Biyokimyasal analizlerle kondrojenik aktivite tayini.....	115
4.3. BMP-6 Yüklü Kitosan Doku İskelelerinin ATDC5 Kondrojenik Hücre Hattı ile Durgun ve Dinamik Koşullardaki Hücre Kültür Çalışmaları.....	117
4.3.1. BMP-6 yüklü kitosan doku iskelelerinin hazırlanması.....	117
4.3.2. BMP-6 yüklü kitosan doku iskeleleri ile durgun koşullarda ATDC5 kondrojenik hücre hattı ile yürütülen hücre kültür çalışmaları.....	119
4.3.3. BMP-6 yüklü kitosan doku iskeleleri ile dinamik koşullarda hücre kültür çalışmaları.....	124
4.4. Kitosan Doku İskelelerinde İnsan Kökenli Hücrelerin Kıkırdak Doku Oluşumuna Etkisi.....	130
4.4.1. FACS analizi ile hücrelerin karakterizasyonu.....	130
4.4.2. Kitosan doku iskelelerinde hücre metabolik atkivitelerinin incelenmesi.....	132
4.4.3. Kitosan doku iskelelerinde hücre farklılaşmasının incelenmesi.....	133
4.5. Kıkırdak Doku Oluşumunda Perfüzyon Biyoreaktörlerin Etkisi.....	137
4.5.1. Biyokimyasal ve fonksiyonel karakterizasyon.....	138
4.5.2. Kitosan doku iskelelerinde kültüre edilen hücrelerin farklılaşma potansiyelleri.....	141
4.6. Biyorektörlerde Simülasyon Çalışmaları.....	143
4.6.1. Kitosan doku iskelesi içermeyen biyoreaktörlerde modelleme.....	143
4.6.2. Doku iskeleleri varlığında biyoreaktör konfigürasyonu.....	145
4.6.3. Döner duvarlı biyoreaktörler içerisindeki kitosan doku iskelelerine etkiyen hız alanları ve kayma gerilim profilleri...	147
4.6.4. Döner duvarlı biyoreaktörlerdeki oksijen profilleri.....	152
5. GENEL SONUÇLAR.....	155

KAYNAKLAR DİZİNİ.....	161
EKLER.....	178
ÖZGEÇMİŞ.....	184

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1.	Kıkırdak matrisinde moleküler organizasyon.....	7
Şekil 2.2.	Kıkırdak doku (a) histolojik kesit görüntüsü (hemotoksilen-eozin boyaması). Hücreler lakünler içerisinde yer almaktadır. Perikondrium şeklin üst ve alt kısmında pembe ile boyanmış kısımda gösterilmiştir. (b) Kondrosit elektron mikroskop görüntüsü.....	8
Şekil 2.3.	Kıkırdak doku tiplerinin şematik gösterimi (a) hiyalin kıkırdak, (b) elastik kıkırdak, (c) fibro kıkırdak.....	9
Şekil 2.4.	Hiyalin kıkırdak yapısı (a) histolojik kesit görüntüsü, (b) şematik gösterimi.....	12
Şekil 2.5.	Elastik kıkırdak (a) histolojik kesit, (b) şematik gösterimi.....	13
Şekil 2.6.	Fibro kıkırdak (a) histolojik kesit görüntüsü, (b) elektron mikroskop görüntüsü.....	14
Şekil 2.7.	Kıkırdak histogenezi. (a) Mezenkimal hücreler, (b) Farklılaşma aşamasında mezenkimal hücrelerin hızla çoğalıp yuvarlaklaşması, (c) Yoğun matris sentezi sonucu kondroblastların merkezden çevreye doğru birbirlerinden uzaklaşması ve kondrosit hücrelerini oluşturmaları, (d) kıkırdak hücrelerin çoğalması ile oluşan izojenik grup kümeleri ve grupları çevreleyen teritoryal (kapsül) matris.....	15
Şekil 2.8.	Artikular kıkırdak doku hasarlarının dereceli olarak gösterimi.....	17
Şekil 2.9.	Birinci jenerasyon ACI: (a) Şematik gösterim; (b) Klinik uygulamadan görünüm.....	19
Şekil 2.10.	İkinci jenerasyon ACI'nın şematik gösterimi (a) ve klinik uygulamalardan görünüm (b). Hasarlı bölge kollajen membranla dikildikten sonra hücre süspansiyonu enjekte edilir.....	19
Şekil 2.11.	Üçüncü jenerasyon ACI'nın şematik gösterimi (a) ve klinik uygulama görüntüleri. Kollajen membran MACI™ (b), hiyaluran polimer Hyalogryft C™ (c) ve kollagen jel CaReS™ (d).....	20
Şekil 2.12.	Kıkırdak doku mühendisliği yaklaşımlarının şematik gösterimi.....	21
Şekil 2.13.	Çoklu farklılaşma kapasitesine sahip olan mezenkimal kök hücrelerin farklı doku hücrelerine dönüşmesi.....	25
Şekil 2.14.	RGD peptid sekansının moleküler formülü ve isimlendirmesi.....	28
Şekil 2.15.	EGF molekülünün amino asit dizilimi.....	30

Şekil 2.16. Kıkırdak doku mühendisliğinde kullanılan değişik yapılardaki doku iskeleleri (a) hidrojel, (b) sünger yapı, (c) fiber ağ yapı.....	32
Şekil 2.17. Kitin ve kitosanın kimyasal yapıları.....	37
Şekil 2.18. Kitosan doku iskelesi fabrikasyon yöntemleri şematik gösterimi (a), hızlı prototipleme yöntemiyle elde edilmiş kitosan jel iskele ve elektron mikroskop görüntüsü (b), dondurarak kurutma yöntemiyle üretilmiş kitosan doku iskelesi elektron mikroskop görüntüsü (c), elektron eğirme yöntemiyle hazırlanmış nanofiber kitosan doku iskelesi elektron mikroskop görüntüsü (d).....	40
Şekil 2.19. Üç boyutlu doku iskelesinde kütle aktarımı.....	47
Şekil 2.20. Doku mühendisliğinde kullanılan hücre kültür sistemlerinin şematik gösterimi.....	50
Şekil 2.21. Doku mühendisliğinde kullanılan karıştırmalı kapların şematik gösterimi ve doku iskeleleri etrafındaki akış profilleri.....	52
Şekil 2.22. Doku mühendisliğinde kullanılan perfüzyon biyoreaktörlerin şematik gösterimi ve doku iskeleleri etrafındaki akış profilleri.....	53
Şekil 2.23. Döner duvarlı biyoreaktörler ve doku iskelesine etki eden kuvvetlerin şematik gösterimi: F_d , hücre kültür ortamının akarken doku iskelesine uyguladığı sürüklenme kuvveti; F_L , hücre kültür ortamının doku iskelesine uyguladığı kaldırma kuvveti; F_c , santrifugal kuvvet; F_g , gravitasyonel kuvvet; W , doku iskelesinin ağırlığı; ω , açısal hız; $\sum F_c + F_d + F_g = 0$ serbest düşme hali.....	55
Şekil 2.24. Döner duvarlı biyoreaktörler: (a) STLV sisteminde kullanılan kaplar ve geometrileri; (b) HARV sisteminde kullanılan kaplar ve geometrileri.....	57
Şekil 2.25. Döner duvarlı perfüzyon biyoreaktörleri (Synthecon Inc.).....	57
Şekil 3.1. EGF'e ait uyarılma ve ışıma dalga boylarını gösteren floresan spektrumu.....	70
Şekil 3.2. Sürekli sistem döner duvarlı biyoreaktör. (a) Silindirik biyoreaktör kabı, (b) oksijenatör, (c) peristaltik pompa.....	73
Şekil 3.3. PCR analizinde termal profil ve amplifikasyon eğrisi.....	80
Şekil 3.4. Dinamik kültür sistemi: (A) sürekli sistem perfüzyon biyoreaktörü; (a) biyoreaktör kabı, (b) havalandırma için membran filtresi (0.2 μ m, Millipore), c) pompa. (B) Biyoreaktör sisteminin şematik gösterimi.....	82

Şekil 3.5. Biyoreaktör ve doku iskelesi için GAMBİT'te hazırlanan örgü yapısı.....	85
Şekil 3.6. Biyoreaktörün dış duvarına (a) ve iç duvarına (b) ait örgü yapısı.....	85
Şekil 4.1. Kitosan iskelelerin genel görüntüsü. (a) Liyofilize edilmiş doku iskeleleri; (A) % 75-85 deasetilasyon derecesine (DD) sahip, %2 (w/v), (B) %75-85 DD, % 3 (w/v), (C) %85 DD, % 2 (w/v), (D) %85 DD, % 3 (w/v). (b) Stabilize edilmiş kitosan iskeleler; kuru halde (sol tarafta), ıslak halde (sağ tarafta). Boyutlar "cm" olarak verilmiştir.....	91
Şekil 4.2. Kitosan iskelelerin farklı büyütmelerde çekilmiş kesit SEM görüntüleri. %2 Kitosan (%75-85 DD); (a) x125 (b) x250, %3 Kitosan (%75-85 DD); (c) x125 (d) x250, %2 Kitosan (>%85 DD); (e) x125 (f) x250, %3 Kitosan (>%85 DD); (g) 125 (h) x250.....	93
Şekil 4.3. Farklı deasetilasyon derecelerindeki %2 (w/v) kitosan iskelelerin gözenek boyut dağılımları.....	94
Şekil 4.4. Kitosan doku iskelelerinin gerilim-gerinim eğrileri; (a) %2 Kitosan (%75-85 DD), (b) %3 Kitosan (%75-85 DD), (c) %2 Kitosan (>%85 DD), (d) %3 Kitosan (>%85 DD).....	97
Şekil 4.5. Kitosan iskelelerdeki L929 fare fibroblastlarının hücre üreme davranışları.....	100
Şekil 4.6. >85% DD'ne ve % 2 (w/v) bileşime sahip kitosan iskeleler üzerinde üreyen L929 hücrelerin floresan mikroskop görüntüleri: a) kültürün 2. günü; b) 4. günü (x20).....	101
Şekil 4.7. >%85 DD'ne ve %2 (w/v) bileşime sahip kitosan iskelelerde L929 hücrelerin CLSM görüntüleri: Kültürün (a) 2. günü, (b) 4. günü.....	102
Şekil 4.8. >%85 DD'ne ve %2 (w/v) bileşime sahip kitosan iskelelerde L929 hücrelerin kültürün 4. günündeki SEM görüntüsü.....	102
Şekil 4.9. Kitosan doku iskelelerine RGD ve EGF immobilizasyonunun şematik gösterimi.....	104
Şekil 4.10. Kitosan, RGD-kitosan ve EGF-kitosan doku iskelelerine ait FTIR spektrumları.....	105
Şekil 4.11. Kitosan doku iskelelerine RGD yerine floresanamin immobilizasyonunun mekanizması.....	106
Şekil 4.12. Floresanamin ile işaretlenmiş kitosan doku iskelelerine ait floresan	

- mikroskop fotoğrafları (a) Parlayan alanlar floresanamin ile immobilize edilmiş kitosan iskelelerini göstermekte ve muhtemel RGD bağlanma bölgelerini işaret etmektedir (x10). (b) Karanlık alanlar floresanamin işaretli RGD-kitosan doku iskelesinde RGD immobilize edilmiş bölgeleri göstermektedir (x10).....107
- Şekil 4.13. EGF immobilize edilmiş kitosan doku iskelelerinin immüno-boyama sonrası floresan mikroskop görüntüleri (a) x20 (b) x40. Parlayan alanlar floresan işaretli EGF'yi işaret etmektedir.....107
- Şekil 4.14. ATDC5 hücrelerinin MTT analizi ile elde edilen kitosan, RGD-kitosan ve EGF-kitosan doku iskelelerindeki üreme davranışları [İstatistiksel önem farklılığı, n=3, * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 kitosan kontrol gurubudur, • p<0.05, •• p<0.01, ••• p<0.001 RGD-kitosan kontrol gurubudur].....111
- Şekil 4.15. Kitosan (a,b), RGD-kitosan (c, d) ve EGF-kitosan (e, f) doku iskelelerinin durgun kültürdeki 7 günlük inkübasyon süresi sonundaki CLSM görüntüleri. CLSM görüntülerinden a, c ve e doku iskelesinin morfolojisini de gösteren arka plan görüntüsünü içermektedir. Yeşil ve kırmızı alanlar ATDC5 hücrelerinin, sırasıyla, F-aktin filamentlerini ve DNA'sını göstermektedir.....114
- Şekil 4.16. Liyofilize edilmiş kitosan doku iskelesinin kesitine ait SEM görüntüsü (a) (x250), FITC işaretli BMP-6 ile modifiye edilmiş kitosan doku iskelesinin floresan mikroskop görüntüleri (b) (x10), (c) (x40). Işıma yapan alanlar, BMP-6 yüklü alanları göstermektedir.....118
- Şekil 4.17. Kitosan ve BMP-6 yüklü kitosan doku iskelelerindeki ATDC5 hücrelerinin mitokondriyal aktiviteleri [İstatistiksel önem farklılığı, n=3, * p<0.05, kitosan kontrol gurubudur].....120
- Şekil 4.18. Durgun koşullarda kültüre edilmiş kitosan (a) ve BMP-6 yüklü kitosan (b) doku iskelelerinin 7 günlük inkübasyon sonundaki CLSM fotoğrafları (x20). Yeşil ve kırmızı alanlar ATDC5 hücrelerinin, sırasıyla, F-aktin filamentlerini ve DNA'sını göstermektedir.....121
- Şekil 4.19. Durgun koşullarda kültüre edilmiş kitosan doku iskelelerine ait SEM görüntüleri (a) x2.50 K, (b) x5.00 K; BMP-6 yüklü kitosan doku iskeleleri (c) x2.50 K, (d) x5.00 K.....122
- Şekil 4.20. BMP-6 yüklü kitosan doku iskelelerindeki ATDC5 hücrelerinin sürekli akış perfüzyon sistemi (RCMW™) içinde inkübasyonu: (a) 24 gözlü Petri kaplarında yürütülen 5 günlük durgun kültür. (b, c) Dinamik kültürasyon sistemi; (1) Döner duvarlı biyoreaktörde 4 hafta süresince inkübe edilen BMP-6 yüklü doku iskeleleri, (2) İç silindirin etrafını çeviren silikon membran (3) Döner duvarlı kap, (4) Oksijenatör, (5) Peristaltik pompa.....125

- Şekil 4.21. Dinamik koşullarda, BMP-6 ile modifiye edilmiş kitosan doku iskeleleri üzerinde ATDC5 hücrelerinin üreme eğilimlerini gösteren MTT sonuçları.....126
- Şekil 4.22. Dinamik koşullarda kültüre edilmiş BMP-6 yüklü kitosan doku iskelelerinin 4 haftalık inkübasyon süresi sonrası CLSM görüntüleri (a, b) (x20) ve (c) (x40). (a) görüntüsünde doku iskelesi morfolojisinin fark edilebildiği arka plan görüntüsü de yer almaktadır. Yeşil ve kırmızı alanlar, sırasıyla, F-aktin filamentlerini ve ATDC5 hücrelerinin DNA'sını göstermektedir.....127
- Şekil 4.23. Dinamik koşullarda 4 hafta kültüre edilmiş BMP-6 yüklü kitosan doku iskelelerinin SEM görüntüleri (a) x2.50K, (b) x5.00K.....128
- Şekil 4.24. CD105-APC, CD90-APC, CD73-PE ve CD49a-PE yüzey işaretleyicileri ile FACS analizi histogramları. (a) Kondrositler, (b) ASCs, (c) ED1 MSCs, (d) ED2 MSCs, (e) BMSCs, (Ff) ESCs. Kırmızı ve yeşil histogramlar sırasıyla kontrol ve yüzey IgG işaretleyicilerdir. Histogramlarda piklerin üzerindeki barlar yüzey işaretleyicilerin pozitif ekspresyonlarının bir göstergesidir.....131
- Şekil 4.25. Kitosan doku iskelelerinde üreyen hücrelerin MTT analizi sonucunda elde edilen hücre canlılık ve mitokondriyal aktivite değerleri. Hücre kaynakları arasında istatistiksel olarak önemli farklar bulunmuştur (kondrositler kontrol grubudur), $n=3$, * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$).....133
- Şekil 4.26. Kitosan doku iskelelerinde PCR analizi ile hücrelerin logaritmik-kat transkripsiyon seviyeleri. AGC(agregan), Col I (Kollajen tip I), Col II (Kollajen tip II), Col X (Kollajen tip 10). Tüm örnekler 4. hafta sonunda analiz edilmiş ve sonuçlar 18S'e göre normalize edilmiştir. Hücre türleri arasında istatistiksel olarak önemli farklar bulunmuştur (kondrositler kontrol grubudur, * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$). N/D (non-detectable), tespit edilememiş transkripsiyon seviyelerini göstermektedir.....134
- Şekil 4.27. Kitosan doku iskelelerinde kültüre edilen hücrelerin histolojik kesit görüntüleri; (a) kondrosit (x32), (b) ED1 MSCs (x32), (c) ED2 MSCs (x32) (X) Safranin-O ile boyanmış doğal kıkırdak dokunun histolojik kesit görüntüsü kontrol olarak kullanılmıştır (bar 200 μm , x10). Skala barları 100 μm 'dir. Belirtilen beyaz ok iskele kenarlarını işaret etmektedir.....135
- Şekil 4.28. Kitosan doku iskelelerinde 4 hafta boyunca kültüre edilen (a) kondrositler, (b) ED1 MSCs, (c) D2 MSCs, (d) ASCs, (e) BMSCs, (f) ESc'in SEM görüntüleri.....136
- Şekil 4.29. Kitosan doku iskelelerinde statik ve dinamik koşullarda kültüre edilen

ED1 MSCs'in 4. hafta sonundaki metabolik aktiviteleri. [İstatistiksel önem farklılığı, n=3, * p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001, durgun ortam kontrol gurubudur].....	138
Şekil 4.30. Dördüncü hafta sonunda dinamik ve statik koşullarda inkübe edilen kitosan doku iskelelerinin biyokimyasal bileşimleri. [İstatistiksel önem farklılığı, n=3, * p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001, statik ortam kontrol gurubudur].....	139
Şekil 4.31. Dinamik ve statik koşullarda inkübe edilen kitosan doku iskelelerinin 4. hafta sonundaki mekanik dayanım özellikleri. Kontrol grubu hücresiz kitosan doku iskelesini ifade etmektedir.....	141
Şekil 4.32. Statik ve dinamik koşullarda kültüre edilen kitosan doku iskelelerinde PCR analizi ile hücrelerin logaritmik-kat transkripsiyon seviyeleri. AGC(agregan), Col I (Kollajen tip I), Col II (Kollajen tip II), Col X (Kollajen tip 10). Tüm örnekler 4. hafta sonunda analiz edilmiş ve sonuçlar 18S'e göre normalize edilmiştir. Hücre kaynakları arasındaki istatistiksel olarak önemli farklar bulunmuştur (statik kültür kontrol grubudur, * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001).	142
Şekil 4.33. Doku iskelesi bulunmayan biyoreaktörde farklı dönüş hızlarında hız alanları: (a) 33 rpm; (b) 35 rpm; (c) 37 rpm; (d) 38 rpm. Skala: (m/s).....	144
Şekil 4.34. Biyoreaktördeki hız değerlerinin, iç silindirden olan uzaklıkla ve dönüş hızı ile değişimleri (sanal düzlemden yararlanılarak elde edilmiştir).....	144
Şekil 4.35. Doku iskelesi bulunmayan biyoreaktörde farklı dönüş hızlarında kayma gerilim profilleri: (a) 33 rpm; (b) 35 rpm; (c) 37 rpm; (d) 38 rpm. Skala: (dyne/cm ²).....	145
Şekil 4.36. Doku iskelelerinin döner duvarlı perfüzyon biyoreaktörü içindeki yerleşim şeması: her birinde 3 adet doku iskelesi bulunan, aralarında 90° olan, 4 adet sıra görülmektedir. Doku iskeleleri, iç ve dış silindirlere eş uzaklıkta bulunmaktadır (6.15 mm).....	146
Şekil 4.37. Biyoreaktöre ait geometrik model ve doku iskelelerinin 1/4'lük simetri içindeki yerleşimi.....	147
Şekil 4.38. Doku iskeleleri içeren biyoreaktörde, yatışkın durum çözümü ile elde edilen hız alanları: (a) 33 rpm; (b) 35 rpm; (c) 37 rpm; (d) 38 rpm. ¼ biyoreaktör kesitinden alınan hız alan kontürleri gösterilmiştir. Skala: (m/s).....	148
Şekil 4.39. Doku iskeleleri içeren biyoreaktörde, yatışkın olmayan durum çözümü ile elde edilen hız alanları: (a) 33 rpm; (b) 35 rpm; (c) 37 rpm; (d) 38 rpm. ¼ biyoreaktör kesitinden alınan hız alan kontürleri gösterilmiştir. Skala: (m/s).....	149

- Şekil 4.40. Yatışkın olmayan durum için, 35 rpm'de doku iskelelerinin çevresindeki hız vektörleri. Skala: (m/s).....151
- Şekil 4.41. Yatışkın olmayan durum için, 35 rpm'de doku iskelelerine etkiyen kayma gerilimleri. Skala: (dyne/cm²).....151
- Şekil 4.42. Yatışkın olmayan durum için, oksijen başlangıç konsantrasyonunun sıfır olduğu durumda biyoreaktör içerisindeki oksijen profilleri. Ok ile gösterilen kısım örnek bir doku iskelesindeki oksijen profilini işaret etmektedir. Skala, oksijen fraksiyonunu göstermektedir.....152
- Şekil 4.43. Yatışkın olmayan durum için, oksijen başlangıç konsantrasyonu 0.2 (fraksiyon) olduğu durumda biyoreaktör içerisindeki oksijen profilleri. Ok ile gösterilen kısım örnek bir doku iskelesindeki oksijen profilini işaret etmektedir. Skala, oksijen fraksiyonunu göstermektedir.....153

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 2.1. Büyüme faktörleri ve sitokinlerin kıkırdak doku üzerindeki düzenleyici etkisi.....	27
Çizelge 2.2. Kıkırdak doku mühendisliğinde kullanılan biyomalzeme türleri.....	34
Çizelge 2.3. Doku mühendisliğinde kullanılan biyoreaktörlerin karşılaştırılmalı özellikleri.....	59
Çizelge 3.1. Biyoreaktör simülasyonu için tasarım ve işletim koşulları.....	86
Çizelge 4.1. Kitosan iskelelerin şişme karakteristikleri.....	95
Çizelge 4.2. Kitosan doku iskelelerinin mekanik dayanımları.....	97
Çizelge 4.3. Kitosan iskelelerde L929 fibroblastik hücre yapışması ve büyümesi.....	99
Çizelge 4.4. RGD veya EGF immobilize edilmiş kitosan doku iskelelerinin kantitatif analizi.....	109
Çizelge 4.5. Kitosan doku iskelelerindeki ATDC5 hücre yapışması ve büyümesi.....	110
Çizelge 4.6. Kitosan, RGD-kitosan ve EGF-kitosan doku iskelelerinin durgun kültürdeki biyokimyasal bileşimleri.....	116
Çizelge 4.7. Durgun koşullarda kültüre edilen kitosan ve BMP-6 yüklü kitosan doku iskelelerinin biyokimyasal bileşimleri.....	123
Çizelge 4.8. Dinamik koşullarda kültüre edilen BMP-6 yüklü kitosan doku iskelelerinin biyokimyasal bileşimleri.....	129
Çizelge 4.9. Farklı dönüş hızlarında, biyoreaktördeki doku iskelelerinin farklı yüzlerine etkiyen kayma gerilimleri (dyne/cm ²).....	150

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

μ	Özgöl üreme hızı
μ	Viskozite
μ/ρ	Kinematik viskozite
ACI	Autologous chondrocyte implantation (Otolog kondrosit implantasyonu)
BMP	Bone morphogenetic protein(Kemik morfogenetik proteini)
BMSC	İnsan kemik iliğinden elde edilen mezenkimal kök hücresi
CFD	Computational fluid dynamics (Hesaplamalı akışkanlar dinamiği)
CLSM	Confocal laser scanning electron microscopy (Konfokal lazer taramalı elektron mikroskopisi)
C_{O_2}	Oksijen konsantrasyonu
DD	Deasetilasyon derecesi
DMEM	Dulbecco's Modified Eagles Medium
D_{O_2,H_2O}	H_2O içinde O_2 diffüzivitesi
ECM	Extracellular Matrix (Ekstrasellüler matriks)
ED MSC	İnsan embriyonik kök hücresinden elde edilen mezenkimal kök hücresi
EGF	Epidermal growth factor (Epidermal büyüme faktörü)
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting (Floresan aktive edilmiş hücre ayırıştırma)
FBS	Fetal siğır serumu
Fc	Santrifugal kuvvet
F_d	Sürükleme kuvveti

Fg	Gravitasyonel kuvvet
FGF	Fibroblast büyüme faktörü
FTIR	Fourier Transform Infrared
GAG	Glikozaminoglikan
HARV	High aspect ratio vessel (Yüksek en-boy oranlı kap)
hASC	İnsan adipoz dokusundan elde edilen mezenkimal kök hücresi
hESC	İnsan embriyonik kök hücresi
IGF	İnsülin büyüme faktörü
IL-1 β	İnterlekün-1beta
MSC	Mezenkimal kök hücre
MTT	3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-difeniltetrazolyum bromür
NHS	N-hydroxysuccinimide (N-hidroksisüksinimid)
N _{RE}	Reynolds Sayısı
PBS	Phosphate Buffer Saline (Tuzlu fosfat tamponu)
PDGF	Platelet derived growth factor (Platelet kökenli büyüme faktörü)
RCMW TM	Sürekli Sistem Döner Duvarlı Hücre Kültür Sistemi
RGD	Arjinin-Glisin-Aspartik asit
R _{O2}	Birim hacimdeki molar oksijen harcanma hızı
RT-PCR	Real-time polymeric chain reaction (Gerçek zamanlı polimerik zincir reaksiyonu)
RWPV	Rotating wall perfused vessel (Döner duvarlı perfüzyon kap)
RWV	Rotating wall vessel (Döner duvarlı kap)
SEM	Scanning Electron Microscope (Taramalı Elektron Mikroskobu)
STLV	Slow turning lateral vessel (Yavaş dönen enine kap)

$\mathcal{T}$	Kayma gerilimi
TGF	Transforming growth factor (Transforme edici büyüme faktör)
TNF	Tumor necrosis factor (Tümör nekroz faktör)
UV	Ultraviyole
VEGF	Vascular endothelial growth factor (Vasküler endotel büyüme faktörü)
V_r	Radyal hız
ρ	Özkütle

1. GİRİŞ VE ÇALIŞMANIN AMACI

1743 yılında Hunter'ın "Hipokrat zamanından günümüze kadar, kıkırdak yapısının bir kere kaybedilirse bir daha asla yenilenemeyeceği herkes tarafından bilinmektedir" açıklaması bilim adamlarını geçen dört yüz yıl boyunca kıkırdak rejenerasyonu konusunda çalışmalara teşvik etmiştir. Kıkırdak yapısının bir kere zarar gördükten sonra spontan olarak iyileşme gösterme kapasitesi, dokunun avasküler yapısı gereği çok azdır. Son dört yüz yılda çeşitli yenileme teknikleri öngörülse de uzun süreli hiyalin kıkırdak yapının zarar görmüş dokunun yerini tam olarak alabildiği bir teknik bulunamamıştır (Suh and Matthew, 2000).

Kıkırdak doku tamirinde, özellikle son yıllarda geliştirilen metal ve plastik eklem protezleri, eklem ağrılarını hafifletmek ve eklem fonksiyonunu yerine getirmek açısından muazzam bir başarı elde etmişlerdir. Ancak canlı olmayan bu protezlerde zamanla aşınma gözlenir, enfeksiyon meydana gelebilir ve fiziksel açıdan aktif kişilerde yeterince dayanıklı değildir. Ayrıca protezin dokuya tutunması da problemli olmaktadır. Tüm bu tedavilere alternatif çözüm; "*doku mühendisliği yaklaşımıyla üretilen kıkırdak dokusudur*". Doku mühendisliği yaklaşımı ile kıkırdak doku üretiminde üzerinde çalışılan iki metod mevcuttur. Bunlardan bir tanesi; vücut dışında çoğaltılan kıkırdak hücrelerinin doğrudan hasarlı bölgeye enjeksiyonu (hücre transplantasyonu); ikincisi ise kıkırdak hücrelerinin 3-boyutlu biyobozunan destek malzemeleri üzerinde üretilmesidir (hücre-polimer modeli). Ancak bu teknolojiyi klinik boyutlara taşımak için üretimi büyük miktarlara çıkartmak halen önemli bir problem olmaktadır. Bu nedenle gerekli biyomalzemelerin seri üretimi ve büyük ölçekte hücre üretimi için metodlar geliştirilmektedir. Bütün bir eklemi kaplamak için gerekli kıkırdak implantının çapı 5 cm, kalınlığı 1-5 mm olmalıdır. Ancak şu anda uygulanan laboratuvar teknikleri ile ulaşılan çap yaklaşık 5 mm'dir. İstenilen boyutlara sahip doku üretiminde biyoreaktörlerin avantaj sağlayacağı düşünülmektedir (Gümüşderelioğlu et al., 2008).

Üç boyutlu yapay doku elemanlarının *in vitro* da üretilebilmesi için sadece hücre-polimer modeli yeterli değildir. Karşılaşılan en büyük problem gazların (O_2 , CO_2), besinlerin, proteinlerin, hücrelerin ve atık ürünlerin doku iskelesine aktarımı yani

difüzyondur. Başarılı bir kıkırdak doku oluşumu için biyoreaktörleri içeren hücre kültür stratejilerinin geliştirilmesi gerekmektedir (Wendt et al., 2005). Literatürde kıkırdak doku mühendisliğinde biyoreaktör kullanımına yönelik çok sayıda çalışma mevcuttur. Freed ve arkadaşları, karıştırmalı kaplarda akışın, kondrosit üremesi ve matris oluşumuna olan etkisini incelemiştir (Freed et al., 1994). Vunjak-Novakovic ve arkadaşları (1999) yaptıkları çalışmalarda, poli (glikolik asit) PGA doku iskelelerine kondrosit hücreleri ekmişler ve kültür ortamı olarak durgun kaplar, karıştırmalı kaplar ve döner duvarlı biyoreaktörler kullanarak, kültür şartlarının oluşan yeni kıkırdak dokunun bileşimi ve mekanik özellikleri üzerindeki etkisini incelemiştir (Vunjak-Novakovic et al., 1999). Freed ve arkadaşları, *in vitro* ortamda hücre-doku iskelesi yapılarında meydana gelen kondrojenesi döner duvarlı biyoreaktörler kullanarak incelemiştir (Freed et al., 1998). Perfüzyon biyoreaktörlerde ise kondrositlerin GAG sentez ve birikimini (Davisson, 2002; Pazzano, 2000) arttırdığı gözlemlenmiştir.

Sunulan tez çalışması kapsamında “hücre-polimer modeli” ile dinamik koşullarda kıkırdak doku üretiminin gerçekleştirilmesi amaçlanmıştır. Deneysel çalışmalar, biyoyumlu doku iskelelerinin geliştirilmesi, doku iskelelerinin biyosinyal moleküller ile modifikasyonu, farklı kaynaklardan temin edilen hücrelerin durgun ve dinamik koşullarda kıkırdak dokusu oluşturma potansiyellerinin incelenmesi ve son olarak biyoreaktörlerde ortam koşullarının simülasyon çalışmalarını kapsamıştır.

Kıkırdak doku yenilenmesi için doğal ya da sentetik, biyobozunur veya biyobozunmaz pekçok biyomateryal önerilmiştir. Kıkırdak yenilenmesi için gerekli olan ideal matrisin doğal doku oluşum çevresini taklit eden bir yapıda olması beklenmelidir. Glikozaminoglikan (GAG) yapıların, kondrosit fenotip ekspresyonunun düzenlenmesinde ve hem *in vitro* hem de *in vivo* ortamlarda kondrojenenin desteklenmesinde kritik rol oynadıkları göz önüne alındığında glikozaminoglikan veya analoglarının doku iskelesi materyalleri olarak kullanılmasının kondrojenenin başarısını etkileyeceği açıktır (Suh and Matthew, 2000).

Tez kapsamında biyoyumluluk, biyobozunurluk ve katyonik karakterine bağlı olarak hücre yapıştırıcı ve üremeyi destekleyici özellikleri nedeniyle kitosan doğal

polimerinden gözenekli doku iskelesi üretimi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla “dondurarak-kurutma” işlemi kullanılmıştır. Ayrıca hazırlanan matrisler hücre yapışması, üremesini ve farklılaşmasını desteklemek üzere çeşitli biyosinyaller ile modifiye edilmiştir. Doku oluşumu, kitosan-doku iskeleleri üzerinde ve mikrogravite koşullarda çalışan döner-duvarlı biyoreaktörlerde incelenmiş ve sonuçlar durgun ortam koşulları ile karşılaştırılmıştır. Literatürde, kitosan doku iskelelerinin mikrogravite koşullardaki etkinliğinin değerlendirilmemiş olduğu göze çarpmaktadır. Dolayısıyla, sunulan tez çalışma bu haliyle orijinallik kazanmaktadır.

Doku mühendisliği yöntemleri kullanılarak istenen nitelikte doku rejenerasyonunu sağlayabilecek potansiyele sahip yeni yaklaşımlar geliştirilmesi konusunda tüm dünyada yoğun araştırma faaliyetleri sürdürülmekte ve çeşitli biyosinyal moleküllerin biyomalzemeler ile etkileşimlerinin önemi vurgulanmaktadır. Kullanılan biyosinyal moleküller arasında hücre yapıştırıcı peptid sekansları, hücre büyüme ve farklılaşma faktörleri önemli bir yer tutmaktadır. RGD (*Arg-Gly-Asp*) sekansını içeren kısa peptidlerin biyomalzeme yüzeyi üzerine bağlanması, integrinler aracılığı ile hücre yapışmasını etkilemektedir. Hücre-malzeme etkileşiminin incelendiği çalışmalarda RGD immobilize edilmiş olan malzemelerde özellikle fibroblast ve endotel yapıdaki hücrelerin yüzeylere yapışma ve yayılma davranışında belirgin bir artış olduğu tespit edilmiş (Hersel ve ark., 2003) ve RGD'nin kondrosit yapışması üzerinde önemli derecede etken olduğu belirlenmiştir (Hoa et al., 2005). Biyosinyal proteinleri ile hücre arasındaki etkileşimin mekanizması henüz tam olarak açıklanmamış olsa da, araştırmalar EGF (*epidermal growth factor*) gibi hücre büyüme faktörlerinin biyomalzeme yüzeyine immobilizasyonu ile hücre üremesinde artış olduğunu göstermektedir (Karakeçili, 2006; Ito, 1999). Tez çalışmasında, kitosan doku iskeleleri RGD ve EGF biyosinyal molekülleri ile immobilize edilmiş ve *in vitro* hücre kültür çalışmaları ile kondrojenik aktiviteleri incelenmiştir.

Kıkırdak doku mühendisliğinde kullanılan büyüme faktörlerinden özellikle TGF- β 'nın (*transforming growth factor- β*) *in vitro* ve *in vivo* ortamlarda kondrojenik farklılaşmayı indüklediği bilinmekte ve sıklıkla kullanılmaktadır (Hennig et al., 2007). BMP-6 (*bone morphogenetic protein-6*) ise TGF- β süper ailesinin bir alt grubu olup, hücrelerin kondrojenik farklılaşmasını indüklediği ve kondrogenezde

önemli rol oynadığı bilinmektedir (Sekiya et al., 2001; Hennig et al., 2007). Bununla beraber, BMP-6 ve doku iskeleleri birlikte kullanılarak kıkırdak doku mühendisliğindeki etkinliğinin henüz incelenmemiş olduğu göze çarpmaktadır. Sunulan tez çalışmasında, kitosan doku iskeleleri BMP-6 ile emdirme (embedding) yöntemi ile yüklenmiş ve kıkırdak doku mühendisliği için kullanılabilirlikleri incelenmiştir. Literatürdeki bahsedilen eksiklik göz önüne alındığında, sunulan tez çalışmasının etkin değeri ve orijinalitesi açıktır.

Sunulan tez çalışmasında, farklı hücre kaynaklarından elde edilen insan kökenli hücreler ile kitosan doku iskeleleri durgun koşullarda kültüre edilmiş ve hücre kaynakları kitosan doku iskeleleri ile kıkırdak doku oluşturma potansiyelleri açısından karşılaştırılmıştır. Karşılaştırmalar sonucunda seçilen en uygun hücre kaynağı ile kitosan doku iskeleleri perfüzyon biyoreaktörlerde kültüre edilmiştir ve dinamik koşullarda kıkırdak doku oluşum potansiyelleri incelenmiştir. Çalışma sonuçları kolayca uygulamaya aktarılabilir nitelikte olup, klinik araştırmalar için literatüre önemli ön bilgiler sunmuştur.

Çalışmanın son aşamasında ise döner duvarlı biyoreaktörde kültüre edilen kitosan doku iskelelere etkiyen lokal parametrelerin simülasyonu uygun bilgisayar yazılımı ile gerçekleştirilmiştir. Kitosan doku iskelelerine etkiyen hız, kayma gerilimi ve biyoreaktör içerisindeki oksijen profillerinin belirlenmesi sunulan tez çalışmasının diğer bir özgün noktasıdır.

2. GENEL BİLGİLER

Bu bölümde, sunulan tez çalışmasının temelini oluşturan konularla ilgili literatür bilgileri dört ana başlık altında özetlenmiştir. İlk bölümde, kıkırdak dokusunun yapısı, özellikleri ve kıkırdak doku hasarlarının tedavisi için doku mühendisliği yaklaşımlarına yer verilmiştir. Ardından kıkırdak doku mühendisliği uygulamalarına yönelik olarak geliştirilen doku iskelelerinin üretiminde kullanılan biyomalzemeler, kıkırdak doku oluşumu ve onarımında kullanılan biyosinyaller, büyüme faktörleri ve kullanılan hücreler ile ilgili açıklamalarda bulunulmuştur. Üçüncü bölümde, tez kapsamında hazırlanan doku iskelelerinin temel maddesi olması nedeniyle “kitosan” hakkında ayrıntılı bilgi verilmiş ve kitosan doku iskelesi hazırlanmasına yönelik literatür bilgilerine değinilmiştir. Son bölümde ise doku mühendisliği uygulamalarında kullanılan biyoreaktörler hakkında ayrıntılı bilgi verilmiş ve simülasyon çalışmalarına değinilmiştir.

2.1. Kıkırdak Doku Mühendisliği

Doku mühendisliği, vücutta kaza veya travma sonucu meydana gelen işlevsel bozuklukların giderilmesi ya da iyileştirilmesi için mühendislik prensiplerini ve yaşam bilimlerini sinerjik bir şekilde birleştiren yepyeni bir bilim dalı olarak tanımlanmaktadır (Langer and Vacanti, 1993). Kıkırdak dokunun yenilenme kapasitesinin çok düşük olmasından dolayı kıkırdak doku mühendisliği, doku mühendisliği çalışmalarının öncelikli konularından biri olmuştur. Kıkırdağın avasküler (damarsız) yapıya sahip olması, kondrositlerin hareketsizliği ve çok zor çoğalabilmeleri, kıkırdak doku onarımını zorlaştıran faktörler arasında yer almaktadır.

Günümüzde, kıkırdak dokuda karşılaşılan belli başlı rahatsızlıklar şunlardır;

- Arterit (eklem iltihabı)
- Kalıtsal anormallikler
- Travma
- Artroz (eklem yıpranması ya da yaşlanması)
- Kireçlenme (kalsifikasyon), kemikleşme (ossifikasyon), lifsel dejenerasyon

- İyi ya da kötü huylu tümörler.

Kıkırdak dokunun dejenerasyonu sonucu ortaya çıkan eklem ağrısı özellikle orta yaşlı ve yaşlı insanlarda önemli bir rahatsızlık kaynağı olmaktadır. Ayrıca çeşitli yaralanmalar ve kazalar da kıkırdak dokuda, daha çok eklem kıkırdağında hasara yol açmaktadır. Kıkırdak dokunun kendini-yenileme eğiliminin çok düşük olması sonucu bu tür hasarlar uzun yıllar boyunca giderilememekte ve dokuda daha ileri dejenerasyonlar meydana gelmektedir.

Kıkırdak doku tedavisi amacıyla uygulanan belli başlı geleneksel yöntemler şöyle sıralanabilir;

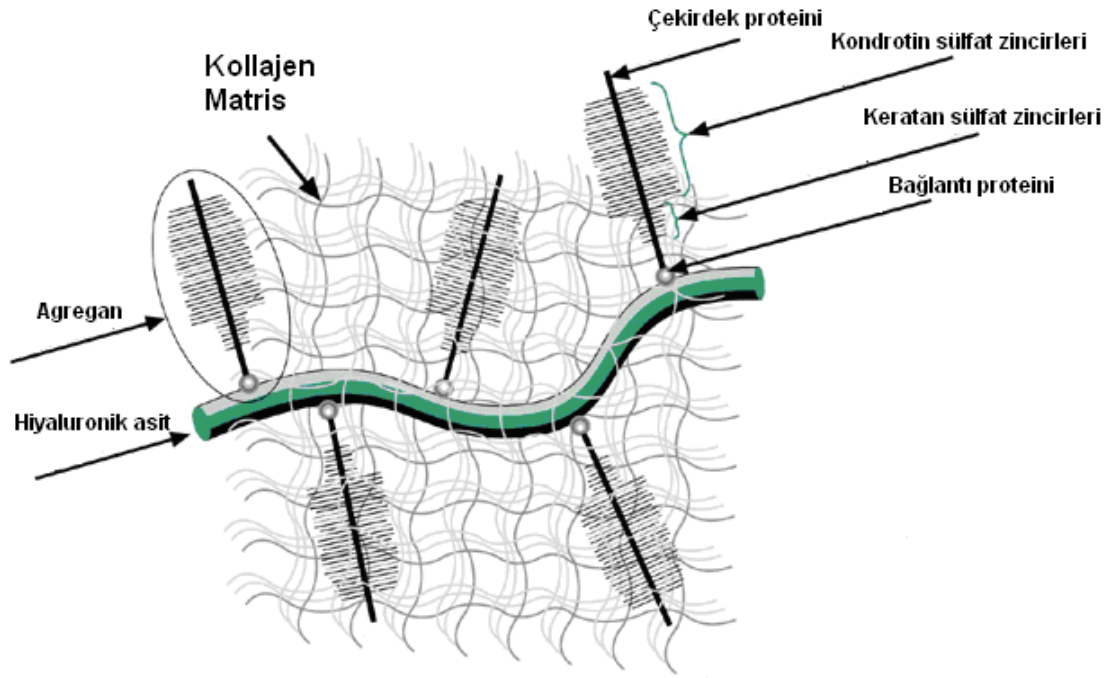
- Estetik ve ortopedik ameliyatlar,
- Doku transplantasyonu,
- Yapay protez kullanımı.

Kıkırdak doku hasarlarında uygulanan cerrahi müdahaleler, dokunun fonksiyonunu tam olarak geri kazandıramamaktadır. Ayrıca müdahale sonrası özellikle erişkinlerdeki hasarlı bölgede doku kaybı tekrarlanabilmektedir. Yukarıda söz edilen tedavi yöntemlerinin sahip oldukları dezavantajlar dikkate alındığında tüm bu tedavilere alternatif çözüm olarak karşımıza çıkan “*doku mühendisliği yaklaşımı*” ile “*kıkırdak dokusu üretimi*” büyük önem kazanmaktadır. Bu yaklaşımda uygun doku iskeleleri, büyüme faktörleri ve hücreler kullanılarak kıkırdak dokunun *in vitro* koşullarda oluşturulması gündeme gelmiştir. Özellikle son yıllarda tıp, biyoloji ve malzeme teknolojilerindeki ümit veren gelişmeler ve hastaya özgün kıkırdak doku mühendisliği stratejilerinin oluşturulması itibarıyla, kıkırdak doku mühendisliğinin gelecekte de bugünkü önemini koruyacağı ve kısa vadede büyük gelişmelere gebe olduğu düşünülmektedir.

2.1.1. Kıkırdak dokusunun yapısı ve türleri

Kıkırdak dokusu, destek dokusunun özel bir çeşidi olup, *kondrosit* adı verilen kıkırdak hücreleri ve kollajen ve elastin iplikçikler ile etkileşen makromoleküller bakımından zengin bir hücre dışı matris (Ekstraselüler matris, ECM) ile karakterize edilmektedir. ECM, kondrositler tarafından sentezlenerek salgılanmaktadır.

Kollajen, hiyaluronik asit, proteoglikanlar ve glikozaminoglikanlar tüm kıkırdak tiplerinin matrisinde yer alan temel makromoleküllerdir. Agregan, kıkırdağın karakteristik proteoglikanıdır (Şekil 2.1). Transkripsiyon faktörü Sox9; tip II kollajen ve agregan gibi kıkırdağa özgü ECM bileşenlerinin ekspresyonu için gereklidir. Bu genin ekspresyonunun eksikliği, kondrojenik tabakanın kondrositlere farklılaşmasını engellemektedir (Kierszenbaum, 2006).

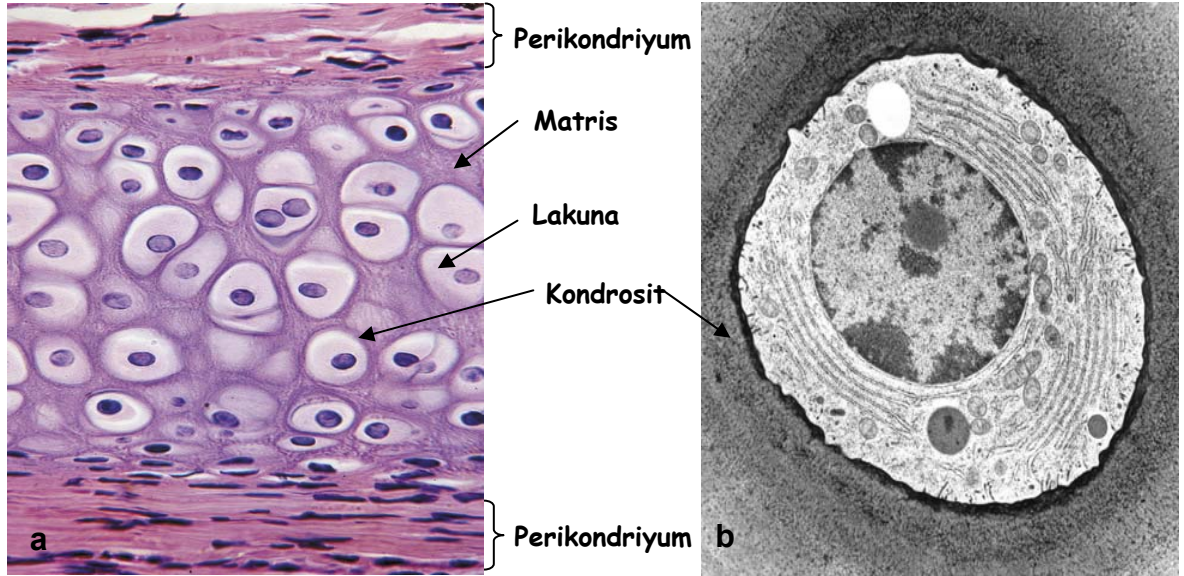


(www.peprotech.co.kr/fa_sub/img/chart-2.jpg)

Şekil 2.1. Kıkırdak matriksinde moleküler organizasyon.

Embriyonik dönemde, hızlı büyüme yeteneği ve sertliği nedeniyle embriyo için önemli bir iskelet materyali oluşturan kıkırdak, ECM'si sayesinde mekanik strese dayanabilmektedir. Kıkırdak, düzgün yüzeyli ve basınçlara dayanıklı yapısı nedeniyle, eklemler için darbe absorbe edici ve kayganlaştırıcı bir bölge oluşturarak hareketi sağlamakta, ve ayrıca yumuşak dokulara destek olmaktadır. Tüm bu işlevlerinin yanında, kıkırdak dokusu uzun kemiklerin büyümesi ve gelişmesi için de önemlidir. Kulak ve solunum yolu gibi bölgelerde ise esnek ve dayanıklı bir çerçeve gibi işlev göstererek organların kapanıp içine çökmesini engellemektedir (Junqueira and Carneiro, 2005; Akay, 2006).

Kondrositler, matriste, *lakün* adı verilen boşluklarda tek tek ya da küçük gruplar (izojen=kondron) halinde bulunabilmektedir (Akay, 2006) (Şekil 2.2). Kıkırdak hücreleri, protein salgılayan bir hücrenin yapısal özelliklerinden olan, iyi gelişmiş granüllü endoplazmik retikuluma, Golgi aygıtına ve iri bir çekirdeğe sahiptir. Kondrositlerin sitoplazması protein sentezinin bir işareti olarak bazofiliktir. Bu hücreler, erişkin kıkırdakta nadiren bölünse de ECM döngüsünde yerine konulmak üzere sürekli proteoglikanları sentezlemektedir. Hücrelerde sadece proteoglikan değil aynı zamanda glikozaminoglikan ve kollajen sentezi de gerçekleşir. Sitoplazmadaki açık alanlar yağ damlacıkları ve glikojen depoları ile karakterize olmuştur (Şekil 2.2).



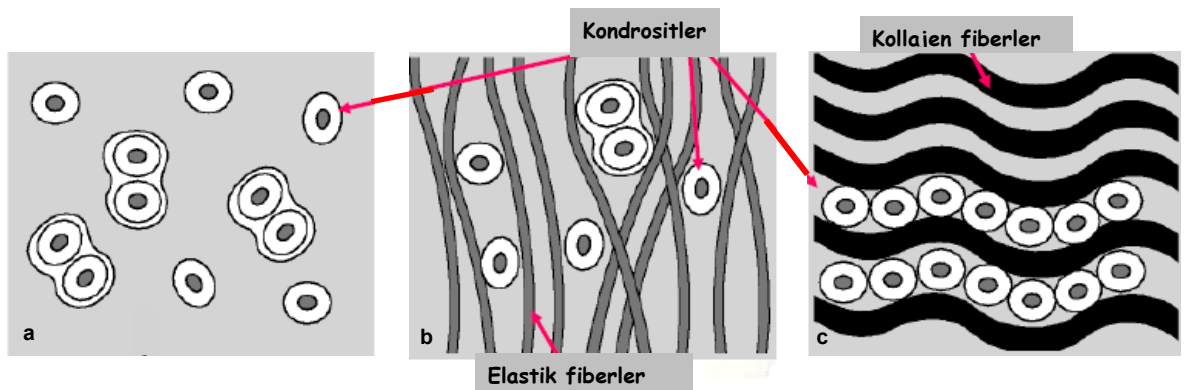
Şekil 2.2. Kıkırdak doku (a) histolojik kesit görüntüsü. Hücreler lakünler içerisinde yer almaktadır. Perikondriyum şeklin üst ve alt kısmında pembe ile boyanmış kısımda gösterilmiştir (hemotoksilen-eozin boyaması). (b) Kondrosit elektron mikroskop görüntüsü.

Kıkırdığın etrafını saran ve sıkı bağ dokusundan oluşan *perikondriyum*, avasküler kıkırdak için vasküler bir destek sağlamaktadır. Ayrıca, sinir ve lenfatik damarlar da yine perikondriyum içerisinde yer almaktadır. Avasküler bir dokuda bulunan hücrelerden beklendiği üzere, kondrositler düşük metabolik aktivite göstermektedir. Kıkırdak hücreleri, glikozu, temelde anaerobik glikolizis ile metabolize etmekte ve bunun sonucunda da laktik asit üretmektedir. Kandaki

besin maddeleri perikondrium ve ardından daha derinde bulunan kıkırdak hücrelerine orta kıkırdağın kompresyon ve dekompresyon ile yarattığı pompa etkisiyle geçmektedir. Bu nedenden ötürü, kıkırdağın maksimum kalınlığı sınırlıdır. Hareketli eklemlerin kemik yüzeylerinde bulunan artikular kıkırdak ise perikondrium içermemekte; bu kıkırdak tipinde, oksijen ve besin maddeleri sinoviyal sıvıdan difüzyonla alınmaktadır (Junqueira and Carneiro, 2005).

Kondrositlerin salgıladığı antianjiyogenez faktörü, bu dokuda damar oluşumunu engellemektedir (Akay, 2006). Kondrositlerin metabolizmasının devamını sağlayan maddeler, perikondriumdaki kan damarlarından kondrosit matrisine difüzyon yoluyla geçmektedir. Kıkırdak matrisinin jel-benzeri doğası bu difüzyonu sağlamaktadır. Kıkırdak matrisi, yüksek oranda hidrate bir jeldir. Kıkırdağın net kütlesinin % 60-80'i sudan oluşmaktadır. Ancak bu su serbest halde bulunmamakta; büyük kısmı, negatif yüklü proteoglikanlara sıkıca bağlanarak kıkırdağa esneklik kazandırırken az bir kısmı da daha gevşek bağlanarak besin maddelerinin difüzyonunda rol oynamaktadır. Eğer kıkırdak matrisi kalsifiye olursa (enkondral kemikleşme ya da yaşlanma sırasında), matris boyunca difüzyon bloke edilmekte ve kondrositler ölmektedir (Henrikson et al., 1997; Akay, 2006).

Kemik büyümesinde de anahtar bir role sahip olan kıkırdak doku matris bileşimindeki değişiklikler, üç tip kıkırdağın ortaya çıkmasında etkilidir (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Kıkırdak doku tiplerinin şematik gösterimi (a) hiyalin kıkırdak, (b) elastik kıkırdak, (c) fibro kıkırdak.

Hiyalin kıkırdak; tip II kollajen, hiyaluronik asit ve proteoglikanlardan oluşmaktadır. Elastik kıkırdak; tip II kollajen, hiyaluronik asit, proteoglikanlar, elastin fiberler ve elastin lamellerden oluşmaktadır. Fibro kıkırdak; tip II kollajen, hiyaluronik asit, proteoglikanlar ve tip I kollajenden oluşmaktadır (Ross et al., 2003).

2.1.1.1. Hiyalin kıkırdak

En yaygın kıkırdak tipi olan hiyalin kıkırdak, embriyoda geçici bir iskelet olarak görev yapmakla beraber fetustaki iskelet gelişiminde bir model olarak kullanılır. Birçok uzun kemikte kıkırdak, başlangıçta uzun kemiğin şeklini sunan bir model görevi görür. Gelişim devam ettikçe, kemik doku kıkırdak dokunun yerini alır ve kıkırdak, kemik doku için bir büyüme bölgesi sağlar (epifizyal büyüme diski). Bu kıkırdak fonksiyonel olarak kemiğin içerisinde uzunlamasına yer alır. Yetişkin memelilerde ise, hareketli eklemlerin yüzeylerinde, solunum yolunda (burun, larinks, trake ve bronşlar) ve kaburganın ventral sonlarında yer almaktadır (Junqueira and Carneiro, 2005).

Eklem bölgelerinde kıkırdak doku (hiyalin kıkırdak) bir baskıya maruz kaldığında veya eklem hareketlerine bağlı olarak kısa süreli bölgesel değişiklikler meydana geldiğinde dokunun içerisindeki su miktarı da değişir. Yüksek derecede hidrasyon ve suyun matris içindeki hareketi, dokunun basınç ve ağırlığa karşı dayanımını sağlar. Matrisin sentezi ve devamlılığı, kondrositlerin matris bileşimindeki değişimi fark etme yeteneğine bağlıdır. Kondrositler bu değişimlere cevap olarak yeni moleküllerin sentezini yapar. Ayrıca matris, bir sinyal değiştirici olarak davranır. Kıkırdağa bir baskı uygulandığında mekanik, elektriksel ve kimyasal sinyallerle kondrositlerin sentez aktivitesini uyarır. Yaşla birlikte matris içeriği değişir ve kondrositler bu uyarılara cevap verme yeteneğini kaybeder.

Hiyalin kıkırdak homojen ve amorf bir matris ile karakterize edilmektedir. Kondrositler tarafından sentezlenen matris; kollajen moleküller, non-kollajen (kollajen olmayan) moleküller ve proteoglikanlar olmak üzere üç tip molekül içerir. *Kollajen moleküller* en önemli hiyalin kıkırdak matris proteoidir. 4 tip kollajen molekülü matris fibrillerinin yapısına katılır. Bunlar;

Tip II: Fibrillere yığın (bulk) yapısını verir.

Tip XI: Fibril boyutunu kontrol eder.

Tip IX: Fibril ve proteoglikanlar arasındaki etkileşimi sağlar.

Tip X: Kollajen fibrillerin üç boyutlu hekzagonal yapısını almasını sağlar.

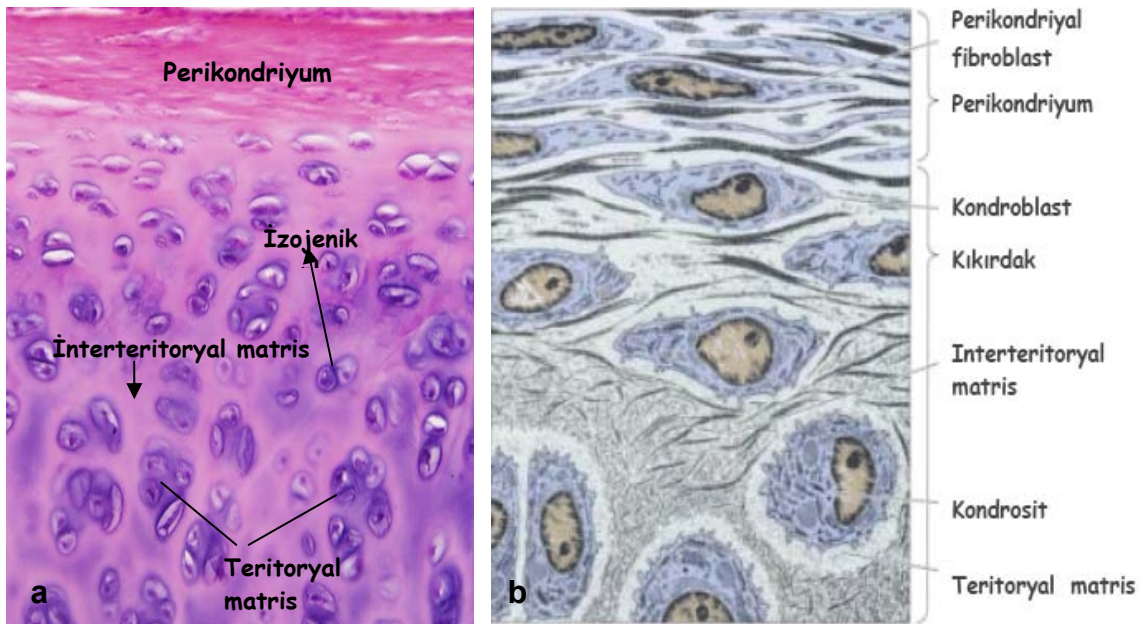
Ayrıca tip VI kollajen de kondrositlerin periferinde bulunmakta ve hücrelerin matris içeriğiyle etkileşmesini sağlamaktadır. Tanımlanan tüm bu moleküller yalnızca kıkırdak matrisinde önemli ölçüde bulunduğu için “kıkırdak-spesifik kollajen molekülleri” olarak adlandırılır.

Proteoglikanlar; hiyaluronik asit, kondrotin sülfat (kondroitin 4-sülfat, kondroitin 6-sülfat) ve keratin sülfat alt ünitelerinden oluşur. Kondrotin sülfat ve keratin sülfat molekülleri bir merkezi protein etrafında dizilerek (kovalent bağlanma) proteoglikan monomerlerini oluşturmaktadır. Her bir doğrusal hiyaluronik asit molekülü yaklaşık 80 adet proteoglikan monomerine çeşitli proteinlerle bağlanmıştır. “Hiyaluronat proteoglikan agreganları” olarak adlandırılan bu yapılar ince kollajen matris fiberlerine elektrostatik etkileşimler ve çapraz bağlayıcı glikoproteinler ile bağlanmıştır.

Kollajen olmayan (non-kollajen) proteinler agregan oluşturmeyen proteoglikanları içerir. Düzenleyici ve yapısal proteinlerdir. Kondrosit ve matris etkileşimlerini sağlamaktadırlar. Klinikte kıkırdak dejenerasyonlarının tespitinde işaretleyici görevi üstlenirler. Örneğin, ankorin II, fibronektin ve tenaskin, kondrositlerin matrise tutunmalarını sağlarlar. Hiyalin kıkırdak matrisi, küçük metabolitlerin difüzyonuna izin verecek şekilde esnek ve oldukça hidrate olmuş durumdadır. Ağırlığının % 60-80’ i sudur. Suyun bir kısmı hiyaluronat proteoglikan agreganlarına sıkıca bağlanmıştır ve esnekliği sağlar. Bir kısmı ise difüzyonda görev alır ve gevşek bir bağlanmaya sahiptir.

Camsı bir görünüme sahip olan hiyalin kıkırdakta lakuna içine yerleşmiş olan kondrositler “izojen gruplar” olarak adlandırılan diğer hücre gruplarından ayrı yerleşim gösterirler. Bu gruplar arasında kondrosit bulunduğu zaman hücreleri bölünmek üzere uyarır. Kondrositlerden salgılanan matris materyali hücreleri sarar ve ayrılmasına neden olur. Hiyalin kıkırdağın tek tip bir yapısı yoktur.

Proteoglikanlar yüksek konsantrasyonda sülfat grupları içerirler. Bu nedenle hematoksilin gibi bazik boyalarla boyanırlar. Bu boyama matristeki proteoglikan konsantrasyonu ve dağılımı ile ilgili bilgi verir. Proteoglikan konsantrasyonu lakuna çevresinde yoğundur, oluşan halka yapısına “kapsül” ya da “teritorial matris (teritoryal matris)” denir. Bu bölge koyu renkte boyanır. Kondrositlerden daha uzakta olan ve proteoglikanlarca fakir olan matris ise “interteritorial matris (interteritoryal matris)” adını alır ve açık renkte boyanır (Şekil 2.4). Bu bölgesel değişikliklerin yanında proteoglikan miktarı yaşa bağlı olarak da değişiklik gösterir (Akay, 2006).



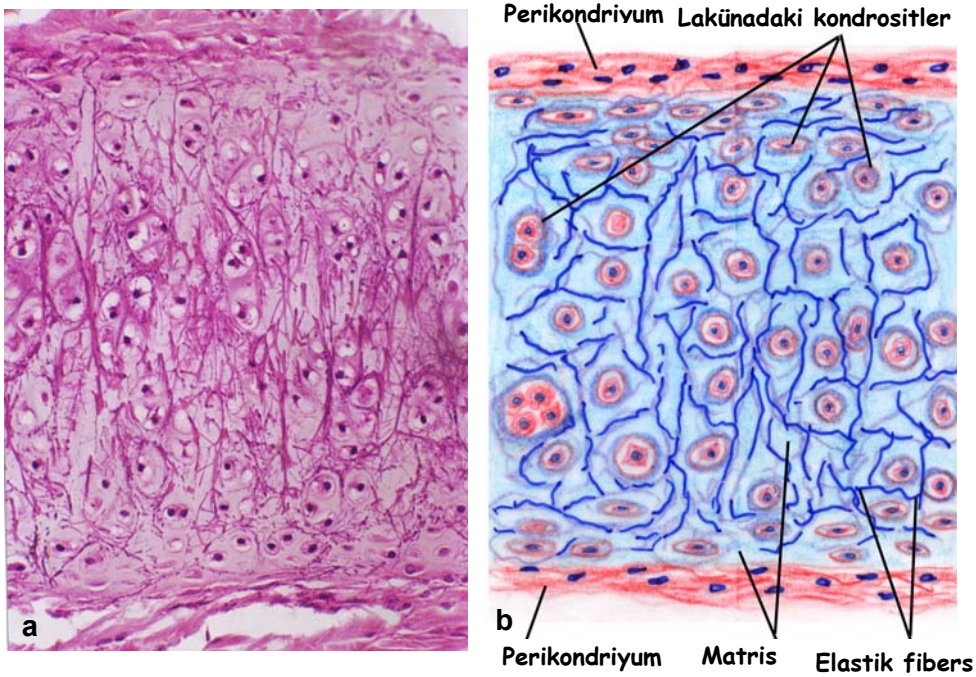
Şekil 2.4. Hiyalin kıkırdak yapısı (a) histolojik kesit görüntüsü, (b) şematik gösterimi (Junqueira and Carneiro, 2005).

Hiyalin kıkırdak perikondriyum ile çevrilmiştir. Perikondriyum, kollajen tip I’ce yoğun ve fibroblast benzeri hücrelerce salgılanan zengin bir bağ dokusu yapısındadır. Yeni kıkırdak hücreleri için bir kaynak durumundadır. Büyüme sırasında perikondrium, dışta fibroz tabaka ve içte hücresel tabaka denilen iki kısma ayrılır. Fibroz tabaka, mekanik destek, koruma, diğer yapılara tutunma gibi görevleri yerine getirirken hücresel tabaka, kondrositlerin üretilmesini sağlar. Eklem bölgelerinde kıkırdak dokunun doğrudan kemik ile temas ettiği ve perikondriyum ile sarılmamış açık bölgeleri bulunur. Bu bölgelerde doku büyümesi

lakünler içerisindeki hücrelerin bölünmesi ile gerçekleşir. Çok yavaş büyüyen kıkırdakta ya da aktif olarak yeni kıkırdak üretmeyen perikondriyumda bu tabakalaşma görülmemektedir (Akay, 2006). Perikondriyumun i  tabakasında yer alan hücreler, fibroblastlara benzeseler de bunlar, kondrositlere kolaylıkla farklıla abilen *kondroblastlardır* (Akay, 2006; Junqueira and Carneiro, 2005).

2.1.1.2. Elastik Kıkırdak

Dış kulak, epiglotis ve işitme kanalında bulunan; basın a karşı pek dayanıklı olmayan elastik kıkırdak, hiyalin kıkırda a oldukça benzer yapıdadır. Elastik kıkırdak matristeki elastin ve bağlayıcı ara tabakalarla karakterize edilir. Bu yapıyı hiyalin kıkırdaktan ayıran en önemli özellik tip II kollajene ek olarak yüksek miktarda elastik lifleri içermesidir. Bu kıkırdak tipi de hiyalin kıkırda a benzer şekilde perikondriyum içermektedir ( ekil 2.5).

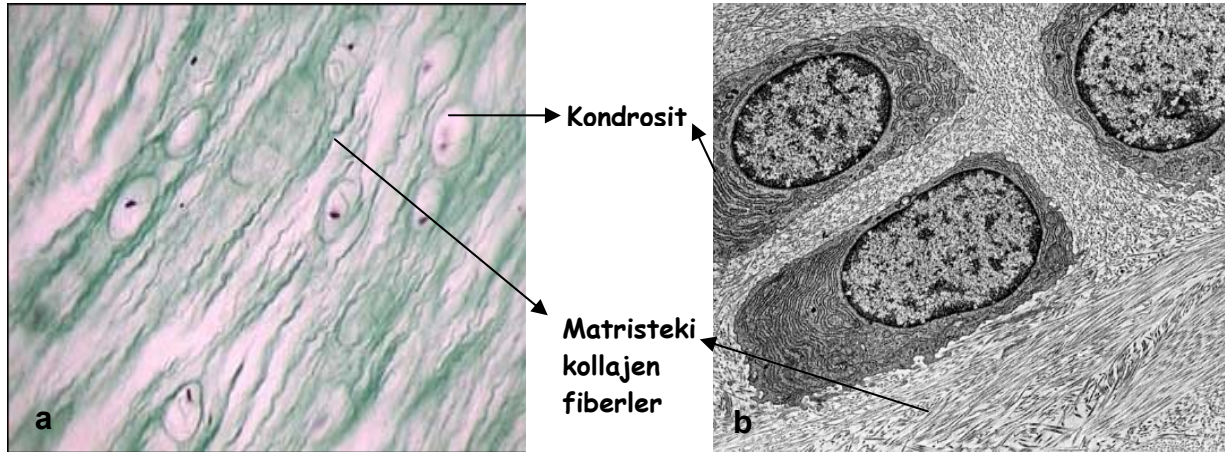


Şekil 2.5. Elastik kıkırdak (a) histolojik kesit, (b)  ematik gösterimi.

Hiyalin kıkırdak matrisi zamanla kalsifiye olurken, elastik kıkırdakta böyle bir durum gözlenmez (Akay, 2006; Junqueira and Carneiro, 2005).

2.1.1.3. Fibröz kıkırdak (Fibro kıkırdak)

Fibröz kıkırdak, sıkı bağ dokusu ile hiyalin kıkırdak arasında bulunan bir dokudur. İntervertebral disklerde, dizin artikular disklerinde, menüsküste ve tendonların kemiklere bağlandığı bölgelerde bulunmaktadır. Fibröz kıkırdak, kondrosit ve bağ doku elemanlarıyla beraber bağ doku yapılarını da içermektedir. Kondrositler kollajen fiberleri boyunca dağılmıştır ya da izojen gruplar içerisinde yer alır (Şekil 2.6). Görünümleri hiyalin kıkırdak ile aynıdır, ancak matris ile daha az temas halindedir ve perikondrium içermez. Tip I kollajence zengin olan matrisi asidofilik karakterdedir. Az miktarda amorf bir matris ile çevrili kondrositler yuvarlak bir çekirdeğe sahipken, fibroblastların uzun çekirdekleri bulunmaktadır. Demetler halinde düzenlenmiş fibröz bağ dokusuna sahip olmasından dolayı bu kıkırdak türü, vücutta basınca en dayanıklı bölgelerde bulunmaktadır (Akay, 2006; Junqueira and Carneiro, 2005; Henrikson *et al.*, 1997).

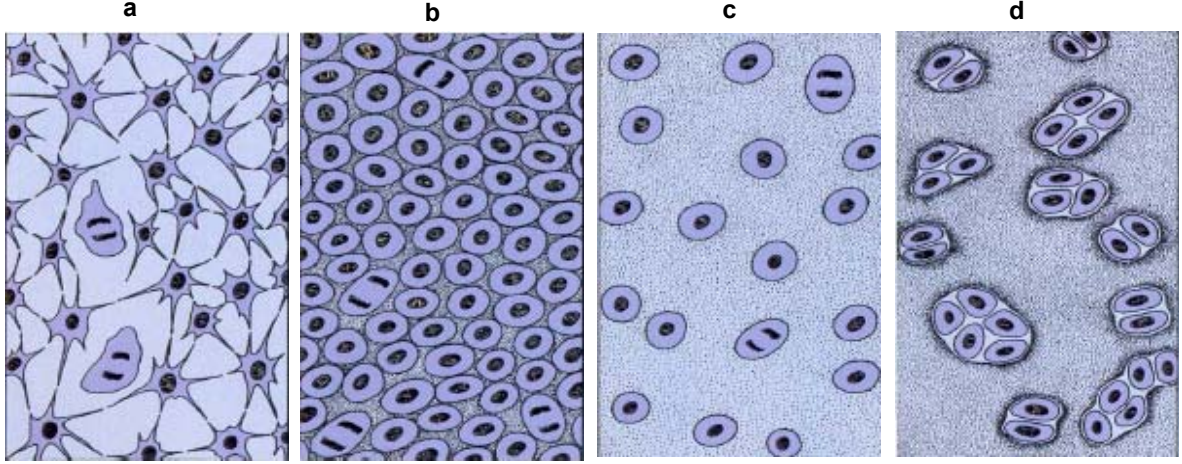


Şekil 2.6. Fibro kıkırdak (a) histolojik kesit görüntüsü, (b) elektron mikroskop görüntüsü.

2.1.2. Kıkırdak doku oluşumu ve gelişimi

Kıkırdak doku mezenkimden köken alır. Kıkırdak gelişimi mezenkimal hücrelerin kümelenmesi ile başlar. Bu kümelenme hiyalin kıkırdak yapısını oluşturmaya başlar. Öncül kıkırdak dokuya “blastema (prokondral doku)” denir. Blastema hücreleri matrisi salgılamaya başladıkları zaman “kondroblast” adını alır ve

matrisin içerisinde hareket etmeye başlar. Matris sentezi hücrelerin birbirlerinden uzaklaşmasını sağlar ve hücreler tamamen matris ile çevrelendiklerinde “kondrosit” adını alırlar (Şekil 2.7). Kondrojenik blastemayı saran mezenkimal doku daha sonra perikondriyumunu oluşturur.



Şekil 2.7. Kıkırdak histogenezi. (a) Mezenkimal hücreler, (b) Farklılaşma aşamasında mezenkimal hücrelerin hızla çoğalıp yuvarlaklaşması, (c) Yoğun matris sentezi sonucu kondroblastların merkezden çevreye doğru birbirlerinden uzaklaşması ve kondrosit hücrelerini oluşturmaları, (d) kıkırdak hücrelerin çoğalması ile oluşan izojenik grup kümeleri ve grupları çevreleyen teritoryal (kapsül) matris (Junqueira and Carneiro, 2005).

Kıkırdak doku gelişimi apozisyonel (yüzeysel) ve interstisiyel (iç) büyüme olmak üzere iki yönde ilerlemektedir.

Apozisyonel büyüme esnasında perikondriyumun matris içeriğini (tip I kollajen) salgılayan ve perikondriyumun iç kısmında bulunan fibroblast benzeri hücreler yeni kıkırdak hücrelerini oluşturur. Hücrelerin sitoplazmik aktiviteleri durur, çekirdek yuvarlaklaşır, sitoplazma içeriği artar ve belirginleşir. Böylece hücre *kondroblast* halini alır. Kondroblast tip II kollajen salgılamaya başlar. Oluşan yeni matris kıkırdak kütlesini artırır.

İnterstisiyel büyümede kıkırdak içerisindeki hücreler yeni kıkırdak hücrelerini oluşturur. Lakuna içerisindeki hücreler bölünerek yeni hücreleri meydana getirir ve

hücre dışı matris sentezlenmeye başlanır. Bu noktada hücreler matris ile çevrelenerek kendi lakunalarını oluşturur ve matris sentezi devam ettikçe birbirlerinden ayrılırlar. İnterstisiyel büyüme uzun kemiklerin epifizyal plaklarında ve artikular kıkırdakta görülmektedir.

