



T.C.

**ANKARA YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ÇOK KATLI DESELÜLERİZE AMNİYON ZARININ
EKLEM KIKIRDAĞI İÇİN DOKU İSKELESİ OLARAK
DEĞERLENDİRİLMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Sümeyye YÜKSEL

KAS İSKELET SİSTEMİ VE REJENERATİF TIP PROGRAMI

Ankara, 2020

T.C.
ANKARA YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ÇOK KATLI DESELÜLERİZE AMNİYON ZARININ
EKLEM KIKIRDAĞI İÇİN DOKU İSKELESİ OLARAK
DEĞERLENDİRİLMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Sümeyye YÜKSEL

KAS İSKELET SİSTEMİ VE REJENERATİF TIP PROGRAMI

Ankara, 2020

T.C.
ANKARA YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Çok Katlı Deselülerize Amniyon Zarının Eklem Kıkırdağı İçin Doku İskelesi Olarak
Değerlendirilmesi

Sümeyye YÜKSEL

Yüksek Lisans Tezi

Tez Savunma Sınav Tarihi

08.06.2020

Tez Danışmanları

Prof. Dr. Murat BOZKURT

Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Doğan AŞIK

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Halil Murat AYDIN

Prof. Dr. Murat BOZKURT

Doç. Dr. Nurdan ÇAY

Okuduğumuz ve Savunmasını dinlediğimiz bu tezin bir Yüksek Lisans derecesi için
gereken tüm kapsam ve kalite şartlarını sağladığını beyan ederiz.

Seyfullah Oktay ARSLAN

Enstitü Müdürü

Bu tezin Yüksek Lisans derecesi için gereken tüm şartları sağladığını tasdik ederim.

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda patent ve telif haklarını ihlal edici etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tezde kullanılmış olan tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi beyan ederim.

08.06.2020

Sümeyye YÜKSEL



TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın fikir aşamasından tamamlanmasına kadar geçen sürede benden desteğini esirgemeyen danışman hocamlarım Prof. Dr. Murat BOZKURT'a ve Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Doğan AŞIK'a;

Tezimin deney aşamalarında yardımıyla katkıda bulunan hocam Doç. Dr. Safa GÜRSOY'a ve laboratuvar çalışma arkadaşlarıma, Kobay Deney Hayvanları Laboratuvarı A.Ş. yetkilileri ve veteriner hekimlerine, Kırıkkale Üniversitesi Merkez Araştırma Laboratuvarları akademik personel ve hocalarına, Ankara Şehir Hastanesi Patoloji bölümündeki sevgili arkadaşım Dr. Betül GÜNBEY YILMAZ'a;

Lisans döneminden beri hayatımda olan ve kilometrelerce uzakta olsalar dahi destekleriyle motivasyonumu arttıran sevgili arkadaşlarım Deniz KARAGÖZ'e ve Sena ÇAYLAK'a;

Ayrıca yüksek lisans sürecinde ve tüm eğitim hayatım boyunca her adımda ve kararında bana destek olan annem, babam, ablam ve kardeşime en önemlisi de beni hiç yalnız bırakmadıkları için;

Sonsuz teşekkür ediyorum.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	iii
ABSTRACT	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
TABLolar DİZİNİ	vii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Eklem Kıkırdağı.....	2
2.1.1. Eklem Kıkırdağı Dejenerasyonu	5
2.1.2. Kıkırdak Dejenerasyonu Tedavisinde Kullanılan Yöntemler	6
2.2. Doku Mühendisliği ve Kıkırdak Doku Mühendisliği	8
2.2.1. Doku Mühendisliği Uygulama Yöntemleri.....	9
2.2.1.1. Doku İskelesi (Scaffold) Çeşitleri	12
2.2.1.2. Üretim Yöntemleri	12
2.3. Deselülerizasyon	15
2.3.1. Doku ve Organ Deselülerizasyon Yöntemleri	17
2.3.1.1. Fiziksel Yöntemler	18
2.3.1.2. Kimyasal Yöntemler	19
2.3.1.3. Enzimatik Yöntemler	22
2.3.2. Deselülerize Biyomateriyallerin Biyomedikal Alanında Kullanımları	23
2.3.3. Amniyon Zarı Deselülerizasyon Yöntemleri	24
2.3.3.1. Rejeneratif Tıp Çalışmalarında Amniyon Zarının Kullanım Alanları.....	27
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	30
3.1. Materyaller	30
3.2. Amniyon Zarının Toplanması ve Hazırlanması	30

3.3. Deselülerizasyon	31
3.4. Amniyon Zarının Saklanması	33
3.5. Deselülerize Amniyon Zarının Karakterizasyonu.....	33
3.6. Çok Katlı Deselülerize Amniyon Zarı Doku İskelelerinin Hazırlanması	34
3.7. Metabolik Aktivite Testi	36
3.8. Biyomekanik Test	37
3.9. Hücre Tutunma Testi.....	37
4. BULGULAR	39
4.1. Deselülerizasyon Karakterizasyonu	39
4.2. Çok Katlı Deselülerize Amniyon Zarı Doku İskelelerinin Hazırlanması	43
4.3. Metabolik Aktivite Testi	44
4.4. Biyomekanik Test	44
4.5. Hücre Tutunma Testi.....	47
5. TARTIŞMA	48
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	51
7. KAYNAKLAR.....	55
8. EKLER.....	62
Ek-1: Etik Kurul Onay Formu.....	62
Ek-2: Özgeçmiş.....	63

ÖZET

Çok Katlı Deselülerize Amniyon Zarının Eklem Kıkırdağı İçin Doku İskelesi Olarak Değerlendirilmesi

Genetik, biyomekanik veya biyokimyasal etkenlerin kıkırdak dokuda meydana getirdiği rahatsızlıklar sonucu eklem kıkırdağı dejenerasyonu meydana gelmektedir. Damar, sinir ve lenf ağına sahip olmayan eklem kıkırdağının kendini yenileyebilme kapasitesi sınırlıdır. Bu amaçla doku mühendisliği alanında eklem kıkırdağı rejenerasyonu için sentetik ve doğal doku iskeleleri kullanılmaktadır. Doğal dokuların deselülerizasyonu ise dokunun hücresel içeriği ve antijenlerinden arındırılması, inflamasyonu ve bağışıklık reddini azaltması sebebiyle tercih edilmektedir. Amniyon zarı ise immunojenitesinin çok düşük olması, anti-mikrobiyal, anti-inflamatuvar olması, yara oluşumunu engellemesi, hücre çoğalmasını güçlendiren çeşitli büyüme faktörleri, hücre dışı matriks proteinlerinin ve sitokinleri üretmesi yönünden doku iskelesi olarak kullanımı araştırılmaktadır. Amniyon zarı eklem kıkırdağının hücre dışı matriksi gibi, farklı tipte kolajenler, glikozaminoglikanlar ve fibronektin içerir.

Bu çalışmada kıkırdak doku için üç boyutlu çok katlı deselülerize amniyon zarı doku iskelelerinin geliştirilmesi planlanmıştır. Etik kurul izni sıçanlardan temin edilen amniyon zarının deselülerizasyonu, belirlenen fiziksel ve kimyasal yöntemlerle yapılmıştır. Deselülerizasyonun karakterizasyonu Hematoksilen & Eozin boyamaları yapılarak histokimyasal olarak değerlendirilmiştir. Deselülerize amniyon zarları stromal katmanları yüz yüze bakacak şekilde kat kat yerleştirilerek, bohça şeklinde dikilmesiyle çok katlı hale getirilmiştir. Çok katlı doku iskeleleri hücre canlılığı ve sitotoksiteleri açısından, hücre tutunması yönünden ve biyomekanik olarak test edilmiştir. Sonuç olarak, çok katlı deselülerize amniyon zarının eklem kıkırdağı için doku iskelesi olarak değerlendirilmeleri yapılmıştır. Çok katlı doku iskelelerinin, özellikle F grubunun, sitotoksik etkisinin olmadığı, hücre yaşayabilirliğini ve tutunmalarını desteklediği ve biyomekanik olarak dayanıklı ve esnek malzemeler olduğu tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Deselülerize amniyon zarı, doku iskelesi, doku mühendisliği, eklem kıkırdağı.

ABSTRACT

Investigation of The Use of Multilayered Decellularized Amniotic Membrane As a Scaffold for Articular Cartilage

Cartilage degeneration occurs because of disorders caused by genetic, biomechanical, or biochemical factors in cartilage tissue. The articular cartilage does not have vascular, nerve and lymph systems so it has limited regeneration capacity. For this purpose, synthetic and natural scaffolds are used for joint cartilage regeneration in tissue engineering. Decellularization of natural tissues is preferred because it clears the cellular content and antigens of tissue, reduces inflammation and immune rejection. The use of amniotic membranes as a scaffold is being investigated in terms of its low immunogenicity, anti-microbial, anti-inflammatory, preventing wound formation, various growth factors that enhance cell proliferation, producing extracellular matrix proteins and cytokines. The amniotic membrane contains different types of collagen, glycosaminoglycans and fibronectin, such as the extracellular matrix of articular cartilage.

In this study, it is planned to develop three-dimensional multi-layer decellularized amniotic membrane scaffolds for cartilage tissue. Decellularization of the amniotic membrane obtained from rats with the permission of the ethics committee was performed by physical and chemical methods. Characterization of decellularization was evaluated histochemical by performing Hematoxylin & Eosin staining. Later, decellularized amniotic membranes were made multilayered by placing the stromal layers face-to-face and suturing them in bundles. Multilayered scaffolds were tested for cell viability and cytotoxicity, for cell adhesion and biomechanically. Finally, the multilayered decellularized amniotic membrane investigated as a tissue scaffold for articular cartilage. It has been determined that multilayered scaffolds, especially the F group, have no cytotoxic effects, support cell viability and attachment and are biomechanically durable and flexible materials.

Keywords: Articular cartilage, decellularized amniotic membrane, scaffolds, tissue engineering.

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ACI	: Otolog Kondrosit İmplantasyonu
Au	: Altın
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dsDNA	: Çift zincirli DNA
ECM	: Ekstraselüler Matriks
EDTA	: Etilendiamin Tetraasetik Asit
GAG	: Glikozaminoglikan
HA	: Hiyaluronik Asit
OA	: Osteoartrit
qRT-PCR	: Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PCL	: Polikaprolakton
PGA	: Poliglikolik Asit
PLA	: Polilaktik Asit
PLLA	: Poli-L-laktik asit
PRP	: Trombosit bakımından Zengin Plazma
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat deterjanı
SEM	: Taramalı Elektron Mikroskobu
SVF	: Stromal Vaskular Fraksiyon

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.1. Sağlıklı eklem kıkırdığı	4
Şekil 2.3.3.1. Fetal membranların katmanları ve hücre dışı matriks bileşenlerinin şematik gösterimi.....	25
Şekil 2.3.3.2. İnsan amniyon zarı hematoksilin & eozin boyama görüntüsü.....	25
Şekil 3.2.1. Amniyon zarı hazırlanması.....	31
Şekil 3.6.1. Çok katlı amniyon zarı dikiş işlemleri ve ölçümleri.....	35
Şekil 3.6.2. Çok katlı deselülerize amniyon zarı doku iskelesinin şematik gösterimi..	35
Şekil 4.1.1. Rat amniyon zarının deselülerizasyon işlemleri sonrası hematoksilin & eozin boyama görüntüsü.....	40
Şekil 4.2.1. Çok katlı deselülerize amniyon zarı doku iskelelerinin SEM görüntüleri.	43
Şekil 4.3.1. MTT testine göre % canlılık değerleri.....	44
Şekil 4.4.1. F grubu çok katlı doku iskelelerine uygulanan tahribat testi kuvvete bağlı ortalama yer değiştirme grafiği	45
Şekil 4.4.2. G grubu çok katlı doku iskelelerine uygulanan tahribat testi kuvvete bağlı ortalama yer değiştirme grafiği	45
Şekil 4.4.3. F grubu çok katlı doku iskelelerine uygulanan kuvvet denetimli test kuvvet- yer değiştirme grafiği.....	46
Şekil 4.4.4. G grubu çok katlı doku iskelelerine uygulanan kuvvet denetimli test kuvvet- yer değiştirme grafiği.....	46
Şekil 4.5.1. Hücre tutunma testi SEM görüntüleri.....	47

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 3.3.1. Rat amniyon zarına uygulanan deselülerizasyon yöntemleri.....	32
---	----



1. GİRİŞ

Geçmişten günümüze insan hayatını olumsuz etkileyen, yaşam kalitesini düşüren ve hareketleri kısıtlayan en yaygın kas-iskelet sistemi rahatsızlığı eklem kıkırdağı dejenerasyonudur (1). Eklem kıkırdağı, bağ doku yapısında olup, kemiğe sıkıca yapışıktır ve eklemlerin birbiri üzerindeki hareketinden sorumludur (2). Eklem kıkırdağı tip II kolajen ve glikozaminoglikanlar içeren hücre dışı matriksten ve kondrositlerden meydana gelmektedir. Kıkırdak dokuda genetik, biyomekanik veya biyokimyasal etkenlerin meydana getirdiği rahatsızlıklar sonucunda kalıtsal anomaliler, travmatik, dejeneratif veya enflamatuar değişiklikleri içeren hastalıklar oluşmaktadır (3, 4).

Akut yaralanmalar ve kazalar, özellikle eklem kıkırdağında ciddi hasarlara yol açmaktadır. Eklem kıkırdağı damar yapısına, sinir ve lenf ağına sahip olmadığı için hasarlı kıkırdak dokusunun kendini yenileyebilme kapasitesi sınırlıdır (3, 4). Eklem kıkırdağı rejenerasyonu, doku mühendisliği alanında son yıllarda çok çalışılan bir konudur. Doku mühendisliği bu amaçla; kök hücreleri, doku iskelelerini (scaffold), doku oluşumunu destekleyen büyüme ve diğer biyolojik faktörleri kullanır (3, 5).

Son yıllarda doku mühendisliği ve rejeneratif tıp alanında çalışmalarda sıklıkla araştırılan amniyon zarı doku iskelelerine bir yenisi eklenebilmesi fikriyle bu çalışma doğmuştur. Çalışmanın amacı, kıkırdak doku için geliştirilen çok katlı deselülerize amniyon zarının doku iskelesi olarak özelliklerinin araştırılmasıdır. Bu amaçla amniyon zarları, belirlenen fiziksel ve kimyasal metodlarla deselülerize edilmiştir. Üç boyutlu (3B) doku iskelelerinin hazırlanması amacıyla deselülerize amniyon zarlarının stromal katmanları yüz yüze bakacak şekilde kat kat dizilmiş ve dikilerek bohça şeklinde çok katlı doku iskeleleri hazırlanmıştır. Çok katlı doku iskelelerinin sitotoksitesisi incelenmiş ve biyomekanik testleri yapılmıştır. Doku iskelelerine kondrosarkom hücreleri ekilerek hücrelerin yüzeye tutunmaları incelenmiş ve elektron mikroskop görüntüleri elde edilmiştir. Araştırmada çok katlı deselülerize amniyon zarının eklem kıkırdağı için doku iskelesi olarak özellikleri değerlendirilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Eklem Kıkırdağı

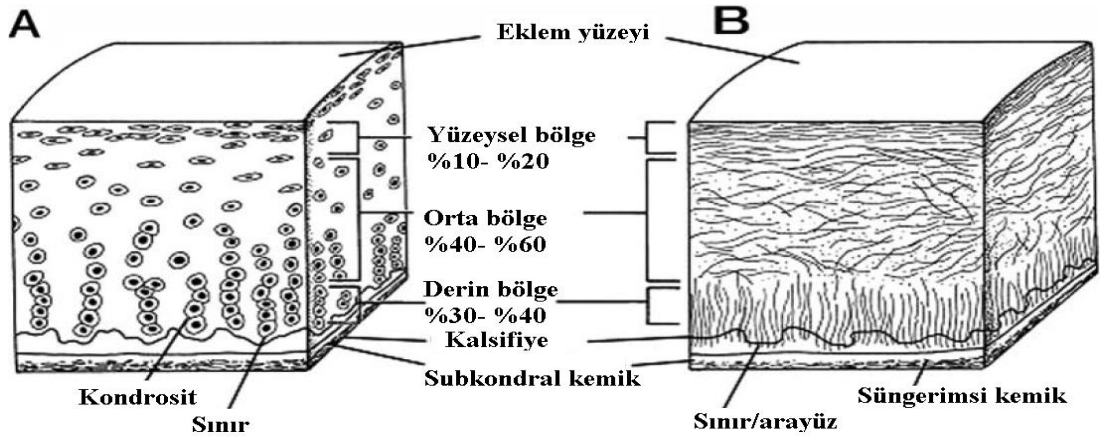
Eklem kıkırdağı, bağ doku yapısında olup içeriğinde çeşitli kolajenleri bulunduran hiyalin kıkırdaktır. Kemiğin destek ve hareketine yardımcı olan eklem kıkırdağı, insanda 2- 4 mm kalınlığındadır. Diğer dokulardan farklı olarak, kan damarı, sinir ve lenf ağına sahip değildir (6). Kondrosit adı verilen özelleşmiş hücrelerin seyrek dağılımına sahip olduğu yoğun bir ekstraselüler matriksten (Extracellular Matrix- ECM) yani hücre dışı matriksten oluşur. Hücre dışı matriksin en önemli bileşenleri su, kolajenler (özellikle tip II ve az miktarda tip IV, V, VI, IX, XI kolajenler) ve proteoglikanlardır. Hücre dışı matriks, lipidler, fosfolipidler, kolajen olmayan proteinler ve glikoproteinler de içermektedir (6-8). Yoğun hücre dışı matriks içeriği, mekanik özelliklerin sağlanması için kritik olan suyun korunmasına yardımcı olmaktadır. Gözenekli yapısını oluşturan proteoglikanlar sıvının matriks içerisinde düzenlenmesini ve tutulmasını sağlamaktadır (6, 8). Eklem kıkırdağında kondrositler ve hücre dışı matriksi içine alan kapsül yapıya kondron denilmektedir. Kondron eklem kıkırdağının mekanik birimi olarak da bilinmektedir (9). Mekanik uyarılar aracılığıyla kondrosit metabolizması düzenlenen kıkırdak doku, damar yapısı olmadığı için oksijen ve besin ihtiyacını sinoviyal sıvıdan difüzyon ile karşılamaktadır (8).

Eklem fonksiyonlarında kritik role sahip olan eklem kıkırdağının temel işlevi, eklemler için pürüzsüz, kaygan bir yüzey sağlamak, sürtünmeyi azaltmaktır. Yüklerin dağılmasını ve subkondral kemiğe iletimini kolaylaştırmaktır (6, 8). Akışkan fazı, temel bileşeni olan su ve sodyum, kalsiyum, klorür ve potasyum gibi inorganik iyonlar oluşturmaktadır. Katı faz ise gözenekli ve geçirgen hücre dışı matriksten oluşmaktadır. Dokunun mekanik davranışı, akışkan ve katı bileşenlerin etkileşimine bağlıdır (6). Kondron içindeki kondrosit ve hücre dışı matriks, basınç ve kayma kuvvetinin subkondral kemiğe absorbe edebilen, yeniden dağıtan ve iletimini sağlayan bir hidroelastik süspansiyon mekanizması sağlamak için sinerjik olarak çalışmaktadır (9).

Eklem kıkırdığı 4 ayrı bölgeden oluşmaktadır (Şekil 2.1.1). Her bölgenin kendine özgü hücre dışı matriks alanı mevcuttur. Bu bölgeler; yüzeysel bölge (the superficial zone), orta bölge (the middle zone- the transitional zone), derin bölge (the deep zone), ve kalsifiye bölge (the calcified zone) olarak adlandırılmaktadır (6, 10). Yüzeysel bölge, eklem kayma yüzeyini içermektedir. Bu bölgenin kolajen lifleri (özellikle tip II ve IX) sıkıca paketlenmiştir ve eklem yüzeyine paralel olarak hizalanarak bir uzun kondrosit tabakasına eklenmektedir. Daha derin katmanları kayma gerilimlerinden korumaktadır. Bu bölge sinoviyal ile temas halindedir ve eklem tarafından oluşturulan sıkıştırma ve gerilme kuvvetlerine karşı direncin sağlanmasından sorumludur (6).

Orta veya geçiş olarak adlandırılan bölgede ise yüzeysel bölgeden daha büyük kolajen lifleri bulunmaktadır. Bu tabaka yüzeysel bölge ve derin bölge arasında anatomik ve fonksiyonel köprü sağlamaktadır. İçeriğindeki daha kalın kolajen lifleri ve proteoglikanlar ile total kıkırdak hacminin %40-60'ını temsil etmektedir. Kondrosit yoğunluğu azdır. İşlevsel olarak, sıkıştırma kuvvetlerine karşı ilk direncin sağlandığı çizgidir (6).

Derin bölge, kolajen liflerinin kıkırdak yüzeyindeki dik yerleşimlerinden dolayı sıkıştırma kuvvetine karşı en iyi direncin sağlanmasından sorumludur. En büyük çaptaki kolajen liflerini, en yüksek proteoglikan miktarını ve en düşük su konsantrasyonunu içermektedir. Kıkırdak hacminin yaklaşık %30'unu temsil etmektedir. Kalsifiye bölge ise derin bölgenin kolajen fibrillerini subkondral kemiğe bağlayarak kıkırdak kemiğe sabitlenmesinde rol oynamaktadır. Bu bölgede, hücre popülasyonu azdır ve kondrositler hipertroftiktir (6, 10).



Şekil 2.1.1: Sağlıklı eklem kıkırdağı. Eklem kıkırdağında yer alan dört bölgeyi hücreler (A) ve kolajen fibril mimarisi (B) gösterilmiştir (6).

Yapı ve kompozisyonlardaki değişikliklere ek olarak hücre dışı matriks, kondrositlere, kolajen liflerin çapına ve organizasyonuna bağlı olarak üç bölgeye ayrılmaktadır: Sırasıyla periselüler, territoryal ve interterritoryal bölgelerdir. İlk matriks bölgesi, hücre zarına bitişik ince bir tabakadır ve kondrositleri çevrelemektedir. Başlıca proteoglikanlar, glikoproteinler ve diğer kolajenik olmayan proteinleri içermektedir. Bu matriks bölgesi, yük taşıma ve kıkırdak içinde sinyal iletimini başlatmak için işlevsel bir role sahiptir. İkinci matriks bölgesi, ilk bölgeyi çevrelemektedir (6, 10). İnce kolajen liflerinden oluşur ve hücrelerin etrafında sepet benzeri bir ağ oluşturmaktadır. Bu bölgenin, bölge matriksindeki kıkırdak hücrelerini mekanik baskılara karşı koruyabileceği ve eklem kıkırdak yapısının esnekliğine ve önemli yüklere dayanma kabiliyetine katkıda bulunabileceği bazı araştırmalarda ileri sürülmüştür (6).

Üçüncü bölge, tüm bölgelerin en büyüğüdür ve yüzeysel bölgenin yüzeyine paralel, orta bölgede eğik olarak ve derin bölgedeki eklem yüzeyine dik düzenlenmiş büyük kolajen liflerinin rastgele yönlendirilmiş demetleri ile karakterize edilmektedir. Eklem kıkırdağının biyomekanik özelliğine katkıda bulunmaktadır. Bu bölge zengin proteoglikan miktarına sahiptir (6, 10). Organik matriks ile çoğunlukla su olan serbest interstisyel sıvıdan oluşan kıkırdak, geçirgendir ve mekanik olarak da viskoelastiktir (7). Eklem kıkırdağı, aşınmaya karşı dayanıklı, pürüzsüz ve neredeyse sürtünmesiz yük taşıma yüzeyi olarak işlev görmektedir (10).

