



T.C.

ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ



**SIĞIR SPİNAL MENİNGSİN HÜCRELERİNDEN ARINDIRILMASI
VE REJENERATİF BİYOMALZEME OLARAK ETKİNLİĞİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Eren ÖZÜDOĞRU

Biyomühendislik ve Malzeme Mühendisliği Anabilim Dalı

ÇANAKKALE

T.C.
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

**SIĞIR SPİNAL MENİNGSİN HÜCRELERİNDEN ARINDIRILMASI
VE REJENERATİF BİYOMALZEME OLARAK ETKİNLİĞİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Eren ÖZÜDOĞRU

Biyomühendislik ve Malzeme Mühendisliği Anabilim Dalı

Tezin Sunulduğu Tarih: 02/07/2019

Tez Danışmanı:

Dr. Öğr. Üyesi Yavuz Emre ARSLAN

ÇANAKKALE

Eren ÖZÜDOĞRU tarafından Dr. Öğr. Üyesi Yavuz Emre ARSLAN danışmanlığında hazırlanan ve **02/07/2019** tarihinde aşağıdaki jüri karşısında sunulan “**Sığır Spinal Meninksin Hücrelerinden Arındırılması ve Rejeneratif Biyomalzeme Olarak Etkinliğinin Değerlendirilmesi**” başlıklı çalışma, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Biyomühendislik ve Malzeme Mühendisliği Anabilim Dalı**’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak oy birliği/oy çokluğu ile kabul edilmiştir.

JÜRİ

Dr. Öğr. Üyesi Yavuz Emre ARSLAN

Başkan

Doç. Dr. Uğur CENGİZ

Üye

Doç. Dr. Fadime KIRAN

Üye

Prof. Dr. Levent GENÇ

Müdür

Fen Bilimleri Enstitüsü

Sıra No:.....

İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI



Bu tezde görsel, işitsel ve yazılı biçimde sunulan tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uyularak tarafımdan elde edildiğini, tez içinde yer alan ancak bu çalışmaya özgü olmayan tüm sonuç ve bilgileri tezde kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.

Eren ÖZÜDOĞRU

TEŞEKKÜR

Bu tezin gerçekleŐtirilmesinde, çalıŐmam boyunca benden yardımlarını esirgemeyen, bilgi ve tecrübesiyle bana yol gÖsteren saygı değer danışman hocam sayın Dr. Öğr. Üyesi Yavuz Emre ARSLAN' a, çalışma süresince tüm zorlukları benimle göğüsleyen Burak KARACA, Büke DEMİR, Evren ERTEN, Aykut YILDIZ, Fatma CAL, Burcu EFE, Hazal KİBAR, Ekin ŐİMŐEK ve Osman Fatih DAMNALI'ya

Histolojik analizlerde yardımlarını esirgemeyen Çanakkale Devlet Hastanesi Patoloji Laboratuvarından Dr. Gamze ÖZCAN'a ve Őule KÖSEOğLU'na

Son olarak hayatımın her aşamasında yanımda olan, sevgilerini ve desteklerini hep hissettiren eŐim Bahar ÖZÜDOğRU, annem Ruveyde ÖZÜDOğRU, kardeŐim Yaren ÖZÜDOğRU ve babam Mehmet ÖZÜDOğRU'ya en içten duygularıyla teŐekkürlerimi ve minnetlerimi sunarım.

Eren ÖZÜDOğRU
anakkale, Temmuz 2019

SİMGELER VE KISALTMALAR

%	Yüzdellik oran
SM	Spinal meninks
dSM	Deselülerize spinal meninks
DMA	Dinamik mekanik analiz
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
GAG	Glikozaminoglikan
H&E	Hematoksilin & eozin
HDM	Hücre dışı matriks
iAMKH	İnsan adipoz kaynaklı mezenkimal kök hücre
mg	Miligram
MKH	Mezenkimal kök hücre
ml	Mililitre
mM	Milimolar
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolyum bromür
ng	Nanogram
nm	Nanometre
Pa	Paskal
PBS	Sodyum klorür içeren fosfat tamponu
pH	Hidrojenin gücü
rpm	Dakikadaki devir sayısı
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
TGA	Termogravimetrik analiz
Tris.HCl	Trizma hidroklorür
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
DMSO	Dimetil sülfoksit
MSS	Merkezi sinir sistemi
3B	3 boyutlu
2,5B	2,5 boyutlu
PAA	Perasetik asit
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SDK	Sodyum deoksikolat

ATR-FTIR

HPR

Atenüe toplam reflektans Fourier dönüŖümlü kızıl ötesi

Hidroksiprolin



ÖZET

SIĞIR SPİNAL MENİNK'S'İN HÜCRELERİNDEN ARINDIRILMASI VE REJENERATİF BİYOMALZEME OLARAK ETKİNLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Eren ÖZÜDOĞRU

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyomühendislik ve Malzeme Mühendisliği Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Yavuz Emre ARSLAN

02/07/2019, 74

Ticari sentetik biyomalzemeler genellikle esnek ve biyolojik olarak aktif değildir, buna ek olarak, düşük biyoyumluluk ve istenmeyen immünojenik etkiler gösterebilirler. Bu sorunların üstesinden gelmek için, bilim adamları doğal dokulardan spesifik biyomalzemeler üretmek için çalışmaktadırlar. Bu tez çalışmasında kullanılan sığır spinal meninksi (SM) Çanakkale'de sağlıklı hayvanların kesildiği yerel bir kesimhaneden elde edilmiştir. SM yeni bir biyomalzeme üretmek için Triton X-100 kullanılarak hücrelerinden arındırılmış ve içerdiği DNA miktarı çift sarmal DNA içerik analizi ile belirlenmiştir. Hücrelerinden arındırma işleminden önce ve sonra sülfatlanmış glikosaminoglikan (GAG'ler) ve kollajen gibi ana matriks bileşenleri, 1,9-dimetilmetilen mavisi (DMMB) ve hidrokspirolin testi ile analiz edilmiştir. Daha sonra, işlem görmemiş sığır spinal meninks (SM) dokusu ve hücrelerinden arındırılan SM türevli iskeleler (dSM), atenüe toplam reflektans Fourier-dönüşümlü kızılötesi (ATR-FTIR) spektroskopisi, termogravimetrik analiz (TGA) ve dinamik mekanik analiz (DMA) ile fizyokimyasal olarak karakterize edilmiştir. İnsan adipoz kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin (iAMKH'ler) dSM üzerinde 1., 3. ve 7. günlerdeki hücre canlılığı MTT kiti kullanılarak değerlendirilmiştir. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve histoloji analizleri hücre adezyonu, göçü ve çoğalmasını gözlemlemek için gerçekleştirilmiştir. Doğal SM'deki kalıntı DNA içeriği, 153.39 ± 53.93 ng/mg kuru ağırlık, dSM'de ise 39.47 ± 4.93 ng/mg ($n=3$) kuru ağırlık olarak hesaplanmıştır. Sonuç olarak üretilen başarılı hücrelerinden arındırılmış SM iskelelerin doku mühendisliği ve rejeneratif tıp uygulamalarında yeni bir biyomalzeme olarak kullanım potansiyelinin olabileceği düşünülmektedir.

Anahtar sözcükler: Deselülerizasyon, İnsan Adipoz Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre, Doku Mühendisliği, Spinal Meninks, Rejeneratif Tıp.