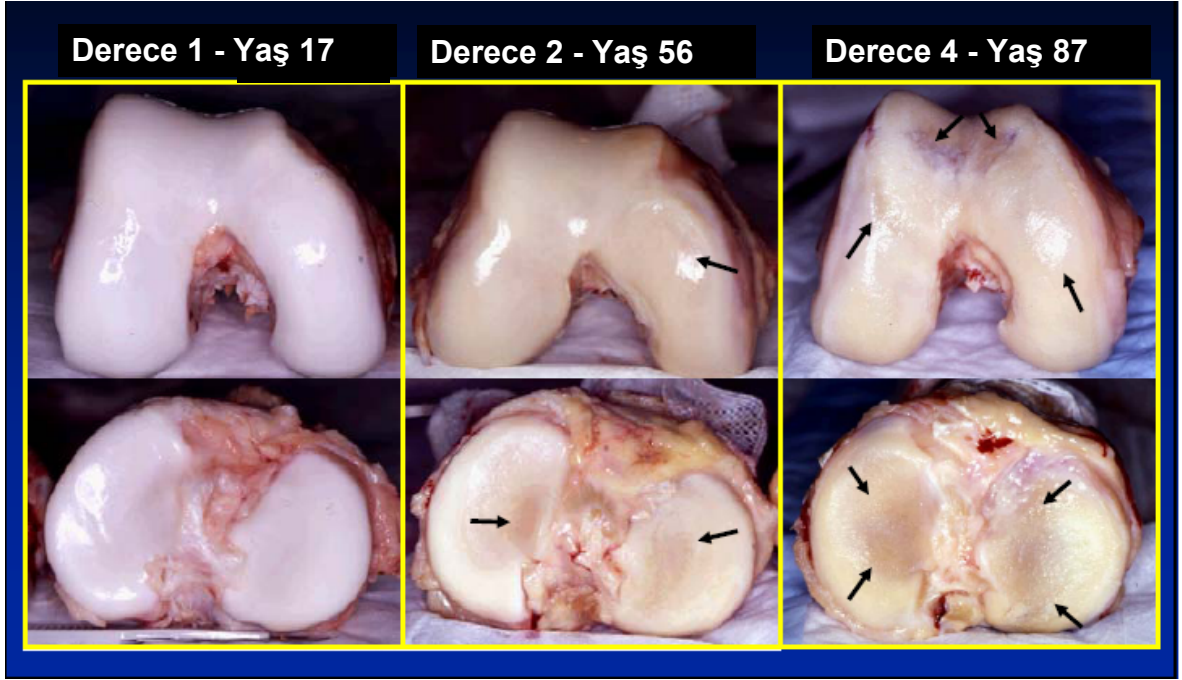
2.1.3. Kıkırdak doku onarımı ve rejenerasyonuna yönelik doku mühendisliği yaklaşımları

TiGenix (Belçika) şirketi tarafından 2007 yılında yapılan araştırmaların sonucunda sadece Amerika Birleşik Devletleri ve Avrupa'da yılda 2 milyon hastanın kıkırdak doku kaybına uğradığı tespit edilmiştir. Bunların 130 binden fazlasının 3. ve 4. dereceden kıkırdak doku defektine sahip olduğu saptanmıştır. Yine aynı şekilde yetişkin nüfusunun yüzde 2.5 ila 5' inin *septomatik osteoartrit* tanısıyla tedavi gördüğü saptanmıştır.

Kıkırdak doku onarımı için en çok uygulanan tedavi yaklaşımları; estetik ve ortopedik ameliyatlar, doku transplantasyonu ve protez uygulamalarıdır. Ancak bu yöntemlerin pek çok dezavantajı bulunabilmektedir. Cerrahi müdahalelerde; uzun vadede rahatsızlığın tekrarlanması gibi sorunlar ortaya çıkabilmektedir. Doku nakillerinde ise, verici doku bulmadaki zorluklar, graftın immün sistem tarafından reddi ve graftın hasarlı bölgeye uygulanması sırasındaki teknik sorunlar karşılaşılan problemlerin başında gelmektedir. Ayrıca kıkırdak dokunun vücudun her yerinde aynı mekanik dayanıma sahip olmaması, özellikle ototransplantasyonlarda istenilen mekanik dayanımın sağlanmasını engelleyen bir diğer güçlüğü oluşturur. Kıkırdak doku tamirinde, metal veya plastik biyomalzemelerin eklem protezi olarak kullanıldığı uygulamalara oldukça sık rastlanmaktadır. Ancak bu uygulamalar; protezin zamanla aşınması, enfeksiyon, yeterli mekanik dayanımın sağlanamaması ve protezin dokuya tutunamaması gibi sorunları da beraberinde getirebilmektedir (Gümüşderelioğlu et al., 2008).

Son yıllarda yükselen hayat standartlarının beraberinde getirdiği klinik ihtiyaçlar kıkırdak doku mühendisliğinin gelişimini olumlu yönde etkilemektedir. Sadece kaza veya yaralanmalar sonucu gelişen kıkırdak doku kayıpları değil, kıkırdak dokunun yavaş rejeneratif özelliğinden dolayı ileriki yaşlarda karşılaşılabilecek doku

hasarları (Şekil 2.8), kıkırdak doku onarımı ve rejenerasyonuna yönelik doku mühendisliği yaklaşımlarını önemli kılmaktadır.



Şekil 2.8. Artikular kıkırdak doku hasarlarının dereceli olarak gösterimi.

Günümüzde kıkırdak doku onarımı ve rejenerasyonu için kullanılan doku mühendisliği yaklaşımları şöyle sıralanabilir;

1) Yeni izole edilmiş ya da kültürü yapılmış hücrelerin implantasyonu; herhangi bir doku iskelesi kullanmadan hücre gruplarının doğrudan hasarın olduğu bölgeye enjekte edilmesi.

2) *In vitro* da üretilmiş hücre ve doku iskelesinden oluşan biyohibrid malzemenin implantasyonu; Otolog hücreler ya da allojenik hücrelerin bir doku iskelesi aracılığıyla hasarlı bölgeye implante edilmesi.

3) Kontrollü ilaç salım sistemleri ile doku mühendisliği tekniklerinin birleştirilmesi ve kıkırdak doku onarımına gidilmesi.

Yapılan tüm çalışmalar ve doku mühendisliğindeki son gelişmeler ışığında kıkırdak doku rejenerasyonunda; uygun hücrelerin seçilmesi, özel olarak dizayn edilmiş

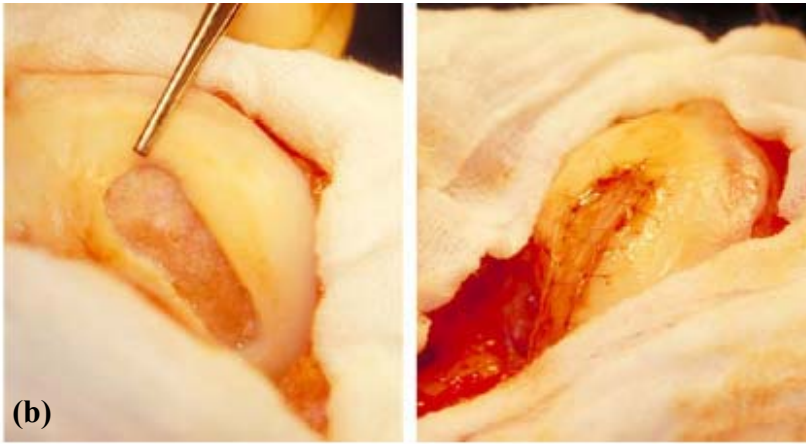
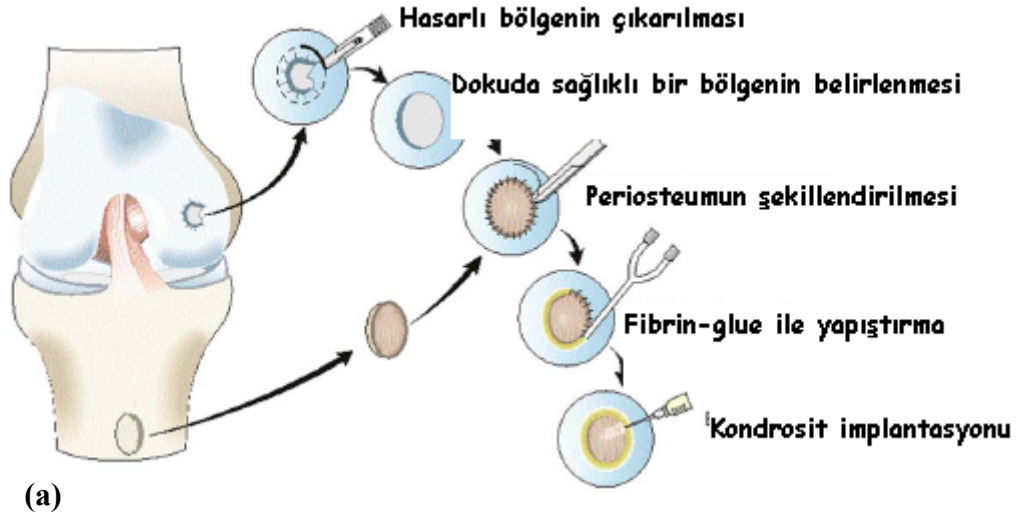
doku iskelelerinin kullanımı, biyoreaktör kullanımı ile oluşturulan dokunun mekanik olarak uyarılması ve çeşitli büyüme faktörlerinin kullanılması gibi parametrelerin bir araya getirilmesiyle büyük bir gelişme kaydedilmiştir (Meyer, 2006).

2.1.3.1. Kondrosit transplantasyonu (Autologous chondrocyte implantation: ACI)

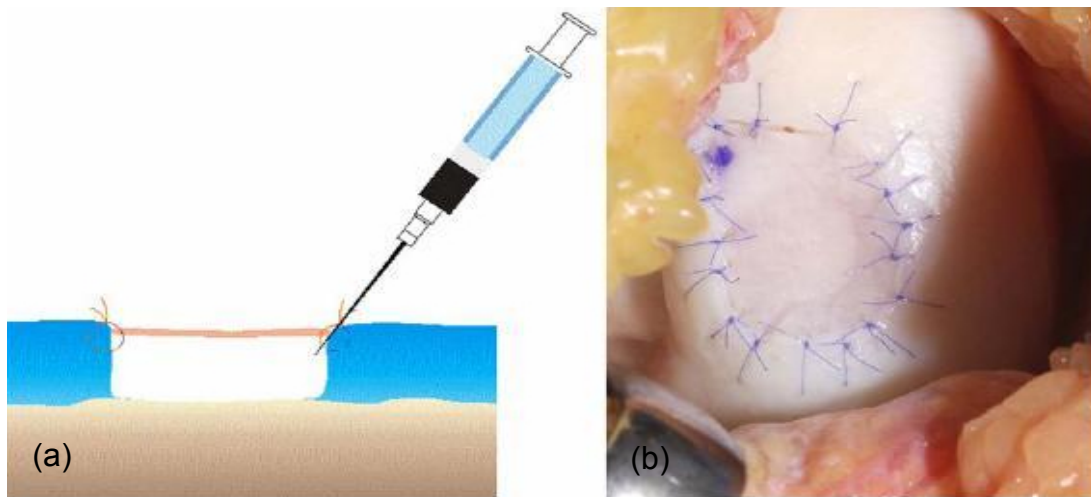
Herhangi bir doku iskelesi kullanılmadan hastanın kendisinden alınan sağlıklı hücrelerin hasarlı bölgeye implante edilmesi, klinikte kırıldak doku hasarlarının onarılmasında uygulanan yöntemlerden biridir. ACI, kırıldak doku rejenerasyonunda kullanılan ve süspanse haldeki kondrositlerin hasarlı bölgeye implantasyonunu dayanan bir yöntemdir. Brittberg tarafından 1994 de uygulanan bu yöntem, 1997 yılında FDA tarafından onaylanmıştır. Daha sonra bu yöntem Carticel® adıyla piyasaya sürülmüştür. Bugüne kadar yaklaşık 12.000 hasta bu yöntemle tedavi olmuştur (Marlovits et al., 2006). ACI 3 grupta incelenebilir: Birinci jenerasyon ACI, ikinci jenerasyon ACI ve üçüncü jenerasyon ACI.

Birinci jenerasyon ACI, ACI ile ilgili yapılan ilk çalışmalardır. Öncelikle hasarlı bölge kırıldaktan çıkarılır. Daha sonra periosteumdan alınan parça hasarlı bölgeyi örtecek biçimde şekillendirilir. Oluşturulan parça, hasarlı kısmın alındığı bölgeye fibrin yapıştırıcı yardımı ile yerleştirilir ve üzerine otolog kondrosit implantasyonu yapılır (Şekil 2.9). Nedeni tam olarak bilinmemekle birlikte periosteumun kondrojenik bir rol oynadığı görülmüştür. Bu yöntemin, hasarlı bölgeden implante edilen hücrelerin uzaklaşması, fenotipik farklılaşmalarını kaybetmeleri ve homojen olmayan bir dağılım göstermeleri gibi birçok dezavantajı bulunmaktadır.

İkinci jenerasyon ACI uygulamalarda periosteal yapılar yerine çift tabakalı kollajen membranlar kullanılır (Şekil 2.10). Böylece cerrahi işlem kolaylaşır ve komplikasyonlar azaltılmış olur. Ghondro-Gide™, tip I/tip II kollajenden oluşan ve bu uygulamalarda kullanılan ticari bir üründür.

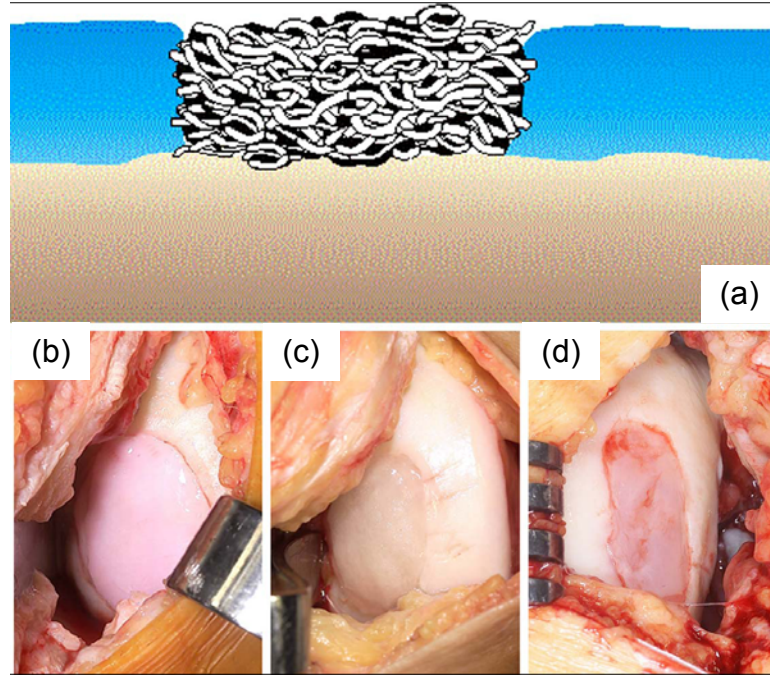


Şekil 2.9. Birinci jenerasyon ACL: (a) Şematik gösterim; (b) Klinik uygulamadan görünüm (Marlovits et al., 2006).



Şekil 2.10. İkinci jenerasyon ACL'nin şematik gösterimi (a) ve klinik uygulamalardan görünüm (b). Hasarlı bölge kollajen membranla dikildikten sonra hücre süspansiyonu enjekte edilir (Marlovits et al., 2006).

Biyomalzeme alanındaki gelişmeler *üçüncü jenerasyon ACI* çalışmalarına önderlik etmiştir. Bu tip çalışmalarda, hasarlı bölgenin kıkırdak dokusundan uzaklaştırılmasını takiben, hasarlı bölgeyi kapatacak, üç boyutlu biyomalzemeler doku içerisine yerleştirilir ve otolog kondrosit implantasyonu bu doku iskeleleri üzerinden gerçekleştirilir (Şekil 2.11). Bu yöntem “matris destekli otolog kondrosit implantasyonu” olarak adlandırılmış ve MACI™ adıyla piyasaya sunulmuştur. Yaygın olarak kullanılan biyomalzemeler, hyaluronan bazlı doku iskeleleri (Hyalograft C™), poliglaktin malzemeler (Bioseed-C™) ve üç boyutlu kollajen yapılarıdır (CaReS™). Yöntemde avantaj olarak, periostal kaplama veya matrislerin dikilmesi gibi komplikasyon yaratabilecek cerrahi işlemler yerine kondrosit ekilen doku iskelelerinin implantasyonu gerçekleştirilmektedir.



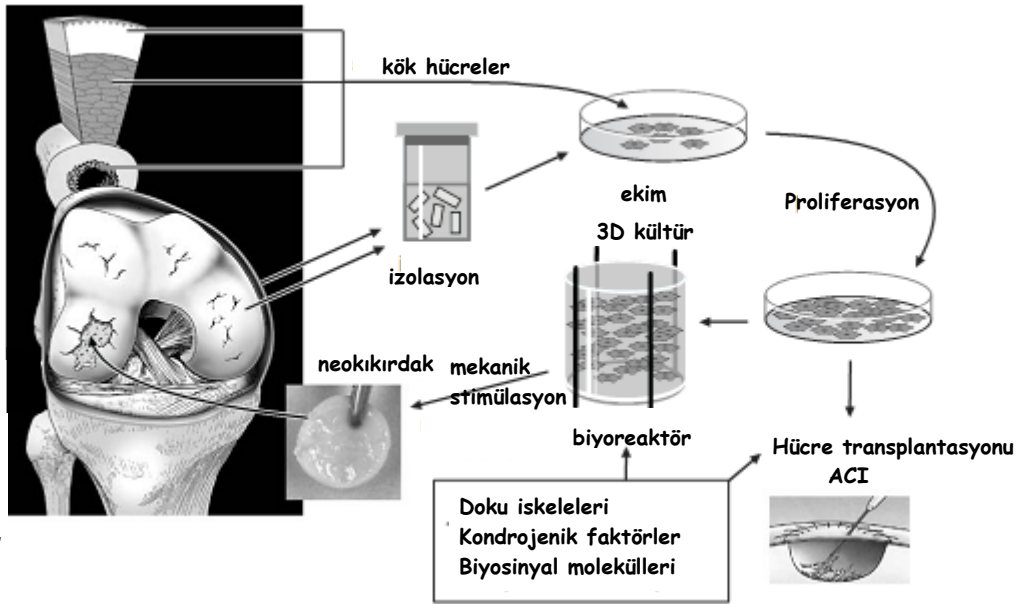
Şekil 2.11. Üçüncü jenerasyon ACI'nın şematik gösterimi (a) ve klinik uygulama görüntüleri. Kollajen membran MACI™ (b), hyaluran polimer Hyalogryft C™ (c) ve kollagen jel CaReS™ (d) (Marlovits et al., 2006).

Geliştirilen tüm bu yöntemlerin sonucunda, Brittberg ve arkadaşları ACI yöntemini kullanarak 23 hasta ile ilk raporunu sunmuştur. Sunulan raporda yaşları 14 ile 48 arasında değişen hastaların yaş ortalamaları 27'dir. Bu hastaların 13 tanesinde, 3 tanesi osteokondral olmak üzere, femoral kıkırdakta hasar, 7 tanesinde de platellar

kıkırdakta hasar tespit edilmiştir. Hasarın boyutları 1.6 ile 6.5 cm² arasında değişmektedir. ACI uygulamasından 2 yıl sonra 16 hastanın 14'ünde %87.5'lik iyileşme görülmüştür. Platellar hasarı bulunan hastalarda da, 2'si dışında, iyileşme kaydedilmiştir. 46 ay sonra 15 hastadan biyopsi alınmış ve 12'sinde %73'lük hiyalin kıkırdak oluşumu tespit edilmiştir. Bu ve bundan sonra yapılan çalışmalarda elde edilen başarılı sonuçlar ACI yönteminin klinikte tercih edilen bir yöntem olmasını sağlamıştır (Britterberg et al., 1994). Bununla beraber, ACI yönteminde karşılaşılabilecek bir sorun olan kontrolsüz hücre aktiviteleri, uzun süreli doku onarımları için dezavantaj yaratmaktadır ve yöntemin uygunluğu hala tartışılmaktadır (Nesic et al., 2006).

2.1.3.2. Hücre-doku iskelesi-biyosinyal moleküllü modeliyle kıkırdak doku mühendisliği yaklaşımları

Yukarıda bahsedilen yöntemlere alternatif olarak kıkırdak doku onarımında kullanılan bir diğer yöntem ise hücre-doku iskelesi-biyosinyal moleküllü (büyüme faktörü ve genler) modeli ile biyoreaktör sistemleri kullanılarak gerçekleştirilen doku mühendisliği yaklaşımlarıdır. Bu yaklaşımın temel amacı in-vitro ortamda neo-kıkırdak doku oluşumunu sağlamaktır (Şekil 2.12) (Nesic et al., 2006).



Şekil 2.12. Kıkırdak doku mühendisliği yaklaşımlarının şematik gösterimi (Nesic et al., 2006).

Yaklaşımında kullanılan doku iskeleleri modelde yapay ECM olarak görev alırken, hücrelerin ve/veya büyüme faktörlerinin de istenilen bölgelere lokal olarak taşınımını sağlamaktadır. Hücrelerin doku iskeleleri ile beraber başarılı bir doku oluşumuna gitmesi, kullanılacak olan biyosinyal moleküllerinin seçimi ile doğrudan bağıntılı olup hücre “de-diferansiyasyonunun” (farklılaşmanın kaybedilmesi) inhibe edilmesini gerektirmektedir. Hücre kaynaklarının seçimi, oluşturulacak kıkırdak dokunun kalitesi ve tedavi sırasında hasta yaşam kalitesinin korunması (immun yanıt geliştirme riski veya immunsüpresif tedavi gerektirmemesi) açısından önem arz etmektedir. Tüm bu yaklaşımların sonucunda kıkırdak doku kayıplarındaki hasar tipine ve hastaya özgü mühendislik stratejilerinin geliştiriliyor olması gelecekte bu konu hakkında önemli gelişmeler olacağına dair ip uçları sunmaktadır.

2.1.3.3. Gen terapi

Doku mühendisliği yaklaşımlarına alternatif olarak kıkırdak rejenerasyonunu kontrol altında tutmak için gen terapi tekniklerinin kullanımı da öngörülmüştür. Gen terapi tekniğinin en önemli avantajı kondrojenik bilgi taşıyan genlerin hücrelere transfekte edilerek genetik olarak hazırlanacak dokunun kontrolünü sağlayabilmektir (Risbud and Sitter, 2002). Viral (retrovirüs ve adenovirüs) ve nonviral (polimerler ve lipozomlar) ajanlar hücrelere transfekte edilerek uygulama gerçekleştirilmektedir. Viral vektörlerin transfeksiyon verimlilikleri yüksek olmasına karşın güvenilirlikleri düşüktür (Chung and Burdick, 2008). Hücreler ve doku iskelelerinin limitsiz kombinasyonları düşünüldüğünde, kıkırdak doku rejenerasyonu için uygulanan gen terapi pek çok araştırmaya konu olmaya devam edecektir.

2.2. Kıkırdak Doku Mühendisliğinde Kullanılan Hücre Kaynakları, Biyosinyal Moleküller ve Doku İskeleleri

2.2.1. Kaynaklarına göre hücreler

Hücreler, doku mühendisliği stratejilerinin vazgeçilmez elemanları olup kullanılacak olan hücrelerin sayısının, morfolojilerinin, gelişimlerinin, protein ve gen

ekspresyonlarının ve yara iyileştirme mekanizmalarının orjinal dokudakine eşdeğer olması beklenmektedir. Hücreler kaynaklarına göre 3 grupta incelenebilir: otolog, allojenik ve zenojenik hücreler. *Otolog hücreler*, hastanın kendisinden elde edilen hücre grubudur. Doku mühendisliği çalışmalarında ideal strateji, immünolojik cevap yaratmamaları nedeniyle, otolog hücrelerin kullanımıdır. Fakat hastadan alınan hücrelerin az sayıda olması ve hücre eldesi sırasında hastanın vücudunda yeni bir hasar oluşturulması nedeniyle otolog hücre kullanımı sınırlıdır. *Allojenik* hücreler ise farklı bir bireyden elde edilen hücrelerdir. Daha fazla miktarda hücrenin, daha ucuz bir şekilde ulaşılabilir olması, allojenik hücrelerin kullanımını avantajlı kılar. Bununla birlikte immünojenik cevap oluşturma ve hastalık geçişi riski bulunmaktadır. Bir diğer hücre kaynağı ise farklı türdeki canlılardan elde edilen *zenojik* hücrelerdir. Bu hücre grubu da ucuz ve kolaylıkla ulaşılabilme avantajının yanı sıra, immünolojik cevap oluşturma, hastalık ve hayvansal virüs geçişi riski gibi önemli dezavantajlara sahiptir (Pachence and Kohn, 2000).

Kıkırdak doku mühendisliği çalışmalarında kullanılan hücreler, “diferansiye olmuş” (farklılaşmış) hücreler, yani “kondrositler”, ve “kök hücreler” olarak da ele alınabilir. Sınırlı bölünme özelliğine sahip farklılaşmış hücreler, belli dokuya özgü fenotipe sahiptirler. Kök hücreler ise, yüksek bölünme potansiyeline ve farklılaşma kapasitesine sahip hücrelerdir. Kök hücrelerin yanı sıra embriyonik kök hücrelerin de uygun bir kaynak olduğu düşünülmektedir, ancak öncelikle bu hücrelerin klinikte kullanımlarıyla ilgili etik sorunların çözülmesi gerekmektedir (Bock and Goode, 2003). Ayrıca hücreler canlılardan izole edildikten sonra uygun kültür koşullarında üretilip kullanılabileceği gibi, hücre hatları da doku mühendisliği araştırmalarında sıkça tercih edilen hücre kaynaklarıdır (Heath, 2000). Doku mühendisliğinde kullanılan tüm bu hücreler bulundukları dokudan izole edildikleri için içsel etkileşimlerini kaybederler. Bu nedenle kullanılan hücrelerin, yapılan uygulamada, istenilen dokuyu oluşturmaları için gerekli biyosinyallerle uyarılmaları gerekir.

2.2.1.1. Kondrositler

Kondrositler özellikle otolog kondrosit implantasyonu uygulamalarında kullanılan en temel hücre grubudur. Hücreler, vücut içerisinde çok fazla mekanik kuvvete

maruz kalmayan bölgelerden (septal, auriküler ve kostal kıkırdak) izole edilir. İzolasyonu takiben hücrelerin farklılaşmasını kaybettiği (de-diferansiyasyon) gözlemlenmiştir. Hücrelerin yeniden farklılaşmalarını (re-diferansiyasyon), yani kondrogenezi sağlamak amacıyla TGF- β (transforme edici büyüme faktörü), BMP-2 (kemik morfojenetik protein), BMP-7, IGF (insülin benzeri büyüme faktörü) ve FGF (fibroblast büyüme faktörü) gibi biyosinyaller kullanılmaktadır (Nesic et al., 2006). Farklılaşmış kondrositler küresel morfolojiye sahiptir ve tip II kollajen ve glikozaminoglikan (GAG) gibi ECM molekülleri sentezlemektedirler. Kondrositler kıkırdak dokunun sadece %5-10'unu oluşturduğu için, izole edildikten sonra sürekli olarak çoğaltılmaları gerekmektedir. Daha önceden de belirtildiği gibi, bu işlemler sırasında hücrelerin farklılaşmalarının kaybedilebildiği bildirilmektedir. Farklılaşma için gerekli olan büyüme faktörlerinin yanı sıra, üç boyutlu bazı doku iskelelerinin ve biyoreaktör sistemlerinin de hücre fenotiplerinin korunmasında etkili oldukları ve yeniden farklılaşmayı tetikledikleri saptanmıştır (Chung and Burdick, 2008). Donörden izole edilen kondrositlerin sayısındaki kısıtlamalar ve hasta yaşam kalitesinin değişken olabilmesi nedeniyle doku mühendisliğinde kullanılmak üzere seçilen bu hücreler bazen uygulamalarda dezavantaj yaratmaktadır.

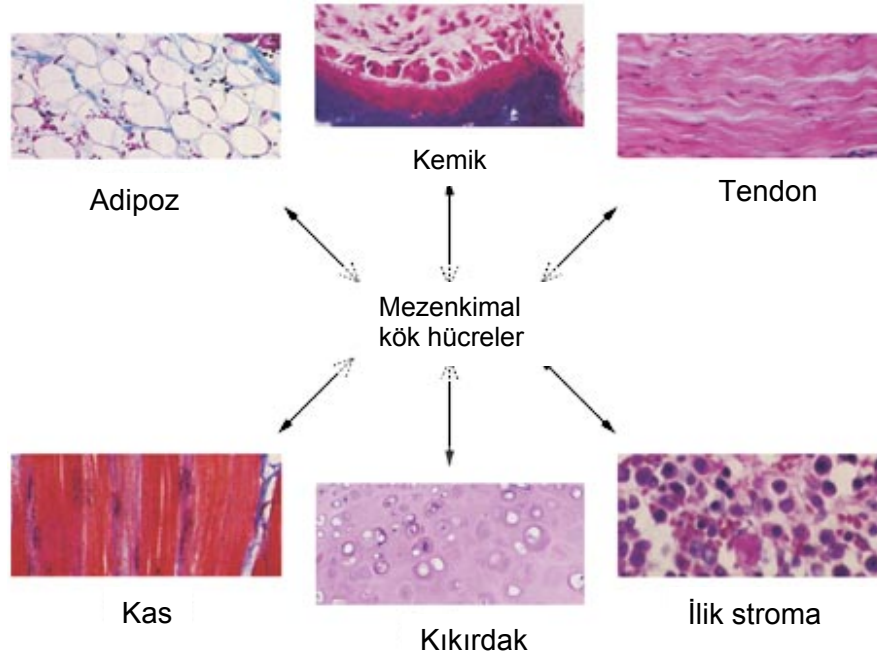
2.2.1.2. Embriyonik kök hücreler

Embriyonik kök hücreler (ESCs), blastositin iç hücre kitlesinden elde edilir. Bugüne kadar farelerde, primatlarda ve insanlarda başarıyla elde edilmişlerdir. Embriyonik kök hücreler, çok yüksek çoğalma ve farklılaşma kapasitesine sahiptirler. Yapılan çeşitli çalışmalarda bu hücrelerin kardiyomiyositlere, hematopoetik hücrelere, endotel hücrelerine, nöronlara, kondrositlere, adipositlere ve osteoblastlara farklılaşmalarının sağlandığı bildirilmiştir (Wobus *et al.* 1984; Thomson, 1998). Embriyonik kök hücrelerin kullanımında; etik sorunların yanı sıra seçici farklılaşmanın tam olarak sağlanamaması, teratom veya benzeri tümoral oluşumlara yol açabilmesi ve elde edilen dokunun immunolojik uyumsuzluğu gibi sorunlarla karşılaşılabilir (Akman, 2007). Daha önce yapılan birkaç çalışmada, kıkırdak dokunun embriyonik hücreler tarafından başarılı bir şekilde oluşturulduğu ve hücrelerin teratom yapı oluşturmaksızın homojen bir farklılaşma yönünde ilerlediği bildirilmiştir (Koay *et al.* 2007; Jukes et al., 2008). Bununla

beraber, embriyonik kök hücrelerin kıkırdak doku mühendisliği uygulamalarında kullanımları ve başarısı hakkında halen tartışmalar mevcuttur.

2.2.1.3. Mezenkimal kök hücreler

Mezenkimal kök hücreler (mesenchymal stem cells, MSC) potansiyel olarak kondrosit, osteoblast, fibroblast ve diğer mezenkimal doku hücrelerine dönüşebilen hücrelerdir (Şekil 2.13).



Şekil 2.13. Çoklu farklılaşma kapasitesine sahip olan mezenkimal kök hücrelerin farklı doku hücrelerine dönüşmesi (Tuan *et al.*, 2003).

MSC'ler, kondrositlere nazaran elde edilmesi daha kolay olan hücreler olup kemik, kemik iliği, kas ve adipoz (yağ) dokulardan türetilmektedirler. Kondrositlerin aksine farklılaşma potansiyellerini ancak çoklu pasajlardan sonra kaybedebilirler (Nesic *et al.*, 2006). Kemik iliği ve adipoz dokulardan elde edilen MSC'ler *in vitro* ve *in vivo* kıkırdak doku mühendisliği uygulamalarında kullanılmış ve çarpıcı sonuçlar elde edilmiştir (Wakitani *et al.* 1994; Im 2005; Wang *et al.* 2005; Jin *et al.* 2007; Kisiday *et al.* 2008). Mezenkimal kök hücreler çoklu üreme potansiyellerinden dolayı tercih edilmektedir. Fakat elde edilen hücrelerin sayıca az olması nedeniyle, hedef hücre sayısına ulaşılabilmesi için gerekli büyüme faktörleri varlığında *in vitro* çoğaltma basamaklarına ihtiyaç duyulmaktadır

(Salgado et al., 2004). MSC'lerin farklılaşmasını uyaran birçok sinyal tespit edilmiştir. FGF'in mezenkimal kök hücrelerin bölünme hızını ve hayatta kalma süresini attırdığı gözlenmiştir. BMP-2, MSC'leri kondrojeniz için uyarırken TGF- β kollajen II sentezini artırır. Ayrıca IGF'in de kondrojenizde rol aldığı bilinmektedir.

MSC'ler için diğer bir potansiyel kaynak embriyonik kök hücrelerdir. Embriyonik hücrelerden türetilmiş mezenkimal kök hücrelerin ihmal edilebilir teratom oluşturma riskiyle beraber elde edilen hücreler çoklu üreme özelliklere sahiptir. Dolayısıyla embriyonik kök hücreler ve mezenkimal kök hücreler dezavantajlarına rağmen alternatif hücre kaynakları olarak düşünülmektedir (Sze et al. 2007). Bununla beraber, literatürde doku mühendisliği çalışmaları için embriyonik kök hücrelerden türetilmiş mezenkimal kök hücrelerle yapılan pek az çalışma yer almaktadır (Hwang et al. 2006; Karp et al. 2006; Wu et al. 2006; Sze et al. 2007).

2.2.4.1. ATDC5 kondrojenik hücre hattı (fare embriyonel karsinoma hücre hattı)

Kondrositlerin ve kök hücrelerin pahalı ve zahmetli eldesi nedeniyle tümör kaynaklı hücrelerden izole edilen ve ölümsüzleştirilen hücre hatları kıkırdak doku mühendisliği uygulamalarında kullanılmaktadır. ATDC5 hücre hattı kondrojenik farklılaşma çalışmaları için model olarak kullanılan fare kökenli hücre hattıdır (Fujita et al., 2004). Farklılaşmamış prekondrojenik hücre karakteristiği sergileyen ATDC5 hücreleri çeşitli büyüme faktörleri varlığında farklılaşma kapasitesine sahip olup, kondrojeniz araştırmaları için potansiyel bir hücre hattı olarak rapor edilmiştir (Tare et al., 2005).

2.2.2. Kıkırdak doku mühendisliğinde kullanılan biyosinyal moleküller

Vücudun doğal işleyiş mekanizmasında çok önemli roller üstlenen biyosinyal moleküller, izole edilerek, rekombinant DNA teknolojilerindeki gelişmeler sayesinde büyük ölçekli üretilmekte, doku mühendisliği çalışmalarında ve klinik tedavilerde kullanılabilmektedir (Kempen et al., 2008). Doku mühendisliği çalışmalarında, biyosinyaller hücre kültür ortamında destekleyici olarak kullanılabileceği gibi çeşitli yöntemlerle doku iskelelerine immobilize edilebilir

ve/veya yüklenebilirler. Böylelikle, doku iskeleleri vücuda implante edildiklerinde, hasarlı bölgedeki hücrelere de etki edebilmeleri planlanmaktadır. Hücresel fonksiyonların düzenlenmesi için kullanılan biyosinyal molekülleri; hormonlar, sitokinler ve büyüme faktörleri olarak kategorize edilmektedir. Hormonlar özelleşmiş endokrin bezleri tarafından sentezlenirler ve vücut sıvısı ile taşınarak hücreler için kimyasal haberci olarak çalışırlar. Sitokinler zarar görmüş veya enfekte olmuş dokulara etki eden ve immün hücreler tarafından salgılanan moleküllerdir. Bununla birlikte, diğer hücre çeşitleri de sitokin salgılayabilirler. Büyüme faktörleri birçok dokudaki hücrelerde sentezlenip, salgılanırlar ve çevredeki hücrelere etki ederler. Bazen gizli olarak salgılanan büyüme faktörleri, proteolitik ayrılmaya ve hücre reseptör bağlanmasına ihtiyaç duyan hücre dışı matris elemanlarına bağlanabilirler. Kıkırdak doku mühendisliği uygulamalarında kullanılan sitokinler ve büyüme faktörleri, düzenleyici etkileri ile Çizelge 2.1’de özetlenmiştir (Holland and Mikos, 2003).

Çizelge 2.1. Büyüme faktörleri ve sitokinlerin kıkırdak doku üzerindeki düzenleyici etkisi .

Büyüme faktörü/sitokin*	Düzenleyici Etki
TGF- β 1, IGF-1, PDGF	Progenitör hücrelerin kondrojenik farklılaşması
TGF- β 1, IGF-1, FGF, EGF	Kondrosit proliferasyonu
TGF- β 1, BMP-2, 4, 6, 7, IGF-1	Matris sentezi
TGF- β 1, IGF-1, IL-4, 6	Matris metalloproteinaz (MMP) inhibisyonu
TGF- β 1, FGF	İnflamatuar hücrelerin hareketi
TGF- β 1, BMP-2, FGF, PDGF, VEGF	Osifikasyon (kemikleşme)
FGF, PDGF, IL-1 β , 17, 18, TNF- α	MMP aktivasyonu
BMP-2, FGF, PDGF, EGF, IL-1 β , 18, TNF- α	Matris degradasyonu

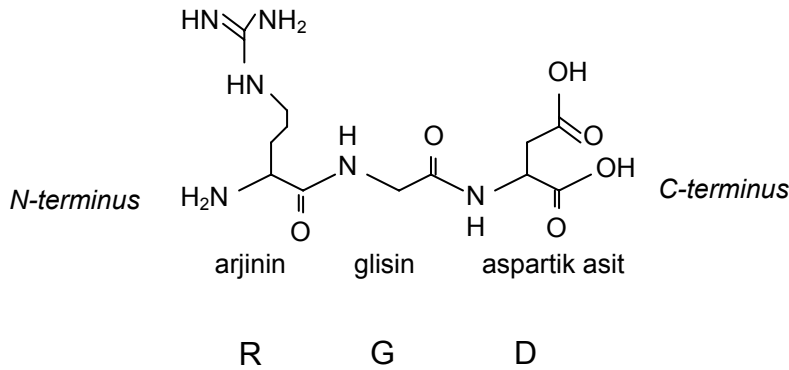
* TGF (transforme edici büyüme faktör), IGF (insülin büyüme faktörü), BMP (kemik morfogenetik büyüme faktörü), EGF (epidermal büyüme faktörü), FGF (fibroblast büyüme faktörü), PDGF (transforme edici büyüme faktörü), VEGF (vasküler endotel büyüme faktörü), TNF (tümör nekroz faktör), IL-1 β (interlekün-1beta).

Yukarıda sözü edilen tüm sitokinler ve büyüme faktörlerinin dışında, biyosinyal molekül olarak, biyomalzemelerin hücrelerle olan etkileşimlerini arttırdığı bilinen hücre yapıştırıcı proteinler (fibronektin, laminin vb.) ve kısa peptid zincirleri de kullanılmaktadır. Hücre-yapıştırıcı peptidler, ECM proteinlerinin yapısında bulunan ve hücre reseptörleri ile etkileşebilen kısa ya da uzun zincirli sekanslardır. Kısa peptid zincirleri tek bir dizilim içerdiğinden, selektif olarak tek bir hücre reseptörüne yönelmekte ve spesifik etkileşimlerin arttırılması açısından önemli bir avantaj sağlamaktadır (Hersel et al., 2003).

Aşağıda, sunulan tez çalışması kapsamında kullanılan biyosinyal moleküllere yer verilmiştir.

2.2.2.1. Arjinin-Glisin-Aspartik asit (Arg-Gly-Asp, RGD)

Hücre yapışmasını destekleyen kısa peptid zincirleri arasında, fibronektinin Arjinin-Glisin-Aspartik asit (Arg-Gly-Asp, RGD) sekansı, doku mühendisliği uygulamalarında en çok uygulanan ve en etkili peptid sekansıdır (Şekil 2.14).



Şekil 2.14. RGD peptid sekansının moleküler formülü ve isimlendirmesi.

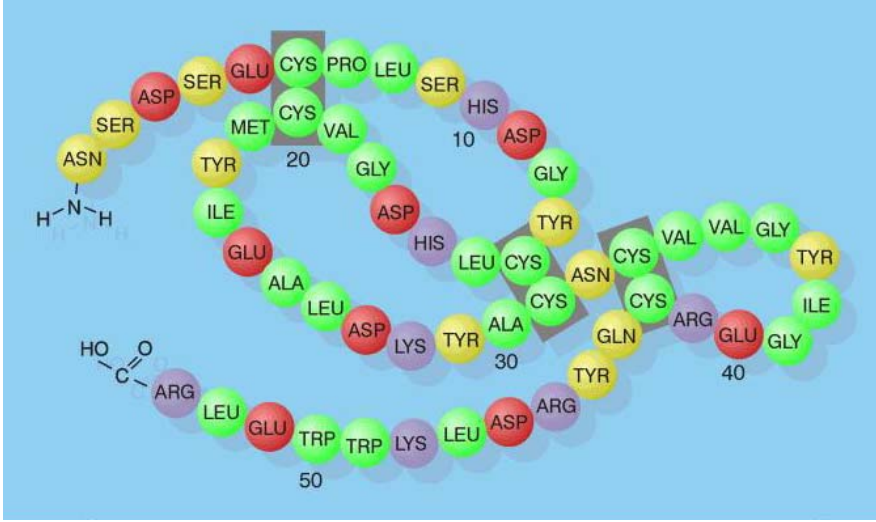
Çok hücreli organizmalarda, hücrelerin komşu hücrelerle ve hücre dışı matrisle olan etkileşimi hücre yapışma reseptörleri aracılığı ile gerçekleşmektedir. Bu reseptörler arasında integrin ailesi sayıca en fazla ve en sık rastlanan grubu oluşturmaktadır. İntegrinler, hücre farklılaşması, embriyogenez, yara iyileşmesi ve hemostaz gibi proseslerde önemli rol oynayan reseptörlerdir. Birden fazla hücre

reseptörü ile etkileşebilmesi ve hücre davranışı üzerindeki biyolojik etkileri nedeniyle RGD sekansı ya da bu sekansı içeren peptid zincirlerinin kullanımı tercih edilmektedir. RGD peptidi, bir yüzey üzerine immobilize edildiğinde ligand görevi görerek fibronektine benzer şekilde hücre yapışmasını desteklerken, çözünmüş olarak ortamda bulunduğunda hücre yapışmasını inhibe etmektedir. RGD sekansının, fibronektinin dışında, vitronektin, fibrinojen, osteopontin ve laminin gibi ECM proteinlerinin yapısında da olduğu tespit edilmiştir (Hersel et al., 2003).

2.2.2.2. Epidermal büyüme faktörü (EGF)

EGF, 53 amino asit'ten oluşan üç disülfid bağına sahip bir oligopeptit'dir (Şekil 2.15). Genellikle tükürük bezlerinde bir arjinin esteraz ile kombine olmuş durumda bulunur. Epitel dokuda EGF son derece hızlı bir biçimde hücrelere molekül taşınımını hızlandırır, bunu RNA sentezlenmesinde bir yükseliş ve ribozomların polizomlara dönüşüm oranında bir artış izler. EGF reseptöründe de intrinsik tirozin kinaz aktivitesi vardır. Reseptöre EGF bağlanır bağlanmaz reseptördeki kinaz domain'i reseptör'ün tamamını ve çeşitli sinyal transdüksiyonu gruplarını fosforile ederek aktivasyonu gerçekleştirir (Wells et al., 1990). EGF'nin memelilerde bilinen biyolojik aktivitelerinden bazıları şunlardır (Cohen, 1986):

- Epidermis'in oluşumunu, farklılaşmasını artırır ve keratinize olmasını sağlar.
- Fetal pulmoner epitel dokusunun büyüme ve olgunlaşmasını hızlandırır.
- Sindirim sistemi mukozasında ornitin dekarboksilaz aktivitesini ve DNA sentezini artırır.
- Korneal epitelyumda yara iyileşmesini ve membran proteinlerin fosforilasyonunu hızlandırır.
- Mezodermal ve ektodermal kökenli pek çok hücre tipi için çoğaltıcı etkilere sahiptir.
- Bazı karsinoma tipleri için negatif büyüme etkilerine sahiptir.



Şekil 2.15. EGF molekülünün amino asit dizilimi.

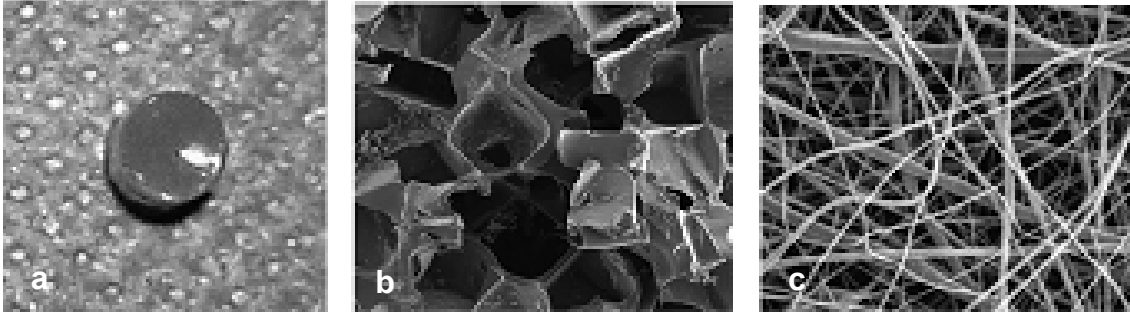
2.2.2.3. Kemik morfogenetik protein-6 (BMP-6)

(TGF- β) süper ailesinin bir üyesi olan kemik morfogenetik proteinler (BMP) yapısal ve fonksiyonel açıdan en az 15 alt gruba sahiptir. Kemik morfogenetik proteinler kıkırdak ve kemik doku oluşumu için belirlenen protein düzenleyiciler olarak görev yapmaktadırlar. Bununla beraber, BMP'ler çeşitli doku ve organların embriyogenez ve morfogenez aşamalarında yer alıp, mezenkimal kök hücrelerin, epitel hücrelerin, hematopoietik hücrelerin ve nöronların büyüme, farklılaşma, kemotaksis ve apoptoz fonksiyonlarını düzenlerler. BMP-6 da BMP'lere bağımlı olan bu gruplardan bir tanesi olarak bilinmektedir. BMP-5, -6, -7 ve -8 aminoasit sekans benzeşmesinden dolayı aynı alt grup içerisinde yer almaktadırlar. Ayrıca, ergin insan ve fare BMP-6 amino asit sekansları %96 oranında benzeşmektedir. BMP-6 büyük bir öncül protein olup, aminoasit sekanslarında dibazik ayrılma bölgesindeki (RXXR) karboksi-terminallerinin yapıya katılması ile sentezlenmektedir. Biyolojik olarak aktif BMP-6, yapısal olarak disülfid-bağlı bir homodimer protein olup, 132 amino asit karboksi-terminalinden oluşmaktadır. Karakteristik olarak yapısında bulunan yedi sistein, sistein düğümlerini ve tekli içsel bağılı disülfid bağlarını oluşturmaktadır. BMP-6 ile hücrel etkileşimler, tip I ve tip II serin/teonin kinaz reseptörlerinin hetero-oligomerik kompleksleri oluşturmasıyla sağlanmaktadır (Ebendal et al., 1998; Reddi, 1998).

BMP-6, TGF beta ailesinin bir alt grubu olmasından dolayı kondrojeniz için ihtiyaç duyulan önemli bir büyüme faktörü olduğu bildirilmiştir (Kameda et al. 2000; Sekiya et al. 2001). Bununla beraber, mezenkimal kök hücrelerin kondrojenik farklılaşmasını indüklemek üzere eklenen BMP-6'nın gerekliliği literatürde çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (Indrawattana et al., 2004; Estes et al., 2006; Hennig et al., 2007).

2.2.3. Kıkırdak doku mühendisliğinde kullanılan doku iskeleleri

İzole edilen hücrelerin istenilen dokuyu oluşturabilmeleri için uygun bir çevre sağlayan destek malzemelerine ihtiyaç duyulmaktadır. Gerçek doku mikroçevresine benzer olarak üç boyutlu (3D) yapıda inşa edilen bu destek malzemeleri *doku iskeleleri* olarak adlandırılmaktadırlar. Dokularda hücrelerin tutunmaları çeşitli proteinlerden oluşan ve hücre dışı matris (ECM) olarak adlandırılan bir protein tabakasının etkileşimi yoluyla gerçekleşmektedir. Dolayısıyla, hücrenin bulunduğu dokunun içindeki yerinin belirlenmesi ve bir anlamda tanınması sağlanmaktadır. Dokularda bulunan ECM, hücreler için fiziksel destek sağlamasıyla beraber, hücrelerin gelişmesini, farklılaşmasını ve işlevselliğini sağlamaktadır. Bu anlamda doku iskeleleri, yapay bir ECM olarak işlev görmektedirler. Doku iskelesi, doku yapılarını en iyi biçimde taklit etmek durumunda olduğundan, doku modellenmesi ve iskele dizaynı, doku mühendisliğindeki önemli konuların başında gelmektedir. Dolayısıyla, doku iskelesi dizaynı için kullanılacak olan materyallerin çeşitli özelliklere sahip olması gerekmektedir. İdeal bir doku iskelesi (1) yüksek gözenekliliğe ve geniş yüzey alanına sahip olmalı (2) biyobozunur malzemelerden üretilmiş olmalı ve parçalanma hızı yeni doku oluşum hızıyla dengede olmalı (3) istenilen doku oluşumu için yeterli mekanik dayanıma sahip olmalı (4) biyouyumlu malzeme olmalı (istenmeyen doku tepkimelerine yol açmamalı) (5) doku iskelesi hücrelerle etkileşebilecek yüzey kimyasına sahip olmalı (hücre yapışması, farklılaşması ve işlevini arttırıcı yüzey kimyasına sahip olmalı) (6) istenilen şekil ve boyutta üretilebilir olmalıdır (Chung and Burdick, 2008). Kıkırdak doku mühendisliğinde doku iskelesi için kullanılacak olan malzemeler genellikle polimerik malzemeler olup, hidrojel, süngerimsi yapı ve fiber ağ (mesh) formları en çok kullanılan yapılar olarak belirlenmiştir (Şekil 2.16).



Şekil 2.16. Kıkırdak doku mühendisliğinde kullanılan değişik yapılardaki doku iskeleleri (a) hidrojel, (b) sünger yapı, (c) fiber ağ yapı (Chung and Burdick, 2008).

Hidrojeller, büyük ölçüde sıvı emme özelliğine sahip, çözünmez ağ (network) yapısında hidrofilik polimerler olup, hücre ve biyoaktif ajanların taşınımı için uygun materyallerdir. Ayrıca, hidrojeller, her boyuttaki defektleri doldurabilen enjekte edilebilir materyaller olduğundan çokça tercih edilen doku iskeleleri olarak kullanılmaktadırlar. Hidrojeller, hücreler için gerekli olan besinlerin ve atık maddelerin aktarımlarını desteklemelerinin yanısıra çapraz bağlı yapıları nedeniyle mekanik olarak kuvvetlidirler. Bu sayede hücrelere etki eden mekanik yükleri rahatlıkla kontrol altına alabilirler.

Süngerimsi yapıdaki doku iskeleleri, gözenekli doku iskeleleri olup, özellikleri gözenek boyutu, gözeneklilik ve içsel bağlantılıklarına (interconnectivity) bağlıdır. Gözeneklilik, hücre yapışma için yüzey alanını etkilerken, gözenek boyutu ve içsel bağlantılık, hücre göçü (migrasyonu), matris depolanması ve dağılımı, besin maddeleri ve atık maddelerin taşınımına etki etmektedir. Süngerimsi yapıdaki doku iskelelerini üretebilmek için porojen uzaklaştırma, dondurarak kurutma ve gaz köpüklendirme gibi geleneksel yöntemlerden yararlanılmaktadır. Söz konusu fabrikasyon metotları doku iskelesi yapısını ve bağımlı olarak doku oluşumunu etkilemektedir. Bu yöntemler bir sonraki bölümde kısaca özetlenmektedir (Chung and Burdick, 2008).

Fiber ağ yapısındaki doku iskeleleri, örülmüş (woven) ve örülmemiş (non-woven) fiberlerden oluşturulmuş olup, hücre davranışlarını malzemelerin boşluk hacimleri, fiber çapları ve çoklu fiber yapıları yönlendirmektedir. Örülmemiş fiber iskeleler

yüksek boşluk hacimlerine sahip iken, örülmüş fiber iskeleler yüksek mekanik dayanımlara sahiptir. Genelde, fiber ağ yapısındaki doku iskeleleri *in vitro* kültür çalışmalarından sonra vücut içine implante edilebilir şekilde hazır halde getirilebilir iken, düzensiz yapıdaki doku defektleri için uyumsuz yapılardır. Kıkırdak doku için implante edilen iskelenin tamamıyla çevre dokularla bağlantısının olması gerektiğinden, fiber ağ yapıdaki doku iskeleleri düzensiz yapıdaki ve kalın defektlerde uyumsuzluk yaratabilmektedir. Üç boyutlu fiber depolama ve elektro eğirme yöntemleri, mikro ve nano boyutta fiberler oluşturarak ağ yapıdaki doku iskelesi üretme yöntemlerindendir. Son yıllarda elektro-eğirme (electrospinning) yöntemiyle hazırlanan nano fiberler, kıkırdak doku yapısında bulunan nano boyuttaki kollajen fiberleri taklit edebilmesi açısından kıkırdak doku mühendisliği için önemli bir fabrikasyon yöntemi olarak önem kazanmıştır (Chung and Burdick, 2008).

2.2.3.1. Doku iskelesi fabrikasyon yöntemleri

Doku iskelelerinin sahip olması gereken önemli fiziksel özellikleri (gözeneklilik, mekanik dayanım) ve hasara özgü geometriye sahip doku iskelelerinin hazırlanması, tercih edilen fabrikasyon yönteminin teknolojik altyapısına ve başarısına bağlıdır. Doku iskelesi fabrikasyon yöntemleri *geleneksel yöntemler* ve *serbest katı hal yöntemleri* olarak iki grupta toplanmaktadır. Geleneksel yöntemlerden kaynaklanabilen yetersiz gözeneklilik kontrolü ve iskele geometrisi, serbest katı hal üretim yöntemlerinin ortaya çıkmasına neden olmuştur. Fiber bağlama, elektro-eğirme, çözücü-dökümü/parçacık uzaklaştırma, faz ayrımı ve dondurarak kurutma, geleneksel yöntemler olarak sıklıkla kullanılmaktadır. Serbest katı hal yöntemlerinde, bilgisayar destekli tasarım (CAD), bilgisayarlı tomografi (CT), manyetik rezonans görüntüleme (MRI) verileri gibi bilgisayar ortamından aktarılan veriler kullanılarak doku iskelesi üretimi yapılabilmektedir. Serbest katı hal yöntemleri, doku iskelesi mimarisinin ve gözenek özelliklerinin kontrolü açısından geleneksel yöntemlere göre üstün olup, ısı, ışık, yapıştırıcı ve kalıp kullanarak üretime dayanan birçok serbest katı hal yöntemi bulunmaktadır.

2.2.3.2. Doku iskelesi üretiminde kullanılan biyomalzemeler

Kıkırdak doku mühendisliğinde doku iskelesi üretimi için kullanılan biyomalzemeler genelde polimerik malzemeler olup, doğal ve sentetik olarak iki grupta toplanmaktadır. Kullanılan doğal polimerler kıkırdak doku mühendisliği için biyoaktif malzemelerdir. En çok kullanılan doğal malzemeler, aljinat, agaroz, fibrin, hiyaluronik asit, kollajen, jelatin, kitosan, kondritin sülfat ve selüloz olarak bilinmektedir (Çizelge 2.2).

Çizelge 2.2. Kıkırdak doku mühendisliğinde kullanılan biyomalzeme türleri.

Biyomalzemeler	Kimyasal/fiziksel sınıflandırılması
Doğal polimerler	Protein bazlı polimerler
Agaroz	Fibrin
Aljinat	Kollajen
Selüloz	Laminin
Kollajen	Jelatin
Kitosan	Karbonhidrat bazlı polimerler
Kondroitin sülfat	Polilaktik asit
Fibrin glue	Poliglikolik asit
Jelatin	Hiyaluronik asit
Hiyaluronik asit	Agaroz
İpek fibroin	Aljinat
Sentetik polimerler	Kitosan
Poli(α hidroksi ester)	Enjekte edilebilir polimerler
Polietilen glikol	Aljinat
Poli(NiPAAm)	Kollajen
Polipropilen fumarat	Fibrin
Poliüretan	Hiyaluronik asit
Polivinil alkol	Polietilen glikol
Kendiliğinden düzenlenen peptidler	Polil(aktid-ko-glikolid)

Doğal polimerler genelde hücre reseptörleri ile etkileşip, hücre fonksiyonlarını yönlendirmekte ve düzenleyebilmektedir. Bununla beraber, bu etkileşimlerden dolayı bazen bu polimerler immün sistem cevaplarını tetikleyebilirler. Doğal polimerlerin enzimler tarafından önemli derecede biyobozunur olmasından dolayı kullanılan doğal polimerler mekanik açıdan zayıf olarak nitelendirilmektedir. Sentetik polimerler ise kimyasal ve fiziksel özelliklerinden dolayı daha kontrollü yapılar olup, mekanik dayanımları ve biyobozunma özellikleri doğal polimerlere nazaran daha düzenlidir. Kıkırdak doku onarımında sıklıkla kullanılan sentetik malzemeler, poli(α -hidroksi ester), polietilen glikol, poli(NiPAAm), polipropilen fumarat, poliüretan, polivinil alkol olarak bilinmektedir (Çizelge 2.2).

Sentetik polimerler, doğal polimerlerde olduğu gibi kuvvetli hücre-malzeme etkileşimlerine sahip değildir. Dolayısıyla hücre fonksiyonlarının malzeme üzerindeki kontrolü zorlaştığı gibi, hücre-dışı matris oluşumları ve biyobozunma karakteristikleri de kontrolsüzdür. Bununla beraber, malzemelerin bozunma sonrası ürünleri toksik etki yaratabileceğinden doku çevresinde enflamasyon oluşabilir. Kendiliğinden düzenlenen peptidler (self-assembling peptides) amino asit sekanslarının birbirini takip eden iyonik hidrofobik ve yüksüz hidrofilik yan gruplarından oluşmaktadır. Kendiliğinden düzenlenen peptidler, hücre-matris etkileşimlerini desteklemek üzere biyolojik olarak aktif motifler olarak kullanılabilirler (Chung and Burdick, 2008).

Kıkırdak doku mühendisliğinde kullanılan biyomalzemeler kimyasal ve fiziksel yapılarına bağımlı olarak da sınıflandırılabilirler (Çizelge 2.2). Protein bazlı doku iskeleleri, doğal kaynaklı olduğundan hücre yüzey reseptörlerini tanıyan ligandlar taşıyabilirler. Bu durum biyoyumluluk açısından bir avantaj sağlar. Ancak kaynakların sınırlı olması, fabrikasyondaki zorluklar, immün cevap, allograftan taşınabilecek hastalıklar ve bozunma hızının değişiklik göstermesi, karşılaşılan sorunların başında gelir. Kıkırdak doku oluşumu için sıklıkla kullanılan protein bazlı polimerler, kollajen, fibrin, laminin ve jelatin olarak bilinmektedir. Bu alanda kullanılan malzemelerin başında kollajen gelir. Wakitani ve arkadaşları kollajen jeller içerisine kondrosit ekimi yapmışlar ve 6 hafta sonunda farklılaşmış fenotipin devam ettiğini ve GAG sentezini gözlemlemişlerdir (Wakitani et al., 2004). Kollajen jeller tavşanlarda hasarlı bölgeye implante edildiğinde hiyalin kıkırdak oluşmuş

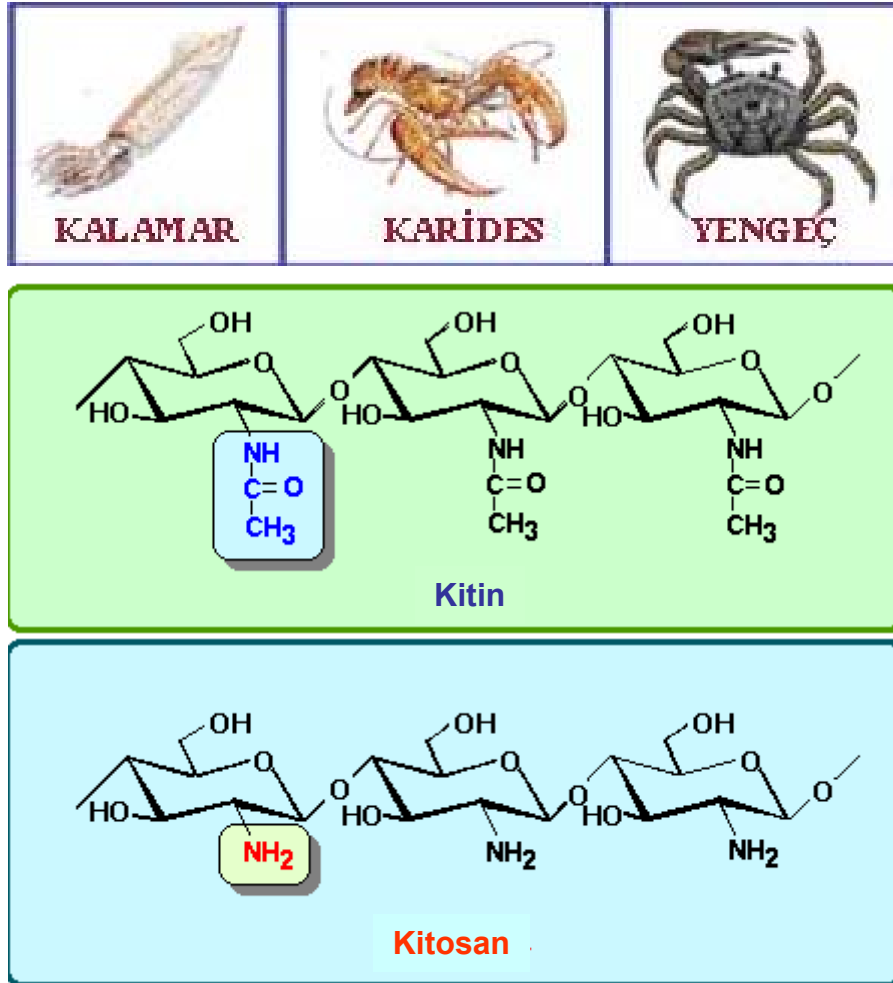
ancak yeterli mekanik dayanım sağlanamamıştır. Kollajen jellerin ayrıca kollajen sentezini de uyardığı tespit edilmiştir. Fibrin; fibrinojen ve tromboninin polimerizasyonu sonucu oluşur. Atlarla yapılan fibrin destekli çalışmalarda, hasarlı bölgede yüksek oranda kollajen II ve GAG içeren hiyalin doku oluşumu gözlenmiştir (Bock and Goode, 2003). Ancak fibrinin bozunması ile oluşan ürünler fizyolojik yapılar olmalarına rağmen immün cevaba neden olurlar. Ayrıca bu malzemenin yapısal kararlılığı da yoktur. Karbonhidrat bazlı malzemelerin başında poli (laktik asit glikolik asit), hiyaluronan ve *kitosan* gelmektedir. Poli (laktik asit-koglikolik asit) genelde hayvan modellerinde kullanılırken, immün cevap ve toksik bozunma ürünleri nedeniyle henüz klinikte uygulanmamaktadır. Hiyaluronan, kıkırdak doku matrisinde bulunan doğal bir yapıdır. Bu nedenle biyouyumlu ve biyobozunur özelliklere sahip ideal bir malzemedir. Ancak yeterli fizikokimyasal özelliklere sahip olması ve yapısal olarak istenilen organizasyonu sağlaması için esterleşme reaksiyonu ile çapraz bağlanması gerekmektedir. Bu da malzemenin biyouyumluluğuna zarar verir. *Kitosan* kıkırdak doku mühendisliğinde sıklıkla kullanılan bir biyomalzeme olup, Bölüm 2.3.1’de ayrıntılı olarak bahsedilmiştir. Hidrojeller son zamanlarda doku mühendisliğinde, özellikle enjekte edilebilir formlarda kullanılan malzemelerdir. Kıkırdak doku çalışmalarında en çok kullanılanlarının başında Pluronic[®] (blok kopolimer; polietilenoksit-polipropilen-polietilenoksit), kollajen, fibrin glue ve Matrigel[™] gelir. Bu malzemeler toksisite sorunu nedeniyle kimyasal yerine fiziksel olarak çapraz bağlanmaktadır. Ancak bu yöntemler malzemenin mekanik dayanımını azaltmakta ve kullanım alanlarını kısıtlamaktadır (Nesic et al., 2006).

2.3. Kitosan ve Kitosan-Temelli Doku İskeleleri

2.3.1. Kitosan ve özellikleri

Kitosan, β -(1→4)-bağlı asetamido-2-deoksi-D-glukopiranoz ve 2-amino-2-deoksi-D-glukopiranoz’dan oluşan bir lineer amino polisakkarittir (Suh and Matthew, 2000; Wise, 2000). Polikatyonik bir biyopolimer olan kitosan genellikle yengeç, karides, midye gibi bazı deniz kabuklularının ve çekirge, örümcek gibi bazı böceklerin kabuklarında yer alan kitinin (Şekil 2.17) deasetilasyonu sonucunda elde edilir (Berger et al., 2004). Bununla beraber, kitinin tam olarak deasetilasyonu

sağlanamadığından, kitosan; glikozamin ve N-asetilglikozaminden oluşan bir kopolimer olarak nitelendirilmektedir. Deasetilasyon prosesinin ilk basamağı hammadde olan kabukluların seyreltik sodyum hidroksit (NaOH) çözeltisinde deproteinizasyonu ve ardından seyreltik hidroklorik asit (HCl) ile dekalsifikasyonudur. Elde edilen kitin, %40-45'lik NaOH çözeltisi ile deasetilasyon işleminin ardından saflaştırma işlemine tabii tutulur ve kitosan elde edilir (Şekil 2.17).



Şekil 2.17. Kitin ve kitosanın kimyasal yapıları.

Kitosan, β -(1→4)-bağlı farklı sayıda rastgele konumlanmış N-asetil-glikozamin ve Dglikozamin kalıntılarından oluşmasından dolayı eklem kıkırdağında bulunan glikozaminoglikanlar (GAG) ve hiyaluronik asitle bazı benzer özellikleri paylaşır (Suh and Matthew, 2000). Kaynağa ve üretim prosesine bağlı olarak elde edilen

ürünün bileşimi ve özellikleri değişebilmektedir. Kitosanın özelliklerini etkileyen en önemli parametreler molekül ağırlığı (MW) ve deasetilasyon derecesidir (DD). Deasetilasyon derecesi, kitin içerisinde deasetile olan molar fraksiyonu tanımlamaktadır. Molekül ağırlığı 50 ila 1000 kD arasında değişebilirken, ticari olarak mevcut olan kitosanın deasetilasyon derecesi %50 ila 90 arasındadır.

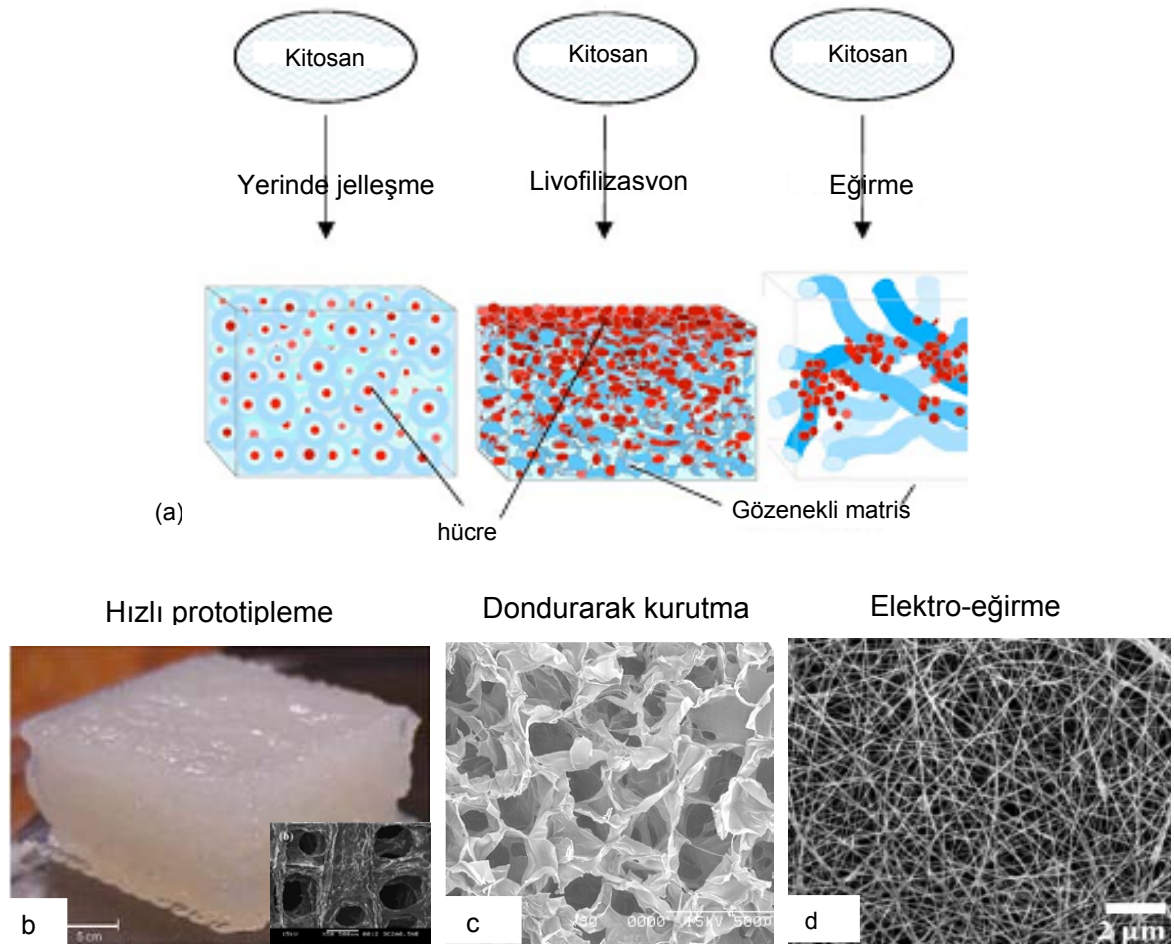
Molekül ağırlığı ve deasetilasyon derecesi kitosanın yüzey yük yoğunluğunu, kristalinitesini, çözünürlüğünü, enzimatik degradasyonunu ve hücre etkileşimlerini etkilemektedir. Deasetilasyon derecesinin yüksek olduğu yapılarda hücre yapışmasının daha fazla olduğu ve biyodegradasyon hızının yüksek olduğu belirlenmiştir (Amaral et al., 2005, Tıgılı et al., 2007). Kitosan yarı-kristalin bir polimerdir ve kristalinite derecesi, deasetilasyon derecesinin bir fonksiyonudur. Kristalinitenin maksimum olduğu nokta, kitin (%0 deasetilasyon) ve tamamen asetilasyona uğramış (%100) kitosan yapılarıdır. Minimum kristalinite ise ortalama deasetilasyon derecesinde iken gerçekleşir. Kitosan, kararlı kristalin yapısı nedeniyle normalde pH'ı 7'nin üzerinde olan sulu çözeltilerde çözünmezken seyreltik asitlerde serbest amino grupları protonlanmakta ve molekül pH 5'in altında tamamen çözünür hale gelmektedir. Çözündüğünde pozitif yüklü $-NH_3^+$ gruplarına sahip olur. Kitosanın *in vivo*'da hidrolizi, enzimatik yolla gerçekleşmektedir. Primer ajan olan lizozim, asetile olmuş kalıntılara hedeflenmektedir. Kitosanın bozunma ürünleri farklı uzunluklarda oligosakkaritlerdir. Kitosanın yüksek oranda deasetile formları (örneğin deasetilasyon derecesi %85'ten büyük olanları) daha düşük bozunma hızları gösterirken deasetilasyon derecesi daha küçük olan örnekler daha hızlı bozunmaktadır (Suh and Matthew, 2000).

Kitosanın başarılı bir biyomalzeme olması temelde katyonik yapısı ve yüksek yük yoğunluğuna sahip olması ile bağıntılıdır. Kitosanın, yüksek yük yoğunluğuna sahip olması anyonik karakterli (aljinat vb.) biyomalzemelerle çözünmez iyonik kompleksler ve koaservatlar oluşturmaya neden olmaktadır. Ayrıca, katyonik yapısı gereği negatif yüklü biyosinyal molekülleriyle etkileşimleri sonucunda kontrollü salım sistemlerinde başarıyla olarak kullanılmaktadır. Kitosan, yapısındaki amino ve hidroksil gruplarının varlığı nedeniyle spesifik uygulamalarda gerekli olan kimyasal modifikasyonlar için uygun bir polimerdir.

Kitosan, doku mühendisliği uygulamaları için değişik fiziksel şekillerde ve formlarda hazırlanabilmektedir. En çok tercih edilen formları gözenekli iskelet yapılar ve jel membranlardır (Krajewska, 2005). Kitosan yapılar, hepatosit kültürlerinde (Chung et al, 2002), kıkırdak doku rejenerasyonunda (Suh et al., 2000) ve kemik rekonstrüksiyonu için ortopedik kompozitlerde kullanılmış (Muzarelli et al., 2002) ve önemli avantajlar sağladığı görülmüştür. Ayrıca kontrollü salım sistemleri uygulamalarında, mikroküre ve nanoküre formlarında ya da jel ve film olarak hazırlanan kitosan yapıların kullanıldığı başarılı çalışmalar bulunmaktadır (Mi et al., 2002). Kitosanın biyolojik olarak yenilenebilir olması; biyobozunur, biyouyumlu, nonantijenik, nontoksik ve biyofonksiyonel özellikleri bu polimerin ve bu polimer kullanılarak elde edilen komplekslerin yara örtü materyali (Mi et al., 2001) ve ilaç dağıtım sistemleri (Aiedeh et al., 1997) gibi biyomedikal uygulamalarda kullanılmasına olanak sağlamıştır. Bunlara ek olarak kitosanın hemostatik özelliklere sahip olduğu, makrofaj oluşumunu tetiklediği ve yara iyileşmesini hızlandırdığı bilinmektedir (Wise, 2000; Wang et al., 2003). Tüm bu özelliklerin yanı sıra kitosanın antibakteriyel özelliği de ilgi çeken konulardan bir tanesidir.