2.1.1. Eklem Kıkırdığı Dejenerasyonu

Günümüzde tüm yaş gruplarından insanların fiziksel aktivitelerinin artması, eklem kıkırdak lezyonlarını ve buna bağlı olarak kıkırdak tedavilerine olan önemi artırmaktadır (11). Batı dünyasında insanın yaşam koşullarını engelleyen en yaygın durum kronik eklem kıkırdak defektleridir. Kıkırdak defektleri yaşa bağlı olarak da artmaktadır. Aşırı kilo ve spora bağlı aşırı yüklenme kıkırdak defektlerinin en belirgin risk faktörleridir (12).

Osteoartrit (OA), dejeneratif eklem hastalığı veya dejenere eklem kıkırdığı, eklem kıkırdığının mekanik ve biyokimyasal parçalanmasını açıklayan anlamca eş terimler olarak kullanılmaktadır. Yaşlanma ile görülme sıklığı artan bu hastalık yaşlanma sonucu meydana gelmese de eklem kıkırdığının kendini yenileyebilmemesi ile ilgilidir (12).

Eklem kıkırdığındaki biyomekanik, metabolik ve biyolojik değişiklikler doku iç dengesinin kaybına yol açabilmektedir. Bu da eklem yüzeyinde hızlı bir kayıpla ve ardından son dönem artrit ile sonuçlanabilmektedir (11, 13). Histolojik özellikleri, eklem kıkırdığının bozulması, hücre dışı matriksin parçalanması ve kıkırdak içindeki hücreliliğin azalmasıdır (14). Hastalık, aşınma ve yıpranma veya spor yaralanmaları dahil olmak üzere yaralanma sonucu eklem kıkırdığında oluşan kıkırdak dejenerasyonu ile karakterize edilmektedir. Yaygın olan bu hastalık ağrı ve eklem fonksiyon kaybı ile ilişkilendirilmektedir (15). Canlının yaşamı boyunca bir denge halinde gerçekleşen yenileme ve onarma işlevlerinin kondrositlerin yaşlanmasıyla yavaşlaması sonucunda OA oluşmaktadır. OA hastalığında kıkırdak kalınlığı ve eklem yüzeyinin kayma özelliği azalmakta, moleküler yapıda değişiklikler meydana gelmektedir. Ayrıca hareket kısıtlanarak ağrı oluşmakta ve zamanla şekil bozukluğu da meydana gelmektedir (16).

Bir hastanın erken osteoartrit (OA) varlığı üç kritere göre sınıflandırılmaktadır. Bunlar; dizdeki ağrı, standart radyografilerde Kellgren ve Lawrence (K&L)'a göre dereceli sınıflandırması ve kıkırdak lezyonlarının artroskopik bulguları veya eklem kıkırdak ve menisküs dejenerasyonu ve subkondral kemik iliği lezyonlarını gösteren manyetik rezonans görüntüleme (Magnetic Resonance Imaging-MRI) bulgularıdır.

Son yapılan araştırmalara göre osteoartrit hem çevresel hem de genetik etkenlerin sebep olduğu bir hastalık olarak değerlendirilmektedir. Bu yüzden hastalık seyri, tanı ve tedavisi hem etnik hem cinsiyet hem de aşırı yüklenmeye bağlı olarak hastadan hastaya göre değişmektedir (17). Enflamatuvar hastalık olmamakla birlikte inflamasyon meydana geldiğinde hastalık seyri ileri boyutlara kadar ilerleyebilmekte ve sonucu etkileyebilmektedir (12). Menisküs ve  n çapraz bağ gibi  evre doku yıpranmaları ile verilen hasar, ekleme binen yükü değiştireceğinden osteoartritin ilerlemesine katkıda bulunabilmektedir. Birçok hastada kıkırdak defekti ile başlayan rahatsızlıklar, uygulanan çeşitli tedaviler ile implantların zamanla aşınması ve ilerleyen evrede son tedavi seçeneği olan total eklem artroplastisine dek ulaşan tedavi profiline rastlanmaktadır (15).

2.1.2. Kıkırdak Dejenerasyonu Tedavisinde Kullanılan Yöntemler

Kıkırdak hasarının rejeneratif tedavileri, mikro-kırık adı verilen yöntem ile Dr. Steadman tarafından 1980'lerin sonlarında lezyon olan bölgeye sağlam subkondral bölgeden gelen mezenkimal kök hücrelerin yerleşmesini amaçlayarak yapılan uygulamayla başlamıştır. Bu yöntemle, mezenkimal kök hücreler uyarılarak kök hücrelerin burada çoğalmasına uygun ortam hazırlanması ve iyileşme tepkisinin verilmesi beklenmektedir (1, 18). İlk klinik sonuçları 1990 yıllarında yayınlanmıştır (1). Ancak bu tedavi sonucunda yeniden oluşan doku; tip I kolajen ağırlıklı fibröz kıkırdaktır. Fibröz kıkırdak, hiyalin kıkırdağa göre biyokimyasal ve biyomekanik olarak daha düşük özelliktedir. Yani hiyalin kadar dayanıklı olmayan fibrokıkırdak uzun dönemde kötü, aşınmış bir doku haline gelen ve klinik tedavi sonuçlarını düşüren bir yapıdır (8, 19).

Hücre bazlı terapilerin temelini oluşturan otolog kondrosit implantasyonu (Autologous Chondrocyte Implantation-ACI) ile devam eden rejeneratif çalışmalar, hiyalin benzeri kıkırdak oluşturmak üzere kültüre edilen otolog kondrositlerin kıkırdak lezyonuna lokal implantasyonu olarak açıklanabilir (14). Bu yöntem ile kıkırdakta hasar olmayan kısımdan biyopsi yapılarak alınan kondrositler, *in vitro* ortamda çoğaltılarak defekt olan kıkırdak bölgesine implante edilir. Bu tekniğin iki önemli faydası bulunmaktadır. Hastanın kendi hücrelerinin kullanılması allojenik hücrelerin

veya yabancı maddelerin implantasyonu sonrası olası immün komplikasyonları önlemektedir. Ototolog osteokondral implantasyonunun aksine, küçük biyopsi ile kondrosit donörlerinin komplikasyonlarını engellemektedir (1). İlerleyen doku mühendisliği çalışmaları ile otolog kondrosit implantasyonu üçüncü kuşağa ulaşmıştır. İmplant edilen bölgenin periost ile örtülmesi birinci kuşağı (ACI), periost yerine tip I-IV kolajen membranların kullanılması ikinci kuşağı (ACI-C) ve nihayet kolajen membranların önünü açtığı, genellikle tip I-III kolajen membranlara kondrositlerin inoküle edilmesi ile oluşan hücre- doku iskelesi (scaffold) yapılarının implantasyonu ise üçüncü kuşak terapileri oluşturmaktadır. Fakat hastanın birden fazla ameliyat gerekliliği, kondrositlerin *in vitro* ortamda yavaş büyümesi, hücrelerin hücre dışı matriks üretim miktarının azalması ve yeni oluşan kıkırdığın mekanik ve yapısal özelliklerinin zamanla kötüleşmesi nedeniyle otolog kondrosit implantasyonuna farklı yöntemler araştırılmaya çalışılmıştır (14).

Ototolog ve allojenik kondrosit implantasyonuna, yetişkin mezenkimal kök hücreleri alternatif olarak değerlendirilmektedir. Kondrojenik farklılaşmaya uygun kök hücreler, kemik iliği mezenkimal kök hücreleri (Bone marrow-derived Mesenchymal Stem Cells- BM MSC), yağ dokusu mezenkimal kök hücreleri (Adipose-derived Mesenchymal Stem Cells- AMSC) ve kas dokusu mezenkimal kök hücreleridir. Bu kök hücrelerin anti-inflamatuvar özellikleri, bağışıklık sistemini düzenleyici moleküllere sahip olmaları ve rejenerasyona yardımcı olmalarının yanı sıra, kendilerini yenileyebilmelerinin sınırlı olması ve yaşa bağlı olarak farklılaşma kapasitelerinin azalması gibi nedenlerle araştırmacıları alternatif kök hücre kaynağı araştırmaya sevk etmiştir (20). Ayrıca 2001 yılından beri adipoz dokudan elde edilen stromal vasküler fraksiyon (SVF) ve kök hücrelerin rejeneratif tıpta kullanımı devam etmektedir. SVF, 3B baskılı veya deselülerize doku iskeleleriyle birlikte doku rejenerasyonu çalışmalarında hala araştırılmaktadır (21).

Pre- klinik çalışmalarda alternatif kök hücre kaynağı olarak amniyon sıvısı kök hücrelerinin kondrojenik farklılaşması günümüzde hala araştırma konusudur. Kunisaki ve arkadaşları tarafından yapılan *in vitro* araştırmada fetal doku mühendisliği için hücre kaynağı olarak amniyon sıvısında bulunan mezenkimal progenitör hücrelerin kondrojenik farklılaşma özelliğine sahip olması sebebiyle kullanılabilir olacağı bulunmuştur (22). Hayvan deneylerinde amniyon sıvısı kaynaklı kök

hücrelerin, fetal doku tamiri, kalp, akciğer, karaciğer, nöral, kemik doku gibi kıkırdak doku rejenerasyonuna da etkisi hala araştırılmaktadır (23).

Bunlara ek olarak yapılan son araştırmalara göre büyüme faktörlerinin kıkırdak tedavisi üzerindeki etkilerinin *in vitro* ve *in vivo* olarak geniş çapta çalışıldığı vurgulanmaktadır. Trombosit bakımından zengin plazma (Platelet-Rich Plasma- PRP) tedavisi, kandan otololog büyüme faktörlerinin konsantrasyonunun elde edilmesini sağlayan basit, düşük maliyetli ve minimal girişim uygulanan bir tedavidir. Bu tedavinin, doku yenilenmesini artırma potansiyeli, farklı tıp alanlarında ve kıkırdak tedavisinde yaygın olarak test edilmektedir (11, 13). Filardo ve arkadaşlarının kıkırdak lezyonu rahatsızlığı olan hastalara uyguladığı PRP enjeksiyon tedavilerinin sonuçlarına göre, PRP özellikle kondral dejeneratif lezyonları olan genç hastalarda veya erken osteoartrit olan hastalarda ağrıyı azaltma ve hem diz fonksiyonlarını hem de yaşam kalitesini kısa süreli etkinlikle iyileştirme potansiyeline sahip olduğu bulunmuştur. Ayrıca etkinliğinin kısa süreli olmasına rağmen, gözlemlenen ilginç klinik sonuçlara göre minimal girişim ihtiyacı olan hastaların ihtiyacını önlemek veya geciktirmek için uygulanabileceği de vurgulanmaktadır (11). Kon ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ise diz kıkırdak lezyonlarına ve erken osteoartrit hastalarına PRP ve hyaluronik asit (hyaluronic acid-HA) enjeksiyon tedavi karşılaştırmaları yapılmıştır. Bu çalışmanın sonucuna göre PRP tedavisinin, HA tedavisine göre genç hastalarda daha uzun ve etkili tedavi sağladığı bulunmuştur (13).

2.2. Doku Mühendisliği ve Kıkırdak Doku Mühendisliği

Doku mühendisliği, mühendislik ve yaşam bilimleri ilkelerini kullanarak doku işlevlerini veya tüm organı eski haline getirebilen, koruyan ya da iyileştiren disiplinlerarası bir alan olarak tanımlanmaktadır (24). Temel olarak, doku spesifik hücreler, biyomateriyaller, doku iskeleleri(scaffold), sinyal molekülleri ve doku oluşumunu destekleyen çevre koşulları doku mühendisliği bileşenleri olarak bilinmektedir (25, 26). Doku mühendisliği yaklaşımlarında, doku mühendisliği ürünü üç etkenle değerlendirilmektedir; uygun biyomateriyal, uygun çevre ve duyarlı hücreler yani doku mühendisliği uygulamalarına cevap veren hücreler (27).

Son zamanlarda toplumların yaşadığı en büyük sağlık sorunlarından biri doku ve organ yetmezliğidir. Travma veya hastalık kaynaklı organ hasarının tedavi edilebilmesi için etkilenen dokunun onarılması veya değiştirilmesi gerekmektedir. Doku mühendisliği ve rejeneratif tıbbın amacı ise hasarlı doku ve organların çeşitli yöntemlerle yeniden yapılandırılmasıdır (26). Bu amaçla doku mühendisliği kök hücreleri, doku iskeleleri, doku oluşumunu destekleyen büyüme faktörlerini (Growth Factor- GF) ve diğer biyolojik faktörleri kullanmaktadır (5, 25, 26). Hasarlı doku ve organların işlevlerinin eski haline getirilmesi, korunması veya iyileştirilmesi için uygun yapılar geliştirmeyi hedefleyen doku mühendisliği çalışmalarında başarılı sonuçlara ulaşırsa, transplantasyonda yaşanan organ ve doku kıtlığı probleminin çözülebileceği düşünülmektedir (28).

Doku mühendisliği araştırmalarında vücut dışında canlı ve işlevsel doku yapıları üretmek için yapılan en erken girişimlerde, kıkırdak doku yalnızca tek bir hücre tarafından üretilmesi, kan damarı ve sinir içermemesi sebebiyle uygun hedef doku olarak kabul edilmiştir. Bu yüzden kıkırdak, doku mühendisliği çalışmalarını oluşturan yöntem ve tekniklerin geliştirilmesinde önemli role sahiptir. Eklem yaralanması veya dejenerasyonu nedeniyle insanların büyük çoğunluğunun yaşamlarının bir bölümünde kronik ağrı veya sakatlık geçirmesi, hem insan sağlığı hem de kıkırdak doku mühendisliği açısından zorlayıcı olmuştur. Bu durum kıkırdak doku mühendisliği alanında implantasyona uygun doku mühendisliği ürünleri için pazar potansiyeli oluşturmuştur (29).

2.2.1. Doku Mühendisliği Uygulama Yöntemleri

Cerrahi işlemlerin mevcut yaklaşımları, kıkırdak rejenerasyonu için uzun vadeli çözümler getirememektedir. Klasik yöntemlere ek olarak doku mühendisliği ile alternatif tedavi stratejileri, doku iskeleleri ve/veya doku iskeleleri olmadan, hücreler, biyokimyasal ve biyomekanik uyaranlarla sağlanabilmektedir (15).

Doku mühendisliği çalışmaları hücreler, sinyal molekülleri ve doku iskeleleri olmak üzere üç ana faktörden oluşmaktadır. Özellikle doku iskeleleri, entegre sinyal molekülleri ile birlikte doku gelişimi ve hücre davranışını yönlendirmek ve düzenlemek için yapısal, biyokimyasal ve biyomekanik işaretler sağlamaktadır (26).

Doku rejenerasyonunda uygun malzemeler, inflamasyon ve skar dokusu oluşumundan işlevsel doku restorasyonu ve yapıcı şekillendirilmesinden birine geçişi uyarak iyileşme yanıtının farklı aşamalarını düzenleyebilme yeteneğine sahiptir. Bu durum hem bağışıklık sistemi hem de kök hücre çoğalma ve farklılaşma mekanizmalarını birlikte gerektiren biyomateryal ve konak arasındaki karmaşık etkileşimi kolaylaştırmaktadır (30).

Kıkırdak doku mühendisliği, yeni hücre kültür sistemleri, doku iskeleleri, biyoreaktörler ve farklılaşma teknikleri sayesinde son yıllardaki yenilikçi çalışmaları ve analitik teknikler ile *in vitro*'da fonksiyonel insan kıkırdağı üretme hedefine yaklaşmakta olduğunu düşündürmektedir (29).

Geçen 30 yıl boyunca doku mühendisliği araştırmaları çok fazla atılım gerçekleştirmesine rağmen bazı güçlüklerle de karşı karşıya kalmaktadır. Bu güçlükler, uygun doku iskelelerinde hücrelerin doğru fenotipte ve organizasyonda büyümeleri, doku yapısında yeterli oksijenin ve besinin dağıtılması ve sürdürülmesinin olmaması, biyoreaktörler, büyüme ortamları, fiziksel uyarılar gibi çevre ortamlarının belirli yapılar için belirlenememesi ve uyarlanabilir, dayanıklı doku yapılarının konak doku ile işlevsel entegrasyonunun gerçekleştirilememesi olarak gösterilmektedir. Tüm bu güçlükler, hücre adezyonu, çoğalması ve farklılaşması için yapısal, mekanik, biyolojik destek sağlayan biyolojik olarak parçalanabilen ve immünojenik olmayan doku iskeleleri aramanın önemini ile hedef doku ve organların organizasyonun yeniden düzenlenmesini içermektedir (31).

Doku mühendisliği ve rejeneratif tıp yaklaşımlarında, otolog doku ve organ oluşturma yanı sıra, hücre bağlanmasını ve yaşayabilirliğini destekleyen, doğal dokunun biyolojik, mekanik ve geometrik özelliklerini taklit eden, yapısal ve moleküler bir ortam oluşturmak amacıyla sentetik ve doğal doku iskeleleri araç olarak kullanılmaktadır (28). Teknolojinin gelişmesiyle birlikte doku iskelelerine dayalı doku tedavi teknikleri geliştirilmektedir (32, 33). Sentetik polimerler (Poliglolik asit- PGA, Polilaktik asit-PLA, Poli-L-laktik asit- PLLA, Polikaprolakton- PCL, polihidroksialkonat), doğal protein veya polimer kaynaklı (kolajen, fibrin, aljinat, kitosan, hialuronik asit) ve doğal doku kaynaklı doku iskeleleri (ince bağırsak zarı,

insan amniyon zarı vb.) rejeneratif doku mühendisliği çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır (25, 31, 34).

Sentetik doku iskelelerinin avantajı, kontrol edilebilen ve iyi karakterize edilmiş bileşimleri, bozulmaları ve fiziksel özellikleridir. Dezavantajları ise, organa özgü yapının ve hücre tipine özgü nişlerin görece azlığıdır (35). Sentetik doku iskeleleri manipüle edilebilirliğinin zorluğu, mekanik özelliklerinin zayıf olması, degradasyon oranı ve biyouyumluluk gibi sınırlamalarla karşı karşıya kalabilmektedir. Buna göre, dokuların deselülerizasyonu, dokunun hücresel içeriği ve antijenlerinden arındırılması, inflamasyonu ve potansiyel bağışıklık reddini azaltması sebebiyle tercih edilmektedir (31). Bu yüzden deselülerize biyomalzemeler yani dokuların hücre dışı matriksinin rejeneratif alanda kullanımı araştırmaları günümüzde çokça yapılmaktadır (1). Doğal hücre dışı matriks veya hücre dışı matriksten elde edilen proteinler tek başına veya sentetik polimerler ile kombine halde araştırmalar için potansiyel bir alternatif sunmaktadır (35). Bu amaçla deselüler ince bağırsak submukoza membranının doku iskelesi olarak kullanılarak karın zarı, cilt, kan damarı, kalp kapağı, tendon, ligament, kemik ve kırık doku onarımı çalışmalarında hayvan modellerinde araştırmaları yapılmaktadır (31, 36). Akciğer, karaciğer, kalp gibi tam organ deselülerizasyonu; kalp damarları, akciğer kapakçıkları, kan damarları, cilt alt derisi (dermis), plasenta ve amniyon zarı gibi doku deselülerizasyonu rejeneratif doku mühendisliği çalışmalarında kullanılmaktadır (31, 37, 38). Kök hücre, büyüme faktörü ve biyomateryal doku iskelelerinin birlikte kullanımı rejenerasyonda iyi bir tedavi edici seçenek olmaktadır. Son yıllarda yapılan biyomateryal kaynaklı doku iskeleleri, hücre ve büyüme faktörü ile birlikte kullanımlarının olduğu rejeneratif çalışmalar hayvan modellerinde umut verici sonuçlar göstermektedir (30).

Bazı araştırmalarda kırık doku mühendisliğinin gen terapi ile desteklenerek osteokondral defektlerin *in vivo* onarılmasını arttırdığı yönünde bulgular bulunmaktadır. Yani hücrelerin, matrikslerin ve genlerin kullanımını içeren geliştirilmiş doku mühendisliği ürünleri, mekanik uyarılarla birlikte kırık doku gelişimini desteklediği ve rejenerasyon için gelecekte teröpatik genlerin bu şekilde kullanımının değerlendirileceği belirtilmektedir (27).

2.2.1.1. Doku İskelesi (Scaffold) Çeşitleri

Doku iskeleleri çeşitli yöntem ve malzemelerle hem doğal hem de sentetik olarak üretilmektedir. İdeal doku iskeleleri, biyouyumlu ve biyobozunur olmalı, yüzey özellikleri hücre çoğalmasını, yaşamasını, yapışmasını ve göçünü desteklemeli, üç boyutlu yapı tekrarlanabilir şekilde işlenebilmeli ve mekanik olarak güçlü olmalıdır. Buna göre PGA, PLA, PLGA gibi sentetik ve kolajen gibi doğal polimerler kırıkta, kemik, deri, bağ vb. doku mühendisliğinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Doku mühendisliği ve kırıkta doku mühendisliğinde kullanılan doku iskeleleri morfolojik yapılarına göre hidrojeller, fibröz (ağsı) yapılar ve gözenekli doku iskeleleri olarak sınıflandırılırlar (39).

Hidrojeller enjekte olabilen veya implante edilebilen şekillerde üretilmektedir. Defekt bölgesini doldurabilen şekil ve büyüklükte üretilen hidrojeller minimal invazif gerektirir. Fibröz yapılar, dokunmuş ve dokunmamış liflerden oluşturulur. Dokunmamış fibröz yapılar liflerin mekansal dağılımı ve yüzey alanı açısından rejenerasyon için daha uygunken, gözenek boyutu ve yoğunluğu çeşitli şekillerde üretilen dokunmuş fibröz yapılar daha güçlüdür. Gözenekli doku iskeleleri ise çeşitli biyomalzemelerle farklı yöntemlerle üretilmektedir. Hücrelerin fizyolojik davranışlarını etkileyen gözenek boyutu, yoğunluğu ve bağlanabilirliği özelliklerine de sahiptir (40).

2.2.1.2. Üretim Yöntemleri

Doku mühendisliğinde herhangi bir doku için üretilcek doku iskelesi tasarlanırken ve kullanımı belirlenirken bazı önemli hususları gerektirir. Bunlar; biyouyumlu ve biyobozunur olma, transplante edilecek dokuya uygun mekanik özellikler, doku iskelesi mimarisinin uygunluğu ve üretim teknolojileridir. Doku iskelesi üretimi için biyomateryal seçimi ve üretim basamağı, diğer hususların ona bağlı olduğu önemli bir durumdur (41).

Doku iskeleleri; gaz köpikleme, dondurarak kurutma (liyofilizasyon), faz ayrımı, çözücü ile tanecik uzaklaştırma, lif (fiber) bağlama, elektroegirme ve üç boyutlu baskı gibi yöntemlerle üretilmektedir (39).

Gaz köpikleme tekniğinde yüksek basınçlı CO₂ gazı kullanılarak, PLLA, PLGA ve PGA gibi polimerlerinden büyük gözenekli doku iskeleleri oluşturulur. Dondurarak kurutma (liyofilizasyon) yönteminde uygun çözücüde hazırlanmış polimer çözeltisi dondurulur ve daha sonra donmuş haldeki çözücü yapıdan liyofilize edilerek uzaklaştırılır. Sonuçta gözenekli polimerik yapı oluşur. Bu yöntemde gözenek boyutu; dondurma hızı, pH ve polimer konsantrasyonuna bağlı olarak değiştirilebilmektedir.