ABSTRACT

DECELLULARIZATION OF BOVINE SPINAL MENINGES AND EVALUATING THEIR EFFICACY AS REGENERATIVE BIOMATERIAL

Eren ÖZÜDOĞRU

Çanakkale Onsekiz Mart University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Master of Science Thesis in Bioengineering and Materials Engineering

Advisor: Assis. Prof. Yavuz Emre ARSLAN

02/07/2019, 74

Commercial synthetic biomaterials are not generally flexible or biologically active; also, they might show low biocompatibility and the undesired immunogenic result(s). Consequently, to defeat these challenges, scientists have working on producing specific state-of-the-art biomaterials from natural tissues. In this study, bovine spinal meninges were obtained from a slaughterhouse located in Çanakkale, Turkey. The bovine spinal meninges were decellularized via Triton X-100 to production a novel biomaterial for tissue engineering and regenerative medicine applications. The nuclear remnant was ascertained with double-strand DNA (dsDNA) content analysis. The essential matrix constituents such as sulfated glycosaminoglycan (GAGs) and collagen before and after the decellularization process were analyzed with 1,9-dimethylmethylene blue (DMMB) and hydroxyproline assay. Afterward, the native bovine spinal meninges (BSM) and decellularized BSM (dSM) were physiochemically characterized by attenuated total reflection Fourier-transform infrared (ATR-FTIR) spectroscopy, thermogravimetric analysis (TGA) and dynamic mechanical analysis (DMA). Cell viability of human adipose-derived mesenchymal stem cells (hAMSCs) on the dSM for 1st, 3rd, and 7th days was assessed using MTT assay. Scanning electron microscopy (SEM) and histology analyses were performed to observe cell adhesion, migration, and proliferation. The dsDNA content in the native BSM was found to be 153.39 ± 53.93 ng/mg dry weight, while in the dBSM-dP was 39.47 ± 4.93 ng/mg (n=3) dry weight. In conclusion, we have considered that the dSM has the notable potential for tissue engineering and regenerative medicine applications.

Keywords: Tissue Engineering, Decellularization, Human Adipose-derived Mesenchymal Stem Cells, Spinal Meninges, Regenerative Medicine

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

TEZ SINAVI SONUÇ FORMU	ii
İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR	v
ÖZET	vii
ABSTRACT.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
BÖLÜM 1	
GİRİŞ	14
1.1. Doku Mühendisliği ve Rejeneratif Tıp	16
1.2. Biyomalzemeler	19
1.2.1. Hücre Dışı Matriks Temelli Biyomalzemeler	21
1.2.1.1 HDM Temelli Biyomalzemelerin Üretim Yöntemleri.....	24
1.2.2. Doğal Biyomalzemeler	30
1.2.3. Sentetik Biyomalzemeler.....	32
1.3. İnsan Adipoz Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücreler.....	33
1.4. Spinal Meninksin Yapısı ve İşlevi	35
BÖLÜM 2	
ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	38
BÖLÜM 3	
MATERYAL VE YÖNTEM.....	39
3.1. Materyal	39
3.1.1. DeneYlerde Kullanılan Materyaller ve Cihazlar	39
3.2. Yöntem.....	40
3.2.1. Sığır Spinal Meninksin Temini	40
3.2.2. Spinal Meninksin Hücrelerinden Arındırılması	41
3.2.3. Çift Sarmal DNA İçeriği Analizi.....	42
3.2.4. GAG İçeriği Analizi	43
3.2.5. Hidroksiprolin İçeriği Analizi	43
3.2.6. Termogravimetrik Analiz	44

3.2.7. Dinamik Mekanik Analiz	44
3.2.8. Atenüe Toplam Reflektans Fourier DönüŖümlü Kızılötesi Spektroskopisi	45
3.2.9. ŖiŖme ve PBS Alım Testi	46
3.2.10. Hücre Kültürü	47
3.2.11. Biyoiskelelerin Tekrar Hücrelendirilmesi	48
3.2.12. Hücrelerinden Arındırılan dSM İskelelerin Üzerine Ekilen Hücrelerin Canlılık Düzeylerinin Belirlenmesi	48
3.2.13. Taramalı Elektron Mikroskopisi.....	49
3.2.14. Histokimyasal Karakterizasyon	50
3.2.15. İstatistiksel Analiz	50
BÖLÜM 4	
ARAŖTIRMA BULGULARI VE TARTIŖMA	51
4.1. Sığır Spinal Meninksin Hücrelerinden Arındırılması ve DNA içerik analizi	51
4.2. Hidroksiprolin ve Glikozaminoglikan İçeriği	52
4.3. Termal ve Biyomekanik Karakterizasyon.....	54
4.4. ATR-FTIR Analizi	56
4.5. dSM İskelelerin PBS Alımı ve ŖiŖme Özellikleri	57
4.6. dSM İskelelerinin <i>In Vitro</i> Hücre Uyumluluğu	59
4.7. dSM İskelelerinin Morfolojik Karakterizasyonu	61
4.8. Histolojik Analiz	63
BÖLÜM 5	
SONUÇ VE ÖNERİLER.....	65
KAYNAKLAR	68
ÖZGEÇMİŖ	I

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1.1. Doku mühendisliği yaklaşımına genel bir bakış (Bajaj ve ark., 2014).....	17
Şekil 1.2. Potansiyel immün reaksiyonların şematik gösterimi (Lygre, 2002).....	23
Şekil 1.3. iAMKH'lerin çoklu soy farklılaşması ifade edilen belirteçlerle ile birlikte şematik gösterimi (Woodruff ve ark., 2012).	35
Şekil 1.4. Spinal kordun anatomisi. Sinir dokusu, omur, dura, araknoid ve pia mater tarafından korunur (Hashemi ve ark., 2015).	36
Şekil 3.1 Spinal korddan ayrılmış ham spinal meninks dokusu	41
Şekil 3.2. Sığır spinal meninksin hücrelerinden arındırılması işleminin şematik gösterimi	42
Şekil 3.3. TGA cihazı	44
Şekil 3.4. DMA cihazı	45
Şekil 3.5. ATR-FTIR analiz cihazı	46
Şekil 3.6. Hazırlanan deney setinin gösterimi	48
Şekil 3.7. MTT testinde formazan mor rengi dönüşümünün kimyasal süreci (Sittampalam ve ark., 2019).	49
Şekil 4.1. Ham (A) ve deselülerize spinal meninks (B)	51
Şekil 4.2. DNA içerik analizi.....	52
Şekil 4.3. Hidroksiprolin içeriği analizi.....	53
Şekil 4.4. Glikozaminoglikan içeriği analizi	54
Şekil 4.5. Ham spinal meninks dokusunun TGA grafiği.....	55
Şekil 4.6. Hücrelerinden arındırılmış spinal meninks dokusunun TGA grafiği	55
Şekil 4.7. DMA analizi	56
Şekil 4.8. ATR-FTIR analizi.....	57
Şekil 4.9. PBS alım testi	58
Şekil 4.10. Şişme testi.....	59
Şekil 4.11. iAMKH'lerin <i>in vitro</i> 'da 1., 3. ve 7. günlerdeki hücre canlılığı (%) grafiği.....	60
Şekil 4.12. Yeterli bolluğa ulaşan iAMKH'lerin 10x büyütme altındaki mikroskopik görünüşü (A), tekrar hücrelendirilen dSM'nin 1. (B), 3. (C) ve 7. (D) günlerdeki makroskopik görüntüleri (Kırmızı bar 100 µm'yi göstermektedir).	60
Şekil 4.13. dSM iskelesinin stereo mikrosokop görüntüsü (kırmızı bar 2000 µm'yi göstermektedir)	62
Şekil 4.14. dSM iskelenin 2.5-B'lu görüntüsü.....	62
Şekil 4.15. dSM ve yeniden hücrelendirilmiş dSM'nin farklı büyütme seviyelerinde (x50, x1500 ve x5000) SEM görüntüleri. Dura (yeşil ok), araknoid (kırmızı ok) ve spinal meninglerin pia (mavi ok) katmanları (A), dSM'nin ağ yapısı (B), iAMKH'lerin dSM iskeleye tutunmalarını sağlayan filopodia yapıları (C), iAMKH'lerin 3. (D) ve 7. (E) günlerdeki yayılması ve çoğalması.	63
Şekil 4.16. H&E boyama sonrası alınan kesitlerin fotoğrafları. SM dokusunun mikromimari yapısı (A), hücre kültürünün birinci gününde iskeleye tutunan iAMKH'ler (B), 3. (C) ve 7. (D) günlerde hücrelerin göçü ve dağılımı. (Kırmızı barlar 200 µm'yi göstermektedir).	64