2.3.2. Kitosan-temelli doku iskelesi fabrikasyonu

Doğada selülozdan sonra en fazla bulunan polimer olan kitosanın en önemli özelliklerinden biri, yapısının, membran, mikro/nano küre, ince filmler, kapsüller, fiberler, sünger yapıları ve jeller halinde doku iskelesi olarak kullanılabilmesidir. Tüm bu yapıların eldesi için kitosan doku iskelelerinde en çok kullanılan fabrikasyon yöntemleri, dökme-kalıplama (casting-molding) (Ma et al., 2001), eğirme (spinning) (Bhattarai, 2005), elektrobirikim (Yi et al., 2005), dondurarak kurutma (Lu et al., 2006, Tıgılı et al., 2007) ve ionotropik jelleşme yöntemleridir (Krajewska, 2005). Alternatif olarak, hızlı prototipleme (rapid prototyping) ve yerinde (in-situ) jelleşme teknikleri ile kitosan jel formunda doku iskeleleri (Ang et al., 2002; Di Martino et al., 2005), gaz köpüklendirme yöntemi ile ise gözenekli kitosan doku iskeleleri elde edilmiştir (Chow and Khor, 2000). Şekil 2.18’de kitosan doku iskeleleri üretimi için en çok kullanılan fabrikasyon yöntemleri özetlenmiştir.



Şekil 2.18. (a) Kitosan doku iskelesi fabrikasyon yöntemlerinin şematik gösterimi (Di Martino et al., 2005), (b) hızlı prototipleme yöntemiyle elde edilmiş kitosan jel iskele ve taramalı elektron mikroskop görüntüsü (Ang et al., 2002), (c) dondurarak kurutma yöntemiyle üretilmiş kitosan doku iskelesi elektron mikroskop görüntüsü (Suh and Matthew, 2000), (d) elektro-eğirme yöntemiyle hazırlanmış nanofiber kitosan doku iskelesi elektron mikroskop görüntüsü (Bhattacharai, 2005).

Ma ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, dökme ve liyofilizasyon yöntemlerini birarada kullanarak deri doku mühendisliği kapsamında kullanmak üzere iki tabakalı kitosan iskeleler elde etmişlerdir (Ma et al., 2001). Bu yöntemle biri sıkı, diğeri gözenekli olmak üzere 2 tabaka elde edilmiştir. Diğer bir çalışmada, farklı oranlarda kitosan-PEO (polietilen oksit) çözeltileri hazırlanmış ve bu çözeltiden elektro-eğirme yöntemi ile çapı birkaç mikrondan ~40 nm'ye kadar olan kitosan fiberler elde edilmiştir (Bhattacharai, 2005). Elde edilen bu polimerik nanofiberler,

özellikle hücre dışı matrisi, yapı ve fonksiyon bakımından taklit etmeleri açısından oldukça kullanışlıdır (Şekil 2.18).

Doku mühendisliği alanında kullanılan doku iskelelerinin gözenekli ve bu gözeneklerin birbirleriyle bağlantılı olması hücrelerin göçü; besin maddelerinin ve hücresel atıkların transferi açısından oldukça önemlidir (Salgado et al., 2004; Sharma and Elisseff, 2004; Hutmacher, 2000). Özellikle 100-150 µm boyutundaki gözenekler hücrelerin doku iskelesinin iç kısımlarına doğru ilerlemesine olanak sağlamaktadır (Zeltinger et al., 2001).

Tüm bu nedenlerden dolayı doku iskelesi eldesinde kullanılan tekniğin gözeneklilik, gözenek boyutu, gözenek dağılımı ve gözeneklerin birbirleriyle olan bağlantısı açısından tutarlı olması gereklidir (Salgado et al., 2004). Dondurarak kurutma tekniği ile 100 µm boyutunda gözeneklerin eldesi mümkündür (Arpornmaeklong et al., 2007). Bu yöntemde, dondurma prosesi sırasında, çözelti içerisinde buz kristalleri oluşmakta ve daha sonra bu kristaller liyofilizasyon ile uzaklaştırılarak gözenekli bir yapı elde edilmektedir (Şekil 2.18). Oluşan yapının gözenek boyutu, dondurma hızı ile değiştirilebilmektedir (Suh and Matthew, 2000). Seol ve arkadaşları, 100-200 µm boyutunda gözeneklere sahip kitosan doku iskelelerini dondurarak kurutma yöntemi ile elde etmişlerdir (Seol et al., 2004). Ang ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada ise 200 µm üstü gözenek boyutuna sahip olan kitosan doku iskeleleri serbest katı hal yöntemlerinden biri olan hızlı prototipleme yöntemi ile elde edilmiştir (Ang et al., 2002). Elde edilen kitosan iskelelerde gözenek yapıları homojen ve içsel bağlantıya sahiptir (Şekil 2.18). Geleneksel yöntemlerin aksine bu yöntem ile çok daha homojen gözenek yapılarına ve daha büyük gözenek boyutlarına sahip olan kitosan doku iskeleleri elde edilmiştir. Bununla beraber, üretim koşullarındaki kolaylık ve maliyet açısından geleneksel yöntemler, kitosan doku iskelelerinde halen popülerliğini korumaktadır.

2.3.3. Doku mühendisliği uygulamalarında kitosan doku iskeleleri

Kitosan, hem kimyasal olarak modifiye edilebilen reaktif amino ve hidroksil grupları içerdiğinden, hem de fiziksel olarak farklı gözenek yapıları için manipulasyon

kolaylığından dolayı doku mühendisliği uygulamaları için yüksek potansiyele sahiptir. Bununla beraber, kitosan modifikasyonu için çapraz bağlama (Mi et al., 2002), karıştırma (blending) (Cheng et al., 2003), aşılama (grafting) (Li J et al., 2005) ve γ -ışınları ile muamele (Renbutsu et al., 2005) gibi birçok yöntem kullanılmaktadır. Örnek vermek gerekirse, kitosan-jelatin yapı iskelelerinin hücresel uyumluluğunu bozmadan mekanik özelliklerini iyileştirmek amacıyla bu iskeleler poli(DL-laktik asit) ile modifiye edilmiş (Liu et al., 2005), TGF- β 1'in kontrollü salımını gerçekleştiren kitosan yapı iskeleleri hazırlanmış (Lee et al., 2004) ya da kitosan doku iskeleleri üzerine hücre yapışmasının artırılması amacıyla RGD veya GRGDS (Gly-Arg-Gly-Asp-Ser) sekansı immobilize edilmiştir (Karakeçili et al., 2007; Li et al., 2006, Tıǧlı and Gümüşderelioğlu, 2008).

Kitosanın doku iyileşmesi üzerindeki en ilginç etkilerinden birisi, anjiyogenez ile birlikte granülasyon dokusunun oluşumudur. Kitosanın fibroblast ve vasküler endotel hücrelerinin çoğalmasını ve fibroblastların hücre göçünde görevli olan interlökin-8 salımını desteklediği rapor edilmiştir. Fakat kitosanın yüksek trombojenik özelliği onun kan-temaslı biyomateryallerde kullanımını sınırlamıştır (Wang et al., 2003). Kitosanın kemik oluşumunu ve yara iyileşmesini arttırdığı (Wang and Hon, 2003), bunun yanında hücre yapışması ve üremesinde önemli rol oynadığı (Zhu et al., 2002) bilinmektedir. Özellikle osteouyumlu ve osteoindüktif özellikleri nedeniyle kemik doku mühendisliği çalışmalarında tercih edilmektedir (Seol et al., 2004).

Kitosanın en önemli dezavantajlarından bir tanesi zayıf fiziksel özelliklere sahip olmasıdır. Bu dezavantajın ortadan kaldırılması amacıyla literatürde birçok çalışma yapılmıştır. Özellikle kitosanın diğer polimerlerle ya da seramiklerle kompozitlerinin oluşturulması sıkça kullanılan yaklaşımlar arasında yer almaktadır. Örneğin kitosanın mekanik olarak zayıf olması ve biyoaktivite eksikliği nedeniyle kemik onarımı ve rejenerasyonu çalışmalarında kitosan-kalsiyum fosfat kompozitleri kullanılmıştır (Zhang and Zhang, 2001). Grubumuz tarafından dondurarak kurutma yöntemiyle hazırlanan kitosan doku iskeleleri bFGF, deksametazon, ve BMP-6 gibi büyüme faktörleriyle modifiye edilmiş, periodontal rejenerasyon ve kemik doku mühendisliğine yönelik çalışmalar yapılmıştır (Tıǧlı et al, 2009, Akman et al., 2009, Akman et al, 2009a). Kitosan doku iskeleleri hidroksiapatit mikro kürelerle modifiye

edilmiş ve iskelelere bFGF yüklenerek *in vitro* ortamda insan periodontal ligament hücreleri ve sementoblast hücreleri ile kültüre edilmiştir. Sonuç olarak, bFGF yüklü kitosan-hidroksiapatit doku iskelelerinin periodontal rejenerasyon için önemli bir taşıyıcı olduğu saptanmıştır (Akman et al, 2009). Kemik doku mühendisliği uygulamalarında etkisi incelenmek üzere grubumuzca yapılan diğer bir çalışma, BMP-6 yüklü kitosan doku iskeleleri ile MC3T3-E1 osteojenik hücre hattı kullanılarak *in vitro* ortamda osteojenik aktivitenin incelenmesidir. Bu çalışmanın sonucunda, BMP-6 yüklü kitosan doku iskelelerinin osteojenik aktivite açısından hücreler üzerinde önemli derece etkin olduğu saptanmıştır (Akman et al., 2009a).

Yu ve arkadaşları kollajen/kitosan/heparin kompleksleri hepatosit kültürlerinde çalışmışlardır (Yu et al., 2005). Çapraz bağlanmış kollajen/kitosan matris (CCM) de karaciğer rejenerasyonu için uygun bir ortam sağlayabileceği düşüncesiyle çalışılmıştır. CCM'nin oluşturulması, NHS (N-hydroxysuccinimide) ve MES (2-morpholinoethane sulfonic acid) tampon sistemi içinde bir çapraz bağ ajanı olan EDC [1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide]'nin kullanılmasıyla sağlanmıştır. Sonuçta EDC çapraz bağlı CCM'nin mekanik gücü azalttığı, hepatositlerle uyumlu olduğu, mükemmel kan uyumluluğu sağladığı görülmüştür ve bu da CCM'nin implante edilebilir biyoyapay karaciğerler için aday bir matris olabileceğini göstermiştir (Wang et al., 2003). Kollajen/kitosan kompozit matrisinin yanısıra aljinat/kitosan ve kitosan/jelatin karışımlarının da hepatosit kültürleri üzerindeki etkileri incelenmiştir. Yapılan incelemeler sonucunda kitosan/kollajen ve kitosan/jelatinden oluşan karışımların diğer materyallere göre daha üstün olduğu, bu kompozit matrislerde hepatositlerin fonksiyonlarını ve canlılıklarını uzun süre korudukları bulunmuştur (Li K. et al, 2005). Kitosan ve jelatinden oluşan kompozit mikrot taşıyıcılar hepatositlerin immobilizasyonu için de kullanılmıştır (Li et al., 2004).

Bunların yanında kendiliğinden düzenlenmiş (self-assembled) nano-hidroksiapatit-kollajen kompozit tozlarının yüklenmesi ile elde edilen çapraz bağlı kollajen-kitosan matrisler (Cui et al., 2004), kitosan-kollajen (Peng L. et al., 2006), kitosan-jelatin-hiyaluronik asit (Liu et al., 2006), kitosan-jelatin (Shen et al., 2000), kitosan-aljinat (Li and Zang, 2005, Tıǧlı and Gümüşderelioğlu, 2008), kitosan- β -trikalsiyum fosfat-poli(metilmetakrilat) (Kuo et al., 2003), kitosan-kondroitin sülfat (Peng C.K.

et al., 2006) kompozitleri gibi yapılarla gerçekleştirilen çalışmalar da rapor edilmiştir.

Görüldüğü gibi kitosan ve kitosan kompozitleri, doku mühendisliği çalışmalarında yapı iskelesi olarak oldukça yaygın bir kullanım olanağı bulmuştur ve çok çeşitli hücrelerin bu iskeleler üzerindeki davranışları incelenmiştir. Çalışılan hücreler arasında hepatositler (Yu et al., 2005), osteoblastlar (Li et al., 2006; Cui et al., 2004; Tuzlakoglu et al., 2004), insan periodontal ligament hücreleri (Peng L. et al., 2006; Akman et al., 2009), Schwann hücreleri (Yuan et al., 2004), fibroblastlar (Liu et al., 2005; Liu et al., 2006; Tuzlakoğlu et al., 2004), keratinositler (Liu et al., 2006), vasküler endotelial hücreler (Foster and Matthew, 1998) ve kondrositler (Lu et al., 2006; Li and Zang, 2005) gibi çok farklı hücre tipleri bulunmaktadır.

2.3.4. Kıkırdak doku mühendisliği için kitosan doku iskeleleri

Kıkırdak doku mühendisliğinde kullanılacak olan biyomateryalin kıkırdak doku matrisine benzerlik göstermesi hatta taklit etmesi beklenmektedir. Kıkırdak dokuda spesifik olarak hücre dışı matris bileşenlerinin (kollajen tip II ve glikozaminoglikan (GAG)) kondrojenik fenotipi düzenlediği ve *in vitro* ve *in vivo* ortamda kondrojenezi desteklediği bilinmektedir (Grande et al., 1997, Kim et al., 2008). Glikozaminoglikanların kondrojenizisi arttırdığı bilindiğinden GAG analoglarının kıkırdak doku iskeleleri olarak kullanılması oldukça akılcı bir davranıştır. GAG'lar, büyüme faktörleri, reseptörler ve yapışma proteinleriyle özel etkileşim içerisindedir. Bunlara yapısal olarak benzeyen kitosanın da benzer biyoaktiviteye sahip olabileceği belirtilmiştir (Suh and Matthew, 2000). Ayrıca kitosanın çeşitli büyüme faktörleri ve yapışma proteinleri ile etkileşerek kondrojenizde rol oynadığı belirtilmiştir (Suh and Matthew, 2000; Lindahl and Hook, 1978). Kim ve arkadaşları, TGF- β 1'i kitosan mikrokürelere yüklemiş ve elde edilen mikrokürelere gözenekli kitosan doku iskelelerine gömerek, TGF- β 1'in kontrollü olarak ortama salınmalarını sağlamışlardır. Çalışmanın sonucunda kondrosit proliferasyonunun ve matris sentezinin arttığı belirlenmiştir (Kim et al., 2003).

Lu ve arkadaşları, sıçan artikular kıkırdak defektlerine kitosan enjekte etmişler ve defektli bölgede önemli derecede kondrosit artışı tespit edilmesiyle beraber, kıkırdak dokuda yara iyileşmeleri için kullanılan kitosanın potansiyel bir

biyomateryal olduğunu rapor etmişlerdir. Şenköylü ve arkadaşları, kondrositlerin kitosan yüzeyine sıkı bir şekilde bağlandıklarını göstermişlerdir (Şenköylü et al., 2001). Yan ve arkadaşları ise kollajen/kitosan/hiyaluronandan oluşan gözenekli yapıyı dondurarak kurutma yöntemi ile elde etmişler ve bu yapı üzerinde kondrositlerin üreme ve farklılaşmayı sürdürme kapasitesini incelemişlerdir (Yan et al., 2006). 21 günün sonunda gözenekli iskelenin kıkırdak dokusu ile kaplandığı gözlemlenmiştir. Yamane ve arkadaşları, hiyaluronan ve kitosan hibrid fiberlerden oluşan doku iskelelerinin mariste kondrosit yapışmasını ve proliferasyonunu arttırdığını saptamış ve hücrelerin kollajen II ve agregan sentezlerini desteklediğini bildirmişlerdir (Yamane et al., 2005).

Bir başka çalışmada, partikül agregasyonu yöntemi kullanılarak %30 gözenekliliğe ve 100-400 µm gözenek büyüklüğüne sahip kitosan doku iskeleleri elde edilmiştir (Malafaya et al., 2005). Bu iskeleler, kıkırdak ve osteokondral doku mühendisliği açısından test edilmiştir. Subramanian ve Lin, kitosanın NH₂ gruplarını çapraz bağlayarak daha sert bir yapı elde etmişler ve bu sert yüzeylerin kondrositlerin üremesini arttırdığını belirlemişlerdir (Sbramanian and Lin, 2005). Ayrıca, kitosan kaplı yüzeylerde kültüre edilen kondrositlerin *in vivo*'dakine benzer küresel yapılarını korudukları ve canlılıklarını sürdürdükleri rapor edilmiştir (Lahiji et al., 2000).

Grubumuz tarafından yapılan kıkırdak doku mühendisliğine yönelik başka bir çalışmada, kitosan doku iskeleleri heparin ile immobilize edilmiş ve ATDC5 sıçan kondrojenik hücre hattı kullanılarak hücrelerin doku iskelesi üzerindeki kondrojenik aktiviteleri incelenmiştir (Aday, 2008).

Günümüzde, yapılan pek çok çalışmanın sonucunda kitosan-temelli biyomateryallerin kondrojenezi desteklediği, kıkırdak doku mühendisliği çalışmaları sonucunda elde edilen neo-kıkırdak yapının kalitesinin geliştirildiği, yapının implante edildiği bölgelerdeki dokularla entegre olduğu ve klinik araştırmalarda kullanılmak üzere uzun süreli kıkırdak doku onarımları için uygun oldukları düşünülmektedir (Kim et al., 2008).

2.4. Biyoreaktörler

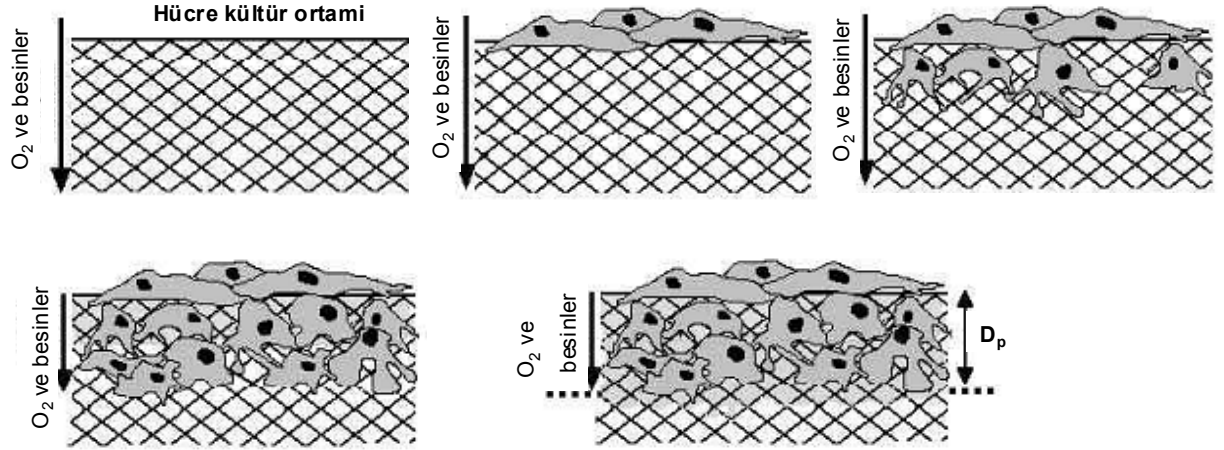
2.4.1. Tanım ve işlevler

Biyoreaktörler biyolojik ve/veya biyokimyasal proseslerin kontrollü ortamlarda ve operasyon koşullarında (pH, sıcaklık, basınç, besi ve atık ortamı vb.) gerçekleştirilmesini sağlayan cihazlar olarak tanımlanmaktadır. Biyoreaktörler genelde endüstriyel fermentasyon, atık su artımı, gıda endüstrisi, ilaç ve rekombinant proteinlerin (antikor, büyüme faktörü, aşı, antibiyotik vb.) büyük ölçek üretimlerinde kullanılmaktadır (Martin et al., 2004).

Son yıllarda doku mühendisliğinde geline noktanın üç boyutlu doku üretimi olduğu düşünüldüğünde, biyoreaktörlerin üç boyutlu doku ve/veya organ üretimindeki rolü büyüktür. Üç boyutlu doku üretimi için doku iskelesi üretiminden sonraki basamak, üretilen doku iskelelerine hücre ekiminin başarılı bir şekilde gerçekleştirilmesidir. Doku iskelelerine hücre ekimi, statik veya dinamik koşullarda gerçekleştirilmektedir. Statik hücre ekimi, sıklıkla kullanılan bir metot olmasına karşın, yapılan çalışmalar sonucunda araştırmacılar, bu metotla düşük ekim verimliliği ve düzensiz hücre dağılımlarına ulaşıldığını belirtmişlerdir (Pörtner et al., 2005). Bununla beraber, üç boyutlu yapay doku elemanlarının *in vitro* da üretilebilmesi için sadece biyolojik modeller (istenen biyolojik işlevlere sahip ve çoğalabilen hücrelerin elde edilebileceği bir kaynak ve hücrelerin dokuya özgü fenotipi sergilemelerini sağlayacak bir hücre üretim protokolü) yeterli değildir. Ancak yine de üç boyutlu iskelelerde statik hücre ekimi ile doku oluşumunu hedefleyen çoğu doku mühendisliği çalışması *optimistik* olarak nitelendirilir.

Üç boyutlu iskelelere statik hücre ekimi sonrası karşılaşılan en büyük problem “difüzyon”dur. Doku oluşumunun başarısı, gazların (O_2 , CO_2), besinlerin, proteinlerin, hücrelerin ve atık ürünlerin doku iskelesine aktarımıyla bağıntılıdır. Kütle aktarımı difüzyon ile gerçekleşmektedir. Şekil 2.19’da üç boyutlu gözenekli doku iskelelerindeki difüzyon problemi şematik olarak gösterilmiştir. Şekilden de anlaşılacağı gibi hücreler doku iskelesine ekildikten sonra yayılıp, yerçekimi kuvveti yönüyle ilerlemeye (migration) başlamaktadır. İlerleyen hücreler kolonize olup gözenekli matris içerisinde kendi hücre dışı matrislerini oluşturmaya başlarlar.

Bununla beraber, hücreler için gerekli olan oksijen ve besinler difüzyon kısıtlamalarından dolayı sadece üstel bölgelere kadar aktarılabildikleri için hücreler belirli bir noktadan sonra (penetration depth, D_p) üç boyutlu iskele içerisinde ilerleyemez ve iskele içerisinde yaşamsal fonksiyonlarını kaybederler (Şekil 2.19) (Sachlos and Czernuszka, 2003).



Şekil 2.19. Üç boyutlu doku iskelesinde kütle aktarımı.

Dolayısıyla başarılı bir doku oluşumu için biyoreaktörleri içeren hücre kültür stratejilerinin geliştirilmesi gerekmektedir. Doku mühendisliğinde biyoreaktörler, transplantasyon için işlevsel hücre ve doku üretiminde kullanılmaktadır. İdeal olarak bir biyoreaktör, hızlı ve düzenli doku gelişimi için *in vitro* ortam yaratmalıdır. Biyoreaktörler aşağıda verilen fonksiyonların biri veya birkaçını gerçekleştirmek ve/veya düzenlemek için dizayn edilirler. Bu fonksiyonlar;

- Doku iskelesi içerisinde hücrelerin uniform ve homojen bir hücre dışı matris oluşturmasını sağlamak.
- Kültür ortamındaki koşulları (sıcaklık, pH, ozmolalite, oksijen, besinler, metabolitler, düzenleyici moleküller) kontrol altında tutmak.
- Hücreler ve kültür ortamı arasında kütle aktarımını sağlamak.
- Fizyolojik olarak gerekli sinyalleri sağlamaktır (kayma gerilimi, basınç, akış, sıkıştırma, elektriksel sinyal vb.) (Vunjak-Novakovic et al., 2005).

Tüm bu fonksiyonların içinde biyoreaktörlerde birincil amaç, hücrelerin 3 boyutlu doku iskeleleri içinde boyutsal olarak eş dağılımını sağlamak, kültür ortamındaki gazların ve besinlerin derişimlerini istenilen değerlerde tutmak ve oluşmakta olan dokuya gereken fiziksel etkileri uygulamaktır (Wendt et al., 2005). Biyoreaktörler bazı biyokimyasal ve biyomekanik faktörlerin hücre ve doku oluşumu üzerindeki etkilerinin araştırıldığı kontrollü *in vitro* çalışmalarda da kullanılmaktadır ve elde edilen bilgiler ışığında biyoreaktör tasarımında ilerlemeler kaydedilmektedir.

Biyoreaktör tasarımındaki en önemli konulardan biri kütle aktarımıdır. Kütle aktarımı istenilen düzeyde olmadığı takdirde, üretilen dokuların yeterli derecede beslenememesi söz konusudur. Biyoreaktörler, öncelikle, hücrelere besinleri (glikoz ve amino asitler), biyokimyasal faktörleri ve oksijeni sürekli olarak ulaştırmalı, çeşitli kimyasalların doku iskelesinin iç kısımlarına difüzyonunu sağlamalı ve laktik asit gibi hücre metabolizmasının yan ürünlerini sürekli uzaklaştırmalıdır. Ayrıca pH, oksijen oranı ve besin miktarı gibi çok önemli parametreler, kütle aktarımının etkinliğine bağlı olarak kontrol edilebilmektedirler (Korossis et al., 2005; Pörtner et al., 2005). Biyoreaktörlerde kütle aktarımı pasif difüzyon ya da doğrudan perfüzyon ile gerçekleştirilebilir (Wendt et al., 2005). Difüzyon ile oksijen aktarımı sadece 100-200 µm derinlikteki hücre katmanlarına kadar etkindir (Fassnacht and Pörtner, 1999). Dolayısıyla perfüzyon, hiç kuşkusuz, aktarımın daha etkin bir şekilde gerçekleşmesini sağlamaktadır (Wendt et al., 2005).

Doku mühendisliğinde işlevsel olarak bir biyoreaktörün sahip olması gereken özelliklere bakıldığında, üzerinde çalışılacak olan dokunun boyutları, karmaşıklığı ve fizyolojik ortamı çok büyük önem taşımaktadır (Korossis et al., 2005). Her bir doku tipi için (deri, kemik, kan damarları ve kıkırdak) özelleştirilmiş biyoreaktör tasarımına ihtiyaç duyulmaktadır. Bu yüzden, dokuya özgü biyoreaktörlerin tasarımı biyolojinin ve mühendislik yaklaşımlarının iyi bir şekilde anlaşılmasıyla mümkündür (Pörtner et al., 2005). Örnek olarak, kemik, kıkırdak ve kardiyovasküler dokuların oluşumunda mekanik sıkıştırma, hidrodinamik basınç uygulama, sıvı akışı vb. gibi mekanik uyarıların pozitif etkisinin bulunduğu bilinmektedir ve bu bilgiler ışığında üretilen dokuların belli mekanik etkilere maruz kalmasını sağlayan özelleştirilmiş biyoreaktör tasarımları üzerinde çalışılmaktadır

(Bilodeau and Mantovani, 2004). Biyoreaktörlerde, mekanik uyarılar ile yaratılan pozitif etkiler çok net gözlemlenmesine rağmen, hala, uygulanması gereken spesifik kuvvet değerleri ya da uygulama aralıkları (büyüklük, frekans, süreklilik ve kesiklilik ve çalışma döngüsü) hakkında çok az bilgi mevcuttur (Pörtner et al., 2005).

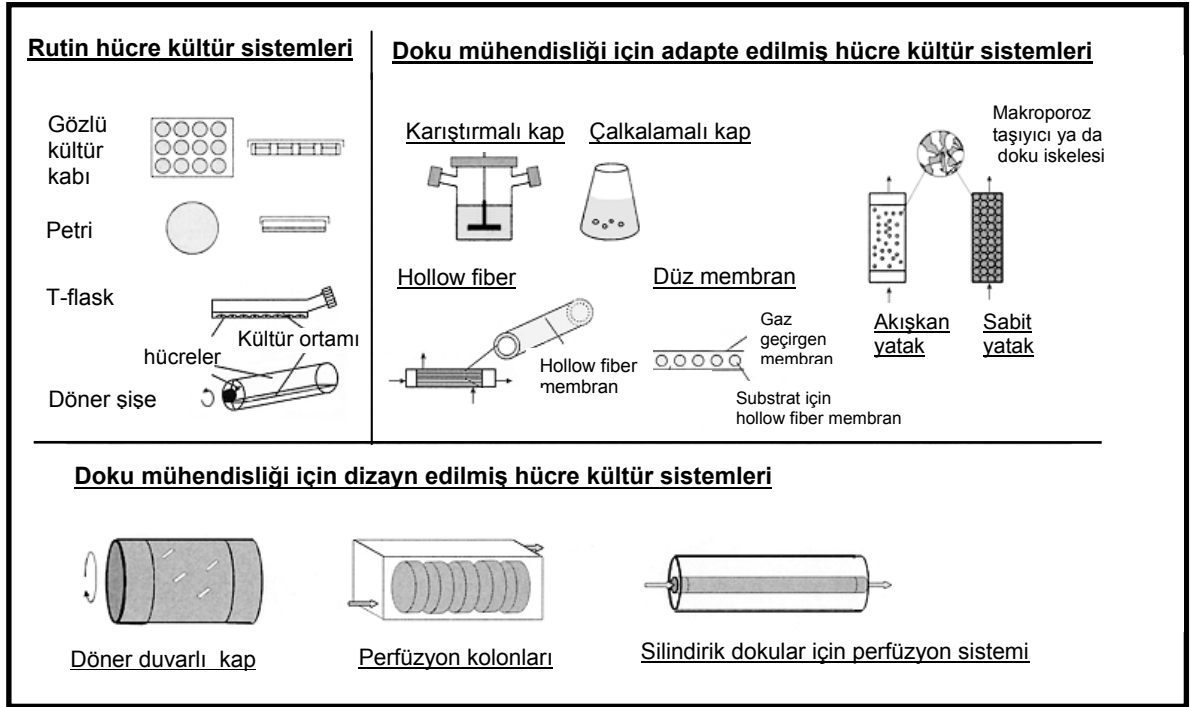
Biyoreaktörlerin tasarımındaki diğer önemli noktalar, elde edilmek istenen ürünün tekrarlanabilirliğinin ve güvenilirliğinin klinik çalışmalar için büyük ölçekte sağlanabilmesidir. Aynı zamanda biyoreaktörlerde istenilen dokuya özgü fonksiyonların takibinin yapılabilmesi için, uzun vadede aseptik koşulların sağlanması şarttır. Doku mühendisliği uygulamalarında kullanılan biyoreaktörler ürün anlamında yüksek beklentilerle dizayn edilmektedir. Beklentilerin yüksek olması ise biyoreaktörlerde üretim maliyetinin artmasına neden olmaktadır. Bununla beraber, biyoreaktör işletim koşullarındaki zorluklar (sterilizasyon ve kontrolü, biyoreaktör parça ve bakımı, vb.) bu alanda çalışmaların hızla devam edeceği konusunda ip uçları vermektedir (Pörtner et al., 2005).

2.4.2. Biyoreaktör türleri ve işletim koşulları

Doku mühendisliği biyoreaktörleri kesikli, yarı-kesikli ve sürekli akışlı (perfüzyon) kültür sisemleri gibi birçok farklı işletme koşullarına izin vermektedir (Pörtner et al., 2005). Basit hücre kültür kapları, karıştırmalı kaplar ve döner şişeler, doku mühendisliğinde biyoreaktör olarak kullanılan basit sistemlerdir. Belirli zaman aralıklarında içlerindeki hücre kültür ortamları yenilenen bu biyoreaktörler kesikli olarak çalıştırılırlar. Diğer tasarımlarda ise kültür ortamının sürekli devridaim edildiği, perfüzyon kolonları karşımıza çıkar. Kültür ortamının perfüzyonu, kütle aktarımını artırıp, kültür ortamındaki gazların, besinlerin, metabolitlerin ve düzenleyici faktörlerin derişimlerdeki değışimleri en aza indirerek doku büyümesini ve metabolizmasını iyileştirmektedir (Wendt et al., 2005).

Doku mühendisliğinde tek tabakalı hücre kültürü ve hücre proliferasyonları için kullanılan hücre kültür sistemleri (T-flask, Petri kapları ve çok gözlü kültür kapları) en basit sistemler olup kullanımları kolay, tek kullanımlık ve düşük maliyetli sistemlerdir. Bununla beraber, pH, O₂ ve sıcaklık gibi parametreler kontrolsüzdür

ve hücre geri kazanımı genellikle enzimatik olarak yapıldığından hücre kayıpları ve hücrelerin farklılaşmalarını kaybetmesi gibi sorunlarla karşılaşılabilir.



Şekil 2.20. Doku mühendisliğinde kullanılan hücre kültür sistemlerinin şematik gösterimi (Pörtner et al. 2005).

Karıştırılmalı biyoreaktörler (çalkalamalı flask, karıştırılmalı kaplar), hem süspanse hücre kültür çalışmaları için hem de enkapsüle edilmiş hücrelerin ya da mikrot taşıyıcılar ve doku iskeleleri ile birlikte hücrelerin kültürasyonunda sıklıkla kullanılan sistemlerdir. Akışkan yataklı ve dolgu yataklı biyoreaktörlerde ise genellikle makrogözenekli taşıyıcılara immobilize edilen hücreler kullanılmaktadır. Bu taşıyıcılar, sabit yataklı biyoreaktörlerde kolon dolgusu olarak, akışkan yataklı biyoreaktörlerde ise kolonda serbest halde (floating) kullanılmaktadır. Akışkan yataklı ve sabit yataklı biyoreaktörlerdeki kolondan kültür ortamı sirküle etmektedir. Bu tür biyoreaktörler, genelde monoklonal antikor, rekombinant ilaçların üretimi veya gen terapi için rekombinat retrovirüs üretimi için kullanılmaktadır. Doku mühendisliği uygulamalarında ise, karaciğer hücreleri, kök hücreler, kardiyovasküler hücreler ve kıkırdak hücrelerinin proliferasyonuna yönelik birçok çalışma yapılmıştır (Pörtner et al., 2005). Membran ve içi boş fiber (hollow-fiber) biyoreaktörlerde, genel prensip hücrelere çeşitli membranlar yardımıyla oksijen ve

besin sağlanması ve toksik maddelerin ortamdan giderilmesini sağlamaktır. İçi boş fiber biyoreaktörler biyofarmasötik ve monoklonal antikor üretiminde kullanılmaktadır. Doku mühendisliği uygulamalarında ise üç boyutlu doku oluşumu için hepatositler, deri hücreleri ve diğer insan kökenli hücreler ile birçok çalışma yapılmıştır (Pörtner et al., 2005).

Tüm bunların yanında doku mühendisliği için dizayn edilen ve günümüzde farklı doku oluşumları için sıklıkla kullanılan biyoreaktörler, döner duvarlı biyoreaktörler ve perfüzyon kolonları olarak bilinmektedir (Pörtner et al., 2005). Şekil 2.20'de yukarıda anlatılan tüm hücre kültür sistemlerinin ve biyoreaktörlerin şematik gösterimi sunulmuştur.

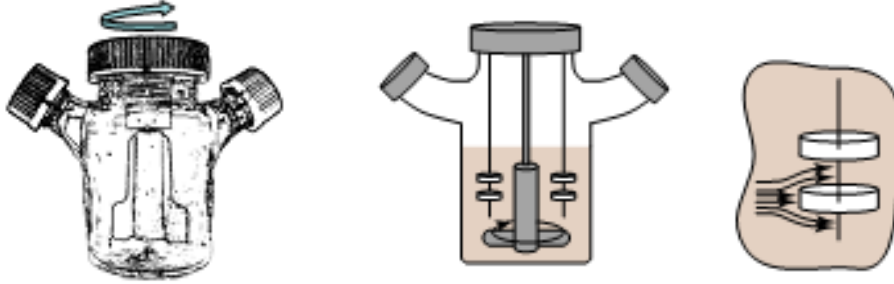
2.4.2.1. Hücre kültür kapları

Hücre kültür kapları, küçük ölçekli *in vitro* çalışmalarda tercih edilen ve kesikli çalışan en basit biyoreaktörlerdir. Hücre kültür kapları durgun sistemlerdir ve *birinci nesil reaktörler* olarak bilinmektedir. Hücre kültür kaplarında hücrelere besin ve gazların ulaşımı pasif difüzyon ile gerçekleşir. Kültür ortamı, belirlenen aralıklarda taze ortamla değiştirilir veya seyreltilir. Biyoreaktör olarak hücre kültür kapları kullanıldığında, kültürü etkileyecek parametreler; kültür ortamının içeriği, her bir göze konulacak ortam miktarı, ortamın değiştirilme veya seyreltilme sıklığıdır. Ayrıca ortamın sıcaklık, pH ve oksijen oranı gibi değerleri, bu kültür kabının yerleştirileceği inkübatörden kontrol edilir. Petri kaplarının yanısıra, 6, 12, 24, 48 ve 96 gözlü hücre kültür kapları ticari olarak çok kolay elde edilebilen sistemlerdir. Genellikle polistirenden üretilmiş olan bu kültür kaplarının hücre yapışmasını engelleyecek şekilde modifiye edilmiş veya kollajenle kaplanmış olanları da bulunmaktadır.

2.4.2.2. Karıştırmalı kaplar

Karıştırmalı kaplar, plastik veya cam malzemelerden yapılmış olup merkezde manyetik karıştırıcı şaftı ve yan kollarında hücrelerin, kültür ortamının ve CO₂ – hava değişiminin sağlandığı kapaklara sahiptir (Şekil 2.21) (Godara et al., 2008). Karıştırmalı kaplar genellikle üç boyutlu doku iskelelerinin kültüre edilmesi için

kullanılmaktadır. Doku iskeleleri, karıştırılmalı kapların kapak kısımlarından sarkan iğnelere geçirilerek biyoreaktör içerisinde asılı halde kültüre edilmektedir (Martin et al., 2004).



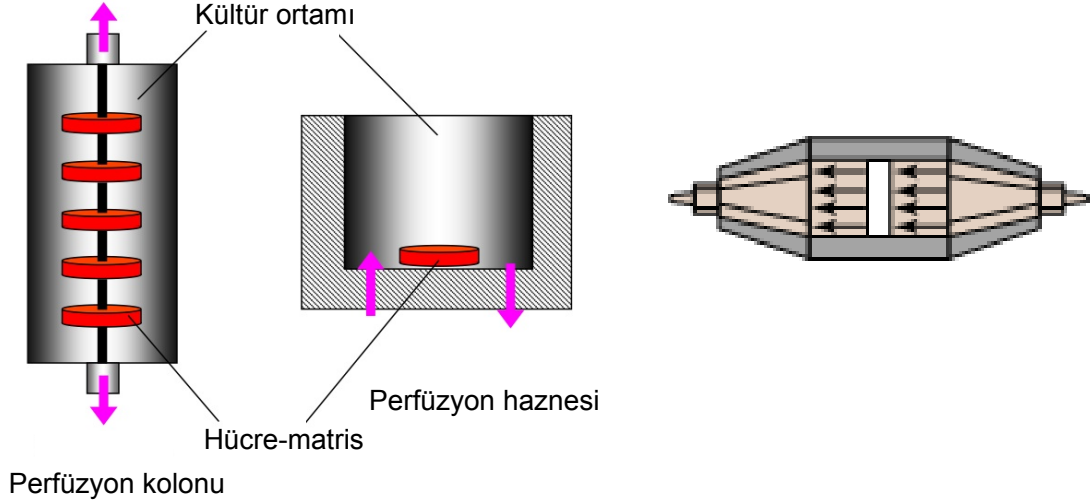
Şekil 2.21. Doku mühendisliğinde kullanılan karıştırılmalı kapların şematik gösterimi ve doku iskeleleri etrafındaki akış profilleri (Godara et al., 2008; Martin et al., 2004).

Kesikli olarak çalıştırılan bu sistemlerdeki akış tipi, karıştırmaya bağlı olarak türbülanslı akıştır. Kütle aktarımı ise türbülanslı konveksiyon ile gerçekleşir. Kültür ortamı belli aralıklarda değiştirilmekte veya taze kültür ortamı ile yenilenmektedir. Gaz değişimi ise, kapların yan kapakları gevşetilerek, sürekli olarak yüzeyden gerçekleşmektedir. Kültür sırasında, ortamın karıştırılması oksijen ve besin maddeleri aktarımını iyileştirir. Bununla beraber, karıştırma sırasında oluşan vorteksler, gelişmekte olan dokuya zarar verebileceğinden dolayı biyoreaktördeki karıştırma hızı ve karıştırıcı türü önemli parametrelerdir (Lanza et al., 2000). Karıştırılmalı kaplarda üretilmek istenen doku bazen birçok özellik bakımından yetersiz kalmaktadır. Kıkırdak doku çalışmalarında, türbülanslı akışa bağlı olarak dokunun çevresinde, ağırlıklı olarak kollajen tip I içeren fibröz bir kapsül oluşmaktadır ki bu kıkırdak dokusu için istenmeyen bir durumdur.

2.4.2.3. Perfüzyon biyoreaktörler

Perfüzyon kolonları sürekli akışlı sistemlerdir. Bu kolonların tabanında bir giriş ve tepesinde bir çıkış bulunmaktadır (Şekil 2.22). Doku iskeleleri, kolonun merkezinde bulunan iğneye takılarak sabitlenir ve kültür ortamı doku iskelelerinin çevresinden

ve içinden akıtılır, böylece doku iskelesinin hem dışındaki, hem de iç gözeneklerindeki kütle aktarımını artırır (Martin et al., 2004).



Şekil 2.22. Doku mühendisliğinde kullanılan perfüzyon biyoreaktörlerin şematik gösterimi ve doku iskeleleri etrafındaki akış profilleri (Martin et al., 2004; Korossis et al., 2005).

Bu sistemlerde karışma, kültür ortamının bir peristaltik pompa yardımı ile sürekli devridaim ettirilmesiyle gerçekleşmektedir. Kültür ortamı belirlenen zamanlarda, kullanılan doku iskelesinin sayısına göre belli oranlarda taze kültür ortamı ile yenilenir. Gaz değişimi için ise kolonun girişine yerleştirilen bir membran kullanılır. Sistemi diğer karıştırılmalı kaplardan ayıran en önemli özelliği, reaktör içerisinde herhangi bir karıştırma mekanizmasının bulunmaması nedeni ile hücrelere etkiyecek önemli derecede bir kayma gerilimi oluşturulmamasıdır (Temenoff and Mikos, 2000).

Biyoreaktör tasarımı açısından düşünüldüğünde, doğrudan perfüzyon, hücre üremesi ve işlevselliği için çok önemli ve yararlıdır. Fakat perfüzyonun etkileri, ortamın akış hızıyla ve dokunun olgunluk aşamasıyla yakından ilgilidir. Çünkü yüksek akış hızlarında, hücrelerin doku iskelesi üzerinden kopması söz konusudur. Ayrıca doku iskelesinin akış yönündeki tarafına etki eden hidrostatik basınç ile diğer tarafına etkiyen basınç birbirinden farklıdır. Dolayısıyla doku

iskelesinin farklı bölgelerinde mekaniksel olarak farklı bir uyarım söz konusudur. Buna bağlı olarak hücrelerin matris sentezinde ve mekaniksel özelliklerinde değişiklik gözlenebilmektedir (McMahon et al., 2004).

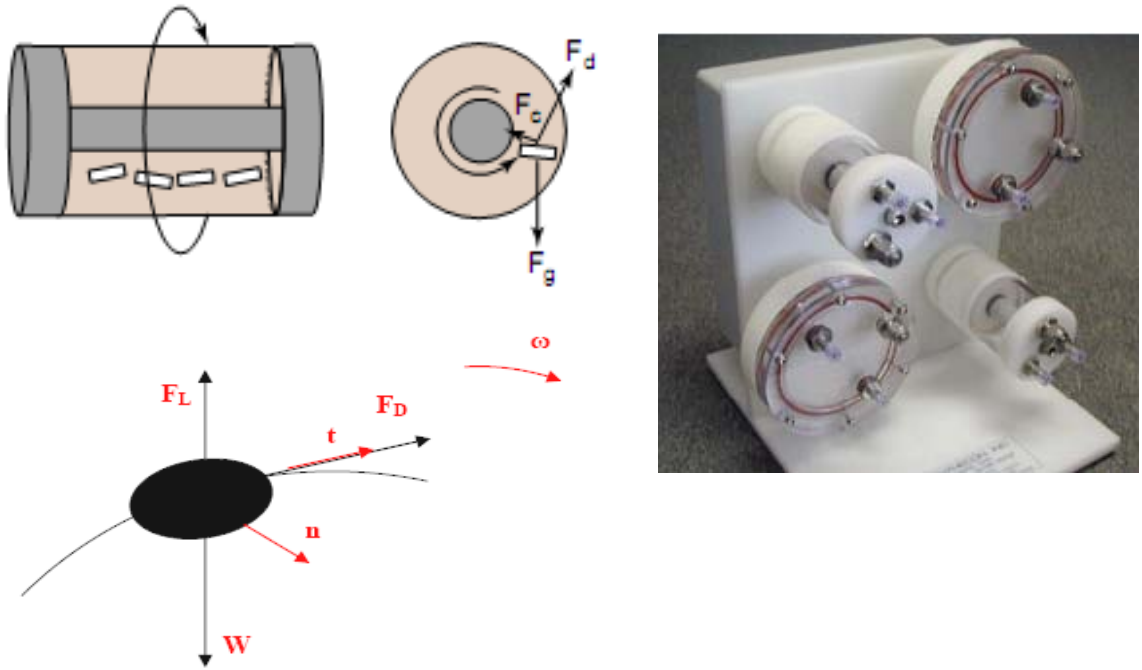
2.4.2.4. Döner duvarlı biyoreaktörler

Üç boyutlu doku oluşumu için kullanılan yöntemlerin hepsinde *in vivo* ortamların tersine hücrelerin yerçekimi kuvveti doğrultusunda ilerlediği ve iki boyutlu hücre büyümesinin gerçekleştiği bilinmektedir. Doku iskelelerinin üç boyutlu doku oluşumunda etkinliği, hücreler için gerekli olan besin ve oksijen difüzyonu ile kısıtlanmaktadır. Doku mühendisliğinde kullanılan biyoreaktörlerin söz konusu difüzyon problemlerine çözüm getirdiği bilirse de *in vivo* ortamdaki gibi hücrelerin üç boyutlu agregat oluşumu sağlanamamaktadır. Araştırmacılar alternatif olarak hücreleri uzayda “mikrogravite” ortamda kültüre etmişler ve süspanse hücrelerin mikrogravite ortamda kümeleştiklerini saptamışlardır (Dintenfass, 1986; Unsworth and Lelkes, 1998). Uzay uçuşlarındaki mikro-yerçekimi koşullarının, hücre kültür çalışmaları için yeryüzünde oluşturulabilmesi amacıyla Birleşik Devletler Ulusal Uzay Havacılık Ajansı (NASA) döner duvarlı biyoreaktörleri (Rotating wall vessel, RWV) geliştirmiştir (Şekil 2.23).

İç içe geçmiş iki silindirin arasında kalan hacimde kültüre edilen hücreler, doğrudan hava-hücre kültür ortamı ara yüzeyi olmaksızın, reaktörle aynı hızda dönmekte olan hücre kültür ortamı içinde büyümektedirler (Doyle and Griffiths, 2000). Biyoreaktör içerisindeki kültür ortamının rotasyonel hızı hücrelerin yada doku iskelelerinin çökme hızına ters yönde ve eşit olduğu zaman, hücreler ortam içerisinde “serbest düşmeye” maruz kalmaktadır. Serbest düşme halindeki partiküllerin (doku iskelesi ve/veya hücre) etrafındaki viskoz akışın düşmesi yani düşük kesme kuvvetleri, hücrelerin etrafındaki arayüzeyi (yığın ortam-hücre) azaltıp difüzyonu kolaylaştırmaktadır (Godara et al., 2008). Düşük kesme kuvvetleri, farklı yoğunluklara sahip hücre gruplarının kümelenmesine ve bir arada üremesine olanak sağlamaktadır (Doyle and Griffiths, 2000).

Döner duvarlı biyoreaktörlerde doku iskelesi ve/veya hücreler üzerine sürüklenme kuvveti (F_d); sıvının kaldırma kuvveti (F_L) ve doku iskelesinin ağırlığı (W) etki eder

(Şekil 2.23). Döndürmeye bağlı olarak, hücre kültür ortamı ve doku iskelesi arasında bağıl hareket oluşur. Bu nedenle doku iskelesinin reaktör duvarına doğru yer değiştirme eğilimi bulunmaktadır. Bu yer değiştirme, doku iskelesinin ve kültür ortamının yoğunluk farkına, doku iskelesinin boyutlarına, ortamın viskozitesine ve reaktörün dönme hızı gibi parametrelere bağlıdır (Anderson, 2004). Kültürasyon sırasında dönme hızı, doku iskelesinin dairesel yönde hareket edebilmesi için gerekli olan kuvvet = " $m_p r \omega^2$ " olacak şekilde ayarlanmaktadır (Şekil 2.23).



Şekil 2.23. Döner duvarlı biyoreaktörler ve doku iskelesine etki eden kuvvetlerin şematik gösterimi: F_d , hücre kültür ortamının akarken doku iskelesine uyguladığı sürüklenme kuvveti; F_L , hücre kültür ortamının doku iskelesine uyguladığı kaldırma kuvveti; F_c , santrifugal kuvvet; F_g , gravitasyonel kuvvet; W , doku iskelesinin ağırlığı; ω , açısal hız (Anderson, 2004); $\sum F_c + F_d + F_g = 0$ serbest düşme hali (Martin et al., 2004).

Biyoreaktördeki dönme hızından dolayı partikül (doku iskelesi ve/veya hücre) üzerine etkiyen santrifugal, sürüklenme ve gravitasyonel kuvvetlerin toplamı sıfıra

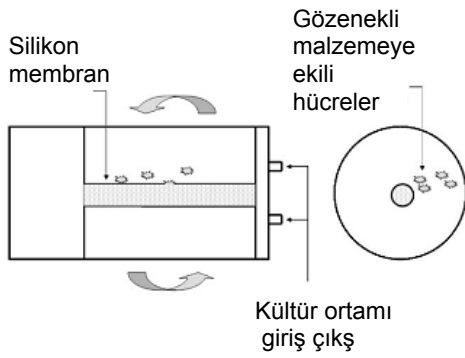
eşitlendiği an partikül serbest düşme eğilimi göstermektedir (Şekil 2.23). Böylece doku iskelelerinin sürekli serbest düşüş halinde, simüle edilmiş mikro-yerçekimi koşullarında kültüre edilebilmeleri mümkün olmaktadır (Unsworth and Lelkes, 1998; Anderson, 2004).

Döner duvarlı biyoreaktörlerde mikro-yerçekimi ortamında kültüre edilen hücrelerin metabolik aktivitelerinde, hücre-hücre etkileşimlerinde ve bazı genlerin eksprese edilmesinde iyileşme gözlemlenmiştir (Anderson, 2004). Hücre kültür ortamının reaktör içindeki akışı “katı vücut rotasyonu” olarak düşünülür ve bu akış sayesinde yüksek kayma gerilimleri elemine edilir. Reaktörün rotasyonuna bağlı olarak yeterli karıştırma sağlanan bu sistemlerde, reaktörün tamamen doldurulmasıyla hava-sıvı ara yüzeyi ve dolayısıyla hava kabarcığı oluşumu tamamen yok edilir. Ayrıca, ortama oksijen transferi de silikon membran üzerinden difüzyonla gerçekleşir. Böylece hava kabarcıklarının neden olabileceği türbülanslı akıştan kaçınılır (Hammond and Hammond, 2001). Döner duvarlı biyoreaktörler, düşük kesme kuvvetleri ve yüksek kütle aktarım hızları ile doku iskelelerine dinamik bir kültür ortamı yaratmaktadır. Dinamik ortam sonucunda kıkırdak ve kemik doku mühendisliğinde önemli aşamalar kaydedilmiştir (Godara et al., 2008).

Döner duvarlı biyoreaktörler, işletim açısından kesikli ve sürekli akışlı olarak ikiye ayrılır. Kesikli işletilen, farklı geometriye sahip 2 çeşit döner duvarlı biyoreaktör vardır: Yavaş dönen yatay biyoreaktörler (Slow turning lateral vessel, STLV, Şekil 2.24-a) ve çap/yükseklik oranı büyük olan biyoreaktörler (High aspect ratio vessel, HARV, Şekil 2.24-b). STLV, iki eşmerkezli silindirin arasında kalan boş alan olarak düşünülebilir. İç silindirde silikon gaz değiştirici membran bulunmaktadır. HARV’ de ise gaz değişimi tabandan gerçekleşmektedir. Farklı gaz değişim sistemleri nedeniyle, HARV sistemlerindeki birim kültür hacmine düşen havalandırma alanı STLV’ lere göre beş kat fazladır (Freed and Vunjak-Novakovic, 1997). Çalışma hacimleri açısından değerlendirildiğinde, HARV sistemleri STLV’ lere göre daha küçük hacimde çalışmaya olanak vermektedir (Anderson, 2004).

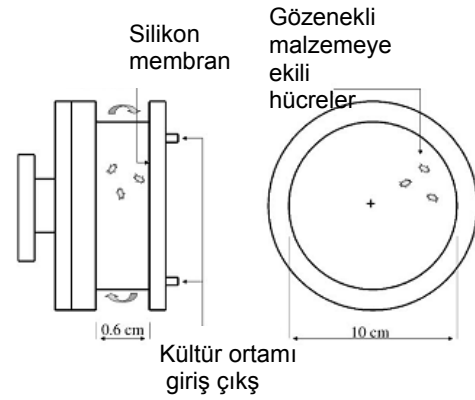
Sürekli akışlı olarak işletilen döner duvarlı perfüzyon biyoreaktörleri (Rotating wall perfused vessel, RWPV), geometrik açıdan ele alındığında akışlı STLV olarak düşünülebilir (Şekil 2.25). Fakat RWPV sürekli akışlı bir sistem olduğu için, bir uçta

hücre kültür ortamının girişi ve diğer uçta çıkışı bulunmaktadır. Hücre kültür ortamı, peristaltik pompa ile sürekli devridaim ettirilmektedir.



Yandan görünüm

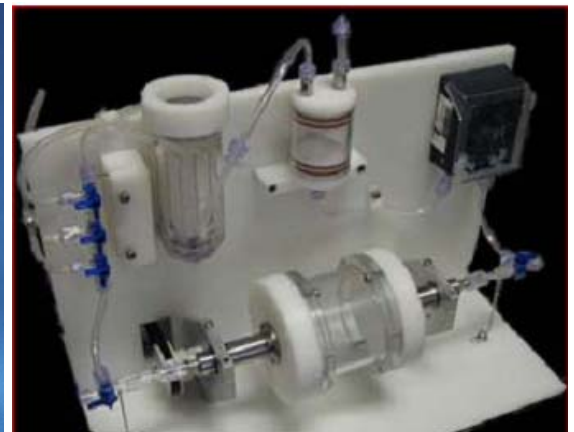
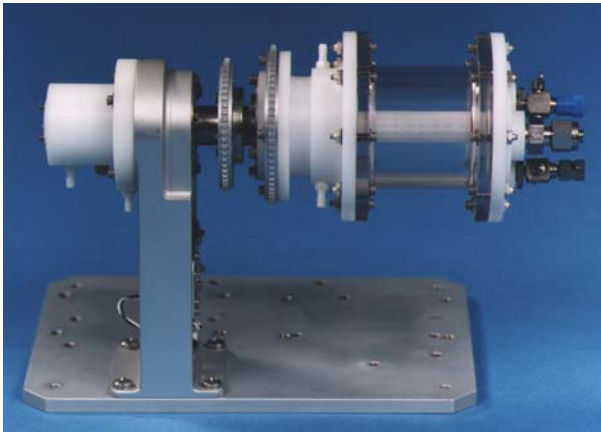
Önden görünüm



Yandan görünüm

Önden görünüm

Şekil 2.24. Döner duvarlı biyoreaktörler: (a) STLV sisteminde kullanılan kaplar ve geometrileri; (b) HARV sisteminde kullanılan kaplar ve geometrileri.



Şekil 2.25. Döner duvarlı perfüzyon biyoreaktörleri (Synthecon Inc.)

Döner duvarlı biyoreaktörlerdeki akış tipi laminar akıştır ve kütle aktarımı konveksiyon ile gerçekleşmektedir. Gaz değişimi için ise gaz değişim membranı kullanılmaktadır. RWPV sistemlerinde, mikro-yerçekimi koşullarının sağlanması için, kesikli döner duvarlı biyoreaktör sistemlerindeki parametrelere ek olarak hücre kültür ortamının akış hızı da ayarlanmaktadır. Böylece biyoreaktörün iç ve dış silindiri arasında kalan boş alanda, doku iskelelerinin serbestçe asılı kalması sağlanır (Lanza et al., 2000). Döner duvarlı biyoreaktörlerin, doku oluşumundaki avantajlarını incelemek için kondrositler (Vunjak-Novakovic et al., 1999), kardiyak hücreleri (Carrier, 1999) ve tümör hücreleri (Rhee, 2001) ile birçok çalışma yapılmıştır.

2.4.3. Kıkırdak doku mühendisliğinde kullanılan biyoreaktörler

Literatürde kıkırdak doku mühendisliğine yönelik olarak birçok biyoreaktör kullanılmaktadır. Her bir uygulama, biyoreaktör türünün kıkırdak doku rejenerasyonu için uygunluğunu, sistemin sunduğu avantaj ve dezavantajları göstererek tartışmaktadır. Biyoreaktörler karşılaştırıldıklarında, sürekli akışlı ve dinamik kültür sistemlerinin kesikli ve durgun olanlara göre, gerek kesme kuvvetleri, gerekse kütle aktarım mekanizmaları açısından çok daha iyi olduğu görülmektedir (Çizelge 2.3).

Freed ve arkadaşları, karıştırmalı kaplarda akışın, kondrosit üremesi ve matris oluşumuna olan etkisini incelemiştir. Hücreler PGA doku iskelelerine ekilmiştir ve 6 hafta boyunca durgun koşullarda ve karıştırmalı kaplarda kültüre edilmiştir. Sonuçlar, karıştırmalı kaplardaki hücre üremesinin ve matris oluşumunun durgun kültürdekine göre daha yüksek olduğunu göstermiştir (Freed et al., 1994).

Perfüzyon kolonlarına bakıldığında, biyoreaktörlerin kemik hücrelerinin üremesini, farklılaşmasını ve mineralize matris birikimini (Bancroft, 2002 ve Goldstein et al., 2001); kondrositlerin ise GAG sentez ve birikimini (Davisson, 2002; Pazzano, 2000) arttırdığı gözlemlenmiştir. Perfüzyon sistemlerinde farklı akış hızlarının ve sürelerinin etkisi Davisson ve arkadaşları tarafından incelenmiştir. PGA doku iskelelerine kondrosit hücreleri ekilmiş, bir gün ya da bir hafta, durgun ve perfüzyon (kültür ortamı akış hızı: 10 µm/s) olmak üzere iki farklı kültür ortamında

kültürasyon gerçekleşmiştir. Sonrasında, hücre-doku iskelesi yapıları perfüzyon biyoreaktörüne yerleştirilmiştir. İki farklı kültür ortamının akış hızı denenmiştir: 10 $\mu\text{m/s}$ ve 170 $\mu\text{m/s}$. Sonuçlar, üç günlük kültür sonunda GAG salımının ve birikiminin çok az olduğunu göstermiştir. Dokuz günlük kültürde ise, akış hızı ilk yedi gün 10 $\mu\text{m/s}$ ve son iki gün 170 $\mu\text{m/s}$ olacak şekilde ayarlandığında, durgun sisteme göre GAG birikimi %60, GAG sentezi ise %136 artmıştır. Hücre sayıları incelendiğinde, ilk günlerde artan akış hızıyla birlikte hücre sayısında bir azalma görülmüştür. Bu da yüksek perfüzyon hızının hücrelerin doku iskelesinden kopmasına neden olabileceğini göstermiştir (Davisson, 2002).

Çizelge 2.3. Doku mühendisliğinde kullanılan biyoreaktörlerin karşılaştırılmalı özellikleri.

Biyoreaktörler Özellikler	Hücre Kültür Kapları	Karıştırmalı Kaplar	Perfüzyon Kolonları	STLV & HARV	RWPV
Doku iskelesi yerleşimi	Sabit	Sabit	Sabit	Dinamik süspanse halde	Dinamik süspanse halde
İşletim	Kesikli	Kesikli	Sürekli akışlı	Kesikli	Sürekli akışlı
Kültür koşulu	Durgun	Dinamik	Dinamik	Dinamik	Dinamik
Karışma mekanizması	-	Manyetik karıştırıcı	Devridaim eden akış hareketi	Doku iskelesinin dönme hareketi	Viskoz pompalama
Akış profili	-	Türbülent akış	Laminer akış	Laminer akış	Laminer akış
Kütle aktarım mekanizması	Difüzyon	Konveksiyon	Konveksiyon	Konveksiyon	Konveksiyon

Pazzano ve arkadaşları, yaptıkları çalışmada durgun ve perfüzyon biyoreaktör sistemlerinde kondrogenezi karşılaştırmıştır. PGA/PLLA doku iskelelerine sığırdan

elde edilen kondrosit hücrelerinin ekimi gerçekleştirilmiştir. Perfüzyon sisteminde akış hızı, kıkırdak matris sentezini uyardığı bilinen, 1 µm/s değerine ayarlanmıştır. Hücre kültür ortamı, peristaltik pompa ile dikey durumdaki biyoreaktöre tabandan verilmiştir. Histolojik boyamalar sonunda, durgun kültürdeki yapıların hücre dışı matris açısından çok zayıf olduğu ve herhangi bir hücre oryantasyonunun bulunmadığı gözlemlenmiştir. Perfüzyon biyoreaktöründeki hücrelerin ise akış yönünde dizilmiş ve yüksek miktarda hücre dışı matris sentezledikleri rapor edilmiştir. Kültürün 4. haftasında perfüzyon sistemindeki GAG derişimlerinin durgun kültüre göre %184, DNA içeriğinin ise %118 daha fazla olduğu bulunmuştur. Bu çalışma, perfüzyonun, kıkırdak hücrelerinin doku iskelesi içinde düzenlenmesinde etkili olduğunu göstermiştir (Pazzano, 2000).

Döner duvarlı biyoreaktörde yapılan kıkırdak doku çalışmalarında, kültürün başlamasından birkaç hafta sonra elde edilen kıkırdağımsı yapının biyokimyasal ve biyomekanik özelliklerinin, durgun veya karıştırmalı kaplardakine göre çok daha iyi özelliklere sahip olduğu ve değerlerin doğal kıkırdak içeriğine yaklaştığı görülmüştür (Vunjak-Novakovic et al., 1999). Freed ve arkadaşları, *in vitro* ortamda hücre-doku iskelesi yapılarında meydana gelen kondrojenezi döner duvarlı biyoreaktörler kullanarak incelemiştir. Çalışmada yavru sığır ekleminden elde edilen kondrosit hücreleri, karıştırmalı kaplarda fibröz PGA disklerine ekilmiştir. Biyoreaktör duvarları, doku iskelelerinin kültür ortamında asılı kalabilmeleri için, 15 ve 30 rpm dönme hız aralığında döndürülmüştür. Kültürün ilerleyen zamanlarında, hücre-doku iskelesi yapılarının kütlelerinin artmasına bağlı olarak dönme hızı da arttırılmıştır. Hücre yoğunluk değerleri, GAG ve kollajen tip II miktarları, kültürün 4. ve 12. günlerinde doku iskelelerinin dış yüzeylerinde daha fazla bulunmuştur. 40 günlük kültür sonunda ise hücreler doku iskelesinde homojen dağılım göstermiş ve doğal kıkırdak yapısına çok benzeyen hücre dışı matris elemanlarına sahip olduğu rapor edilmiştir. Bu çalışma artan kültür süreleriyle döner duvarlı biyoreaktörlerde, gerçek kıkırdağın hücre dışı matris özelliklerine sahip yapıların üretilmesinin mümkün olduğunu göstermiştir (Freed et al., 1998).

Vunjak-Novakovic ve arkadaşları (1999) yaptıkları çalışmalarda, PGA doku iskelelerine kondrosit hücreleri ekmişler ve kültür ortamı olarak durgun kaplar,

karıştırılmalı kaplar ve döner duvarlı biyoreaktörler kullanarak, kültür şartlarının oluşan yeni kıkırdak dokunun bileşimi ve mekanik özellikleri üzerindeki etkisini incelemişlerdir. Durgun koşullarda kültüre edilen yapıların ince, kırılğan ve düzensiz şekle sahip olduğu görülmüştür, ayrıca GAG birikimi doku iskelelerinin sadece dış yüzeyinde gerçekleşmiştir. Karıştırılmalı kaplarda kültüre edilen yapılarda, daha iç bölgelerde GAG birikimi gözlenmiştir. Döner duvarlı biyoreaktörlerdeki hücre-doku iskelesi yapıları incelendiğinde yapının kalın ve tümüyle kıkırdağımsı hücre dışı matris içerdiği görülmüştür. Kültürün 6. haftasında kollajen miktarları değerlendirildiğinde, döner duvarlı biyoreaktördeki değer, durgun ve karıştırılmalı kaplardakilere göre oldukça yüksek olduğu, ancak doğal kıkırdağa göre düşük olduğu bulunmuştur. Mekanik özellikler incelendiğinde farklı şartlarda kültüre edilen tüm hücre-doku iskelesi yapılarının, doğal kıkırdağa göre yetersiz olduğu görülmüştür. Kültürasyon yedi ay süreyle devam ettirildiğinde, döner duvarlı biyoreaktördeki örneklerin GAG değerlerinin yükseldiği ve mekanik dayanımlarının arttığı, ayrıca bu yapıların özellikleri bakımından doğal kıkırdaktan ayırt edilemediği gözlemlenmiştir (Vunjak-Novakovic et al., 1999).

2.4.4. Simülasyon çalışmaları

Döner duvarlı biyoreaktörlerde silindirlerin dönme hızları ve ortam akış hızı gibi mikro-yerçekimi koşullarının oluşturulması için çok önemli olan parametreler kesinlikle deneme-yanılma yoluyla belirlenmemelidir. Biyoreaktörler için optimum işletme koşullarının bulunması amacıyla simülasyon metodlarına ihtiyaç duyulmaktadır. Son yıllarda geliştirilen Hesaplamalı Akış Dinamik (Computational Fluid Dynamic, CFD) yazılımları bu amaca yönelik olarak sıkça kullanılmaktadır (Williams, 2002). Hesaplamalı akış dinamiği, akışkanlar mekaniğinin, akışkan hareketini içeren problemlerini nümerik çözümleme ve algoritmalar ile ele alan bir branşıdır. Karmaşık yüzeyler ile etkileşen akışkanların davranışlarını simüle edebilmek için gereken milyonlarca denklemin çözümü bilgisayarlar ile gerçekleştirilmektedir. CFD problemlerinin temelleri, tekli-faz akışkan hareketlerini tanımlayan Navier-Stokes eşitliklerine dayanmaktadır (CFD, 2007).

Hesaplamalı akış dinamiği ile farklı konulardaki problemlerin çözümü gerçekleştirilse de tüm bu yaklaşımlarda temel çözüm basamakları takip

edilmektedir. İlk olarak problemin geometrisi, yani fiziksel sınırları, tanımlanmaktadır. Sonrasında akışkan tarafından kaplanan hacim, soyut hücrelere bölünerek, *meş* oluşturulmaktadır. Bu meş eş dağılımlı olabildiği gibi düzensiz dağılımlı da olabilmektedir. Fiziksel model, hareket, entalpi ve korunum eşitlikleri tanımlandıktan sonra, sınır koşulları belirlenmektedir. Bu aşamadan sonra simülasyon başlatılır ve yatışkın hal veya geçiş halleri için iterasyon yapılarak eşitlikler çözülür. Yazılımdaki çözüm sonrası işlemcisi ile elde edilen sonuçlar analiz edilir ve görüntülenir. Böylece biyoreaktör içindeki akış bölgeleri, kayma gerilimleri ve doku iskelesinin içinde ve etrafındaki kütle aktarımları hesaplanabilmektedir. Ayrıca reaktör sistemlerinde, ölçek büyütme sonrasında değişecek olan momentum ve oksijen aktarımları bu yazılımlar sayesinde önceden bulunabilmektedir (Williams, 2002).

FLUENT, COSMOSFloWorks, COSMOL Multiphysics vb. gibi ticari olarak elde edilebilen birçok CFD yazılımı bulunmaktadır. Birçok farklı problemin çözümünde kullanılabilen bir yazılım olan FLUENT, Fluent şirketinin ilk ürünüdür. Bu yazılım, yanyana dizilmiş olan meş elemanlarını sonlu hacim çözümü kullanarak ele alır. Çok farklı endüstrilere uygulanabilecek fiziksel modeller sunan bu yazılımın pek çok özelliği bulunmaktadır. Dinamik ve hareketli meş kurabilme özelliği sayesinde, sistemin ilk kurulumunda kullanılan meş, hareket tanımlandıktan sonra otomatik olarak harekete uyum sağlar. Böylece hareket eden cisimlerin etrafındaki akış modelleneceği zaman gerçekçi yaklaşımlarda bulunulabilir. Türbülans içeren akış profillerinin ele alınması için birçok model bulunmaktadır. Tepkimeli ve çok-fazlı akışların çözümü, ayrıca ısı aktarımı ve radyasyon problemleri için birçok model seçeneği vardır. Çözüm sonrası işlemcisi sayesinde veriler sistem üzerinde çeşitli kontürler ve vektörler ile görüntülenebilmektedir (Fluent Inc., 2007).

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Bu bölümde, sunulan tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen deneysel çalışmalar ile ilgili bilgi sunulmaktadır. İlk bölümde, gözenekli kitosan doku iskelelerinin hazırlanması ve karakterizasyonuna yönelik çalışmalar sunulmuştur. İkinci bölümde, hazırlanan kitosan doku iskelelerinin RGD ve EGF ile biyomodifikasyon çalışmalarına yer verilmiş ve kitosan doku iskelelerine BMP-6 yüklenmesi ile ilgili çalışmalar özetlenmiştir. Üçüncü bölümde, ATDC5 kondrojenik hücre hattı ile durgun koşullarda yürütülmüş hücre kültür çalışmalarına yer verilmiştir. Buna ek olarak, hazırlanan BMP-6 yüklü doku iskelelerinin dinamik koşullarda (döner duvarlı biyoreaktör; perfüzyon modlu) ATDC5 kondrojenik hücre hattı ile gerçekleştirilen kültür çalışmaları açıklanmıştır. Dördüncü bölümde ise optimum kıkırdak doku oluşumunun incelenmesine yönelik olarak, kitosan doku iskelelerinin altı farklı kaynaktan sağlanan hücrelerle statik koşullarda yürütülen hücre kültür çalışmalarına yer verilmiştir. Beşinci bölümde, belirlenen optimum özelliklere sahip hücre türü ile kitosan doku iskelelerinde ve perfüzyon biyoreaktörlerde gerçekleştirilen hücre kültür çalışmalarına yer verilmiştir. Son bölümde ise, döner duvarlı biyoreaktörlerde ortam koşullarının hesaplamalı akışkanlar dinamiği (CFD) modeliyle simülasyonuna yönelik olarak yapılan çalışmalar hakkında bilgi verilmiştir.

3.1. Kitosan Doku İskelelerinin Hazırlanması

Farklı deasetilasyon derecelerine sahip kitosan (%75-85, %85'lik, Sigma-Aldrich) 0.2 M asetik asit çözeltisinde çözünene kadar karıştırılıp, % 2 ve % 3 (w/v) konsantrasyonlara sahip kitosan jel karışımları elde edilmiştir. Elde edilen kitosan jel karışımları, safsızlıkların giderilmesi amacıyla filtreden (100 µm elek) geçirilmiş ve 24 gözlü Petri kaplarına (İsviçre) dökülerek -20°C'de dondurulmuştur. Bu işlemi takiben gözenekli kitosan doku iskeleleri "dondurarak kurutma" (freeze-drying) yöntemi ile hazırlanmıştır. Bu metodla, -20°C'de donmuş kitosan çözeltisi -80°C'de 4 gün süreyle liyolifize edilmiş (Christ, Almanya), böylece gözenekli yapıda ve içsel bağlantıları olan 10 mm çaplı ve 2 mm kalınlığa sahip kitosan doku iskeleleri elde edilmiştir. Elde edilen kitosan doku iskelelerinin stabilizasyonu için iskeleler %

96'lık (v/v) etanol çözeltisi içerisinde 1 gün, %70'lik (v/v) etanol çözeltisi içerisinde ise 1 saat bekletilmiştir.

3.1.1. Kitosan doku iskelelerinin karakterizasyonu

3.1.1.1. Gözenek boyut dağılımı

Hazırlanan kitosan doku iskelelerinin gözenek boyut dağılımları civalı porozimetre (MIP, Quantachrome, ABD) cihazı ile incelenmiştir. Testler düşük basınç ortamında, yaklaşık 0-50 psi basınç aralığında gerçekleştirilmiştir. Kitosan üzerindeki civanın temas açısı 140° ve civa yüzey gerilimi ise 480 erg/cm² olarak belirtilmiştir.

3.1.1.2. Taramalı elektron mikroskop (SEM) ile analiz

Liyofilize edilen kitosan doku iskelelerinin yüzey ve kesit morfolojileri (LEO-435 VP, İngiltere) taramalı elektron mikroskobu ile incelenmiştir. Örnekler altın-paladyum ile kaplandıktan sonra incelemeye alınmıştır.

3.1.1.3. Şişme çalışmaları

Kitosan doku iskeleleri için şişme çalışmaları örneklerin 37°C'de fosfat tampon çözeltisinde (PBS, pH=7.4) rehidrasyonu ile gerçekleştirilmiştir. Örnekler tampon çözeltisi içerisinde çıkartılmış ve üzerindeki fazla çözelti filtre kağıdı ile uzaklaştırılmıştır. Şişme oranları gravimetrik olarak aşağıdaki eşitlik (Eşitlik 3.1) kullanılarak kuru temelde belirlenmiştir:

$$\text{Şişme oranı} = (W - W_0)/W_0 \quad (3.1)$$

eşitlikteki W_0 kitosan iskelenin kuru ağırlığını, W ise yaş ağırlığını göstermektedir.

3.1.1.4. Kitosan iskelelerin mekanik dayanım testleri

2 mm kalınlığa sahip kitosan iskeleler mekanik testlerden önce 37°C'deki PBS içerisinde tamamen şişirilmiştir. Mekanik dayanım testi, 500 N'luk yüke sahip bir

başlığın (Lloyd Ins., İngiltere) malzeme üzerine 5 mm/dk'lık sabit bir hızda basılmasıyla gerçekleştirilmiştir. Mekanik test sonucu kitosan iskelelerin gerilim-gerinim eğrileri elde edilmiştir. Eğrilerdeki doğrusal bölgenin eğiminden malzemelerin elastik modülleri (E) hesaplanmıştır.