Faz ayrımı yönteminde, fenol ya da naftalin gibi çözücüde polimer çözünür. Homojen polimer-çözücü karışımında, çözücüyle karışmayan farklı bir çözücünün eklenmesi veya çözünürlük eğrisinin altında bir sıcaklığa soğutulması ile polimerce zengin ve fakir faz olacak şekilde farklı faz oluşturulur. Çözelti dondurularak uzaklaştırılır ve gözenekli polimer yapılar elde edilir.

Diğer bir yöntem olan çözücü ile tanecik uzaklaştırma işlemlerinde, genellikle suda çözünen tuz veya karbohidratlar kullanılmaktadır. Organik bir çözücüde hazırlanmış polimer çözeltisine tuz eklenerek homojen karışım hazırlanır ve çözücü buharlaştırılarak tuz ve polimer içeren kompozit yapı kalır. Tuzun uzaklaştırılması için kompozit suda bekletilir, tuz uzaklaştırılarak gözenekli doku iskeleleri elde edilir.

Lif bağlama yönteminde ise, PLLA gibi polimerler kloroformda çözünür ve PGA ağları eklenir. Daha sonra çözücü buharlaştırılır, kompozit yapı ısıtılarak PLLA ve PGA'nın birbirine bağlanması sağlanır. Bu yapıdan PLLA, metilen klorürde çözünmesi ile uzaklaştırılır.

Elektroegirme (electrospinning) yönteminde elektrostatik kuvvet uygulanarak nano boyutlara kadar ulaşan polimer lifler üretilir. Biri polimer çözeltiye diğeri toplayıcıya yerleştirilen elektrotlardan, elektrik alan oluşturulur ve sonunda polimer pompalanarak çözelti damlaları oluşur. Bu sırada çözelti buharlaştırılır ve üretilen polimer lifler toplayıcı üzerinde toplanır (39, 40).

Üç boyutlu baskı (3D printer) yönteminde polimerler kullanılarak bir bağlayıcıyı mürekkep püskürtmeli olarak bastırması ile katman katman parçalar oluşturulur. Doku iskelesinin üretim hızı, polimerin akış hızı ve düşme pozisyonu bilgisayar yardımıyla kontrol edilir (39).

Çeşitli yöntem ve malzemelerle üretilen doku iskelelerinin matriks sertliği ve yüzey şekli hücre büyümesi ve farklılaşmasını etkileyen faktörlerdendir. Buna göre kullanılacak polimer cinsi de uygulama yerine göre değişmektedir. Örneğin kemik doku mühendisliğinde polilaktik asit-ko-glikolik asit (PLGA) gibi sentetik polimerler tercih edilirken, yumuşak doku mühendisliği çalışmalarında hidrojeller daha çok tercih edilmektedir. Bununla birlikte doğal dokuya benzer sertlikte matriks, üzerinde istenen bir hücrenin farklılaşmasını kolaylaştırabilmektedir. Doku iskelesinin yüzey şekli hatta nanotopografyası hücre düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır ve hücrenin morfolojik ve gen ekspresyonu olarak uyarılmasına ek olarak, nanotopografi kök hücrelerin nöron, kas veya kemik gibi belirli hücre türlerine farklılaşmasını düzenlediği çalışmalarda bildirilmiştir. Sonuç olarak hücre davranışı doku iskelesinin özelliklerinin uyarlanması ile düzenlenebilmektedir (26).

Hücre çoğalmasını, farklılaşmasını, mekanik tepkilerini ve hücre sağkalımını (cell survival) önemli derecede etkileyen bir diğer parametre hücre dışı matriksin yani hücre dışı matriksinin boyutsallığının arttırılmasıdır. 2B hücre kültürlerinde hücrelerin homojen büyüme ve çoğalma göstermesi, basitlik ve verimlilik açısından ve hücre dışı matriks bileşenlerinin hücreler üzerindeki etkinliğinin araştırılması için çok yönlü ve doğru bir yolu temsil etmesinden dolayı tercih edilmektedir (42, 43). 2B sistemlerin çoğu, *in vivo* olarak hücre biyoaktivitelerini etkileyen biyofiziksel işaretleri belirleyen hücre şeklinin kontrolünü sağlayamamakta; ancak yardımcı bazı substratlar kullanılarak gerçekleştirebilmektedir. Bunun yanında üç boyutlu hücre dışı matriksin bir taklitinin sağlanması için sandviç şeklinde doku iskeleleri kullanılabileceği araştırmacılar tarafından gösterilmiştir. Poliakrilamid veya kolajenden oluşan iki katman hücre dışı matriks arasına yerleştirilen yani sandviç model kültüründe hepatositlerin, morfolojik ve işlevsel *in vivo* davranışları daha doğru gerçekleştirebildiği tespit edilmiştir (42). Doku mühendisliği araştırmalarında ise kök hücrelerin proliferasyonu ve farklılaşmasına fiziki destek olan doku iskelelerinin boyutunun hücre davranışını etkileyebileceği bir değişken olarak da

değerlendirilmiştir. Barralet ve arkadaşlarının kemik iliği kök hücreleriyle yaptıkları *in vitro* araştırmada iki boyutlu ve üç boyutlu tüp yapıda oluşturulan aljinat hidrojel doku iskelelerinde geometrinin değiştirilmesi jel kalınlığını da değiştirmesi ve bunun da hücre davranışını belirlemede önemli olduğu bulunmuştur (44). Tian ve arkadaşlarının insan embriyonik kök hücreleriyle yaptıkları 2B ve 3B kültürlerin karşılaştırıldığı çalışmada ise insan embriyonik kök hücrelerinin osteojenik farklılaşmasının 3B sistemlerde arttığı ve hücre iskelesi sistemlerinin daha sonra tavşan iliak krest defektlerine yapılan *in situ* implantasyonunda farklılaştırılmış insan embriyonik kök hücrelerin teratom oluşturmada canlı ve işlevsel olduğu tespit edilmiştir (45). Sonuç olarak 3B kültür sistemleri doğal hücre dışı matriksin karmaşıklığının aşamalı şekilde tekrar yapılandırılması amacıyla tasarlanmaktadır. Yani 3B kültür model tasarımlarının gerçek hücre dışı matrikse az çok benzeyeni, gerçeğe yakın sonuçlar elde edilebilmesi için önemli olduğu vurgulanmaktadır (43).

Doku iskelelerinin hücre davranışını uyarması ile ilgili özellikler son teknoloji ürünleri elektroğirme (electrospinning) ve üç boyutlu yazıcı sayesinde malzeme ve işlem parametrelerinin optimize edilmesi yoluyla kontrol edilebilmektedir. Ancak sentetik doku iskelelerinde karşılaşılan manüpile edilebilirliği gibi sınırlamalar araştırmacıları doğal doku iskelelerine yönlendirmektedir (26). Doku iskeleleri olarak kadavra dokuları da kullanılmaktadır. Kadavra dokularının hücresizleştirilmesi ile biyolojik veya mekanik bozulma olmaksızın hücrelerin çıkarılması, fiziksel, kimyasal veya enzimatik işlemlerle biyouyumlu doğal hücre dışı matriks doku iskeleleri üretilmektedir (35).

2.3. Deselülerizasyon

Doku ya da organları oluşturan hücreler dışında birbirleri ile yüksek derecede organize olan, yapısında kolajen, elastin, laminin, fibronektin, glikoprotein, proteoglikan ve glikozaminoglikan gibi makromoleküler bileşenleri içeren yapıya ekstraselüler matriks yani hücre dışı matriks denilmektedir. Hücre dışı matriks içeriğindeki makromoleküler bileşenler her dokunun yapı ve fonksiyonuna göre uygun, farklı form ve miktarlarda bulunmaktadır. Hücre dışı matriks hücrenin çoğalmasına, farklılaşmasına, yapışmasına ve göçüne aracılık eden rollere sahiptir

(46). Bileşiminde birçok biyoaktif molekül bulunduran hücre dışı matriks, hücrel davranışların düzenlenmesi gibi özelliğinin yanı sıra koruyucu ve destekleyici özelliklere de sahiptir (47).

Doğal hücre dışı matriks, gelişmekte olan embriyoda biyofiziksel uyarılara, biyokimyasal ve moleküler sinyallere ve mekansal yerleşime aracılık eden merkezi bir rol üstlenmektedir. Hücreler ve hücre dışı matriks arasında dinamik karşılıklılık olarak tanımlanan, sabit değişim süreci, hücre kaderini belirlemekte ve proliferasyondan yapı oluşumuna geçişi tetiklemektedir. Gelişim süresinde ilk üretilen laminin hücre dışı matriks proteini, gastrulasyon sırasında hücre yapışmasına ve yer değiştirmesine yardımcı olmaktadır. Fibronektin, kolajen IV ve heparan sülfat gibi glikozaminoglikanlar gelişimde daha sonra ortaya çıkmaktadır. Gelişmiş matriks yapıları olan bazal membranların içindeki spesifik bağlanma bölgeleri daha sonra organ gelişimini ve olgunlaşmasını yönlendirmektedir. Fibronektin ise bir ligand olarak kalp, akciğer ve böbrek oluşumunda dallanma morfogeneze rehberlik etmesi için gereklidir. Moleküler işaretlerin ötesinde, hücre dışı matriks aracılığı stres ve gerinim, hücre gelişimini ve fenotipini sadece gelişimde değil, aynı zamanda doku onarımı ve rejenerasyon süreçlerinde de düzenlemektedir. Buna göre doğal hücre dışı matriksin onarım ve rejenerasyondaki çok yönlü rolü, onu ilgi çekici bir greft materyali haline getirmektedir (35).

Doku mühendisliğinde amaç işlevsel hücreler tarafından doldurulabilen ve hücreleri destekleyebilen biyolojik olarak uyumlu doku iskelelerinin geliştirilmesini gerektirir. *İn vivo*'da bu işlem hücre dışı matriks tarafından doğal olarak gerçekleştirilmektedir. Hücre dışı matriks gibi aynı niteliklere sahip sentetik doku iskeleleri yapma girişimlerinin istenen başarıya ulaşmaması sonucunda bu sorunu çözmek için dokular antijenitelerinin ortadan kaldırılması için hücresizleştirilmektedir. Deselülerize dokularda ise düşük antijeniteye sahip kolajen içeren ekstraselüler matriks yapıları bulunmaktadır ve allogreft olarak kullanılabilir (48). Hücresizleştirme işlemi ile doğal doku mimarisinin korunması ve genellikle oluşturulması zor ve pahalı olan bazı hücre dışı matriks moleküllerinin korunması gibi sentetik yapılara göre birçok avantaja sahip doğal üç boyutlu doku iskeleleri üretilmektedir (28). Deselülerize doku iskelelerinin, yeniden hücrelendirilme ve doku oluşumunda, kompleks biyokimyasal ve mekanik

işaretlerle hücre yapışmasını, çoğalmasını ve farklılaşmasını yönlendirdiği yani rehberlik ettiği hipotezi kurulmaktadır (49). Doğal ekstraselüler matriks doku ve organ gelişimine, onarımına ve fizyolojik rejenerasyona rehberlik ettiğinden, sentetik iskelelere ümit verici bir alternatif ve rejeneratif araştırmalar için bir temel sağlamaktadır. Araştırılan birçok ürün klinik uygulamalarda test edilmiştir ve umut verici sonuçlar ortaya konulmaktadır (35).

Deselülerizasyon yani hücresizleştirme hücre dışı matriks şablonu elde edebilmek için doku ve/veya organlardan hücresel yapıların ortadan kaldırılması işlemidir. Bu işlem sonunda elde edilen yapısal ve fonksiyonel proteinlerin kompleks bir karışımı doku mühendisliği uygulamalarında tercih edilmektedir. Hücresel içeriği ve antijeni ortadan kaldırılan doku kaynaklı doku iskeleleri transplante edildiği yerde yabancı cisim reaksiyonu, inflamasyonu ve potansiyel bağışıklık reddini azaltmaktadır (31).

Doku veya organ deselülerizasyonunda yapısal proteinlerin korunmasının ardından ilk olarak hücrelerin ve genetik materyallerin ortadan kaldırılmasına odaklanılmaktadır. Bunlara ek olarak, tedavi öncesi ve sonrası doku ve/veya organın mekanik özellikleri karşılaştırılmaktadır. Doku veya organın başarılı yenilenmesi veya yapılandırılması için gerekli özelliklerin deselülerizasyon metodu ile korunmasına dikkat edilmektedir (26).

2.3.1. Doku ve Organ Deselülerizasyon Yöntemleri

Her doku veya organın deselülerizasyonu, dokunun hücreliliği (karaciğer, tendon), yoğunluğu (dermis ve yağ dokusu), lipid içeriği (beyin ve idrar kesesi) ve kalınlığı (dermis ve perikard) da dahil olmak üzere birçok faktöre bağlıdır. Deselülerizasyon için kullanılan madde veya yöntem hücre dışı matriks bileşimini değiştirebilmektedir ve belli derecelerde altyapıda bozulmaya neden olabileceği bilinmektedir. Hücresizleştirme işlemlerinde amaç bu değişiklik ve bozulma gibi istenmeyen etkinliklerin en aza indirilmesi olmaktadır (50).

Doku veya organ deselülerizasyonu için kullanılan yöntemler fiziksel, kimyasal ve enzimatik yöntemler olarak ayrılmaktadır. Doku mühendisliğinde, mühendislik ürünü geliştirilmesinde, doku deselülerizasyonundan tekrar hücreleştirilmesine kadar şu aşamalar değerlendirilmektedir: Fiziksel, kimyasal, enzimatik ya da bunların kombinasyonlarının olduğu deselülerizasyon yöntemleri ile hücresel ve genetik materyallerin ortadan kaldırılması, hücre dışı matriks yapılarının, yapısal ve düzenleyici proteinlerin korunması ve mekanik özelliklerinin kaybedilmemesidir (26).

Fiziksel, kimyasal veya enzimatik deselülerizasyon yöntemlerinin herbiri her doku veya organ için optimize değildir. Yani bu yöntemlerin hepsi her doku için uygun değildir. Her spesifik doku veya organ daha öncede bahsedildiği gibi doku özelliğinden dolayı, farklı deselülerizasyon etken maddeleri ya da yöntemleri gerektirmektedir (51). Genel hatları ile deselülerizasyon; hücre membranına hasar verilmesi, sitoplazmik ve hücre çekirdek içeriğinin çözülmesi, nükleer materyalin uzaklaştırılması, hücre dışı matriksin korunup, hücre dışı matriksten hücresel yapıların ayrılması olarak ifade edilmektedir (46).

2.3.1.1. Fiziksel Yöntemler

Doku deselülerizasyonunda kullanılan fiziksel yöntemler; basınç (hidrostatik basınç), mekanik kuvvet (çalkalama, fırçalama, kazıma), sonikasyon, sıcaklık değişimleri (dondurma/çözme), elektroporasyon, yaygın olmayan süperkritik akışkan (Supercritical fluid- süperkritik CO₂) ve UV uygulamalarıdır (31, 46).

Bunlardan en çok uygulanan sıcaklık değişimi ile deselülerizasyon metodudur. Ani sıcaklık değişimleri ile -80°C’de hızlıca dondurulan dokuda, hücre zarı bütünlüğünün bozulması ve hücre içi buz kristallerinin oluşmasıyla hücre lizisi gerçekleştirilmektedir. Bu yöntemin yan etkisi, hücre içi buz kristallerinin hücre dışı matriks mikroyapısını bozmasıdır. Bu nedenle sıcaklık değişim dereceleri dikkatli kontrol edilmelidir. Hücresel materyalin tamamen ortadan kaldırılması için diğer deselülerizasyon yöntemlerini de gerektirmektedir (31, 52).

Mekanik kuvvet, hidrostatik basınç, sonikasyon gibi yöntemlerin deselülerizasyon için etkili olduğu fakat hücre dışı matriks üç boyutlu yapısında minimal düzeyde bozulmalara sebebiyet verdiği bazı araştırmalarda bildirilmiştir. Ayrıca, hücre materyalin ve DNA'nın uzaklaştırılması için diğer kimyasal yöntemlerle birlikte ve daha fazla yıkama yapılarak gerçekleştirilmelidir (26, 31, 52).

Ek olarak, UV ışınlarının sterilizasyon rolü dışında deselülerizasyon amacıyla kullanıldığı araştırmalar da mevcuttur. Oliveira ve arkadaşlarının yaptığı korneal doku mühendisliği araştırmasında fare ince bağırsağından deselülerize greft hazırlanması için uygulanan fiziksel yöntemlerden biri UV ışının 10, 20 ve 30 dk uygulamalarıdır. Bazı kimyasal ve fiziksel yöntemlerin karşılaştırıldığı bu araştırmada UV ışınlarının deselülerizasyon için kullanılabilirliği farklı sürelerde maruz bırakmak suretiyle araştırılmış, diğer yöntemlerden daha az etkili olduğu değerlendirilmiştir (51).

2.3.1.2. Kimyasal Yöntemler

Kimyasal deselülerizasyon; deterjanlar, hipotonik veya hipertonic solüsyonlar, alkali, asit-baz solüsyonları, alkol-aseton veya diğer solüsyonların (şelatlayıcı ajanlar, EDTA vb.) kullanıldığı yöntemlerdir (31, 46).

Deterjanlar: Yüklerine göre iyonik, iyonik olmayan veya çift kutuplu-zwitteriyon (zwitterionic) olarak adlandırılan deterjanlar doku veya organ deselülerizasyonunda fosfolipid hücre membranı lizisinde kullanılmaktadır.

İyonik deterjanlar, nükleer ve sitoplazma membranı bozulmasında etkilidir, ancak protein-protein etkileşimlerini bozarak, protein denatürasyonuna neden olmaktadır (26, 52). İyonik deterjanlardan SDS (Sodium dodesil sulfate) biyomateriyallerin deselülerizasyonunda en yaygın olarak tercih edilen kimyasallardandır. SDS, hücreleri ve genetik materyali etkili bir şekilde ortadan kaldırmaktadır. Deselülerizasyon araştırmalarında SDS, farklı oranlarda, sıçan kalbi, tendonu; domuz kornea, kalp kası, ince bağırsak; insan kalp, damar, akciğer, amniyon zarı gibi farklı doku ve organlarda kullanılmış ve verimli hücresizleştirme sağlandığı gösterilmiştir (26, 31, 53).

SDS'nin bazı yan etkileri ise yapısal ve sinyal proteinlerin ve hücre dışı matriksin doğal doku yapısında bozulmalara sebep olabileceği, GAG miktarında azalmaya neden olarak GAG-kolajen birlikteliğini bozabilmesi gösterilmiştir (26). Ancak kolajenler enzimatik deselülerizasyonda korunamazken, iyonik deterjanlara karşı dirençlidir ve SDS ile kolajenler uzaklaştırılmaz (35, 52). Bu nedenle, iyonik deterjanla hücresizleştirme, kolajen koruması gerektiren iskeleler üretmek için ideal olabilmektedir. Herhangi deselülerizasyon işlemine yeterli maruz bırakılma ile hücre dışı matriks yapısında minimal bozulmalar kabul edilebilmektedir (35). Diğer bir yan etkisi ise sitotoksik etkiye sahip olmasıdır. Deterjanlı deselülerizasyon protokollerinde dikkat edilmesi gereken önemli nokta işlem sonunda artık kimyasalların hücre dışı matrikse nüfuz etmesidir. Bu kimyasallar sonucunda malzeme, kullanıldığı yerde sitotoksiteye neden olabilmektedir (46). Böylece deselülerizasyon sonrasında kalan SDS'nin matriksten tamamen uzaklaştırılmasının zor olabileceği ve hücre çoğalmasını olumsuz etkileyebileceği unutulmamalı ve dokunun SDS'den temizlenmesi için yıkama adımları artırılmalıdır (54).

Doku deselülerizasyonunda kullanılan diğer iyonik deterjanlar ise Triton X-200 ve SD (Sodium Deoxycholate)'dir. Bu deterjanlar genellikle enzimlerle birlikte kullanılmaktadır. Rapor edilen yan etkilerin yanı sıra diğer kimyasallar içerisinde SDS, dokudan hücre bileşenlerinin, nükleer kalıntıların ve sitoplazma proteinlerinin tamamen temizlenmesinde diğer deterjanlara nazaran çok daha verimlidir (52). Yan etkilerini en aza indirmek için düşük sıcaklıklarda, düşük konsantrasyonlarda ve birden fazla yıkama adımları gerektirir. Düşük sıcaklıklarda veya kısa süreli SDS solüsyonuna maruz bırakılan dokuların, hücrelerinden arındırılırken, kolajenleri, glikoproteinleri ve hücre dışı matriks yapısının korunduğu bilinmektedir (54).

İyonik olmayan deterjanlar lipid-lipid ve lipid-protein etkileşimlerini bozmakta ve protein-protein etkileşimlerini etkilemeyerek proteinin fonksiyonel yapısını etkilememektedir. Bu nedenle diğer yöntemlere göre doku yapısında az bir etkisi olduğu için tercih edildiği bazı araştırmalarda bildirilmiştir (26). Triton X-100, deselülerizasyon için iyonik olmayan deterjanlardan en çok tercih edilenidir. Diğer yöntemlerle desteklendiği takdirde Triton X-100 uygulama etkili bir yöntem olarak değerlendirilebilmektedir (52).

Zwitteriyonik deterjanlar, hem iyonik hem de iyonik olmayan deterjan özelliği gösterirler ve daha ince dokuların deselülerizasyonunda tercih edilmektedir (31). Bunlar 3-[(3-cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propane- 315 sulfonate (CHAPS), sulfobetaine-10 (SB-10) and SB-16'dir. Araştırmalarda, CHAPS ile deselülerize edilen dokuların hücre dışı matrisin veriminin fazla olduğu, hücre dışı matrisin mikro yapısının ve yapısal proteinlerin korunduğu tespit edilmiştir. Fakat, DNA kalıntıları ve hücre debrisinin tamamen ortadan kaldırılamadığı bildirilmiştir. Bu durumda CHAPS'a maruz bırakılan dokunun immunojenik potansiyelini engellemek için daha fazla yıkama ile bu kimyasalın etkinliği artırılabilir (26). Hipotonik ve Hipertonik Solüsyonlar: Çözünen konsantrasyonun değişimi dokunun osmotik şoka girmesini ve hücre zarını bozarak hücrelerin parçalanmasını sağlamaktadır. Hücre kalıntılarının tamamen uzaklaştırılması için diğer kimyasallarla birlikte kullanımları yaygın bir şekilde araştırmalarda gösterilmektedir (31).

Asit- Baz Solüsyonları: Asit ve alkaline deselülerizasyonunda genellikle asetik asit, sodyum hidroksit, kalsiyum hidroksit, amonyum hidroksit sitoplazmik bileşenlerin ve nükleer materyallerin uzaklaştırılması amacıyla kullanılmaktadır. Nükleer materyalin ortadan kaldırılması için etkili yöntem olan asit baz solüsyonlarının, bazı çalışmalarda proteinleri denature ettiği ve hücre dışı matris yapısına hasar verdiği gösterilmiştir (31). Dezenfektan özelliği olan perasetik asit (PAA), çoğu zaman sterilizasyon amacıyla kullanılmasının yanında, alkalilerle birlikte dönüşümlü tekrarlanarak kullanıldığı deselülerizasyon yöntemleri bulunmaktadır. Genellikle ince bağırsak submukoza ve idrar kesesi gibi ince dokuların deselülerizasyonu çalışmalarında kullanılmıştır. PAA'ya maruz bırakılan dokunun deselülerizasyon uygulamalarında, hücrelerin tamamen ortadan kaldırılmadığı ve dokunun mekanik özelliklerini belirgin değişikliği neden olduğu da gösterilmiştir (26).