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa No

Çizelge 1.1. Amerika Birleşik Devletleri'nde yaralanma ve hastalık vakaları (Berthiaume ve ark., 2011)	14
Çizelge 1.2. Doku mühendisliğinde mevcut sorunlar (Berthiaume ve ark., 2011).....	18
Çizelge 1.3. Deselülerizasyon işleminin avantajlarının ve dezavantajlarının karşılaştırılması (Srokowski ve Woodhouse, 2017).....	24
Çizelge 1.4. Hücre Dışı Matriks Temelli Ticari Ürünler	29
Çizelge 1.5. Doku mühendisliği ve rejeneratif tıpta kullanılan, doğal biyomalzemeler (Kim ve ark., 2011)	31
Çizelge. 1.6. Doku mühendisliği ve rejeneratif tıpta kullanılan sentetik biyomalzemeler (Kim ve ark., 2011; Tan ve ark., 2013)	32
Çizelge 1.7. Adipoz ve kemik iliği kaynaklı kök hücrelerin ifade ettiği belirteçler. ++, > %70; +, %30-70; -, %10-30; -, %2-10; —, < %2 (Woodruff ve ark., 2012)..	33



BÖLÜM 1

GİRİŞ

Organ nakli için mevcut bekleme listesi son on yılda sadece Amerika Birleşik Devletleri'nde 120 bini aşmıştır. Organ bağıışı sayısında ciddi bir sıkıntı bulunmakta ve arz ile talep arasındaki fark artmaya devam etmektedir. Günümüzde böbrek, karaciğer, kalp ve akciğer gibi hayati organların nakli son aşama organ yetmezliklerinin tek tedavisidir. İstatistiklere göre her gün yaklaşık 79 kişiye herhangi bir organın nakli yapılmaktadır. Bununla birlikte, her gün ortalama 18 hastadan birinin, organ naklindeki tedarik sıkıntısı nedeniyle öldüğü belirtilmektedir. Bu transplantasyon açığını kapatmak için, doku mühendisliği ve rejeneratif tıp yaklaşımları, biyoiskeleleri ve hücreleri kullanarak dokuları/organları tedavi etmeyi veya yeni doku/organ üretilmesini vaat etmektedir (Bajaj ve ark., 2014). Çizelge 1.1.'de Amerika Birleşik Devletleri'nde meydana gelen yaralanma ve hastalık vakalarının oranları verilmiştir.

Çizelge 1.1. Amerika Birleşik Devletleri'nde yaralanma ve hastalık vakaları (Berthiaume ve ark., 2011)

Hastalıklar	Hasta veya İşlem Sayısı
DERİ	
Yanma	2 Milyon
Ezilme	144 Bin
SİNİR SİSTEMİ	
Spinal kord yaralanmaları	259 Bin
Alzheimer	5,3 Milyon
İSKELET-KAS SİSTEMİ	
Diz protezi	326 Bin/yıl
Kalça protezi	165 Bin/yıl
Kemik grefti	500 Bin/yıl
İskelet-Kas (diğer)	6,3 Milyon/yıl
KARDİYOVASKÜLER	
Kalp hastalıkları	Toplam 26,8 Milyon
Solunum sistemi ameliyatları	1,5 Milyon/yıl

Çizelge 1.1.'in devamı

KARACİĞER	
Karaciğer sirozu	400 Bin
Karaciğer kanseri	16.260/yıl
Hepatit C	3,2 Milyon
PANKREAS	
Diyabet	24 Milyon
SİNDİRİM SİSTEMİ AMELİYATLARI	11 Milyon/yıl
ÜRİNER SİSTEM AMELİYATLARI	2,5 Milyon/yıl

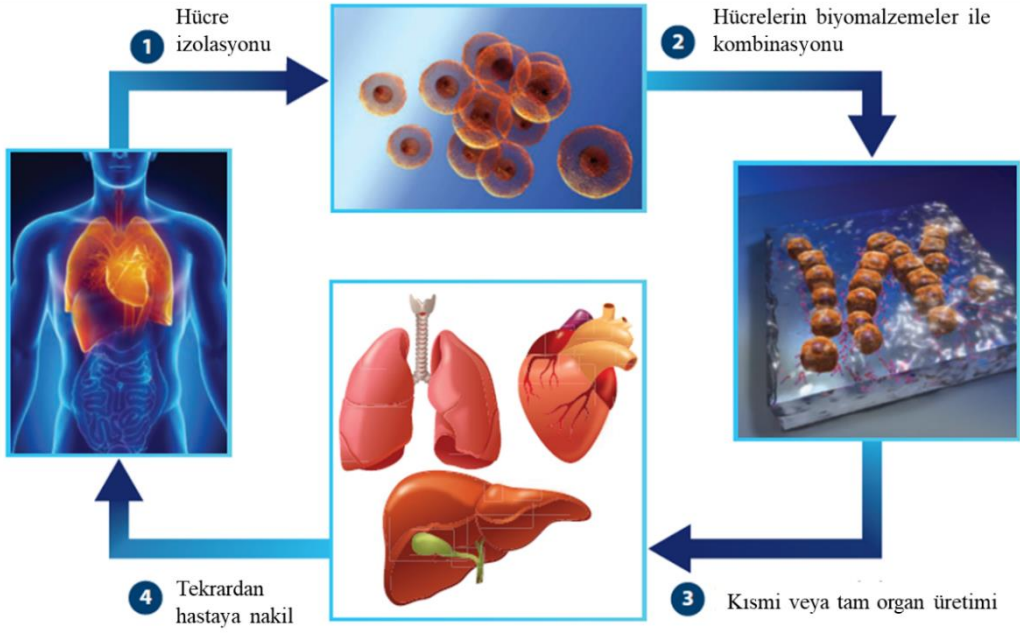
Doku mühendisliğinin amacı, dokuları yeniden oluşturmak, hastaya hücre transplantasyonu ve matriksin dahil edilmesi yoluyla organ fonksiyonunu geri kazandırmaktır. Doku mühendisliğine güncel yaklaşımlar ikame edici, histiyokondüktif ve histiyokondüktif olarak sınıflandırılabilir (Knight ve Evans, 2004). İkame yaklaşımları (*ex vivo*) esasen organın tamamen değiştirilmesidir, bununla birlikte histiyokondüktif yaklaşımlar (*ex vivo*) bir organ dokusunun hasar görmüş kısımlarının onları ikame edebilecek yapılarla değiştirilmesini içerir. Buna karşılık, histiyokondüktif tedaviler dokunun veya organın kendini onarmasına olanak tanır ve plazmid vektörleri veya büyüme faktörleri yoluyla DNA iletimini kullanarak gen terapisini içerebilir (Kim ve Evans, 2005). Zarar görmüş dokuların onarımını sağlamak için bir dizi kriter yerine getirilmelidir. Bu kriterler: 1) Yeterli hücre sayısı olmalıdır, 2) Hücreler uygun fenotipleri gösterebilmelidir, 3) Hücreler yapısal destek/yapı iskelesini benimsemeli ve hücre dışı matriks (HDM) üretmelidir. 4) Üretilen hücrelerin aynı özellikleri gösterebilmesi gerekmektedir. 5) Hücreler immünolojik redde neden olmamalıdır. 6) Asgari miktarda biyolojik risk bulunmalıdır. Doku mühendisliğinde kullanılan hücreler otolog (hastadan), allojenik (bir insan vericiden, ancak immünolojik olarak özdeş değil) veya ksenojenik (farklı bir tür canlı vericiden) temelli olabilir (Vats ve ark., 2002). Otolog hücreler, bağışıklık sistemi komplikasyonlarıyla düşük ilişki göstermesinden dolayı doku mühendisliğinde kullanım için optimum bir kaynak olduğu düşünülmektedir (Knight ve Evans, 2004).