3.1.1.5. Biyobozunurluk testleri

Kitosan iskelelerin *in vitro* ortamdaki bozunma karakteristikleri enzimatik olarak incelenmiştir. % 75-85 ve % 85 deasetilasyon derecelerine sahip olan 2 mm kalınlıktaki kitosan iskeleler, 37°C'de 500 µg/ml konsantrasyona sahip “tavuk yumurta beyazı lizozimi” (Cat No: L6876, Sigma, Almanya) ve %0.1 (w/v) sodyum azid içeren kültür ortamı (DMEM, Sigma Co.) içerisinde 3 hafta süreyle inkübasyona bırakılmıştır. Kontrol grupları oluşturmak için kitosan iskeleler lizozim içermeyen kültür ortamında da aynı anda inkübe edilmiştir. Üç haftalık inkübasyon süresince kültür ortamları haftada bir yenilenmiştir. Inkübe edilen kontrol ve test kitosan iskeleler 1., 4., 7., 14. ve 21. günlerde dehidre edilerek kuru ağırlıkları ölçülmüş ve inkübasyon öncesindeki kuru ağırlıklarla karşılaştırılmıştır. Kitosan iskelelerin bozunma değerleri, Eşitlik 3.2'den yüzde ağırlık kaybı olarak (W_L) belirlenmiştir.

$$W_L (\%) = [(W_0 - W)/W_0] \times 100 \quad (3.2)$$

Eşitlikteki W_0 doku iskelesinin başlangıç kuru ağırlığını, W ise bozunma sonrası kuru ağırlığı göstermektedir.

3.1.2. Hücre-doku iskelesi etkileşiminin belirlenmesi

Hazırlanan kitosan iskelelerin biyoyumluluklarını test etmek amacıyla iskeleler, L929 fare fibroblastları ile kültüre edilmiştir. L929 hücre hattı HÜKÜK Hücre Hattı Koleksiyonundan elde edilmiştir (No: 92123004, Türkiye Şap Enstitüsü, Ankara). Hücreler kültür kaplarında %10 fetal sığır serumu (FBS, Sigma Co., Almanya) içeren Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Sigma Co., Almanya) besi ortamı kullanılarak, 37°C'deki % 5 CO₂ içeren etüvde (Heraus Instruments, Almanya) kültüre edilmiştir. Tek tabaka halinde elde edilen hücreler yüzeyden %

0.01 trypsin/10 mM EDTA (Sigma, Almanya) ile kaldırılmış, santrifüjlenip hücre ekimi için tekrar süspansiyon edilmiştir.

3.1.2.1. Kitosan iskelelere hücre ekimi

Parafilm ile kaplanmış 24 gözlü Petri kapları % 96'lık alkolle muamele edildikten sonra UV ışık altında 30 dakika sterilizasyon için bekletilmiştir. 10 mm çapa, 2 mm kalınlığa sahip kitosan iskelelerin sterilizasyonu için iskeleler %70'lik etanol içerisinde 24 saat ve ardından yine 24 saat boyunca Dulbecco's PBS içerisinde bekletilmiştir. Daha sonra, 3.4×10^4 hücre/ml konsantrasyondaki hücre süspansiyonundan 1.5 ml alınarak kitosan iskele üzerine ekim işlemi gerçekleştirilmiştir.

3.1.2.2. Hücre yapışma deneyleri

Kitosan iskele içerisine difüzlendi hücre sayısı hemositometrik sayımla bulunmuştur. Farklı kültür zamanlarında (1, 2, 4 ve 6 saat), besi ortamındaki yapışmayan hücreler tripan-mavisi metodu ile Neubauer hemositometresi (Karakeçili, 2006) kullanılarak sayılmıştır. İskele içerisine difüzlendi hücre sayısı, ekilen toplam hücre sayısından yapışmayan hücrelerin sayısının çıkartılması ile belirlenmiştir. Sadece iskele üzerine yapışan hücrelerin canlı kalabilmesinden dolayı, ilk gün sonundaki büyüme indeksi (son hücre konsantrasyonu/ başlangıç hücre konsantrasyonu) MTT analizi (Karakeçili, 2006) ile belirlenmiştir.

3.1.2.3. Hücre üreme kinetiği ve fibroblastik çoğalma

6 günlük kültür süresince iskelelerdeki hücrelerin üreme testleri kantitatif olarak, 3-[4,5-dimethyltiyazol-2-yl]-difeniltetrazolium bromür (MTT) formazan (Sigma, Almanya) kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Karakeçili, 2006). Yöntemde, Petri kaplarında inkübasyona bırakılan kitosan iskelelerin üzerindeki besi ortamından 0.75 ml çekilip 0.75 ml taze besi ortamı ile değiştirilmiş ve 0.15 ml MTT çözeltisi (2.5 mg MTT, 1 ml PBS içerisinde çözünmüş) eklenmiştir. Örnekler 37°C'de 4 saat inkübe edilmiştir. Sonrasında üzerindeki ortam atılarak iskelede oluşan formazan kristalleri 0.04 M HCl içeren izopropanol ile çözülmüş ve elde edilen boya

çözeltisinin optik yoğunluğu 540 nm’de microplate reader (Asys UVM 340, Avusturya) ile belirlenmiştir. Hücre içermeyen iskeleler kontrol olarak kullanılmış ve MTT bu örneklerle de uygulanmıştır. Özgül hücre üreme hızı (μ) üstel hücre üremesi varsayılarak Eşitlik 3.3, ikilenme süresi ise Eşitlik 3.4 yardımıyla belirlenmiştir.

$$\ln(A/A_0) = \mu(t - t_0) \quad (3.3)$$

$$t_d = \ln 2 / \mu \quad (3.4)$$

Eşitliklerdeki A_0 , t_0 (sa) zamanındaki başlangıç absorbans değerini; A , t (sa) zamanındaki absorbans değerini, μ özgül üreme hızını (sa^{-1}), t_d ise ikilenme süresini göstermektedir.

3.1.2.4. İskele içerisindeki hücrelerin mikroskopik olarak görüntülenmesi

Hücrelerin iskele içerisindeki morfolojileri 4 günlük inkübasyon sonunda taramalı elektron mikroskopisi (SEM) (Zeiss Evo 50, Almanya) ile incelenmiştir. İskeleler hafifçe PBS ile yıkandıktan sonra hücreler 0.1 M PBS (pH=7.4) içerisindeki %2.5’luk (v/v) glutaraldehit (Sigma, Almanya) çözeltisi ile 4°C’de 1 saat boyunca muamele edilerek sabitlenmiştir. Sonrasında iskeleler etanol çözeltileri (%30, %50, %70, %90 ve %96 (v/v)) içerisinde dehidre edilmiştir. Hekzametildisilazan (Sigma, Almanya) ile yıkandıktan sonra kurutulan örnekler altın-paladyum ile kaplandıktan sonra incelemeye alınmıştır. Yukarıda anlatılan yöntem tez kapsamında yapılan tüm SEM analizleri için kullanılmıştır. L929 hücreleriyle yürütülen kültür çalışmalarında ikinci ve dördüncü gün sonunda floresan mikroskobu (Olympus, ABD) ve konfokal lazer mikroskobu (CLSM, Zeiss, Almanya) ile incelenmek üzere örnekler hazırlanmıştır. Kısaca, örnekler PBS’de yıkandıktan sonra yukarıda anlatılan yöntemle bağlı kalınarak sabitlenmiştir. Örnekler 0.5 $\mu\text{g/ml}$ etidyum bromür (Sigma, Almanya) ile 15 dakika karanlıkta tutularak boyanmış ve ardından floresan mikroskop ve CLSM ile incelenmiştir.

3.2. Kitosan Doku İskelelerinin Biyomodifikasyonu

3.2.1. Kitosan doku iskelelerine RGD ve EGF immobilizasyonu

Kitosan doku iskeleleri, hücre yapıştırıcı bir molekül olan fibronektinin RGD sekansı (Sigma, Almanya) veya farenin çene altı tükürük bezinden elde edilen epidermal büyüme faktörü (EGF, Cat. No: E4157, Sigma-Aldrich, Almanya) ile kovalent immobilizasyon yöntemi kullanılarak modifiye edilmiştir (Yoon et al., 2004). Doku iskeleleri %70 (v/v) etanol çözeltisi ve fosfat tampon çözeltisinde (PBS, pH=7.4) yıkanmıştır, daha sonra 0.08 mmol suberikasit bis(N-hidroksi-süksinimid ester) (NHS) (Sigma, Almanya) içeren 10 ml PBS içinde, hafif karıştırma ile 4 saat boyunca oda sıcaklığında bekletilmiştir. Aktive edilen doku iskeleleri PBS ile 5 kez yıkandıktan sonra 3 µmol RGD peptidi içeren 10 ml PBS içine yerleştirilip, 12 saat boyunca 4°C'de çalkalanmıştır. Peptid immobilize edilen doku iskeleleri PBS ile yıkanmıştır ve dondurularak kurutulmuştur. Doku iskelelerine EGF immobilizasyonu için de benzer bir yöntem kullanılmıştır. Aktive edilen doku iskeleleri PBS ile 5 kez yıkanmış ve ardından 2 µg/ml EGF çözeltisine (PBS içinde) yerleştirilerek 12 saat boyunca 4°C'de çalkalanmıştır. EGF immobilize edilen doku iskeleleri PBS ile yıkanmış ve dondurularak kurutulmuştur.

3.2.2. RGD ve EGF ile immobilize edilen doku iskelelerinin karakterizasyonu

3.2.2.1. FTIR spektroskopisi

Doku iskelelerinin kimyasal yapıları Fourier Transform Infrared Spektroskopisi (FTIR) ile incelenmiştir. Tablet örnekler, kurutulmuş kitosan, RGD ve EGF immobilize edilmiş olan kitosan doku iskelelerinin KBr içinde dağıtılmasıyla hazırlanmıştır. Örneklerin spektrumları 400-4000 cm⁻¹ dalga boyu aralığında FTIR-8101 (Shimadzu, Japonya) ile alınmıştır.

3.2.2.2. RGD immobilizasyonunun floresan mikroskop ile doğrulanması

RGD immobilize edilmiş olan kitosan doku iskelelerinde RGD varlığını dolaylı olarak belirlemek için, NHS ile aktive edilen doku iskeleleri RGD yerine, floresan

bir boya, floresanamin (Sigma, Almanya) çözeltisi (0.3 mg/ml, aseton içinde), ile muamele edilmiştir. Aktive edilen her bir doku iskelesi 100 µl floresanamin içeren 1 ml PBS içinde, hafif çalkalama altında, 1 saat boyunca bekletilmiştir. RGD immobilize edilen doku iskeleleri, kitosan doku iskelelerinde RGD bağlanmamış bölgelerin görüntülenmesi için, daha sonra aynı koşullarda floresanamin çözeltisinde bekletilmiştir. Floresan işaretli, aktive edilmiş ve RGD immobilize edilmiş kitosan doku iskeleleri floresan mikroskop (Olympus, USA) ile karşılaştırmalı olarak görüntülenmiştir.

3.2.2.3. EGF immobilize edilen kitosan doku iskelelerinin immünolojik-boyanması

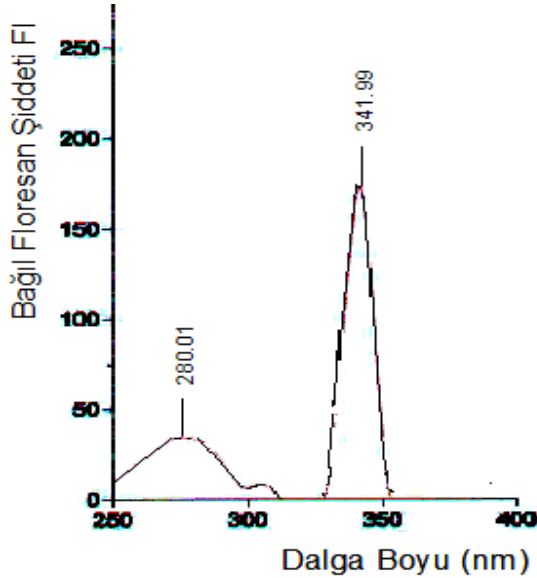
EGF immobilize edilen kitosan doku iskelelerini görüntülemek için, doku iskeleleri % 0.02 NaN_3 ve %3 BSA içeren PBS içinde, buz banyosunda 24 saat boyunca tutulmuştur ve ardından % 0.02 sodyum azid (NaN_3) ve %3 serum albumin, BSA (Sigma, Almanya) (2 µg/ml) içeren anti-EGF (Sigma, Almanya) (PBS içinde) çözeltisinde, buz banyosu içinde 12 saat boyunca inkübe edilmiştir. PBS ile yıkanan doku iskeleleri Anti-Rabbit IgG antikoru (Sigma, Almanya) (10 µg/ml) ile buz banyosu içinde 12 saat boyunca inkübe edilmiştir. Boyanan doku iskeleleri PBS ve distile su ile yıkanmış, ardından floresan mikroskop (Olympus, ABD) ile görüntülenmiştir.

3.2.2.4. RGD ve EGF immobilize edilen kitosan doku iskelelerinin kantitatif analizi

İmmobilize edilen RGD miktarı ninhidrin metodu ile belirlenmiştir (Zheng et al., 1995). Kısaca, immobilizasyon işlemi sonrası çözeltide kalan RGD, ninhidrin ile tepkimeye girerek mor renkli bir kompleks oluşturmuş ve çözeltinin absorbansı, 570 nm’de UV-görünür spektrofotometresi (Hitachi, 150-20) kullanılarak ölçülmüştür. RGD miktarı, kalibrasyon eğrisi kullanılarak bulunmuştur. Daha sonra bu miktar, başlangıç konsantrasyonundan çıkarılmış ve böylece, dolaylı bir şekilde, kitosan doku iskelesine immobilize olan RGD miktarı belirlenmiştir. Ninhidrin yöntemine ait kalibrasyon grafiği Ek 1’de verilmiştir.

Çalışma kapsamında hazırlanan kitosan doku iskelelerine immobilize olan EGF miktarı, floresan spektrofotometresi (Cary Eclipse, Avustralya) kullanılarak, oligopeptidin triptofan uçlarından izlenerek tayin edilmiştir. Uyarılma (λ_{uy}) ve emisyon (λ_{em}) dalga boylarını belirlemek amacıyla pH=7'de PBS tamponu içerisinde 0.001 mg/ml derişiminde EGF stok çözeltisi hazırlanmıştır. Kuartz küvetlere aktarılan EGF çözeltisinin uyarılma dalga boyu 280 nm'de sabit tutularak, emisyon spektrumu 300-400 nm aralığında taranmıştır. Tarama sonucu EGF'in maksimum emisyon dalga boyu 342 nm olarak bulunmuştur. Emisyon dalga boyu 342 nm'de sabit tutularak, uyarılma dalga boyu için 220-350 nm arasında maksimum dalga boyu taraması yapılmış ve bu değer 280 nm olarak gözlenmiştir (Karakeçili, 2006) (Şekil 3.1).

İmmobilize olan EGF miktarının tayini amacıyla kovalent immobilizasyon işlemi sonrasında yüzey üzerinden alınan EGF çözeltisinin floresan şiddeti ölçülerek yüzeye immobilize olan miktar indirekt olarak hesaplanmıştır. İmmobilize olan EGF miktarı, başlangıç çözeltisindeki EGF miktarından çözeltide kalan miktarın çıkartılmasıyla hesaplanmıştır. Floresan şiddetinin EGF miktarı ile olan değişimine ait kalibrasyon grafiği Ek 1'de verilmiştir.



Şekil 3.1. EGF'e ait uyarılma ve ışıma dalga boylarını gösteren floresan spektrumu (Karakeçili, 2006).

3.2.3. Kitosan doku iskelelerine BMP-6 yüklenmesi

%2 (w/v) bileşimindeki kitosan doku iskeleleri için, literatür çalışmalarına bağlı olarak pellet kültürlerde kondrojenezi arttırdığı belirlenen minimal konsantrasyondaki BMP-6 (Cat. No: 507-BP, R&D Systems, ABD) kullanılması öngörülmüştür (Sekiya et al., 2001). Kitosan doku iskelelerine BMP-6 yüklenmesi emdirilme (embedding) yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Yöntemde öncelikle, 2 µg/ml konsantrasyona sahip olacak şekilde BMP-6 çözeltisi, Dulbecco fosfat tamponu (DPBS, pH:7,4, Invitrogen) içerisinde hazırlanmıştır. Hazırlanan BMP-6 çözeltisinden 50 µl alınarak bir mikropipet yardımıyla kitosan doku iskelelerine damlatılmış ve yükleme işlemi tamamlanmıştır. Hemen sonrasında ise iskeleler dondurarak kurutma (freeze-drying) yöntemi ile -80°C'de 1 gün boyunca liyofilize edilmiştir. Kitosan doku iskelelerine yüklenmiş BMP-6 miktarları yükleme çözeltisindeki konsantrasyona bağlı olarak, kuru doku iskelesi (yaklaşık 3 mg ağırlığa sahip) başına 100 ng olarak hesaplanmıştır. Yüklenen BMP-6 konsantrasyonu RayBio® Human BMP-6 ELISA kiti (Ray Biotech, Inc., USA) ile üretici firmanın protokolü kullanılarak belirlenmiştir.

3.2.3.1. Kitosan doku iskelelerindeki BMP-6'nın görüntülenmesi

Doku iskelelerine yüklenmiş olan BMP-6'nın görüntülenebilmesi için floresan bir boya olan floresan 5(6) izotiyosiyanat (FITC, Sigma, Almanya), BMP-6 üzerindeki primer amin gruplarının, diyaliz tüp selüloz membran tekniği (The and Feltkamp, 1970) ile işaretlenmesi için kullanılmıştır. Protein çözeltisinin her bir ml'si için 50 µl FITC çözeltisi eklenmiştir ve çözelti 4°C'de 8 saat boyunca karanlıkta inkübe edilmiştir. Son olarak hazırlanan çözelti selüloz membran (Sigma, Almanya) ile 2 gün boyunca diyaliz edilmiştir. Elde edilen FITC işaretli BMP-6 çözeltisi kitosan doku iskelelerine emdirilmiş ve 1 gece dondurarak kurutma yöntemiyle liyofilize edilmiştir. Kitosan doku iskeleleri üzerindeki floresan işaretli BMP-6 floresan mikroskobu (Olympus, ABD) ile gözlemlenmiştir.

3.3. ATDC5 Kondrojenik Hücre Hattı ile Doku Mühendisliği Çalışmaları

Çalışmanın bu bölümünde, hazırlanan kitosan doku iskelelerinin kondrojenik potansiyelinin araştırılması amacıyla gerçekleştirilen hücre kültür çalışmaları açıklanmıştır. Hücre kültür çalışmaları Riken Hücre Bankasından (Japonya) satın alınan ATDC5 hücre hattı (fare kondrojenik hücre hattı) ile yürütülmüştür. Hücreler, %5 (v/v) fetal sığır serum (FBS, Sigma Co., Almanya) ve %1 penisilin-streptomisin (Biological Industries, İsrail) ile desteklenmiş DMEM/Ham's F12 (Sigma Co., Almanya) besi ortamı kullanılarak flasklarda kültüre edilmiştir. 37°C'de, nemli CO₂ (%5) atmosferinde (Heraus Instruments, Almanya) tutulan hücreler, %0.25 tripsin-EDTA (Sigma, Almanya) ile yüzeyden kaldırılmış, santrifüjlenip hücre ekimi için besi ortamında tekrar süspansiyon edilmiştir. Hücre kültür çalışmaları hem durgun koşullarda, hem de döner duvarlı biyoreaktörlerdeki dinamik koşullarda gerçekleştirilmiştir. ATDC5 hücre hattının karakterizasyon çalışmaları Ek 2'de sunulmuştur.

3.3.1. Durgun koşullardaki çalışmalar

Çalışmada, durgun koşullarda yürütülen hücre kültür çalışmalarında, kitosan, RGD-kitosan, EGF-kitosan ve BMP-6 yüklü kitosan doku iskeleleri kullanılmıştır. Hücre kültürleri 24 gözlü doku kültür kaplarında (TCPS), durgun koşullarda yürütülmüştür. Hücre kültür deneyleri için 24 gözlü kaplar parafilm ile kaplanmış ve %96'lık etanol çözeltisi ile muamele edildikten sonra UV ışık altında 30 dakika sterilizasyon için bekletilmiştir. 10 mm çapa ve 2 mm yüksekliğe sahip olan kitosan iskeleler, %70'lik etanol çözeltisi ile 1 saat sterilize edilmiştir ve Dulbecco PBS (pH=7.4) içerisinde yıkanarak dengeye getirilmiştir. Daha sonra doku iskeleleri hücre ekimine hazırlık amacıyla 1.5 saat boyunca besi ortamında bekletilmiştir. Her bir örneğe 50 µl hücre süspansiyonu enjekte edilerek nemli inkübatör (37°C, CO₂ (%5)) içerisinde 1 saat boyunca inkübe edilmiştir. Son olarak, her bir örnek için 8×10^4 hücre/ml ekim yoğunluğunu sağlamak amacıyla, 1x ITS premix (insulin, 10 µg/ml; transferin, 5.5 µg/ml; and selenyum, 5 ng/ml) (Sigma, Almanya) ile desteklenmiş kültür ortamından 1'er ml eklenmiştir. Eklenen kültür ortamı ATDC5 hücre hattı için "kondrojenik kültür ortamı" olarak adlandırılmıştır.

3.3.2. Dinamik koşullardaki alışmalar

Dinamik koşullar altında yürütülen hücre kültür alışmaları BMP-6 yüklü kitosan doku iskeleleri ile gerçekleştirilmiştir. Dinamik hücre kültür çalışmaları, sürekli akış perzyon sistemi olan Döner Duvarlı Hücre Kültür Biyoreaktrnde (RCMW™, Döner Duvarlı Hücre Kültür Sistemi: Synthecon. Houston, TX, A.B.D.) yrtlmştir. şekil 3.2.'de çalışmada kullanılan döner duvarlı biyoreaktörün fotoğrağı verilmiştir. ATDC5 hücreleri, BMP-6 yüklü kitosan doku iskelelerine ekildikten sonra durgun koşullarda steril 24 gözlü polistiren doku kültür kaplarında (TCPS) 5 gün süreyle kültüre edilmiştir. Daha sonra, doku iskelesi-hücre yapıları, 125 ml hacimli döner duvarlı kaba aktarılmıştır. Bu yapıların, dış silindir ve silikon membran ile kaplanmış iç silindir arasında kalan boş alanda serbestçe asılı kalmaları sağlanmıştır. 1x ITS n karışımı ile desteklenmiş olan kültür ortamı peristaltik pompa kullanılarak i silindirden 2.25 ml/dak hız ile pompalanmıştır ve kültür ortamının değişimi silikon membrandan difüzyon ile gerçekleşmiştir. Gaz değişimi (hava içinde %5 CO₂) 297 cm² yüzey alanına sahip olan ince silikon borulardan oluşan oksijenatör ile gerçekleştirilmiştir.



şekil 3.2. Sürekli sistem döner duvarlı biyoreaktör. (a) Silindirik biyoreaktör kabı, (b) oksijenatör, (c) peristaltik pompa.

Kültür kabının dönüş hızı, kültür süresi boyunca büyüyen yapıları etkileyen kuvvetleri (yerçekimi, kaldırma kuvveti ve sürüklenme kuvveti) dengeleyerek, her

bir doku iskelesinin hücre kültür kabı içerisinde göreceli olarak sabit bir pozisyonda kalmasını sağlayacak şekilde ayarlanmıştır (30-38 rpm arasında değiştirilmiştir). Biyoreaktör içerisindeki akış rejimleri, kültür kabının rotasyonel hızlarına bağımlı olarak Reynold sayılarının (1312-1511) hesaplanması ile “laminer” olarak belirlenmiştir. Biyoreaktördeki tüm hesaplamalar vorteks oluşumu sağlanmayan konsantirik silindir bölgesinde tek boyutlu yatışkın akış rejimi için belirlenen kriterler çerçevesinde yapılmıştır (Schlichting, 1960). Bütün deney gruplarında, her hafta kültür ortamının %50’si yenilenmiştir. Kültür 4 hafta boyunca devam ettirilmiştir. Yapısal ve işlevsel analiz için doku iskelelerinden her hafta örnek alınmıştır.

3.3.3. Hücre üremesi ve mitokondriyal aktivite analizi (MTT yöntemi)

Kitosan doku iskelelerindeki ATDC5 hücrelerinin durgun koşullar için mitokondriyal aktivite analizleri, 11 günlük kültür süresince farklı kültür zamanlarında, 3-[4,5-dimetiltiazol-2-yl]-difeniltetrazolium bromür formazan kullanılarak *MTT yöntemi* ile kantitatif olarak tayin edilmiştir. Dinamik koşullar için yöntem her hafta örnek alınarak uygulanmıştır. Yöntemde, seçilen zaman aralıklarında, kültür ortamı uzaklaştırılmış ve örnekler 600 µl daha önceden ılık hale getirilmiş PBS (pH:7.4) ile yıkanmıştır. Her bir örneğe 60 µl MTT çözeltisi (2.5 mg/ml, PBS içinde) içeren 600 µl kültür ortamı eklenmiş ve hücreler 37°C’de 3 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinden sonra, her bir gözden ortam uzaklaştırılmış ve doku iskeleleri başka bir 24 gözlü kültür kabına aktarılmıştır. Formazan kristallerini çözmek için her bir göze 400 µl 0.04 M HCl içeren izopropanol çözeltisi eklenmiştir. Elde edilen, kristal viyole rengindeki çözelti alınıp 13 000 rpm’de 2 dakika boyunca santrifüjlenmiştir. Optik yoğunluk, 200 µl süpernatant alınarak, 690 nm referans olmak üzere 570 nm’de microplate reader (Asys UVM 340, Avusturya) ile spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. MTT testi kontrol olarak hücre içermeyen doku iskelelerine de uygulanmış ve elde edilen değerler ölçüm değerlerinden çıkarılmıştır. Kitosan ve RGD ya da EGF immobilize edilmiş kitosan iskelelerde kültüre edilen ATDC5 hücrelerinin özgül üreme hızları, 1 gün sonundaki büyüme indeksleri ve ikilenme süreleri Bölüm 3.1.2.3’de verilen Eşitlik 3.3 ve 3.4’ten yararlanılarak hesaplanmıştır.

3.3.4. İmmüno-floresan boyama ve mikroskopik analiz

Kitosan doku iskelelerindeki hücre iskeleti organizasyonu hücre ekiminden 7 gün sonra değerlendirilmiştir. Hücreler 2 kez PBS ile yıkandıktan sonra 0.1 M PBS (pH 7.4) içindeki % 2.5 (v/v) glutaraldehit çözeltisi ile 4°C'de 10 dakikada sabitlenmiştir ve % 0.1 Triton X-100 (Sigma, Almanya) çözeltisi ile 5 dakika boyunca muamele edilerek hücre membran geçirgenliği arttırılmıştır. Hücrelerin iskeletsel filamentöz aktinleri (F-aktin), hücrelerin % 2.5 (v/v) Fluor 488 phalloidin (Invitrogen, ABD) ile 20 dakika boyunca muamele edilmesiyle boyanmıştır. Hücre çekirdeği, 10 µg/ml propidyum iyodür (Sigma, Almanya) ile 5 dakika muamele edilerek ters boyama yapılmıştır. Örnekler konfokal lazer taramalı mikroskop (CLSM) (Zeiss, Almanya) kullanılarak görüntülenmiştir. ATDC5 hücrelerinin kitosan ve BMP-6 yüklü kitosan doku iskeleleri içindeki morfolojileri, durgun ve dinamik koşullardaki 4 haftalık kültür süresi sonunda taramalı elektron mikroskobu ile Bölüm 3.1.2.4'de verilen yöntem kullanılarak incelenmiştir.

3.3.5. Biyokimyasal analiz

Hücre kültürü sonunda, doku iskeleleri (her grup için n=3) dondurulup, liyofilize edilmiş ve papain (Sigma, Almanya) ile, doku iskelesinin 4-40 mg kuru ağırlığı başına 1 ml enzim çözeltisi kullanılarak parçalanmıştır (Obradovic et al., 2001). İskele başına düşen hücre sayısı, floresan spektrofotometre (Cary Eclipse, Avustralya) ile tespit edilen DNA içeriği ve kondrosit başına 7.7 pg DNA olan dönüşüm faktörü kullanılarak tayin edilmiştir (Kim et al., 1988). Glikozaminoglikan (GAG) içeriği dimetilmetilen mavisi (Sigma, Almanya) ve standart olarak sığır kondroitin sülfatı (Sigma, Almanya) kullanılarak spektrofotometrik olarak belirlenmiştir (Goldberg and Kolibas, 1990). Hücre-doku iskelesi yapısındaki tip II kollajen miktarlarının tayini için iskeleler pepsin ile parçalanmış ve Kollajen II ELISA kiti (Chondrex, USA) ile üretici firmanın protokolü kullanılarak belirlenmiştir. GAG ve kollajen II içeriği hesaplamalarında kullanılan kalibrasyon grafikleri Ek 3'te sunulmuştur.

3.4. Farklı Kaynaklardan Sağlanan Hücrelerle Durgun Ortam Koşullarında Yapılan Çalışmalar

Çalışmanın bu bölümünde, kıkırdak doku rejenerasyonu için kitosan doku iskelelerinde kondrojen potansiyellerinin araştırılması amacıyla altı farklı kaynaktan temin edilen insan kökenli hücrelerin durgun koşullarda gerçekleştirilen hücre kültür çalışmaları özetlenmiştir. Çalışmanın bu bölümü, Tufts Üniversitesi, Biyomedikal Mühendisliği Bölümü'nde (Boston, ABD) Prof. David Kaplan danışmanlığında yürütülmüştür. Çalışmada kitosan iskelelere ekilmek üzere aşağıda belirtilen 6 farklı hücre kaynağı kullanılmıştır:

- 1.Yetişkin primer insan kondrositleri (Prof. Ivan Martin tarafından gönderilmiştir, İsviçre).
2. İnsan embriyonik kök hücresi (hESCC) (Wisconsin, ABD).
3. İnsan embriyonik kök hücresinden elde edilen mezenkimal kök hücresi (ED1 MSCs) (MGH, MA, ABD).
4. İnsan embriyonik kök hücresinden elde edilen mezenkimal kök hücresi (ED2 MSCs) (Wisconsin, ABD) (Üç numaralı hücre kaynağı ile aralarında türetilme farkı bulunmaktadır, türetilme prosedürleri bir sonraki paragrafta açıklanmıştır).
5. İnsan kemik iliğinden elde edilen mezenkimal kök hücresi (BMSCs) (Cambrex, ABD).
6. İnsan adipoz dokusundan elde edilen mezenkimal kök hücresi (hASCs) (Pennington, ABD).

Kullanılan yetişkin insan primer kondrositleri 42 yaşında bir bayanın artikular kıkırdak doku biyopsisi sonucunda aşağıda anlatılan prosedür çerçevesinde elde edilmiştir. Kondrositler, kıkırdak dokudan %0.15 tip II kollajenaz varlığında 22 saat 37°C'de inkübe edilerek izole edilmiş ve ardından %10 FBS, 4.5 mg/ml D-glukoz, 0.1 mM (nonessential) amino asitler, 1 mM sodyum piruvat, 100 mM HEPES tampon, 100 unite/ml penisilin, 100 µg/ml streptomisin, ve 0.29 mg/ml L-glutamat içeren DMEM besi ortamı ile tekrar süspanse edilmiştir (Francioli *et al.* 2007). Çalışmada kullanılan kondrositlerin pasaj sayıları 2-4 aralığındadır. İnsan embriyonik kök hücreleri (hESCs) H9, normal dişi karyotipte, NIH (National Institute of Health, ABD) tarafından onaylanmış protokoller uygulanarak elde

edilmiştir. Hücrelerin çalışmada kullanılan pasaj sayısı 29'dur. hESCs'lerden türetilen mezenkimal kök hücreler daha önceden de belirtildiği gibi elde edilmiş protokolleri açısından farklılık taşımaktadır. ED1 MSCs'ler, fare embriyonik fibroblast (MEFs) tek tabaka kültürlerinin üzerinde büyüyen insan embriyonik kök hücrelerden (H9 hücre hattı, P39) elde edilmiştir. Öncelikle hESCs kültürleri 10 gün farklılaşma besi ortamı (IMDM, %15 FBS) içerisinde kültüre edilmiştir. Ardından hücreler tripsinize edilip, MSC-benzeri hücrelerin elde edilmesi için birkaç gün daha MSC besi ortamı içerisinde kültüre edilmiştir. Son olarak CD73+ ile işaretlenen ve ayrılan hücreler, MSC besi ortamı içerisinde çoğaltılıp, deneyler için kullanıma hazır hale getirilmiştir. ED2 MSC'ler, insan embriyonik kök hücrelerden (H9 (L), P36) WiCell (Wisconsin, ABD) Araştırma Merkezi tarafından uygulanan embriyoid kütlelerin (embryoid bodies) oluşturulmasına yönelik protokol kullanılarak elde edilmiştir. Protokolde embriyoidler kültürden tripsinize edilmiş ve tekli hücrelere ayrılarak mezodermal hücrelerin oluşturulması için 7 gün mesenchyme-specific medium (MesenCult™ Basal Medium, Stem Cell Tech., Vancouver, BC) ile kültüre edilmiştir. Bu hücre popülasyonu, sonrasında aynı besi ortamı ve daha önceden test edilmiş FBS (pretested FBS) ile homojen mezenkimal kök hücre oluşturulması için kültüre edilmiştir. Ardından hücreler tripsinize edilip çalışmalar için hazır hale getirilmiştir.

Toplam kemik iliği aspiratı 25 yaşında, sigara içmeyen erkek bir donörden elde edilmiş ve MSC'ler izole edilmiştir. Öncelikle kemik iliği hücreleri (200,000 hücre/cm²) besi ortamı (DMEM, %10 FBS, 0.1 mM non-essential amino asit, 1 ng/ml bFGF, 100 U/ml penisilin, 100 mg/ml streptomisin and 0.5 µg/ml fungizone (Gibco, Carlsbad, CA, USA)) içerisinde 175 cm²lik flasklara ekilerek çoğalmaları sağlanmıştır. Flasklardaki besi ortamı hematopoietik hücrelerin süspanse halde kalması ve stromal hücrelerin yapışmasını sağlamak amacıyla 35 ml olarak ayarlanmıştır. %80 oranda tek tabaka haline gelen hücreler, tripsinize edilip %9 DMSO içeren FBS ile süspanse edilerek sıvı azotta saklanmıştır. Donmuş hücreler çözündürülüp tekrar kültüre edilerek bir kez daha dondurulmuştur. İkinci pasaj hücreler son olarak çözündürülüp, besi ortamı içerisinde çoğaltılmış ve elde edilen hücreler "kemik iliğinden elde edilmiş mezenkimal kök hücreler (BMSCs)" olarak deneylerde kullanılmak üzere adlandırılmıştır. İnsan adipoz dokusundan elde edilen MSC'ler, 30 yaşında bayan bir donörün karın bölgesinden lipoaspirasyon

sonucu elde edilmiştir (Pennington Biomedical Research Center, Baton Rouge, ABD). hASCs'ler, kollajenazla parçalanmış stromal vasküler hücrelerin Stromal besi ortamı ((DMEM)/F12 Ham's medium, %10 FBS, 100 U/ml penisilin, 100 mg/ml streptomisin ve 0.5 µg/ml fungizone) içerisinde çoğaltılmasıyla elde edilmektedir. Hücreler (5000 hücre/cm²) % 80-90 oranında tek tabaka haline gelene kadar flasklarda kültüre edilmektedir.

Aksi belirtilmediği sürece çalışmada kullanılan tüm hücre kaynakları Invitrogen (ABD) tarafından elde edilen malzemeler ve kimyasallarla kültüre edilmiştir. hASCs dışındaki tüm hücrelerin kültürleri %90 DMEM, %10 FBS, %1 non-essential amino asit, %1 antibiotik/antimikotik ve 1 ng/ml bFGF içeren büyüme besi ortamı içerisinde kültüre edilmiştir. hACSc'ler için besi ortamı ise %10 FBS, %1 non-essential amino asit ve 1% antibiotik/antimikotik ile desteklenmiş %90 DMEM olarak belirlenmiştir. Hücreler, 37°C 'daki %5 CO₂ içeren etüvde inkübasyona bırakılmış ve ~% 80 tek tabaka haline gelen hücreler, %0.25 tripsin-EDTA çözeltisi kullanılarak tripsinizasyon yöntemi ile yüzeylerden koparılmış ve santrifüjlendikten sonra çalışmada yapılan deneyler için hazır hale getirilmiştir. hESc'ler ise WiCell Araştırma Merkezinin (Wisconsin, ABD) protokolü ile elde edilmiştir. Yapılan çalışmalarda kondrojenезin sağlanması için kondrojenik besi ortamı (%90 DMEM, %10 FBS, %1 non-essential amino asit, %1% antibiyotik/antimikotik, %1 ITS⁺¹ (10 mg/ml insulin, 5.5 mg/ml transferrin, 5 ng/ml selenyum, 0.5 mg/ml sığır serum albumin, 4.7 mg/ml linoleik asit; Sigma), 0.1mM askorbik asit 2-fosfat (Sigma), 10⁻⁷ M deksametazon (Sigma) ve 10 ng/ml TGF-β1) kullanılmıştır.

Çalışmada kullanılan tüm hücre hatlarının 1 ve 2 haftalık inkübasyon süreleri sonunda Petri kapları üzerindeki Giemsa ile boyanmış görüntüleri invert mikroskop altında dijital kamera ile alınmıştır ve görüntüler Ek 4'te sunulmuştur. Hücre kaynaklarının doku iskelelerine ekimi Bölüm 3.3.1'de açıklandığı gibi gerçekleştirilmiştir. Her bir doku iskelesi için 5x10⁴ hücre/ml ekim yoğunluğunu sağlanmıştır ve kültür süresi 4 haftadır.

3.4.1. Floresan aktive edilmiş hücre ayırışma (Fluorescence Activated Cell Sorting, FACS) analizi

Çalışmada kullanılan tüm hücre kaynakları yüzey antijenlerinin (CD105 (Biolegend), CD73, CD90 ve CD49a (BD Biosciences, ABD)) eksprese edilmesi sonucu karakterize edilmiştir. Yöntemde kullanılan hücreler %0.25 tripsin-EDTA ile yüzeyden ayrılmış, santrifüjlenip pellet haline getirilerek tekrar 300 µl DMEM içerisinde süspanse edilmiştir. Süspanse hücreler üç gruba ayrılmıştır (100 µl); işaretlenmemiş kontrol grubu, phycoerythrin ile konjuge anti CD73 (CD73-PE) (20 µl) ve allophycocyanine ile konjuge anti CD105 (CD105-APC) (20 µl), 20 µl CD49a-PE ve 5 µl CD90-APC. Sözü edilen antikorlar hücre süspansiyonlarıyla karıştırılıp 4°C'de 30 dk karanlıkta inkübe edilmiştir. Sonrasında hücreler DPBS ile yıkayıp 5 dk 1500 rpm'de santrifüjlenmiştir. Süpernatant atılmış ve pellet hücre polistiren tüplerde (Falcon, ABD) 1 ml DPBS ile süspanse edilerek FACS analizi için hazır hale getirilmiştir. Analiz FACSCalibur (Becton Dickinson, ABD) flow sitometri cihazı ile sürdürülmüştür.

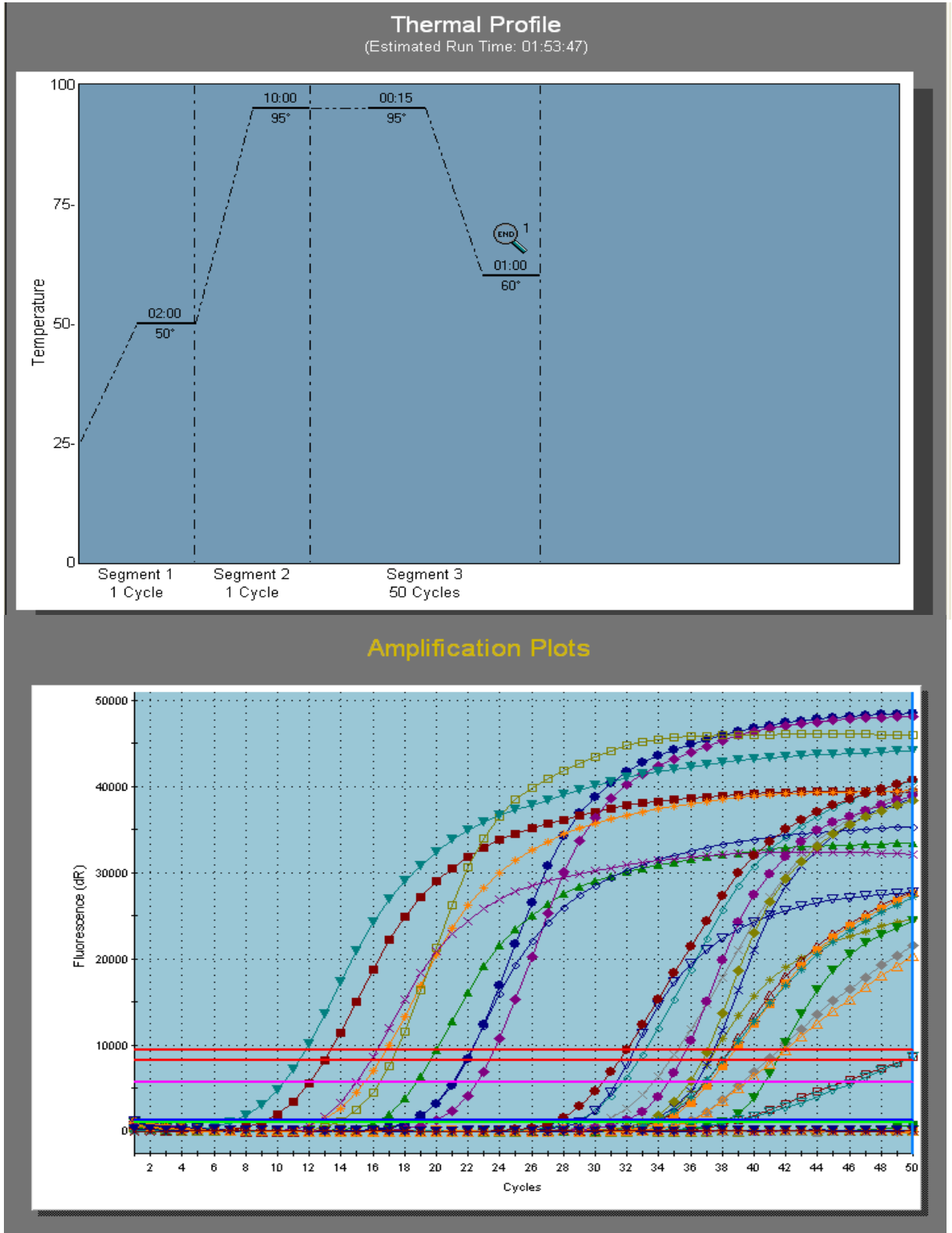
3.4.2. Hücre metabolik aktivite tayini (MTT analizi) ve hücre proliferasyonu

Hücre metabolik aktiviteleri ve proliferasyonları Bölüm 3.3.3.'de anlatılan *MTT yöntemi* kullanılarak kantitatif olarak tayin edilmiştir.

3.4.3. Polimerik zincir analizi (PCR), RNA ekstraksiyonu, cDNA sentezi

Hücrelerden ekstrakte edilen toplam RNA, RNeasy Mini Kiti (Qiagen, Valencia, CA, USA) kullanılarak elde edilmiştir. Yöntemde kısaca, doku iskelelerine ekilen hücreler PBS ile yıkandıktan sonra lizis tampon (Qiagen) tarafından parçalanmıştır. Elde edilen lizat QIAshredder spin kolon ile homojenize edildikten sonra, etanol eklenip RNeasy spin kolona transfer edilmiştir. Sonuçta elde edilen eluent -80°C'da saklanmıştır. Ekstrakte edilen toplam RNA, cDNA sentezinde kullanılmak üzere High-Capacity cDNA Archive kiti (Applied Biosystems, ABD) ile üretici firma protokolü dahilinde kullanılmıştır. Sentezlenen cDNA -20°C'da saklanmıştır. Real-time polimerik zincir reaksiyonu (RT-PCR) Mx3000P

(Stratagene®) cihazı ile gerçekleştirilip monüterize edilmiştir. Reaksiyon belirlenmiş döngülerde ve sıcaklıklarda gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.3).



Şekil. 3.3. PCR analizinde termal profil ve amplifikasyon eğrisi.

Reaksiyonda kıkırdak-bağımlı ECM genlerinin transkripsiyon seviyelerinin belirlenmesi amacıyla TaqMan® Gene Expression Assay kiti (Applied Biosystems, ABD) kullanılmıştır. İncelenen genler; kollajen tip-II (Col-II), agregan (AGC), Sox9, kollajen tip-X (Col-X) ve kollajen type-I (Col-I) olarak belirlenmiştir. Yöntemde, tüm cDNA örneklerinden 5 µl alınıp, 2.5 µl TaqMan® Gene Expression Assay kiti, 17.5 µl RNase/DNase içermeyen su ve 25 µl TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) ile karıştırılmıştır. Elde edilen 50 µl'lik karışım PCR cihazında reaksiyona sokulmuştur.

Ökaryotik 18s rRNA endojen kontrol (Applied Biosystems) referans (housekeeping) transkript olarak kullanılmıştır. Tüm cDNA örnekleri transkripte edilecek genler ve referans genlerle bağımsız olarak reaksiyona sokulmuştur. Veriler PCR cihazı üretici firması (Stratagene®) tarafından tedarik edilen MxPro-Mx3000P version 4.0 yazılımı ile analiz edilmiştir. Analizde her bir örneğin Ct değeri reaksiyonda döngü numarası ile ifade edilmektedir. Bu değer, PCR tarafından belirlenen floresan şiddetinin amplifikasyon eğrisinde kesin bir eşik noktasına ulaşılmasıyla belirlenmektedir. Her bir hedef genin amplifikasyonu, reaksiyon amplifikasyon eğrisinde doğrusal bölge aralığındadır (Şekil 3.3). Analizde incelenmek istenen genin bağıl ekspresyon seviyesi, referans gen, 18s, tarafından normalize edilerek belirlenmiştir ($2^{\Delta Ct}$ formülü, Perkin Elmer User Bulletin #2). Her bir örnek üçer kez analiz edilmiştir.

3.4.4. Histoloji ve SEM

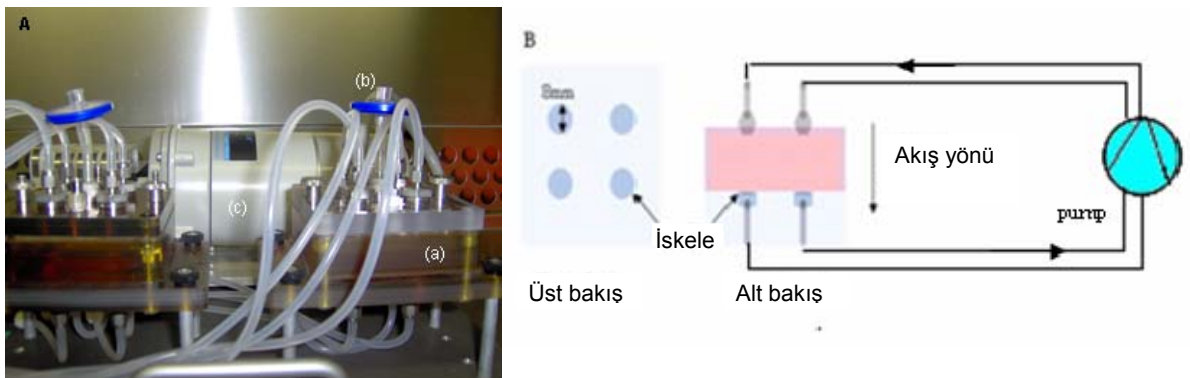
Doku iskelelerinde kültüre edilen hücreler 4. hafta sonunda PBS ile yıkandıktan sonra %2.5 (v/v) glutaraldehit çözeltisi (0.1 M DPBS) ile 1 sa sabitlenmiştir. Histolojik inceleme için sabitlenen yapılar parafinlendikten sonra deparafinize edilip alkol serilerinden geçirilmiştir. Hemen sonrasında Safranin-0 ve fast green ile boyamalar yapılmıştır. Örneklerin boyamaları BenchMark otomatik histolojik işaretleme ünitesi (Ventana, Tucson, AZ) ile gerçekleştirilmiştir. Kesitler son olarak hematoksilin ile kontuar-boyama yapılarak kurumaya bırakılmıştır. Hücreler, 4 haftalık kültür süresi sonunda taramalı elektron mikroskobu ile Bölüm 3.1.2.4'de verilen yöntem kullanılarak incelenmiştir.

3.5. Perfüzyon Biyoreaktördeki Mezenkimal Kök Hücreler (ED1 MSC) ile Yapılan Çalışmalar

Çalışmanın bu bölümünde, Bölüm 3.4'te açıklanan insan embriyonik kök hücrelerden türetilmiş mezenkimal kök hücreler (ED1 MSCs) kullanılarak kitosan doku iskelelerinde ve dinamik koşullarda gerçekleştirilen hücre kültür çalışmalarına değinilmiştir. Dinamik koşullar altındaki hücre kültür çalışmaları Chris Cannizaro (Tufts Üniversitesi, MA, ABD) tarafından dizayn edilen perfüzyon biyoreaktörler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. ED1 MSCs'in kitosan doku iskelelerine ekimi Bölüm 3.3.1'de açıklandığı gibi gerçekleştirilmiştir. Her bir doku iskelesi (8 mm çap, 3 mm kalınlık) için 1×10^6 hücre/ml ekim yoğunluğu sağlanmıştır ve kültür süresi 4 haftadır. Hücreler ekildikten sonra durgun koşullarda steril 6 gözlü polistiren doku kültür kaplarında (TCP, Falcon, ABD) 5 gün süreyle kültüre edilmiştir. Daha sonra, doku iskelesi-hücre yapıları, 24 ml hacimli perfüzyon biyoreaktörlere aktarılmıştır. Besi ortamı haftada iki kez yenilenmiştir.

3.5.1. Perfüzyon biyoreaktörü

Perfüzyon biyoreaktör, 24 ml hacminde kültür kapları içerisine yerleştirilen 4 doku iskelesinin paralel olarak sürekli akış sisteminde kültüre edilmesini sağlamaktadır. Doku iskeleleri kültür kapları içerisindeki 8 mm çap ve 3 mm kalınlığa sahip olan özel boşluklara yerleştirilmektedir. Perfüzyon biyoreaktörü ve dinamik kültür sisteminin şematik gösterimi Şekil 3.4'te verilmiştir.



Şekil 3.4. Dinamik kültür sistemi: (A) sürekli sistem perfüzyon biyoreaktörü; (a) biyoreaktör kabı, (b) havalandırma için membran filtresi (0.2 μ m, Millipore), c) pompa (B) biyoreaktör sisteminin şematik gösterimi.

Besi ortamının biyoreaktördeki devridaimi bir pompa tarafından gerçekleştirilmektedir. Akış hızı 1ml/dk olarak ayarlanmıştır. Doku iskelelerinin kalınlığı boyunca sirküle eden besi ortamının akış hızı ise $408 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ olarak belirlenmiştir (doku iskelelerinin gözenekliliği %81 olarak alınmıştır (Aday, 2008)). Biyoreaktörlerde havalandırma, kültür kabı üzerindeki 0.2 μm filtre (Milipore, ABD) ile gerçekleştirilmiştir.

3.5.2. Metabolik aktivite ve biyokimyasal analizler

Hücre metabolik aktiviteleri Bölüm 3.3.3.'de anlatılan *MTT yöntemi* kullanılarak kantitatif olarak tayin edilmiştir. Biyokimyasal analizler ise Bölüm 3.3.5.'te özetlenen yöntemler ile gerçekleştirilmiştir. Biyokimyasal analizlere ek olarak toplam kollajen miktarları hidroksiprolin içeriği hesaplanarak belirlenmiştir (hidroksiprolin:kollajen oranı 1:10 alınmıştır, Hollander et al., 1994). Yöntemde kısaca, papain ile parçalanmış doku iskeleleri 120°C 'de 20 dakika otoklavlanarak hidrolize edilmiştir. Hidrolize edilen iskelelere 450 μl chloramine-T (Sigma, ABD) eklenerek 25 dk oda sıcaklığında karıştırılmıştır. Ardından 500 μl Enrich's aldehyde reagent (Sigma, ABD) eklenerek 65°C 'de 20 dk inkübe edilerek kromofor oluşturulması sağlanmıştır. Elde edilen çözeltinin absorbans değerleri 550 nm'de UV spektrofotometre ile tayin edilmiştir. Toplam kollajen içeriği hesaplamalarında kullanılan hidroksiprolin kalibrasyon grafiği Ek 3'te sunulmuştur.

3.5.3. PCR analizleri

Hücrelerdeki kıkırdak-bağımlı gen ekspresyonlarının (Agregan, Coll-II, Sox 9, Coll-I, Coll-X) tayini daha önce Bölüm 3.4.3'te açıklanan PCR analiz yöntemi ile incelenmiştir.

3.5.4. Mekanik dayanım testi

4 haftalık inkübasyon sonrasında hazırlanan hücre-doku iskelesi örnekleri 1 saat PBS ile yıkanarak test için hazır hale getirilmiştir. Mekanik dayanım testi, 0.02 N'luk bir yüke sahip bir başlığın (Instron mechanical testing device, MA, USA) malzeme üzerine 5 mm/dk'lık sabit bir hızda basılmasıyla gerçekleştirilmiştir.

Mekanik test sonucu kitosan iskelelerin gerilim-gerinim eğrileri kullanılarak doğrusal bölgenin eğiminden malzemelerin elastik modülleri hesaplanmıştır.

3.6. İstatistiksel Analiz

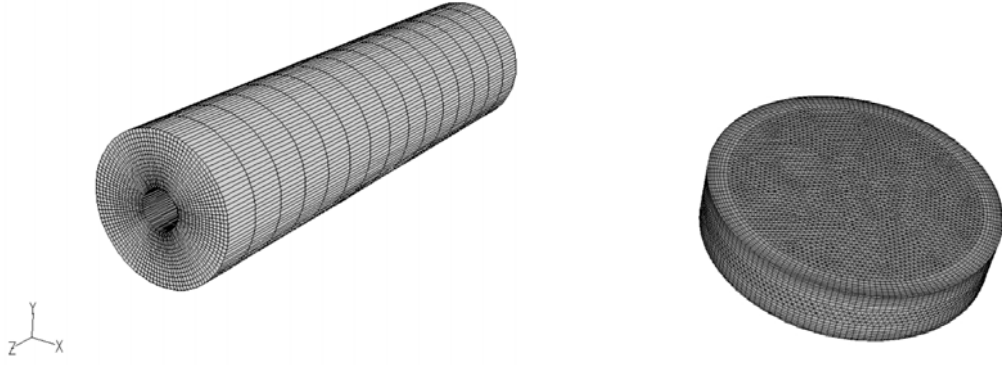
Tüm deneysel veriler, üçlü yürütülen üç benzer deneyin gösterimi olarak $\pm$ standart sapma olarak ifade edilmiştir. İstatistiksel analiz, SPSS 9. versiyon yazılımında tek-yönlü varyans analizi (ANOVA) ile çoklu karşılaştırma için Tukey's post hoc testinin birlikte kullanılmasıyla gerçekleştirilmiştir.

3.7. Döner Duvarlı Biyoreaktörlerde Simülasyon Çalışmaları

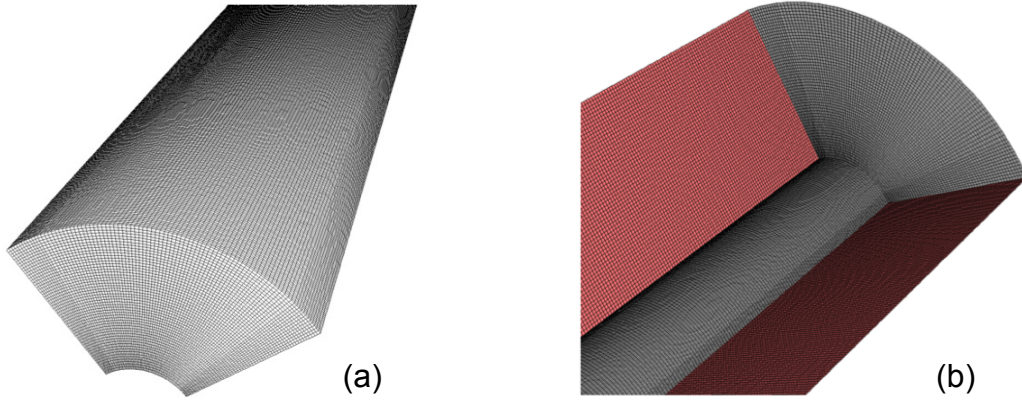
Çalışmanın bu bölümünde, Hesaplamalı Akışkanlar Dinamiği (CFD) modeli kullanılarak, yatışkın ve yatışkın olmayan durumlarda döner duvarlı biyoreaktörlerdeki hücre kültür çalışmaları sırasında doku iskelelerine etkiyen hız alanları ve vektörleri, kayma gerilim profilleri ve oksijen profillerinin belirlenmesine yönelik çalışmalara değinilmiştir.

3.7.1. Yöntem

Simülasyon çalışmaları için Hesaplamalı Akışkanlar Dinamiğinde (CFD) çoklu referans çerçevesi (Multiple Reference Frame, MRF) modeli kullanılmıştır. Biyoreaktörün simetrisinden yararlanılarak ve periyodik sınır koşulları tanımlanarak, 33, 35, 37 ve 38 rpm dönüş hızları için biyoreaktör modellenmiştir. Biyoreaktörün örgü yapısı GAMBIT'te hazırlanmıştır (Şekil 3.5) ve çözücü olarak Fluent 6.3.26 yazılımı kullanılmıştır. Biyoreaktörün örgü yapısı gerçek geometriye sadık kalınarak oluşturulmuştur. Bioreaktörün simetrisinden yararlanılarak, modelleme biyoreaktörün 1/4'ü için yapılmıştır (Şekil 3.6, a ve b). Böylece hesaplama süresi önemli derecede azaltılmıştır. GAMBIT'te hazırlanan örgü yapısında toplam 1153796 adet eleman (cell) kullanılmıştır. Örgü yapısında hekzahedral ve tetrahedral elemanlar tercih edilmiştir. Biyoreaktör, doku iskelelerinin varlığında ve yokluğunda olmak üzere iki şekilde modellenmiştir ve yapılan çözümler yatışkın ve yatışkın olmayan durumlar için ayrı ayrı ele alınmıştır.



Şekil 3.5. Biyoreaktör ve doku iskelesi için GAMBIT’te hazırlanan örgü yapısı.



Şekil 3.6. Biyoreaktörün dış duvarına (a) ve iç duvarına (b) ait örgü yapısı.

3.7.2. Simülasyon koşulları

Simülasyon sırasında kullanılan tüm işletim ve tasarım parametreleri Çizelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Biyoreaktör simülasyonu için tasarım ve işletim koşulları

Uzunluk, L	14.5 cm
Dış silindir dış çap, $R_{d,d}$	6.80 cm
Dış silindir iç çap, $R_{d,i}$	3.80 cm
Dış silindir et kalınlığı, ($R_{d,d} - R_{d,i}$)	1.5 cm
İç silindir çap, R_i	1.5 cm
Toplam kültür ortamı hacmi, V	125 ml
Doku iskelesi ölçüleri: Çap, R; Yükseklik, H	R: 10 mm, H: 2 mm
Silindirlerin dönme hız aralığı, Ω	33-35-37-38 rpm
İşletme sıcaklığı, T_o	37 °C
Kültür ortam yoğunluğu, ρ	1020 kg/m ³
Kültür ortam viskozitesi, μ	0.00097 kg/m.s
Kültür ortamı akış hızı, v	2.25 ml/dak
Doku iskelesi içermeyen biyoreaktördeki Reynolds Sayısı, N_{RE}	1192 (30 rpm); 1283 (38 rpm)
Başlangıç hücre ekim yoğunluğu,	4 x 10 ⁴ hücre/doku iskelesi
En yüksek hücre yoğunluğu,	3.16 x 10 ⁷ hücre/doku iskelesi
Henry Yasası sabiti,	51 700 atm/mol kesri
Denge O ₂ mol kesri,	0.0385 x 10 ⁻⁴ mol O ₂ /mol H ₂ O
H ₂ O içinde O ₂ diffüzivitesi, D_{O_2,H_2O}	2.66 x 10 ⁻⁹ m ² /s
Ortam Schmidt Sayısı, N_{Sc}	357

3.7.3. Hız alanları ve kayma gerilimi profilleri için yapılan hesaplamalar

Bioreaktör için, basınç esaslı ve nod esaslı sonlu hacimler metodu kullanılarak, önceden GAMBIT’te hazırlanmış örgü yapısı için *süreklilik ve momentum denklemleri* (üç boyutlu sistemlerde Newtonian akışkanlar için Navier-Stokes

denklemleri), dönme hareketi modellenerek çözülmüştür (Eşitlik 3.5 ve 3.6). Sınır koşul değeri biyoreatördeki silindir duvarlarında radyal hızın sıfır olmasıdır (no-slip boundary condition, Eşitlik 3.7). Duvar bölgelerine kesme gerilmesi sıfır sınır koşulu verilmiştir.

$$\nabla \cdot \mathbf{v} = 0 \quad (3.5)$$

$$\frac{\partial \mathbf{v}}{\partial t} + \mathbf{v} \cdot \nabla \mathbf{v} = -\frac{1}{\rho} \nabla P + \frac{\mu}{\rho} \nabla^2 \mathbf{v} \quad (3.6)$$

$$V_r|_R = 0 \quad (3.7)$$

Eşitliklerdeki $\mathbf{v}$; hız vektörünü (m/s), V_r ; radyal hızı, P ; basıncı (Pa), μ/ρ ; kinematik viskoziteyi (m^2/s) ifade etmektedir.

Sıkıştırılamaz Newtonian akışkanlar için kayma gerilimi, deformasyon tensörü ile orantılıdır. Bu bağıntıya göre kayma gerilimi aşağıda verilen Eşitlik 3.8 ile ifade edilmektedir.

$$\bar{\bar{\tau}} = \mu \bar{\bar{D}} \quad (3.8)$$

Deformasyon tensörü;

$$\bar{\bar{D}} = \left(\frac{\partial u_i}{\partial x_j} + \frac{\partial u_j}{\partial x_i} \right) \quad (3.9)$$

olarak ifade edilir. Çalışmada hız alanlarının simüle edilmesinden sonra, hız vektörlerinin hesaplanmasıyla kitosan doku iskelelerine birim saniye başına etkiyen kayma gerilimleri bulunmuştur. Çalışmada yatışkın ve yatışkın olmayan durumlar için, iki ayrı çözüm yapılmıştır. Momemtum denklemi 2. dereceden hassasiyetle (2nd order upwind scheme) diskritize edilmiştir. Bu şema doğruluk (accuracy) için uygun bir şemadır. Basınç Denklemi ise PRESTO kullanılarak diskritize edilmiştir. Basınç hız kuplajı ise PISO algoritması kullanılarak yapılmıştır (Fluent 6.3 kullanıcı kitapçığı). Modelleme çalışmalarında 2 adet 2.40 GHz Intel®

Xeon™ CPU işlemci ve 2 Gb RAM kullanılmıştır. İterasyon toleransı 10^{-4} 'ün altında olup, yakınsama için gerekli iterasyon süresi 8800-10000 arasında değişmiştir.

3.7.4. Oksijen profilleri için yapılan hesaplamalar

Biyoreaktör içerisindeki oksijen profillerinin simülasyonu için akışkan yoğunluğu ve diffüzivitenin sabit kaldığı varsayılarak *oksijen süreklilik denklemi*, dönme hareketi modellenerek çözülmüştür (Eşitlik 3.8).

$$\frac{\partial C_{O_2}}{\partial t} + v \cdot \nabla C_{O_2} = D_{O_2, H_2O} \nabla^2 C_{O_2} + R_{O_2} \quad (3.8)$$

$$C_{O_2} \Big|_r^R (t = 0) = C_{O_2,0} \quad (3.9)$$

$$C_{O_2} \Big|_r = 0.2 \rightarrow C_{O_2} (t = 0) = 0 \quad (3.10)$$

Eşitlikteki C ; molar konsantrasyon (mol/m^3), R ; birim hacimdeki molar oksijen harcanma hızı ($\text{mol/m}^3/\text{s}$) ve D ; oksijenin sudaki diffüzivitesini (m^2/s) ifade etmektedir.

Sınır koşulu değeri biyoreaktör boyunca doygun olan başlangıç oksijen konsantrasyonudur ($C_{O_2,0}=0.2$) (Eşitlik 3.9). Bu değer inkübatördeki yaklaşık oksijen fraksiyonudur. Diğer bir başlangıç sınır koşulu ise, iç silindir duvarındaki oksijen konsantrasyonu 0.2 iken, biyoreaktördeki oksijen konsantrasyonunun sıfır olmasıdır (Eşitlik 3.10). Bu yaklaşımla, biyoreaktör içerisindeki doku iskelelerine etkiyen oksijen profilleri belirlenmiştir. Biyoreaktör içerisindeki oksijen profilleri belirlendikten sonra Eşitlik 3.9'daki başlangıç sınır koşulu ile disklerin etrafındaki oksijen fraksiyon dağılımları modellenmiştir. Modelde, doku iskelesindeki hücrelerin oksijeni anında tükettiği varsayılmıştır ve *sıvı faz O_2 kontrol modeli* olarak ifade edilmiştir (Williams et al., 2002). Sıvı faz O_2 kontrol modeli molar konsantrasyon gradiyentinin ihmal edilmesiyle sonuçlanmaktadır. Yapılan yaklaşıma bağımlı olarak birim hacimde oksijen harcanma hızı sıfır sınır koşulu olarak verilmiştir.

4. DENEYSEL SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Çalışmanın bu bölümünde, tez kapsamında gerçekleştirilen deneysel çalışmalardan elde edilen sonuçlar sunulmuş ve elde edilen bulgular üzerinde tartışmalar yapılmıştır. Öncelikle, gözenekli kitosan doku iskelelerinin hazırlanma yöntemi ve karakterizasyon çalışmalarının sonuçları sunulmuş ve hücre etkileşimleri ile ilgili bulgular açıklanmıştır. İkinci bölümde, en uygun bileşim ve deasetilasyon derecesine (DD) sahip olan kitosan doku iskelelerine RGD ve EGF immobilizasyonunun açıklanması amacıyla yapılan karakterizasyon çalışmalarının sonuçlarına yer verilmiştir. Sonraki bölümlerde, RGD, EGF ve BMP-6 ile immobilize edilmiş kitosan doku iskelelerinin ATDC5 kondrojenik hücre hattı ile kondrojenik aktivitelerinin belirlenmesi için yürütülen statik koşullardaki hücre kültür çalışmalarının sonuçları sunulmuştur. Devamında ise, hazırlanan BMP-6 yüklü doku iskelelerinin dinamik koşullarda (döner duvarlı biyoreaktör; perfüzyon modlu) ATDC5 kondrojenik hücre hattı ile yürütülen kültür çalışmalarının sonuçları sunulmuş ve elde edilen bulgular dahilinde dinamik koşulların kondrojeniz üzerine etkisi tartışılmıştır. Ardından, optimum kıkırdak doku oluşumunun incelenmesine yönelik olarak, kitosan doku iskelelerinin insan kaynaklı primer, mezenkimal ve embriyonik kök hücreler kullanılarak gerçekleştirilen (altı farklı hücre kaynağından temin edilen hücre) statik koşullardaki hücre kültür çalışmalarının sonuçları sunulmuştur. Sonraki bölümde ise bir önceki bölümde en uygun hücre kaynağı olarak belirlenen embriyonik kök hücreden türetilmiş mezenkimal kök hücre (ED1 MSCs) kullanılarak perfüzyon biyoreaktörde yürütülen hücre kültür çalışmalarından elde edilen bulgular sunulmuştur. Elde edilen bulgular dahilinde perfüzyon biyoreaktörlerin kıkırdak doku oluşumu üzerindeki etkileri tartışılmıştır. Son bölümde ise, döner duvarlı biyoreaktörlerde CFD modeliyle gerçekleştirilen simülasyon çalışmalarının sonuçları sunulmuştur.

4.1. Gözenekli Kitosan Doku İskelelerinin Hazırlanması ve Karakterizasyonu

Çalışmanın bu bölümünde, %75-85 ve >%85 deasetilasyon derecesine ve %2 (w/v) ve %3 (w/v) bileşime sahip olan gözenekli kitosan doku iskelelerinin doku mühendisliği uygulamalarında kullanılabilirliğinin belirlenmesi için yapılan karakterizasyon çalışmalarından elde edilen sonuçlar sunulmuştur. Ek olarak,

hücre-doku iskelesi etkileşimlerinin belirlenmesi amacı ile L929 fare fibroblast hücre hattı ile gerçekleştirilen hücre kültür çalışmalarından elde edilen sonuçlara da yer verilmiştir. Elde edilen bulgular ışığında, tez kapsamında yapılacak tüm çalışmalarda kullanılacak en uygun doku iskelesi bileşimi belirlenmiştir.

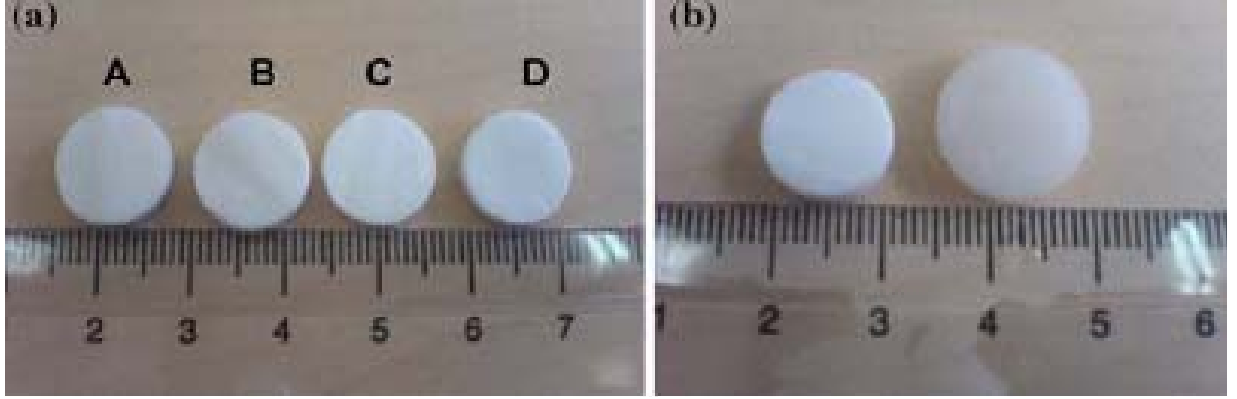
4.1.1. Kitosan doku iskelelerinin hazırlanması

Üzerinde en çok araştırma yapılan biyopolimerler arasında kitinin deasetilasyonu ile elde edilen kitosanın önemli bir yeri bulunmaktadır. Kontrollü salım sistemlerinde ve biyosensörlerde kullanılan kitosanın, en önemli uygulama alanlarından birisi doku mühendisliği'dir. Kitosanın özellikle bir doku destek malzemesi olarak seçimindeki en önemli parametreler, biyolojik, fiziksel ve kimyasal özelliklerinin kolaylıkla kontrol edilebilmesi, biyoyumluluğu, antibakteriyal ve hidrofilik özellikleri ve enzimatik olarak parçalanabilmesidir (Khor and Lim, 2003). Sunulan çalışmada, kitosan, özellikleri göz önüne alınarak kıkırdak doku mühendisliği için uygun biyomalzeme olarak seçilmiştir.

Doku mühendisliği alanında kullanılan doku iskelelerinin içsel bağlantılı (interconnected) gözeneklere sahip olması hücrelerin yayılması ve besin maddelerinin taşınımı açısından oldukça önemlidir (Freyman *et al.*, 2001; Arpornmaeklong *et al.*, 2007). Doku iskelelerinde gözeneklerin çok küçük olması durumunda gözenekler hücreler tarafından tıkanacak; bu da hücre penetrasyonunu ve ECM oluşumunu engelleyecektir (Salgado *et al.*, 2004). Minimum 100-150 µm arasında değişen gözenek büyüklüğü, dokunun iskelenin içerisine doğru yayılmasını sağlamaktadır (Zeltinger *et al.*, 2001). Kısacası gözenek yapısı; hücre bağlanması ve *in vitro* hücre migrasyonunu etkilemektedir (van Tienen *et al.*, 2002). Bu nedenle doku iskelesi üretiminde kullanılan yöntem, gözeneklilik, gözenek boyutu ve dağılımı açısından kararlı olmalıdır (Salgado *et al.*, 2004).

Gözenekli kitosan iskeleler, farklı deasetilasyon derecelerinde (DD) ve bileşimlerde “dondurarak-kurutma” yöntemiyle hazırlanmıştır. Dondurarak-kurutma yöntemi, polimer çözeltilerinin dondurulması ve dondurma sonucu oluşan buz kristallerinin yapıdan uzaklaştırılması şeklinde tanımlanabilir. Bu yöntemde

jelleşmeden sonra, donmuş kitosan çözeltilerinde oluşan buz kristalleri liyofilize edilmektedir. Bu sayede gözenekli ve içsel bağlantıları olan süngerimsi bir yapı elde edilmiştir. Donmuş çözeltilerden elde edilen iskeleler herhangi bir çapraz bağlayıcıya maruz bırakılmamıştır. Dolayısıyla elde edilen yapının hücre kültür çalışmaları için biyobozunurluk ve biyoyumluluğu önemli derecede artmıştır.



Şekil 4.1. Kitosan iskelelerin genel görüntüsü. (a) Liyofilize edilmiş doku iskeleleri; (A) % 75-85 deasetilasyon derecesine (DD) sahip, %2 (w/v), (B) %75-85 DD, % 3 (w/v), (C) >%85 DD, % 2 (w/v), (D) >%85 DD, % 3 (w/v). (b) Stabilize edilmiş kitosan iskeleler; kuru halde (sol tarafta), ıslak halde (sağ tarafta). Boyutlar “cm” olarak verilmiştir.