Alkoller-Aseton ve Diğer Solüsyonlar: Alkoller, dehidrasyon yoluyla hücreleri parçalayıp yoğun lipidleri dokulardan uzaklaştırdıkları için yoğun dokuların hücre dışı matrisin veriminin fazla olduğu, hücre dışı matrisin mikro yapısının ve yapısal proteinlerin korunduğu tespit edilmiştir. Fakat, DNA kalıntıları ve hücre debrisinin tamamen ortadan kaldırılamadığı bildirilmiştir. Bu durumda CHAPS'a maruz bırakılan dokunun immunojenik potansiyelini engellemek için daha fazla yıkama ile bu kimyasalın etkinliği artırılabilir (26). Hipotonik ve Hipertonik Solüsyonlar: Çözünen konsantrasyonun değişimi dokunun osmotik şoka girmesini ve hücre zarını bozarak hücrelerin parçalanmasını sağlamaktadır. Hücre kalıntılarının tamamen uzaklaştırılması için diğer kimyasallarla birlikte kullanımları yaygın bir şekilde araştırmalarda gösterilmektedir (31).

dışı matrikste hasara neden olmakta ve doku mekanik özelliklerini etkilemektedir. Organik bir çözücü olan Tributıl fosfat (TBP) ise özellikle tendon gibi yoğun dokuların hücre dışı matriksin yapısal ve mekanik özelliklerini daha iyi koruduğu araştırmalarda gösterilmiştir (31, 46). Şelatlayıcı ajanlar ise, merkezi metal iyonlarına kararlı bir şekilde bağlanarak bu iyonların izole edilmesini sağlamaktadır. Deselülerizasyonda şelatlayıcı ajan olarak genellikle kullanılan EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid), tripsin enzimi ile birlikte kullanılmaktadır. Uzun süreli kullanımına doku iskelesinin mekanik özelliklerini düşürdüğü için dikkat edilmelidir (31).

2.3.1.3. Enzimatik Yöntemler

Enzimatik deselülerizasyon genellikle nükleazlar (DNaz, RNaz) ve proteazlar (tripsin gibi) aracılığıyla gerçekleştirilmektedir (26, 46). Endonükleazlar ve ekzonükleazlar genellikle hücresel ve genetik materyalin ortadan kaldırılması; proteazlar ise, dispaz gibi kolajen IV ve fibronektinlerin degradasyon sonucunda ortadan kaldırılmasıyla deselülerizasyonu sağlamaktadır (26, 31). Ayrıca lipaz, termolizin enzimleri ve hücre dışı matriks kolajeninin gerekli olmadığı durumlarda kolajenaz enzimlerinin kullanıldığı deselülerizasyon yöntemleri bulunmaktadır (46).

Enzimler genellikle deselülerizasyonu desteklemesi amacıyla kimyasallarla birlikte kullanılmaktadır. Kimyasal yöntemlerle uzaklaştırılamayan hücresel ve genetik materyaller enzimler yardımıyla uzaklaştırılmaktadır. Triton X-100 ve SD (Sodium Deoxycholate) gibi kimyasalların kullanıldığı çalışmalarda, DNA'nın parçalanmasını ve dokuya yapışmasını engellemek için DNaz'ın kullanıldığı gösterilmektedir (26).

Enzimatik deselülerizasyon yöntemlerinde proteolitik enzimlerden en çok tripsin kullanılmaktadır. Tripsin yapısal proteinlerdeki peptit bağların lizisini gerçekleştirmekte ve hücre matriks adezyonunu bozmaktadır. Genellikle dokudan hücresel materyalin uzaklaştırılmasını sağlayan EDTA (Etilendiamin tetraasetik asit) ile birlikte kullanılmaktadır. Uzun süreli ve çok miktarla tripsin muamelesi sonucunda doku ve organların hücre dışı matriks bileşenlerinin büyük ölçüde azaldığı ve dokunun

elastik özelliği bozulduğu gösterilmiştir. Bu yüzden düşük oranlarda tripsin uygulamaları gerçekleştirilmelidir (31, 52).

Kimyasal yöntemlerle birlikte tercih edilen enzimatik deselülerizasyonla, hücre dışı matrikste bulunan istenmeyen hücresel ve genetik materyalin ortadan kaldırıldığı etkili deselülerizasyon sağlanabilmektedir. Etkisi doku veya organa göre değişmekle birlikte, enzimatik deselülerizasyon, doku ve organların hücre dışı matriks bileşenlerine veya doku elastik özelliğine hasar veren etkiye de sahip olduğu dikkate alınmalıdır (26, 52).

Tüm deselülerizasyon çalışmalarına bakıldığında, doku mühendisliği araştırmalarında uygulanan deselülerizasyon yöntemlerinin fiziksel, kimyasal veya enzimatik olarak belirli kombinasyonlarda kullanımı ile en etkin ve verimli sonuçlara ulaşılabilmektedir. Ayrıca her dokuya göre uygulanacak protokollerin doku yapısı ve fonksiyonuna göre değiştirilmesi gerekmektedir. Deselülerizasyon sonrası elde edilen dokudan hücresel materyallerin uzaklaştırıldığı aynı zamanda hücre dışı matriksin yapısal ve fonksiyonel özelliklerini büyük oranda koruyan yöntem en uygun deselülerizasyon yöntemi olarak değerlendirilebilmektedir (26, 31, 46, 52, 54).

2.3.2. Deselülerize Biyomateryallerin Biyomedikal Alanında Kullanımları

Doku yenilenmesi için doğal dokudan esinlenerek üretilen malzemeler, doku mikro çevresini tamamen taklit edememektedir. Potansiyel bir terapötik malzeme olan hücre dışı matriks, bir hücrenin kaderini belirleyen, yaşamasını, çoğalmasını, göçünü belirleyen yapısal destek ve biyokimyasal sinyalleri sağlamaktadır. Yani hücre dışı matriks, hücre mikro çevresini ve biyokimyasal faktörleri kapsayan doğal bir materyaldir (55).

Deselülerizasyon ile hücresizleştirme sayesinde elde edilen, üç boyutlu yapısı korunan, hücre ile ilişkili yüzey molekülleri, proteinleri ve hücre içeriğinden temizlenen hücre dışı matriks, hastaya nakledildiğinde alıcının kök hücreleri tarafından zamanla yeniden yapılandırıldığı için immunojenik reaksiyon

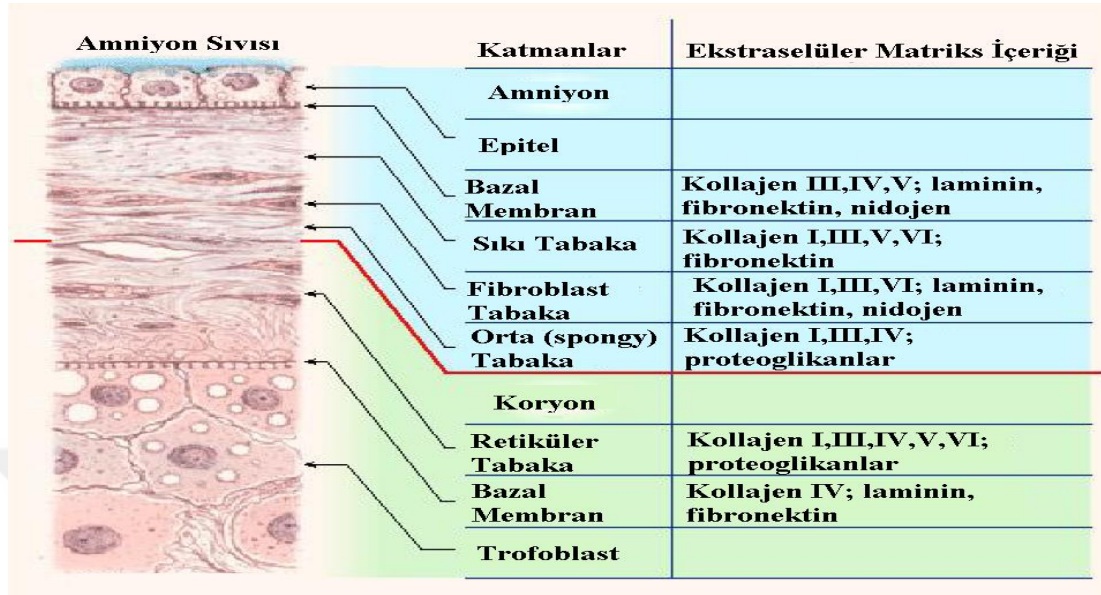
vermemektedir. Deselülerize greft materyallerinden beklenen optimal yarar greftin biyoyumunun ve adaptasyonunun olmasıdır. Ayrıca immunojenik reaksiyon vermemesi de etik izinler çerçevesinde d n r olarak hayvan dokularının kullanımına olanak sağlamaktadır. Böylece d n re ulaşmak kolaylaşmaktadır (46).

Son yıllarda rejeneratif tıp ve doku mühendisliği araştırmalarında tüm organ deselülerizasyonu yoluyla hazırlanan üç boyutlu hücre dışı matriks iskeleleri dahil, h cresizleştirilmiş dokudan üretilen hücre dışı matriks doku iskelelerinin kullanımı gün geçtikçe artmaktadır. Hücre dışı matriksten oluşan cerrahi malzemeler gibi dermis, idrar kesesi, ince bağırsak, mezotelyum, perikard ve kalp kapakçıkları dahil olmak üzere çeşitli allojenik veya ksenojenik doku kaynaklarından ve birkaç farklı türden elde edilen ticari olarak da satılan klinik ürünler bulunmaktadır. Halihazırda, klinikte kullanılan ticari olarak satılan deselülerize doku iskelelerinden bazıları şunlardır: insan dermis kaynaklı AlloDerm (Lifecell Corp.), AlloPatch HD ve FlexHD (Musculoskeletal Transplant Foundation), NeoFor (Mentor Worldwide LLC), GraftJacket (Wright Medical Technology Inc.) gibi ürünler yumuşak doku, tendon, kronik yaralarda ya da Restore (DePuy Orthopaedics), FortaFlex (Organogenesis Inc.) ve CorMatrix ECM (CorMatrix Cardiovascular Inc.) gibi domuz ince bağırsağında elde edilen ürünler yumuşak doku ve kalp dokusu rejenerasyonunda kullanılan ürünlerdir (50).

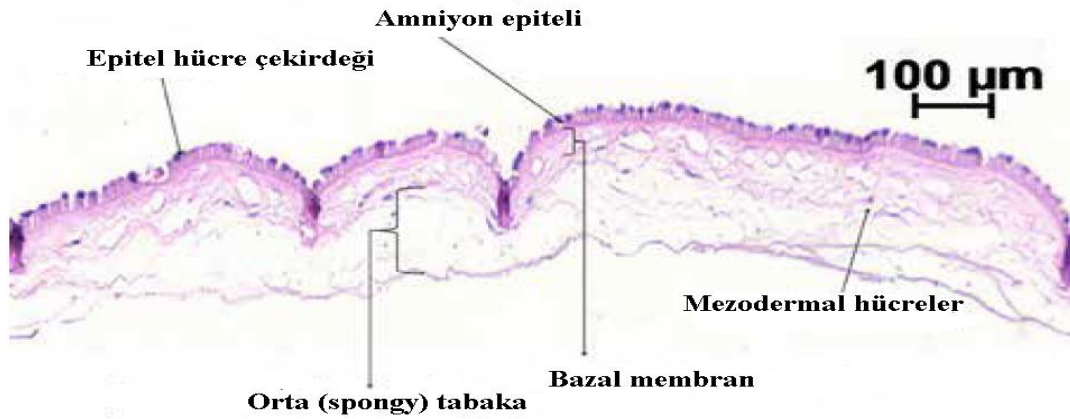
2.3.3. Amniyon Zarı Deselülerizasyon Yöntemleri

Amniyon zarı insanda 0.02- 0.5 mm kalınlığındadır ve üç katmandan oluşur. Bunlar tek katlı kübik epitel, bazal membran ve stroma katmanıdır (37). Epitel tabaka hücresel taşıma ve salgıda aktif rol oynayan pek çok mikrovillulardan oluşur (56). Bazal membran, bazal proteinler olan kolajen tip I, III, IV, laminin ve fibronektinden oluşmaktadır. Ayrıca insan amniyon zarına çekiş gücü ve mekanik özellikler kazandırır. Bazal membran altında bulunan avasküler mezenkimal doku katmanı (stroma) ise sıkı tabaka, fibroblast tabaka ve orta tabakadan meydana gelir. Fibroblast tabakada tip I ve III kolajen üretilir. Orta tabaka sünger tabaka (spongy layer) olarak da adlandırılır. Bu tabaka glikoprotein ve proteoglikanlarca zengindir. Orta tabakanın

koryon zarına zayıf olarak bağlanması amniyon zarının koryondan kolay ayrılmasını sağlar (56-58).



Şekil 2.3.3.1: Fetal membranların katmanları ve hücre dışı matriks bileşenlerinin şematik gösterimi (57).



Şekil 2.3.3.2: İnsan amniyon zarı hematoksisilen & eozin boyama görüntüsü (20).

Doku mühendisliği araştırmalarında insan amniyon zarı ve deney hayvanlarının amniyon zarları çeşitli fiziksel, kimyasal ve enzimatik deselülerizasyon yöntemleri kullanılarak, *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda değerlendirilmiştir. Diğer dokularda olduğu gibi birden fazla yöntemin kullanıldığı veya yalnızca bir yöntemle deselülerizasyon sağlanan çalışmalar bulunmaktadır (59).

Wilsaw ve arkadaşları tarafından insan amniyon zar deselülerizasyon metodunda %0,03 SDS, DNaz ve RNaz enzimleri kullanılmıştır. Deselülerizasyon sonucunda hücrelerin ortadan kaldırılması başarılı bir şekilde sağlanmıştır. Matriks doku mimarisi korunmuş ve biyokimyasal verilere göre dokunun ana bileşenleri üzerinden herhangi bir yan etki gözlenmemiştir. Bu çalışma metoduna göre biyoyumluluğu tespit edilen, doku morfolojisinin ve ana bileşenlerin korunduğu deselülerize amniyon zarı doku iskeleleri oluşturulmuştur (60).

Golipourmalekabadi ve arkadaşlarının 2015 ve 2016 yıllarında yaptığı çalışmalarda, EDTA, NaOH, Amonyum klorür kimyasalları kullanılarak çalkalama, kazıma ve -80 de dondurup- çözme fiziksel işlemleri ile insan amniyon zarı deselülerizasyonu sağlanmıştır. Çalışma sonunda, deselülerizasyonla dokunun mekanik özelliklerinin kötüleşmediği ancak dokunun dikiş tutma kabiliyetinin azaldığı ve *in vitro* biyodegradasyonunun arttığı tespit edilmiştir. Bu yöntemle klinik uygulamalar için potansiyel role sahip, uygun maliyetli hızlı ve tekrar üretilebilir bir doku iskelesi olabileceği ispat etmiştir. Ayrıca hazırlanan deselülerize doku iskelelerinin yağ doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin çoğalması ve hücre taşınması için potansiyel üç boyutlu doku iskelesi olduğu öne sürülmüştür (37, 38).

Jin ve arkadaşları insan amniyon zarı deselülerizasyonunu tripsin içeren solüsyonda nazıkçe kazıma işlemi yapılarak enzimatik ve fiziksel yöntemlerle gerçekleştirmişlerdir (61).

Saghizadeh ve arkadaşları fiziksel, kimyasal ve enzimatik yöntemlerle amniyon zarı deselülerizasyonu karşılaştırmalarını gerçekleştirmişlerdir. Deselülerizasyon için, EDTA, EDTA ve kazıma, EDTA-heptanol ve kazıma, termolizin ve kazıma, NaOH ve kazıma işlemleri test edilmiştir. DMSO veya gliserol içeren solüsyonunda -80°C'de saklama sonunda yapılan deselülerizasyon yöntemlerinden NaOH deselülerizasyonu ile normal insan amniyon zarındaki bileşenleri değişmemiş ve limbal kök hücreler dahil diğer hücrelerin üzerinde büyümesinin desteklendiği doku iskelelerinin oluşturulduğu bildirilmiştir (59).

Diaz Prado ve arkadaşları ise %0.9 NaCl solüsyonu kullanarak amniyon zarı deselülerizasyonu gerçekleştirmişlerdir. Deselülerizasyon sonrası koryonik

membranın, bazal membrana göre kıkırdak hücreleri büyümeleri için daha uygun ortamı sağladığı ortaya konulmuştur. Ayrıca yapılan *in vitro* rejenerasyon sonucunda, dondurularak saklanmış (cryopreserved) insan amniyon zarının, insan kondrosit hücreleri için çoğalmayı ve kıkırdak onarımını desteklediği bulunmuştur (62).

2.3.3.1. Rejeneratif Tıp Çalışmalarında Amniyon Zarının Kullanım

Alanları

İnsan amniyon zarı, 1910 yıllarından itibaren çeşitli alanlarda doku rejenerasyonu amacıyla hem doku iskelesi olarak hem de kök hücre kaynağı olarak kullanılmaktadır (56, 63). Doku iskelesi amniyon zarı; taze, dondurularak saklanmış ve dahi deselülerize halde oftalmoloji alanında korneal yaralanmalarda, plastik cerrahide yanık ve yara iyileşmesinde, diyabetik ayak ülserlerinde, iyileşmeyen yaralarda, kas ve iskelet sistemi pre-klinik çalışmalarında kullanılmaktadır (38, 62). Bunlarla birlikte, Sridhar ve arkadaşları çalışmalarında birden fazla kata sahip amniyon zarı doku iskelelerinin skleral veya korneaskleral incelme ameliyatlarında kullanışlı greftler olarak yararlanılabileceğini belirtmişlerdir (64).

İnsan amniyon zarının; immunojenitesinin çok düşük olması, anti-mikrobiyal, anti-inflamatuvar olması, yara oluşumunu engellemesi, hücre çoğalmasını güçlendiren çeşitli büyüme faktörlerinin salımı, çeşitli hücre dışı matriks proteinlerinin ve sitokinlerin üretilmesi yönünden doku iskelesi olarak kullanımı oldukça yaygın bir şekilde araştırılmaktadır. Ayrıca doğum sonrası kolay temin edilebilirliği, dondurularak saklanmaya uygunluğu ve allogreft kullanımının kolay olduğu için doku mühendisliği çalışmalarında potansiyel biyomalzemeler olarak tercih edilir (3, 38, 56). Ek olarak, insan plasental dokuları potansiyel donör olarak zengin hücre dışı matriks içeriğine ve bazal membrana sahip olduğu için tercih edilmektedir. Bazal membran *in vivo*'da hücre göçü, hücre yapışması ve doku organizasyonunun yönlendirilmesi gibi önemli role sahiptir (48).

Bunlarla birlikte, insan amniyon zarı eklem kıkırdağı hücrelerinin metabolizmasını devam ettiren, düzenleyen ve rejenerasyonuna izin veren spesifik özelliklere sahiptir. Eklem kıkırdağının hücre dışı matriksi gibi, glikozaminoglikanlar

(GAG), farklı tipte kolajenler (I, III, IV, V ve VI), laminin, hiyaluronan, fibronektin ve büyüme faktörlerini içerir. İnsan amniyon zarı hücre dışı matriksi elastik, kolay şekil alabilme ve çekiş gücüne karşı direnç sağlayabilme özelliğindedir (4). Amniyon zarı özellikle yumuşak doku rejenerasyonu araştırmalarında kullanılmaktadır (37).

İnsan amniyon zarı hücreleri ise spesifik iki hücre topluluğundan oluşmaktadır. Amniyon zarı epitel hücreleri (Amniotic epitel cells-AEC) ve stroma hücreleridir (63). Amniyon zarı epitel hücreleri maternal kaynaklı olup pluripotent belirteçler (Oct 4, Sox 2, Nanog vs.) eksprese eder. Stroma katmanında bolca bulunan amniyon zarı stroma mezenkimal kök hücreleri embriyonik mesoderm kaynaklıdır. Ortopedik doku mühendisliği araştırmalarında, amniyon zarı epitel hücresi ve amniyon zarı stroma mezenkimal kök hücresinin her ikisinin de çeşitli *in vitro* çevre koşullarında klasik mesoderm kökenli kas, kıkırdak, kemik ve tendon hücrelerine farklılaşabildiği ve bu hücrelerin kas iskelet sistemi doku spesifik hücre dışı matriks bileşenlerini ürettiği gösterilmiştir (20, 56).

İnsan amniyon zarı çalışmalarının bazılarında kullanılan deselüler amniyon zarının, kondrositlerin zar üzerine dağılmasını, çoğalmasını ve *in vitro* ortamda karakteristik özelliklerini korumasını desteklemekte olduğu gösterilmiştir (60, 61). Jin ve arkadaşlarının yaptığı araştırmada de-epitelize amniyon zarlarının bazal membranı ve stromal membranı karşılaştırılmıştır. Stromal membran üzerinde tavşan kıkırdak hücrelerinin daha iyi tutunma, yaşama, çoğalma ve tip II kolajen üretimi gösterilmiştir. *In vivo* deneylerde, kıkırdak dejenerasyonu için hazırlanan stromal membran üzerine ekilen kıkırdak hücreleri ile rejenerasyon gözlenmiştir ve *in vitro* deneylerde gösterilen sonuçlar desteklenmiştir (61).

Saghizadeh ve arkadaşları ise deselüler amniyon zarının *in vitro* ortamda limbal epitel kök hücreleri gibi kök hücrelerin çoğalmasını destekleyen nişi oluşturduğunu göstermiştir (59).

In vitro onarım araştırmalarında bazal membranında kıkırdak hücreleri olan amniyon zarı, lezyon olan bölgeye transplante edilerek lezyonunun kapatıldığı ve yeni kıkırdak dokusunun oluştuğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır (62). Deselülerize amniyon zarı veya kurutulmuş amniyon zarının porlu yapısının hücre dağıtım sistemi

olarak, mezenkimal kök hücrelerin zara yapışmasını ve çoğalmasını desteklediğini bildiren çalışmalar da bulunmaktadır (38, 58). Başka bir çalışmada ise kemik iliği mezenkimal kök hücrelerinin büyümesine ortam sağlayan amniyon zarı hücre dışı matriksi, hayvan modelinde sıçan kıkırdak, tendon ve kemik hasar onarımını sağladığı gösterilmiştir (3, 20).

Muinos-Lopez ve arkadaşlarının yaptığı *in vitro* bir çalışmada, insan amniyon zarının kıkırdağa iyi bir yapışma sağladığı, amniyon zarı mezenkimal stroma kök hücrelerinin kıkırdak rejenerasyonunu diğer kök hücrelere göre daha iyi sağladığı ve tip II kolajen yönünden zengin yeni doku oluşturduğu gözlemlenmiştir (4). Ayrıca farklı bir çalışmada adipoz mezenkimal kök hücreleriyle karşılaştırılan amniyon zarı mezenkimal kök hücrelerinin *in vitro* osteoartrit ilerlemesini geciktirdiği, kıkırdak doku degradasyonunu daha etkili bir şekilde engellediği belirlenmiştir (65).

Amniyon zarı düşük immunojenitesi, anti-mikrobiyal, anti-inflamatuvar, anti-fibroz ve yara oluşumunu engellemesi ile birlikte esneklik ve destek veren mekanik özelliklere sahip hücre dışı matriks içeriği ile hem hücresel hem de yapısal özelliklerinden dolayı rejeneratif tıp ve doku mühendisliğinde kullanım alanı son yıllarda artmaktadır (66).