Bu tez çalışmasında sığır spinal meninksisi, hücrelerinden etkili şekilde arındırılmış ve doku mühendisliği ve rejeneratif tıp için HDM temelli doku yaması olarak kullanım potansiyeli değerlendirilmiştir. Bu amaçla, sığır spinal meninksine bir dizi işlem uygulanarak doğal HDM'den türetilen biyoiskele elde edilmiştir. Daha sonra, hücrelerinden

arındırma işleminin etkinliğini belirlemek için DNA içerik analizi gerçekleştirilmiştir. Hücrelerinden arındırma işlemi sırasında HDM'nin işlemlerimiz neticesinde olası hasarını belirlemek için hidroksiprolin ve sülfatlanmış glikozaminoglikan (GAG) analizleri yapılmıştır. Hidroksiprolin, kollajenin bileşenlerinden bir aminoasittir ve hidroksiprolin miktarı kollajen miktarının doğrudan bir göstergesidir. Hidroksiprolin analizi, hidroksiprolin kit prosedürüne göre gerçekleştirilmiştir. Negatif yüklü polisakaritler olan sülfatlanmış glikozaminoglikanlar çoğunlukla bağ dokularında, HDM'de ve sayısız hücre türünün yüzeyinde bulunmaktadır. HDM'deki glikozaminoglikan içeriği spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Ayrıca biyoiskelelerin yüzey morfolojisi SEM, ham ve hücrelerinden arındırılmış iskelelerin kimyasal bağları arasındaki farkı atenuasyon toplam reflektans Fourier dönüşüm kızılötesi (FTIR) ve termal stabilitesi termogravimetrik analiz (TGA) ile karakterize edilmiştir. Sonrasında insan adipoz kaynaklı mezenkimal kök hücreler (iAMKH), hücrelerinden arındırılmış iskelelerin üzerine ekilmiş ve iskelelerin *in vitro* ortamdaki biyouyumluluğunu test etmek için MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolyum bromür) analizi yapılmıştır. Son olarak, hücrelerinden arındırma işleminin etkinliğini ve hücrelerin biyoiskele üzerindeki davranışlarını tanımlamak için iskelelere hematoksilin ve eozin (H&E) boyaması uygulanmıştır.

1.1. Doku Mühendisliği ve Rejeneratif Tıp

Biyoloji, kimya, tıp ve mühendislik kombinasyonunu içeren doku mühendisliği ve rejeneratif tıp, hızla genişleyen disiplinler arası alanlardır. Tamamen veya kısmen işlevini yitiren dokuların ve organların yeniden yapılandırılması için, bu alanlar, doğal dokuların ikamelerinin (yani, biyoiskelelerin) oluşturulması gibi alternatif yaklaşımlar sunar (Sicari ve ark., 2014; Erten ve Arslan, 2018) (Şekil 1.1).



Şekil 1.1. Doku mühendisliği yaklaşımına genel bir bakış (Bajaj ve ark., 2014)

Etkili doku mühendisliği için anahtar ihtiyaçlardan birisi de hücrelerin doğal dokularda olduğu gibi işlev görmesini sağlayan hücresel ortamdır. Doku mühendisliğinde, uygun bir mikro-ortam sağlama, yani hücre büyümesi, göçü ve çoğalması için bir iskele veya hücrelerinden arındırılmış HDM üretmek önemlidir. Çünkü büyüme faktörlerini veya diğer sinyal moleküllerini içeren iskeleler hücreler için bir niş görevi görmektedir. Hücre iskeleleri genellikle aşağıdaki amaçlardan en az birine hizmet etmektedir (Berthiaume ve ark., 2011):

- Hücre tutunması ve göçü,
- Biyokimyasal faktörleri bulundurma ve onların salınımı,
- Besinlerin, üretilen ürünlerin homojen dağılımı ve atıkların uzaklaştırılması için gözenekli ortam,
- Mekaniksel dayanım ve esneklik.

Hücre dışı matriks, dokuya özgü üç boyutlu bir yapı içinde düzenlenen yapısal ve fonksiyonel proteinlerin, glikoproteinlerin ve proteoglikanların kompleks bir kombinasyonunu oluşturur (Badyak, 2004). HDM organların yanı sıra dokuların morfogenezi, kompozisyonu ve fonksiyonunda hayati bir rol oynayabilir (Kleinman ve ark., 2003). Üretilen HDM'lerin doku mühendisliğinde hücre-substrat temini, üç boyutlu doku yapısının kontrolü ve büyüme faktörlerinin, hücre yapışma sinyallerinin ve biyomekanik sinyallerin sunulması gibi çeşitli işlevleri bulunmaktadır (Brien, 2011). Doku mühendisliğinde aşılması gereken ve üzerinde çalışılan mevcut sorunlar Çizelge 1.2'de

verilmiştir.