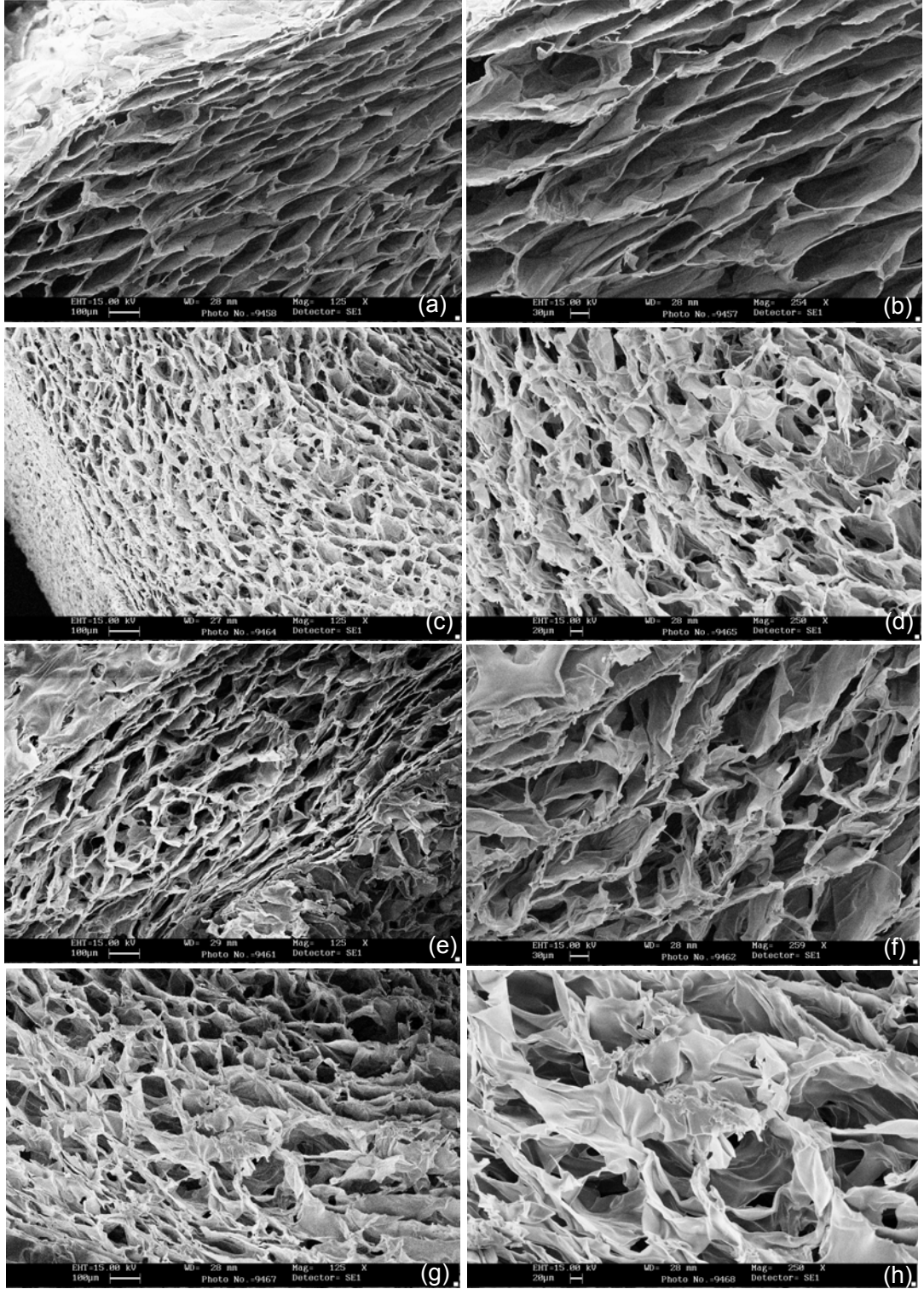
Liyofilize edilen iskeleler sert ve esnek olmayan bir yapıdadır. Liyofilize edilmiş yapı, çözünmüş kitosan asetat bileşiminde olduğu için, kitosan iskele nötral sıvı ortamında çok hızlı bir şişmeye ve aynı zamanda yapısal olarak ortamda çözünmeye maruz kalacaktır. Dolayısıyla yapının kararlı hale getirilmesi (stabilizasyonu) şarttır. Literatürde kitosan stabilizasyonu için seyreltik NaOH (0.1 M) veya etanol serilerine maruz bırakılması önerilmiştir (Madihally and Matthew, 1999). NaOH ile muamele sonucunda yapının kırılmalılaşıp sertleştiği ve doku iskelelerinde büzülme ve biçim bozukluklarının meydana geldiği belirtilmiştir (Freyman et al., 2001). Bu problemler, kristalinitedeki değişimlerle ilişkilidir ve iskelelerin pH'ı 7 olan sıvı çözeltilere transfer edilmesi durumunda yalnızca kısmi olarak tersine çevrilebilmektedir (Rathke and Hudson, 1994). Ancak, etanol içerisinde hidrate edilen örneklerde herhangi bir hacim ya da biçim değişikliği görülmemekte; ayrıca bu yöntemde saf alkolün düşük yüzey gerilimi nedeniyle

NaOH kullanımına göre çok daha iyi bir hidrasyon sağlanarak daha az hava kabarcığı oluşmaktadır (Madhally and Matthew, 1999). Doku mühendisliğinin en önemli kısmını oluşturan hücre kültür çalışmalarında sterilite çok büyük önem taşımaktadır. Etanolle stabilizasyon sırasında aynı zamanda sterilizasyon da sağlanmakta; bu da zaman ve hücre kültürü çalışmaları açısından büyük avantaj sağlamaktadır. Dolayısıyla bu çalışmada stabilizasyon liyofilize edilmiş iskelelerin %96'lık (v/v) etanol içerisinde 1 gün, %70'lik (v/v) etanol çözeltisi içerisinde ise 1 saat bekletilmesi şeklinde uygulanmıştır. Stabilizasyon sonrası elde edilen iskelelerin şekil olarak hiç bir değişime uğramamış olup, esnek ve süngerimsi yapıya sahip oldukları ve sulu ortamda şişmenin herhangi bir çözünme olmaksızın kontrollü bir şekilde gerçekleştiği gözlemlenmiştir (Şekil 4.1).

Sunulan çalışmada, stabilize edilen kitosan iskelelerin morfolojik yapıları taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile görüntülenmiştir (Şekil 4.2-a-h). Yüzey ve kesit SEM görüntüleri her bir kitosan iskele için tamamen gözenekli ve içsel bağlantıları olan bir yapının varlığını ortaya çıkarmaktadır. İskelelerin gözenek boyutları Şekil 4.2'deki kesit SEM görüntülerinden faydalananarak hesaplanmıştır. Bu görüntülere göre, %2 (w/v) ve %3 (w/v) bileşime sahip olan kitosan iskelelerin gözenek boyutları sırasıyla ~100 µm (Şekil 4.2-a, b, e, f) ve 20-80 µm (Şekil 4.2-c, d, g, h) olarak belirlenmiştir. Düşük konsantrasyonlarda (%2 (w/v)) ulaşılan büyük gözeneklerin, seyreltik kitosan çözeltilerinde oluşan büyük buz kristallerinin sonucunda ortaya çıktığı belirlenmiştir.

Bununla beraber, düşük deasetilasyon derecesine (%75-85) sahip olan kitosan iskelelerdeki gözeneklerin daha düzenli ve poligonal kesite sahip olup, paralel şekillendiği gözlemlenmiştir (Şekil 4.2-a, b). Fakat bu geometride, yüksek deasetilasyon derecesine sahip olan kitosan iskelelere (>%85 DD) (Şekil 4.12-e, f) göre içsel gözenek bağlantılarının oldukça azaldığı görülmektedir.

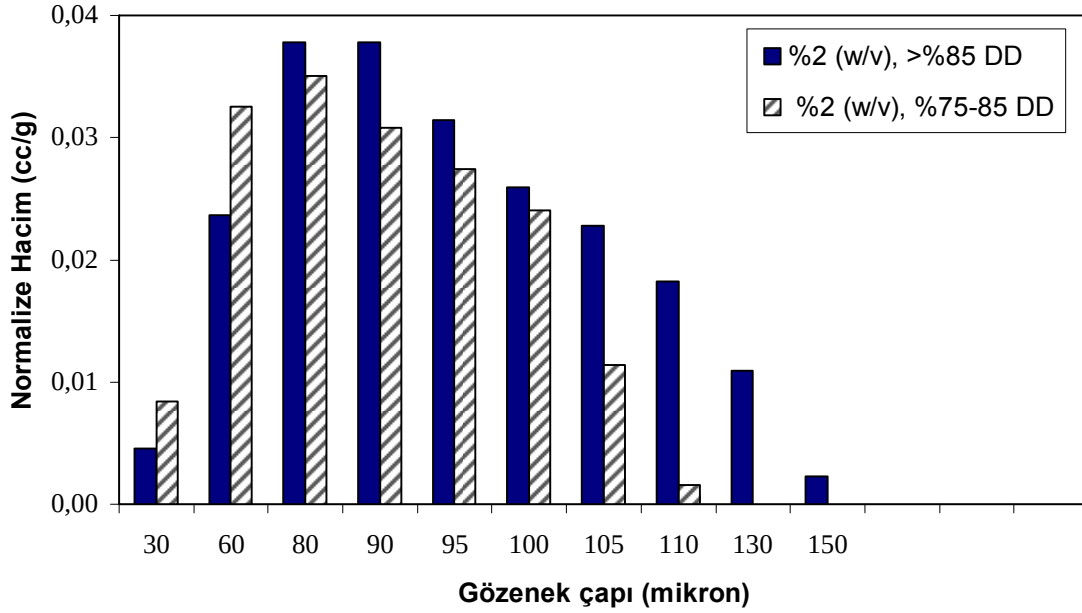
Sonuç olarak, >% 85 DD'nde ve % 2 (w/v) bileşime sahip olan kitosan doku iskelelerin içsel bağlantılara ve daha büyük gözenek boyutuna sahip iskeleler olduğu saptanmıştır.



Şekil 4.2. Kitosan iskelelerin farklı büyütme ölçeklerinde çekilmiş kesit SEM görüntüleri. %2 Kitosan (%75-85 DD); (a) x125 (b) x250, %3 Kitosan (%75-85 DD); (c) x125 (d) x250, %2 Kitosan (>%85 DD); (e) x125 (f) x250, %3 Kitosan (>%85 DD); (g) x125 (h) x250.

4.1.2. Gözenek boyutu dağılımı ve gözeneklilik

Çalışmada, kitosan doku iskelelerinin gözenek boyut dağılımları Bölüm 3.1.1.1’de açıklanan civalı porozimetre ile tayin edilmiş ve sonuçlar Şekil 4.3’te sunulmuştur.



Şekil 4.3. Farklı deasetilasyon derecelerindeki %2 (w/v) kitosan iskelelerin gözenek boyut dağılımları.

Şekil 4.3’te görüldüğü gibi kitosan iskelelerdeki gözenek boyutlarının 30-150 μm arasında değiştiği ve SEM fotoğraflarından hesaplanan gözenek boyutlarının belirlenen aralık için uygunluk gösterdiği bulunmuştur. Bu gözenek boyutu, iskele içine hücre penetrasyonu ve aynı zamanda besin, metabolit ve çözünen sinyaller için gerekli olan kütle aktarımını sağlayabilecek düzeydedir (Prasitsilp et al., 2000; Chen et al., 2002). Kitosan doku iskelelerinin gözenekliliği, sıvı değişim yöntemiyle hesaplanmış ve hazırlanan iskeleler için gözeneklilik değeri $\% 81.8 \pm 1.7$ olarak bulunmuştur (Aday, 2008). Yüksek oranda gözenekli yapılar, doku mühendisliği çalışmaları için istenen özellikte malzemelerdir. Yapılan çalışmalar, %80 gözenekliliğe sahip malzemelerin kondrositlerin ortamda bulunan besin maddelerine ulaşımı açısından uygun olduğunu ortaya koymuştur (Guo et al., 2006).

4.1.3. Şişme özellikleri

Kitosan doku iskelelerinin 37°C'de PBS içerisinde (pH=7.4) rehidre edilmesinden sonra gerçekleştirilen şişme testlerinin sonucunda elde edilen denge şişme oranları 27-40 arasında değişmektedir (Çizelge 4.1). Ayrıca, şişme prosesinin 3 dakika içerisinde hızlı bir şekilde tamamlandığı belirlenmiştir.

Çizelge 4.1. Kitosan iskelelerin şişme karakteristikleri.

Kitosan Doku İskeleleri	Denge Şişme Oranları*
%2 (w/v) Kitosan (%75-85 DD)	40.6±0.7
%3 (w/v) Kitosan (%75-85 DD)	27.0±1.4
%2 (w/v) Kitosan (>%85 DD)	36.7±0.2
%3 (w/v) Kitosan (>%85 DD)	32.3±0.4

* İstatistiksel olarak %95 güvenilirlik seviyesi.

Çizelge 4.1'de görüldüğü gibi %3 (w/v) bileşime sahip olan kitosan iskelelerin denge şişme oranları daha düşüktür. %2 (w/v) bileşime sahip olan iskelelerin gözenek boyutlarının ve içsel bağlantılarının bağlı olarak daha büyük olması bu iskelelerin denge şişme oranlarını artırmaktadır.

Bununla beraber, kitindeki asetamid gruplarının deasetilasyon prosesi sonucunda amin gruplarına çevrildiği ve amin gruplarının daha hidrofilik olduğu düşünüldüğünde, yüksek DD'ye sahip olan kitosan iskelelerin yüksek su absorblama kapasitesine de sahip olacağı beklenmektedir. Sunulan çalışmada ise, şişme oranlarıyla DD arasında bir ilişki saptanamamıştır. Çalışmada elde edilen bulgulara benzer olarak Tomihata ve Ikada, deasetilasyona uğramış kitin türevlerinin DD'inden farklı olarak başka faktörlere bağımlı olabileceğini rapor etmişlerdir (Tomihata and Ikada, 1997).

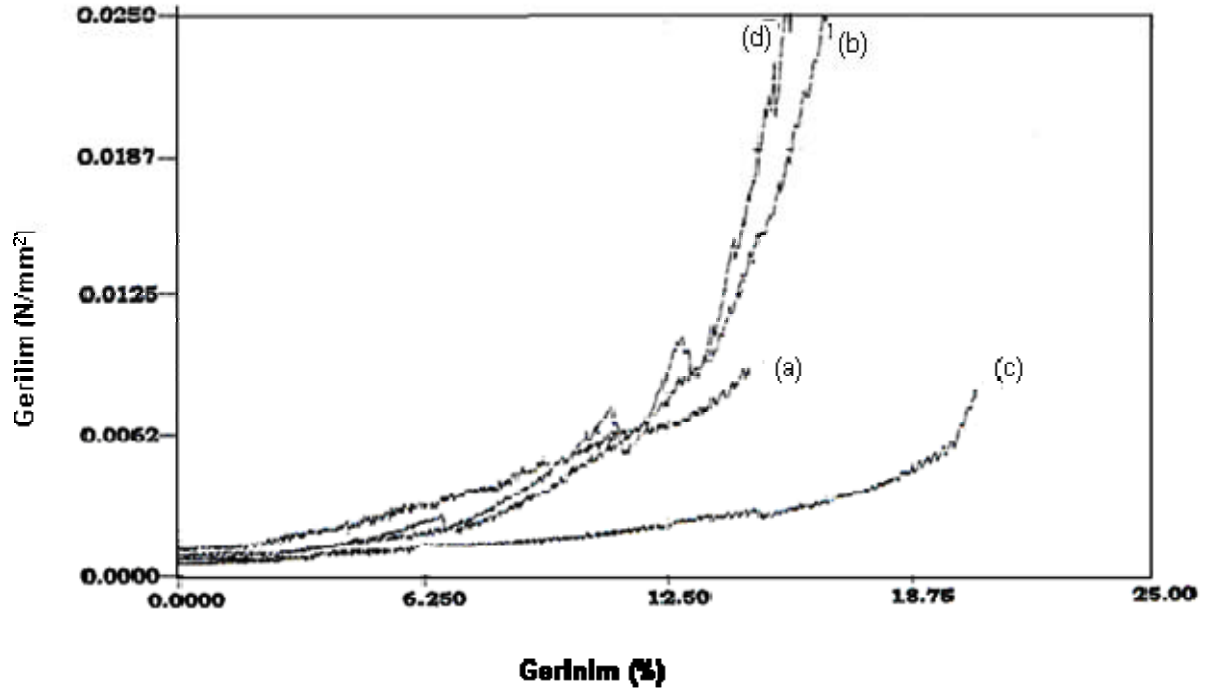
4.1.4. Mekanik dayanım

In vitro ve *in vivo* doku mühendisliği çalışmalarında implant olarak kullanılan doku iskeleleri, uygulama sırasında yenilenecek dokunun özelliğine göre belli bir gerilime maruz kalır. Dolayısıyla uygulamalarda kullanılacak olan iskelelerin mekanik dayanımlarının belirlenmesi gereklidir. Mekanik özellikler, oluşan dokuda spesifik hücre fonksiyonlarını da etkilemektedir (Ingber et al., 1993; Huang et al., 2005). Dolayısıyla sunulan çalışmada, farklı deasetilasyon derecelerine ve bileşimlere sahip olan kitosan iskelelere mekanik dayanım testi uygulanmıştır. Genel olarak elastik polimer materyaller *gerilim-gerinim eğrilerinde* iki karakteristik deformasyon bölgesine sahiptir. Düşük gerinimlerde, artan gerinime bağımlı olarak gerilim hızlı bir şekilde artmaktadır. Elastik bölgede gözlenen keskin eğimler kantitatif olarak materyalin yüksek elastik modülüne sahip olduğunu göstermektedir. Yüksek gerinimlerde gerilim, artan gerinime bağımlı olarak sadece küçük bir artış gösterir ve kopma noktasında sona erer. Kopma noktası materyalin kırılma özelliğinin bir göstergesidir (Wan et al., 2004).

Tamamen şişirilmiş kitosan iskeleler yumuşak, süngerimsi ve esnektir. Şekil 4.4, her bir iskele için elde edilen “gerilim-gerinim” eğrilerini göstermektedir. Şekilden anlaşılacağı gibi, %3 (w/v) bileşime sahip olan iskeleler düşük gerinim değerlerinde gerilimde hızlı artış göstermektedirler. Dolayısıyla yüksek bileşimlerdeki iskelelerin bağıl olarak daha sert bir yapıya sahip oldukları söylenebilir. Mekanik test sonucu elde edilen gerilim-gerinim eğrileri kullanılarak kitosan doku iskelelerinin elastik modülleri hesaplanmıştır ve Çizelge 4.2’de sunulmuştur.

Hesaplanan elastik modüllerine göre (Çizelge 4.2), düşük bileşimlerde kitosan iskelelerin mekanik dayanımlarının azaldığı gözlenmiştir. Bu bulgu iskeleler arasındaki gözeneklilik farkının bir sonucudur. Yüksek gözenek hacmi ve boyutuna sahip olan iskelelerde deformasyona uğrayacak olan alan büyümektedir. Dolayısıyla %3 (w/v) bileşime sahip olan iskelelerin gözenek boyutları küçük olmasına rağmen mekanik dayanımları yüksektir. Bununla beraber, elastik modül değerlerine göre, aynı bileşime sahip olan iskelelerde yüksek deasetilasyon

derecesine bağımlı olarak mekanik dayanımlarının daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Kitosanın yüksek deasetilasyon derecelerinde kristalinite artmakta ve yapı mekanik açıdan daha dayanıklı hale gelmektedir. Bu bulgu, literatürdeki asetilasyon derecesiyle mekanik dayanım arasındaki bağıntıyı doğrulamaktadır (Chatelet et al., 2001).



Şekil 4.4. Kitosan doku iskelelerinin gerilim-gerinim eğrileri; (a) %2 Kitosan (%75-85 DD), (b) %3 Kitosan (%75-85 DD), (c) %2 Kitosan (>%85 DD), (d) %3 Kitosan (>%85 DD).

Çizelge 4.2. Kitosan doku iskelelerinin mekanik dayanımları.

Kitosan Doku İskelesi	Elastik Modül (N/mm ²)*
%2 (w/v) Kitosan (%75-85 DD)	0.0572±0.0082
%3 (w/v) Kitosan (%75-85 DD)	0.0983±0.0080
%2 (w/v) Kitosan (>%85 DD)	0.0917±0.0001
%3 (w/v) Kitosan (>%85 DD)	0.1662±0.0464

* İstatistiksel olarak %95 güvenilirlik seviyesi.

4.1.5. Biyobozunurluk

Biyobozunurluk, doku mühendisliği uygulamalarında doku oluşumu için gerekli olan en önemli özelliklerden bir tanesidir. *In vivo* ortamda kitosan, enzimatik hidroliz sonucu bozunmaya uğramaktadır. Kitin ve türevleri, deasetilasyon, lokal pH ve kitinin kaynağına bağımlı olarak lizozim varlığında bozunma eğilimi göstermektedir (Wan et al., 2004). Lizozim varlığında bozunma, asetil gruplarının lizozomal bağlanması sonucunda gerçekleşmektedir. Asetil gruplarındaki azalış, başka bir deyişle deasetilasyon derecesindeki artış, kitosan iskelelerdeki bozunmayı azaltmaktadır. *In vivo* ortamda yüksek DD'ye sahip kitosanın biyobozunma süresi birkaç ay iken, düşük DD'ye sahip kitosan ise daha hızlı bozunmaktadır. Bozunma sonrasında elde edilen ürün, farklı uzunluklardaki kitosan oligosakkaritlerdir (Suh and Matthew, 2000).

Sunulan çalışmada, farklı deasetilasyon derecelerine sahip olan kitosan iskeleler, kültür ortamında lizozim varlığında inkübasyona bırakılmıştır. Çalışma sonucunda 7 güne kadar kitosan iskeleler arasında önemli bir ağırlık kaybı değişimi kaydedilmemiştir. Üç haftalık inkübasyon sonrasında her iki tür kitosan iskelede de enzimatik bozunmanın gerçekleştiği gözlemlenmiştir. Düşük deasetilasyon derecesine sahip olan kitosan iskelelerin lizozim varlığındaki inkübasyon sonrası %20 ağırlık kaybına uğradığı, kontrol grupların ise (lizozim yokken) %10'luk ağırlık kaybına uğradığı belirlenmiştir.

4.1.6. Hücre-doku iskelesi etkileşimleri

Sunulan çalışmada farklı deasetilasyon derecelerinde ve bileşimlerde hazırlanan doku iskelelerinin doku mühendisliğinde kullanım potansiyelinin araştırılması amacıyla *in-vitro* koşullarda L929 fare fibroblast hücreleri ile hücre kültür çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Hücre-doku iskelesi etkileşimlerinin saptanması amacıyla kitosan doku iskelelerindeki hücre yapışması ve hücre üremesi incelenmiştir. Kitosan doku iskeleleriyle gerçekleştirilen hücre kültür çalışmalarına ilişkin sonuçlar aşağıda tartışılmıştır.

4.1.6.1. Deasetilasyon derecesinin hücre yapışması üzerine etkisi

Hazırlanan kitosan doku iskelelerinin hücre yapışma karakteristiklerini ve iskele içerisine hücre difüzyonunun gerçekleştiğini belirlemek amacı ile hücre yapışma testleri uygulanmıştır. Hemositometrik sayım çalışmaları sonucunda L929 fibroblast hücrelerinin, tüm iskelelere 6 saat sonunda tamamen difüze olduğu belirlenmiştir. Kitosan doku iskelelerine yapışan tüm hücrelerin canlı hücreler olduğu düşünülerek 1 gün sonundaki hücrelerin özgül üreme hızları Bölüm 3.1.2.3'te açıklanan yöntem ile belirlenmiştir. Elde edilen bulgular Çizelge 4.3'te sunulmuştur. Çizelge 4.3'ten de anlaşılacağı gibi, yüksek deasetilasyon derecesine sahip olan kitosan iskelelerde daha yüksek büyüme indeksi değerleri kaydedilmiştir.

Deasetilasyon derecesi arttıkça katyonik polimerin taşıdığı primer amin grupları artmaktadır. Dolayısıyla, hücreler, hücre membranları vasıtasıyla kitosan iskelelerdeki protone olmuş amin gruplarına bağlanmaktadır. Literatürde de düşük asetilasyon derecelerinin hücre yapışmasını desteklediği belirtilmiştir (Chatelet et al., 2001; Amaral et al., 2005). Elde edilen sonuçlar literatür ile uyumludur ve sonuç olarak >%85 DD'ye sahip olan kitosan iskelelerin hücre yapışmasını desteklediği saptanmıştır.

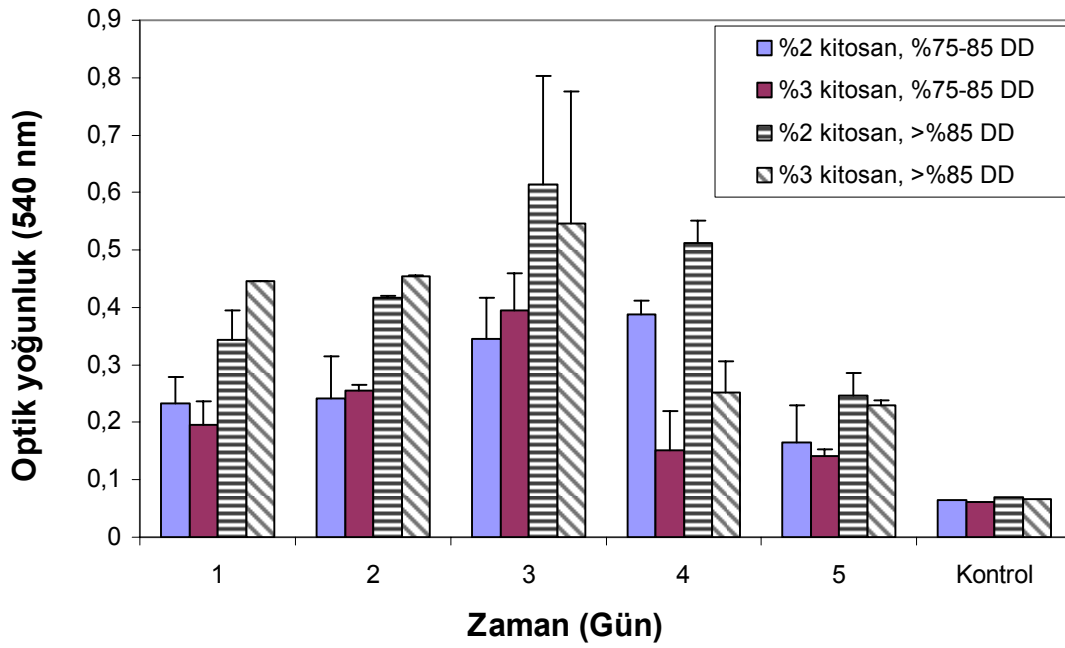
Çizelge 4.3. Kitosan iskelelerde L929 fibroblastik hücre yapışması ve büyümesi.

Kitosan Doku İskelesi	Özgül üreme hızı (μ, sa⁻¹)	İkilenme süresi (t_d, sa)	24. saat sonunda büyüme indeksi	Üstel üreme fazı sonunda büyüme indeksi
%2 Kitosan (%75-85 DD)	0.009	77.0	1.80±0.53	3.62±0.29
%3 Kitosan (%75-85 DD)	0.012	57.7	1.55±0.49	3.71±0.75
%2 Kitosan (>%85 DD)	0.017	40.8	3.10±0.60	6.28±1.20
%3 Kitosan (>%85 DD)	0.015	46.2	4.29±1.40	5.48±1.70

* İstatistiksel olarak %95 güvenilirlik seviyesi.

4.1.6.2. Hücre üreme kinetiği ve fibroblastik çoğalma

Farklı deasetilasyon derecelerinde ve bileşimlerinde hazırlanan kitosan iskelelerdeki hücre üremesi, 5 günlük inkübasyon periyodunda Bölüm 3.1.2.3'te açıklanan mitokondriyal aktivite tayin testi (MTT testi) kullanılarak incelenmiştir. Sonuçlar optik yoğunluk değeri olarak Şekil 4.5'te verilmektedir.



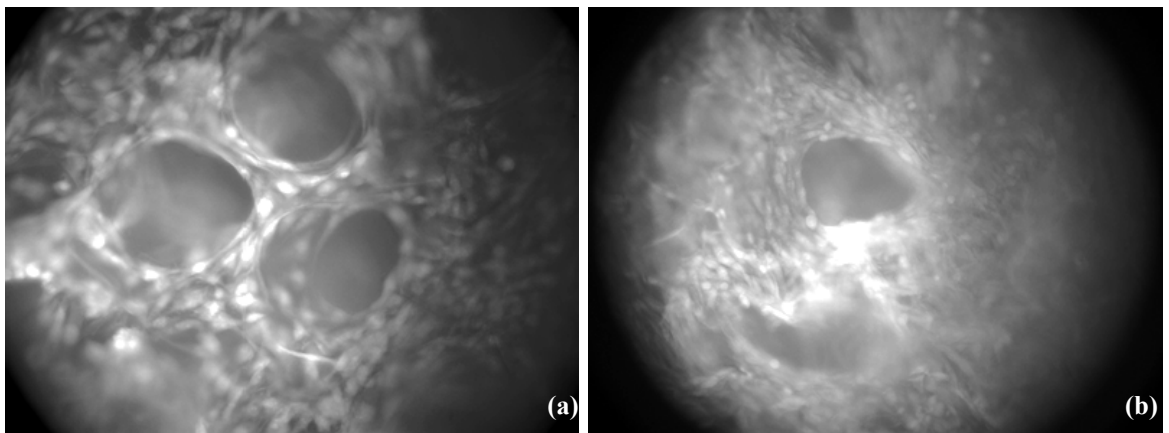
Şekil 4.5. Kitosan iskelelerdeki L929 fare fibroblastlarının üreme davranışları.

Şekil 4.5'ten açıkça görüleceği gibi, tüm iskelelerde 24 saat sonunda iskeleye yapışan hücreler yayılmaya başlamış ve ilk üç gün hücre sayısında artış olduğu belirlenmiştir. Bununla beraber, >%85 DD'ne sahip olan kitosan iskelelerdeki hücrelerin, bu iskelelerdeki yüksek çoğalma eğilimlerinden dolayı sayılarının önemli derecede arttığı belirlenmiştir. %3'lük bileşime sahip kitosan iskelelerde, 4. gün sonunda hücre sayılarında keskin bir düşüş belirlenmiştir. Bu düşüş %3'lük bileşime sahip olan iskelelerdeki gözenek boyutunun küçük olmasıyla bağlantılıdır. Kültür ortamı ve iskele arasındaki kütle aktarımının difüzyon kısıtlamalarıyla engellenmesi, bu iskelelerdeki hücrelerin yaşamsal faaliyetlerini azaltmaktadır.

Kitosan iskeleler üzerindeki fibroblastik hücre üremesi Eşitlik 3.3 kullanılarak hesaplanan özgül üreme hızı (μ) değerleriyle ifade edilmiştir. Hesaplanan değerler Çizelge 4.3'te sunulmuştur. Elde edilen sonuçlar ışığında yüksek deasetilasyon derecesine sahip olan kitosan iskelelerdeki hücre büyüme hızlarının daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Yüksek deasetilasyon derecesine sahip olan kitosan iskelelerin morfolojik açıdan daha fazla içsel bağlantılara sahip olduğu bilinmektedir. Dolayısıyla, bu iskelelerdeki hücrelerin üreme davranışlarının bağıl olarak daha yüksek olduğu mitokondriyal aktivite testi ile doğrulanmıştır. Karşılaştırmalar sonucunda %85 deasetilasyon derecesine ve %2 bileşime sahip olan kitosan iskelelerin hücre üreme ve çoğalma fonksiyonlarını desteklediği saptanmıştır.

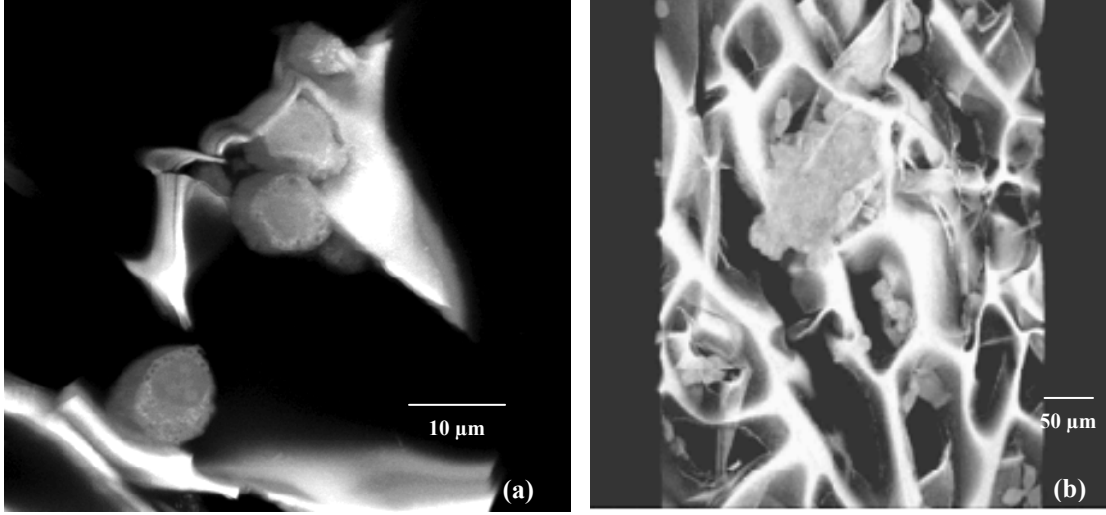
4.1.6.3. Kitosan iskelelerdeki hücrelerin floresan görüntülemesi ve morfoloji takibi

Kitosan doku iskeleleri içerisinde üreyen hücrelerin görüntülenmesi amacıyla %85 deasetilasyon derecesine sahip olan kitosan iskelelerde L929 fibroblastların 2. ve 4. günlerdeki floresan mikroskop görüntüleri alınmış ve Şekil 4.6'da sunulmuştur. Şekil 4.6-a'dan da anlaşılacağı gibi 2 günlük inkübasyon sonrasında hücrelerin iskele üzerinde çoğalmaya başladığı gözlemlenmiştir. 4. gün sonunda, hücrelerin iskele yüzeyine yayıldığı ve gözenekleri neredeyse tamamen kapladığı görülmektedir (Şekil 4.6-b). Elde edilen görüntüler Şekil 4.5'te açıklanan kitosan iskeleler içerisindeki hücre üreme karakteristikleri ile uyumludur.

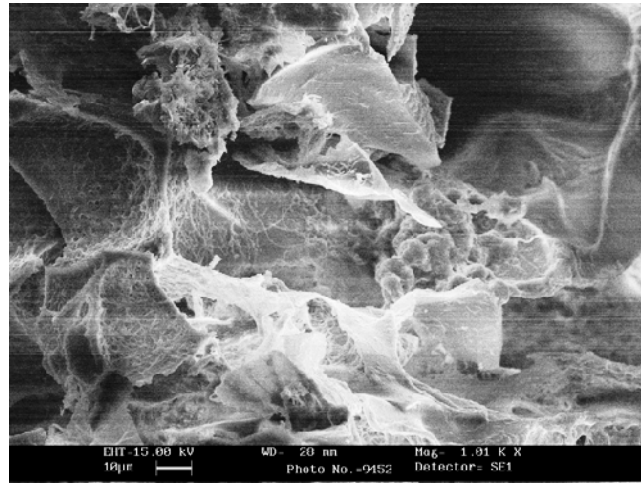


Şekil 4.6. >85% DD'ne ve % 2 (w/v) bileşime sahip kitosan iskeleler üzerinde üreyen L929 hücrelerin floresan mikroskop görüntüleri: a) kültürün 2. günü; b) 4. günü (x20).

%85 DD'ne sahip kitosan iskelelerdeki hücre morfolojilerinin belirlenmesi amacı ile elde edilen konfokal lazer mikroskop (CLSM) ve SEM görüntüleri sırasıyla Şekil 4.7 ve Şekil 4.8'de verilmektedir. Kültür sonrası 2. günde CLSM ile çekilen görüntüler hücrelerin gözenekler içerisine yapıştığını ve yapı içerisinde yayılmaya başladığını göstermektedir (Şekil 4.7-a, b).



Şekil 4.7. >%85 DD'ne ve %2 (w/v) bileşime sahip kitosan iskelelerde L929 hücrelerin CLSM görüntüleri: Kültürün (a) 2. günü, (b) 4. günü.



Şekil 4.8. >%85 DD'ne ve %2 (w/v) bileşime sahip kitosan iskelelerde L929 hücrelerin kültürün 4. günündeki SEM görüntüsü.

Şekil 4.8’de kültürün 4. günü kitosan iskele üzerindeki hücrelerin SEM görüntüsü sunulmuştur. Elde edilen SEM görüntüsünün değerlendirilmesiyle hücrelerin gözenekli yapı boyunca yayıldığı ve küresel hücre morfolojisinin elipsoidal forma dönüştüğü belirlenmiştir.

Elde edilen bulgular, kitosan iskelelerin hücre-malzeme etkileşimleri ve biyouyumluluk açısından uygun malzemeler olduğunu açıkça göstermektedir. Yapılan tüm çalışmaların sonuçları topluca değerlendirildiğinde, %2 (w/v) bileşime ve >%85 DD’ne sahip kitosan doku iskelelerinin kıkırdak doku oluşumunun takibi açısından daha uygun olacağına karar verilmiş ve sunulan tez çalışmasında bu doku iskeleleri kullanılmıştır.

4.2. Kitosan Doku İskelelerinin RGD veya EGF ile İmmobilizasyonu ve Kondrojenik Aktivitelerinin Belirlenmesi

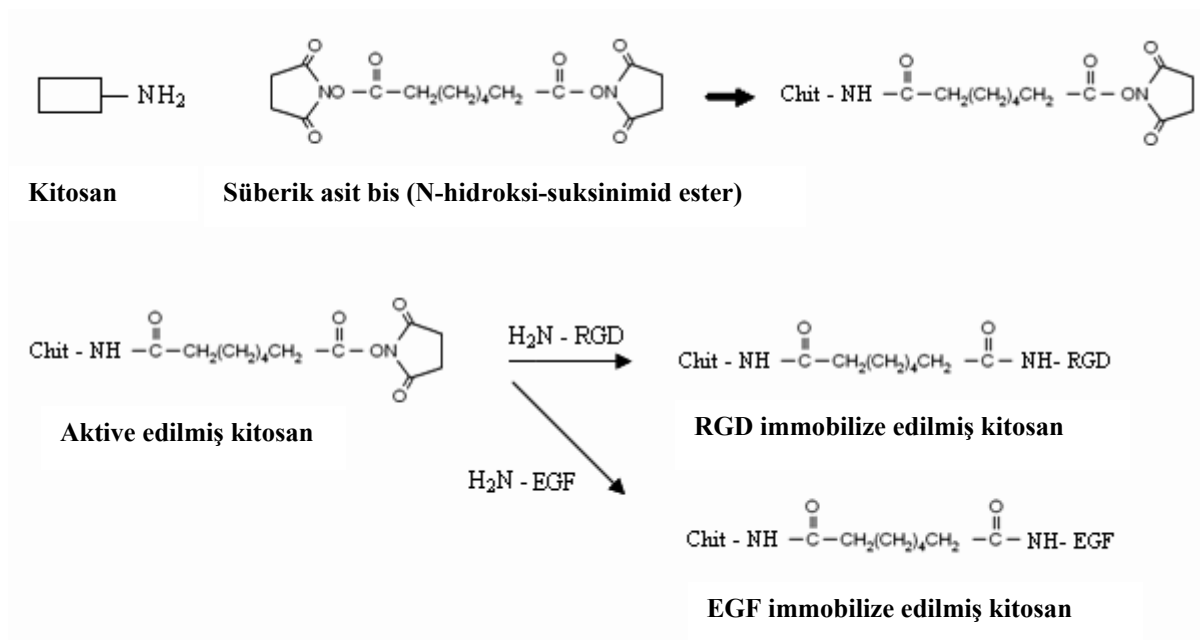
Çalışmanın bu bölümünde, bir önceki bölümde karakterize edilen kitosan doku iskelelerine (>%85 DD ve %2 (w/v) bileşim) RGD ya da EGF immobilizasyonu sonucunda elde edilen bulgulara yer verilmiştir. Sonrasında, RGD veya EGF immobilize edilmiş kitosan doku iskelelerinin ATDC5 kondrojenik hücre hattı ile gerçekleştirilen hücre kültür çalışmalarından elde edilen bulgular tartışılmıştır.

4.2.1. Kitosan doku iskelelerine RGD veya EGF immobilizasyonu

Başarılı bir doku mühendisliği iskelesi, hücre yapışmasına ve üremesine elverişli, hücre uyumlu bir yüzeye sahip olmalıdır. Çoğu yüzey modifikasyonu, hücreler tarafından spesifik olarak algılanabilen biyomoleküllerin polimerik yüzeylere immobilizasyonu ile polimerik doku iskelesinin biyouyumluluğunu arttırmaya yöneliktir (Elbert and Hubbell, 1996). Biyomoleküller, biyomalzeme yüzeylerine hem kovalent olarak hem de elektrostatik olarak veya kendiliğinden düzenlenme ile bağlanabilmektedir. Doku mühendisliği uygulamaları için kullanılan kitosan, yapısında bulunan amino ve hidroksil grupları sayesinde kimyasal modifikasyon işlemlerine tabi tutulabilmektedir (Krajewska, 2005; Karakeçili, 2006). Hücre yapışmasını ve üremesini destekleyen biyomoleküllerin başında, RGD peptidleri gibi adeziv proteinler ve EGF gibi büyüme faktörleri gelmektedir. Literatürde,

kitosanın RGD ve EGF gibi biyolojik moleküller ile modifiye edilerek farklı hücre tipleri ile olan etkileşimlerinin incelendiği pek çok doku mühendisliği çalışması olduğu halde kıkırdak doku mühendisliği alanında yapılan çalışmalar kısıtlıdır. Masuko ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada kitosanın biyomodifikasyonu 2-iminotiyolan ile gerçekleştirilmiş ve kitosan üzerindeki amino gruplarına aktif –SH molekülü immobilize edilmiştir. Daha sonra bu aktif gruplar RGDS içeren hücre yapıştırıcı peptidin disülfid bağları ile yüzeye bağlanmasında kullanılmıştır. Sentezlenen biyoaktif kitosan üzerinde *in-vitro* ortamda insan artiküler kondrositlerin yapışma ve üreme davranışı incelenmiştir (Masuko et al., 2005).

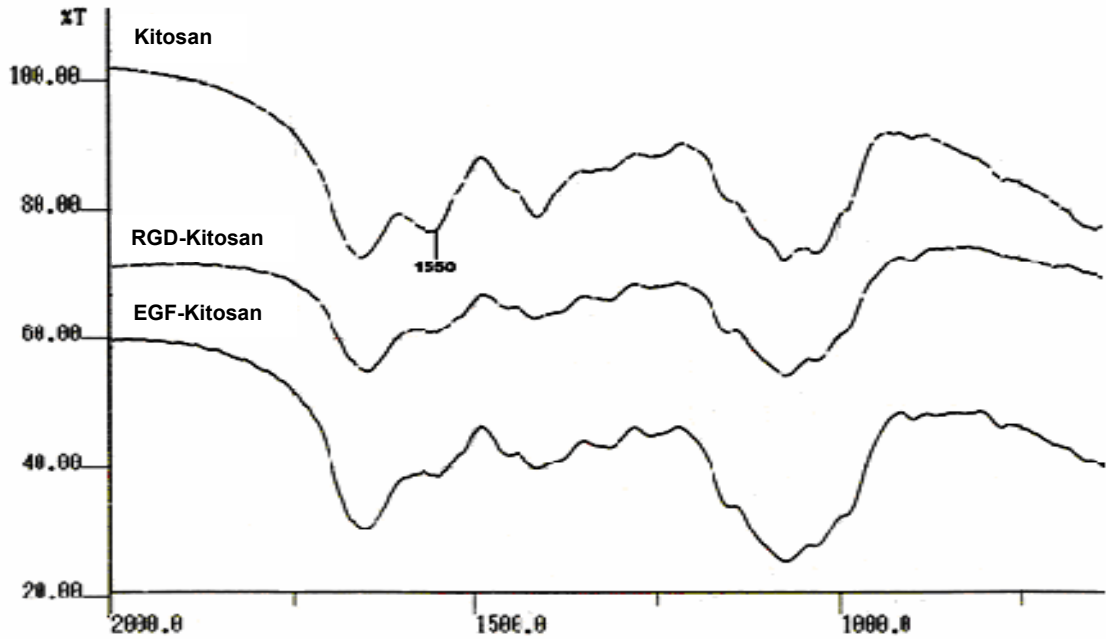
Sunulan çalışmada, kıkırdak doku mühendisliği çalışmalarında kullanılmak üzere, RGD veya EGF, gözenekli kitosan doku iskelelerine Bölüm 3.2.1’de açıklanan yöntem kullanılarak kovalent olarak immobilize edilmiştir. Şekil 4.9’da kitosan iskelelere RGD ve EGF immobilizasyonunun şematik olarak gösterimi verilmiştir. Kısaca, kitosanın uç amin grubu ilk olarak NHS ile aktive edilmektedir. Sonrasında ise aktive edilen kitosan, RGD veya EGF’ in amino terminali ile konjuge edilmektedir.



Şekil 4.9. Kitosan doku iskelelerine RGD ve EGF immobilizasyonunun şematik gösterimi.

4.2.1.1. FTIR analizi

Sunulan çalışmada kitosan doku iskeleleri, biyomodifikasyon sonrasında iskeledeki biyosinyal moleküllere ait grupların ve yapıda meydana gelen değişikliklerin belirlenmesi amacıyla FTIR spektrofotometresi ile Bölüm 3.2.2.1’de açıklanan yöntem kullanılarak kalitatif olarak incelenmiştir. Kitosan, RGD immobilize edilmiş kitosan (RGD-kitosan) ve EGF immobilize edilmiş kitosan (EGF-kitosan) doku iskelelerine ait FTIR spektrumları Şekil 4.10’da görülmektedir. Sunulan FTIR spektrumları incelendiğinde, kitosan doku iskelesi için 1550 cm^{-1} ’de net bir pik gözlenmiştir. Gözlenen bu pik primer N–H bükülme bölgesini ($1500\text{--}1550\text{ cm}^{-1}$) işaret etmektedir (Socrates, 1998). RGD ve EGF immobilize edilen doku iskeleleri için elde edilen spektrumlarda ise 1550 cm^{-1} ’deki pik kaybolmuştur. Bu durum, biyosinyal moleküllerin kitosanın primer amino grubuyla birleştiğini kanıtlamıştır. Şekil 4.10’dan elde edilen bulgular, RGD ve EGF’in kitosan doku iskelelerine Bölüm 3.2.1’de verilen yöntem kullanılarak, başarıyla immobilize edildiğini destekleyen kanıtları sağlamıştır.

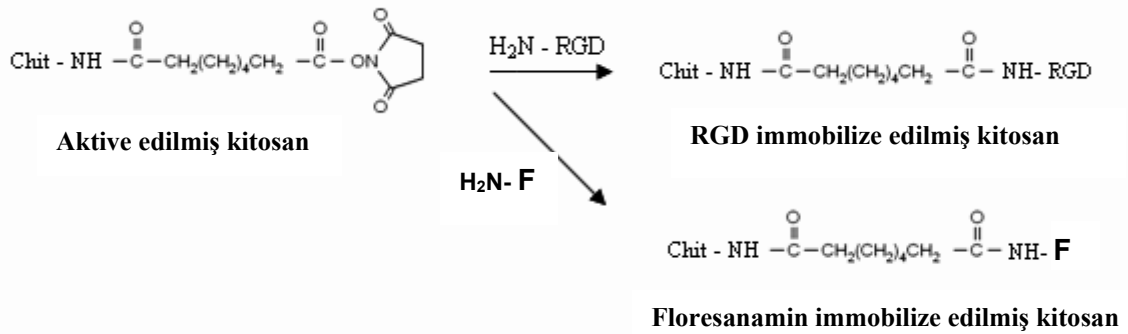


Şekil 4.10. Kitosan, RGD-kitosan ve EGF-kitosan doku iskelelerine ait FTIR spektrumları.

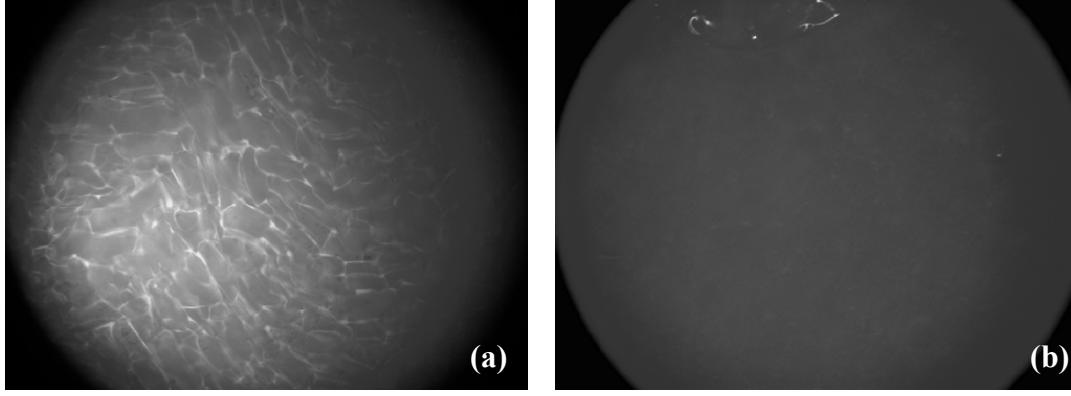
4.2.1.2. RGD veya EGF immobilize edilmiş kitosan doku iskelelerinin kalitatif analizi

Sunulan çalışmada, RGD immobilize edilen doku iskelelerinde RGD'nin varlığını kanıtlamak ve doku iskelesi üzerinde RGD'nin boyutsal dağılımını analiz etmek amacıyla Bölüm 3.2.2.2'de anlatılan yöntem çerçevesinde iskeleler dolaylı olarak görüntülenmiştir. Özetle, floresan bir boya olan floresanaminin amin grupları, RGD molekülünün immobilizasyonundaki gibi, aktive edilmiş kitosanla birleşmiştir. Şekil 4.11'de, aktive edilmiş kitosan doku iskelesine RGD yerine floresan boyanın immobilizasyonunun gerçekleşmesi şematik olarak verilmiştir. Böylece, muhtemel RGD birleşme bölgeleri bu yöntem ile işaretlenmiştir (Şekil 4.12-a). Şekil 4.12-b, RGD immobilize edilen doku iskelelerinin floresanamin ile işaretlenemediğini göstermektedir.

Elde edilen bu bulgu, RGD'nin aktive edilmiş kitosan doku iskelelerine başarılı bir şekilde immobilize edildiğini işaret etmektedir. Bu dolaylı yöntem, sadece RGD'nin kitosan doku iskelesi üzerindeki dağılımını değil, aynı zamanda immobilizasyon tekniğinin başarısını da göstermiştir.

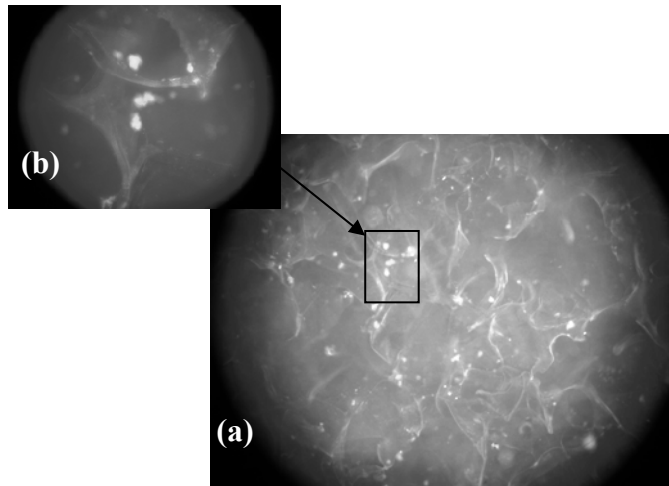


Şekil 4.11. Kitosan doku iskelelerine RGD yerine floresanamin (F) immobilizasyonunun mekanizması.



Şekil 4.12. Floresanamin ile işaretlenmiş kitosan doku iskelelerine ait floresan mikroskop fotoğrafları (a) Parlayan alanlar floresanamin ile immobilize edilmiş kitosan iskelelerini göstermekte ve muhtemel RGD bağlanma bölgelerini işaret etmektedir (x10). (b) Karanlık alanlar floresanamin işaretli RGD-kitosan doku iskelesinde RGD immobilize edilmiş bölgeleri göstermektedir (x10).

Çalışmada, EGF immobilize edilen doku iskelelerinde EGF'nin varlığını kanıtlamak ve doku iskelesi üzerindeki EGF dağılımını analiz etmek amacıyla Bölüm 3.2.2.3'te anlatılan yöntem çerçevesinde iskeleler floresan mikroskop ile görüntülenmiştir. Kitosan doku iskelesi üzerindeki EGF'in immüno-boyaması, EGF'in varlığını açıkça göstermiştir (Şekil 4.13).



Şekil 4.13. EGF immobilize edilmiş kitosan doku iskelelerinin immüno-boyama sonrası floresan mikroskop görüntüleri (a) x20 (b) x40. Parlayan alanlar floresan işaretli EGF'i işaret etmektedir.

Özetle, kitosan doku iskelesi üzerindeki EGF, floresan bir antikor olan Anti-Rabbit IgG ile birleşmek için, anti-EGF' e bağlanmıştır (Ito, 1998). Şekil 4.13'te görüldüğü gibi, aktive edilen kitosan doku iskelesine EGF'in immobilizasyonunun başarıyla gerçekleştirilmesinin sonucunda, EGF molekülleri kitosan doku iskelesinde homojen olarak dağılmıştır.

4.2.1.3. RGD veya EGF immobilize edilmiş kitosan doku iskelelerinin kantitatif analizi

Kitosan doku iskelelerine RGD immobilizasyonu sonrasında, yüzeylere immobilize olan peptid miktarının kantitatif tayini Bölüm 3.2.2.4'te açıklanan ninhidrin yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Ninhidrin yöntemiyle yapılan kantitatif tayin sonucu hesaplanan değerler Çizelge 4.4'te sunulmuştur. Ek olarak, farklı başlangıç konsantrasyonlarında immobilize edilen RGD'nin immobilizasyon verimlilikleri hesaplanmıştır (Çizelge 4.4). Çizelge 4.4'ten de anlaşılabacağı gibi 0.3 µmol/ml başlangıç RGD konsantrasyonu sonucunda kitosan doku iskelelerini birim ağırlığı başına (g) 6.34×10^{-5} mol RGD bağlandığı saptanmıştır. Immobilizasyon verimliliği ise %63.4 olarak belirlenmiştir. Sonuç olarak, tez kapsamında kullanılacak RGD miktarının 0.3 mM olmasına karar verilmiştir. Bu değer literatürde hücre yapışmasına ve yayılmasına destek olacak yeterli RGD miktarı olarak bilinmektedir (Karakeçili et al., 2007).

Kitosan doku iskelelerine bağlanan EGF miktarı, oligopeptidin floresan özellik gösteren triptofan uçları üzerinden, floresan spektrofotometreyle Bölüm 3.2.2.4'te açıklanan yöntem çerçevesinde kantitatif olarak belirlenmiştir. Floresan spektrofotometresi ile elde edilen kantitatif sonuçlar ve EGF immobilizasyon verimliliği Çizelge 4.4'te sunulmuştur. Çizelge 4.4'ten de anlaşılabacağı gibi 2µg/ml EGF başlangıç konsantrasyonu ile immobilize edilen kitosan doku iskelelerindeki EGF immobilizasyon verimliliği %97.6 olarak hesaplanmıştır. Literatürde, hücre fonksiyonlarının geliştirilmesi amacıyla yapılan ve EGF biyosinyal molekülünün kullanıldığı biyomodifikasyon çalışmaları incelendiğinde, kondrojenik aktivitenin artması ya da hücre göçünün gerçekleşmesi için gerekli olan immobilize EGF miktarına ilişkin optimal bir değere rastlanamamıştır. Bununla beraber, grubumuz tarafından yapılan çalışmalarda, kitosan membranlar ve PCL, PCL/jelatin nano

fiberler üzerine immobilize edilen EGF miktarlarının gram malzeme başına 10^{-3} g civarında olduğu ve bu miktarın L929 fare fibroblast hücrelerinin mitojenik aktivitelerinin artırılması açısından yeterli olduğu saptanmıştır (Karakeçili, 2006; Kazaroğlu, 2009). Tüm bu bulgular ışığında, tez kapsamında kullanılan EGF konsantrasyonunun 2 µg/ml olarak alınmasına karar verilmiştir.

Çizelge 4.4. RGD veya EGF immobilize edilmiş kitosan doku iskelelerinin kantitatif analizi.

Başlangıç RGD Konsantrasyonu (µmol/ml)	İmmobilize RGD Miktarı (10^{-5}) (mol/g kuru iskele)	İmmobilizasyon Verimliliği (%)
0.15	3.13 ± 0.12	62.6
0.30	6.34 ± 0.41	63.4
0.60	12.75 ± 0.06	63.8

Başlangıç EGF Konsantrasyonu (µg/ml)	İmmobilize EGF Miktarı (10^{-4}) (g/g kuru iskele)	İmmobilizasyon Verimliliği (%)
1.00	3.18 ± 0.00	95.5
2.00	6.50 ± 0.00	97.6
4.00	13.13 ± 0.01	98.5

4.2.2. RGD veya EGF immobilize edilmiş kitosan doku iskelelerinin kondrojenik aktivitelerinin belirlenmesi.

Sunulan çalışmanın bu bölümünde, RGD veya EGF ile immobilize edilmiş kitosan doku iskelelerinin ATDC5 hücre hattı ile yapılan hücre kültür çalışmalarından elde edilen sonuçlar sunulmuştur. Hücre kültür çalışmaları sonucunda RGD veya EGF

biyomoleküllerinin kondrojenik hücre yapışması, proliferasyonu ve kondrojenik aktiviteleri üzerindeki etkileri tartışılmıştır.

4.2.2.1. Kondrojenik hücre yapışması ve üremesi

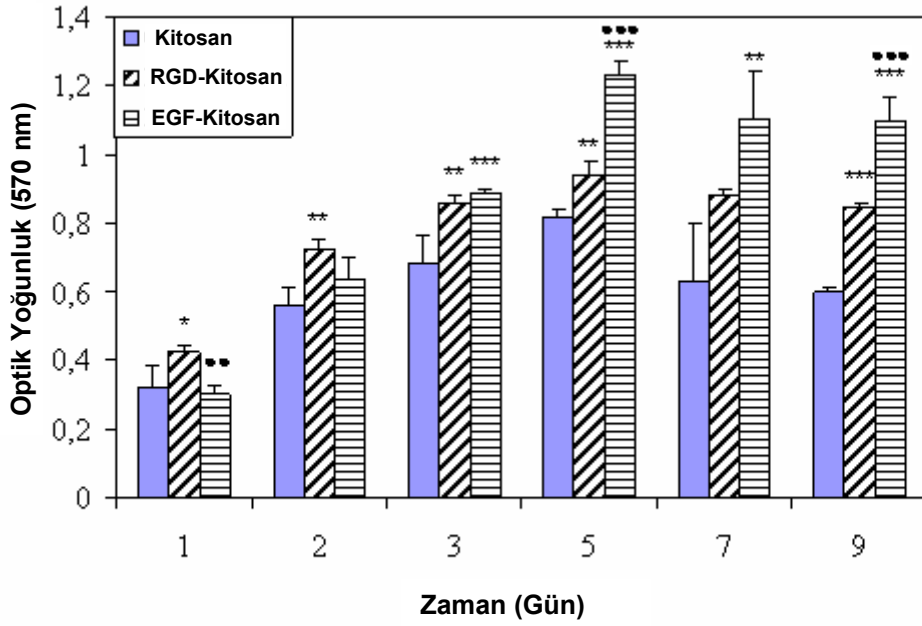
RGD sekansının hücre membranındaki yapışma reseptörleri tarafından tanınabilmesinden dolayı, hücre yapışmasını iyileştirebildiği bildirilmiştir (Hoa et al., 2005). Dolayısıyla, biyomalzemelerin hücre ile etkileşimlerinin RGD immobilizasyonu ile iyileştirilebileceği ve malzemelerin doğal hücre dışı matrisi (ECM) taklit edebileceği öngörülmüştür. Çalışmada, ATDC5 hücreleri kitosan iskelelere ekildikten 6 saat sonra tüm hücrelerin kitosan doku iskelelerine difüzlendiği hemositometrik analiz ile saptanmıştır. Kitosan doku iskelelerine yapışan hücrelerin canlı hücreler olduğu düşünülerek 1 gün sonundaki hücrelerin özgül üreme hızları Bölüm 3.3.3'te açıklanan MTT yöntemi ile belirlenmiştir. Elde edilen bulgular Çizelge 4.5'te sunulmuştur. Çizelgedeki 24 saat sonunda hesaplanan özgül üreme hızları karşılaştırıldığında, RGD'nin kitosan doku iskelelerindeki kondrojenik hücre yapışmasını desteklediği saptanmıştır.

Çizelge 4.5. Kitosan doku iskelelerindeki ATDC5 hücre yapışması ve büyümesi.

Doku İskelesi	Özgül üreme hızı (μ , sa^{-1})	24. saat sonunda özgül üreme hızı (sa^{-1})	İkilenme süresi (sa)
Kitosan	0.014	0.037	47.9
RGD- Kitosan	0.015	0.049	46.3
EGF-Kitosan	0.018	0.036	37.0

Kitosan doku iskeleleri üzerindeki kondrojenik hücre üremesini sayısal olarak değerlendirmek için, özgül üreme hızı (μ), Eşitlik 3.3 kullanılarak belirlenmiştir. Kitosan, RGD-kitosan ve EGF-kitosan doku iskeleleri için özgül üreme hızı değerleri, sırasıyla, 0.014, 0.015 ve 0.018 sa^{-1} olarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.5). Elde edilen bulgular EGF'in hücre üremesi üzerinde önemli derecede etkin olduğu yönündedir.

Hücre/materyal etkileşimlerinin ilk basamağında gerçekleşen başlangıç hücre yapışması, daha önce birçok araştırma grubu tarafından da bildirildiği gibi (Yoon et al., 2004), arttırılan hücre-polimer etkileşimlerinin hücre üremesini uyarmada çok önemli bir rol oynadığını göstermektedir. Üç boyutlu gözenekli doku iskelesi üzerinde, dokudaki hücre dışı matris yapısını taklit eden, kümelenmiş hücre yapışma ligandları sadece hücre-polimer etkileşimlerini arttırmayacak, aynı zamanda basit hücre-hücre iletişimi için de uygun bir çevre yaratabilecektir (Yoon et al., 2004). Çalışmada, ATDC5 hücrelerinin kitosan doku iskeleleri üzerindeki üreme davranışları dokuz günlük inkübasyon süresince izlenmiştir ve sonuçlar MTT analizi ile ölçülen optik yoğunluk değerleri olarak verilmiştir (Şekil 4.14). MTT testlerinden elde edilen sonuçlar RGD'nin hücre yapışmasını iyileştirdiğini kanıtlamakla beraber, daha sonra hücre üremesi için de önemli bir biyosinyal molekülü olduğu yönündedir.



Şekil 4.14. ATDC5 hücrelerinin MTT analizi ile elde edilen kitosan, RGD-kitosan ve EGF-kitosan doku iskelelerindeki üreme davranışları [İstatistiksel önem farklılığı, n=3, * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 kitosan kontrol gurubudur, • p<0.05, •• p<0.01, ••• p<0.001 RGD-kitosan kontrol gurubudur].

EGF immobilize edilen kitosan doku iskeleleri kondrojenik hücre yapışmasında kayda değer bir etki göstermemesine rağmen, ATDC5 hücrelerinin EGF-kitosan doku iskelelerindeki üreme eğilimi, kitosan ve RGD-kitosan doku iskelelerindekiyle karşılaştırıldığında üstün bulunmuştur. Şekil 4.14, 3 günlük inkübasyon süresinin ardından ATDC5 hücrelerinin EGF immobilize edilen kitosan doku iskeleleri üzerinde üremeye başladıklarını göstermektedir ($p<0.001$). 5. günün sonunda hücrelerin yüksek üreme eğilimlerine bağlı olarak MTT sonuçlarında ani bir artış gerçekleşmiştir ($p<0.001$). EGF-kitosan doku iskeleleri üzerindeki bu ivmeli hücre üremesi, EGF varlığına bağlı olarak oluşan yüksek mitojenik aktiviteyle açıklanabilir.

Yapışan hücreler EGF reseptörleriyle hiçbir sterik engelleme olmadan, seçimli bir etkileşimde bulunmaktadır ve yüksek mitojenik aktivite devamlıdır. Çünkü EGF immobilizasyonunun, biyosinyal molekülünün hücre içine alınmasını ve hücre reseptörlerinin bozulmasını engellediği düşünülmektedir. EGF, hücre yüzey reseptörlerine bağlanır ve daha sonra hücreyle bütünleşen ve hücre içinde bozulan kompleksler oluşturur. Bozulma sonucunda, büyüme faktörü molekülünün hücre metabolizması üzerindeki uyarıcı etkisi azalır. Yani, EGF gibi biyosinyal molekülleri serbest halde bulunduklarında hücreler tarafından hücre içi ortamda parçalanmakta ve sonuç olarak aktivitelerini kısa sürede yitirmektedirler. Bu fenomen “hücre reseptörlerinin bozulması” (down regulation) olarak bilinir ve moleküllerin serbest halde kullanımından çok, immobilize halde kullanımlarıyla engellenebilmektedir (Ito, 1998a). Ito ve arkadaşları, CHO-ER (EGF reseptörlerini over eksprese eden Chinese Hamster Ovary hücreleri) hücrelerinin mitojenik aktivitesini, immobilize edilen ve doğal EGF molekülünün varlığında araştırmıştır (Ito et al., 1997). Doğal EGF’in, EGF reseptörünü hemen aktive etmesine rağmen, bu aktivasyon geçici olmuştur. Immobilize edilen EGF, EGF reseptörünü daha uzun sürede aktive etmesine rağmen, yüksek mitojenik aktivite gözlemlenmiştir.

Benzer sonuçlar doğal ve immobilize edilmiş insülin için de gözlemlenmiştir (Liu et al., 1992; Chen et al., 1997). Gobin ve West, poli(etilen glikol) (PEG) diakrilattan oluşan, 3 boyutlu ağısı yapıya EGF takmışlar ve fibroblast üremesini incelemişlerdir (Gobin and West, 2003). EGF içermeyen hidrojellerle karşılaştırıldığında, EGF içeren yüzeylerde çok daha fazla sayıda hücrenin ürettiği gözlemlenmiştir.

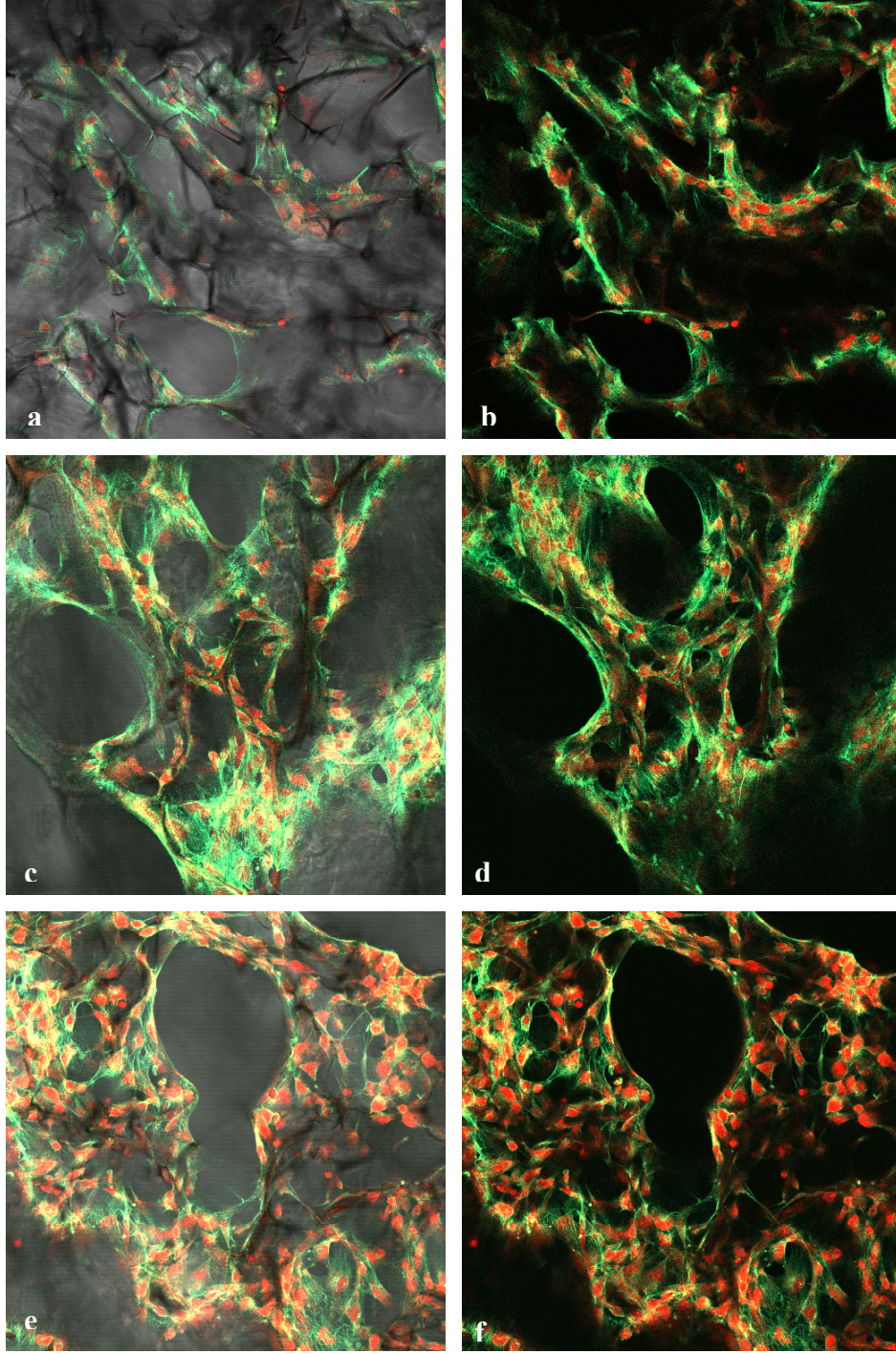
Sunulan çalışmada, yüzey bağımlı hücreler için güçlü bir mitojen olduğu bilinen EGF, kitosan doku iskelelerine immobilize edilmiş ve sonuç olarak kondrojenik üremeyi ve proliferasyonu dikkate değer bir biçimde iyileştirdiği belirlenmiştir.

4.2.2.2. Hücre canlılığı ve hücre iskelet organizasyonu için floresan görüntüleme

Bir doku iskelesi içerisindeki hücrelerin infiltrasyonu ve proliferasyonu doku rejenerasyonunun desteklenmesi ve yönlendirilmesi açısından büyük önem taşımaktadır. Konfokal lazer mikroskobu (CLSM) üç boyutlu yapıların sadece yüzey kısımlarını değil iç bölgelerini de görüntüleyebilmektedir. Dolayısıyla doku iskeleleri içerisindeki hücre dağılımları malzemeden herhangi bir kesit alınmadan belirlenebilmektedir.

Sunulan çalışmada, kitosan, RGD-kitosan ve EGF-kitosan doku iskeleleri üzerinde kültüre edilmiş olan ATDC5 hücrelerinin 7 gün sonundaki CLSM görüntüleri verilmiştir (Şekil 4.15). Şekil 4.15'te sunulan CLSM görüntüleri doku iskelelerinin yüzeyden 250µm derinlikteki kesit alanından elde edilmiştir. Modifiye edilmemiş olan kitosan doku iskelesiyle karşılaştırıldığında (Şekil 4.15-a,b), RGD immobilize edilmiş olan doku iskelesinin gözeneklerinde çok fazla sayıda hücrenin ürediği ve hücrelerin yayıldığı açıkça görülmektedir (Şekil 4.15-c, d). CLSM görüntüleri, üreyen ATDC5 hücrelerinin EGF immobilize edilmiş olan doku iskeleleri içinde oldukça iyi oryante olup, dağıldıklarını göstermektedir (Şekil 4.15-e, f). Bu görüntülere göre, hücrelerin tüm EGF-kitosan doku iskelesi boyunca neredeyse tamamen yayıldıkları belirlenmiştir. Sonuç olarak, ATDC5 hücrelerinin EGF-kitosan doku iskelelerindeki hücre canlılığının ve kondrojenik hücre proliferasyonlarının çok iyi olduğu saptanmıştır.

Elde edilen bulguların MTT analiz sonuçlarıyla uyumlu olduğu saptanmıştır. Bununla beraber, hiçbir doku iskelesinde kondrositlerde olması gereken küresel morfoloji gözlenmemiştir ve hücre fenotiplerinin korunamadığı öngörülmüştür.



Şekil 4.15. Kitosan (a,b), RGD-kitosan (c, d) ve EGF-kitosan (e, f) doku iskelelerinin durgun kültürdeki 7 günlük inkübasyon süresi sonundaki CLSM görüntüleri. CLSM görüntülerinden a, c ve e doku iskelesinin morfolojisini de gösteren arka plan görüntüsünü içermektedir. Yeşil ve kırmızı alanlar ATDC5 hücrelerinin, sırasıyla, F-aktin filamentlerini ve DNA'sını göstermektedir.

4.2.2.3. Biyokimyasal analizlerle kondrojenik aktivite tayini

Hücre-doku iskelesi yapısındaki hücrelerin kondrojenik aktivitelerinin sayısal olarak değerlendirilmesi için, Bölüm 3.3.5'te açıklanan dimetilmetilen mavisi testi ile kitosan doku iskelelerindeki GAG içeriği tespit edilmiştir. Çizelge 4.6'da, *in vitro* oramda ATDC5 hücreleriyle kültüre edilen kitosan, RGD-kitosan ve EGF-kitosan kitosan doku iskelelerinin 14., 21. ve 28. günlerdeki GAG içerikleri sunulmuştur. Sonuçlar, 14. gün sonunda kitosan doku iskelelerindeki GAG içeriğinin, RGD ve EGF immobilize edilen doku iskelelerine nazaran daha düşük olduğunu göstermiştir. Çizelge 4.6'da verilen GAG içerikleri göz önüne alınarak kitosan doku iskelelerinde kıkırdak doku oluşumunun 14. günde başladığı öngörülmüşken, sonuçlar hücre farklılaşmasının RGD ve EGF kullanılarak immobilize edilen doku iskelelerinde daha önce başladığını ifade etmektedir. 4 haftalık inkübasyon süresinin sonrasında, kitosan, RGD-kitosan ve EGF-kitosan doku iskelelerindeki GAG içerikleri, sırasıyla, 7.5 mg GAG/g kuru iskele, 9.7 mg GAG/g kuru iskele ve 10.2 mg GAG/g kuru iskele olarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.6). Freed ve arkadaşları, PGA doku iskelesinin 6 haftalık *in vitro* örnekleri için, GAG içeriğini 10.5 ± 0.01 mg GAG/g kuru iskele olarak rapor etmişlerdir (Freed et al., 1993). Ek olarak, sunulan çalışmada hücre-doku iskelesi yapılarındaki GAG içeriği belirlenirken kitosanın yapısındaki GAG içeriği hesaba katılmamıştır. Dolayısıyla verilen değerler tamamıyla hücrelerin sentezlediği GAG içeriklerini ifade etmektedir.