Tüm bunlar göz önüne alındığında, kıkırdak dokunun kendiliğinden iyileşmesi sınırı ile eklem kıkırdağı için çeşitli teknikler kullanılarak yeni doku iskeleleri yapma fikri ortaya çıkmıştır. Rejeneratif tıp araştırmalarında yaygın bir şekilde tercih edilen amniyon zarı ve sadece amniyon zarının hücre dışı matriksini içeren doku iskelelerine çeşitli yöntemlerle yenilerinin eklenebileceği düşünülerek bu araştırma hazırlanmıştır. Hücrelerin üç boyutlu kültürlerde işlevsel olması göz önünde bulundurularak, bu çalışmada rat amniyon zarlarının deselülerizasyonu yapılmış ve deselülerize amniyon zarlarından üç boyutlu, çok katlı doku iskeleleri hazırlanmıştır. Çok katlı deselülerize amniyon zarının eklem kıkırdağı için doku iskelesi olarak değerlendirilmesi yapılmıştır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyaller

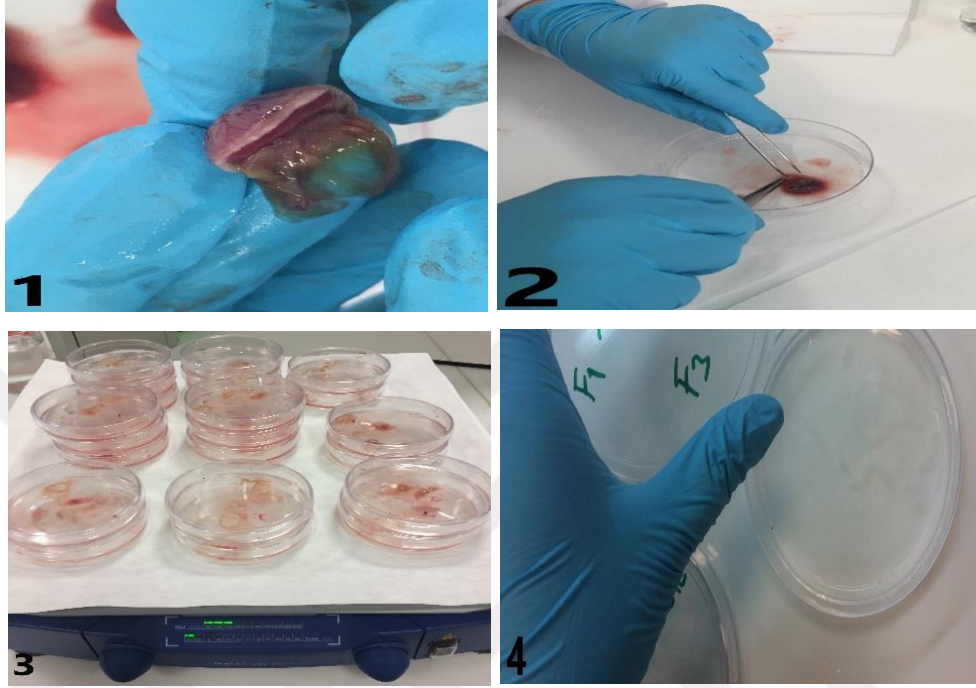
Amniyon zarı çalışmaları için; fosfat tamponlu tuz (PBS- Phosphate buffered saline tablet- Sigma), NaCl (MERCK), SDS-Sodyum Dodesil Sülfat (10X TGS-Tris/Glycine/SDS buffer- BIORAD), EDTA (Ethylenediaminetetraacetic Acid Disodium salt- MERCK), hematoksilen (Bes-Lab Harris Hematoksilen solüsyonu), eozin (Bes-Lab Eozin solüsyonu), -80°C buzdolabı, UV kabin (UVT-B-AR-Biosan), çalkalama cihazı (shaker- IKA, KS 260), petri kabı (Corning), formaldehit (%37 Formaldehyde solution -MERCK) , Steril absorbe edilebilir PGA iplikli 4.0 cerrahi iğne (Alcasorb Polyglycolic acid- Katsan).

Hücre kültürü, metabolik aktivite ve hücre tutunma deneyleri için; DMEM Medium ve DMEM High Glucose Medium (Biological Industries), Trypsin EDTA Solution c (Biological Industries), Foetal Bovine Serum (Biological Industries), Pen-Strep Solution (Biological Industries), fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS-BioShop), MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide- VWR Life Science). CO₂'li inkübatör (Binder), Biyolojik güvenlik kabini (Esco, Class II BSC), santrifüj (Hettich, Rotina 380R), çok kanallı pipet (Gilson, PipetmanUltra), tekrarlayıcı pipet (Gilson, Repetman), hücre kültür kapları ve çoklu kuyucuklu plaklar (Corning,ABD), mikrolaka okuyucu (Biotek, PowerWave XS2). Mekanik test için; SHIMADZU (AGS-X/EZ-X) basma-çekme test cihazı. Görüntüleme için; JEOL (JSM-5600 SEM) taramalı elektron mikroskobu.

3.2. Amniyon Zarının Toplanması ve Hazırlanması

Kobay Deney Hayvanları Laboratuvarından alınan 426 protokol numaralı etik kurul izni ile sağlık kontrolleri yapılan ve sağlıklı gebelik geçiren 6 tane *Wistar Albino Rat* türü sıçanların amniyon zarları normal doğum veya sezaryen sonunda temin edilmiştir. Doğum sonrasında plasentalar taze hazırlanan PBS (Phosphate-Buffered

Saline- Sigma, pH 7,2) içerisine konulmuştur. Plasentalar amniyon zarlarından el yordamıyla veya künt diseksiyon yapılarak nazıkçe ayrılmıştır. Deselülerizasyona hazırlamak amacıyla amniyon zarları PBS ile 16 saat çalkanarak kandan iyice temizlenmiştir (59, 61).



Şekil 3.2.1: Amniyon zarı hazırlanması. (1) plesanta ve amniyon zarı, (2) amniyon zarının plesantadan ayrılması, (3) amniyon zarlarının yıkanması, (4) deselülerizasyon sırasında amniyon zarı görüntüsü.

3.3. Deselülerizasyon

Yıkamalar sonrasında yapılacak çalışma için uygun deselülerizasyon metodunu belirlemek amacıyla, literatüre göre belirlediğimiz deselülerizasyon yöntemlerinin farklı kombinasyonları denenmiştir. Bunun için UV, -80°C’de dondurma, hipertonic ortam ve SDS yıkama olarak fiziksel ve kimyasal yöntemler kullanılmıştır. Deney grupları şu şekilde planlanmıştır (Tablo 3.3.1):

Tablo 3.3.1: Rat amniyon zarına uygulanan deselülerizasyon yöntemleri.

Grup	Hazırlık	1	2	3	4
A	PBS yıkama				
B	PBS yıkama	UV			
C	PBS yıkama	UV	-80°C dondurma		
D	PBS yıkama	UV	-80°C dondurma	Hipertonik ortam	
E	PBS yıkama	UV	-80°C dondurma	SDS yıkama	
F	PBS yıkama	UV	-80°C dondurma	Hipertonik ortam	SDS yıkama
G	PBS yıkama	UV	Hipertonik ortam	SDS yıkama	-80°C dondurma

Tablo 3.3.1’de belirtildiği gibi amniyon zarları öncelikle 16 saat taze hazırlanmış PBS solüsyonu içerisinde çalkalanarak yıkanmıştır. Daha sonra gruplara ayrılmıştır. Deselülerizasyon için gerekli ortamlar hazırlanmıştır. Hipertonik ortam için 100 mL distile suya 36 g NaCl eklerek manyetik karıştırıcıda çözdürülmüştür. %0,03 SDS ise 1X TGS tamponundan 15 mL alınarak üzeri distile su ile 450 mL’ye tamamlanarak hazırlanmıştır. Hazırlanan %0,03 SDS çözeltisinden 100 mL alınarak içine %0,1 g EDTA eklendi böylece %0,1’lik EDTA içeren %0,03 SDS solüsyonu hazırlanmıştır (53).

A grubu yıkama sonrasında herhangi bir işlem yapılmayarak, kontrol olarak belirlenmiştir. Birinci basamakta diğer gruplardaki (B, C, D, E, F, G) amniyon zarları PBS içerisinde UV ışını altında 15 dk inkübe edilmiştir.

İkinci basamakta C, D, E, F grubundaki amniyon zarları PBS’lerinden arındırılıp, -80°C’de 2 saat inkübasyona bırakılarak dondurulurken; G grubu amniyon zarları hipertonik ortamda 2 saat çalkalanmıştır. 2 saat sonunda dondurulan dokular hızlıca oda sıcaklığında çözdürülmüştür. G grubu amniyon zarları ise tuzdan arındırılması için distile su ile 3 defa (3x5dk) yıkanmıştır.

Üçüncü basamakta, D ve F grubu amniyon zarları hipertonik solüsyonda; E ve G grupları SDS solüsyonda 2 saat çalkalanmıştır. İşlem sonunda tüm amniyon zarları 3 defa (3x5dk) distile suda yıkanmıştır.

Son basamakta ise F grubu SDS solüsyonda 2 saat çalkalanmış; G grubu yıkama sonrası sudan arındırılıp, -80°C’de 2 saat inkübe edilmiştir. İşlem sonunda amniyon zarları 3 defa (3x5dk) distile suda yıkanmıştır. Tüm deselülerizasyon deneylerinde özellikle hipertonic ve SDS solüsyonu ile muamele yapılan amniyon zarlarında önemli olan nokta her uygulamanın sonunda tuzdan veya deterjandan arındırmak için 3 defa ve 5’er dk distile su ile yıkanmıştır.

Tüm basamaklar bittikten sonra amniyon zarlarını histolojik boyamalara hazırlamak için %4 (w/v)’lük formaldehite konulmuştur. Deselülerizasyon karakterizasyonu için histolojik boyamaları yapılmıştır. Hematoksilen ve eozin boyama değerlendirilmeleri sonucunda deselülerizasyon için en uygun iki deney grubu belirlenmiştir. Diğer çalışmalar için bu deney gruplarının hazırlandığı deselülerizasyon metodu kullanılmıştır.

3.4. Amniyon Zarının Saklanması

Bazı saklama protokollerinde deselülerize amniyon zarları kullanılacak zamana kadar, -80°C’de PBS içeren %10’luk DMSO (Dimethyl sulfoxide-Invitrogen™, D12345) solüsyonunda, bazılarında ise 1:1 gliserol içeren çözeltide birkaç ay saklanabildiği gösterilmektedir (59, 61). Bu araştırmada sadece yıkamaları yapılan amniyon zarları 1:1 gliserol içeren çözelti içerisinde ve diğerleri yani deselülerize amniyon zarları ise içerisinde bulunduğu sıvıdan arındırılıp -80°C’de saklanmıştır. Kullanım öncesi amniyon zarı oda ısısında çözündürülerek PBS ile birkaç defa yıkanmıştır.

3.5. Deselülerize Amniyon Zarının Karakterizasyonu

Deselülerize amniyon zarının karakterizasyonunda histokimyasal analiz ile deselülerizasyon verimi belirlenmiştir. Histokimyasal analiz için, deselülerizasyon öncesinde ve sonrasında amniyon zarından alınan örnekler, %4 (w/v)’lük formaldehit fiksasyonunun ardından, artan alkol serilerinde suyu uzaklaştırıldı ve ksilolden

geçirildikten sonra doku saydamlaştırılmıştır. Rutin histoloji için işlemlerden geçirildikten sonra parafin bloklara gömüldü, dondurulan bloklardan mikrotom yardımı ile 4-6 µm kesitler alınmıştır. Boyama işlemi için öncelikle deparafinizasyon yapılmıştır. Etüv’ de 55-60°C’de 2 saat kurutulduktan sonra, ksilolden ve alkolden geçirilmiştir. Su ile yıkama işlemi yapıldıktan sonra Hematoksilin & Eosin (H-E) ile hücre çekirdek ve sitoplazma yapıları boyanmıştır. Işık mikroskobu altında hücresel yapıları incelenmiştir.

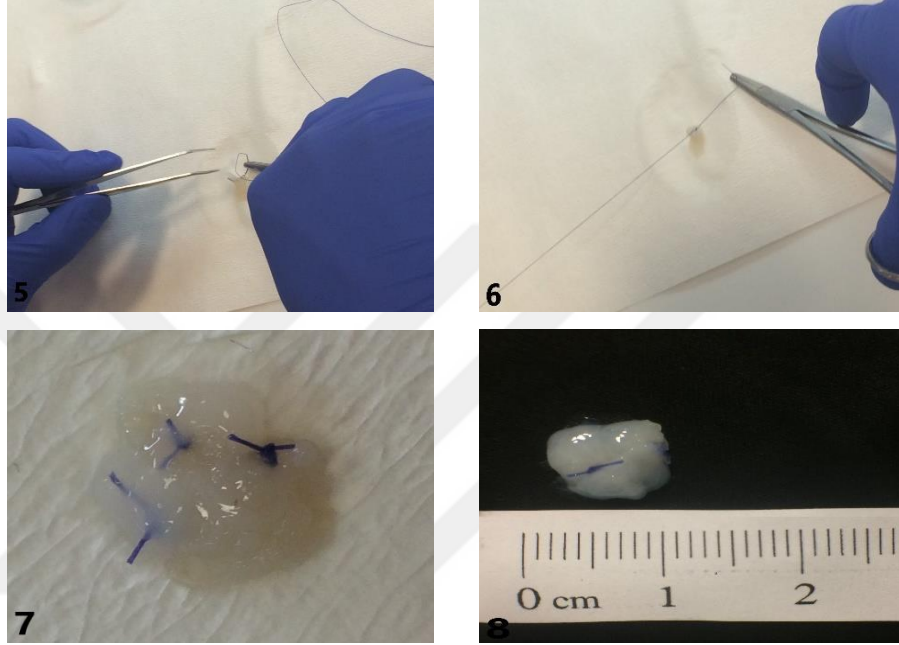
Oliveira ve arkadaşlarının ince bağırsak submukoza deselülerizasyonu yaptıktan sonra uyguladıkları deselülerizasyon incelemesi referans alınarak doku yapısında yarı kantitatif H&E analizi yapılmıştır. Analiz için ince bağırsak submukoza deselülerizasyonunda şu sınıflandırma: (0) yüksek düzeyde düzenli doku, (1) düşük düzeyde düzensiz doku, (2) orta düzeyde düzensiz doku, (3) yüksek düzeyde düzensiz doku olarak kullanılmıştır (51). Sınıflandırmaya göre puanlamalarla deselülerize zar hakkında değerlendirmeler yapılmıştır.

Ayrıca her preperatta bazal membrana bakılarak ve hücre yoğunluğu en yoğun olan beş bölge seçilerek o alanlardaki hücreler sayılmış, dokulardaki hücre yoğunluğu istatistiksel olarak t-test yapılarak değerlendirilmiştir.

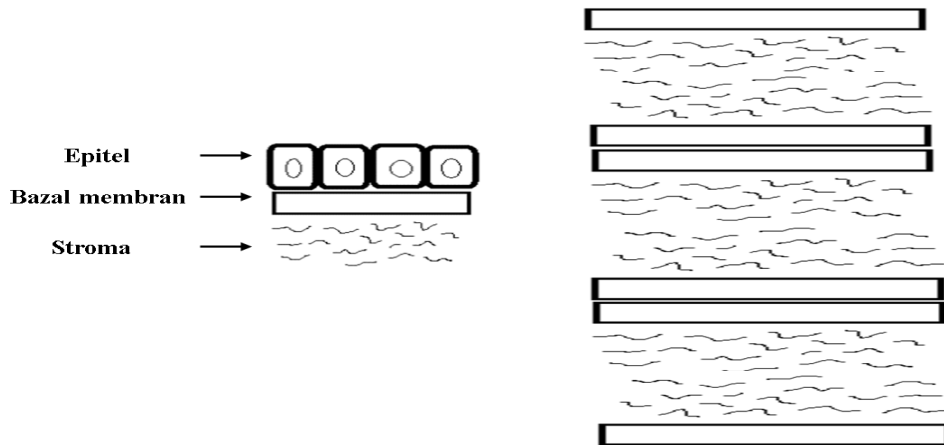
3.6. Çok Katlı Deselülerize Amniyon Zarı Doku İskelelerinin Hazırlanması

Deselülerize edildikten sonra amniyon zarları -80°C’de birkaç gün kullanılacak zamana kadar saklanmıştır. Kullanım öncesi oda sıcaklığına getirilen amniyon zarları PBS ile yıkanmıştır. Çok katlı doku iskelesi oluşturmak amacıyla her doku iskelesi için üçer tane deselülerize amniyon zarı kullanılmıştır. Kullanılmadan önce üzerindeki suları kurutma kağıdı kullanılarak emdirilmiştir. Amniyon zarının stromal katmanı kıkırdak hücrelerinin çoğalması, yaşaması ve tutunmasına olanak sağlaması ve tip 2 kolajen varlığı nedeniyle verimli bir ortam olarak değerlendirilmektedir (61). Bu nedenle çok katlı amniyon zarı doku iskeleleri hazırlamak için, amniyon zarları stromal katmanları yüz yüze gelecek şekilde alt alta dizilmiştir (Şekil 3.6.2.). Gong ve arkadaşlarının deselülerize kıkırdak yaprakları (tabakaları) ile yaptığı sandiviç

modelden ilham alınarak deselülerize rat amniyon zarlarının steril absorbe edilebilir PGA iplikli 4.0 cerrahi iğne yardımıyla dikilmesi ile bohça şeklinde katlanan çok katlı doku iskeleleri meydana getirilmiştir (67). Oluşturulan çok katlı amniyon zarı doku iskelelerinin kalınlıkları ve çapları ölçülmüştür (Şekil 3.6.1). Hazırlanan çok katlı deselülerize amniyon zarları hücre kültüründe, metabolik aktivite testleri ve hücre tutunma testlerinde kullanım öncesi UV C kabiniinde 1-2 dk kadar sterilize edilmiştir.



Şekil 3.6.1: Çok katlı amniyon zarı dikiş işlemleri ve ölçümleri.



Şekil 3.6.2. Çok katlı deselülerize amniyon zarı doku iskelesinin şematik gösterimi.

3.7. Metabolik Aktivite Testi

Metabolik aktivite testinde L929 fibroblast hücreleri kullanılmıştır. Hücre ekimi için öncelikle kriyotüplerle -80°C’de dondurularak saklanan L929 hücreleri, dondurucudan alınarak hızlıca çözündürülmüştür. Tüpler alkolle sterilize edilip kabin içerisine alınmıştır. İçerisinde % 89 DMEM, % 10 FBS ve % 1 Penisilin Streptomisin olacak şekilde besiyeri hazırlanmıştır. Çözülme işlemi gerçekleştirilirken hücreler falkonlara alındıktan sonra üzerlerine 4 mL besiyerinden eklenmiştir. Sonra falkon tüpteki hücreler 2000 rpmde 2 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda falkondaki üst kısım olan süpernatant atılmış ve pellet yani hücreler besiyeri ile karıştırılarak flaska aktarılmıştır. 37°C’ de %5 CO₂ içeren inkübatöre yerleştirilen flasklar 24 saatte bir kontaminasyon ve hücre çoğalmalarının incelenmesi için kontrol edilmiştir.

Ekilen hücreler flask yüzeyini tamamen kapladığında tripsin enzimi ile flask yüzeyinden kaldırılmış ve pasajlama için yeni flasklara aktarılmıştır. Yeterince çoğaltılan L929 hücreler flask yüzeyini kapladığında flasktaki yapışan hücreleri kaldırmak için içindeki vasat atılıp 2 mL PBS (1X) ile yıkanmış, üzerlerine 2 mL Tripsin-EDTA eklenmiştir. Etüvde 4 dakika inkübe edilmiş, inkübasyon sonunda hücrelerin yüzeyden ayrılmalari mikroskop ile kontrol edilmiştir. Yüzeyden ayrılan hücrelere taze besiyeri eklenerek, falkonlara aktarılmıştır. 2000 rpm ve 2 dakika santrifüj yapılarak süpernatant kısmı atılarak tüpün altında kalan pellet pıt pıtlanarak ve 1 mL taze besiyeri ile karıştırılmıştır. Daha sonra hücrelerin sayımı tripan blue ile boyanarak yapılmıştır. Kuyucuk başına 20x10⁴ hücre olacak şekilde 48 kuyucuklu plaklara (well plate) ekilmiştir. Hücreler 37°C’de, %5 CO₂’li inkübatörde 24 saat inkübe edilmiştir.

24 saatlik inkübasyon sonunda doku iskeleleri 5 tekrar olarak hücrelerin bulunduğu plaklara eklenmiş ve 24 saat inkübasyonun sonunda kuyucuklardaki vasat atılmıştır. Her kuyucuğa taze hazırlanan (1mg/mL MTT) 70 µl MTT solüsyonundan eklenerek, 2 saat 37°C’de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda MTT solüsyonu atılıp kuyucuklara 100 µl izopropanol eklenerek, ELİSA okuyucuda 570 nm absorbans değerleri ölçülmüştür.

3.8. Biyomekanik Test

Hazırlanan çok katlı doku iskelelerine SHIMADZU (AGS-X/EZ-X, ODTÜ Merkez Laboratuvarı) marka çekme test cihazı yardımı ile 40N'luk basma kuvveti uygulanarak çok katlı amniyon zarlarının tahribat testi yapılmıştır. Elde edilen sonuçlardan üzerine binen kuvvet (N) ve uzama- yer değişimi (mm) grafiği çizilmiştir. Yer değiştirmelerine göre değerlendirilmeler yapılmıştır. İstatistiksel değerlendirmeleri yer değiştirme miktarlarına göre t-test hesaplanarak yapılmıştır. Ayrıca 0,01-1N aralığında uygulanan kuvvetle kuvvet kontrollü (denetimli) biyomekanik test yapılmıştır. Kuvvete bağlı yer değişimi değerleri hesaplanmıştır.

3.9. Hücre Tutunma Testi

Hücre tutunma deneylerinde SW-1353 (ATCC) kondrosarkom insan hücre hattının 14. pasajları kullanılmıştır. -80°C'de dondurularak saklanan SW-1353 hücre hattı yukarıda anlatıldığı hücre açma işlemleri gibi yapılarak çözündürülmüştür. Hızlıca çözülme işlemi gerçekleştirilirken hücreler falkon tüp içerisine alındıktan sonra % 89 DMEM (High Glucose Medium), % 10 FBS ve % 1 antibiyotik içeren besiyerinden 4 mL eklenmiştir. Hücre ve besiyeri bulunan falkonlar 2000 rpmde 2 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj işleminin ardından falkon içerisinde bulunan süpernatant atılmış ve pellet yani hücreler besiyeri ile karıştırılarak flaska konulmuştur. 37°C' de % 5 CO₂ içeren inkübatöre alınan flasklardaki hücrelerin 24 saatte bir kontaminasyonu ve çoğalmaları kontrol edilmiştir.