Çizelge 1.2. Doku mühendisliğinde mevcut sorunlar (Berthiaume ve ark., 2011)

Doku	Fonksiyon	Yaklaşım	Sorun
Deri	Vücut için bariyer	Yenilenmeyi yönlendirmek için implante edilen matriks; olog veya allojenik hücreli implantlar	İmplant yetersizliği, yavaş damarlanma
Kornea	Göz için şeffaf bariyer	Matriks implantları; <i>ex vivo</i> olarak kültürlenmiş hücreler tarafından üretilen hücre dışı matriks	Matriksin şeffaflık ve bariyer özelliklerini koruyamama
Karaciğer	Detoksifikasyon, karaciğere özgü proteinlerin üretimi	Ksenojenik, allojenik veya kök hücre kaynaklı kaynaklardan hepatositler veya implante edilebilir matrikslere ekilmiş ölümsüzleştirilmiş hepatom, ekstrakorporeal biyoreaktör sistemleri	Hücre kaynağı, hepatik fonksiyonların bakımı, yüksek hücre yoğunluğu, implantların vaskülarizasyonu
Pankreas	Glikoz homeostazını sürdürmek için insülin salgılamak	Serbest veya kapsüllenmiş adacık nakli	Nakil bölgesi seçimi, vaskülarizasyon, hücre kaynağı, immün reddi
Kıkırdak	Eklemlerin kritik bileşeni	Yenilenmeyi yönlendirmek için implante edilen matriks; olog veya allojenik kaynaklı hücreli implantlar	Hücre farklılaşmasının kontrolü, konak entegrasyonu, uzun süreli dayanıklılık
Kalp	Kan dolaşımını sağlar	Hücre olmayan organları içeren, progenitör ve ekilmiş kardiyomyositlere farklılaştırılmış kök hücreleri içeren materyaller	Tümörjenite, hücre farklılaşmasının kontrolü, elektriksel entegrasyon

Çizelge 1.2.'nin devamı

Böbrek	Vücut sıvı hacmini ve pH'ı, metabolit atılımını düzenler	<i>ex vivo</i> 'da kültürlenmiş kök hücre kaynaklı nefronlar	Yüksek hidrolik geçirgenliği koruyarak glomerüler seçiciliği çoğaltma
Nöron ve spinal kord	Bedensel fonksiyonları kontrol etmek için elektriksel uyarılar gönderir	Aksonal rehberlik ve rejenerasyon için tüp şeklinde, bazen de iltihap önleyici stratejilerle birlikte kullanılan malzemeler; sinir kök hücreleri	Uygun aksonları tekrar bağlamak, proinflatuar ortamı kontrol etmek, yara dokusu oluşumunu önlemek

1.2. Biyomalzemeler

1976'da Avrupa Biyomalzemeler Derneği Ortak Görüş Konferansında, bir biyomalzeme “tıbbi sistemlerde kullanılan ve biyolojik sistemlerle etkileşime girmesi amaçlanan bir malzeme” olarak tanımlandı. Bununla birlikte, bu derneğin şu anki tanımı, “Hasar görmüş herhangi bir dokuyu/organi tedavi etmek veya onunla yer değiştirmek için biyolojik sistemlerle etkileşebilen bir malzemedir.” Tanımdaki bu ince değişim, biyomalzemeler alanının nasıl geliştiğini göstermektedir. Biyomalzemeler sadece vücut ile etkileşime girmekten ziyade biyolojik süreçleri doku rejenerasyonu hedefine doğru yönlendirmeye evrilmiştir (Brien, 2011).

Çeşitli biyomalzemelerden, çeşitli imalat teknikleri kullanılarak üretilen, vücuttaki farklı doku ve organları yeniden oluşturma girişimlerinde sayısız iskele kullanılmıştır. Doku tipinden bağımsız olarak, bir iskelenin doku mühendisliğinde kullanım için uygunluğunu tasarlarken veya belirlerken bir dizi önemli husus bulunmaktadır:

- I. **Biyouyumluluk**; herhangi bir yapı iskelesinin doku mühendisliği için ilk kriteri biyolojik olarak uyumlu olması gerektiğidir; hücreler tutunmalı, normal fonksiyonlarını sürdürmeli, yüzeye göç etmeli ve sonunda yüzeyde/ortamda çoğalmaya başlamalıdır (Javadzadeh ve Hamedeyaz, 2014).
- II. **Biyobozunurluluk**; doku mühendisliğinin bir diğer amacı da vücudun kendi hücrelerinin zamanla implante edilmiş iskeleyi değiştirmesini sağlamaktır. Genellikle iskeleler kalıcı implantlar olarak tasarlanmamıştır. Bu nedenle iskele, hücrelerin kendi hücre dışı matrislerini üretmelerine izin verecek şekilde biyolojik olarak organizmanın hücreleri tarafından üretilen HDM ile yer değiştirebilir olmalıdır. Bu bozulmanın yan ürünleri de toksik olmamalıdır (Brien, 2011). Bozulmanın doku

oluşumu ile birlikte gerçekleşmesine izin vermek için, makrofajlar gibi hücrelerin kontrollü infüzyonuyla birleştirilen bir enflamatuar yanıt gereklidir (Gilbert ve ark., 2009).

- III. Mekaniksel özellikler; ideal olarak, iskele, implante edileceği anatomik bölgeyle uyumlu mekanik özelliklere sahip olmalı ve pratik bir perspektiften, implantasyon sırasında cerrahi kullanıma izin verecek kadar dayanıklı olmalıdır. Bugüne kadar iyi mekanik özelliklere sahip birçok malzeme üretilmiştir, ancak vaskülerizasyon için yetersiz kapasiteye sahip oldukları için *in vivo* olarak implante edildiklerinde *in vitro*'da gösterdiği potansiyeli gösterememişler ve birçok malzeme başarısız olmuştur. Hücrelerin nüfuz etmesine ve vaskülerizasyona izin vermek için yeterli mekanik özellikler ile gözenekli mimari arasındaki dengenin herhangi bir iskelenin başarı yüzdesini artırabilir (Hutmacher, 2006).
- IV. Biyoskelenin yapısı; doku mühendisliğinde kullanılan yapı iskelelerinin mimarisi çok önemlidir. Biyoskeleler, hücreyel penetrasyonu ve yapı içerisindeki hücrelere ve bu hücreler tarafından oluşturulan hücre dışı matrikse yeterli miktarda besin sağlamak için birbirine bağlı bir gözenek yapısına ve yüksek gözenekliliğe sahip olmalıdır (Murphy ve ark., 2010; Badylak ve ark., 2015). Ayrıca, atık ürünlerin iskeleden dışarı atılmasını sağlamak için gözenekli ve birbirine bağlı bir yapıya ihtiyaç duyulmaktadır. Ayrıca, iskelenin bozunma ürünleri, diğer organlar ve çevre dokularla etkileşime girmeden vücuttan çıkabilmelidir. Başka bir kilit bileşen, iskelenin ortalama gözenek büyüklüğüdür. Hücreler öncelikle, malzeme yüzeyindeki kimyasal gruplar (ligandlar) vasıtasıyla iskelelerle etkileşime girer. Doğal hücre dışı malzemelerden (örneğin kollajen) sentezlenen iskeleler, doğal olarak arjinin-glisin-aspartat bağlanma dizileri formunda bu ligandlara sahiptir, oysa sentetik malzemelerden yapılan iskeleler, bu ligandların, örneğin protein adsorpsiyonu yoluyla kasıtlı olarak dahil edilmesini gerektirebilir (Theocharis ve ark., 2016). Ligand yoğunluğu spesifik yüzey alanından, yani hücrelerin tutunabileceği gözenekli yapıdan kaynaklı yüksek yüzey alanından etkilenir. Bu, iskeledeki ortalama gözenek büyüklüğüne bağlıdır. Bu nedenle gözeneklerin, hücrelerin yapıya geçmesine izin verecek kadar büyük olmaları gerekir, burada nihayet iskele içindeki ligandlara bağlanırlar (Murphy ve ark., 2010).
- V. Üretim teknolojisi; belirli bir iskele veya doku mühendisliği yapısının klinik ve ticari olarak uygulanabilir hale gelebilmesi için uygun maliyetli olmalı ve araştırma laboratuvarından seri üretime kadar ölçek büyütme izin vermelidir. Ölçeklenebilir

üretim süreçlerinin iyi üretim uygulaması standardına geliştirilmesi, doku mühendisliği stratejilerinin kliniğe başarılı bir şekilde çevrilmesinde kritik öneme sahiptir (Hollister, 2009). Bir diğer önemli faktör, bir ürünün nasıl dağıtım yapılacağını ve operatör doktorlar için kullanıma nasıl uygun hale getirileceğini belirlemektir. Diğer yandan, üretim teknolojisi doku mühendisliği ürünlerinin depolanma süreç ve şartlarını da değerlendirmeli, çözümlerin içine bu kriterleri de dahil edebilmelidir (Murphy ve ark., 2010).