Kitosan doku iskelelerindeki kültür sonrası ulaşılan hücre sayıları Bölüm 3.3.5'te anlatılan yöntemler ışığında DNA içerikleri analiz edilerek belirlenmiştir. Kitosan, RGD-kitosan ve EGF-kitosan doku iskeleleri üzerinde 4 hafta boyunca *in vitro* koşullarda kültüre edilmiş olan ATDC5 kondrositlerinin sayısının, tek bir doku iskelesi başına, sırasıyla 1.95×10^7 , 2.23×10^7 ve 2.30×10^7 'ye ulaştığı belirlenmiştir (Çizelge 4.6). Çizelge 4.6'dan da anlaşılacağı gibi kültür periyodunun 14., 21. ve 28. günlerinin her üçünde de, en yüksek DNA içeriği EGF immobilize edilmiş olan doku iskelesinde bulunmuştur. Elde edilen bulgular, ATDC5 hücrelerinin EGF-kitosan doku iskelelerindeki üreme aktiviteleriyle bağıntılı olduğuna işaret etmektedir.

Çizelge 4.6. Kitosan, RGD-kitosan ve EGF-kitosan doku iskelelerinin durgun kültürdeki biyokimyasal bileşimleri¹.

	14. gün	21. gün	28. gün
	Kitosan	Kitosan	Kitosan
GAG (µg)	1.29 ± 3.39	15.32 ± 3.39	45.02 ± 3.60
GAG (mg)/(g) kuru ağırlık	0.26 ± 0.68	2.78 ± 0.62	7.50 ± 0.43
DNA µg	2.79 ± 0.23	3.33 ± 0.03	2.54 ± 0.88
Kondrosit sayısı (x10 ⁷)	2.15 ± 0.17	2.57 ± 0.03	1.95 ± 0.68
Hücre sayısı/ kuru ağırlık (x10 ⁹)	4.29 ± 0.35	4.67 ± 0.05	3.25 ± 0.68
	RGD- Kitosan	RGD- Kitosan	RGD- Kitosan
GAG (µg)	14.95 ± 4.95 ^a	23.80 ± 7.04 ^a	58.12 ± 8.61 ^a
GAG (mg)/(g) kuru ağırlık (w/w)	2.99 ± 0.99	4.33 ± 1.28	9.69 ± 1.23
DNA µg	3.81 ± 0.35 ^b	3.53 ± 0.62	2.90 ± 0.18
kondrosit sayısı (x10 ⁷)	2.94 ± 0.26	2.72 ± 0.48	2.23 ± 0.14
Hücre/kuru ağırlık (x10 ⁹)	5.87 ± 0.53	4.95 ± 0.87	3.72 ± 0.14
	EGF- Kitosan	EGF- Kitosan	EGF- Kitosan
GAG (µg)	16.05 ± 8.61 ^a	24.17 ± 0.26 ^a	61.07 ± 7.04 ^a
GAG (mg)/(g) kuru ağırlık (w/w)	3.21 ± 1.72	4.39 ± 0.05	10.18 ± 1.17
DNA µg	4.12 ± 0.37 ^c	3.79 ± 0.20	2.98 ± 0.17
kondrosit sayısı (x10 ⁷)	3.17 ± 0.28	2.92 ± 0.15	2.30 ± 0.13
Hücre sayısı/ kuru ağırlık (x10 ⁹)	6.34 ± 0.57	5.31 ± 0.28	3.83 ± 0.13

^a GAG miktarları için istatistiksel olarak önemli farklılıklar (n=3, p<0.05, kitosan kontrol grubudur).

^b DNA miktarları için istatistiksel olarak önemli farklılıklar (n=3, p<0.01 kitosan kontrol grubudur).

^c DNA miktarları için istatistiksel olarak önemli farklılıklar (n=3, p<0.001, kitosan kontrol grubudur).

¹ Doku iskelelerinin başlangıç kuru ağırlığı ortalama 3 mg'dır.

Sonuç olarak, kıkırdak rejenerasyonu için kullanılması amaçlanan EGF-kitosan doku iskelelerinin hücre üremesi açısından kondrojenik aktivitelerinin oldukça iyi olduğu saptanmıştır. Bununla beraber, EGF-kitosan iskelelerde hücrelerin fenotiplerini koruyamadıkları ve hücrel farklılaşmayı destekleyecek bir büyüme faktörünün kullanılması gerektiği sonucuna varılmıştır.

4.3. BMP-6 Yüklü Kitosan Doku İskelelerinin ATDC5 Kondrojenik Hücre Hattı ile Durgun ve Dinamik Koşullardaki Hücre Kültür Çalışmaları

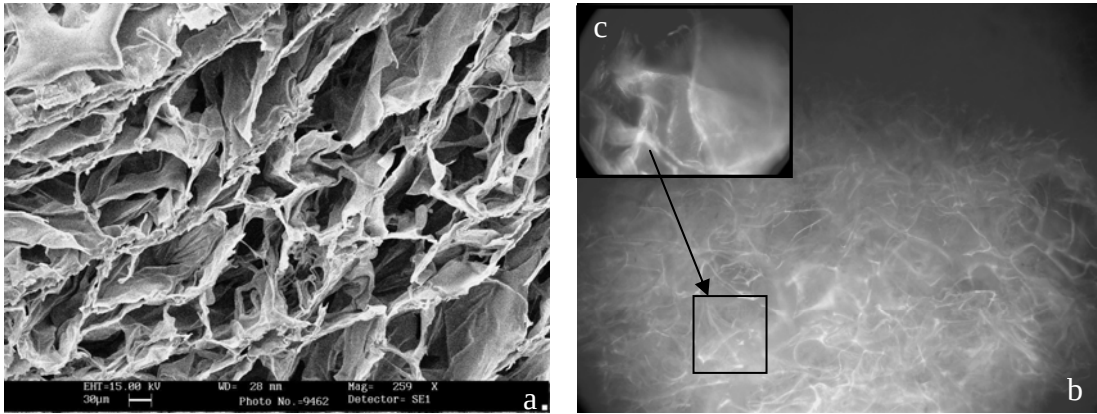
Sunulan çalışmanın daha önceki bölümlerinde, incelenen kitosan doku iskelelerinin kıkırdak doku oluşumu için önerilen malzemeler olduğu ifade edilmiştir. Elde edilen bulgular sonucunda, incelenmesi gereken birkaç durumun gerekliliği saptanmıştır. Birincisi, hazırlanan kitosan doku iskelelerinde kondrojenik hücre fenotipinin korunmasını ve kondrojenik hücre oluşumunu iyileştirilmesini amaçlayan bir mikroçevreyi çeşitli büyüme faktörleriyle geliştirebilmektir. İkincisi ise, kıkırdak doku rejenerasyonunda daha düzenli bir ECM'in oluşturulabilmesi için biyoreaktörlerin kullanılmasıdır. Çalışmada, gözenekli kitosan doku iskelelerinin BMP-6 ile biyomodifikasyonu gerçekleştirilmiş ve ATDC5 hücreleri ile yapılan hücre kültür çalışmalarında elde edilen sonuçlar sunulmuştur. Elde edilen bulgular BMP-6 yüklü doku iskelelerinin durgun ve dinamik koşullarda kondrojenik hücre oluşumundaki etkilerinin karşılaştırılması açısından değerlendirilmiştir.

4.3.1. BMP-6 yüklü kitosan doku iskelelerinin hazırlanması

Literatürde TGF β gibi büyüme faktörlerinin *in vitro* ve *in vivo* ortamlarda kıkırdak doku oluşumunu indüklediği açıkça belirtilmiştir (Hennig et al., 2007). TGF β süper ailesinin bir alt grubu olan BMP-6'nın *in vitro* ve *in vivo* ortamda kondrojenik farklılaşmayı desteklediği pek çok araştırmacı tarafından rapor edilmiştir. Kameda ve arkadaşları kondrositlerin pellet kültürlerinde yaptıkları bir çalışmada, BMP-6'nın kondrojenik hücre oluşumunu desteklediğini bildirmişlerdir (Kameda et al., 2000). Diğer bir çalışmada, insan kökenli mezenkimal kök hücrelerin pellet kültürlerinde kondrojenik farklılaşmanın BMP-6 varlığında geliştirildiği saptanmıştır (Sekiya et al., 2001). Ek olarak daha birçok çalışmada, mezenkimal kök hücrelerin kondrojenik farklılaşmalarını sağlamak için BMP-6'nın gerekliliği savunulmuştur (Hennig et al., 2007; Indrawattana et al., 2004; Estes et al., 2006). Bununla beraber, literatürde henüz BMP-6 ve üç boyutlu doku iskelelerinin kombinasyonu sonucunda kıkırdak doku oluşumunu inceleyen bir çalışma yer almamaktadır. Dolayısıyla sunulan çalışmada, BMP-6 yüklü kitosan doku iskelelerinin geliştirilmesine karar verilmiştir.

Çalışmada, >%85 DD'ne ve %2 bileşime sahip, gözenekli kitosan doku iskelelerine (Şekil 4.16-a). BMP-6 yüklenmiştir. En çok kullanılan ilaç yükleme yöntemleri çözücü emdirme tekniği ve polimerizasyon veya çapraz bağlama sırasında yükleme yöntemleridir (Ramkissoon-Ganorkar et al., 1999). Bu çalışmada, gözenekli kitosan doku iskelelerine BMP-6 yüklemesi Bölüm 3.2.3'te açıklanan emdirme tekniği ile gerçekleştirilmiştir. Literatürde, yaklaşık olarak 2×10^5 hücre sayısı için etkin BMP-6 miktarı 500 ng/ml olarak önerilmiştir (Sekiya et al., 2001; Estes et al., 2006). Bu nedenle yükleme miktarları, her bir doku iskelesi için hücre ekim yoğunluğunun 4×10^4 hücre/ml olması göz önünde bulundurularak, 100 ng/ml olarak ayarlanmıştır.

Hazırlanan kitosan doku iskelelerinde BMP-6 varlığının tespiti ve iskele üzerindeki dağılımlarının incelenmesi amacıyla Bölüm 3.2.3.1'de anlatılan teknik kullanılarak iskeleler floresan mikroskop ile görüntülenmiştir (Şekil 4.16-b,c). Şekil 4.16-b,c'da FITC ile işaretlenmiş BMP-6 yüklü kitosan doku iskelelerinin floresan mikroskop görüntüleri verilmektedir. Şekil 4.16-b,c'da gözlemlendiği gibi BMP-6, kitosan doku iskelesine homojen bir şekilde dağılmıştır.



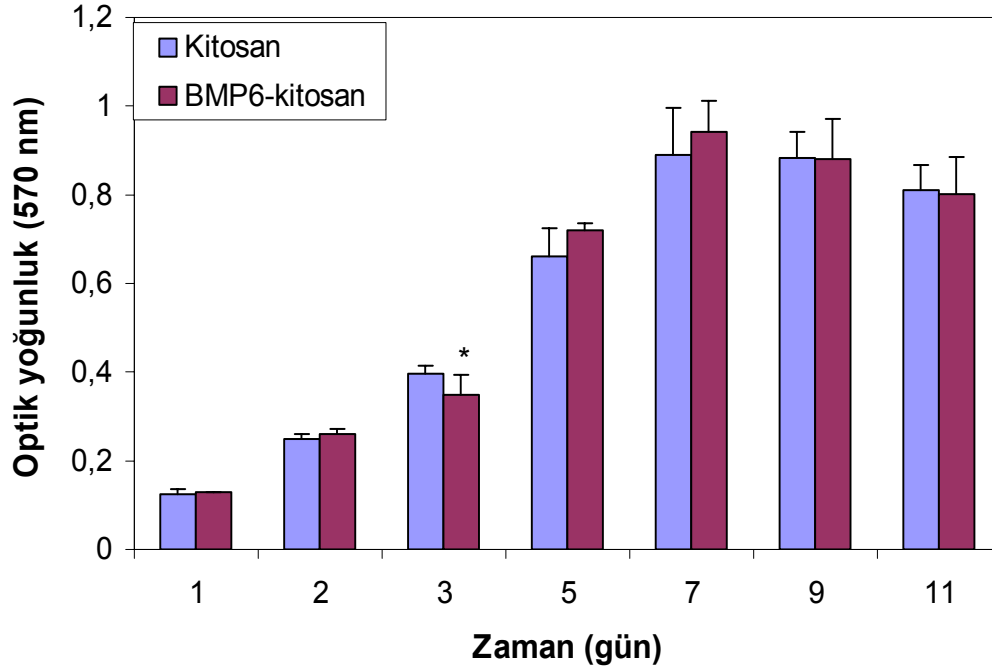
Şekil 4.16. Liyofilize edilmiş kitosan doku iskelesinin kesitine ait SEM görüntüsü (a) (x250), FITC işaretli BMP-6 ile modifiye edilmiş kitosan doku iskelesinin floresan mikroskop görüntüleri (b) (x10), (c) (x40). Işıma yapan alanlar, BMP-6 yüklü alanları göstermektedir.

4.3.2. BMP-6 yüklü kitosan doku iskeleleri ile durgun koşullarda ATDC5 kondrojenik hücre hattı ile yürütülen hücre kültür çalışmaları

Çalışmanın bu bölümünde, kitosan ve BMP-6 yüklü kitosan doku iskeleleri durgun koşullarda ATDC5 hücreleri ile kültüre edilmiştir ve elde edilen sonuçlar aşağıda tartışılmıştır. Grubumuz tarafından yapılan başka bir çalışmada, BMP-6 yüklü kitosan doku iskeleleri MC3T3-E1 preosteoblast hücreleri ile kültüre edilmiş ve BMP-6'nın kemik doku oluşumu için etkinliği araştırılmıştır (Akman et al., 2009a). Akman ve arkadaşları tarafından yapılan bu çalışmada, BMP-6 yüklü doku iskelelerindeki hücrelerin osteoblastik aktivitelerinin, serbest halde kültür ortamına enjekte edilen BMP-6 ile kültüre edilen kitosan iskelelerindeki hücrelerin osteoblastik aktivitelerine göre önemli derece yüksek olduğu saptanmıştır. Dolayısıyla bu çalışmada, temel olarak kitosan ve BMP-6 yüklü doku iskelelerindeki kondrojenik aktiviteler incelenmiş ve kontrol olarak serbest halde BMP-6 kullanılmamıştır.

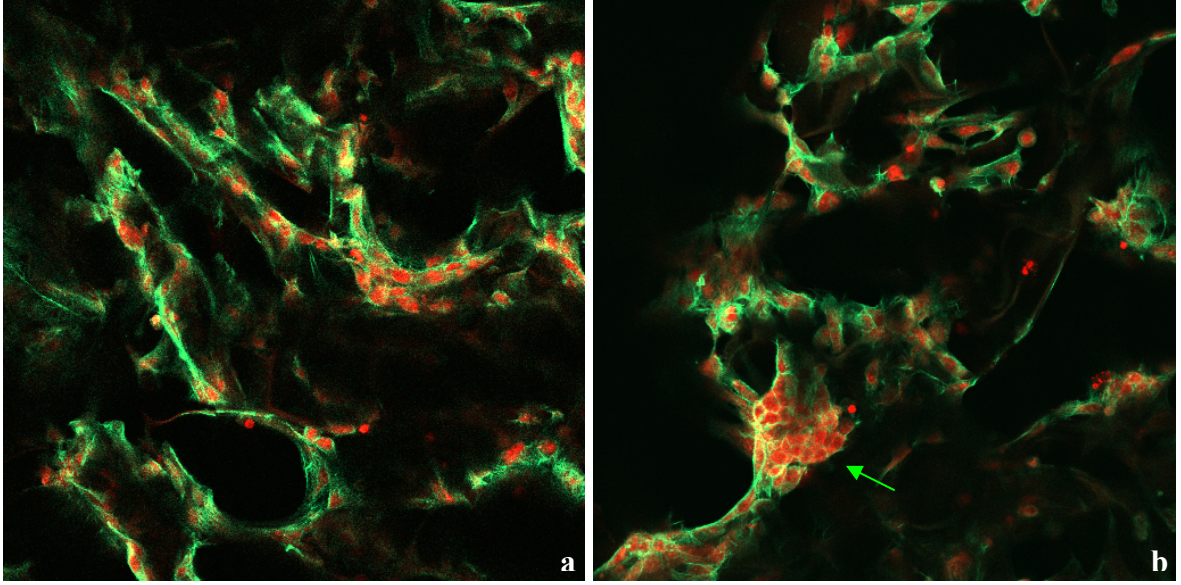
BMP-6 yüklü kitosan doku iskelelerindeki ATDC5 hücrelerinin üreme davranışları 11 günlük inkübasyon süresince izlenmiştir ve sonuçlar MTT analizi ile ölçülen optik yoğunluk değerleri olarak verilmiştir (Şekil 4.17). Şekil 4. 17'den de anlaşılacağı gibi BMP-6 varlığında ATDC5 hücrelerinin kitosan doku iskeleleri üzerindeki mitokondriyal aktiviteleri istatistiksel olarak farklılık yaratmamıştır ($p>0.05$). Dolayısıyla, BMP-6'nın ATDC5 kondrojenik hücreleri üzerinde mitojenik aktivitelerini etkileyecek bir etki göstermediği saptanmıştır. Benzer bir bulgu, daha önce yaptığımız bir çalışmada BMP-6 yüklenmiş kitosan ve ipek fibroin doku iskelelerindeki kondrositler ve kök hücreler için de saptanmıştır (Tıǧlı et al., 2009). Literatürde işaret edilen başka bir çalışmada, BMP-6'nın kültüre edilen sağlıklı ve osteoartirik insan kondrositlerinin proliferasyonlarında herhangi bir etkisinin olmadığı bildirilmiştir (Bobacz et al., 2003).

Kitosan doku iskelelerindeki hücre üremesini sayısal olarak tayin etmek için, özgül üreme hızı (μ) Eşitlik 3.3 kullanılarak hesaplanmıştır. Kitosan ve BMP-6 yüklü kitosan doku iskelelerindeki ATDC5 hücrelerinin özgül üreme hızları tamamen aynı bulunmuştur (0.014 h^{-1}). Sonuçlar kondrojenik hücre büyümesinde BMP-6'nın etken olmadığını göstermiştir.



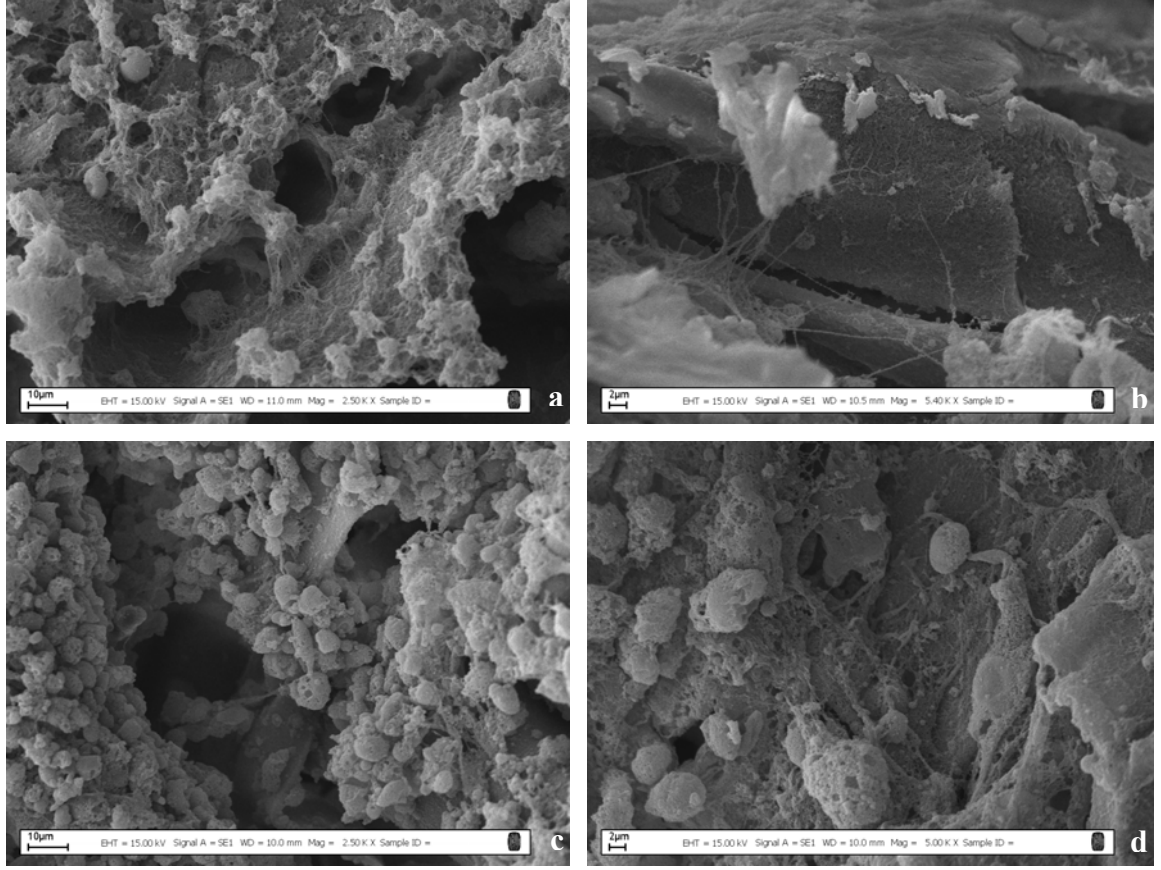
Şekil 4.17. Kitosan ve BMP-6 yüklü kitosan doku iskelelerindeki ATDC5 hücrelerinin mitokondriyal aktiviteleri [İstatistiksel önem farklılığı, n=3, * p<0.05, kitosan kontrol grubudur].

Kitosan ve BMP-6 yüklü kitosan doku iskelelerinde üreyen ATDC5 hücrelerinin iskele içerisindeki proliferasyonlarının takibi amacıyla hücreler Bölüm 3.3.4'te açıklanan immüno Floresan boyama yöntemleriyle işaretlenmiş ve CLSM ile gözlemlenmiştir. Şekil 4.18'de sırasıyla, kitosan ve BMP-6 kitosan doku iskelelerinde 7 günlük inkübasyon sonrası hücrelerin CLSM ile görüntülenen fotoğrafları verilmiştir. Şekil 4.18'de sunulan CLSM görüntüleri doku iskelelerinin yüzeyden 250µm derinlikteki kesit alanından elde edilmiştir. CLSM görüntüleri, MTT analizinden elde edilen sayısal verilerle uyumlu olarak, kitosan ve BMP-6 kitosan doku iskeleleri arasında ATDC5 hücre canlılığı ve kondrojenik hücre üremesi açısından belirgin bir fark olmadığını işaret etmektedir. ATDC5 hücre iskeletsel morfolojileri Alexa Fluor 488 phalloidin kullanılarak hücrelerin F-aktin filamentlerinin boyanması ile gözlemlenmiştir. Şekil 4.18-a'da görüldüğü gibi, ATDC5 hücreleri kitosan doku iskelesi üzerinde tipik farklılaşmamış epitelik morfolojilerini korumuşlardır. Bununla beraber, BMP-6 yüklü kitosan doku iskelesindeki ATDC5 hücre morfolojilerinin, kondrojenik farklılaşmaya bağımlı olarak, küresel şekilli bir morfolojiye dönüşmeye başladığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.18-b).



Şekil 4.18. Durgun koşullarda kültüre edilmiş kitosan (a) ve BMP-6 yüklü kitosan (b) doku iskelelerinin 7 günlük inkübasyon sonundaki CLSM fotoğrafları (x20). Yeşil ve kırmızı alanlar ATDC5 hücrelerinin, sırasıyla, F-aktin filamentlerini ve DNA'sını göstermektedir.

Sunulan çalışmada kitosan ve BMP-6 yüklü kitosan doku iskelelerindeki hücre morfolojileri 4 haftalık kültürasyon sonunda SEM ile gözlemlenmiştir. Elde edilen SEM görüntüleri Şekil 4.19'da sunulmuştur. SEM görüntüleri, BMP-6 varlığının hücre morfolojisini çok güçlü bir şekilde etkilediğini göstermektedir. Şekil 4.19-a ve b'de görüldüğü gibi kitosan doku iskelesindeki hücreler yassılaştırmıştır ve epitelik morfolojiye sahiptir. Diğer taraftan, BMP-6 yüklü kitosan doku iskelesindeki ATDC5 hücrelerinin sıkı bir şekilde dizili ve dairesel kondrositel morfolojiye sahip oldukları gözlemlenmiştir (Şekil 4.19-c ve d). Bu durum BMP-6 yüklü kitosan iskelelerindeki ATDC5 hücrelerinin farklılaşarak kondrojenik fenotiplerini koruduğunu ifade etmektedir. Literatürde daha önceki yapılan çalışmalar, kondrositel fenotipin eksprese edilmesi için (Tip II kollajen ve GAG) kondrositlerin küresel morfolojiye sahip olmaları gerektiğini ve bu küresel morfolojinin kondrosit farklılaşmasının bir işareti olduğunu göstermiştir (Benya and Shaffer, 1982; Risbud et al., 2001). Bununla birlikte, BMP-6 ile modifiye edilmiş doku iskelelerinde, yapay matrise sağlam bir şekilde yapışmış olan hücrelerin bol miktardaki membran vezikül oluşumu ile karakterize edilen (Raimondi et al., 2004) hipertropik dairesel morfolojide oldukları gözlemlenmiştir (Şekil 4.19-d).



Şekil 4.19. Durgun koşullarda kültüre edilmiş kitosan doku iskelelerine ait SEM görüntüleri (a) x2.50 K, (b) x5.00 K; BMP-6 yüklü kitosan doku iskeleleri (c) x2.50 K, (d) x5.00 K.

Hücre-doku iskelesi yapılarındaki kondrojenin kantitatif olarak değerlendirilebilmesi için, kitosan ve BMP-6 yüklü kitosan doku iskelelerindeki GAG ve Kollajen II içerikleri Bölüm 3.3.5'te açıklanan yöntemler çerçevesinde tayin edilmiştir. Belirlenen sonuçlar Çizelge 4.7'de sunulmuştur. Çizelge 4.7, ATDC5 hücreleri ile kültüre edilmiş kitosan ve BMP-6 yüklü kitosan doku iskelelerinin 14., 21., ve 28. günlerdeki biyokimyasal içeriklerini (GAG, Kollajen II, DNA) ifade etmektedir. Sonuçlar, 14 günlük inkübasyon süresinin sonunda BMP-6 yüklü doku iskelelerindeki GAG içeriklerinin, kitosan iskelelere nazaran dikkate değer bir şekilde fazla olduğunu göstermektedir ($p=0.0033$). Dolayısıyla hücre farklılaşmasının BMP-6 yüklü doku iskelelerinde daha erken başladığı düşünülmüştür. 4 haftalık inkübasyon süresinden sonra, kitosan ve BMP-6 yüklü kitosan doku iskeleleri için kondrojen, sırasıyla, doku iskelesi başına 9.87 mg GAG ve 16.97 mg GAG olarak belirlenmiştir. Daha önceden de belirtildiği gibi

Freed ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, PGA doku iskelelerindeki GAG bileşimini 10.5 ± 0.01 mg GAG/g kuru doku iskelesi olarak rapor etmişlerdir (Freed et al., 1993).

Çizelge 4.7. Durgun koşullarda kültüre edilen kitosan ve BMP-6 yüklü kitosan doku iskelelerinin biyokimyasal bileşimleri.

	14. gün	21. gün	28. gün
	Kitosan	Kitosan	Kitosan
GAG (µg)	5.99 ± 1.75	15.87 ± 5.17	35.06 ± 4.43
DNA µg	2.89 ± 0.25	3.60 ± 0.28	3.22 ± 0.09
Kondrosit (10^7)	2.23 ± 0.11	2.78 ± 0.21	2.48 ± 0.07
Kollajen II (ng)	3.15 ± 0.19	4.07 ± 0.37	4.91 ± 0.09
	BMP-6	BMP-6 Kitosan	BMP-6
	Kitosan		Kitosan
GAG (µg)	$19.56 \pm 4.69^{**}$	$26.94 \pm 3.39^*$	$63.66 \pm 3.39^{***}$
DNA µg	2.49 ± 0.42	4.08 ± 0.51	$4.10 \pm 0.71^{\#}$
Kondrosit (10^7)	1.92 ± 0.32	3.14 ± 0.39	3.16 ± 0.59
Kollajen II (ng)	$4.35 \pm 0.09^{ }$	$5.37 \pm 0.19^{ }$	$5.83 \pm 0.09^{ }$

* t-test kullanılarak, GAG miktarları için istatistiksel olarak önemli fark bulunmuştur (n=3, p=0.0281, kitosan kontrol grubudur).

** t-test kullanılarak, GAG miktarları için istatistiksel olarak çok önemli fark bulunmuştur (n=3, p=0.0033, kitosan kontrol grubudur).

*** t-test kullanılarak, GAG miktarları için istatistiksel olarak son derece önemli fark bulunmuştur (n=3, p=0.0006, kitosan kontrol grubudur).

t-test kullanılarak, DNA miktarları için istatistiksel olarak önemli fark bulunmuştur (n=3, p=0.0346, kitosan kontrol grubudur).

|| t-test kullanılarak, Kollajen II miktarları için istatistiksel olarak önemli fark bulunmuştur (n=3, p=0.0055, kitosan kontrol grubudur).

||| t-test kullanılarak, Kollajen II miktarları için istatistiksel olarak önemli fark bulunmuştur (n=3, p=0.0005, kitosan kontrol grubudur).

Çizelge 4.7'den de anlaşılacağı gibi BMP-6 yüklü kitosan doku iskelelerindeki kollajen II içeriklerinin kitosan iskelelerle karşılaştırıldığında önemli derecede yüksek olduğu belirlenmiştir (p=0.0005; ikinci hafta, p=0.0055; üçüncü hafta, p=0.0003; dördüncü hafta). Kitosan doku iskelelerindeki hücre yoğunlukları DNA içerikleri ile sayısal olarak değerlendirilmiştir. BMP-6 ile modifiye edilmiş kitosan doku iskelelerinin hem 14. hem de 21. günlerindeki DNA içeriklerinin kültür süresi

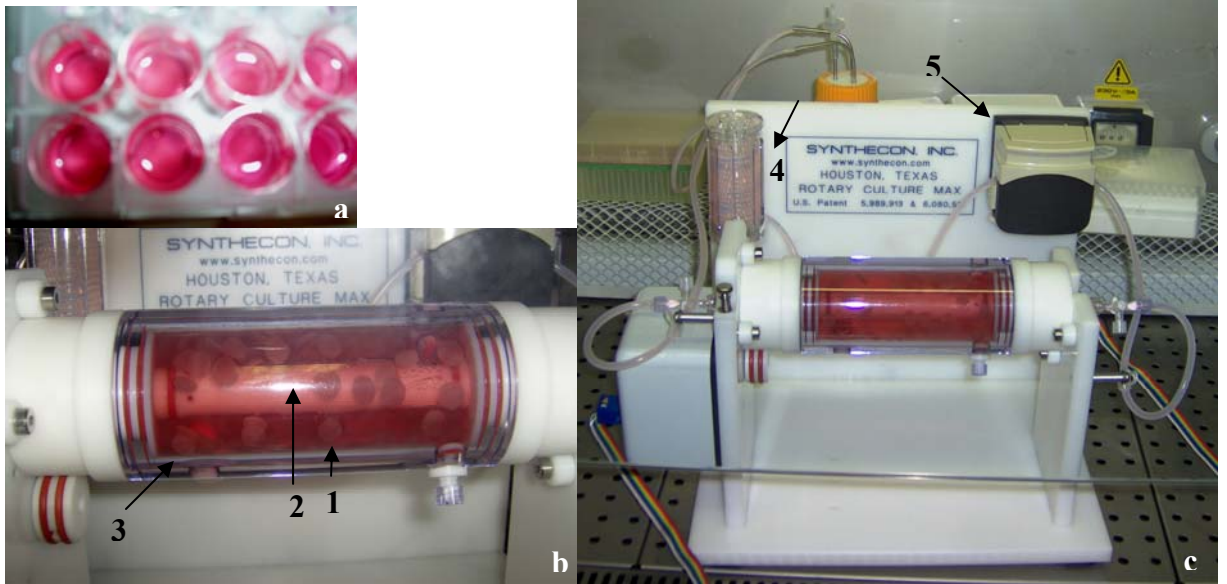
boyunca daha yüksek olduğu bulunmuştur ve 28 gün sonunda DNA içeriklerinin istatistiksel açıdan önemli derecede yüksek olduğu belirlenmiştir ($p=0.0346$). Kitosan ve BMP-6 yüklü kitosan doku iskelelerinde 4 hafta boyunca kültüre edilen ATDC5 kondrositlerinin sayısı, sırasıyla, 2.48×10^7 ve 3.16×10^7 'ye ulaşmıştır (Çizelge 4.7).

Yapılan tüm çalışmalardan elde edilen bulgular ışığında ATDC5 hücreleriyle kitosan doku iskelelerindeki kıkırdak doku oluşumunun “BMP-6” varlığında sağlandığı sonucuna varılmıştır. Sonuç olarak, BMP-6 yüklü kitosan doku iskelelerinde, hücrelerin farklılaşmasından sonra hücre morfolojilerinde gözlemlenen hipertropiye karşın kondrojenik fenotiplerin korunarak kondrogenezin desteklendiği saptanmıştır.

4.3.3. BMP-6 yüklü kitosan doku iskeleleri ile dinamik koşullarda hücre kültür çalışmaları

Hücre kültür ortamının büyüme faktörleriyle desteklenmesi gibi, hücre kültür ortam koşulları da hücrelerin farklılaşma programlarına yeniden girme becerilerini etkileyebilmektedir (Jakob et al., 2001). *In vitro* kondrogenezi iyileştirdiğine inanılan diğer koşullar ise etkin besi transportu ve mekanik uyarıdır. Birçok dokunun *in vitro* oluşumunda, kültür ortamının doku iskelesinin etrafından ve içinden dolaşımının geliştirilmesi için birçok “dinamik” kültür sistemi önerilmiştir (Botchwey et al., 2003; Gooch et al., 2001; Goldstein et al., 2001). Biyoreaktör kültür sistemlerinde fonksiyonel doku matris sentezindeki kütle aktarımlarının iyileştirildiği ve matrisin fiziksel sinyaller ile uyarıldığı bildirilmiştir (Darling and Athanasiou, 2003; Freed and Vunjak-Novakovic, 2000; Mauck et al., 2002; Martin et al., 2004; Vunjak-Novakovic et al., 2005). Perfüzyon sistemleri, durgun üç boyutlu kültürasyonda karşılaşılan difüzyon kısıtlamalarının aşılması için, doku iskelesine oksijen ve besin aktarımının ve doku iskelesinden katabolit uzaklaştırılmasının iyileştirilmesiyle, etkin bir strateji sağlayabilmektedirler. Statik ve karıştırmalı kaplar ile karşılaştırıldığında döner duvarlı biyoreaktörlerde biyokimyasal ve mekanik olarak desteklenmiş çok iyi özellikleri olan kıkırdak doku yapılarının oluşturulduğu bildirilmiştir (Freed et al., 1998; Martin et al., 2000; Vunjak-Novakovic et al., 1999; Vunjak-Novakovic et al., 2002). Döner duvarlı

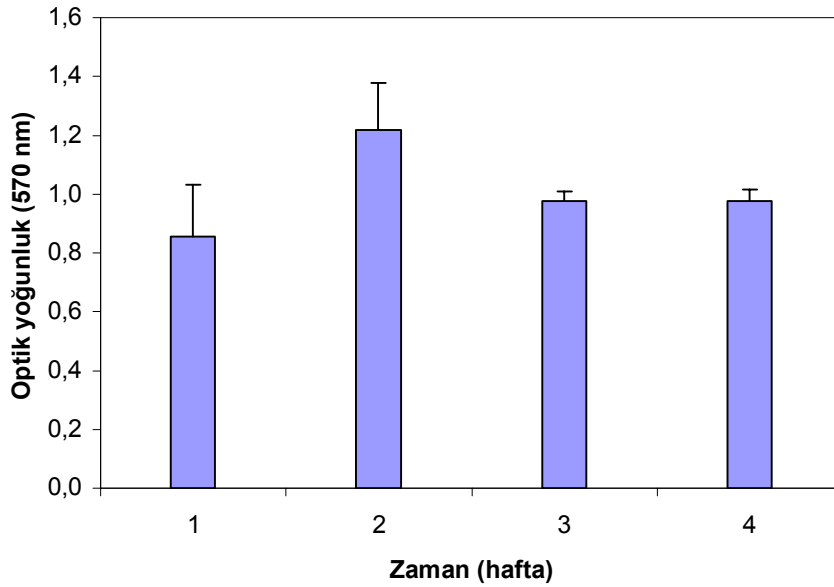
biyoreaktörlerin, kültür ortamında asılı kalan hücelere etkiyen kesme kuvvetlerini ve türbülansı en aza indirdiği (Vunjak-Novakovic et al., 1999; Hammond and Hammond, 2001), bunun yanında konvektif akış ve büyüme faktörlerinin üretilen kıkırdak doku üzerinde sinerjistik etkiler yarattığı belirlenmiştir (Gooch et al., 2001a; Pei et al., 2002). Çalışmanın bu bölümünde, BMP-6 ile modifiye edilmiş olan kitosan doku iskeleleri, sürekli akış perfüzyon sistemi ile desteklenmiş döner duvarlı biyoreaktör (RCMW™) kullanılarak kültür şartlarının etkilerinin incelenmesi için araştırılmıştır ve elde edilen bulgular tartışılmıştır. Şekil 4.20, BMP-6 yüklü kitosan doku iskeleleri ile ATDC5 hücrelerinin perfüzyon modlu döner duvarlı biyoreaktörlerdeki kültürasyonunu göstermektedir.



Şekil 4.20. BMP-6 yüklü kitosan doku iskelelerindeki ATDC5 hücrelerinin sürekli akış perfüzyon sistemi (RCMW™) içinde inkübasyonu: (a) 24 gözlü Petri kaplarında yürütülen 5 günlük durgun kültür. (b, c) Dinamik kültürasyon sistemi; (1) Döner duvarlı biyoreaktörde 4 hafta süresince inkübe edilen BMP-6 yüklü doku iskeleleri, (2) İç silindirin etrafını çeviren silikon membran (3) Döner duvarlı kap, (4) Oksijenatör, (5) Peristaltik pompa.

Biyoreaktördeki hücre kültür çalışmaları 4 hafta boyunca sürdürülmüştür. Hücrelerin metabolik aktiviteleri ve farklılaşma kapasiteleri aşağıda verilen sonuçlar doğrultusunda yorumlanmıştır.

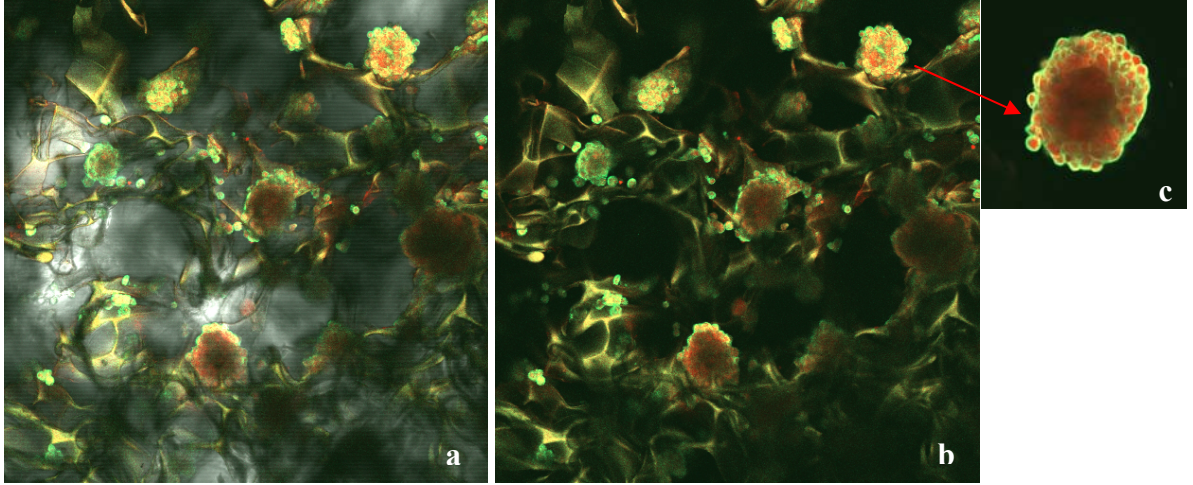
Kitosan doku iskelesindeki ATDC5 hücrelerinin üremeleri inkübasyon süresi boyunca her hafta takip edilmiştir ve sonuçlar MTT analizi ile elde edilen optik yoğunluk değerleri olarak verilmiştir (Şekil 4.21). İnkübasyonun 1. haftasında dinamik hücre kültür şartlarındaki BMP-6 yüklü kitosan doku iskelelerinden elde edilen absorbans değerlerinin, durgun koşullardakilere göre istatistiksel açıdan farklı olmadığı bulunmuştur ($p=0.1656$). Bununla birlikte, ATDC5 hücrelerinin dinamik koşullardaki üreme eğilimlerinin kültürün 2. haftasının sonuna kadar azalmadığını (Şekil 4.21) fakat durgun koşullardaki üreme eğiliminin 1. haftanın sonunda düştüğünü göstermiştir (Şekil 4.17).



Şekil 4.21. Dinamik koşullarda, BMP-6 ile modifiye edilmiş kitosan doku iskeleleri üzerinde ATDC5 hücrelerinin üreme eğilimlerini gösteren MTT sonuçları.

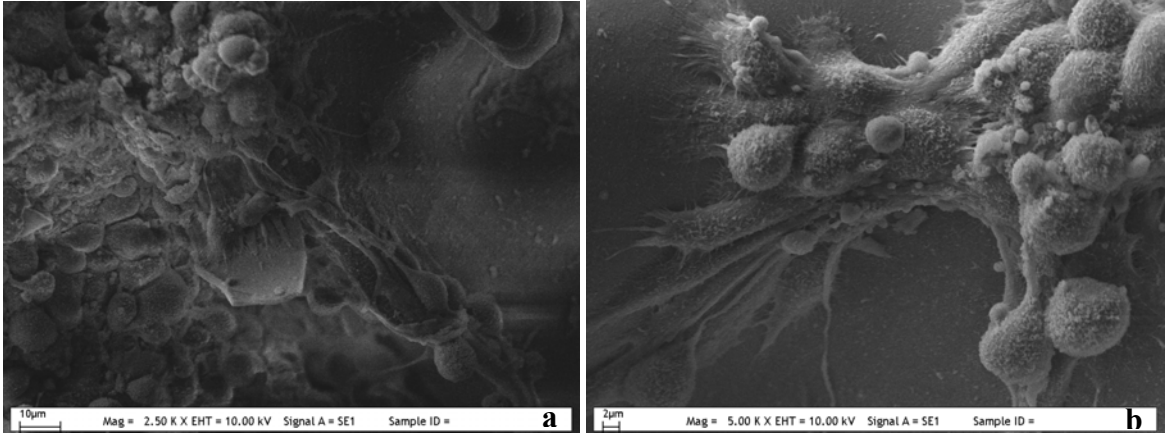
Birçok hücre kültür koşulu ile *in vitro* kondrojeniz geliştirilse de, hücre-matriks etkileşimiyle hücrelerin küresel morfolojilerinin korunmasını sağlamak kondrojeniz açısından diğer bir önemli koşuldur (Bonaventure et al., 1994). Çalışmada döner duvarlı biyoreaktörde hücre iskeletsel organizasyonlarını belirlemek amacı ile 1 haftalık inkübasyon sonrası BMP-6 yüklü kitosan iskelelerdeki ATDC5 hücrelerinin CLSM görüntüleri elde edilmiştir (Şekil 4.22). CLSM görüntüleri, dinamik koşullarda BMP-6 yüklü kitosan doku iskelelerindeki ATDC5 hücrelerinin küresel morfolojiye sahip olduğunu göstermiştir (Şekil 4.22-a,b,c). Gözlemlenen hücrelerin farklılaşmış hücreler olduğu ve 1. hafta sonunda

fenotiplerinin korunduğu saptanmıştır. Ayrıca, kitosan doku iskelelerine yapışan hücrelerin, kümelenmiş hücre gruplarına benzediği saptanmıştır ki bu durum “neo-kıkırdak doku benzeri yapıları” işaret etmektedir (Şekil 4.22-c).



Şekil 4.22. Dinamik koşullarda kültüre edilmiş BMP-6 yüklü kitosan doku iskelelerinin 4 haftalık inkübasyon süresi sonrası CLSM görüntüleri (a, b) (x20) ve (c) (x40). (a) görüntüsünde doku iskelesi morfolojisinin fark edilebildiği arka plan görüntüsü de yer almaktadır. Yeşil ve kırmızı alanlar, sırasıyla, F-aktin filamentlerini ve ATDC5 hücrelerinin DNA'sını göstermektedir.

Hücre morfolojisinin takibi amacıyla Şekil 4.23-a ve b’de verilen SEM görüntüleri doku iskelesine bir kez yapışan ATDC5 hücrelerinin, hiçbir zaman doku iskelesi boyunca üremediğini göstermiştir. Bunun yerine, hücreler yeni büyük doku matris kümeleri içinde, yakın hücre-içi temasları ile organize olmuşlardır. Durgun koşullardakine benzer olarak, hücreler küresel morfolojilerini korumuşlardır. Fakat hücreler dinamik koşullarda, durgun koşullardakine benzemeyen bir şekilde daha pürüzsüz membranlara sahiptir. Bu sonuç hücrelerin hipertropik farklılaşmaya gitmediğinin bir kanıtıdır. Sonuçlar, hücre morfolojilerinin farklı kültür şartlarından çok fazla etkilendiğini ve hücrelerin döner duvarlı biyoreaktörde kültüre edilmesiyle yeni kıkırdak oluşumunun iyileştirildiğini göstermiştir. Değişime uğramış hücreler, hipertropik morfolojiden yoksun bir şekilde kondrojenik fenotiplerini korumuşlardır.



Şekil 4.23. Dinamik koşullarda 4 hafta kültüre edilmiş BMP-6 yüklü kitosan doku iskelelerinin SEM görüntüleri (a) x2.50 K, (b) x5.00 K.

Dinamik şartlarda kültüre edilen BMP-6 yüklü kitosan doku iskelelerinde gerçekleşen kondrojenез, inkübasyon periyodunun her haftasında GAG ve kollajen II içeriğinin ölçülmesiyle sayısal olarak değerlendirilmiştir (Çizelge 4.8). Çizelge 4.8’de görüldüğü üzere, biyoreaktörde 1 haftalık inkübasyon süresinden sonra, BMP-6 yüklü kitosan doku iskelelerindeki gram kuru iskele başına GAG içeriği 4.86 ± 1.34 mg olarak hesaplanmıştır. Durgun koşullarda ise bu değerlere, ancak 2 haftalık inkübasyon süresi sonunda ulaşılabilmiştir (Çizelge 4.7, 3.62 ± 0.87 mg GAG/g kuru doku iskelesi). Elde edilen bulgular, kondrojenезin dinamik koşullarda daha erken başladığını (7. ve 14. günler) işaret etmektedir. Inkübasyon periyodunun 14. gününün sonunda, biyoreaktörde kültüre edilen BMP-6 yüklü kitosan doku iskelelerinin GAG içerikleri, durgun koşullardaki değerlere göre önemli derecede yüksektir ($p=0.0034$). 4 haftalık inkübasyon sonucunda, dinamik şartlarda kültüre edilen BMP-6 yüklü kitosan doku iskelelerinin GAG içeriği ve GAG kuru ağırlık yüzdeleri, sırasıyla, 64.95 ± 2.21 µg and $\%2.17 \pm 0.74$ olarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.8). Chen ve arkadaşları, farklı biyoreaktörlerde dinamik şartlarda 4 hafta boyunca PLGA doku iskelesi üzerinde kültüre edilen *in vitro* örneklerin GAG kuru ağırlık yüzdelerinin $\%3.1$ ile $\%1.4$ arasında değiştiğini bildirmişlerdir (Chen et al., 2004). Benzer olarak dinamik koşullar altında inkübe edilen BMP-6 yüklü doku iskelelerindeki kollajen II içerikleri, durgun koşullarla karşılaştırıldığında 2. ve 3. haftalarda istatistiksel olarak önemli derecede yüksek

farklar elde edilmiştir. Elde edilen bulgular, dinamik koşulların BMP-6 yüklü kitosan iskelelerde erken kondrojenезle sonuçlandığını işaret etmektedir.

Çizelge 4.8. Dinamik koşullarda kültüre edilen BMP-6 yüklü kitosan doku iskelelerinin biyokimyasal bileşimleri.

	7. gün	14. gün	21. gün	28. gün
GAG (µg)	26.02 ± 7.19	33.95 ± 2.21**	33.77 ± 3.50*	64.95 ± 2.21
GAG (kuru ağırlık %)	0.87 ± 2.39	1.13 ± 0.74	1.13 ± 1.17	2.17 ± 0.74
DNA µg	1.56 ± 0.33	3.68 ± 0.93 [#]	4.79 ± 0.58	4.21 ± 0.24
kondrosit (10⁷)	1.20 ± 0.26	2.84 ± 0.71	3.69 ± 0.45	3.25 ± 0.18
Kollajen II (ng)	3.61 ± 0.09	5.00 ± 0.19 ^{II}	5.83 ± 0.09 ^I	6.11 ± 0.19

* t-test kullanılarak, GAG miktarları için istatistiksel olarak önemli fark bulunmuştur (n=3, p=0.0496, durgun koşullarda kültüre edilen BMP-6 kitosan kontrol grubudur).

** t-test kullanılarak, GAG miktarları için istatistiksel olarak çok önemli fark bulunmuştur (n=3, p=0.0034, durgun koşullarda kültüre edilen BMP-6 kitosan kontrol grubudur).

[#] t-test kullanılarak, DNA miktarları için istatistiksel olarak önemli fark bulunmuştur (n=3, p=0.0301, durgun koşullarda kültüre edilen BMP-6 kitosan kontrol grubudur).

^It-test kullanılarak, Kollajen II miktarları için istatistiksel olarak önemli fark bulunmuştur (n=3, p=0.0186, durgun koşullarda kültüre edilen BMP-6 kitosan kontrol grubudur).

^{II}t-test kullanılarak, Kollajen II miktarları için istatistiksel olarak önemli fark bulunmuştur (n=3, p=0.0059, durgun koşullarda kültüre edilen BMP-6 kitosan kontrol grubudur).

Kültürün 7. gününe ait istatistiksel analizi kültürün 7. gününe ait kontrol grup verisi gösterilmediğinden dolayı yapılmamıştır.

Durgun ve dinamik şartlarda kültüre edilmiş olan BMP-6 yüklü kitosan doku iskelelerinin inkübasyon periyodunun 2. haftasındaki DNA içerikleri, sırasıyla, 2.49 ± 0.42 µg ve 3.68 ± 0.93 µg olarak bulunmuştur (Çizelge 4.8). 2 haftalık kültür süresi için, DNA içeriklerinden elde edilen sonuçlar istatistiksel açıdan önemli farkların oluştuğunu ifade etmektedir (p=0.0301). Fakat ilerleyen haftalarda durgun ve dinamik şartlarda kültüre edilen doku iskelelerinin DNA içeriklerinin istatistiksel olarak fark yaratacak şekilde değişken olmadığı sonucuna varılmıştır.

Sonuç olarak, BMP-6 yüklü kitosan doku iskelelerinde ATDC5 hücrelerinin başarılı bir şekilde farklılaşıp, hipertropiye uğramadan küresel morfolojilerini korudukları saptanmıştır. RCMW™ reaktörlerinde gerçekleştirilen dinamik kültürasyon, BMP-6 yüklü kitosan doku iskelelerindeki yüksek GAG ve kollajen II miktarlarına bağımlı

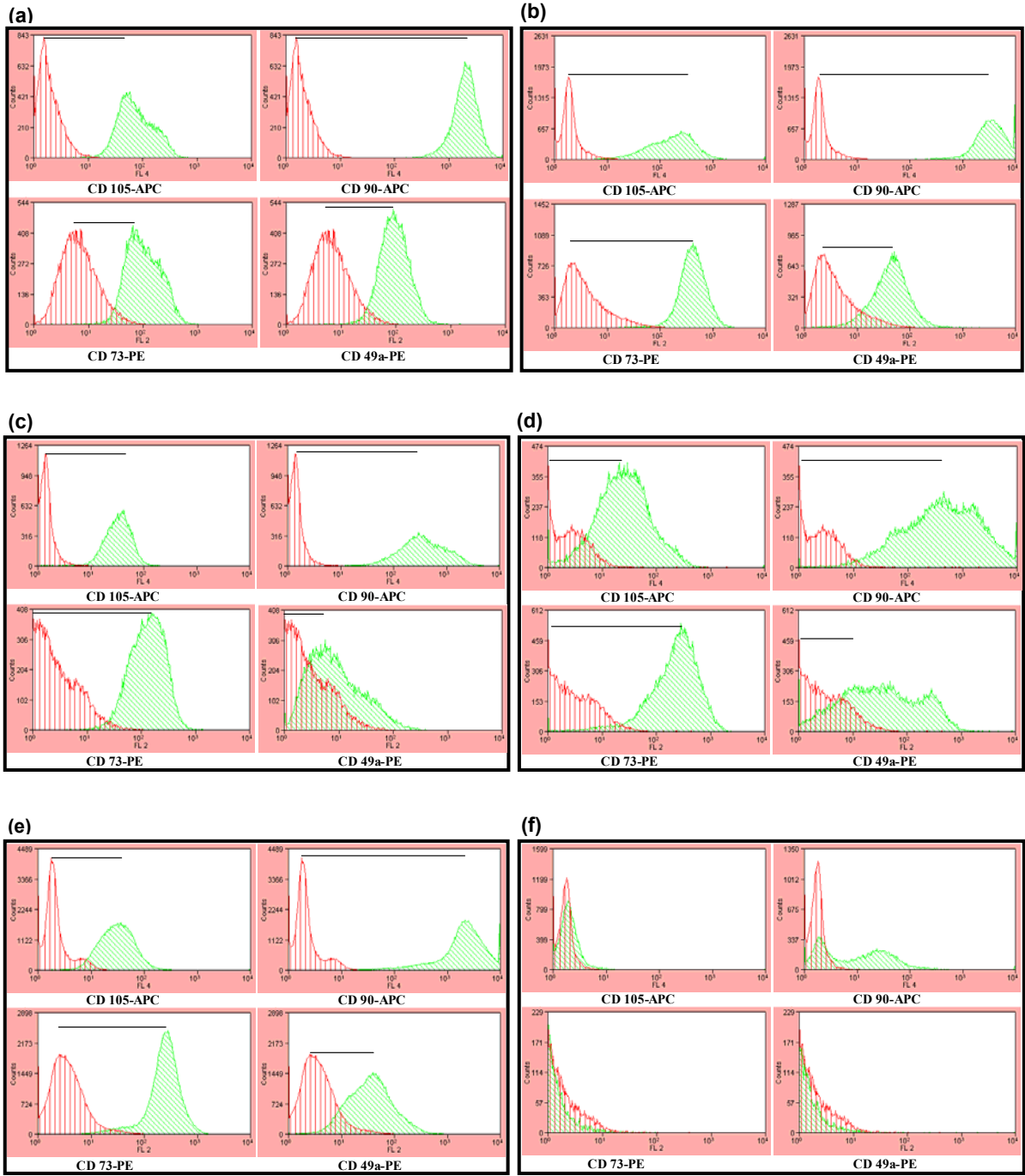
olarak erken kondrojenezi desteklemiştir. Çalışmanın bu bölümünde, biyoreaktörlerle sağlanan mekanik uyarımın etkileri ortaya çıkarılmış ve kırık doku mühendisliğinde BMP-6 ile modifiye edilmiş yeni kitosan doku iskelelerinin *in-vitro* ortamda kullanılabilecekleri öngörülmüştür.

4.4. Kitosan Doku İskelelerinde İnsan Kökenli Hücrelerin Kırık Doku Oluşumuna Etkisi

Kırık doku mühendisliğinde başarılı bir doku oluşumu için gerekli olan üç temel araç; bilinen bir kaynaktan alınmış ve kolay edilebilir olan bir hücre, kondrojenik besi ortamı içeren kontrollü bir kültür ortamı ve hücre yapışmasını, üremesini ve kondrojenezi destekleyen biyobozunur üç boyutlu bir doku iskelesidir. Literatürde şu ana kadar farklı kaynaklardan sağlanan hücrelerle yapılmış pek çok çalışma mevcuttur. Bu çalışmada, kondrositler, kemik iliğinden türetilmiş mezenkimal kök hücreler (BMSCs) ve adipoz dokudan türetilmiş mezenkimal kök hücreler (ASCs) kitosan doku iskelelerinde kültüre edilmiş ve kırık doku mühendisliği için kullanım potansiyelleri araştırılmıştır (Lahiji *et al.* 2000; Sechriest *et al.* 2000; Malafaya *et al.* 2005; Guo *et al.* 2007). Yukarıda açıklanan tüm bu bilgilerin ışığında yanıtlanmamış olan anahtar soru, hücre kaynağı seçiminin doku iskelelerindeki kondrojenik aktiviteyi nasıl etkileyeceğidir. Sunulan çalışmada, farklı hücre kaynaklarıyla (altı çeşit) statik koşullarda kültüre edilen kitosan doku iskelelerinin kondrojeniz üzerindeki etkileri tartışılmıştır. İnsan kökenli primer kondrositler, kemik iliği mezenkimal kök hücreler (BMSCs), adipoz dokudan türetilmiş mezenkimal kök hücreler (ASCs), embriyonik kök hücrelerden türetilmiş mezenkimal kök hücreler (ED1 MSCs ve ED2 MSCs) ve embriyonik kök hücreler (ESCs) kitosan doku iskeleleriyle inkübe edilmiştir. Elde edilen bulgular kırık doku rejenerasyonunda optimum hücre kaynağının tespit edilmesi amacıyla uygun olarak karşılaştırılmıştır.

4.4.1. FACS analizi ile hücrelerin karakterizasyonu

Sunulan çalışmada hücrelerin karakterizasyonu Bölüm 3.4.1’de sunulan yöntem çerçevesinde FACS analizi ile gerçekleştirilmiştir ve sonuçlar Şekil 4.24’te sunulmuştur.



Şekil 4.24. CD105-APC, CD90-APC, CD73-PE ve CD49a-PE yüzey işaretleyicileri ile FACS analizi histogramları. (a) Kondrositler, (b) ASCs, (c) ED1 MSCs, (d) ED2 MSCs, (e) BMSCs, (Ff) ESCs. Kırmızı ve yeşil histogramlar sırasıyla kontrol ve yüzey IgG işaretleyicilerdir. Histogramlarda piklerin üzerindeki barlar yüzey işaretleyicilerin pozitif ekspresyonlarının bir göstergesidir.

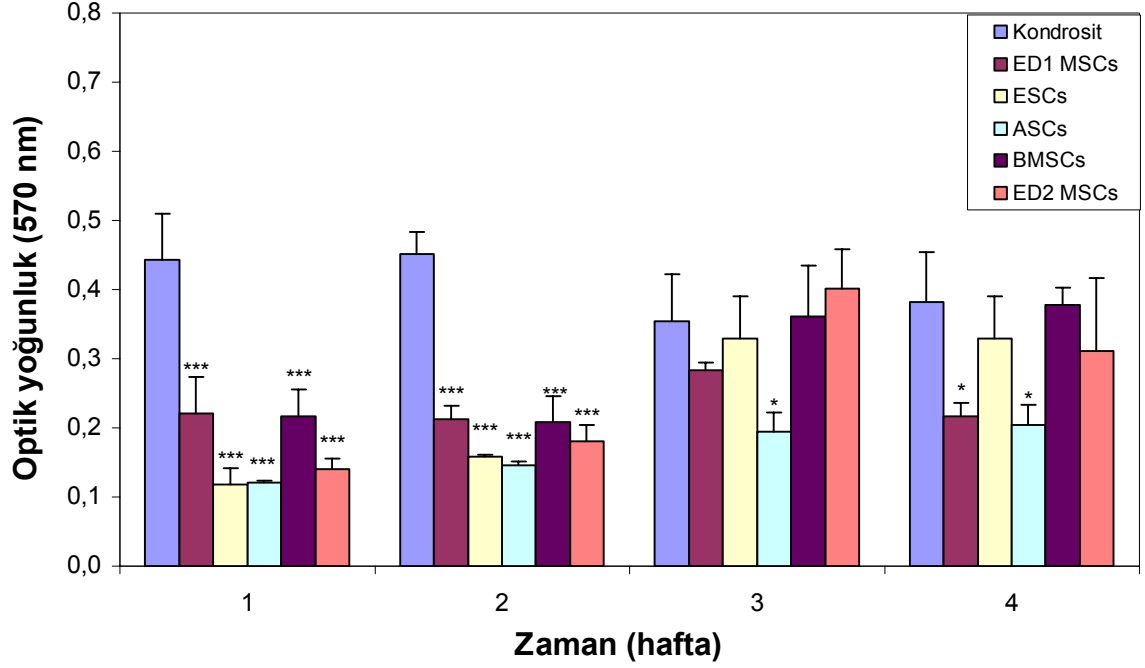
Şekil 4.24'te, çalışılan tüm hücre kaynakları için (kondrositler, ASCs, ED1 MSCs, ED2 MSCs, BMSCs and ESCs) CD105, CD73, CD90 ve CD49a yüzey antijenlerinin ekspresyonları gösterilmektedir. FACS analizi sonuçları ESCs dışında tüm hücre kaynaklarının tüm antijenlerle eksprese olduğuna işaret etmektedir (Şekil 4.24-(a-e)). ESCs ekspresyonlarının ise negatif olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.24-f). ESCs'deki negatif ekspresyon hücrelerin farklılaşmamış olmasından kaynaklanmaktadır. Her bir hücre kaynağı için yüzey işaretleyicilerin verdiği floresan şiddetiyle kontrol IgG'ler arasındaki bağıl farkların değiştiği gözlemlenmiştir. CD105, CD90 ve CD49a, ASCs için en yüksek floresan şiddeti yayarken (Şekil 4.24-b), CD73 için ED2 MSCs en yüksek seviyede floresan şiddete sahiptir (Şekil 4.24-d).

FACS analizi sonuçları yorumlandığında çalışmada kullanılan hücrelerin çoklu potansiyeldeki (multiple potential) mezenkimal kök hücrelerin tanımlanması için gerekli olan minimum kriterleri sağlamakta olduğu saptanmıştır. Minimum kriterler CD73, CD105 ve CD90'nın pozitif ekspresyonlarıyla sınırlandırılmıştır (Dominici et al., 2006). CD49a'nın pozitif ekspresyonları özellikle mezenkimal kök hücrelerde oluşan fibroblast-koloni-oluşma birimlerinin farklılaşma potansiyellerini ifade etmektedir (Deschaseaux *et al.* 2003). Tek tabaka halinde kültüre edilen kondrositlerin de mezenkimal hücrelere benzer olarak farklı hücre hatlarına farklılaşabilecekleri ve dolayısıyla MSCs'in eksprese etmesi gereken minimum antijenlere sahip olması gerekmektedir (Barbero et al., 2003; Tallheden et al., 2003). Çalışmada kullanılan tüm MSCs ve kondrositler için elde edilen bulgular yukarıda açıklanan literatür bilgileriyle uyumludur.

4.4.2. Kitosan doku iskelelerinde hücre metabolik aktivitelerinin incelenmesi

Sunulan çalışmada kullanılan tüm hücrelerin kitosan doku iskeleleri üzerindeki üreme davranışları haftalık yapılan MTT analizi ile tespit edilmiştir. Sonuçlar optik yoğunluk değerleri olarak Şekil 4.25'te sunulmuştur. İlk iki hafta süresince kitosan iskelelerde inkübe edilen kondrositlerin hücre mitojenik aktivitelerinin diğer hücre kaynaklarına göre istatistiksel olarak önemli derecede yüksek olduğu saptanmıştır ($p < 0.001$). Elde edilen sonuçlar, kondrositlerin kök hücreler ile karşılaştırıldığında yüksek proliferasyon kapasitelerine sahip olduklarını ifade etmektedir ve

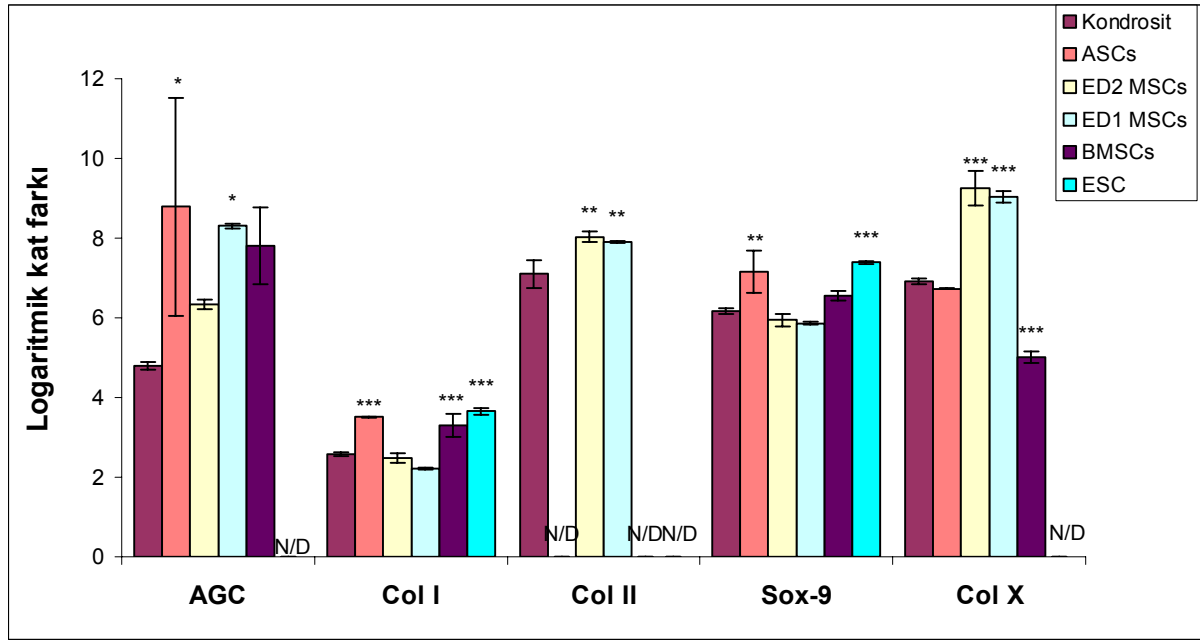
literatürden edinilen bilgilerle uyumludur (Wang et al., 2006). Üçüncü haftanın sonunda diğer hücrelerin metabolik aktivitelerinin arttığı, dördüncü hafta sonunda ise ED1 MSCs ve ASCs ($p>0.05$) dışındaki tüm hücrelerin üreme hızlarının kondrositlere yaklaştığı ve istatistiksel olarak aralarında önemli farkların olmadığı saptanmıştır. ($p<0.05$).



Şekil 4.25. Kitosan doku iskelelerinde üreyen hücrelerin MTT analizi sonucunda elde edilen hücre canlılık ve mitokondriyal aktivite değerleri. Hücre kaynakları arasında istatistiksel olarak önemli farklar bulunmuştur (kondrositler kontrol grubudur), $n=3$, * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$).

4.4.3. Kitosan doku iskelelerinde hücre farklılaşmasının incelenmesi

Sunulan çalışmada, kitosan doku iskelelerinde kültüre edilen tüm hücrelerin farklılaşma kapasitelerinin incelenmesi için Bölüm 3.4.3'te açıklanan RT-PCR analizleri yapılmıştır. PCR analizlerinde spesifik kıkırdak-bağımlı ECM genlerinin (Agregan, Kollajen tip II, Sox-9, Kollajen tip 10) transkripsiyon seviyeleri kantitatif olarak analiz edilmiş ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.26'da sunulmuştur. Ek olarak kıkırdak-bağımlı ECM genlerinden biri olmayan ve kıkırdak dokuda ancak düşük transkripsiyon seviyelerinde eksprese olabilen Col-I geni de kontrol amaçlı kullanılmış ve transkripsiyon seviyeleri Şekil 4.26'da sunulan grafikte verilmiştir.

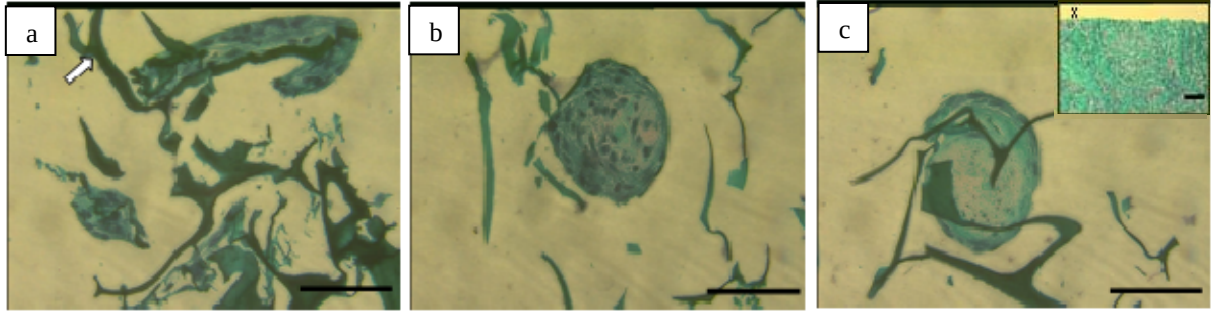


Şekil 4.26. Kitosan doku iskelelerinde PCR analizi ile hücrelerin logaritmik-kat transkripsiyon seviyeleri. AGC(agregan), Col I (Kollajen tip I), Col II (Kollajen tip II), Col X (Kollajen tip 10). Tüm örnekler 4. hafta sonunda analiz edilmiş ve sonuçlar 18S'e göre normalize edilmiştir. Hücre türleri arasında istatistiksel olarak önemli farklar bulunmuştur (kondrositler kontrol grubudur, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). N/D (non-detectable), tespit edilememiş transkripsiyon seviyelerini göstermektedir.

Şekil 4.26'dan da anlaşılacağı gibi, kitosan doku iskelelerinde kültüre edilen ED1 MSCs ve ASCs en yüksek ve önemli farklar yaratan AGC transkripsiyon seviyelerine sahiptir. ED1 MSCs'de ve ED2 MSCs'de Col-II ekspresyonlarının diğer hücre türlerine göre istatistiksel olarak yüksek olduğu saptanmıştır. Aynı zamanda bu hücrelerin Col-I transkripsiyon seviyelerinin düşük olduğu belirlenmiştir. Hücrelerde AGC, Col II ve Sox-9 genlerinin eksprese olması ve yüksek transkripsiyon seviyeleri, hücrelerin yüksek farklılaşma kapasitelerine sahip olduklarının bir kanıtıdır. Bununla beraber düşük Col I transkripsiyon seviyeleri kıkırdak doku için hücre farklılaşmasının başarısını işaret etmektedir. Sonuç olarak kitosan doku iskelelerinde kültüre edilen hücrelerde ED1 MSCs'nin yüksek AGC

ve Col II ve düşük Col-I transkripsiyon seviyeleri ile kondrojenik fenotipe benzerlik gösterdiği ve farklılaşma potansiyellerinin yüksek olduğu saptanmıştır.

Sunulan çalışmada, kitosan iskelelerde Bölüm 3.4.4'te açıklanan yöntem dahilinde yapılan histolojik incelemeler sonucunda ED1 MSCs'de ve ED2 MSCs'de proteoglikanların Safranin-O ile zayıf fakat pozitif olarak boyandıkları gözlemlenmiştir. Kondrositlerde ise minimal boyanma ile proteoglikan varlığı tespit edilmiştir. Diğer hücre türlerinde de benzer görüntüler elde edilmiştir. Kitosan doku iskelelerinde gözenekler içerisinde gözlemlenen yapıların kümelenmiş ECM yapıları oldukları belirlenmiştir. Yapılan histolojik analizler sonrasında kitosan iskeleler üzerinde üreyen hücrelerin optik mikroskop altında çekilen görüntüleri Şekil 4.27'de sunulmuştur.

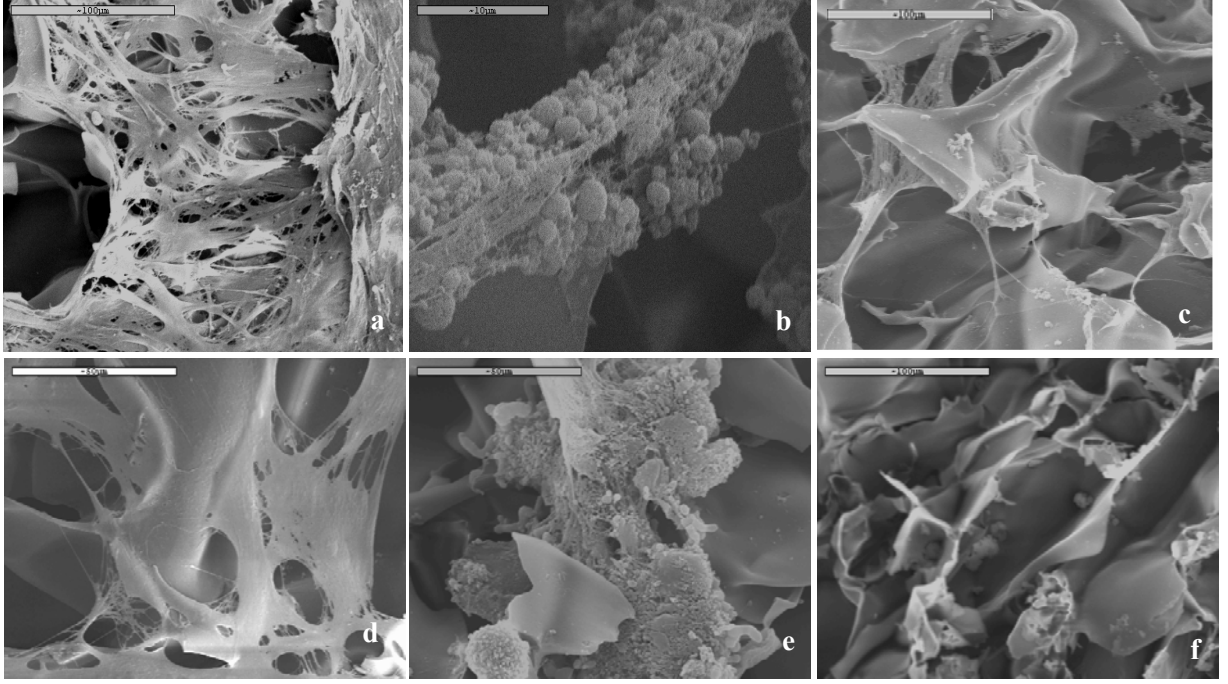


Şekil 4.27. Kitosan doku iskelelerinde kültüre edilen hücrelerin histolojik kesit görüntüleri; (a) kondrosit (x32), (b) ED1 MSCs (x32), (c) ED2 MSCs (x32) (X) Safranin-O ile boyanmış doğal kıkırdak dokunun histolojik kesit görüntüsü kontrol olarak kullanılmıştır (bar 200 µm, x10). Skala barları 100 µm'dir. Belirtilen beyaz ok iskele kenarlarını işaret etmektedir.