Ekilen hücrelerin birkaç hafta boyunca çoğalmaları kontrol edilmiştir. Uygun miktarda çoğaltılan hücreler flask yüzeyini tamamen kapladığında tripsin enzimi yardımı ile kaldırılmış ve pasajlanarak yeni flaslara aktarılmıştır. Flasklarda çoğaltılan SW-1353 hücrelerin yüzeye yapışma oranlarına göre yüzeyden ayrılma işlemi 2 mL Tripsin-EDTA eklenerek gerçekleştirilmiştir. 4 dakika boyunca etüvde inkübe edilmiş ve inkübasyondan sonra hücrelerin yüzeyden ayrılmaları mikroskop ile kontrol edilerek taze besiyeri ile hücreler falkonlara aktarılmıştır. Falkonlar 2000 rpm ve 2 dakika santrifüj edilmiştir. Yapılan santrifüj işleminin ardından süpernatant kısmı atılarak tüpün en alt kısmındaki hücreler 1 mL taze besiyeri ile pipetlenerek

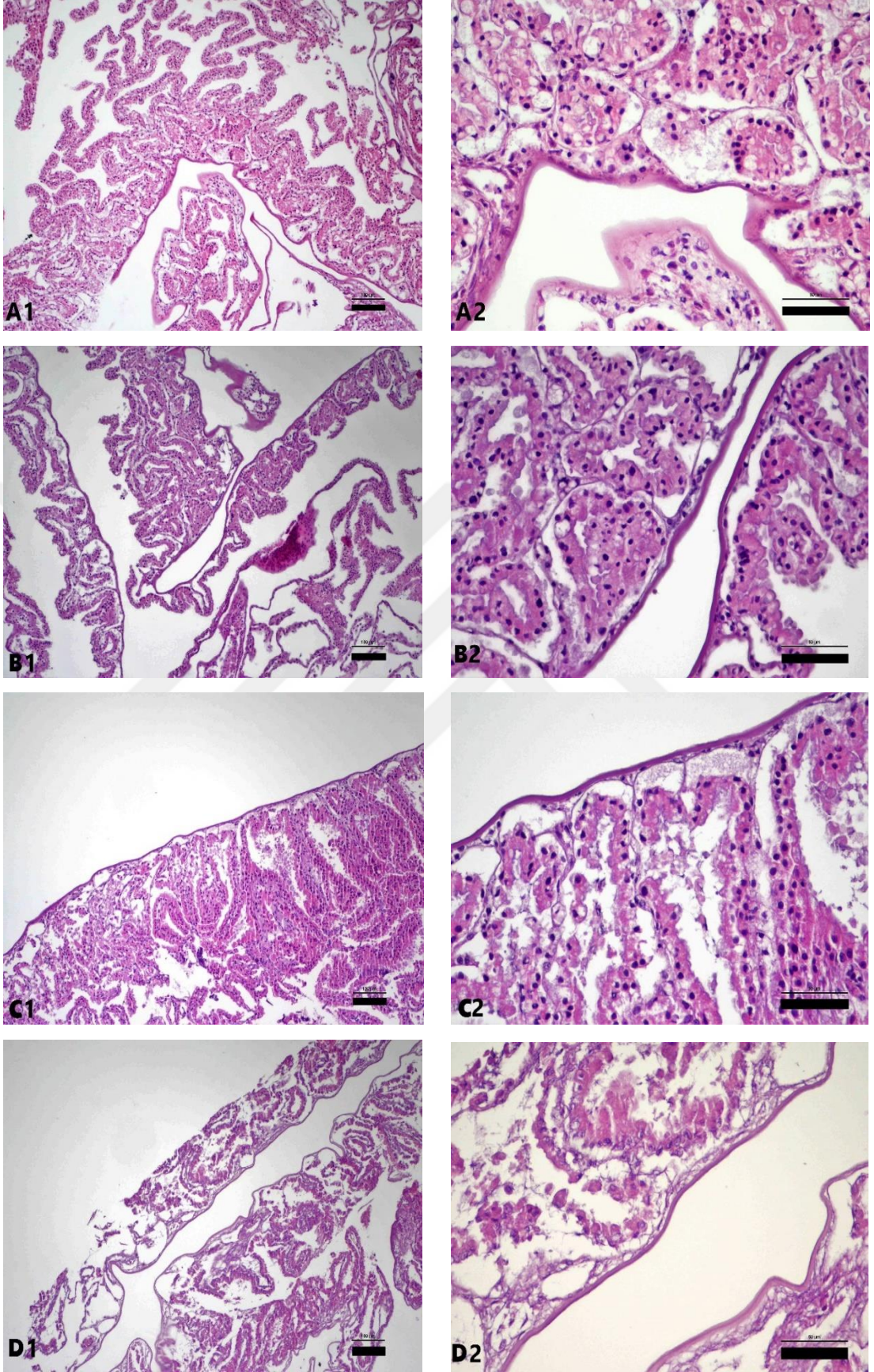
kariştırılmıştır. Bu işlemin ardından hücrelerin sayımı tripan blue ile boyanarak yapılmıştır. 25×10^4 hücre daha önceden oda sıcaklığında kurutulan ve UV C’de sterilize edilen çok katlı deselülerize amniyon zarı doku iskelelerinin üzerine ekilmiştir. Yani ortalama 10 mm uzunluğunda ve 5 mm kalınlığında olan doku iskelelerine aynı miktarlarda hücre ekimi gerçekleştirilmiştir. 24 saat 37 C’ de % 5 CO₂ içeren inkübatöre bırakılmıştır. Daha sonra hücre yapışmaları inverted mikroskop ile kontrol edilmiştir.

48 saat sonunda yapışma gerçekleştiğinde hücrelerin SEM görüntülerini almak için besiyeri çekilip, serum fizyolojik ile yıkanan doku iskeleleri oda sıcaklığında ağzı kapalı plakalarda kurutulmuştur. SEM görüntülemeye hazırlamak için, kuruyan numuneler karbon bandıyla tutturulup altın (Au) ile kaplama yapılarak, görüntüleme haznesine alınmış ve çok katlı doku iskeleleri ve tutunan hücreler incelenmiştir.

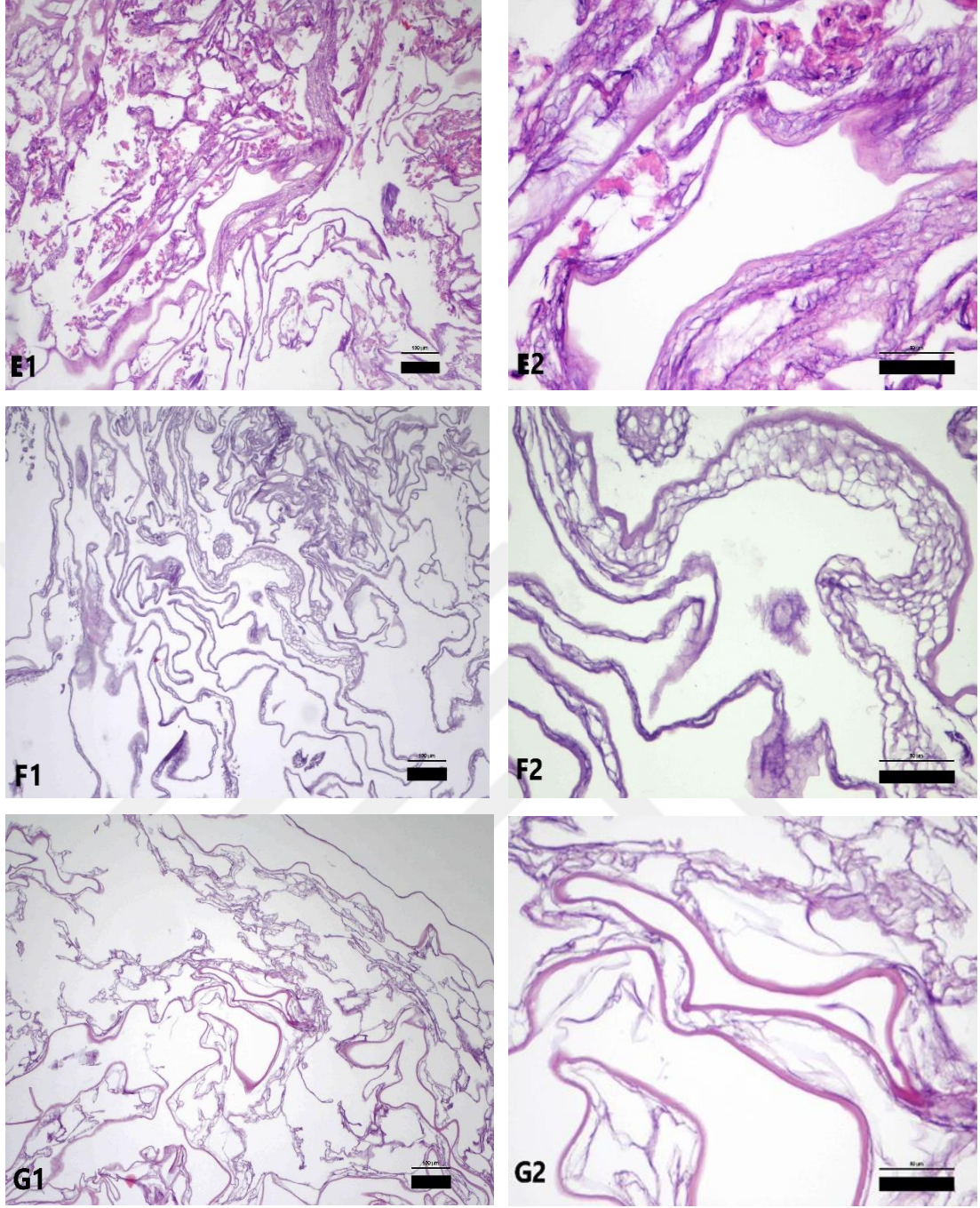
4. BULGULAR

4.1. Deselülerizasyon Karakterizasyonu

Amniyon zarları deselülerizasyonu için fiziksel ve kimyasal yöntemler farklı kombinasyonlarda denenerek, yapılmak istenen doku iskeleleri için en verimli hücresizleştirme işlemi histokimyasal boyama yapılarak tespit edilmiştir. Kontrol grubu ile birlikte toplam 7 farklı grubun deselülerizasyon sonrası hematoksilin & eozin boya ile hücre ve sitoplazmaları boyanmıştır. Edilen deselülerize amniyon zarlarının Hematoksilin & Eosin (H-E) boyanmış slaytları ışık mikroskobu yardımıyla incelenmiştir. Işık mikroskop kamerası ile boyama fotoğrafları çekilen dokularda hücre çekirdeği ve sitoplazmaları gösterilmiştir (Şekil 4.1.1).



Şekil 4.1.1: Rat amniyon zarının deselülerizasyon işlemleri sonrası hematoksilin & eozin boyama görüntüsü. Sol kısımdaki fotoğraflar ışık mikroskop 10X görüntüsü ve bar ölçümü 100µm, sağ kısımdaki fotoğraflar ise 40X ve bar ölçümü 50 µm.



“Şekil 4.1.1 (devam)”: Rat amnion zarının deselülerizasyon işlemleri sonrası hematoksilin & eozin boyama görüntüsü. Sol kısımdaki fotoğraflar ışık mikroskop 10X görüntüsü ve bar ölçümü 100µm, sağ kısımdaki fotoğraflar ise 40X ve bar ölçümü 50 µm.

Elde edilen nitel gözlem sonuçları;

Kontrol grubu olan A grubu amnion zarları büyük oranda kan damarlarından temizlenmiştir. Hücresel yapıları korunmuştur. B ve C grubu amnion zarlarının hücrelerinde kayıp gözlemlenmemiştir ve kontrol ile karşılaştırıldığında, hücre debrisini tamamen yerindedir. D grubu amnion zarlarının hücre kaybı C grubu ile

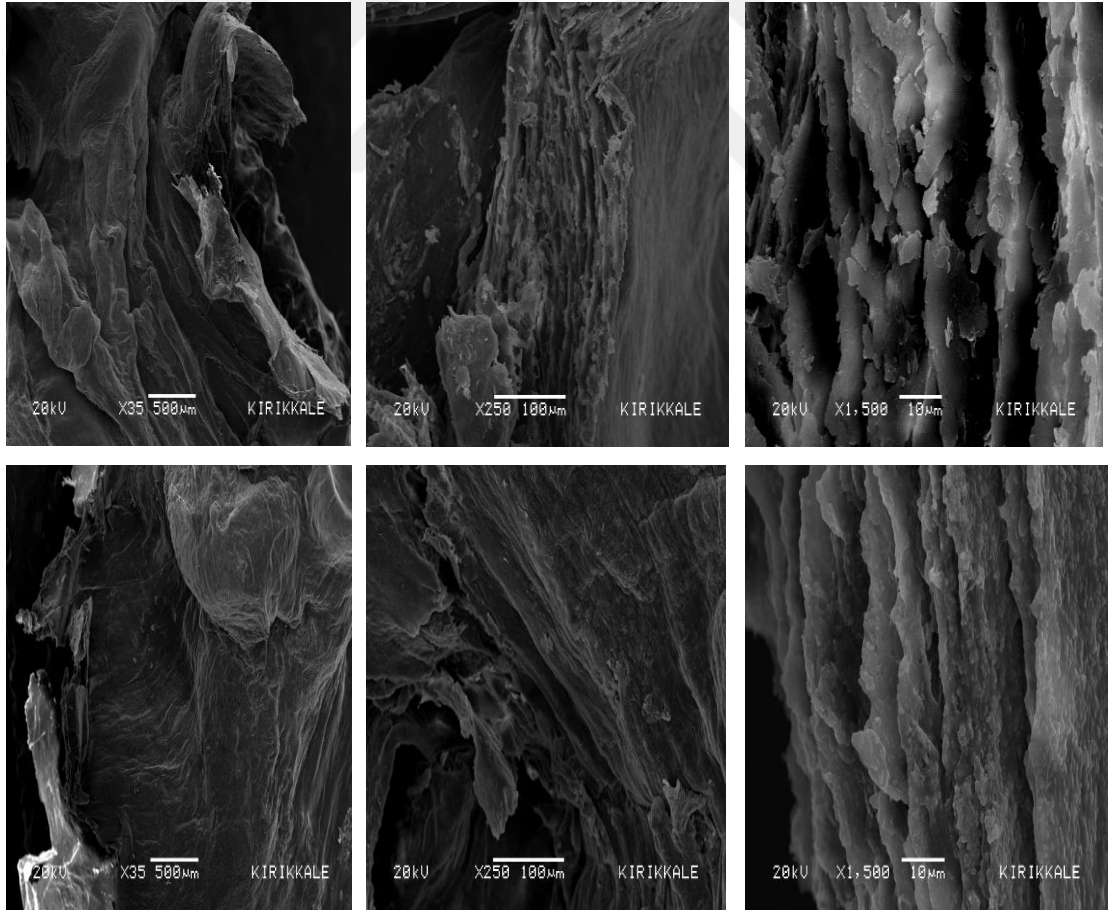
karşılaştırıldığında arttığı gözlemlenmiştir ve hücre debris C'ye göre az miktarda ortadan kaldırılmıştır. E grubu amniyon zarlarının hücre kaybı D grubuna göre daha fazladır. Hücre debris ise büyük oranda ortadan kaldırılmıştır. F grubu amniyon zarlarının hücre kaybı tamamen gerçekleştirilmiştir ve hücre debris çok az oranda mevcuttur. Bağ doku yapısının kontrol ile benzerlik gösterdiği gözlemlenmiştir. G grubu amniyon zarlarının hücre kaybı ise F grubuna göre biraz daha fazladır. Hücresel yapıları ve hücre debris tamamen ortadan kaldırılmıştır. Bazal membranın F grubuna göre daha ince ve zayıf olduğu gözlemlenmiştir.

Doku yapısı/düzeninde Oliveira ve arkadaşlarının yaptığı yarı nicel (semi-quantitative) analiz sınıflandırması referans alınarak (51) her deney grubundaki puanlandırmaların ortalamaları alınmıştır. Daha öncede bahsedildiği gibi yarı kantitatif H&E analiz sınıflandırması: (0) yüksek düzeyde düzenli doku, (1) düşük düzeyde düzensiz doku, (2) orta düzeyde düzensiz doku, (3) yüksek düzeyde düzensiz doku olarak verilmiştir. Gruplara verilen puan ortalamaları A (kontrol), 0; B; 0, C; 0, D; 1; E; 2, F; 3, G; 3'tür. Elde edilen sonuçlarda A, B, C gruplarındaki amniyon zar yapılarının yüksek düzeyde düzenli olduğu ve hücresel yapıların bozulmadığı; D grubu amniyon zarlarında düşük düzeyde düzensizlik ve hücresel yıkımların başladığı; E grubu amniyon zarlarında orta düzeyde düzensizlik ve hücre debrisinin gözlemlendiği; F ve G gruplarındaki amniyon zarlarının yapısında yüksek düzeyde düzensizlik olduğu ve hücre debrisinin G grubunda biraz daha fazla olmak üzere ortadan kaldırıldığı tespit edilmiştir.

Diğer bir değerlendirmede ise her örnekte üç preparatta hücre yoğunluğu fazla olan beş farklı bölge seçilerek 40X büyütmede hücre sayımı yapılmıştır. Her grup için sayılan hücrelerin istatistiksel değerlendirmeleri t-test ile yapılmıştır. İstatistiksel anlamlı verilere p değeri 0,05'ten küçük alınarak ulaşılmıştır. A-B, B-C, C-D, D-E, E-F, E-G olacak şekilde t-test yapılarak p değerleri bulunmuştur. Sırasıyla $p=0,01$, $p<0,01$, $p<0,01$, $p<0,01$ ve $p<0,01$ olarak hesaplanmıştır. Ayrıca kontrol grubu A ile C, D, E, F ve G gruplarının istatistik t-test p değerleri sırasıyla $p=0,4$, $p<0,01$, $p<0,01$, $p<0,01$ ve $p<0,01$ olarak hesaplanmıştır.

4.2. Çok Katlı Deselülerize Amniyon Zarı Yapı İskelelerinin Hazırlanması

Deselülerize amniyon zarlarının karakterizasyonu yapıldıktan sonra, en verimli deselülerizasyon deney protokollerinin uygulandığı amniyon zarları ile çok katlı deselülerize amniyon zarı doku iskeleleri hazırlanmıştır (Şekil 4.2.1). Hücrelerin yaşaması için uygun ortamın sağlandığı amniyon zarının stromal katmanının önemi dolayısıyla zarlarının stromal katmanları yüz yüze bakacak şekilde kat kat sıralı şekilde oluşturulan bohça modelinde doku iskelelerinin kalınlık ve uzunluk (çap) ölçümleri yapılmıştır. F grubu deney protokolü uygulanan amniyon zarlarından oluşturulan çok katlı doku iskelelerinin kalınlığı ortalama $5,08 \pm 0,93$ mm, uzunluğu ise ortalama $10,25 \pm 1,99$ mm ölçülmüştür. G grubunda ise ortalama kalınlık $4,83 \pm 0,55$ mm, ortalama uzunluk $10,75 \pm 2,15$ mm olarak ölçülmüştür. Toplanan amniyon zarı miktarına ve iki gruptaki amniyon zararının inceliğine göre F ve G grubu doku iskeleleri 9 ± 2 kat olacak şekilde hazırlanmıştır.

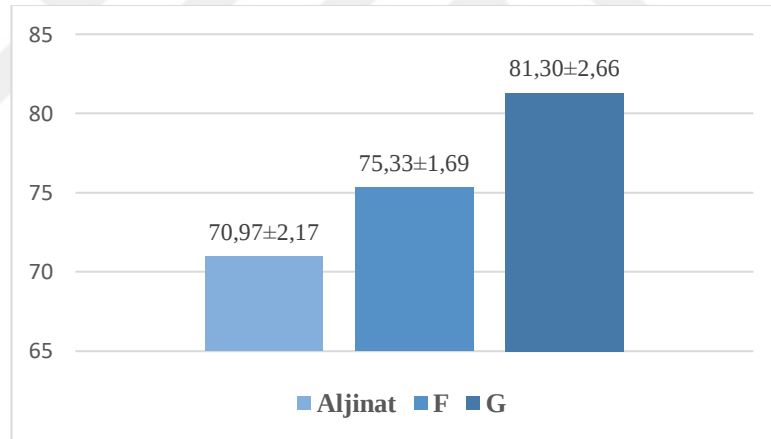


Şekil 4.2.1. Çok katlı deselülerize amniyon zarı doku iskelelerinin SEM görüntüleri. İlk sıra F grubu; ikinci sıra ise G grubu doku iskelelerine aittir. Görüntülerde bohça şeklinde katlanma ve çoklu katlar gösterilmiştir.

4.3. Metabolik Aktivite Testi

Hücre yaşayabilirliği MTT testi yapılarak sitotoksitenin belirlenmesi ile tespit edilmiştir. Bu test ile hücre proliferasyonu MTT kullanılarak, hücre mitokondrilerinden üretilen mitokondriyel dehidrogenaz enzimi sayesinde renk değişimi esasına dayanan kalorimetrik ölçümlerle belirlenmektedir. Eğer hesaplanan canlılık %70' in altında olursa üretilen materyal sitotoksik potansiyele sahip demektir.

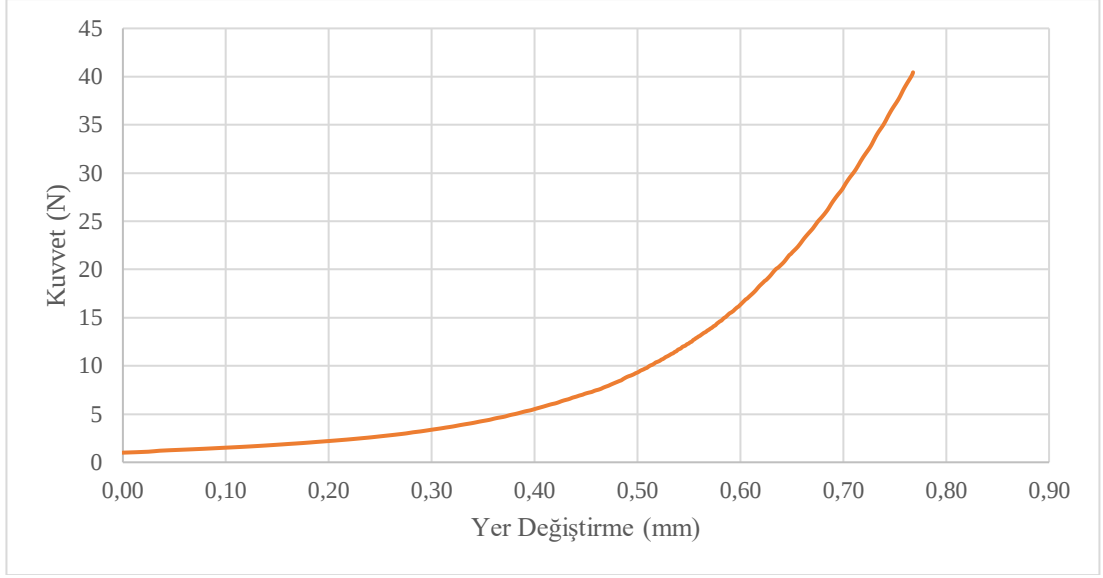
Negatif kontrol olarak sadece hücre ve besi yerinin absorbans değeri alınmıştır. Doku mühendisliğinde kullanılan aljinat hidrojel doku iskeleleri burada diğer bir kontrol olarak değerlendirilmiştir. Aljinat doku iskelesi ve hazırlanan çok katlı amniyon zarı doku iskelelerinin 570 nm dalgaboyunda absorbans değerleri alınarak, doku iskelelerinin sitotoksiteleri karşılaştırılmıştır (Şekil 4.3.1).



Şekil 4.3.1: MTT testine göre % canlılık değerleri.