1.2.1. Hücre Dışı Matris Temelli Biyomalzemeler

HDM aslında hücrelerden salgılanan bir üründür ve yapısal ve işlevsel moleküllerin dokuya özgü 3 boyutlu (3B) ortamından oluşur. HDM, hücre davranışını desteklemek ve etkilemek için ayrı ayrı ve birlikte çalışan proteinlerin, GAG'lerin, glikoproteinlerin, küçük moleküllerin birleşimidir. HDM hücre göçünü, çoğalmasını ve farklılaşmasını işaret eden sinyaller sağlar. Ayrıca, HDM, pH, oksijen konsantrasyonu, mekanik kuvvetler ve biyokimyasal ortamının parametrelerine bağlı olarak hücrelerin genetik profilini ve protein işlevselliğini etkileyebilir (Elitok ve ark., 2017). Bu özelliklerin tümü, endojen kök/progenitor hücrelerin mitojenik/kemotaktik mekanizmalarını etkiler, immün tepkisini düzenler, hücre fenotipini ve fonksiyonunu etkiler. Bu yüzden doğal HDM'nin, organ ve doku rekonstrüksiyonu için en ideal iskele olduğu düşünülmektedir (Gattazzo ve ark., 2014). Biyolojik iskele ile optimal sonuçlar için doku/organ hücrelerinden arındırma süreci sırasında HDM'nin doğal altyapısının ve bileşiminin zararını en aza indirmek böylece doğal mekanik özellikleri ve biyolojik özellikleri korumak esastır. Zarar görmemiş 3B HDM biyoiskelelerinin üretilmesi için çeşitli allojenik, ksenojenik dokular ve organlar kullanılmıştır. Bu iskeleler doku veya organlardan hücrelerinden arındırma işlemi ile üretilmektedir. Tedavi stratejileri bu hücrelerinden arındırılmış iskelelere implantasyonun ve immün cevabın olumsuz etkilerini önlemek için mevcut hastanın başta otolog tamamen farklılaşmış, progenitor veya kök hücrelerin ekimini ya da çeşitli biyolojik ajanları içerebilir (Totter ve ark., 2011). Bu iskelelerin, hücrelerin fonksiyonel gruplarına kendiliğinden entegre edilmesi için gerekli olan ligandların ve biyoaktif moleküllerin sunumu yoluyla, tekrar hücrelendirme sırasında bölgeye uygun hücre fenotiplerini koruyabildiği veya teşvik edebildiği gösterilmiştir (Ott ve ark., 2008).

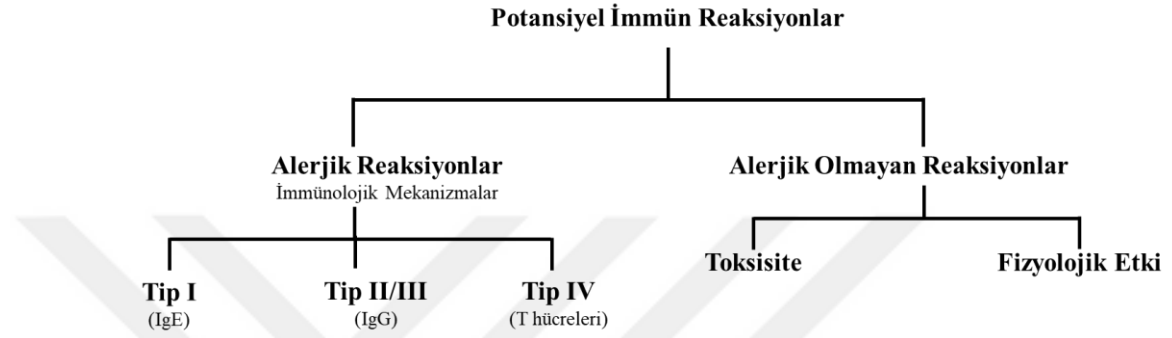
İmplant edilmiş malzemelerin tekrar hücrelendirilmesi, farklılaşma süreçlerini güçlendirilmesi ve yaşam boyu doku restorasyonunun sürdürülebilmesi için, doku boyunca

biyoaktif moleküllerin transferinin yanı sıra yeterli oksijen ve besin desteği de yapılmalıdır (Khan ve Tanaka, 2018).

Hücrelerinden arındırma, allojenik veya ksenojenik kaynaklı bir dokudan hücrelerin uzaklaştırılarak hücresel antijenlerin, yapısal ve fonksiyonel moleküllerin bir karışımını içeren sağlam bir HDM'nin elde edilmesi işlemidir. Hücrelerinden arındırma stratejileri, işlenen dokuya bağlı olarak değişir. Genel olarak imalat prosesi, doğal HDM dokusunun kompozisyonunu, organizasyonunu, biyolojik aktivitesini ve mekanik bütünlüğünü olumsuz yönde etkilemeden tüm hücresel ve nükleer materyalleri ideal bir şekilde gideren bir dizi fiziksel, kimyasal ve enzimatik muamele içerir (Srokowski ve Woodhouse, 2017). Hücrelerinden arındırılmış yapı iskelelerinin doku mühendisliği yaklaşımı için kullanımı, Çizelge 1.3.'de listelendiği gibi birçok avantaj sağlar. İlk olarak, allojenik veya ksenojenik hücresel antijenlerin uzaklaştırılması, sadece implantasyondaki immünojenik kaynağı minimize etmekle kalmaz, ayrıca HDM bileşenlerini de korur. Ayrıca, hücrelerinden arındırılmış iskeleler, dokunun doğal HDM kompozisyonunu ve mikro-çevresini koruyabilir. Ek olarak hücrelerinden arındırma işlemi, iskelenin esnekliğini korumakla kalmayıp aynı zamanda biyolojik aktivitesinin de korunmasını sağlayabilir (Scarritt ve ark., 2019). Dahası, hücrelerinden arındırılmış iskelelerin işlevselliği ve mekanik stabilite özellikleri, doğal dokunun özelliklerine oldukça yakın olabilmektedir. Son olarak, hücrelerinden arındırılmış iskeleler, klinik uygulamalar için uzun süreli depolama özelliklerine sahip, kullanıma hazır bir ürün potansiyeli ile yaygın olarak uygulanabilir ve ekonomik bir seçenek sunabilir. Başarılı bir hücrelerinden arındırma işleminden bahsedebilmek için HDM 50 ng/mg kuru ağırlıktan daha az çift iplikli DNA içermeli ve H&E boyamasıyla yapılan analizde HDM yapısında hücre çekirdeğine rastlanmamalıdır (Crapo ve ark., 2011).