Yapılan histolojik gözlemlerin sonucunda iskelelerdeki zayıf ve homojen olmayan boyanma ile kondrojenезin tamamlanmamış olduğu kanısına varılmıştır. Bu bulgunun, çalışma periyodunun 4 haftalık kısa bir zaman dilimi içerisinde yapılmış olmasına bağlanabileceği öngörülmüştür. Freed ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada, PGA iskeleleri döner duvarlı biyoreaktörler içerisinde inkübe etmişler ve 40 gün sonra kıkırdak doku yapısına ulaşabildiklerini bildirerek ve kondrojenезin zaman bağımlı bir proses olduğunu ifade etmişlerdir (Freed et al., 1998). Sunulan çalışmada amaç, farklı kaynaklardan elde edilen hücre türlerinin

karşılaştırmalı kondrojenik potansiyellerinin incelenmesine yönelik olduğu için 4 haftalık sürede elde edilen veriler yeterli olmaktadır.

Hücrelerin kitosan doku iskeleleri üzerinde 4. hafta sonundaki morfolojileri SEM ile takip edilmiştir ve elde edilen görüntüler Şekil 4.28’de sunulmuştur.



Şekil 4.28. Kitosan doku iskelelerinde 4 hafta boyunca kültüre edilen (a) kondrositler, (b) ED1 MSCs, (c) ED2 MSCs, (d) ASCs, (e) BMSCs, (f) ESc'in SEM görüntüleri.

Daha önce yapılan çalışmalarda, üç boyutlu kültürlerde mezenkimal kök hücrelerinde (Williams *et al.* 2003) ve kondrositlerde (Benya and Shaffer, 1982) küresel morfolojiler gözlemlenmiş ve bu morfoloji kıkırdak dokuyu temsil eden ECM bileşiklerinin hücreler tarafından salgılanması ile ilişkilendirilmiştir (von der Mark *et al.* 1977). Sunulan çalışmada Şekil 4.28'den de görüldüğü gibi sadece ED1 MSCs'de küresel morfoloji gözlemlenmiştir ve farklılaşma sonrasında kondrojenik fenotiplerini korudukları saptanmıştır. Sonuç olarak ED1 MSCs'nin küresel morfolojilerinin korunmasından dolayı, kitosan doku iskelelerinin bu hücrelere istenilen bir mikroçevre yarattıkları sonucuna varılmıştır.

Yapılan çalışmada, elde edilen sonuçları yorumlarken dikkat edilmesi gereken bir diğer konu, kullanılan hücre kaynaklarının izole edildiği donörlerin yaş, cinsiyet

farklılıkları ve hücrelerin izolasyon protokollerindeki farklılıklardır. Kondrositler 42 yaşındaki erkek bir donörden izole edilmiş ve hücreler 2. ve 4. pasajlarından sonra kullanılmıştır. ASCs (2. pasaj) ve BMSCs (3. pasaj) sırasıyla, 30 ve 25 yaşlarındaki erkek donörlerden izole edilmiştir. hESCs (normal dişi karyotip), ED1 MSCs ve ED2 MSCs'in pasaj sayıları, sırasıyla, 29, 6 ve 4'tür. ED1 MSCs'de farklılaşma protokolü iki boyutlu sistemlerde yürütülürken, ED2 MSC'de ise farklılaşma protokolü embriyoid cisimler üzerinden yürütülmektedir. Çalışmada sunulan sonuçlar kondrojeniz çerçevesinde hücre kaynaklarının karşılaştırılması olduğundan dolayı, hücre seçimi yapılırken yukarıda anlatılan değişkenlerin göz önünde bulundurulması gerektiği düşünülmektedir. Bununla beraber, çalışmada edinilen tüm bulguların ışığında kitosan doku iskelelerinde kıkırdak doku oluşumu için ED1 MSCs'in potansiyel hücre kaynağı olduğu ve kıkırdak doku mühendisliği uygulamalarında gelecek vaat ettiği sonucuna varılmıştır.

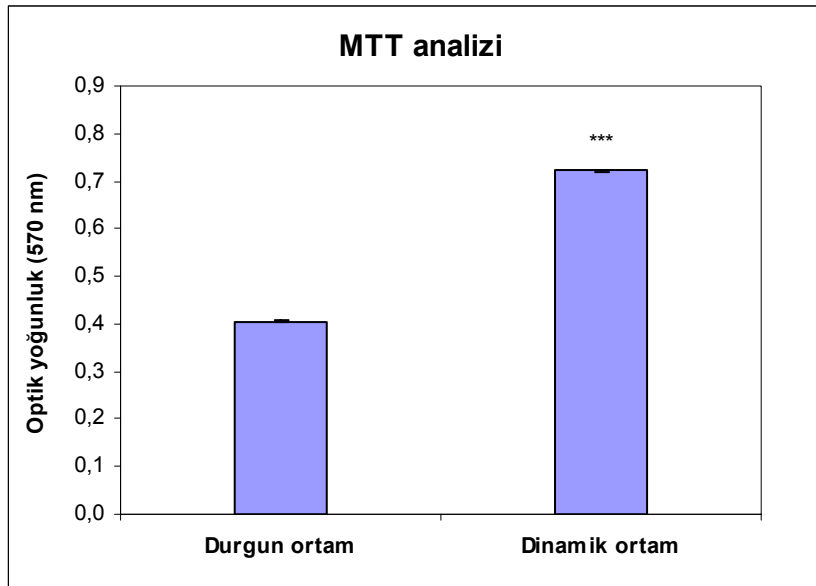
4.5. Kıkırdak Doku Oluşumunda Perfüzyon Biyoreaktörlerin Etkisi

Daha önceki bölümlerde de tartışıldığı gibi kültür sistemlerinde biyoreaktörlerin kütle aktarımlarını iyileştirdiği, matrisin fiziksel sinyaller ile uyarıldığı ve dolayısıyla sentezlenen matrisin kalitesinin geliştirildiği bildirilmiştir (Freed et al., 1998; Martin et al., 2004; Vunjak-Novakovic et al., 1999). Pek çok çalışmada, biyoreaktörlerin oluşturduğu mekanik baskılama, karıştırma ve hidrostatik basınç gibi fiziksel kuvvetlerin *in vitro* kondrosit kültürlerinde ve kıkırdak eksplantlarda matris metabolizmasını düzenlediği bildirilmiştir (Parkkinen et al., 1993; Carver and Heath, 1999; Ragan et al., 1999). Tüm bu kuvvetlerin yanı sıra, hidrodinamik kuvvetler sonucu oluşan akışla beraber matristeki GAG ve kollajen içeriklerini arttırıldığı (Vunjak-Novakovic et al., 1996; Ragan et al., 1999; Dunkelman et al., 1995), GAG ve DNA içeriklerinin arttırıldığı (Smith et al., 1995, Davisson et al., 2002; Pazzano et al., 2000) ve oluşan hücre-matris yapısının mekanik özelliklerinin geliştirildiği (Vunjak-Novakovic et al., 1999) bildirilmiştir. Dolayısıyla perfüzyon sistemleri, durgun üç boyutlu kültürasyonda karşılaşılan difüzyon kısıtlamalarının aşılması için, doku iskelesine oksijen ve besin aktarımının ve doku iskelesinden katabolit uzaklaştırılmasının iyileştirilmesiyle, etkin bir strateji sağlayabilmektedirler. Bununla beraber, literatürde perfüzyon biyoreaktörlerde kıkırdak doku rejenerasyonu için yapılan çalışmalar sayılıdır (Dunkelman et al.,

1995; Davisson et al., 2002; Pazzano et al., 2000; Sittinger et al., 1994; Mizuno et al., 2001; Bujia et al., 1995; Glowacki et al., 1998; Nagel-Heyer et al., 2005). Sunulan çalışmanın bu bölümünde, Bölüm 4.4'te kıkırdak doku oluşumu için ümit vaat ettiği belirlenen insan embriyonik kök hücrelerinden türetilmiş mezenkimal kök hücrelerin (ED1 MSCs) kitosan doku iskelelerinde dinamik koşullar altındaki (perfüzyon biyoreaktörler) performansları incelenmiştir ve elde edilen sonuçlar tartışılmıştır.

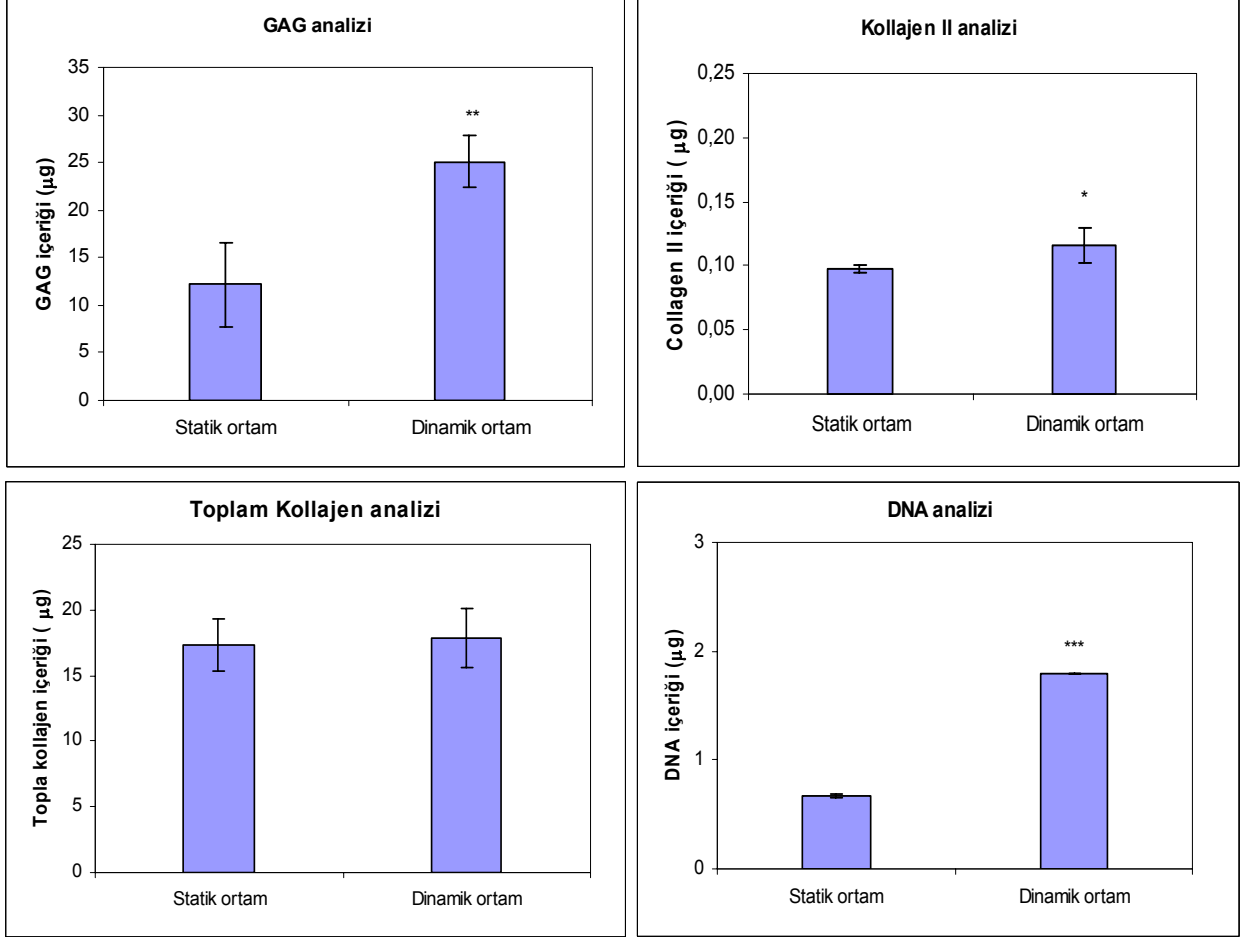
4.5.1. Biyokimyasal ve fonksiyonel karakterizasyon

Sunulan çalışmanın bu bölümünde, kitosan doku iskelelerinde kültüre edilen ED1 MSCs'in metabolik ve biyokimyasal analizleri ile mekanik dayanım testlerinden elde edilen sonuçlar sunulmuştur. Kitosan doku iskelelerinde kültüre edilen hücrelerin 4. hafta sonundaki metabolik aktiviteleri MTT analizi ile tayin edilmiş ve sonuçlar optik yoğunluk değerleri ile ifade edilmiştir. Şekil 4.29'da durgun ve dinamik koşullarda kültüre edilen hücrelerin MTT analiz sonuçları sunulmaktadır. Şekil 4.29'dan da anlaşılacağı gibi, perfüzyon biyoreaktörlerde inkübe edilen hücrelerin kitosan iskelerdeki metabolik aktiviteleri, durgun ortamdakilere göre istatistiksel olarak önemli derecede büyüktür ($p < 0.001$). Elde edilen bu bulgu, perfüzyon biyoreaktörlerin hücre üremesi üzerindeki etkisine işaret etmektedir.



Şekil 4.29. Kitosan doku iskelelerinde statik ve dinamik koşullarda kültüre edilen ED1 MSCs'in 4. hafta sonundaki metabolik aktiviteleri. [İstatistiksel önem farklılığı, $n=3$, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$, durgun ortam kontrol grubudur].

Kitosan doku iskelesi-hücre yapılarındaki en yüksek ECM içeriği, 4. hafta sonunda ve Bölüm 3.5.2’de açıklanan yöntemler dahilinde yapılan biyokimyasal testler sonucunda belirlenmiştir. Biyokimyasal testler sonucunda hesaplanan kitosan doku iskelesi başına GAG, DNA, Kollajen II ve toplam kollajen içerikleri Şekil 4.30’da sunulmuştur.



Şekil 4.30. Dördüncü hafta sonunda dinamik ve statik koşullarda inkübe edilen kitosan doku iskelelerinin biyokimyasal bileşimleri. [İstatistiksel önem farklılığı, n=3, * p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001, statik ortam kontrol grubudur].

Şekil 4.30’dan da anlaşılacağı gibi, perfüzyon biyoreaktörlerde kültüre edilen kitosan doku iskelelerindeki hücrelerin sentezlediği GAG miktarı, statik koşullarla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli derecede yüksektir (p<0.01). Daha önce perfüzyon biyoreaktörle yapılan çalışmalarda elde ettiğimiz bulgulara benzer olarak kondrositlerin yüksek oranda GAG sentezledikleri bildirilmiştir (Daivsson et al., 2002; Pazzano et al., 2000). Kollajen II, kırık dokuda diğer bir önemli ECM içeriği olarak bilinmektedir. Çalışmada, dinamik ortamlarda kültüre edilen kitosan

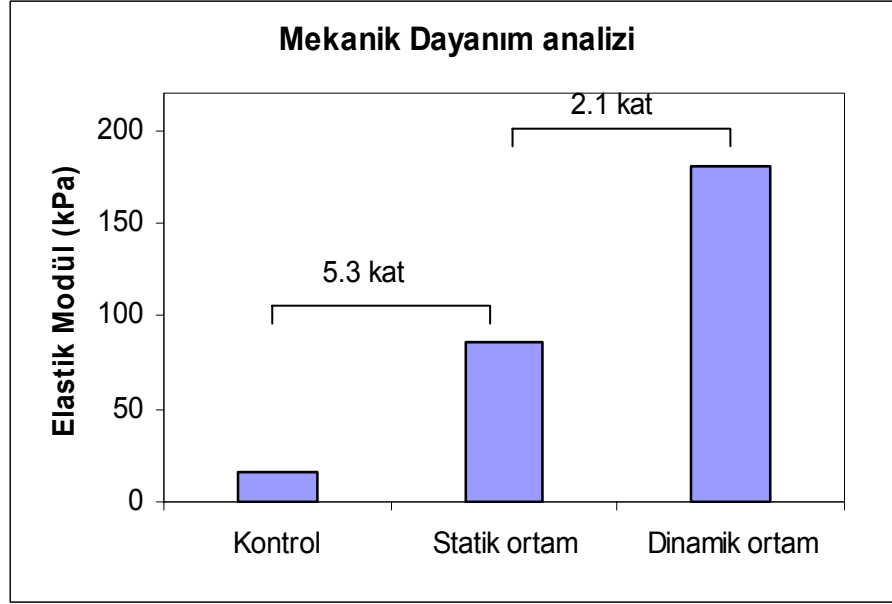
doku iskelelerinde daha yüksek kollajen II ve toplam kollajen miktarları saptanmıştır (Şekil 4.30). Perfüzyon biyoreaktörlerde kültüre edilen kitosan iskelelerdeki Kollajen II miktarı, statik koşullarda kültüre edilen iskelelerle karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli derecede yüksektir ($p<0.05$). Benzer olarak, çalışmada dinamik koşullarda kültüre edilen hücre-iskele yapılarındaki DNA miktarlarının, statik kültür ile karşılaştırıldığında önemli derecede yüksek olduğu belirlenmiştir ($p<0.001$).

Elde edilen tüm bu bulguların sonucunda, perfüzyon biyoreaktörlerin kondrojeniz üzerindeki etkileri açıktır. Kitosan doku iskelelerinde kültüre edilen ED1 MSCs'in perfüzyon biyoreaktörlerle kondrojenik aktivitelerinin arttığı ve kıkırdak doku oluşumunun geliştirildiği saptanmıştır. Sonuçlar, perfüzyon biyoreaktörün sağladığı hidrodinamik kuvvetlerden dolayı kütle aktarımının geliştirilmiş olmasıyla ilişkilendirilebilir. Sonuçlar literatürde bildirilen çalışmalar ile uyumludur (Davisson et al., 2002, Pazzano et al., 2000, Nagel-Heyer et al., 2005).

Sunulan çalışmada, hücre-kitosan doku iskelesi yapılarının mekanik özelliklerini tespit etmek için Bölüm 3.5.4'te açıklanan yöntem ile malzemenin elastik modülleri hesaplanmıştır. Sonuçlar Şekil 4.31'de sunulmuştur. Kontrol olarak 4 hafta boyunca hücre ile kültüre edilmemiş kitosan doku iskeleleri kullanılmıştır. Şekil 4.31'den de anlaşılacağı gibi statik ortamda kültüre edilen hücrelerin oluşturduğu ECM'den dolayı yapının elastik modülü 5.3 kat artmıştır. Perfüzyon biyoreaktörlerde kültüre edilen hücre-iskele yapılarının elastik modüllerinin ise statik ortamda kültüre edilen hücre-iskele yapılarıyla karşılaştırıldığında 2.1 kat yüksek olduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak perfüzyon biyoreaktörünün ulaşılan yapıyı mekanik açıdan kuvvetlendirdiği saptanmıştır.

Çalışmada incelenen kitosan iskelelerdeki kollajen II miktarı, sadece kondrojen için yorumlanması beklenen bir değer olmayıp, aynı zamanda hücre-iskele yapısının mekanik karakteristiklerini dolaylı olarak işaret etmektedir. Dolayısıyla elde edilen verilerin mekanik analiz sonuçlarıyla uyumlu olduğu söylenebilir. Freed ve arkadaşları, doku kültürü biyoreaktörlerindeki hidrodinamik koşulların oluşan kıkırdak dokudaki bileşimi, morfolojiyi ve mekanik özellikleri değiştirebileceğini öngörmüşlerdir. Çalışmalarında sonuç olarak, döner duvarlı biyoreaktörlerde

kültüre edilen yapıların statik kültürlerle karşılaştırıldığında, GAG ve kollajen içeriklerinin yüksek olduğu ve mekanik özelliklerinin geliştirildiği bildirilmiştir (Vunjak-Novakovic et al., 1999).

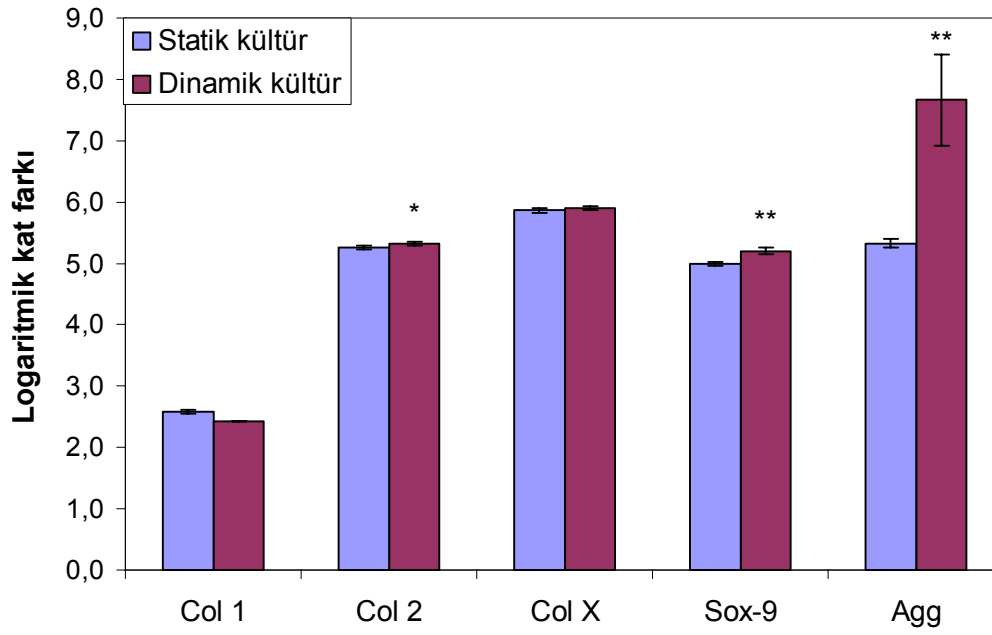


Şekil 4.31. Dinamik ve statik koşullarda inkübe edilen kitosan doku iskelelerinin 4. hafta sonundaki mekanik dayanım özellikleri. Kontrol grubu hüresiz kitosan doku iskelesini ifade etmektedir.

4.5.2. Kitosan doku iskelelerinde kültüre edilen hücrelerin farklılaşma potansiyelleri

Sunulan çalışmanın bu bölümünde, kitosan doku iskelelerinde inkübe edilen ED1 MSCs'in farklılaşma potansiyelleri, PCR analizi ile eksprese edilen kırıkdağı bağımlı ECM genlerinin (Agg, Col 2, Sox-9, Col X) transkripsiyon seviyelerinin belirlenmesi ile incelenmiştir. Ek olarak Col 1 transkripsiyon seviyesi belirlenerek kırıkdağı doku farklılaşması kontrol edilmiştir. Eksprese olan genlerin transkripsiyon seviyeleri Şekil 4.32'de sunulmuştur. Sonuçlar, kırıkdağı-bağımlı genlerin her iki kültür koşulunda eksprese edilmesinden dolayı ED1 MSCs'in farklılaştığını göstermektedir. Kırıkdağı doku için eksprese olabilen kollajen I geninin düşük seviyelerde transkripsiyonu, hücre farklılaşmasının başarısını işaret etmektedir. Perfüzyon biyoreaktörlerde kültüre edilen ED1 MSCs'de tüm kırıkdağı-bağımlı

genlerin transkripsiyon seviyeleri yüksek bulunmuştur. Şekil 4.32'den açıkça görüleceği gibi, dinamik koşullarda kültüre edilen AGC ve Sox-9 ($p<0.01$) ve Col 2 ($p<0.05$) transkripsiyon seviyeleri, statik koşullara göre istatistiksel olarak önemli farklar yaratmıştır. Elde edilen PCR analiz sonuçlarının, biyokimyasal analiz sonuçlarıyla uyumlu olduğu saptanmıştır. Sonuç olarak, perfüzyon biyoreaktörlerde sağlanan dinamik koşulların, kitosan doku iskelelerinde kültüre edilen ED1 MSCs'in farklılaşma potansiyellerini geliştirdiği saptanmıştır.



Şekil 4.32. Statik ve dinamik koşullarda kültüre edilen kitosan doku iskelelerde PCR analizi ile hücrelerin logaritmik-kat transkripsiyon seviyeleri. AGC(agregan), Col I (Kollajen tip I), Col II (Kollajen tip II), Col X (Kollajen tip 10). Tüm örnekler 4. hafta sonunda analiz edilmiş ve sonuçlar 18S'e göre normalize edilmiştir. Hücre kaynakları arasındaki istatistiksel olarak önemli farklar bulunmuştur (statik kültür kontrol grubudur, * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$).

Elde edilen sonuçları yorumlarken dikkat edilmesi gereken diğer bir konu perfüzyon biyoreaktördeki akış hızı ve rejimlerdir. Yapılan çalışmalarda akış koşullarının üç boyutlu yapılar içerisindeki hücre içeriğini ve matris sentezini önemli derecede etkilediği bildirilmiştir (Davisson et al., 2002). Sunulan çalışmada, perfüzyon biyoreaktöründeki akış hızı (1 ml/dk) daha önceden yapılmış ön çalışmaların sonunda belirlenerek optimize edilmiştir. Sonuç olarak, elde edilen tüm bulgular çerçevesinde, perfüzyon biyoreaktörlerde sağlanan dinamik kültür

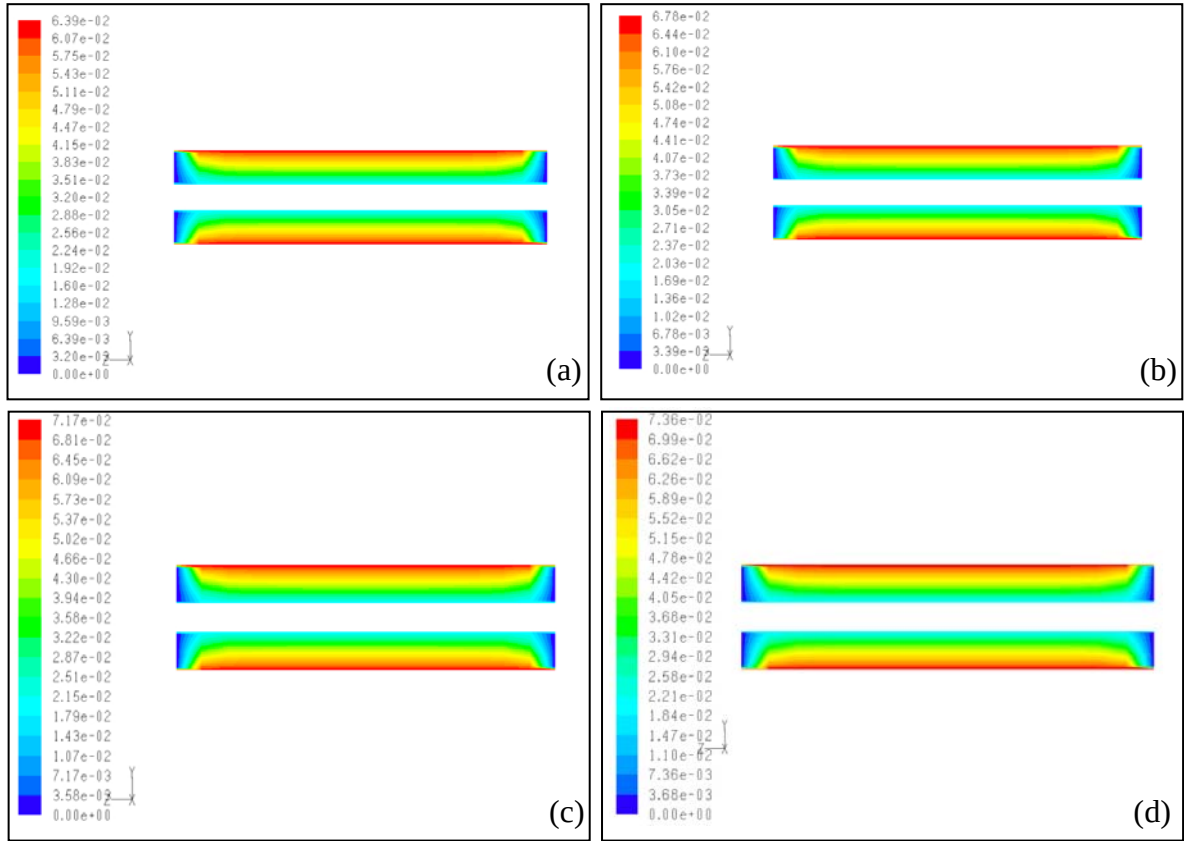
koşullarının (akış ile uygulanan mekanik etki) kıkırdak doku oluşumu için önemli bir etken olduğu saptanmıştır.

4.6. Biyorektörlerde Simülasyon Çalışmaları

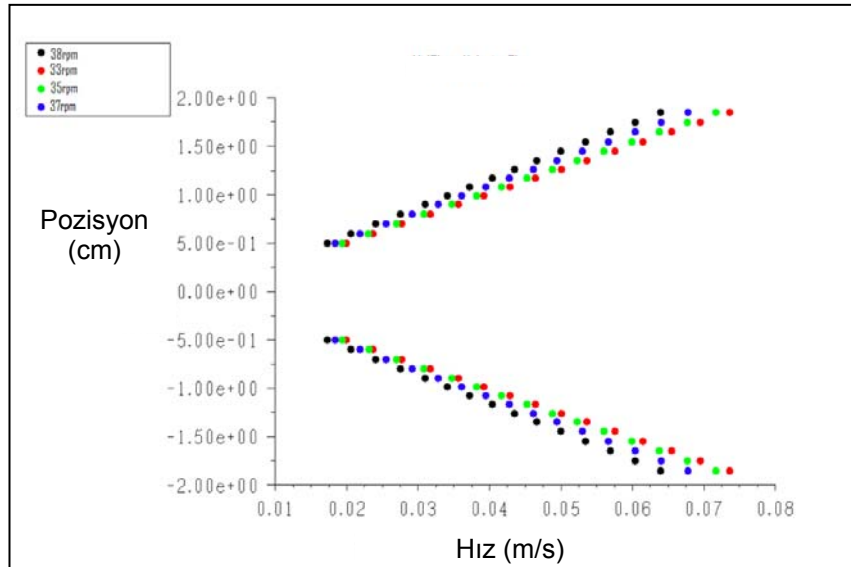
Çalışmanın bu bölümünde, Hesaplamalı Akışkanlar Dinamiği (CFD) modeli kullanılarak, yatışkın ve yatışkın olmayan durumlarda, çalışmada kullanılan döner duvarlı biyoreaktörlerdeki (RCMW™) simülasyon çalışmalarının sonuçlarına değinilmiştir. Simülasyon çalışmaları sonucunda, kitosan doku iskelelerine etkileyen hız alanları ve vektörleri, kayma gerilim profilleri ve oksijen profilleri Bölüm 3.7’de açıklanan yöntemler dahilinde yapılan çalışmalarla belirlenmiş ve sonuçlar aşağıda verilen bölümlerde tartışılmıştır.

4.6.1. Kitosan doku iskelesi içermeyen biyoreaktörlerde modelleme

Doku iskelelerinin, biyoreaktörde maruz kaldığı hız alanlarının ve kayma gerilimi profillerinin bulunmasından önce, içinde doku iskelesi bulunmayan biyoreaktörde oluşan hız alanlarının ve gerilim oranlarının tespit edilmesi gerekmektedir. Çünkü doku iskelelerinin, biyoreaktör içindeki akış alanlarını ve kayma gerilim profillerini değiştireceği düşünülmektedir. Bu amaca yönelik olarak, modellemenin ilk basamağında, iç içe geçmiş 2 silindirden oluşan biyoreaktörün içinin tamamen hücre kültür ortamıyla dolu olduğu durum için simüle edilmiştir ve biyoreaktörde farklı dönüş hızları için elde edilen hız alanları ve kayma gerilimi profil sonuçları sunulmuştur. Farklı dönüş hızlarında, doku iskelesi içermeyen biyoreaktör içindeki hız alanları Şekil 4.33’te verilmiştir. Bu şekilden de anlaşılacağı gibi tüm dönüş hızlarında (33, 35, 37 ve 38 rpm) biyoreaktör içindeki hız profilinin kararlı olduğu bulunmuştur ve çizgisel hızın, iç silindirden olan uzaklıkla doğrusal olarak değiştiği saptanmıştır. Reaktör içindeki hız değerlerinin, iç silindirden olan uzaklıkla ve dönüş hızıyla değişimini inceleyebilmek için, reaktörü z-ekseninde simetrik olarak ikiye bölen sanal bir düzlem oluşturulmuştur. Bu düzlemde yararlanılarak, Şekil 4.34’te, farklı parametrelerin çizgisel hız üzerindeki etkisi gösterilmiştir. Biyoreaktörde iç silindirden olan uzaklık arttıkça çizgisel hız artmıştır, dönüş hızının artması ise çizgisel hızı çok fazla etkilememiştir. Sonuç olarak, dönüş hızındaki değişimin, reaktör içindeki hız profilini etkilemediği görülmüştür.

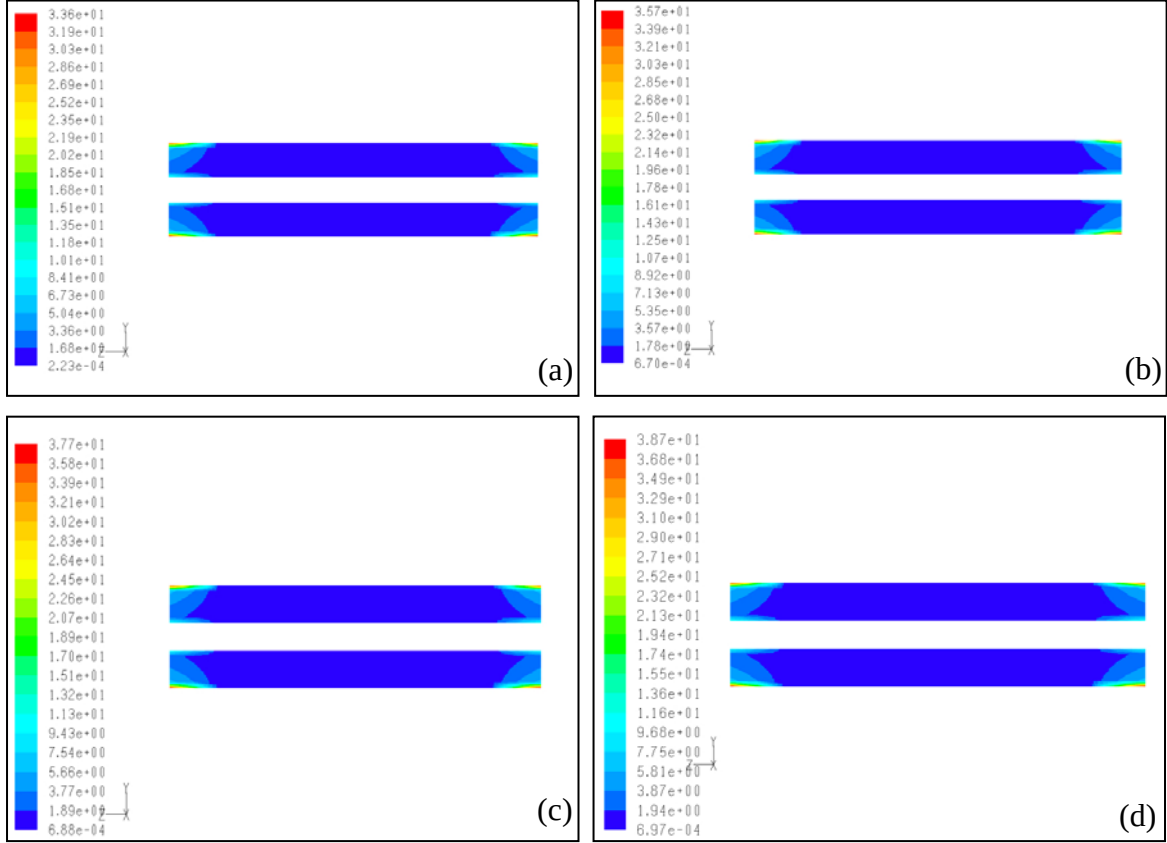


Şekil 4.33. Doku iskelesi bulunmayan biyoreaktörde farklı dönüş hızlarında hız alanları: (a) 33 rpm; (b) 35 rpm; (c) 37 rpm; (d) 38 rpm. Skala: (m/s).



Şekil 4.34. Biyoreaktördeki hız değerlerinin, iç silindirden olan uzaklıkla ve dönüş hızı ile değişimleri (sanal düzlemden yararlanılarak elde edilmiştir).

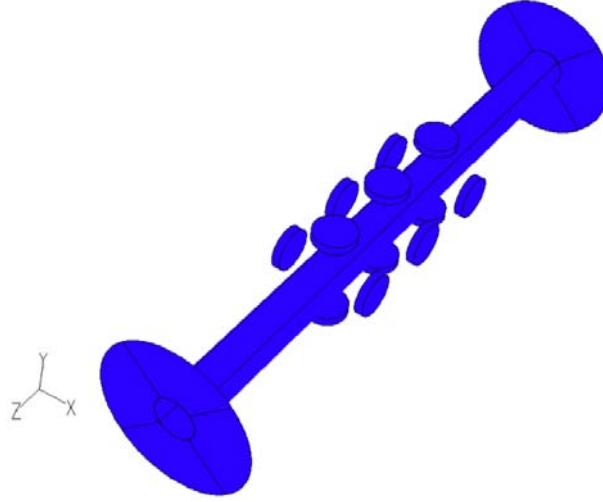
Biyoreaktör içindeki kayma gerilimleri Şekil 4.35'te verilmiştir. Kayma gerilimi değerlerinin oldukça düşük ($2.23\text{-}6.97 \times 10^{-4}$ dyne/cm²) ve silindirler arası uzaklıktan bağımsız olduğu görülmüştür. Döndürme hızı arttıkça, reaktör içindeki kayma gerilimi değerlerinde de artış olmuştur.



Şekil 4.35. Doku iskelesi bulunmayan biyoreaktörde farklı dönüş hızlarında kayma gerilim profilleri: (a) 33 rpm; (b) 35 rpm; (c) 37 rpm; (d) 38 rpm. Skala: (dyne/cm²).

4.6.2. Doku iskeleleri varlığında biyoreaktör konfigürasyonu

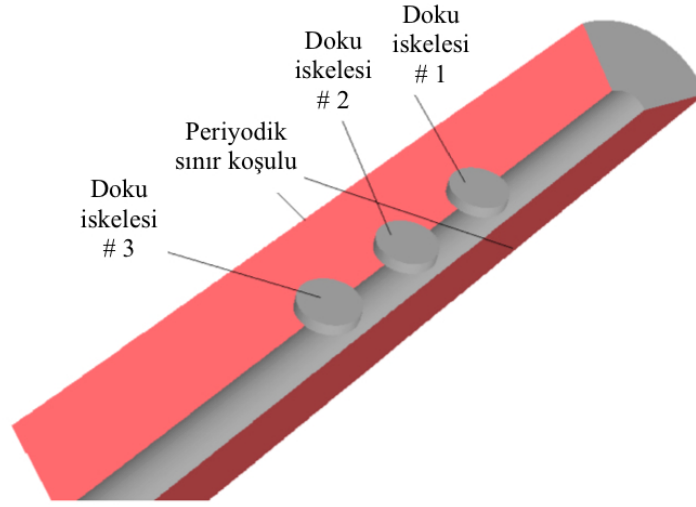
Döner duvarlı perfüzyon biyoreaktörü, yatay pozisyonda, iç içe geçmiş 2 silindirden oluşmaktadır. Hücre kültür ortamı ve doku iskeleleri, 2 silindirin arasında kalan boşlukta kültüre edilmektedir. Simülasyon çalışmalarında 12 adet doku iskelesi (çap, 10 mm ve kalınlık, 2 mm) biyoreaktör içine, herbirinde 3 adet doku iskelesi bulunan, aralarında 90° olan, 4 sıra halinde yerleştirilmiştir (Şekil 4.36).



Şekil 4.36. Doku iskelelerinin döner duvarlı perfüzyon biyoreaktörü içindeki yerleşim şeması: her birinde 3 adet doku iskelesi bulunan, aralarında 90° olan, 4 adet sıra görülmektedir. Doku iskeleleri, iç ve dış silindirlere eş uzaklıkta bulunmaktadır (6.15 mm).

Silindirler, doku iskelelerinin sürekli serbest düşüş halinde kültür ortamı içinde asılı kalabilmeleri için farklı hızlarda döndürülmektedir. Kültür süresi boyunca hücre sayısındaki ve hücre dışı matris miktarındaki artış nedeniyle, doku iskelelerinin gözeneklilik değerleri azalır ve ağırlıkları artar. Bu ağırlık artışı, doku iskelelerinin mikro-yerçekimi koşullarında kültüre edilebilmesini sağlayan kuvvetler dengesini bozar. Bunu engellemek için, kültür boyunca silindirlerin dönme hızı kademeli bir şekilde arttırılmıştır. Kültürün 1., 2., 3., ve 4., haftalarındaki dönme hızı, sırasıyla, 33, 35, 37 ve 38 rpm olarak ayarlanmıştır. Model oluşturulurken hücrelerin, doku iskelesindeki tüm gözenekleri kapladığı varsayılmıştır. Aslında kültürün 1. ve 2. haftalarındaki hücre sayısı tüm gözenekleri kapatacak boyutta değildir, fakat simülasyonun, 1. ve 2. haftaları için, yani 33 ve 35 rpm dönüş hızında, başarılı bir şekilde yapılabilmesi için doku iskelelerinin sahip olduğu gözeneklilik ihmal edilmiştir.

Doku iskeleleri biyoreaktöre yerleştirildikten sonra biyoreaktör simetrisinden yararlanılarak biyoreaktörün 1/4'ü modellenmiştir. Geometrik model Şekil 4.37'de gösterilmiştir.

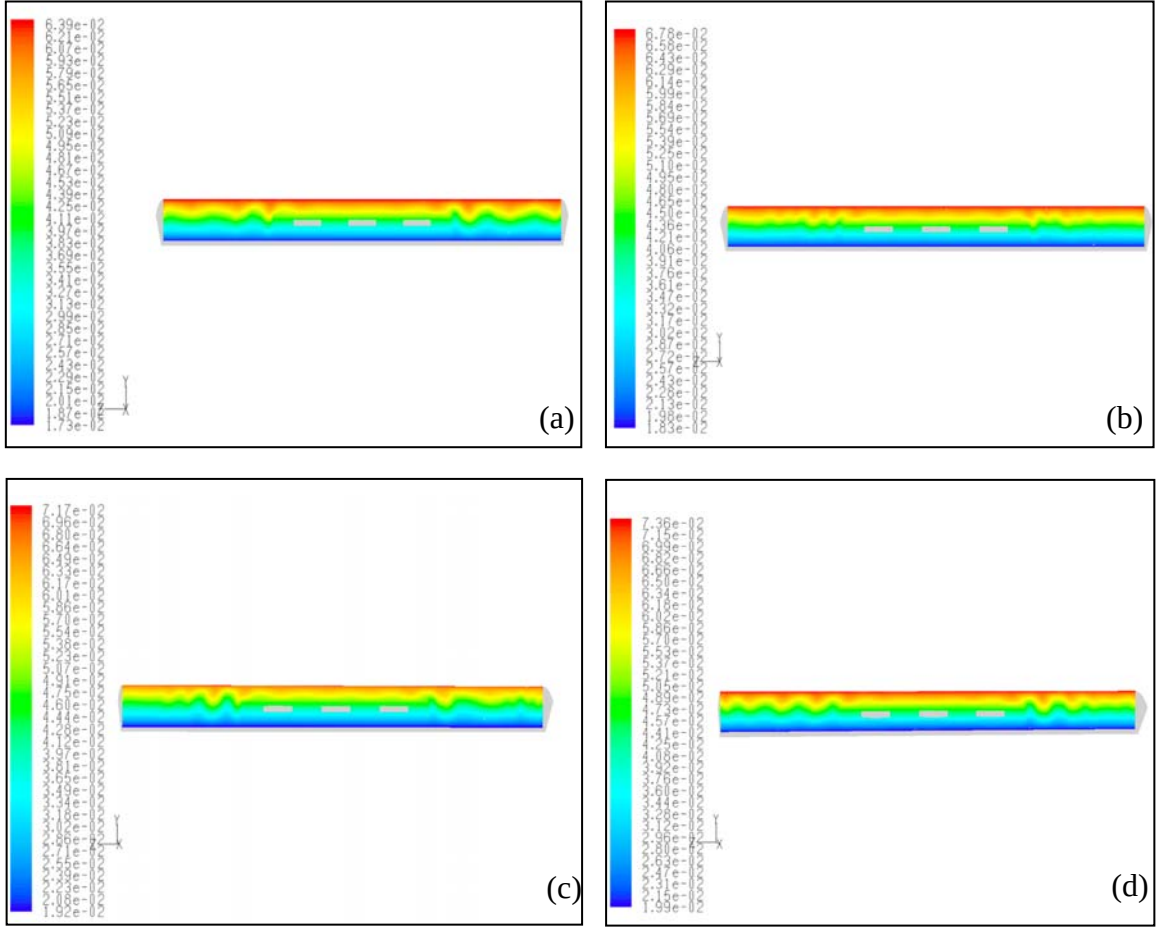


Şekil 4.37. Biyoreaktöre ait geometrik model ve doku iskelelerinin 1/4'lük simetri içindeki yerleşimi.

Şekil 4.37'de pembe ile renklendirilen yüzeyler periyodik sınır koşullarını temsil etmektedir. Çoklu Referans Çerçevesi (Multiple Reference Frame, MRF) modeli ile hesaplama bölümüne sırasıyla 33, 35, 37 ve 38 rpm dönüş hızları uygulanmıştır. Bu şekilde biyoreaktörün doku iskeleleri ile beraber dönüşü modellenmiştir.

4.6.3. Döner duvarlı biyoreaktörler içerisindeki kitosan doku iskelelerine etkileyen hız alanları ve kayma gerilim profilleri

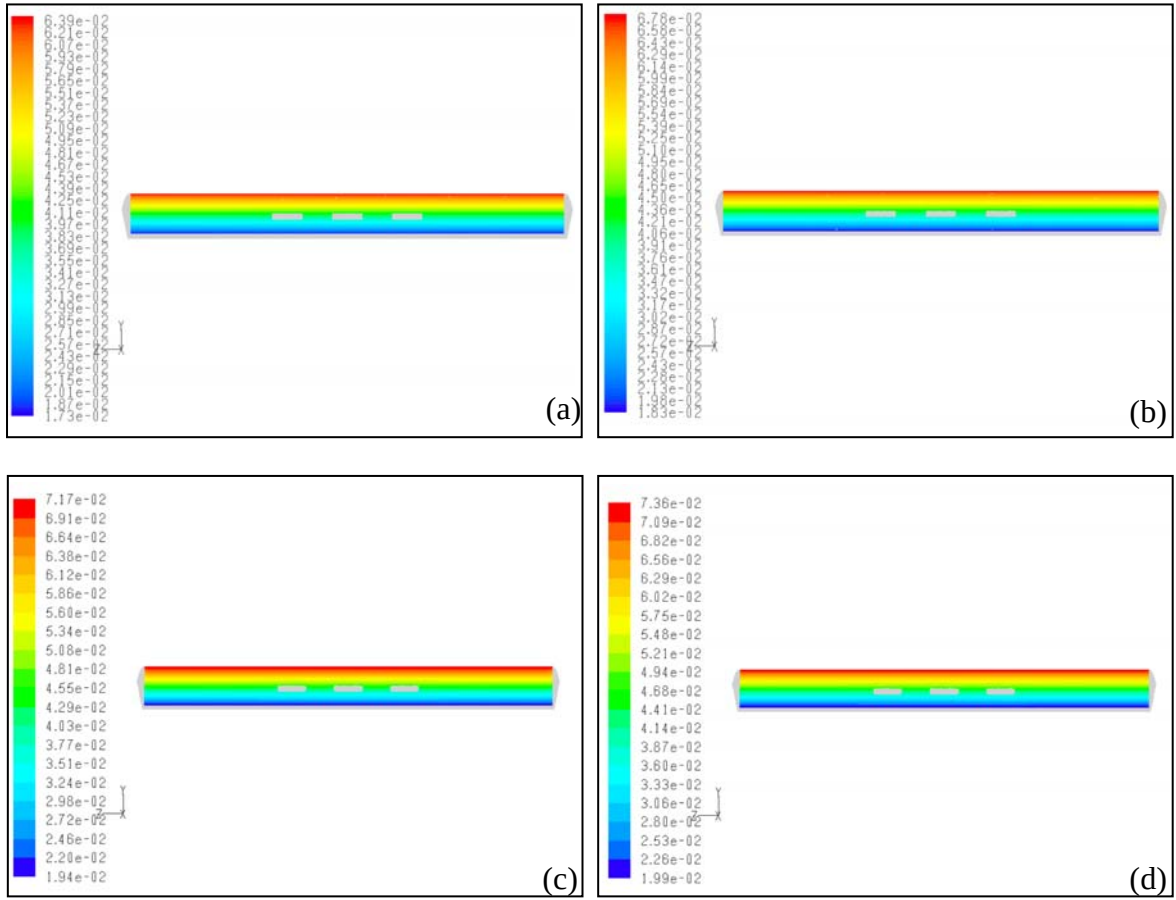
Sunulan çalışmanın bu bölümünde, biyoreaktörde kitosan doku iskelelerine etkileyen hız alanları ve kayma gerilim profilleri yatışkın ve yatışkın olmayan durumlar için sunulmuştur. Yatışkın durum hız alanı 33, 35, 37 ve 38 rpm dönüş hızları için hesaplanmıştır ve hız alanlarının kontürleri Şekil 4.38'de verilmiştir. Şekil 4.38'den de anlaşıldığı gibi yatışkın durum çözümüne ait hız alanlarının hiçbir dönüş hızında stabil olmadığı saptanmıştır. Disklerin etrafındaki akışın zamana bağımlı olması böyle bir sonuca neden olabilmektedir. Düşük çözünürlükteki örgü yapısında da aynı sonuç elde edilmiştir.



Şekil 4.38. Doku iskeleleri içeren biyoreaktörde, yatışkın durum çözümü ile elde edilen hız alanları: (a) 33 rpm; (b) 35 rpm; (c) 37 rpm; (d) 38 rpm. $\frac{1}{4}$ biyoreaktör kesitinden alınan hız alan kontürleri gösterilmiştir. Skala: (m/s).

Sonuç olarak, yatışkın durum için yapılan çözümün bu modelleme için uygun olmadığı belirlenmiştir. Yatışkın olmayan durum için daha hızlı yakınsama yakalanabileceği düşünüldüğünden dolayı yatışkın olmayan durum için aynı koşullarda modellemenin yapılması öngörülmüştür.

Yatışkın olmayan durum için, 33, 35, 37 ve 38 rpm dönüş hızlarındaki hız alanları Şekil 4.39’da sunulmuştur. Şekil 4.39’dan açıkça görüldüğü gibi, yatışkın olmayan durum yaklaşımı ile dikkate alınan zaman bağımlılığının, sistemdeki kararsızlıkları yok etmekte olduğu, böylelikle hız alanını düzelttiği anlaşılmaktadır.



Şekil 4.39. Doku iskeleleri içeren biyoreaktörde, yatışkın olmayan durum çözümü ile elde edilen hız alanları: (a) 33 rpm; (b) 35 rpm; (c) 37 rpm; (d) 38 rpm. $\frac{1}{4}$ biyoreaktör kesitinden alınan hız alan kontürleri gösterilmiştir. Skala: (m/s).

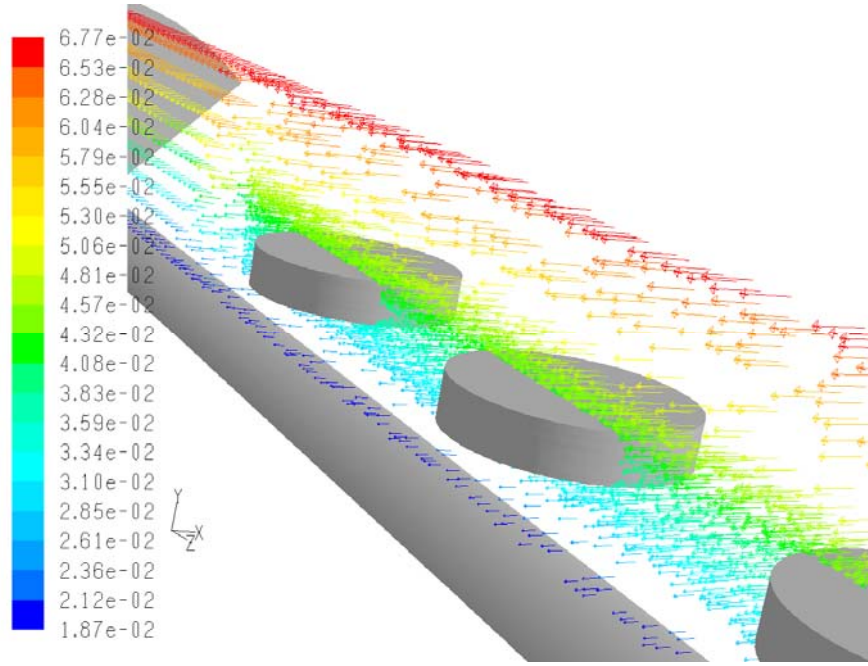
Biyoreaktörde doku iskeleleri etrafındaki hız alanlarının simüle edilmesinden sonra vektörel hız değerleriyle hesaplanan, doku iskelelerine etkiyen birim zamandaki kayma gerilimleri hesaplanmıştır. Hesaplanan değerler, Çizelge 4.9'da sunulmuştur. Çizelge 4.9'da belirtilen d_1 , d_2 ve d_3 , Şekil 4.37'de gösterilen doku iskelelerinin tek bir sıra içindeki pozisyonlarını ifade etmek için kullanılmıştır. Çizelge 4.9'da doku iskelelerinin yanal bölgelerine birim zamanda (1 saniye) etkiyen kayma gerilimlerinin her bir doku iskelesi için daha yüksek olduğu görülmüştür ($0.523\text{-}0.755 \text{ dyne/cm}^2$). Doku iskelelerinde en düşük kayma gerilimine maruz kalan bölgeler üstel bölgeler olup ($0.276\text{-}0.468 \text{ dyne/cm}^2$), alt yüzeylerde ise ortalama bir değer hesaplanmıştır ($0.313\text{-}0.605 \text{ dyne/cm}^2$).

Bu kayma gerilimleri, literatürde incelenen çeşitli biyoreaktörlerde bildirilen kayma gerilimi değerleriyle uyumludur. (Neitzel et al., 1998; Bilgen and Barabino, 2007). Doku iskelesi içermeyen biyoreaktör için yapılan modellemelerden elde edilen verilerle karşılaştırıldığında, doku iskelelerinin varlığının hem hız, hem de kayma gerilimlerini etkilediği görülmüştür.

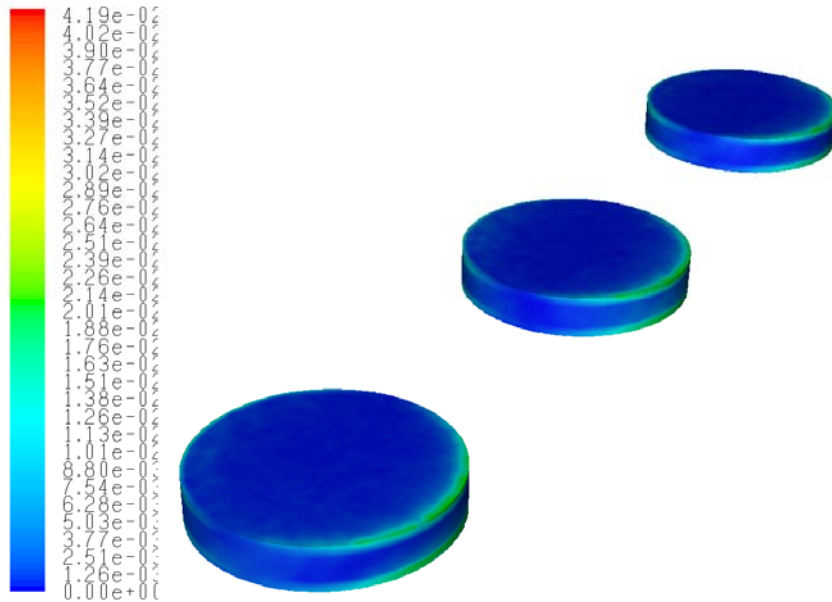
Çizelge 4.9. Farklı dönüş hızlarında, biyoreaktördeki doku iskelelerinin farklı yüzlerine etkiyen kayma gerilimleri (dyne/cm²).

Dönüş hızı Yüzey	33 rpm	35 rpm	37 rpm	38 rpm
d1_{üst}	0.286	0.389	0.424	0.328
d1_{alt}	0.397	0.328	0.605	0.313
d1_{yanal}	0.527	0.598	0.755	0.560
d2_{üst}	0.276	0.365	0.358	0.319
d2_{alt}	0.410	0.316	0.565	0.314
d2_{yanal}	0.523	0.618	0.654	0.559
d3_{üst}	0.290	0.394	0.468	0.327
d3_{alt}	0.387	0.350	0.569	0.316
d3_{yanal}	0.534	0.616	0.613	0.557

Çizelge 4.9’da hesaplanan kayma gerilimlerinin kitosan doku iskeleleri üzerindeki kontuarlarına örnek vermek amacıyla Şekil 4.40’ta 35 rpm dönüş hızında doku iskelelerine etkiyen hız vektörleri ve Şekil 4.41’de 35 rpm dönüş hızında iskelelere etkiyen kayma gerilimi kontuarları sunulmuştur.



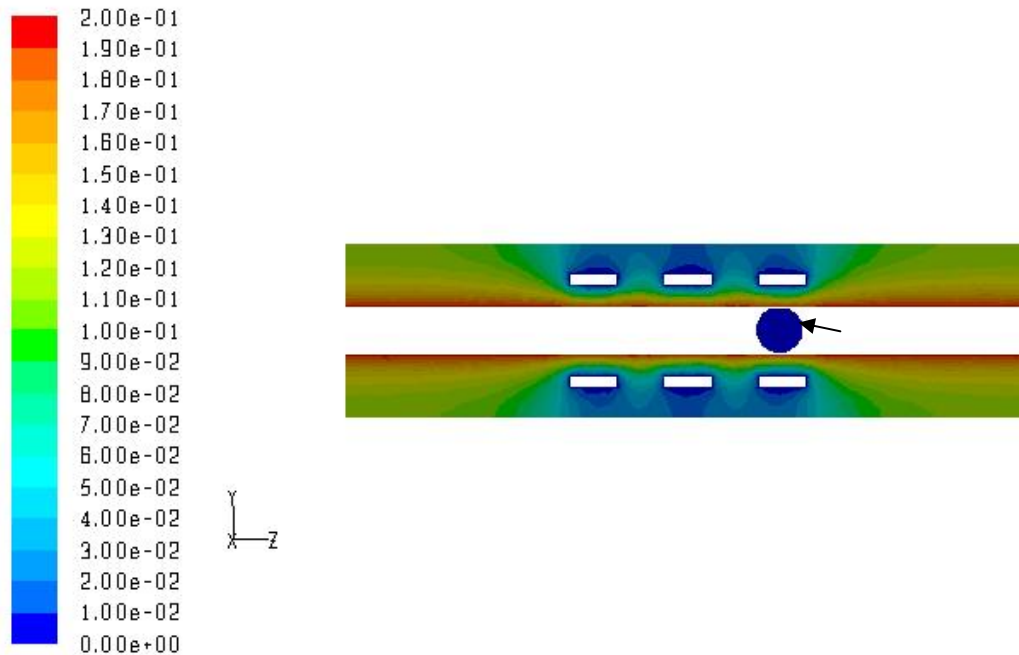
Şekil 4.40. Yatışkın olmayan durum için, 35 rpm’de doku iskelelerinin çevresindeki hız vektörleri. Skala: (m/s).



Şekil 4.41. Yatışkın olmayan durum için, 35 rpm’de doku iskelelerine etkiyen kayma gerilimleri. Skala: (dyne/cm²).

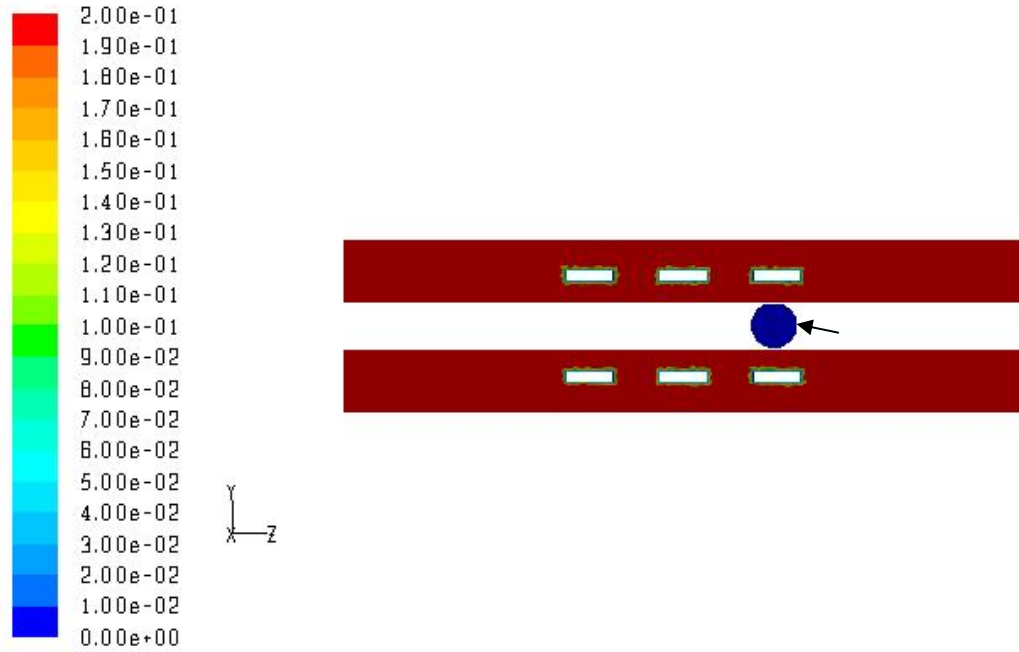
4.6.4. Döner duvarlı biyoreaktörlerdeki oksijen profilleri

Sunulan çalışmada, perfüzyon modlu döner duvarlı biyoreaktörlerde doku iskelelerine etkiyen oksijen profilleri Bölüm 3.7.4'te açıklanan hesaplamalar dahilinde simüle edilmiştir. Biyoreaktörde simülasyon çalışmaları Eşitlik 3.9 ve Eşitlik 3.10'da verilen iki başlangıç koşuluyla tasarlanan yaklaşımlarla sürdürülmüştür. Eşitlik 3.10'da verilen başlangıç koşulu, döner duvarlı biyoreaktörlerin içerisinde oksijen konsantrasyonunun sıfır olması ve iç silindirden difüze olan oksijenin sabit başlangıç oksijen konsantrasyon değerinin (O_2 (fraksiyon): 0.2) olduğunu göstermektedir. Bu yaklaşımla reaktör içindeki oksijen fraksiyon profilleri simüle edilmiştir (Şekil 4.42). Doku iskeleleri üzerinde üreyen hücrelerin oksijeni anında tükettiği varsayılarak, iskeleler üzerindeki oksijen gradiyenti ihmal edilmiştir (Williams et al., 2002). Şekil 4.42'deki gösterim amacıyla sunulan doku iskelesinin lacivert rengi, oksijenin iskele yüzeyindeki ani tüketimini işaret etmektedir.



Şekil 4.42. Yatışkın olmayan durum için, oksijen başlangıç konsantrasyonunun sıfır olduğu durumda biyoreaktör içerisindeki oksijen profilleri. Ok ile gösterilen kısım örnek bir doku iskelesindeki oksijen profilini işaret etmektedir. Skala, oksijen fraksiyonunu göstermektedir.

Şekil 4.42’den de açıkça görüleceği gibi biyoreaktör içerisindeki oksijen profilleri iskeleler çevresinde çok düşük fraksiyonlar vermiştir. Özellikle doku iskelelerinin dış silindire yakın olan alanlarında başlangıç konsantrasyonunun %10’undan daha az oranda (< 0.02) doymun oksijen konsantrasyonu saptanmıştır. Doku iskelelerinin iç silindire bakan taraflarında ise başlangıç konsantrasyonunun yaklaşık %25 oranında doymun oksijen konsantrasyonu saptanmıştır (~ 0.04). Elde edilen profil perfüzyon koşullarının döner duvarlı biyoreaktörlerdeki öneminin ve gerekliliğinin de bir kanıtıdır. Çalışmada kullanılan biyoreaktörün perfüzyon işlevi durdurulduğu taktirde, reaktördeki doymun oksijen konsantrasyonunun dağılımı Şekil 4.42’de gösterilen profiller gibi olacaktır. Tüm bu bulguların ışığında, döner duvarlı biyoreaktörlerde sürekli sistemin ve oksijen transferinin önemi açıktır.



Şekil 4.43. Yatışkın olmayan durum için, oksijen başlangıç konsantrasyonu 0.2 (fraksiyon) olduğu durumda biyoreaktör içerisindeki oksijen profilleri. Ok ile gösterilen kısım örnek bir doku iskelesindeki oksijen profilini işaret etmektedir. Skala, oksijen fraksiyonunu göstermektedir.

Daha önceden de açıklandığı gibi, çalışmada kullanılan perfüzyon modlu döner duvarlı biyoreaktörler inkübasyon öncesi tamamen doymun oksijene sahip kültür ortamıyla doldurulmuştur. Dolayısıyla gerçek sistemimizde simülasyon koşulları için Eşitlik 3.9’da açıklanan başlangıç koşulları kullanılmıştır. Yani, başlangıç

oksijen konsantrasyonu tüm biyoreaktör boyunca 0.2 (fraksiyon) olarak alınmıştır. Elde edilen profiller Şekil 4.43'te sunulmuştur. Şekil 4.43'ten de anlaşılacağı gibi doku iskelelerine etkiyen oksijen kontuarları, sadece doku iskeleleri çevresinde değişmektedir ve biyoreaktörde doymuş oksijen miktarı sabittir. Bu bağlamda, biyoreaktörün sürekli sistemde çalışmasının doku oluşumu açısından bir avantaj olduğu saptanmıştır.

Bununla beraber, farklı dönüş hızlarıyla yapılan simülasyonların sonucunda Şekil 4.43'e benzer profiller gözlemlenmiş ve sonuç olarak biyoreaktördeki oksijen profillerinin dönme hızıyla değişmediği saptanmıştır. Elde edilen bu sonuç ile, biyoreaktörde kültür boyunca değiştirilen dönme hızının sadece doku iskelelerinde üreyen hücrelere etkiyen kayma gerilimlerini değiştirdiği saptanmıştır. Oksijen profillerinin kültür boyunca değişmemesi hücrelerin kontrollü bir şekilde kültüre edildiğinin bir kanıtıdır ve deneysel olarak elde edilen tüm verilerin tutarlılığını göstermektedir.

FLUENT yazılımı kullanılarak yapılan modelleme çalışmaları, biyoreaktör ölçek büyütmesine esas oluşturacak temel bilgilere ve işlem parametrelerine ışık tutmaktadır. Elde edilen sonuçlar sayesinde, hücre kültürünün farklı evrelerindeki koşulların değişimi incelenmiştir. Sonuçlar, CFD yazılımlarının perfüzyon modlu döner duvarlı biyoreaktörlerdeki hidrodinamik koşulların belirlenmesi için kullanılabilecek etkin sistemler olduğunu işaret etmektedir. Tüm bu bulguların ışığında, çalışmada kullanılan döner duvarlı biyoreaktördeki işletim koşullarının kıkırdak doku mühendisliği çalışmaları için uygunluğu saptanmıştır.

5. GENEL SONUÇLAR

Sunulan tez kapsamında, kıkırdak doku mühendisliği uygulamalarına yönelik olarak, gözenekli kitosan doku iskelelerinin sentezi ve farklı biyosinyal molekülleri ile zenginleştirilerek durgun koşullarda ve döner duvarlı biyoreaktörlerde kıkırdak doku oluşum performansları belirlenmiştir. Çalışmada ek olarak, farklı kaynaklardan elde edilen hücrelerin kitosan doku iskeleleriyle etkileşimleri ve perfüzyon biyoaktörlerde kıkırdak doku oluşum performanslarının incelenmesine yönelik çalışmalar da yapılmıştır. Son olarak, döner duvarlı biyoreaktörlerde kitosan doku iskelelerine etkileyen hız alanları, kayma gerilimleri ve biyoreaktördeki oksijen profillerin belirlenmesine yönelik bulguların elde edilmesine çalışılmıştır. Çalışma kapsamında elde edilen önemli bulgular aşağıda özetlenmiştir.

- % 75-85 DD ve >% 85 DD'ne sahip, % 2 (w/v) ve % 3 (v/v) bileşimlerde gözenekli kitosan doku iskeleleri dondurarak-kurutma yöntemi ile elde edilmiştir.
- % 85 DD'nde ve % 2(w/v) bileşimde üretilen kitosan doku iskelelerin içsel bağlantılara ve ~100 µm gözenek çapına sahip iskeleler olduğu saptanmıştır ve iskelelerdeki gözeneklilik değeri % 81.8±1.7 olarak bulunmuştur.
- Düşük deasetilasyon derecesine (% 75-85) sahip olan iskelelerinin mekanik dayanımlarının zayıf olduğu ve biyobozunma hızlarının yüksek olduğu saptanmıştır.
- Kitosan doku iskelelerinin hücresel etkileşimlerinin belirlenmesi amacıyla doku iskeleleri L929 hücre hattı ile kültüre edilmiştir. Yapılan karşılaştırmalar sonucunda >%85 deasetilasyon derecesine ve %2 bileşime sahip olan kitosan iskelelerin hücre yapışma, üreme ve çoğalma fonksiyonlarını desteklediği saptanmıştır ve kitosan iskelelerin hücre-malzeme etkileşimleri ve biyoyumluluk açısından uygun malzemeler olduğu belirlenmiştir. Yapılan tüm çalışmaların sonuçları topluca değerlendirildiğinde, %2 (w/v) bileşime ve 85% DD'ne sahip kitosan doku

iskelelerinin kıkırdak doku oluşumunun takibi açısından daha uygun olacağına karar verilmiş ve sunulan tez çalışmasında bu doku iskeleleri kullanılmıştır.

- Hazırlanan kitosan doku iskeleleri RGD ve EGF ile immobilize edilmiştir. Yapılan kalitatif analiz sonuçları immobilizasyonun etkinliğini işaret etmektedir. Kitosan doku iskelelerine birim ağırlık (g) başına 6.34×10^{-5} mol RGD bağlandığı saptanmıştır. İmmobilizasyon verimliliği ise % 63.4 olarak belirlenmiştir. 2µg/ml EGF başlangıç konsantrasyonuyla immobilize edilen kitosan doku iskelelerindeki EGF immobilizasyon verimliliği % 97.6 olarak hesaplanmıştır. Belirlenen değerlerin hücre yapışması ve yayılmasını etkileyecek düzeyde olduğuna karar verilmiştir.
- RGD ve EGF immobilize edilmiş kitosan doku iskeleleri kondrojenik aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla ATDC5 kondrojenik hücre hattı ile kültüre edilmiştir. RGD immobilize edilmiş kitosan iskelelerdeki hücrelerin 24 saat sonunda özgül üreme hızları 0.049 sa^{-1} olarak bulunmuş ve RGD'nin kitosan doku iskelelerdeki kondrojenik hücre yapışmasını desteklediği saptanmıştır. MTT analizi sonucunda EGF-kitosan doku iskelelerinde hücrelerin yüksek hücre üreme eğilimlerine sahip oldukları ve sonuç olarak kondrojenik üremeyi ve proliferasyonu dikkate değer bir biçimde iyileştirdiği belirlenmiştir.
- CLSM görüntüleri ile ATDC5 hücrelerin EGF-kitosan doku iskelelerindeki hücre canlılığının ve kondrojenik hücre proliferasyonlarının kitosan ve RGD-kitosan iskelelere göre oldukça iyi olduğu gözlemlenmiştir. Elde edilen bulguların MTT analiz sonuçlarıyla uyumlu olduğu saptanmıştır. Bununla beraber, hiçbir doku iskelesinde kondrositlerde olması gereken küresel morfoloji gözlenmemiş ve hücre fenotiplerinin korunamadığı belirlenmiştir.
- Kitosan doku iskelelerine BMP-6 (iskele başına 100 ng) yüklenmiş ve ATDC5 hücreleri ile durgun koşullarda kültüre edilerek hücrelerin kondrojenik aktiviteleri incelenmiştir. BMP-6'nın ATDC5 kondrojenik

hücreleri üzerinde mitokondriyal aktivitelerini etkileyecek bir etki göstermediği saptanmıştır.

- Durgun koşullarda ATDC5 hücreleriyle kültüre edilen BMP-6 yüklü kitosan doku iskelelerinin CLSM görüntülerinde hücre morfolojilerinin, kondrojenik farklılaşmaya bağımlı olarak, küresel bir morfolojiye dönüşmeye başladığı gözlemlenmiştir. BMP-6 yüklü kitosan iskelelerindeki ATDC5 hücrelerinin 4. hafta sonundaki SEM görüntülerinde hücrelerin farklılaşarak kondrojenik fenotiplerini korudukları gözlemlenmiştir. Bununla birlikte, BMP-6 yüklü kitosan doku iskelelerinde, yapay matrise sağlam bir şekilde yapışmış olan hücrelerin bol miktardaki membran vezikül oluşumu ile karakterize edilen hipertropik küresel morfolojide oldukları gözlemlenmiştir.
- Durgun koşullarda inkübe edilen BMP-6 yüklü doku iskelelerindeki GAG, kollajen II ve DNA içeriklerinin, kitosan iskelelere nazaran dikkate değer bir şekilde fazla olduğunu saptanmıştır. Sonuç olarak, BMP-6 yüklü kitosan doku iskelelerde, hücrelerin farklılaşmasından sonra hücre morfolojilerinde gözlemlenen hipertropiye karşın kondrojenik fenotiplerin korunarak kondrogenezin desteklendiği saptanmıştır.
- Döner duvarlı biyoreaktörde inkübe edilen BMP-6 yüklü kitosan doku iskelelerindeki ATDC5 hücrelerinin CLSM ve SEM görüntülerine bağımlı olarak, hücrelerin küresel morfolojiye sahip oldukları ve neo-kıkırdak yapısına benzer şekilde kümelenmiş hücre grupları gözlemlenmiştir. Değişime uğramış hücrelerde pürüzsüz hücre membranlarına bağımlı olarak, hücrelerin hipertropik morfolojiden yoksun bir şekilde kondrojenik fenotiplerini korudukları sonucuna varılmıştır.
- Döner duvarlı bioreaktörlerde inkübe edilen BMP-6 yüklü kitosan doku iskelelerindeki yüksek GAG ve kollajen II miktarlarına bağımlı olarak erken kondrogenezin desteklendiği saptanmıştır. Biyoreaktörlerle sağlanan mekanik uyarımın etkileri ortaya çıkarılmış ve kıkırdak doku mühendisliğinde BMP-6 ile modifiye edilmiş yeni kitosan doku iskelelerinin *in-vitro* ortamda kullanılabilirlikleri öngörülmüştür.