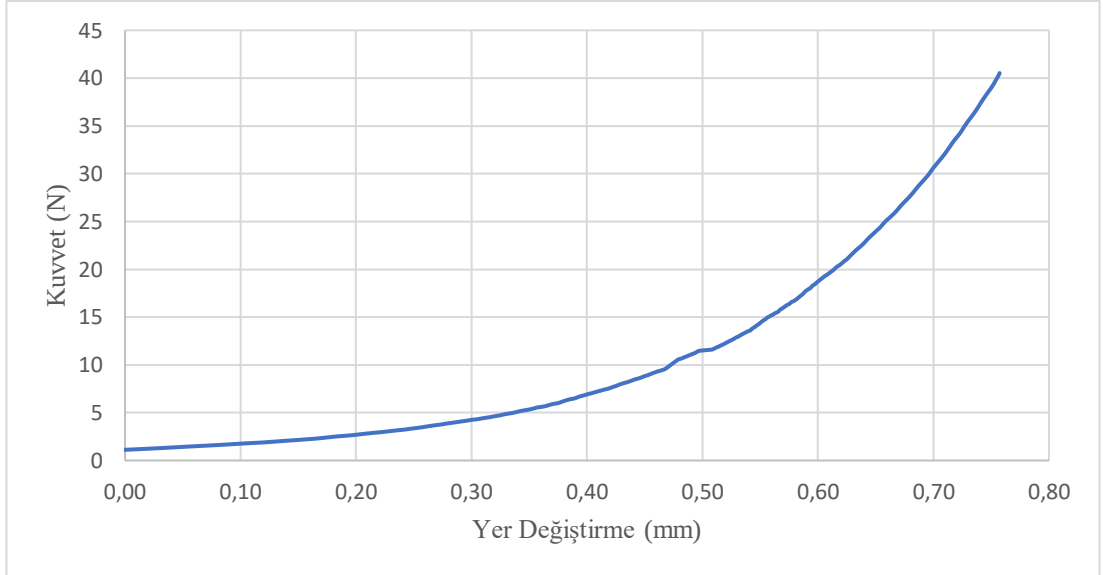
4.4. Biyomekanik Test

Çok katlı hale getirilen amniyon zarlarının mekanik gücünü tespit etmek amacıyla 40 N'luk kuvvetlerle basma testi uygulanarak kuvvete bağlı uzama yani yer değiştirme grafikleri çizilmiştir (Şekil 4.4.1 ve Şekil 4.4.2).



Şekil 4.4.1: F grubu çok katlı doku iskelelerine uygulanan tahribat testi kuvvete bağlı ortalama yer değiştirme grafiği.

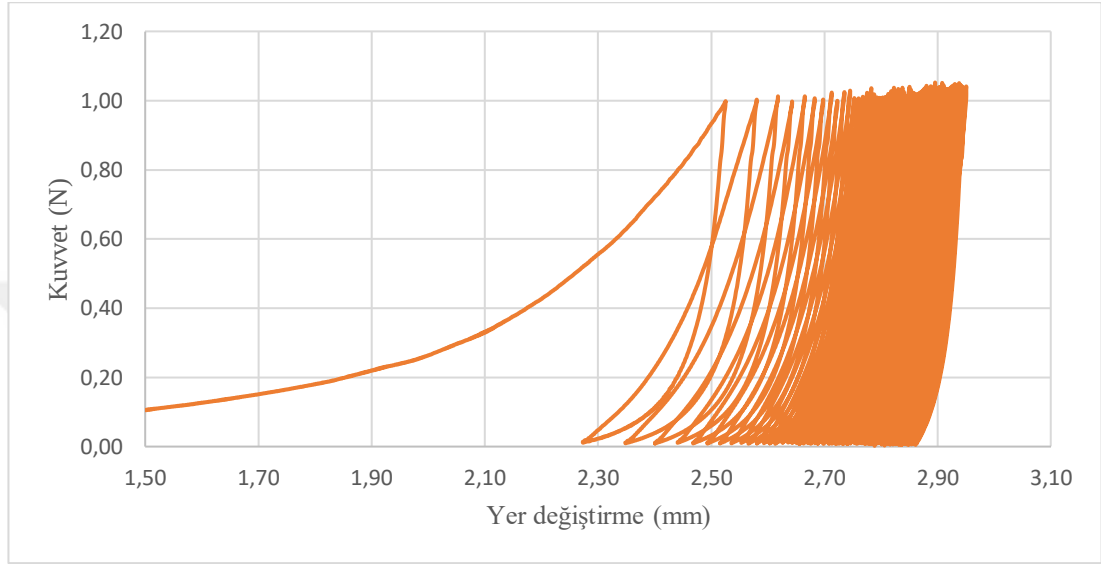
Şekil 4.4.1’deki F grubu amniyon zarlarına uygulanan tahribat kuvvetine bağlı olarak yer değiştirme grafiğine göre 40N’luk kuvvette en fazla 0,77 mm yer değişimi gerçekleşmiştir.



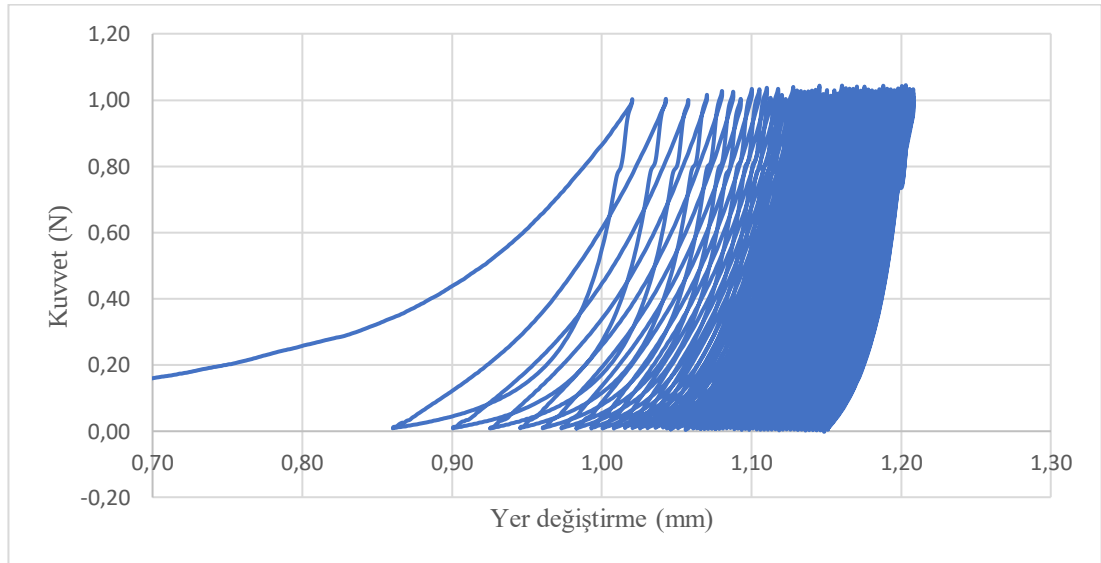
Şekil 4.4.2: G grubu çok katlı doku iskelelerine uygulanan tahribat testi kuvvete bağlı ortalama yer değiştirme grafiği.

Şekil 4.4.2’deki G grubu amniyon zarlarına uygulanan tahribat kuvvetine bağlı olarak yer değiştirme grafiğine göre 40N’luk kuvvette ortalama en fazla 0,75 mm yer değişimi gerçekleşmiştir.

Kuvvet denetimli test ile 0,01-1N aralığında kuvvet amniyon zarı doku iskelelerine uygulanarak bu süreçteki yer değişimlerinin grafikleri elde edilmiştir (Şekil 4.4.3 ve Şekil 4.4.4). Kuvvet denetimli testlere göre, 0,01-1 N aralığında uygulanan döngüsel kuvvete göre F grubunda toplam 2,9 mm yer değişimi varken, G grubu amniyon zarında 1,2 mm yer değişimi gerçekleşmiştir.



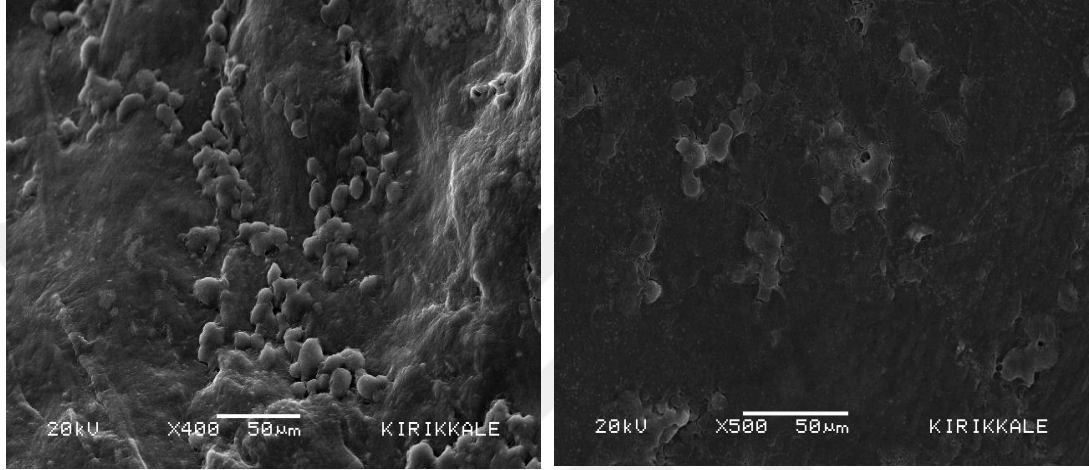
Şekil 4.4.3: F grubu çok katlı doku iskelelerine uygulanan kuvvet denetimli test kuvvet- yer değiştirme grafiği.



Şekil 4.4.4: G grubu çok katlı doku iskelelerine uygulanan kuvvet denetimli test kuvvet- yer değiştirme grafiği.

4.5. Hücre Tutunma Testi

Çok katlı doku iskelelerinin yapısının incelenmesi ve hücre tutunmasının karakterizasyonu için taramalı elektron mikroskop görüntüleri, Kırıkkale Üniversitesi Merkez Araştırma Laboratuvarı desteğiyle JEOL marka (JSM-5600 SEM) elektron mikroskobu ile elde edilmiştir (Şekil 4.5.1).



Şekil 4.5.1: Hücre tutunma testi SEM görüntüleri. F grubu doku iskelesi solda; G grubu doku iskelesi sağda.

5. TARTIŞMA

Araştırmamızda deselülerizasyon protokolü hazırlanırken aşama aşama hücrelerin ortadan kaldırılması hedeflenmiştir. Yani her deselülerizasyon adımı daha fazla hücre ortadan kaldırarak verimli bir deselülerizasyon sağlamak amaçlanmıştır. Deselülerizasyonun karakterizasyonu için H&E ile histolojik boyamalarına göre nitel, yarı nicel ve nicel değerlendirmeleri yapılmıştır.

Nitel gözlemlerde B ve C grupları kontrol grubuyla neredeyse aynı hücre yoğunluğuna sahiptir ve hücresel yapıların korunduğu karşılaştırma sonunda gözlemlenebilmektedir. -80°C dondurup çözündürme basamağında daha önce anlatıldığı ve literatürde geçen bilgilere göre deselülerizasyon beklenmekteydi. Ancak burada neredeyse hiç gözlemlenememiştir. Burada etkili olamamasının nedeni deselülerizasyon için yeterli sürenin verilmemiş olması olabilir. Daha sonra D grubu amniyon zarlarında hipertonic ortam ile deselülerizasyonun başladığı; E grubunda SDS dolayısıyla büyük oranda hücresel kaybın gözlemlendiği ve hücresel debrizin kaldığı; F grubu amniyon zarlarında ise tüm deselülerizasyon basamakları sonunda tam bir deselülerizasyon gerçekleştirilmiştir ve minimal düzeyde hücre debrizinin olduğu söylenebilmektedir. G grubu amniyon zarları ise F grubu gibi tamamen deselülerize edilmiş ve hücresel debriz tamamen ortadan kaldırılmıştır (Şekil 4.1.1).

Doku yapısı ve düzeninin değerlendirildiği puanlamalara göre yani yarı nicel değerlendirmede F ve G gruplarının amniyon zar yapılarında hücresel kayba bağlı olarak yüksek düzeyde düzensizlik bulunmaktadır. Fakat hücre dışı matriks düzeninde bir bozulma belirlenmemiştir. Yani hücresel anlamda düzenin bozulduğu gruplar F ve G gruplarıdır.

Hücre sayımı istatistiksel verilerine göre; sıçan amniyon zarlarının hücresizleştirilmesi için p değeri 0,05'ten küçük olan değerler anlamlı sonuçlara ulaştırmaktadır. Buna göre A-B, B-C, C-D, D-E, E-F ve E-G karşılaştırmalarına göre elde edilen p değerleri 0,05'ten küçük olan B, C, D, E, F ve G gruplarının oluşturulduğu yöntemlerdir. Ancak D, E, F ve G deselülerizasyon yöntemleri daha

anlamli bulunmuştur. Buna göre deselülerizasyonun D grubundan itibaren yani hipertonic ortam ile başladığı söylenebilmekte ve nitel gözlemler desteklenmektedir. C, D, E, F ve G'nin kontrol grubu ile karşılaştırılması sonucu elde edilen p değerlerinden D, E, F ve G gruplarından anlamlı sonuçlar elde edilmiştir. Ancak D ve E grubu amniyon zarlarının hücrel içeriğinden tamamen arındığı yapılan diğer analizlere göre söylenememektedir. Bu durumda en verimli potokoller olarak F ve G grubu amniyon zarlarına uygulanan deselülerizasyon yöntemleri belirlenmiştir.

Kısaca, F ve G grubu amniyon zarları PBS yıkama ile kandan temizlenmiştir. UV altında DNA'ya hasar verilerek hücre bütünlüğünün bozulması yoluyla hücre hasarının gerçekleşmesi beklenmiş fakat hücre bütünlüğünün korunduğu B grubu ile karşılaştırılarak tespit edilmiştir (Şekil 4.1.1). Hücre zarının parçalanması ile hücre lizisi F grubunda protokolün ikinci adımında, G grubunda ise son yani dördüncü adımda -80°C inkübasyon ile sağlanması beklenmiştir. Sonuç olarak; her iki protokolde de sırasıyla önce hipertonic solüsyonla hücreler ozmotik şoka uğratarak zar bütünlüğü bozularak, hücre lizisi gerçekleştirilmiş ve daha sonra SDS yani iyonik deterjan ile hücre ve hücrel materyalin tamamı ortadan kaldırılmıştır yorumu yapılabilmektedir (Şekil 4.1.1).

Metabolik aktivite testinde deselülerizasyonu en iyi gruplar olan F ve G grubu amniyon zarları doku iskeleleri kontrol olan aljinat ile karşılaştırılmıştır. Buna göre F ve G grubu çok katlı deselülerize amniyon zarı doku iskelelerinin hücreler için sitotoksik özellikte olmadığı gösterilmiştir (Şekil 4.3.2). G grubu doku iskelelerinde yüzde canlılık oranı F grubuna göre daha fazladır.

F ve G grubu çok katlı deselülerize amniyon zarları doku iskelelerine yapılan biyomekanik tahribat testi sonucunda; 40N'luk kuvvet uygulandığında F grubunda 0,77 mm yer değişimi, G grubunda ise 0,75 mm yer değişimi gerçekleşmiştir (Şekil 4.4.1 ve Şekil 4.4.2). Tahribat testi yer değişimlerine göre istatistiksel değerlendirmeleri t-test yapılarak p değeri 0,1 olarak hesaplanmıştır (p değeri 0,05'ten küçük olanlar anlamlıdır). Buna göre iki grubun aralarında anlamlı bir farklılık bulunmadığı tespit edilmiştir. Test öncesi ve sonrası yapılan nitel gözlemlere dayanarak, tahribat testi süresi boyunca özellikle F grubunda herhangi bir tahribat gerçekleşmemiştir ve test sonunda amniyon zarları kısa süre sonra eski haline

gelmiştir. G grubu amniyon zarında F'ye kıyasla minimal düzeyde tahrip gözlemlenebilirken o da diğer gruptakiler gibi eski haline kısa sürede dönmüştür.

Kuvvet denetimli testte ise 0,01-1 N aralığında kuvvet uygulanan F grubu doku iskelelerinde maksimum yer değiştirme 2,9 mm iken; G grubu doku iskelelerinde 1,2 mm olarak ölçülmüştür (Şekil 4.4.3 ve Şekil 4.4.4). Yer değiştirmelerin başladığı andan itibaren aynı kuvvette F grubu doku iskeleleri daha fazla (0,7 mm) yer değiştirme gerçekleştirirken; G grubunda daha az (0,4 mm) yer değiştirme gerçekleşmiştir. Gözlemlere dayanarak, yapılan biyomekanik testlerin her ikisinde de amniyon zarı doku iskeleleri kısa sürede eski hallerine dönmüştür. Sonuç olarak biyomekanik test verileri bu malzemelerin özellikle F grubu doku iskelelerinin esnek karakterde ve dayanıklı malzemeler olduğu iddaasını güçlendirmektedir.

Doku iskelelerinde hücre tutunma deneyi insan kondrosarkom hücreleri ile yapılmıştır. Hücresel tutunmaları taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile değerlendirilen çok katlı deselülerize amniyon zarı doku iskelelerinde, hücre tutunmalarının gerçekleştiği gösterilmiştir. Yaklaşık olarak 10 mm uzunluğa ve 5 mm kalınlığa sahip olan doku iskelelerine (F ve G) eşit miktarlarda ekimi yapılan hücrelerin, F grubu doku iskelelerinde tutunma miktarı G grubuna görece daha fazla olduğu gözlemi yapılabilmektedir (Şekil 4.5.1).

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Doku mühendisliği ve rejeneratif tıbbın amacı hasta ve hasarlı doku veya organların işlevlerini tekrar kazandırabilmektir. Bu amaçla kök hücreler, greftler ve biyomühendislik ürünleri kullanılmaktadır. Rejeneratif tıpta, gelecekte doku veya organ transplantasyonunda kullanılmak üzere hücrelerle birlikte yeni biyomalzemelerden üretilen otolog doku greftlerinin kullanılması amaçlanmaktadır. İnsan pluripotent kök hücreleri kullanılarak üretilecek, hastaya/kişiyeye özgü doku veya organların biyomühendislik ürünleri için doku ve organ kaynaklı deselülerize hücre dışı matriks kaynaklı doku iskelelerinin kullanımı terapötik uygulamalarda önemli bir yer almaktadır. Bu durumda canlı vücuduna uyumlu, bozunabilir ve rejenerasyona katkı sağlayacak greft üretimi önem kazanmaktadır. Buna göre, doğal dokuya benzer biyoaktiviteye sahip hücre dışı matriks kaynaklı doku iskeleleri diğer biyomalzemelere göre daha çekici konumdadır.

Bu araştırmada çok katlı deselülerize amniyon zarının doku iskelesi olarak eklem kırıkdağı için değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla öncelikle deselülerizasyon için uygun metodoloji aranmış, deselülerizasyon gruplarından sadece ikisinde F ve G gruplarında verimli deselülerizasyon tespit edilmiştir. PBS ile yıkama, UV, -80°C dondurma, hipertonic ortam ve SDS yıkama ile deselülerizasyonu yapılan F grubu amniyon zarlarından farklı olarak G grubunda, sadece bu yöntemlerin uygulama sıraları değiştirilerek yapılmıştır. Daha sonra üç boyutlu doku iskelesinin oluşturulması için deselülerize amniyon zarları kat kat dizilerek, özellikle hücreler için daha verimli bir ortam sağlayan stromal katmanları yüz yüze bakacak şekilde yerleştirilmiştir. Bu şekilde bohça şeklinde kıvrılarak dikilmiş ve çok katlı hale getirilmiştir. Çok katlı doku iskeleleri sitotoksiteleri, biyomekanik özellikleri ve hücre tutunmaları açısından test edilmiştir. Hücreler için sitotoksik olmayan her iki grup doku iskelelerinden G grubunda canlı hücre yüzdesi daha fazladır. Biyomekanik olarak esnek karakterde olan her iki doku iskelelerinden, F grubunun daha dayanıklı bir malzeme olduğu söylenebilmektedir. Hücre tutunma deneylerinde ise F grubunun hücreler için daha çok tutunma yüzeyi sağladığı görülmektedir.

Yapılan testlerde F ve G grubu doku iskelelerinin genel olarak benzer özellikte sonuçlar göstermesinin yanında deselülerizasyon deney süresi boyunca nitel gözlemlere de dayanarak, F grubu doku iskelelerinin G grubuna göre daha kalın olması klinik olarak kullanılabileceği yerlerde dayanıklılık açısından eklem kıkırdağındaki daha büyük lezyonlarda tercih edilebilir bir materyal olarak düşünülebilir. Ayrıca H&E boyamaların mikroskopta incelenmesi sırasında göze çarpan bir farklılık ise bazal membran ve stromal katmanlarındadır. G grubu doku iskelelerinde F grubuna göre daha ince bazal membran ve stromal katman görüldüğü söylenebilmektedir. Bu durumda deselülerize hücre dışı matrikste hücreler için önemli olan stromal katmanın bozulmadığı F grubu doku iskelesi diğerine göre tercih edilebilir bir materyal olarak değerlendirilmektedir. Diğer taraftan, G grubu amniyon zarları geliştirildiği takdirde çok katlı hale getirilmeden önceki basamağının -80°C dondurma olması, klinik kullanım öncesinde zaten dondurulmuş olması tekrar saklama basamağı gerektirmeyeceğinden klinik kullanımlarında tercih edilebilir biyomateryal olabilir. Rejeneratif tedavilerde oftalmoloji gibi alanlarda da sıklıkla kullanılan amniyon zarının güvenli ve steril ortamlarda saklanabilmesi, gerekli olan kaliteli ürün tedariki açısından standartların sağlanabilmesi için amniyon zarı bankacılığına tüm dünyada ihtiyaç bulunmakta ve geliştirilmesi için çalışmalar yapılmaktadır (68).

Tüm bu sonuçlara göre F grubu çok katlı deselülerize amniyon zarı doku iskeleleri diğerine göre eklem kıkırdağı için kullanılabilir bir biyomalzeme olarak değerlendirilmektedir. Ancak literatürde yer alan deselülerizasyonun karakterizasyonu için ileri testler yapılması mümkündür. Amniyon zarının temininin sağlanamaması ve bazı maddi sınırlılıklar dolayısıyla deselülerizasyon veriminin doğrulanmaya ve desteklenebilir sonuçlar elde edilmeye gereksinimi bulunmaktadır. Doğrulanması için gerekli olan yöntemlerden bazıları ise: Nükleer materyalin kontrolünü için 4',6-diamino- 2phenylindole (DAPI) boyama ile DNA miktar tayini ve ticari olarak temin edilebilen PicoGreen veya propidyum iyodür gibi kitler ile dsDNA'nın kantitatif analizi; hücre zarı veya hücre içi yapıların (mitokondri gibi) kontrolüdür. Ayrıca hücre dışı matriks içeriği ve bütünlüğünün karakterizasyonu için immunohistokimyasal boyamalarla kolajen, GAG, ve fibronektin gibi hücre dışı matriks proteinlerin tespiti (69).