Hücrelerinden arındırılmış iskelelerin sağladığı sayısız faydaya rağmen, bazı aşılması gereken sorunlar bulunmaktadır. Öncelikle, hücrelerinden arındırma işleminin her doku kaynağı için optimize edilmesi gerekir, çünkü dokudan elde edilen HDM, o belirli doku veya organa özgü yapısal ve fonksiyonel bileşenlerin benzersiz bir düzenlemesini ve kompozisyonunu içermektedir (Gilbert ve ark., 2006). Sonuç olarak, hücrelerin yeteri kadar uzaklaştırılmaması implantasyonda immün reaksiyonlara neden olabilir. İmplantasyon sonrası HDM kaynaklı malzemenin reddedilmesiyle alerjiye benzer bir reaksiyon meydana gelebilir. Hasta ile implante edilecek malzeme arasındaki spesifik proteinler farklı ise malzeme daha hızlı reddedilebilir. Her cerrahi işlemde önce hasta ile implante edilecek malzemenin uyumluluklarının herhangi bir immün reaksiyon gerçekleşmemesi için test

edilmesi gerekmektedir. Çoğu durumda, antijenler tam olarak uyumsuz ve alıcının immün reaksiyonunun ilaçlar tarafından baskılanması gerekir (immün supresyon). Ancak, bu aynı zamanda komplikasyonlara yol açabilir çünkü hasta enfeksiyonlara karşı oldukça duyarlı hale gelir. Günümüzde böbrekler, kemik iliği, kornea, karaciğer, kalp ve pankreas başarıyla nakledilebilmektedir (Kimber ve Dearman, 2002). Şekil 1.2’de potansiyel immün reaksiyonların çeşitleri gösterilmiştir.



Şekil 1.2. Potansiyel immün reaksiyonların şematik gösterimi (Lygre, 2002)

Bunlara ek olarak, farklı doku uygulamaları, doku kalınlığı ve yaşı açısından doku hücrelerinden arındırmanın etkinliğini değiştirebilir. Benzer şekilde, imalat işleminde kullanılan yöntemlere veya reaktiflere bağlı olarak, iskelenin biyolojik etkinliği ve yapısal bütünlüğü bozulabilir. Bu nedenle, optimum bir hücrelerinden arındırma işlemi için sistematik bir yaklaşıma ihtiyaç duyulabilir (Furth ve ark., 2007). Çizelge 1.3.’de hücrelerinden arındırma işleminin avantajlarının ve dezavantajlarının karşılaştırılması verilmiştir.

Çizelge 1.3. Deselüerizasyon işleminin avantajlarının ve dezavantajlarının karşılaştırılması (Srokowski ve Woodhouse, 2017)

Avantajları

- ✓ İmplantasyon sonrası immünolojik yanıtı en aza indirir
- ✓ Ksenojenik malzemelerin kullanımına izin verir
- ✓ Doğal dokunun mekanik bütünlüğünü korur
- ✓ Doğal dokunun biyokimyasal bileşimini muhafaza eder
- ✓ Doğal dokunun üç boyutlu mikro mimarisini korur
- ✓ Doku tadilatını kolaylaştırmak için biyo-uyarıcı özellikleri muhafaza eder
- ✓ Ekonomiktir ve geniş uygulama alanına sahiptir
- ✓ Uygun saklama koşullarında uzun süre depolanabilir

Dezavantajları

- ✓ Her doku kaynağı için hücrelerinden arındırma işleminin optimizasyonunu gerektirir
 - ✓ Yetersiz hücrelerinden arındırma işlemi sonrası immünolojik yanıtı neden olabilir
 - ✓ Doku kaynağına, kalınlığına ve mimarisine bağlı olarak hücrelerinden arındırma verimliliği değişebilir
 - ✓ Dokunun yapısal bütünlüğü ve biyoaktivitesi imalat işlemi sırasında bozulabilir.
 - ✓ Deselüerizasyonun verimini karakterize etmek zordur
 - ✓ İskele özellikleri doku kaynağı özellikleri tarafından sınırlandırılmıştır
-

1.2.1.1 HDM Temelli Biyomalzemelerin Üretim Yöntemleri

Son yıllarda, hücrelerinden arındırılmış doku ve organlardan türetilen biyolojik yapı iskelelerini üretmek için geliştirilen birkaç yöntem bulunmaktadır. En sağlam ve etkili hücrelerinden arındırma protokolleri, fiziksel, kimyasal ve enzimatik işlemlerin bir kombinasyonunu içermektedir. Genel olarak, tipik bir hücrelerinden arındırma protokolü aşağıdaki aşamaları içermektedir (Gilpin ve Yang, 2017):

- ✓ Hücre zarlarının fiziksel yöntemler veya iyonik çözeltilerle lizisi,
- ✓ Hücresel bileşenin enzimatik işlemler kullanılarak HDM'den ayrılması,
- ✓ Sitoplazmik ve nükleer hücresel bileşenlerin deterjan muamelesi ile çözündürülmesi,

- ✓ Hücresel kalıntıların HDM'den durulanması ve çıkarılması.

Bu adımların her biri, mekanik çalkalama ile birleştirilebilir ve etkinliği arttırmak için birkaç kez tekrarlanabilir. Bununla birlikte, dokuların kökenlerine, bileşimlerine, yapılarına ve kalınlıklarına bağlı olarak hücrelerinden arındırma işlemine farklı yanıt verebileceğini kabul etmek önemlidir. Bu nedenle, hücrelerinden arındırma stratejileri, her bir tedavinin konsantrasyonunu ve süresini kontrol ederek ve daha sonra geri kalan hücrelerinden arındırılmış HDM'nin fonksiyonunun yanı sıra kompozisyon ve mimari üzerindeki etkilerini analiz ederek her doku için optimize edilmelidir (Srokowski ve Woodhouse, 2017).

Dokunun hücrelerinden arındırılmasını kolaylaştırmak için, liyofilizasyon, tekrarlanan dondurmama-çözdürme, sonikasyon, doğrudan basınç ve çalkalama gibi fiziksel yöntemler kullanılabilir. Bu yöntemler doğrudan ve hızlı bir hücrelerinden arındırma sağlar. Bununla birlikte, bu yöntemlerin tipik olarak etkinliklerini arttırmak için kimyasal ekstraksiyon işlemleri ile birlikte kullanılması gerekmektedir. Hızlı dondurma, ardından liyofilizasyon, bağ doku, kalp kapakçıkları, perikardiyum, kemik matriksi, amniyotik membran ve daha yakın zamanda embriyoid organları dahil olmak üzere terapötik uygulamadan önce çeşitli dokuların hücrelerinden arındırılması için kullanılmıştır (Chiono ve ark., 2014). Dokunun veya matrikslerin hızlı bir şekilde dondurulması, hücre zarını bozan ve dolayısıyla hücre parçalanmasına neden olan hücre içi buz kristali oluşumuna yol açmaktadır. Bu işlemin ardından su moleküllerinin dondurma-kurutma ile uzaklaştırılması, hücre artıklarının uzaklaştırılmasını da kolaylaştırabilir. Dondurma-çözdürme döngüsü, dokunun sıvı azot içine daldırılmasından (çabuk dondurma) ve ardından tamponlanmış bir sulu çözeltide oda sıcaklığında çözdürülmesinden oluşan başka bir fiziksel tekniktir. Periferik sinir greftleri, menisküs dokusu ve insan derilerini içeren birçok doku dondurma-çözdürme döngüsü ile hücrelerinden arındırılmıştır (Ngangan ve McDevitt, 2009). Her iki teknikte de HDM bileşenlerine zarar gelmesini önlemek için dokular veya matriks için sıcaklık değişim oranının optimize edilmesi gerekmektedir. Doğrudan basınç uygulanması başka bir fiziksel tekniktir, ancak bu teknik sadece HDM'i yoğun olarak organize olan (örneğin, karaciğer, akciğer) dokular için etkilidir; aksi takdirde, muamele hücresel artıkları geride bırakarak potansiyel immünojenik reaksiyonlara neden olabilir (Gilbert ve ark., 2006).