- Altı farklı hücre kaynağından elde edilen hücreler kitosan doku iskeleleriyle durgun koşullarda kültüre edilmiş ve elde edilen bulgular kıkırdak doku rejenerasyonunda optimum hücre kaynağının tespit edilmesi amacıyla uygun olarak karşılaştırılmıştır. Kitosan doku iskelelerinde kültüre edilen hücrelerden en çok ED1 MSCs'in yüksek AGC, Col II ve düşük Col-I transkripsiyon seviyeleri ile kondrojenik fenotipe benzerlik gösterdiği ve farklılaşma potansiyellerinin yüksek olduğu saptanmıştır.
- Yapılan histolojik incelemeler sonucunda ED1 MSCs'de ve ED2 MSCs'de proteoglikanların Safranin-O ile zayıf fakat pozitif olarak boyandıkları gözlemlenmiştir. SEM görüntülerine bağımlı olarak, ED1 MSCs'in küresel morfolojilerinin korunmasından dolayı, kitosan doku iskelelerinin bu hücrelere istenilen bir mikroçevre yarattıkları sonucuna varılmıştır. Çalışmada edinilen tüm bulguların ışığında kitosan doku iskelelerinde kıkırdak doku oluşumu için ED1 MSCs'in potansiyel hücre kaynağı olduğu ve kıkırdak doku mühendisliği uygulamalarında gelecek vaat ettiği sonucuna varılmıştır.
- İnsan embriyonik kök hücrelerinden türetilmiş mezenkimal kök hücrelerin (ED1 MSCs) kitosan doku iskelelerinde dinamik koşullar altındaki (perfüzyon biyoreaktörler) performansları incelenmiştir. MTT analiz sonuçlarından, perfüzyon biyoreaktörlerde inkübe edilen hücrelerin kitosan iskelelerdeki metabolik aktivitelerinin durgun ortamdakilere göre yüksek olduğu saptanmıştır. Yapılan biyokimyasal testlerin sonucunda, perfüzyon biyoreaktörlerin iskelelerdeki GAG, Kollajen II ve DNA içeriklerini arttırdığı saptanmıştır. Sonuç olarak, kitosan doku iskelelerinde kültüre edilen ED1 MSCs'in perfüzyon biyoreaktörlerle kondrojenik aktivitelerinin arttığı ve kıkırdak doku oluşumunun geliştirildiği saptanmıştır.
- Perfüzyon biyoreaktörlerde kültüre edilen hücre-iskele yapılarının elastik modüllerinin ise statik ortamda kültüre edilen hücre-iskele yapılarıyla karşılaştırıldığında 2.1 kat daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

- Perfüzyon biyoreaktörlerde kültüre edilen ED1 MSC hücrelerinde tüm kıkırdak-bağımlı genlerin transkripsiyon seviyeleri yüksek bulunmuştur. Sonuç olarak, ED1 MSCs'nin farklılaşma potansiyellerinin yüksek olduğu saptanmıştır. Elde edilen tüm bulgular çerçevesinde, perfüzyon biyoreaktörlerde sağlanan dinamik kültür koşullarının (akış ile uygulanan mekanik etki) kıkırdak doku oluşumu için önemli bir etken olduğu saptanmıştır.
- Hesaplamalı Akışkanlar Dinamiği (CFD) modeli kullanılarak, doku iskelesi içermeyen döner duvarlı biyoreaktörlerde (RCMW™) dönüş hızındaki değişimin hız profilini etkilemediği belirlenmiştir. Kayma gerilimi değerlerinin oldukça düşük ($2.23-6.97 \times 10^{-4}$ dyne/cm²) ve silindirler arası uzaklıktan bağımsız olduğu görülmüştür.
- Doku iskelesi içeren biyoreaktörlerde yapılan simülasyon çalışmalarının sonucunda, yatışkın çözüme ait hız alanlarının hiçbir dönüş hızında stabil olmadığı saptanmıştır. Yatışkın olmayan durum yaklaşımı ile dikkate alınan zaman bağımlılığının, sistemdeki kararsızlıkları yok etmekte olduğu saptanmıştır.
- Doku iskelelerinin yanal bölgelerine birim zamanda (1 saniye) etkiyen kayma gerilimlerinin her bir doku iskelesi için daha yüksek olduğu görülmüştür (0.523-0.755 dyne/cm²). Doku iskelelerinde en düşük kayma gerilimine maruz kalan bölgeler üstel bölgeler olup (0.276-0.468 dyne/cm²), alt yüzeyleri ise ortalama bir değer etkilemiştir (0.313-0.605 dyne/cm²). Bu kayma gerilimlerinin literatürde incelenen çeşitli biyoreaktörlerde bildirilen kayma gerilimi değerleriyle uyumlu olduğu belirlenmiştir.
- Biyoreaktördeki oksijen kontuarlarının, sadece doku iskeleleri çevresinde değiştiği belirlenmiştir. Bu bağlamda, biyoreaktörün sürekli sistemde çalışmasının doku oluşumu açısından bir avantaj olduğu saptanmıştır. Biyoreaktördeki oksijen profillerinin dönme hızıyla değişmediği saptanmıştır. Elde edilen bu sonuç ile, biyoreaktörde kültür boyunca değiştirilen dönme

hızının sadece doku iskelelerinde üreyen hücrelere etkiyen kayma gerilimlerini değiştirdiği saptanmıştır.

Sunulan tez çalışması kapsamında edinilen tüm bu bulguların ışığında, dinamik kùltür koşulları altında inkùbe edilen BMP-6 yùklù kitosan doku iskelelerinin kıkırdak doku mùhendisięi için uygun malzemeler olduğu belirlenmiştir. Sùrekli sistem dōner duvarlı biyoreaktōrlerin ve perfùzyon biyoreaktōrlerin kıkırdak doku oluşumu için etkin sistemler olduğu sonucuna varılmıştır.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Aday, S., 2008, Biyomimetik Apatit Kaplı ve Heparin Fonksiyonalitesine Sahip Kitosan Doku İskelelerinde Kondrosit ve Osteoblast Aktivitelerinin İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 116s.
- Aiedeh, K., Gianasi, E., Orienti, I., Zecchi, V., 1997, Chitosan microcapsules as controlled release systems for insulin, *The Journal of Microencapsulation*, 14, 567-576.
- Akay, T., 2006, Genel Histoloji, Palme Yayıncılık, ISBN 975-7477-92-3, Ankara, 262s.
- Akman, A.C., 2007, Periodontal Doku Mühendisliği Uygulamaları için Kitosan Temeli doku İskelelerinin üretilmesi, kemik morfojenetik protein-2 (BMP-2), bazik fibroblast büyüme faktörü (bFGF), deksametazon (DEX) salım kinetiklerinin ve in vitro etkinliklerinin tayini. Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 76s.
- Akman, A.C., Tıǧlı, R.S., Gümüşderelioğlu, M., Nohutçu, R.M., 2009a, BMP-6 loaded chitosan scaffolds enhancing the osteoblastic characteristics of MC3T3-E1 cells, *Artificial Organs*, (baskıda).
- Akman, A.C., Tıǧlı, R.S., Gümüşderelioğlu, M., Nohutçu, R.M., 2009, bFGF loaded HA-chitosan: A promising scaffold for periodontal tissue engineering, *J Biomed Mater Res: Part A*, (baskıda).
- Amaral, I. F., Lamghari, M., Sousa, S. R., Sampaio, P., Barbosa, M. A., 2005, Rat bone marrow stromal cell osteogenic differentiation and fibronectin adsorption on chitosan membranes: The effect of the degree of acetylation, *J Biomed Mater Res*, 7, 387-397.
- Anderson, R.K., 2004, Effects of simulated microgravity and shear on cell behavior, Doktora Tezi, The University of Florida, 103s.
- Ang, T.H., Sultana, F.S.A., Hutmacher, D.W., Wong, Y.S., Fuh, J.Y.H., Mo, X.M., Loh, H.T., Burdet, E., Teoh, S.H., 2002, Fabrication of 3D chitosan-hydroxyapatite scaffolds using a robotic dispensing system, *Materials Science and Engineering: C*, 20 (1), 35-42.
- Arpornmaeklong, P., Suwatwirote, N., Pripatnanont, P., Oungbho, K., 2007, Growth and differentiation of mouse osteoblasts on chitosan-collagen sponges, *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 36, 328-37.
- Bancroft, G.N., 2002, Fluid flow increases mineralized matrix deposition in 3D perfusion culture of marrow stromal osteoblasts in a dose-dependent manner, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 99, 12600–12605.

- Barbero, A., Ploegert, S., Heberer M., Martin I., 2003, Plasticity of clonal populations of dedifferentiated adult human articular chondrocytes, *Arthritis Rheum*, 48, 1315–1325.
- Benya, P.D., Shaffer, J.D., 1982, Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels, *Cell*, 30, 215–224.
- Berger, J., Reist, M., Mayer, J. M., Felt, O., Peppas N. A., Gurny, R., 2004, Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked hydrogels for biomedical applications, *European J Pharm and Biopharm*, 57, 19-25.
- Bhattacharai, N., Edmondson, D., Veis, O., Matsen, F.A., Zhang, M., 2005, Electrospun chitosan-based nanofibers and their cellular compatibility, *Biomaterials*, 26, 6176-6184.
- Bilgen, B., Barabino, G.A., 2007, Location of scaffolds in bioreactors modulates the hydrodynamic environment experienced by engineered tissues, *Biotechnology and Bioengineering*, 98(1), 282-294.
- Bilodeau, K., Mantovani, D., 2006, Bioreactors for tissue engineering: focus on mechanical constraints. A Comparative Review, *Tissue Engineering*, 12(8), 2367-2383.
- Bobacz, K., Gruber, R., Soleiman, A., Erlacher, L., Smolen, J.S., Graninger, W.B., 2003, Expression of Bone Morphogenetic Protein 6 in Healthy and Osteoarthritic Human Articular Chondrocytes and Stimulation of Matrix Synthesis In Vitro, *Arthritis & Rheumatism*, 48(9), 2501–2508.
- Bock, G., Goode, J., 2003, *Tissue engineering of cartilage and bone*, Wiley, West Sussex, ISBN 0-470-84481-7, 251s.
- Bonaventure, J., Kadhom, N., Cohen-Solal, L., Ng, K.H., Bourguignon, J., Lasselin, C., Freisinger, P., 1994, Reexpression of cartilage-specific genes by dedifferentiated human articular chondrocytes cultured in alginate beads, *Exp Cell Res*, 212, 97-104.
- Botchwey, E.A., Dupree, M.A., Pollack, S.R., Levine, E.M., Laurencin, C.T., 2003, Tissue engineered bone: measurement of nutrient transport in three dimensional matrices, *J Biomed Mater Res: Part A*, 67 (1), 357–367.
- Brittberg, M., Lindahl, A., Nilsson, A., Ohlsson, C., Isaksson, O., Peterson, L., 1994, Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation, *N Engl J Med*, 331 (14), 889-895.
- Bujia, J., Sittlinger, M., Minuth, W.W., Hammer, C., Burmester, G., Kastenbauer, E., 1995, Engineering of cartilage tissue using bioresorbable polymer fleeces and perfusion culture, *Acta Otolaryngol*, 115(2), 307-310.
- Carrier, R.L., 1999, Cardiac tissue engineering: cell seeding, cultivation parameters, and tissue construct characterization, *Biotechnol Bioeng*, 64, 580–589.

- Carver, S.E., Heath, C.A., 1999, Influence of intermittent pressure, fluid flow, and mixing on the regenerative properties of articular chondrocytes, *Biotechnology and Bioengineering*, 65(3), 274-281.
- CFD, 2007, Wikipedia-CFD.
http://en.wikipedia.org/wiki/Computational_fluid_dynamics.
- Chatelet, C., Damour, O., Domard, A., 2001, Influence of the degree of acetylation on some biological properties of chitosan films, *Biomaterials*, 22, 261-268.
- Chen, G., Ito, Y., Imanishi, Y., 1997, Mitogenic activities of water-soluble and water-insoluble insulin conjugates, *Bioconj Chem*, 8, 106–110.
- Chen, G.P., Ushida, Y., Tateishi, T., 2002, Scaffold design for tissue engineering, *Macromol Biosci*, 2, 67-77.
- Chen, H.C., Lee, H.P., Sung, M.L., Liao, C.J., Hu, Y.C., 2004, A novel rotating-shaft bioreactor for two-phase cultivation of tissue-engineered cartilage, *Biotechnol Prog*, 20, 1802-1809.
- Cheng, M.Y., Deng, J.G., Yang, F., Gong, Y.D., Zhao, N.M., Zhang, X.F., 2003, Study on physical properties and nerve cell affinity of composite films from chitosan and gelatin solutions, *Biomaterials*, 24, 17, 2871-80.
- Chow, K.S., Khor, E., 2000, Novel fabrication of open-pore chitin matrixes, *Biomacromolecules*, 1, 61-67.
- Chung, C., Burdick, J.A., 2008, Engineering cartilage tissue, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60, 243–262.
- Chung, T.W., Yang, J., Akaike, T., Cho, K.Y., Nah, J.W., Kim, S.I., Cho, C.S., 2002, Preparation of alginate/galactosylated chitosan scaffold for hepatocyte attachment, *Biomaterials*, 23(14), 2827-2834.
- Cohen, S., 1986, Nobel Lecture Notes, Vanderbilt University, USA. pp.333-345.
- Cui, K., Zhu, Y., Wang, X.H., Feng, Q.L., Cui, F.Z., 2004, A porous scaffold from bone-like powder loaded in a collagen–chitosan matrix, *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 19, 17-31.
- Darling, E.M., Athanasiou, K.A., 2003, Biomechanical strategies for articular cartilage regeneration, *Ann Biomed Eng.*, 31, 1114–1124.
- Davisson, T., Sah, R.L., Ratcliffe, A., 2002, Perfusion increases cell content and matrix synthesis in chondrocyte three-dimensional cultures, *Tissue Engineering*, 8(5), 807-816.
- Deschaseaux, F., Gindraux, F., Saadi, R., Obert, L., Chalmers, D., Herve, P., 2003, Direct selection of human bone marrow mesenchymal stem cells using an anti-CD49a antibody reveals their CD45(med,low) phenotype, *British Journal of Haematology*, 122, 506-517.

- Di Martino, A., Sittinger, M., Risbud, M.V., 2005, Chitosan: A versatile biopolymer for orthopaedic tissue-engineering, *Biomaterials*, 26, 5983–5990.
- Dintenfass, L., 1986, Execution of 'ARC' Experiment on Space Shuttle 'Discovery' STS 51-C: Some Results on Aggregation of Red Blood Cell under Zero Gravity, *Biorheology*, 23, 331-347.
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F.C., Krause, D.S., Deans, R.J., Keating, A., Prockop, D.J., Horwitz, E.M., 2006, Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement., *Cytotherapy*, 8, 315-317.
- Doyle, A., 2000, Griffiths J.B., *Cell and tissue engineering: 3D culture systems, cell and tissue culture for medical research*, John Wiley and Sons Ltd, New York. pp. 352-357.
- Dunkelman, N.S., Zimmer, M.P., Lebaron, R.G., Pavelec, R., Kwan, M., Purchio, A.F., 1995, Cartilage production by rabbit articular chondrocytes on polyglycolic acid scaffolds in a closed bioreactor system, *Biotechnology and Bioengineering*, 46(4), 299-305.
- Ebenda, I.T., Bengtsson, H., Soderstrom, S., 1998, Bone morphogenetic proteins and their receptors: potential functions in the brain, *J Neurosci Res*, 51, 139-146.
- Elbert, DL., Hubbell, J.A., 2001, Conjugate addition reactions combined with free-radical cross-linking for the design of materials for tissue engineering, *Biomacromolecules*, 2, 430-441.
- Estes, B.T., Wu, A.W., Guilak, F., 2006, Potent induction of chondrocytic differentiation of human adipose-derived adult stem cells by bone morphogenetic protein 6, *Arthritis and Rheumatism*, 54, 1222-1232.
- Fassnacht, D., Pörtner, R., 1999, Experimental and theoretical considerations on oxygen supply for animal cell growth in fixed bed reactors, *J. Biotechnol.*, 72, 169–184.
- Fluent, 2007, Wikipedia-Fluent Inc. http://en.wikipedia.org/wiki/Fluent%2C_Inc.
- Foster, A., Matthew, H.W.T., 1998, Growth of vascular cells on bioactive polysaccharide surface, *Proc-NOBCCHE*, 25, 127-129.
- Francioli, S.E., Martin, I., Sie, C.P., Hagg, R., Tommasini, R., Candrian, C., Heberer, M., Barbero, A., 2007, Growth factors for clinical-scale expansion of human articular chondrocytes: Relevance for automated bioreactor systems, *Tissue Engineering*, 13, 1227-1234.

- Freed, L.E., Hollander, A.P., Martin, I., Barry, J.R., Langer, R., Vunjak-Novakovic, G., 1998, Chondrogenesis in a cell-polymer-bioreactor system, *Experimental cell research*, 240, 58-65.
- Freed, L.E., Marquis, J.C., Nohria, A., Emmanuel, J., Mikos, A.G., Langer, R., 1993, Neocartilage formation *in vitro* and *in vivo* using cells cultured on synthetic biodegradable polymers, *J Biomed Mat Res*, 27, 11-23.
- Freed, L.E., Vunjak-Novakovic, G., 1997, Microgravity tissue engineering, *in vitro Cell Dev. Biol. – Animal*, Vol 33, 381-385.
- Freed, L.E., Vunjak-Novakovic, G., 2000, Tissue engineering bioreactors. Principles of tissue engineering. Lanza, R.P., Langer, R., Vacanti, J. (eds.), Academic Press, San Diego. pp. 143–56.
- Freed, L.E., Vunjak-Novakovic, G., Marquis, J.C., Langer, R., 1994, Kinetics of chondrocyte growth in cell-polymer implants, *Biotechnology and Bioengineering*, 43, 597-604.
- Freyman, T.M., Yannas, I.V., Gibson, L.J., 2001, Cellular materials as porous scaffolds for tissue engineering, *Progress in Materials Science*, 46, 273-282.
- Fujita, T., Fukuyama, R., Enomoto, H., Komori T., 2004, Dexamethasone Inhibits Insulin-Induced Chondrogenesis of ATDC5 Cells by Preventing PI3K-Akt Signaling and DNA Binding of Runx2, *Journal of Cellular Biochemistry*, 93, 374–383.
- Glowacki, J., Mizuno, S., Greenberger, J.S., 1998, Perfusion enhances functions of bone marrow stromal cells in three-dimensional culture, *Cell Transplantation*, 7(3), 319-326.
- Gobin, A.S., West, J., 2003, Effects of epidermal growth factor on fibroblast migration through biomimetic hydrogels, *Biotechnol Prog*, 19, 1781–1785.
- Godara, P., McFarland, C.D., Nordon, R., 2008, Design of bioreactors for mesenchymal stem cell tissue engineering, *J Chem Technol Biotechnol*, 83, 408–420.
- Goldberg, R.L., Kolibas, L.M., 1990, An Improved method for determining proteoglycans synthesized by chondrocytes in culture, *Connective tissue Research*, 24, 265-275.
- Goldstein, A.S., Juarez, T.M., Helmke, C.D., Gustin, M.C., Mikos, A.G., 2001, Effect of convection on osteoblastic cell growth and function in biodegradable polymer foam scaffolds, *Biomaterials*, 22 (11), 1279–1288.
- Gooch, K.J., Kwon, J.H., Blunk, T., Langer, R., Freed, L.E., Vunjak-Novakovic, G., 2001, Effects of mixing intensity on tissue-engineered cartilage, *Biotechnol Bioeng*, 72 (4), 402–407.

- Grande, D.A., Halberstadt, C., Naughton, G., Schwartz, R., Manji, R., 1997, Evaluation of matrix scaffolds for tissue engineering of articular cartilage grafts, *J Biomed Mater Res*, 34, 211–220.
- Guo, T., Zhao, J. Chang, J., Ding Z., Hong H., Chen J., Zhang J., 2006, Porous chitosan-gelatin scaffold containing plasmid DNA encoding transforming growth factor-beta1 (TGFβ-1) for chondrocytes proliferation, *Biomaterials*, 27, 1095–1103.
- Gümüşderelioğlu, M. Tıǧlı, R.S., Karakeçili A., 2008, Kıkırdak Doku rejenerasyonunda doku iskelesi destekli biyoreaktör performansının incelenmesi, TÜBİTAK Proje Raporu, Proje No: 105M097. 107s.
- Hammond, T.G., Hammond, J.M., 2001. Optimized suspension culture: the rotating-wall vessel, *Am J Physiol Renal Physiol*, 281(1), 12–25.
- Heath, C.A., 2000, Cells for tissue engineering, *TIBTECH*, 18, 17-19.
- Hennig, T., Lorenz, H., Thiel, A., Goetzke, K., Dickhut, A., Geiger, F., Richter, W., 2007, Reduced chondrogenic potential of adipose tissue derived stromal cells correlates with an altered TGF beta receptor and BMP profile and is overcome by BMP-6, *Journal of Cellular Physiology*, 211, 682-691.
- Henrikson, R.C., Kaye G.I., Mazurkiewicz, 1997, *NMS Histology*, Lippincott Williams & Wilkins, 3rd edition, ISBN 978-0683062250, USA, 425s.
- Hersel, U., Dahmen, C., Kessler, H., 2003, RGD modified polymers: biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond, *Biomaterials*, 24, 4385-4415.
- Hoa, M.H., Wanga, D.M., Hsieha, H.J., Liub, H.C., Hsien, T.Y., Laid, J.Y., Hou, L.T., 2005, Preparation and characterization of RGD-immobilized chitosan scaffolds, *Biomaterials*, 26, 3197–3206.
- Holland, T.A., Mikos, A.G., 2003, Advances in drug delivery for articular cartilage, *Journal of Control Release*, 86, 1-14.
- Hollander, A.P., Heathfield, T.F., Webber, C., Iwata, Y., Bourne, R., Rorabeck, C., Poole, A.R., 1994, Increased damage to type II collagen in osteoarthritic articular cartilage detected by a new immunoassay, *Journal of Clinical Investigation*, 93(4), 1722-1732.
- Huang, Y., Onyeri, S., Siewe, M., Moshfeghian, A., Madihally, S.V., 2005, In vitro characterization of chitosan–gelatin scaffolds for tissue engineering, *Biomaterials*, 26, 7616-7627.
- Hubbell, J.A., 1999, Bioactive biomaterials, *Curr Opin Biotechnol*, 10, 123-129.
- Hutmacher, D.W., 2000, Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage, *Biomaterials* 21, 2529–43.

- Hwang, N.S., Varghese, S., Zhang, Z., Elisseeff, J., 2006, Chondrogenic differentiation of human embryonic stem cell-derived cells in arginine-glycine-aspartate modified hydrogels, *Tissue Engineering*, 12, 2695-2706.
- Im, G.I., 2005, Chondrogenesis from mesenchymal stem cells derived from adipose tissue on the fibrin scaffold, *Current Applied Physics*, 5, 438-443.
- Indrawattana, N., Chen, G.P, Tadokoro, M., Shann, L.H., Ohgushi, H. Tateishi, T., 2004, Growth factor combination for chondrogenic induction from human mesenchymal stem cell, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 320, 914-919.
- Ingber, D., Karpp, S., Plopper, G., Hansed, L., Mooney, D., 1993, *Physical Forces and the Mammalian Cell*, Chap. 2, Academic Press, New York, 61p.
- Ito, Y., 1998, Regulation of cell functions by micropattern-immobilized biosignal molecules, *Nanotechnology*, 9, 200–204.
- Ito, Y., 1998a, Tissue engineering by immobilized growth factors, *Mat Sci Eng C*, 6, 267–274.
- Ito, Y., Li, J.S., Takahashi, T., Imanishi, Y., Okabayahashi, Y., Kido, Y., Kasuga, M., 1997, Enhancement of the mitogenic effect by artificial juxtacrine stimulation using immobilized EGF, *J Biochem*, 121, 514–520.
- Jakob, M., Demarteau, O., Schafer, D., Hintermann, B., Dick, W., Heberer, M., Martin, I., 2001, Specific growth factors during the expansion and redifferentiation of adult human articular chondrocytes enhance chondrogenesis and cartilaginous tissue formation *in vitro*, *J Cell Biochem*, 81, 368-377.
- Jin, X.B., Sun, Y.S., Zhang, K., Wang, J., Ju, X.D., Lou, S.Q., 2007, Neocartilage formation from predifferentiated human adipose derived stem cells in vivo, *Acta Pharmacologica Sinica*, 28, 663-671.
- Jukes, J.M., Moroni, L.vBC., de Boer, J., 2008, Critical Steps toward a Tissue-Engineered Cartilage Implant Using Embryonic Stem Cells, *Tissue Eng Part A*, 14, 135-47.
- Junqueira, L.C., Carneiro J., 2005, *Basic Histology Text & Atlas*, McGraw – Hill Medical; 11th edition, ISBN 978-0071440912, USA, 502p.
- Kameda, T., Koike, C., Saitoh, K., Kuroiwa, A., Iba, H., 2000, Analysis of cartilage maturation using micromass cultures of primary chondrocytes, *Development Growth & Differentiation*, 42, 229-236.
- Karakecili, A.G., Demirtas T.T., Satriano, C., Gümüşderelioglu, M., Marletta G., 2007, Evaluation of L929 fibroblast attachment and proliferation on Arg-Gly-Asp-Ser (RGDS)-immobilized chitosan in serum-containing/serum-free cultures, *JBB*, 1, 69-77.

- Karakeçili A.G., 2006, Mikrodeseeni biyoaktif malzemelerin dizaynı, karakterizasyonu ve doku mühendisliğindeki uygulamaları. Doktora Tezi. Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 184s.
- Karp, J.M., Ferreira, L.S., Khademhosseini, A., Kwon, A.H., Yeh, J., Langer, R.S., 2006, Cultivation of human embryonic stem cells without the embryoid body step enhances osteogenesis in vitro, *Stem Cells*, 24, 835-843.
- Kazaroğlu, N.M., 2009, Yara örtüleri için alternatif doku iskeleleri: in vitro çalışmalar. Yüksek Lisans Tezi, Başkent Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 126s.
- Kempen, D.H.R., Lu, L., Hefferan, T.E., Creemers, L.B., Maran, A., Classic, K.L., Dhert, W.J.A., Yaszemski, M.J., 2008, Retention of in vitro and in vivo BMP-2 bioactivities in sustained delivery vehicles for bone tissue engineering, *Biomaterials*, 29, 3245–3252.
- Khor, E., Lim, L.Y., 2003, Implantable applications of chitin and chitosan, *Biomaterials*, 24, 2339-2349.
- Kierszenbaum, A.L., 2006, Histoloji ve Hücre Biyolojisi, (çev.ed: Ramazan Demir), Palme Yayıncılık, ISBN 9944-341-02-9, Ankara, 618s.
- Kim, I.Y., Seo, S.J., Moon, H.S., Yoo, M.K., Park, I.Y., Kim, B.C., Cho, C.S., 2008, Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications, *Biotechnol Adv.*, 26(1), 1-21.
- Kim, S.E., Park, J.H., Cho, Y.W., Chung, H., Jeong, S.Y., Lee, E.B., Kwon, I.C., 2003, Porous chitosan scaffold containing microspheres loaded with transforming growth factor-beta 1: implications for cartilage tissue engineering, *Journal of Controlled Release*, 91, 365–374.
- Kim, Y.J., Sah, R.L., Doong, J.Y., 1988, Grodzinsky A.J., Fluorometric assay of DNA in cartilage explants using Hoechst 33258, *Anal Biochem*, 174, 168–176.
- Kisiday, J.D., Kopesky, P.W., Evans, C.H., Grodzinsky, A.J., McIlwraith, C.W., Frisbie, D.D., 2008, Evaluation of adult equine bone marrow- and adipose-derived progenitor cell chondrogenesis in hydrogel cultures, *Journal of Orthopaedic Research*, 26, 322-331.
- Koay, E.J., Hoben, G.M.B., Athanasiou, K.A., 2007, Tissue engineering with chondrogenically differentiated human embryonic stem cells, *Stem Cells*, 25, 2183-2190.
- Korossis, S.A., Bolland, F., Kearney, J.N., Fisher, J., Ingham, E., 2005, Chapter 8 Bioreactors in tissue engineering. *Topics in Tissue Engineering*. Ashammakhi N., Reis R.L., (eds.), Helsinki. 24p.

- Krajewska, B., 2005, Membrane-based processes performed with use of chitin/chitosan materials, *Separation and Purification Technology*, 41, 305-312.
- Kuo, S.M., Chang, S.J., Lin, L.C., Chen, C.J., 2003, Evaluating chitosan/ β -tricalcium phosphate/poly(methylmethacrylate) cement composites as bone-repairing materials, *Journal of Applied Polymer Science*, 89, 14, 3897-3904.
- Lahiji, A., Sohrabi, A., Hungerford, D.S., Frondoza, C.G., 2000, Chitosan supports the expression of extracellular matrix proteins in human osteoblasts and chondrocytes, *J Biomed Mater Res*, 51, 586-95.
- Langer, R., Vacanti, J.P., 1993, Tissue engineering, *Science*, 260, 920-927.
- Lanza, R.P., Langer, R., Vacanti, J., 2000, Chapter 13 Tissue engineering bioreactors, *Principles of Tissue Engineering*, Academic Press, New York, pp: 143-153.
- Lee, J.E., Kim, S.E., Kwon, I.C., Ahn, H.J., Cho, H., Lee, S.H., Kim, H.J., Seong, S.C., Lee, M.C., 2004, Effects of a chitosan scaffold containing TGF- β 1 encapsulated chitosan microspheres on in vitro chondrocyte culture, *Artificial Organs*, 28, 9, 829-839.
- Li, J., Gong, Y.D., Zhao, N.M., Zhang, X.F., 2005, Preparation of N-butyl chitosan and study of its physical and biological properties. *Journal of Applied Polymer Science*, 98, 3, 1016-1024.
- Li, J., Yun, H., Gong, Y., Zhao, N., Zhang, X., 2006, Investigation of MC3T3-E1 cell behavior on the surface of GRGDS-coupled chitosan, *Biomacromolecules*, 7, 1112-1123.
- Li, K., Qu, X., Wang, Y., Tang, Y., Qin, D., Wang, Y., Feng, M., 2005, Improved performance of primary rat hepatocytes on blended natural polymers, *J Biomed Mater Res: Part A*, 75 (2), 268-74.
- Li, K., Wang, Y., Miao, Z., Xu, D., Tang, Y., Feng, M., 2004, Chitosan/gelatin composite microcarrier for hepatocyte culture, *Biotechnology Letters*, 26, 879-83.
- Li, Z., Zhang, M., 2005, Chitosan-alginate as scaffolding material for cartilage tissue engineering, *J Biomed Mater Res: Part A*, 75, 2, 485-93.
- Lindahl, U., Hook, M., 1978, Glycosaminoglycans and their binding to biological macromolecules, *Annual Review of Biochemistry*, 47, 385-417.
- Liu, H., Yao, F., Zhou, Y., Yao, K., 2005, Porous poly (DL-lactic acid) modified chitosan-gelatin scaffolds for tissue engineering, *Journal of Biomaterials Applications*, 19, 303-322.

- Liu, H., Yin, Y., Yao, K., 2007, Construction of chitosan-gelatin-hyaluronic acid artificial skin in vitro, *Journal of Biomaterials Applications*, 21 (4), 413-430.
- Liu, S.Q., Ito Y., Imanishi Y., 1992, Cell growth on immobilized cell growth; 4: interaction of fibroblast cells with insulin immobilized on poly(methyl methacrylate) membrane, *J Biophys Biochem Method*, 25, 139–148.
- Lu, G., Zhu, L., Kong, L., Zhang, L., Gong, Y., Zhao, N., Zhang, X., 2006, Porous chitosan microcarriers for large scale cultivation of cells for tissue engineering: fabrication and evaluation, *Tsinghua Science and Technology*, 11, 4, 427- 432.
- Ma, J., Wang, H., He, B., Chen, J., 2001, A Preliminary in vitro study on the fabrication and tissue engineering applications of a novel chitosan bilayer material as a scaffold of human neonatal dermal fibroblasts, *Biomaterials*, 22, 331-336.
- Madihally, S.V., Matthew, H.W.T., 1999, Porous chitosan scaffolds for tissue engineering, *Biomaterials*, 20, 1133-1142.
- Malafaya, P.B., Pedro, A.J., Peterbauer, A., Gabriel, C., Redl, H., Reis, R.L., 2005, Chitosan particles agglomerated scaffolds for cartilage and osteochondral tissue engineering approaches with adipose tissue derived stem cells, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 16, 1077-1085.
- Marlovits, S., Zeller, P., Singer, P., Resinger, C., Vecsei, V., 2006, Cartilage repair: generations of autologous chondrocyte transplantation, *European Journal of Radiology*, 57, 24-31.
- Martin, I., Obradovic, B., Treppo, S., Grodzinsky, A.J., Langer, R., Freed, L.E., Vunjak-Novakovic, G., 2000, Modulation of the mechanical properties of tissue engineered cartilage, *Biorheology*, 37, 141–148.
- Martin, I., Wendt, D., Heberer, M., 2004, The role of bioreactors in tissue engineering, *Trends Biotechnol*, 22, 80–86.
- Masuko, T., Iwasaki, N., Yamane, S., Funakoshi, T., Majima, T., Minami, A., Ohsuga, N., Ohta, T., Nishimura, S., 2005, Chitosan-RGDSSGGC conjugate as a scaffold material for musculoskeletal engineering, 26, 5339-5347.
- Mauck, R.L., Seyhan, S.L., Ateshian, G.A., Hung, C.T., 2002, Influence of seeding density and dynamic deformational loading on the developing structure/function relationships of chondrocyte-seeded agarose hydrogels, *Ann Biomed Eng.*, 30, 1046–1056.
- Mc Mahon, L.A., Baron, V., Prina-Melloa, A., Prendergast, P.J., 2004, Chapter 4, State-of-the-art in cartilage bioreactors, *Topics in Bio-Mechanical Engineering*, 94-146.
- Meyer, U., Wiesmann, H.P., 2006, *Bone and Cartilage Engineering*, Springer, New York. 37p.

- Mi, F.L., Shyu, S.S., Wu, Y.B., Lee, S.T., Shyong, J.Y., Huang, R.N., 2001, Fabrication and characterization of a sponge-like asymmetric chitosan membrane as a wound dressing, *Biomaterials*, 22, 165-173.
- Mi, F.L., Sung, H.W., Shyu, S.S., 2002, Drug release from chitosan-alginate complex beads reinforced by a naturally occurring cross-linking agent, *Carbohydr Polym*, 48, 61-72.
- Mi, F.L., Tan, Y.C., Liang, H.F., Sung, H.W., 2002, In vivo biocompatibility and degradability of a novel injectable-chitosan-based implant, *Biomaterials*, 23 (1) 181-191.
- Mizuno, S., Allemann, F., Glowacki, J., 2001, Effects of medium perfusion on matrix production by bovine chondrocytes in three-dimensional collagen sponges, *Journal of Biomedical Materials Research*, 56(3), 368-375.
- Muzzarelli, C., Muzzarelli, R.A.A., 2002, Natural and artificial chitosan-inorganic composites, *J Inorg Biochem*, 92, 89-94.
- Nagel-Heyer S., Goepfert C., Feyerabend F., Petersen J.P., Adamietz P., Meenen N.M., Pörtner R., 2005, Bioreactor cultivation of three-dimensional cartilage-carrier-constructs, *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 27(4), 273-280.
- Neitzel, G.P., Nerem, R.M., Sambanis, A., Smith, M.K., Wick, T.M., Brown, J.B., Hunter, C., Jovanovic, I., Malaviya, P., Saini, S., Tan, S., 1998, Cell Function and Tissue Growth in Bioreactors: Fluid-Mechanical and Chemical Environments, Joint 1st Pan-Pacific Basin and 4th Japan–China Work-shop on Microgravity Sciences, July 8–11 1998, Tokyo, Japan. pp. 875-876.
- Nesic, D., Whiteside, R., Brittberg M., Wendt D., Martin I., Mainil-Varlet P., 2006, Cartilage tissue engineering for degenerative joint disease, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 58 300– 322.
- Obradovic, B., Martin, I., Padera, R.F., Treppo, S., Freed, L.E., Vunjak-Novakovic, G., 2001, Integration of engineered cartilage, *Journal of Orthopaedic Research*, 19, 1089-1097.
- Pachence, J.M., Kohn, J., 2000, Biodegradable polymers. *Principles of Tissue Engineering*. 2nd edition. Lanza, R.P., Langer, R., Vacanti, J. (eds.), Academic Press, California. pp. 251-262.
- Parkkinen, J.J., Ikonen, J., Lammi, M.J., Laakkonen, J., Tammi, M., Helminen, H.J., 1993, Effects of cyclic hydrostatic-pressure on proteoglycan synthesis in cultured chondrocytes and articular-cartilage explants, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 300(1), 458-465.
- Pazzano, D., Mercier, K.A., Moran, J.M., Fong, S.S., DiBiasio, D.D., Rulfs, J.X., Kohles S.S., Bonassar, L.J., 2000, Comparison of chondrogenesis in static and perfused bioreactor culture, *Biotechnology Progress*, 16(5), 893-896.

- Pei, M., Seidel, J., Vunjak-Novakovic, G., Freed, L.E., 2002, Growth factors for sequential cellular de- and re-differentiation in tissue engineering, *Biochem Biophys Res Commun.*, 294, 149–154.
- Peng, C.K., Yu, S.H., Mi, F.L., Shyu, S.S., 2006, Polysaccharide-based artificial extracellular matrix: preparation and characterization of three-dimensional, macroporous chitosan and chondroitin sulfate composite scaffolds, *Journal of Applied Polymer Science*, 99, 2091–2100.
- Peng, L., Cheng, X.R., Wang, J.W., Xu, D.X., Wang, G., 2006, Preparation and evaluation of porous chitosan/collagen scaffolds for periodontal tissue engineering, *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 21, 207-220.
- Pörtner, R., Heyer, S.N., Goepfert, C., Adamietz, P., Meenen, N.M., 2005, Bioreactor design for tissue engineering, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 100 (3), 235–245.
- Prasitsilp, M., Jenwithisuk, R., Kongsuwan, K., Damrongchai, N., Watts, P., 2000, Cellular responses to chitosan in vitro: the importance of deacetylation, *J Mater Sci Mater Med.*, 12, 773-778.
- Ragan, P.M., Badger, A.M., Cook, M., Chin, V.I., Gowen, M., Grodzinsky, A.J., Lark, M.W., 1999, Down-regulation of chondrocyte aggrecan and type-II collagen gene expression correlates with increases in static compression magnitude and duration, *Journal of Orthopaedic Research*, 17(6), 836-842.
- Raimondi, M.T., Falcone, L., Colombo, M., Remuzzi, A., Marinoni, E., Marazi, M., Rapisarda, V., Pietrabissa, R., 2004, A comparative evaluation of chondrocyte/scaffold constructs for cartilage tissue engineering, *Journal of Applied Biomaterials & Biomechanics*, 2, 55-64.
- Ramkisson-Ganorkar, C., Liu, F., Baudys, M., Kim, S.W., 1999, Modulating insulin release profile from pH/thermosensitive polymeric beads through polymer molecular weight, *J Control Rel*, 59, 287–298.
- Rathke, T.D., Hudson, S.M., 1994, Review of chitin and chitosan as fiber and film formers, *Reviews in Macromolecular Chemistry & Physics*, C34, 375-437.
- Reddi, A.H., 1998, *Nature Biotechnology*, 16, 247-252.
- Renbutsu, E., Hirose, M., Omura, Y., Nakatsubo, F., Okamura, Y., Okamoto, Y., Saimoto, H., Shigemasa Y., Minami S., 2005, Preparation and biocompatibility of novel uv-curable chitosan derivatives, *Biomacromolecules*, 6(5) 2385-2388.
- Rhee, H.W., 2001, Permanent phenotypic and genotypic changes of prostate cancer cells cultured in a three-dimensional rotating-wall vessel, *In vitro Cell Dev. Biol. Anim.*, 37, 127–140.

- Risbud, M., Ringe, J., Bhonde, R., Sittering, M., 2001, *In vitro* expression of cartilage-specific markers by chondrocytes on a biocompatible hydrogel: implications for engineering cartilage tissue, *Cell Transplant*, 10, 755–763.
- Risbud, V.M., Sittering, M., 2002, Tissue engineering: advances in in vitro cartilage generation, *Trends in Biotechnology*, 20(8), 351-356.
- Ross, M.H., Kaye, G.I., Pawlina W., 2003, *Histology*, Chapter:7, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia. pp.474-531.
- Sachlos, E. and Czernuszka, J.T., 2003, Making tissue engineering scaffolds work. Review on the application of solid freeform fabrication technology to the production of tissue engineering scaffolds, *European cells and Materials*, 5, 29-40.
- Salgado, A.J., Coutinho, O.P., Reis, R.L., 2004, Bone tissue engineering: state of art and future trends, *Macromolecular Bioscience*, 4, 743-765.
- Schlichting, H., 1960, Origin of turbulence II. In: Drake RM, Kline RM, editors. *Boundary Layer Theory*. McGraw-Hill Book Company, New York. pp. 409-456.
- Sekiya, I., Colter, D.C., Prockop, D.J., 2001, BMP-6 enhances chondrogenesis in a subpopulation of human marrow stromal cells, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 284, 411-418.
- Seol, Y.J., Lee, J.Y., Park, Y.J., Lee, Y.M., Ku, Y., Rhyu, I.C., Lee, S.J., Han, S.B., Chung, C.P., 2004, Chitosan sponges as tissue engineering scaffolds for bone formation, *Biotechnology Letters*, 26, 1037-1041.
- Sharma, B., Elisseeff, J.H., 2004, Engineering structurally organized cartilage and bone tissues, *Annals of Biomedical Engineering*, 32, 148-159.
- Shen, F., Cui, Y.L., Yang, L.F., Yao, K.D., Dong, X.H., Jia, W.Y., Shi, H.D., 2000, A study on the fabrication of porous chitosan/gelatin network scaffold for tissue engineering, *Polymer International*, 49, 1596-1599.
- Sittering, M, Bujia, J, Minuth, W.W., Hammer, C., Burmester, G.R., 1994, Engineering of cartilage tissue using bioresorbable polymer carriers perfusion culture, *Biomaterials*, 15(6):451-456.
- Smith RL, Donlon BS, Gupta MK, Mohtai M, Das P, Carter DR, Gibbons, G., Hutchinson, N., Schurman, D.J., 1995, Effects of fluid-induced shear on articular chondrocyte morphology and metabolism in vitro, *Journal of Orthopaedic Research*, 13(6), 824-831.
- Socrates, G., 1998, *Infrared characteristic group frequencies tables and charts*, 2nd ed. Wiley, New York. pp. 74–79.

- Subramanian, A., Lin, H.Y., 2005, Crosslinked chitosan: Its physical properties and the effects of matrix stiffness on chondrocyte cell morphology and proliferation, *Journal of Biomedical Materials Research*, 75A, 742-753.
- Suh, J.K.F., Matthew, H.W.T., 2000, Application of chitosan based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: a review, *Biomaterials*, 21, 2589-2598.
- Sze, S.K., de Kleijn, D.P.V., Lai, R.C., Tan, E.K.W., Zhao, H., Yeo, K.S., Low, T.Y., Lian, Q., Lee, C.N., Mitchell, W., Oakley, R.M.E., Lim, S-K., 2007, Elucidating the secretion proteome of human embryonic stem cell-derived mesenchymal stem cells, *Molecular & Cellular Proteomics*, 6, 1680-1689.
- Şenköylü, A., Şimşek, A., Şahin, F.I., Menevşe, S., Özoğul, C., Denkbaş, E.B., Pişkin, E., 2001, Interaction of cultured chondrocytes with chitosan scaffold, *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 16, 136-144.
- Tallheden, T., Dennis, J.E., Lennon, D.P., Sjögren-Jansson, E., Caplan, Al., Lindahl, A., 2005, Phenotypic plasticity of human articular chondrocytes. *J Bone Joint Surg Am.*, 85, 93–100.
- Tare, R.S., Howard, D., Pound, J.C., Roach, H.I., Oreffo, R.O.O., 2005, Tissue engineering strategies for cartilage generation—Micromass and three dimensional cultures using human chondrocytes and a continuous cell line, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 333, 609–621.
- Temenoff, J.S., Mikos, A.G., 2000, Review: tissue engineering for regeneration of articular cartilage, *Biomaterials*, 21, 431-440.
- The, T.H., Feltkamp, T.E.W., 1970, Conjugation of fluorescein isothiocyanate to antibodies, *Immunology*, 18(6), 865-873.
- Thomson, J.A., 1998, Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts, *Science*, 282, 1827-1827.
- Tıǧlı, R.S., Ghosh S., Laha M., Shevde N. K., Daheron L., Gimble J., Gümüşderelioğlu M., Kaplan D. L., 2009, Comparative Chondrogenesis of Human Cell Sources in 3D Scaffolds, *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, (baskıda).
- Tıǧlı, R.S., Akman, A.C., Gümüşderelioğlu, M., Nohutçu, R.M., 2009, In vitro release kinetics of dexamethasone and bFGF from chitosan-hydroxyapatite scaffolds, *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, (baskıda).
- Tıǧlı, R.S., Gümüşderelioğlu, M., 2008, Evaluation of RGD- or EGF-immobilized scaffolds for chondrogenic activity, *International Journal of Biological Macromolecules*, 43(2), 121-128.

- Tıǧlı, R.S., Karakeçili, A., Gümüşderelioǧlu, M., 2007, In-vitro characterization of chitosan scaffolds: influence of composition and deacetylation degree, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 18, 1665-1674.
- Tomihata, K., Ikada, I., 1997, In vitro and in vivo degradation of films of chitin and its deacetylated derivatives, *Biomaterials*, 18(7), 567-75.
- Tuan, R.S., Boland, G., Tuli, R., 2003, Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering, *Arthritis Res Ther*, 5, 32–45.
- Tuzlakoǧlu, K., Alves, C.M., Mano, J.F., Reis, R.L., 2004, Production and characterization of chitosan fibers and 3-D fiber mesh scaffolds for tissue engineering applications, *Macromolecular Bioscience*, 4, 811–819.
- Unsworth, B.R., Lelkes, P.I., 1998, Growing tissues in microgravity, *Nat Med*, 4, 901–907.
- van Tienen, T.G., Heijkants, R.G., Buma, P., de Groot, J.H., Pennings, A.J., Veth, R.P., 2002, Tissue ingrowth and degradation of two biodegradable porous polymers with different porosities and pore sizes, *Biomaterials*, 23, 1731–1738.
- von der Mark, K., Gauss, V., von der Mark, H., Muller, P., 1977, Relationship between cell shape and type of collagen synthesised as chondrocytes lose their cartilage phenotype in culture, *Nature*, 267, 531-532.
- VunjakNovakovic, G., Freed, L.E., Biron, R.J., Langer, R., 1996, Effects of mixing on the composition and morphology of tissue-engineered cartilage, *Aiche Journal*, 42(3), 850-860.
- Vunjak-Novakovic, G., Martin, I., Obradovic, B., Treppo, S., Grodzinsky, A.J., Langer, R., Freed, L.E., 1999, Bioreactor cultivation conditions modulate the composition and mechanical properties of tissue engineered cartilage, *J Orthop Res.*, 17, 130–138.
- Vunjak-Novakovic, G., Meinel, L., Altman, G., Kaplan, D., 2005, Bioreactor cultivation of osteochondral grafts, *Orthod Craniofacial Res.*, 8, 209–218.
- Vunjak-Novakovic, G., Obradovic, B., Martin, I., Freed, L.E., 2002, Bioreactor studies of native and tissue engineered cartilage, *Biorheology*, 39, 259–268.
- Wakitani, S., Goto, T., Pineda, S.J., Young, R.G., Mansour, J.M., Caplan, A.I., Goldberg, V.M., 1994, Mesenchymal Cell-Based Repair of Large, Full-Thickness Defects of Articular-Cartilage, *Journal of Bone and Joint Surgery-American Volume*, 76A, 579-592.
- Wakitani, S., Takagi, M., Fukui, Y., Yoshida, T., 2004, Effect of poly DL-lactic-co-glycolic acid mesh on a three-dimensional culture of chondrocytes, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 98, 477-481.

- Wan, Y., Wu, H., Wen, D., 2004, Porous-conductive chitosan scaffolds for tissue engineering, *Macromol Biosci.*, 4, 882-890.
- Wang, J.W., Hon, M.H., 2003, Sugar-mediated chitosan/poly(ethylene glycol)-beta-dicalcium pyrophosphate composite: mechanical and microstructural properties, *Journal of Biomedical Materials Research*, 64A, 262–272.
- Wang, X.H., Li, D.P., Wang, W.J., Feng, Q.L., Cui, F.Z., Xu, Y.X., Song, X.H., Werf, M., 2003, Crosslinked collagen/chitosan matrix for artificial livers, *Biomaterials*, 24, 3213-3220.
- Wang, Y.Z., Blasioli, D.J., Kim, H.J., Kim, H.S., Kaplan, D.L., 2006, Cartilage tissue engineering with silk scaffolds and human articular chondrocytes, *Biomaterials*, 27, 4434-4442.
- Wang, Y.Z., Kim, U.J., Blasioli, D.J., Kim, H-J., Kaplan, D.L., 2005, In vitro cartilage tissue engineering with 3D porous aqueous-derived silk scaffolds and mesenchymal stem cells, *Biomaterials*, 26, 7082-7094.
- Wells, A., Welsh, J.B., Lazar, C.S., Wiley, H.S., Gill, G.N., Rosenfeld, M.G., 1990, Ligand-induced transformation by a non-internalizing epidermal growth factor receptor, *Science*, 247, 962–964.
- Wendt, D., Marcel, J., Martin, I., 2005, Bioreactor-based engineering of osteochondral grafts: from model systems to tissue manufacturing, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 100(5), 489–494.
- Williams, C.G., Kim, T.K., Taboas, A., Malik, A., Manson, P., Elisseeff, J., 2003, In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in a photopolymerizing hydrogel, *Tissue Eng Part A*, 9, 679–688.
- Williams, K.A., 2002, Computational fluid dynamics modeling of steady-state momentum and mass transport in a bioreactor for cartilage tissue engineering, *Biotechnol. Prog.*, 18, 951–963.
- Wise, D.L., 2000, *Biomaterials and Bioengineering Handbook*. Marcel Dekker Inc., pp. 366-68.
- Wobus, A.M., Holzhausen, H., Jakel, P., Schöneich, J., 1984, Characterization of a Pluripotent Stem-Cell Line Derived from a Mouse Embryo, *Experimental Cell Research*, 152, 212-219.
- Wu, M., Yang, L., Liu, S., Li, H., Hui, N., Wang, F., Liu, H., 2006, Differentiation potential of human embryonic mesenchymal stem cells for skin-related tissue, *British Journal of Dermatology*, 155, 282-291.
- Yamane, S. , Iwasaki, N., Majima, T. , Funakoshi, T. , Masuko, T. , Harada, K. , Minami, A., Monde, K., Nishimura, S., 2005, Feasibility of chitosan-based hyaluronic acid hybrid biomaterial for a novel scaffold in cartilage tissue engineering, *Biomaterials*, 26, 611–619.

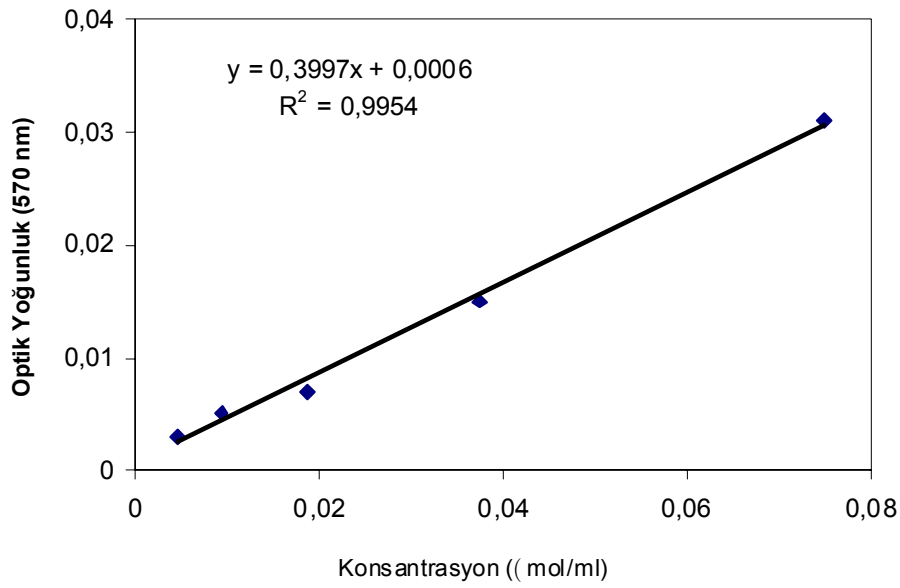
- Yan, J., Li, X., Liu, L., Wang, F., Zhu, T.W., Zhang, Q., 2006, Potential use of collagen-chitosan-hyaluronan tri-copolymer scaffold for cartilage tissue engineering, *Artificial Cells, Blood Substitutes and Biotechnology*, 34, 27-39.
- Yi, H., Wu, L.Q., Bentley, W.E., Ghodssi, R., Rubloff, G.W., Culver, J.N., Payne, G.F., 2005, Biofabrication with chitosan, *Biomacromolecules*, 6(6), 2881-2894.
- Yoon, J.J., Song, S.H., Lee, D.S., Park, T.G., 2004, Immobilization of cell adhesive RGD peptide onto the surface of highly porous biodegradable polymer scaffolds fabricated by a gas foaming/salt leaching method, *Biomaterials*, 25, 5613–5620.
- Yu, X., Bichtelen, A., Wang, X., Yan, Y., Lin, F., Xiong, Z., Wu, R.O., Zhang, R., Lu, Q., 2005, Collagen/chitosan/heparin complex with improved biocompatibility for hepatic tissue engineering, *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 20, 15-28.
- Yuan, Y., Zhang, P., Yang, Y., Wang, X., Gu, X., 2004, The interaction of schwann cells with chitosan membranes and fibers in vitro, *Biomaterials*, 25, 4273-4278.
- Zeltinger, J., Sherwood, J.K., Graham, D.A., Mueller, R., Griffith, L.G., 2001, Effect of pore size and void fraction on cellular adhesion, proliferation, and matrix deposition, *Tissue Engineering*, 7, 557–572.
- Zhang, Y., Zhang, M., 2001, Synthesis and characterization of macroporous chitosan/calcium phosphate composite scaffolds for tissue engineering, *Journal of Biomedical Materials Research*, 55, 3, 304-312.
- Zheng, J., Ito, Y., Imanishi, Y., 1995, Growth enhancement of anchorage-dependent and anchorage-independent cells by co-immobilization of insulin with poly(allylamine) or gelatin, *Biotechnol. Prog.*, 11, 667-681.
- Zhu, A., Zhang, M., Wu, J., Shen, J., 2002, Covalent immobilization of chitosan/heparin complex with a photosensitive hetero-bifunctional crosslinking reagent on PLA surface, *Biomaterials*, 23, 4657-4665.

EKLER

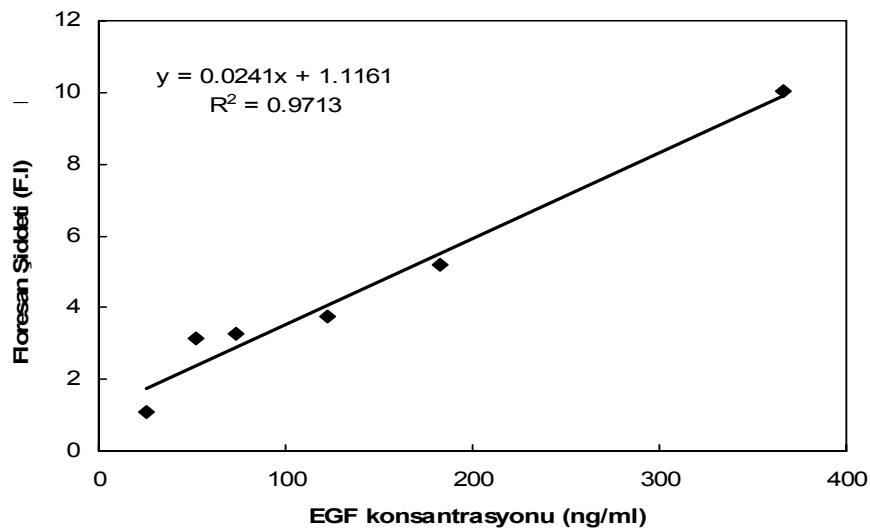
EK-1

KANTİTATİF RGD VE EGF TAYİN YÖNTEMLERİ İÇİN HAZIRLANAN KALİBRASYON GRAFİLERİ

NİNHİDRİN KALİBRASYON GRAFİĞİ



EGF KALİBRASYON GRAFİĞİ

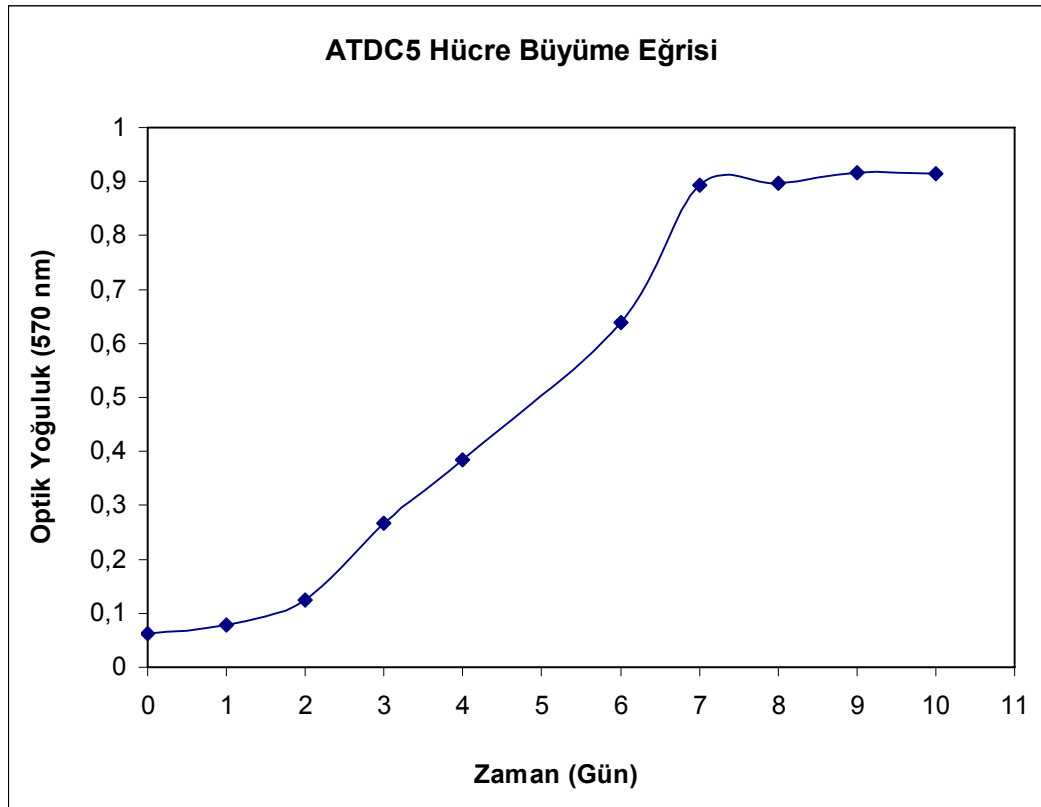


EK-2

ATDC5 HÜCRE HATTI KARAKTERİZASYON ÇALIŞMALARI

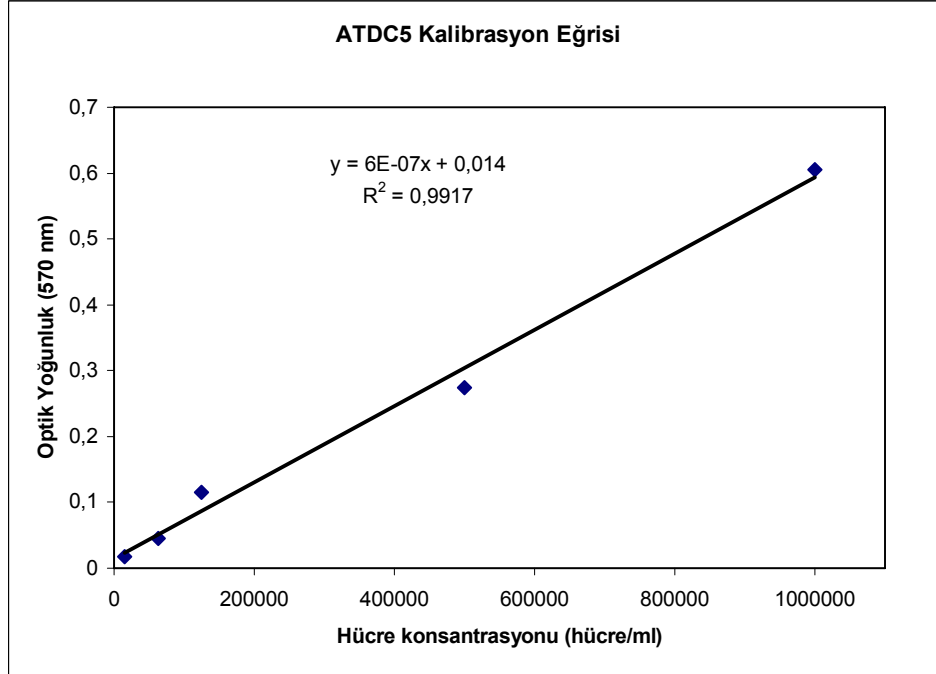
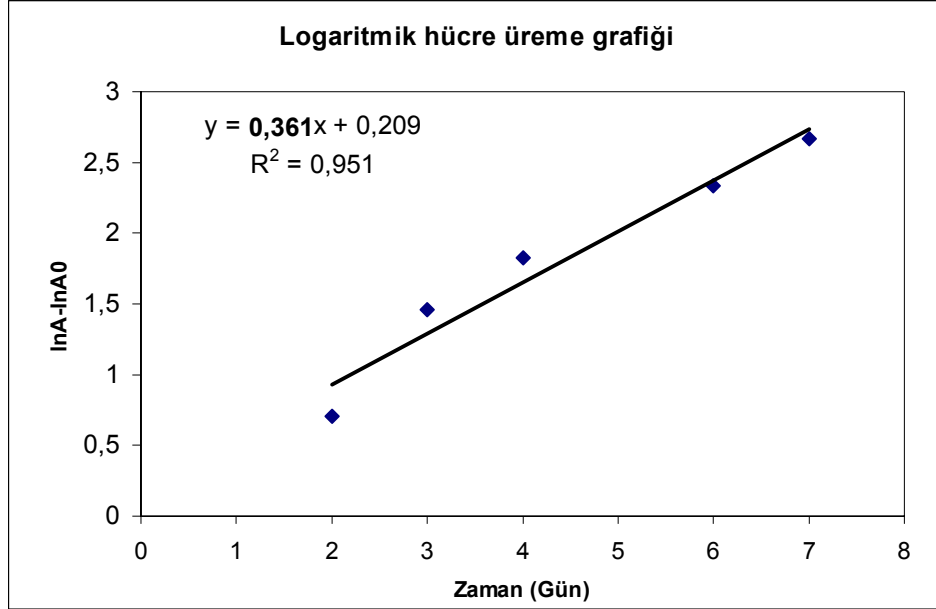
HÜCRE ÜREMESİNE AİT ÖZGÜL ÜREME HIZI (μ , saat^{-1}) ve HÜCRE İKİLENME SÜRESİNİN (t_d , saat) HESAPLANMASI

Çalışmada kullanılan ATDC5 kondrojenik hücrelerinin Petri kaplarındaki üreme davranışı Bölüm 3.3.3'te açıklanan *MTT yöntemi* ile belirlenmiştir. Hücrelerin 10 günlük inkübasyonu boyunca MTT testi sonucu elde edilen absorbans değerlerine karşılık zaman grafiği çizilmiş, bu sayede hücre büyüme eğrisi elde edilmiştir.



Hücre büyüme eğrisi sonucu, hücrelerin ikinci ve yedinci günler arasında üstel üreme fazında (logaritmik faz) oldukları belirlenmiştir. Bu dönemde Eşitlik 3.3 ve 3.4'ten yararlanılarak hücrelerin özgül üreme hızı (μ) ve ikilenme süreleri (t_d) hesaplanmıştır. Özgül üreme hızlarının hesaplanması için Eşitlik 3.3'teki $\ln A - \ln A_0$ değerlerinin zamana karşı grafiğe geçirilmesiyle elde edilen doğrunun eğimi "özgül üreme hızı" (μ) olarak tespit edilmiştir. Absorbans değerlerinden hücre konsantrasyonuna geçebilmek için, bilinen hücre konsantrasyonları ile yapılan

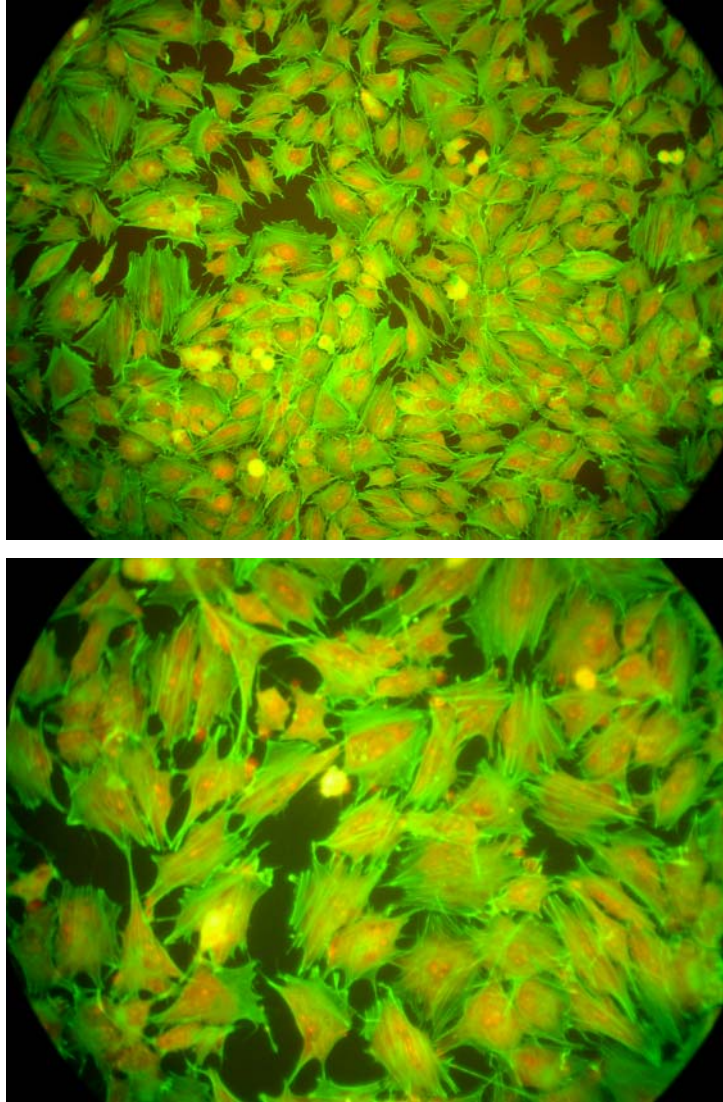
MTT analizi sonunda hücre sayısına karşılık gelen absorbans değerleri grafiğe geçirilerek bir kalibrasyon grafiği elde edilmiştir. Özgül üreme hızının saptanması için gerekli olan grafikte (logaritmik hücre üreme grafiği) başlangıç absorbans değeri (A_0) ATDC5 kalibrasyon eğrisi kullanılarak elde edilmiştir.



Çalışmamızda, ATDC5 hücreler için özgül üreme hızı, $0,015 \text{ sa}^{-1}$ ve ikilenme süresi 46 saat olarak tespit edilmiştir.

ATDC5 KONDROJENİK HÜCRE MORFOLOJİLERİ

Çalışmamızda kullanılan ATDC5 hücrelerinin Petri kaplarındaki morfolojileri ve hücresel iskelet organizasyonu Bölüm 3.3.4'te anlatılan immünofloresan boyama tekniği kullanılarak değerlendirilmiştir. Aşağıda floresan mikroskobu ile görüntülenen ATDC5 hücrelerin sırasıyla x20 ve x40 büyütmelerde fotoğrafları verilmiştir.

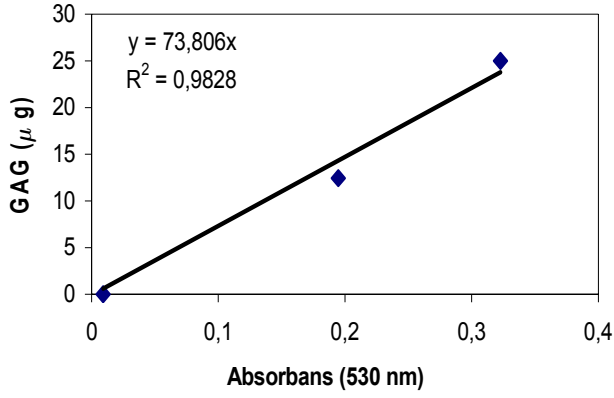


ATDC5 hücrelerinin epitel morfolojiye sahip oldukları saptanmıştır.

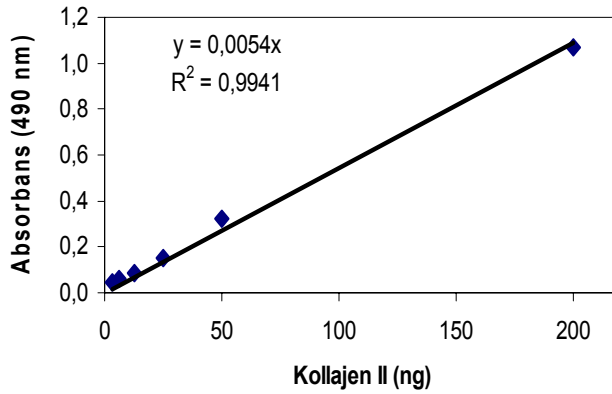
EK-3

BİYOKİMYASAL ANALİZ (GAG, KOLLAJEN II VE TOPLAM KOLLAJEN TAYİNİ) YÖNTEMLERİ İÇİN HAZIRLANAN KALİBRASYON GRAFİKLERİ

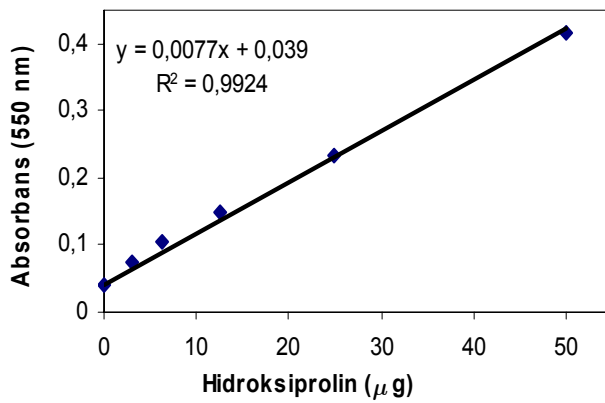
KONDROİTİN SÜLFAT KALİBRASYON GRAFİĞİ



KOLLAJEN II KALİBRASYON GRAFİĞİ



TOPLAM KOLLAJEN KALİBRASYON GRAFİĞİ

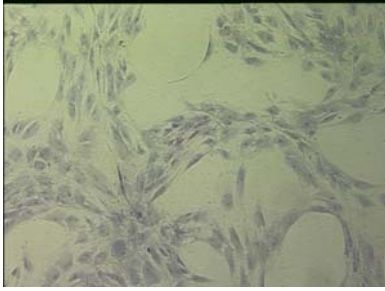


EK-4

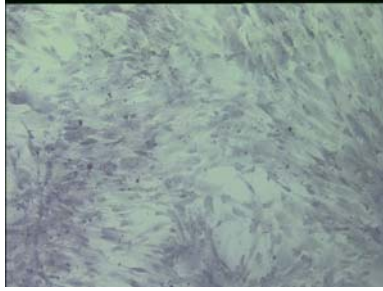
İNSAN KÖKENLİ KONDROSİT, MEZENKİMAL KÖK HÜCRE VE EMBRİYONİK KÖK HÜCRELERİN MORFOLOJİK KARAKTERİZASYONU

Çalışmada, Bölüm 3.4'te ayrıntılı olarak anlatılan hücre kaynaklarının 1 haftalık kültür sonrasında Petri kaplarındaki morfolojileri Giemsa boyaması uygulanarak optik invert mikroskop ile görüntülenmiştir. Embriyonik kök hücreler için Giemsa boyaması yapılmamıştır. Aşağıda optik mikroskobu ile görüntülenen hücrelerin x10 büyütmelerde fotoğrafları verilmiştir.

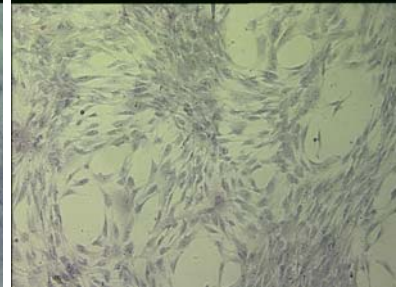
KONDROSİTLER



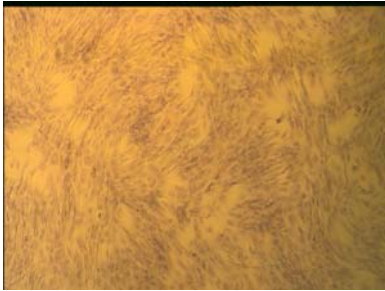
ED2 MSCs



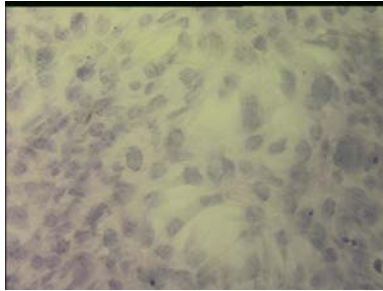
ED1 MSCs



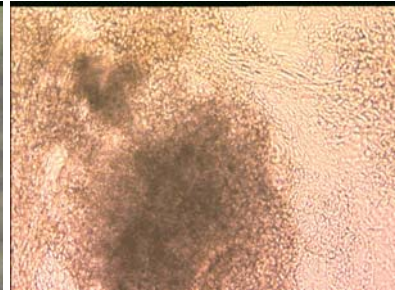
ASCs



BMSCs



ESCs



1. hafta sonunda kondrojenik kültür ortamı içerisinde kültüre edilen hücre kaynaklarından sadece BMSCs'lerin küresel hücre morfolojisine sahip oldukları belirlenmiştir. hESC'lerin ise karakteristik hücre kümeleri görüntülenmiştir.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Rahime Seda TIĞLI

Doğum Yeri : Isparta

Doğum Yılı : 1979

Medeni Hali : Bekar

Eğitim ve Akademik Durumu:

Lise : Antalya Anadolu Lisesi (1997)

Lisans : Hacettepe Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Bölümü (2001)

Yüksek Lisans : Hacettepe Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Bölümü (2003)

Yabancı Dil : İngilizce

İş Tecrübesi:

2001- Araştırma Görevlisi, Hacettepe Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Kimya Mühendisliği Bölümü, Ankara.