Deselülerize edilmiş dokulardan elde edilen doku iskelelerinin uygulanan deselülerizasyon metoduna göre biyomekanik davranışlarında ve hücresel cevaplarında değişiklik görülebilmektedir. Deselülerizasyonla zarar gören yapışkan proteinler ve glikozaminoglikanlar doku iskelesinin biyoaktivitesini ve üzerindeki hücre göçünü azaltmaktadır. Kolajen ağının bozulması iskelenin mekanik davranışını ve kolajen lif kinematığını değiştirebilmektedir. Yani mekanik mikroçevre değişmektedir. Deselülerizasyon sırasında sert kimyasalların kullanımı ise doku iskelelerinin biyoaktivitesini ve mekanliğini de etkileyen yapıyı bozan önemli faktörlerden biridir (26, 47). Hücre dışı matriks kaynaklı doku iskelelerinin kullanıldığı rejeneratif çalışmalarda etkili deselülerizasyon stratejileri, hücrelerin bu yapılara ekimi, vaskülarizasyon, kök hücrelerin farklılaşmasının qRT-PCR ile karakterizasyonu ve hücre-doku iskelesi transplantasyonunu içermektedir (47). Bu amaçla deselülerize doku iskelelerinin klinik alanda kullanımlarının değerlendirilebilmesi için en uygun optimal şartların sağlandığı ve hücre dışı matriksin korunduğu deselülerize doku iskeleleri hazırlanmalıdır.

Hücrelerin ve genetik materyallerin ortadan kaldırılması, yapının ekilen hücrelere immün reaksiyonu önlenmesinde kritik öneme sahiptir. Bunun için DNA kantitatif analizleri yapılmalıdır. Hücre ve genetik materyalin ortadan kaldırılmasını değerlendirmek için araştırmalarda şu kriterler önerilmektedir: Hücresizleştirilmiş hücre dışı matriksin kuru ağırlığında çift zincirli DNA (dsDNA) 50ng'dan az, DNA fragment uzunluğu 200bp'den daha az ve DAPI boyama ile hiçbir görünür nükleer materyal olmamalıdır. Hücre dışı matrikste kalan, kolajen, fibronektin, laminin gibi yapısal protein içeriği, glikozaminoglikanlar ve büyüme faktörleri değerlendirilmelidir. Uygulamalara bağlı olarak elastik modül ve gerilme direnci orjinal doku ile benzerlik ya da yakınlık göstermelidir (26, 50).

Kısaca bu araştırmada, eklem kıkırdağı için, deselülerize edilen rat amniyon zarlarından geliştirilen çok katlı doku iskelelerinin özellikleri hücre yaşaması, çoğalması, yapışması ve biyomekanik özellikleri yönünden değerlendirilmiştir. Elde edilen tüm bu sonuçlar doğrultusunda hücrelere üç boyutlu bir ortam sağlayan çok katlı deselülerize amniyon zarı doku iskeleleri hücrelerin yaşaması ve iletişimi için destek sağlamıştır. Doku iskelesinin üç boyutlu yapısı yalnız amniyon zarına göre mekanik olarak dayanıklılık da getirerek eklem kıkırdağı için kullanılabilir bir doku

iskelesi olduğu sonucuna varılabilmektedir. Daha önce bahsedildiği gibi deselülerizasyon ve hücre dışı matriksin kontrolünü sağlayan ileri yöntemlerle de test edilerek bu çalışmanın desteklenmesi önerilmektedir. Daha sonra rejeneratif çalışmalarda ortopedi alanında klinik uygulamalarda, halihazırda kullanılan allograft ve ksenograft benzerleri gibi (AmnioM™, Nanofactor™ ürünleri gibi) çok katlı deselülerize amniyon zarının doku iskelesi olarak değerlendirilebilmesi için *in vivo* testlerin gerekliliği de önerilmektedir.

Son yıllarda gelişen üç boyutlu biyoyazıcı teknolojileri sayesinde biyomimetik hidrojel­ler içine kapsüllenmiş farklı hücrelerin kombinasyonları, katman katman işlenerek 3B doku iskeleleri üretilmektedir. 3B yazıcı­lı sistemlerde deselülerize hücre dışı matriks doku iskelelerinin de kullanıldığı bazı araştırmalarda görülmektedir. 3B yazıcı, tasarım ve yapay zeka teknolojilerinin de geliştirilmesi insanlarda kullanılabilecek doku iskelelerinin geliştirilmesine yardımcı olacağı öngörülmektedir (49). Gelecekte ise hücreler için doğal ortamı taklit edebilen, üç boyutlu yapısıyla destek olan, deselülerize, amniyon zarı dahil biyomateriyallerin indüklenmiş pluripotent kök hücreler ve mezenkimal kök hücrelerle hücrelendirilmesi ve karmaşık doku modellerinin üç boyutlu yazıcılar yardımıyla hazırlanması çalışmaları da muhtemeldir.

7. KAYNAKLAR

1. Makris EA, Gomoll AH, Malizos KN, Hu JC, Athanasiou KA. Repair and tissue engineering techniques for articular cartilage, *Nature Reviews Rheumatology*, 2015, 11(1): 21-34.
2. Doral MN, Dönmez G, Atay ÖA, Bozkurt M, Leblebicioğlu G, Üzümcügil A, Aydoğ T. Dejeneratif eklem hastalıkları, *TOTBID Dergisi*, 2007, 6(1-2).
3. Liu Y, Zhou G, Cao Y. Recent progress in cartilage tissue engineering—our experience and future directions, *Engineering*, 2017, 3(1): 28-35.
4. Muinos-Lopez E, Hermida-Gomez T, Fuentes-Boquete I, de Toro-Santos J, Blanco FJ, Diaz-Prado SM. (*) human amniotic mesenchymal stromal cells as favorable source for cartilage repair, *Tissue Eng Part A*, 2017, 23(17-18): 901-912.
5. Atilla HA, Stubbs AJ. Amniyotik membran ve sıvı kaynaklı tedaviler – kök hücre tedavisi, *TOTBID Dergisi*, 2017, 16(3).
6. Sophia Fox AJ, Bedi A, Rodeo SA. The basic science of articular cartilage: Structure, composition, and function, *Sports Health*, 2009, 1(6): 461-8.
7. Laasanen MS, Töyräs J, Korhonen RK, Rieppo J, Saarakkala S, Nieminen MT, Hirvonen J, Jurvelin JS. Biomechanical properties of knee articular cartilage, *Biorheology*, 2003, 40: 133–140.
8. Miller MD, Thompson SR, Hart J, *Review of orthopaedics e-book*, 6th ed. Philadelphia, Elsevier Saunders, 2012: 285-349.
9. Poole CA. Articular cartilage chondrons: Form, function and failure, *Journal of Anatomy*, 1997, 191: 1-13.
10. James CB, Timothy LU. A review of articular cartilage pathology and the use of glucosamine sulfate, *Journal of Athletic Training*, 2001, 36(4): 413–419.
11. Filardo G, Kon E, Buda R, Timoncini A, Di Martino A, Cenacchi A, Fornasari PM, Giannini S, Marcacci M. Platelet-rich plasma intra-articular knee injections for the treatment of degenerative cartilage lesions and osteoarthritis, *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 2011, 19(4): 528-35.
12. Simon TM, Jackson DW. Articular cartilage: Injury pathways and treatment options, *Sports Medicine and Arthroscopy Review*, 2006, 14(3).

13. Kon E, Mandelbaum B, Buda R, Filardo G, Delcogliano M, Timoncini A, Fornasari PM, Giannini S, Marcacci M. Platelet-rich plasma intra-articular injection versus hyaluronic acid viscosupplementation as treatments for cartilage pathology: From early degeneration to osteoarthritis, *Arthroscopy*, 2011, 27(11): 1490-501.
14. Preitschopf A, Zwickl H, Li K, Lubec G, Joo G, Rosner M, Hengstschläger M, Mikula M. Chondrogenic differentiation of amniotic fluid stem cells and their potential for regenerative therapy, *Stem Cell Reviews and Reports*, 2012, 8(4): 1267-1274.
15. Kwon H, Brown WE, Lee CA, Wang D, Paschos N, Hu JC, Athanasiou KA. Surgical and tissue engineering strategies for articular cartilage and meniscus repair, *Nat Rev Rheumatol*, 2019, 15(9): 550-570.
16. Korkusuz F, *Musculoskeletal research and basic science*, 1st ed. London, Springer, 2016: 367-386.
17. Madry H, Kon E, Condello V, Peretti GM, Steinwachs M, Seil R, Berruto M, Engebretsen L, Filardo G, Angele P. Early osteoarthritis of the knee, *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 2016, 24(6): 1753-62.
18. Steadman JR, Rodgey WG, Rodrigo JJ. Microfracture: Surgical technique and rehabilitation to treat chondral defects, *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 2001, 391S: S362-S369.
19. Shah MR, Kaplan KM, Meislin RJ, Bosco JA. Articular cartilage restoration of the knee, *Bulletin of the NYU Hospital for Joint Diseases*, 2007, 65(1): 51-60.
20. Keeley R, Topoluk N, Mercuri J. Tissues reborn: Fetal membrane-derived matrices and stem cells in orthopedic regenerative medicine, *Critical Reviews™ in Biomedical Engineering*, 2014, 42(3-4): 249-270.
21. Bora P, Majumdar AS. Adipose tissue-derived stromal vascular fraction in regenerative medicine: A brief review on biology and translation, *Stem Cell Research & Therapy*, 2017, 8(1).
22. Kunisaki SM, Jennings RW, Fauza DO. Fetal cartilage engineering from amniotic mesenchymal progenitor cells, *Stem Cells And Development*, 2006, 15(2): 245-253.
23. Eslaminejad MB, Jahangir S. Amniotic fluid stem cells and their application in cell-based tissue regeneration, *Royan Institute International Journal of Fertility and Sterility*, 2012, 6(3): 147-156.

24. Howard D, Buttery LD, Shakesheff KM, Roberts SJ. Tissue engineering: Strategies, stem cells and scaffolds, *J Anat*, 2008, 213(1): 66-72.
25. Akbay E, Onur MA. Scaffold technologies: Using a natural platform for stem cell therapy, *Medeniyet Medical Journal*, 2016.
26. Gilpin A, Yang Y. Decellularization strategies for regenerative medicine: From processing techniques to applications, *Biomed Res Int*, 2017, 2017: 9831534.
27. Madeira C, Santhagunam A, Salgueiro JB, Cabral JM. Advanced cell therapies for articular cartilage regeneration, *Trends Biotechnol*, 2015, 33(1): 35-42.
28. Dhal A, Brovold M, Atala A, Soker S. Principles of organ bioengineering. *Kidney transplantation, bioengineering and regeneration*, 1st ed. Cambridge, Massachusetts, Academic Press, 2017. 873-876.
29. Doran PM. Cartilage tissue engineering: What have we learned in practice? In: Doran PM, (ed). *Cartilage tissue engineering methods and protocols*, 1st ed. New York, Humana Press, 2015. 3-21.
30. Cianforlini M, Coppa V, Grassi M, Gigante A. New strategies for muscular repair and regeneration. *Muscle and tendon injuries*, 1st ed. Berlin, Heidelberg, Springer, 2017. 145-156.
31. Patnaik SS, Wang B, Weed B, Wertheim JA, Liao J. Decellularized scaffolds: Concepts, methodologies, and applications in cardiac tissue engineering and whole-organ regeneration In: Liu Q, Wang H, (eds). *Tissue regeneration: Where nano-structure meets biology*, 1st ed. Singapore, WSPC, 2014. 77-124.
32. Krishnamurithy G, Shilpa PN, Ahmad RE, Sulaiman S, Ng CLL, Kamarul T. Human amniotic membrane as a chondrocyte carrier vehicle/substrate: In vitro study, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2011, 99A(3): 500-506.
33. Temenoff JS, Mikos AG. Review: Tissue engineering for regeneration of articular cartilage, *Biomaterials*, 2000, 21: 431-440.
34. Liao J, Tian T, Shi S, Xie X, Ma Q, Li G, Lin Y. The fabrication of biomimetic biphasic can-pac hydrogel with a seamless interfacial layer applied in osteochondral defect repair, *Bone Research*, 2017, 5(1).
35. Song JJ, Ott HC. Organ engineering based on decellularized matrix scaffolds, *Trends Mol Med*, 2011, 17(8): 424-32.

36. Yang M, Wang J, Zhu Y, Mao C. Bio-templated growth of bone minerals from modified simulated body fluid on nanofibrous decellularized natural tissues, *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 2016, 12(4): 753–761.
37. Gholipourmalekabadi M, Mozafari M, Salehi M, Seifalian A, Bandehpour M, Ghanbarian H, Urbanska AM, Sameni M, Samadikuchaksaraei A, Seifalian AM. Development of a cost-effective and simple protocol for decellularization and preservation of human amniotic membrane as a soft tissue replacement and delivery system for bone marrow stromal cells, *Advanced Healthcare Materials*, 2015, 4(6): 918-926.
38. Gholipourmalekabadi M, Sameni M, Radenkovic D, Mozafari M, Mossahebi-Mohammadi M, Seifalian A. Decellularized human amniotic membrane: How viable is it as a delivery system for human adipose tissue-derived stromal cells?, *Cell Proliferation*, 2016, 49(1): 115-121.
39. Chen G, Ushida T, Tateishi T. Scaffold design for tissue engineering, *Macromolar Bioscience*, 2002, 32(2): 462-484.
40. Demirdögen B, Kıkırdak Doku Onarımı İçin Hiyalüronik Asit Temelli Yapı İskelelerinin Geliştirilmesi Ve Hücre Kültürlerinde Kullanımı, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Doktora Tezi, Ankara: Ankara Üniversitesi, 2012.
41. O'Brien FJ. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering, *Materials Today*, 2011, 14(3): 88-95.
42. Duval K, Grover H, Han LH, Mou Y, Pegoraro AF, Fredberg J, Chen Z. Modeling physiological events in 2d vs. 3d cell culture, *Physiology (Bethesda)*, 2017, 32(4): 266-277.
43. Santos E, Hernandez RM, Pedraz JL, Orive G. Novel advances in the design of three-dimensional bio-scaffolds to control cell fate: Translation from 2d to 3d, *Trends Biotechnol*, 2012, 30(6): 331-41.
44. Barralet JE, Wang L, Lawson M, Triffitt JT, Cooper PR, Shelton RM. Comparison of bone marrow cell growth on 2d and 3d alginate hydrogels, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 2005, 16: 515– 519.
45. Tian XF, Heng BC, Ge Z, Lu K, Rufaihah AJ, Fan VT, Yeo JF, Cao T. Comparison of osteogenesis of human embryonic stem cells within 2d and 3d culture systems, *Scand J Clin Lab Invest*, 2008, 68(1): 58-67.
46. Çeviker K, Özseven Ö. S, Şeker CG, Rahim M, Kılıçarslan Ş, Yazkan R. Biyolojik damarsal greft üretiminde hücresizleştirme metodları;

güncel literatür derlemesi, *Med J SDU / SDÜ Tıp Fak Derg*, 2017, 24(1): 12-23.

47. Arslan YE, Hız MM, S. Arslan T. Hücrelerinden arındırılmış hayvansal dokuların rejeneratif tedavilerde kullanımı, *Kafkas Univ Vet Fak Der*, 2015, 21(1): 139-145.
48. Hopper RA, Woodhouse K, Semple JL. Acellularization of human placenta with preservation of the basement membrane: A potential matrix for tissue engineering, *Ann Plast Surg*, 2003, 51(6): 598-602.
49. Garreta E, Oria R, Tarantino C, Pla-Roca M, Prado P, Fernández-Avilés F, Campistol JM, Samitier J, Montserrat N. Tissue engineering by decellularization and 3d bioprinting, *Materials Today*, 2017, 20(4): 166-178.
50. Crapo PM, Gilbert TW, Badylak SF. An overview of tissue and whole organ decellularization processes, *Biomaterials*, 2011, 32(12): 3233-43.
51. Oliveira AC, Garzon I, Ionescu AM, Carriel V, Cardona Jde L, Gonzalez-Andrades M, Perez Mdel M, Alaminos M, Campos A. Evaluation of small intestine grafts decellularization methods for corneal tissue engineering, *PLoS One*, 2013, 8(6): e66538.
52. Akbay E, Onur MA. Rejeneratif tıpta kullanılan organ ve doku deselülerizasyon yöntemleri, *Turkish Journal of Life Sciences*, 2016, 1/2: 96-102.
53. Taghiabadi E, Nasri S, Shafieyan S, Firoozinezhad SJ, Aghdami N. Fabrication and characterization of spongy denuded amniotic membrane based scaffold for tissue engineering, *Cell Journal(Yakhteh)*, 2015, 16(4).
54. Keane TJ, Swinehart IT, Badylak SF. Methods of tissue decellularization used for preparation of biologic scaffolds and in vivo relevance, *Methods*, 2015, 84: 25-34.
55. Kim YS, Majid M, Melchiorri AJ, Mikos AG. Applications of decellularized extracellular matrix in bone and cartilage tissue engineering, *Bioeng Transl Med*, 2019, 4(1): 83-95.
56. Riboh JC, Saltzman BM, Yanke AB, Cole BJ. Human amniotic membrane-derived products in sports medicine, *The American Journal of Sports Medicine*, 2016, 44(9): 2425-2434.
57. Niknejad H, Peirovi H, Jorjani M, Ahmadiani A, Ghanavi J, Seifalian AM. Properties of the amniotic membrane for potential use in tissue engineering, *Eur Cell Mater*, 2008, 15: 88-99.

58. Tan S-L, Sulaiman S, Pingguan-Murphy B, Selvaratnam L, Tai C-C, Kamarul T. Human amnion as a novel cell delivery vehicle for chondrogenic mesenchymal stem cells, *Cell and Tissue Banking*, 2011, 12(1): 59-70.
59. Saghizadeh M, Winkler MA, Kramerov AA, Hemmati DM, Ghiam CA, Dimitrijević SD, Sareen D, Ornelas L, Ghiasi H, Brunken WJ, Maguen E, Rabinowitz YS, Svendsen CN, Jirsova K, Ljubimov AV. A simple alkaline method for decellularizing human amniotic membrane for cell culture, *PLoS One*, 2013, 8(11): e79632.
60. Wilshaw SP, Kearney JN, Fisher J, Ingham E. Production of an acellular amniotic membrane matrix for use in tissue engineering, *Tissue Engineering*, 2006, 12(8).
61. Jin CZ, Park SR, Choi BH, Lee K-Y, Kang CK, Min B-H. Human amniotic membrane as a delivery matrix for articular cartilage repair, *Tissue Engineering*, 2007, 13(4): 693-702.
62. Díaz-Prado S, Rendal-Vázquez ME, Muñíos-López E, Hermida-Gómez T, Rodríguez-Cabarcos M, Fuentes-Boquete I, de Toro FJ, Blanco FJ. Potential use of the human amniotic membrane as a scaffold in human articular cartilage repair, *Cell and Tissue Banking*, 2010, 11(2): 183-195.
63. Friel NA, de Girolamo L, Gomoll AH, Mowry KC, Vines JB, Farr J. Amniotic fluid, cells, and membrane application, *Operative Techniques in Sports Medicine*, 2017, 25(1): 20-24.
64. Sridhar MS, Bansal AK, Rao GN. Multilayered amniotic membrane transplantation for partial thickness scleral thinning following pterygium surgery, *Eye*, 2002, 16(5): 639-642.
65. Topoluk N, Steckbeck K, Siatkowski S, Burnikel B, Tokish J, Mercuri J. Amniotic mesenchymal stem cells mitigate osteoarthritis progression in a synovial macrophage-mediated in vitro explant coculture model, *J Tissue Eng Regen Med*, 2018, 12(4): 1097-1110.
66. Mohan R, Bajaj A, Gundappa M. Human amnion membrane: Potential applications in oral and periodontal field, *J Int Soc Prev Community Dent*, 2017, 7(1): 15-21.
67. Gong YY, Xue JX, Zhang WJ, Zhou GD, Liu W, Cao Y. A sandwich model for engineering cartilage with acellular cartilage sheets and chondrocytes, *Biomaterials*, 2011, 32: 2265-2273.
68. Paolin A, Cogliati E, Trojan D, Griffoni C, Grassetto A, Elbadawy HM, Ponzin D. Amniotic membranes in ophthalmology: Long term data on transplantation outcomes, *Cell Tissue Bank*, 2016, 17(1): 51-8.

69. Kawecki M, Labus W, Klama-Baryla A, Kitala D, Kraut M, Glik J, Misiuga M, Nowak M, Bielecki T, Kasperczyk A. A review of decellurization methods caused by an urgent need for quality control of cell-free extracellular matrix' scaffolds and their role in regenerative medicine, *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2018, 106(2): 909-923.



8. EKLER

Ek-1. Etik Kurul Onay Formu



Kobay Deney Hayvanları Laboratuvarı Sanayi ve Ticaret A.Ş.
İ.O.S.B.21. Cad. 520. Sk. No:2/2 Yenimahalle ANKARA
Tel & Fax: 0 (312) 394 70 94
www.kobay.com.tr

KOBAY DHL A.Ş. YEREL ETİK KURULU BAŞVURU ONAYI		
BAŞVURU BİLGİLERİ	Protokol Numarası	426
	Protokol Adı	Çok katlı deselülerize amniyon zarının ekleme kıkırdığı rejenerasyonuna etkisinin araştırılması
	Başvuru Tarihi	06.11.2019
	Sorumlu Araştırmacı Adı-Unvanı	Prof. Dr. Murat BOZKURT
	Sorumlu Araştırmacı Çalıştığı Kurum	Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi
	Yardımcı Araştırmacılar	Dr. Öğr. Üyesi Safa GÜRSOY Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Doğan AŞIK Sümeyye YUKSEL
KARAR BİLGİLERİ	Onay Numarası	426
	Onay Tarihi	11.11.2019
	Onaylanan Hayvan Türü ve Sayısı	Wistar Albino Rat , Dişi 6 Adet
	Onay Bilgileri	Proje amaç ,gerekçe , yaklaşım ve yöntem yönünden incelenmiş , çalışmanın gerçekleşmesinde etik sakınca bulunmadığına karar verilmiştir.
KOBAY DHL A.Ş. YEREL ETİK KURUL ÜYELERİ	Etik Kurul Başkanı Veteriner Hekim A.Begüm BUĞDAYCI AÇIKKOL	
	Etik Kurul Başkan Yardımcısı Prof. Dr. Güneş ESENDAĞLI	
	Etik Kurul Üyesi Sorumlu Veteriner Hekim Salih SALAR	
	Etik Kurul Üyesi Kürşat DERİCİ	
	Etik Kurul Üyesi Veteriner Hekim Kaan YAVUZYİĞİT	
	Etik Kurul Üyesi Turgut ALTUN	
	Etik Kurul Üyesi Adil KIŞ	
	Etik Kurul Üyesi Uzman Diğdem Yöyen ERMIŞ	
	Etik Kurul Üyesi Ali VAROL	

Ek-2. Özgeçmiş

KİŞİSEL BİLGİLER	
Adı Soyadı	: Sümeyye YÜKSEL
Doğum tarihi	: 30.11.1992
Doğum yeri	: Altındağ- ANKARA
Medeni hali	: Bekar
Uyruğu	: T.C.
Adres	: Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kas İskelet Sistemi ve Regeneratif Tıp Anabilim Dalı, Ankara
Tel	: 05067488392
E-mail	: smyyeyuksel@gmail.com
EĞİTİM	
Lise	: Ankara Nene Hatun Fen Lisesi
Lisans	: Gebze Teknik Üniversitesi Temel Bilimler Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü
Yüksek lisans	: Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kas İskelet Sistemi ve Regeneratif Tıp Anabilim Dalı
YABANCI DİL BİLGİSİ	
İngilizce	: Üst Orta Derece (Upper Intermediate) YDS: 55, YÖKDİL: 75
ÜYE OLUNAN MESLEKİ KURULUŞLAR	