Birçok hücrelerinden arındırma protokolünde, dokunun hücrelerinden arındırılmasına yardımcı olmak için fiziksel teknikler ile birlikte kimyasal işlemler kullanılır. Dokuların hücrelerinden arındırılması için bağımsız olarak veya çok aşamalı bir ekstraksiyon işleminde çeşitli kimyasal işlemler kullanılabilir. Farklı dokuları hücrelerinden arındırmak için kullanılan reaktifler genellikle ekstraksiyon için çözeltiler, alkali veya asidik deterjanlar,

hipotonik ve hipertonic çözeltiler ve enzimler olarak sınıflandırılabilir. Reaktiflerin seçimi, büyük ölçüde, doğal HDM'nin biyokimyasal ve yapısal özelliklerini korumak ve aynı zamanda istenmeyen hücre materyalleri uzaklaştırmak açısından doku kaynağına bağlıdır (Crapo ve ark., 2011). Etanol, ksilen, bütanol ve ayrıca aseton gibi reaktiflerin kullanılmasıyla çözücü ekstraksiyonunun, kan damarlarının ve kalp kapakçıklarının hücrelerinden arındırılmasını kolaylaştırdığı rapor edilmiştir. Ağırlıklı olarak diğer kimyasal işlemlerle birlikte kullanıldığında, bu ön işlemin doku kalsifikasyonunu en aza indirirken fosfolipitler, trigliseritler ve kolesterol gibi zara bağlı lipidleri uzaklaştırdığı bildirilmiştir. Proteinlere kıyasla, örneğin fosfolipid moleküllerinin kimyası, organik çözücüler tarafından daha fazla çözünmektedir. Bununla birlikte, çözücü ekstraksiyon işleminden sonra HDM yapısal bileşenlerinde ve biyomekanik özelliklerinde bozulmalar gözlenebilmektedir (Srokowski ve Woodhouse, 2017). İnce bağırsak submukoza, idrar kesesi submukoza ve idrar kesesi matriksi, kan damarları ve safra kesesi gibi dokuların hücrelerinden arındırılması için alkali ve asidik işlemler kullanılmıştır. Alkali ekstraksiyon prosedürleri, sodyum veya potasyum gibi alkali tuzları ve kalsiyum gibi toprak alkali metalleri, asidik işlemler ise, asetik asit, perasetik asit (PAA), hidroklorik asit ve sülfürik asidin kullanımını içermektedir. Bu yöntemler sadece hücre zarı parçalamakla kalmaz, aynı zamanda hücrelerin ana sitoplazmik bileşenlerini (yani organellerini) de çözebilmekte, ayrıca nükleik asitlerin matrikslerden çıkarılmasına yardımcı da olabilmektedir (Fitzpatrick ve McDevitt, 2015).

Deterjanlar lipid-lipid ve lipid-protein etkileşimlerini bozarak, hücre membranlarını parçalayan suda çözünebilir moleküllerdir. Dokuları hücrelerinden arındırmak için iyonik olmayan, iyonik, katyonik veya zwitteriyonik deterjanlar gibi çeşitli deterjanlar kullanılmaktadır. Doku boyutundaki farklılıklar, deterjanın yükü ve denatürasyon kabiliyeti doku nüfuzunu, zarın bozulmasını ve protein-deterjan etkileşimini belirleyebilir, bunların hepsi deterjanın HDM üzerindeki etkisini değiştirebilir. Hücrelerinden arındırma protokolünde kullanılan deterjanın türünden bağımsız olarak, belirgin immün yanıtları önlemek için matrikslerde artık kalan deterjanın etkin bir şekilde çıkarılması için matrikslerin iyice durulanması gerekmektedir. Oktil fenol etoksilat (Triton X-100), Tween 20 ve Tween 80 gibi iyonik olmayan deterjanlar, lipid-lipid ve protein-lipid etkileşimlerini kırabilen ancak protein-protein etkileşimlerini bozulmadan bırakabilen deterjanlardır ve denatüre edici değildirler (Knight ve ark., 2008). Triton X-100, bağ doku, tendon, kıkırdak, mesane, sinir, karaciğer, aort kapakçıkları ve kan damarları gibi çeşitli dokuların hücrelerinden arındırılmasında kullanılan, en çok çalışılan noniyonik deterjandır. Bununla birlikte, Triton X-100'ün tam hücre materyalleri ve nükleer uzaklaştırmanın yanı sıra HDM

bileşenlerinin korunması açısından etkinliği, dokunun yapısına bağlı olarak değişmektedir. Sodyum dodesil sülfat (SDS), sodyum deoksilat (SDK) ve Triton X-200 gibi iyonik deterjanlar hem sitoplazmik hem de nükleer hücrel membranların çözündürülmesinde etkili oldukları için hücrelerinden arındırma protokollerinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Gilpin ve Yang, 2017). Genel olarak, iyonik deterjanlar denatüre edicidir. İyonik deterjanlar, proteinler içindeki kovalent olmayan bağları bozarlar, doğal konformasyonlarını yitirmelerine neden olurlar ve HDM açısından kollajenin bütünlüğünü potansiyel olarak bozmaktadırlar. Hücrelerinden arındırma için, katyonik deterjanlar doğal HDM'deki yapısal proteinlerin denatüre olmasına neden olan çok güçlü bir deterjan olmalarının yanı sıra en sitotoksik deterjan olarak kabul edilmektedirler. Setiltrimetilamonyum bromür, sinir dokusu için deterjan bazlı bir hücrelerinden arındırma yönteminin bir parçası olarak kullanılan katyonik bir deterjandır. Hücrel bileşenlerin sinir dokusundan çıkarılmasında etkili bir deterjan olmasına rağmen, HDM yapısına zarar vermektedir (Srokowski ve Woodhouse, 2017).

Hücrelerinden arındırma stratejilerinde 3- [(3-kolamidopropil) dimetilamonyum] -1-propansülfonat (CHAPS) ve ayrıca sülfobetain-10 (SB-10) ve -16 (SB-16) gibi çeşitli zwitteriyonik veya amfoterik deterjanlar da kullanılmaktadır. Zwitteriyonik deterjanlar hem iyonik olmayan hem de iyonik deterjanların özelliklerini gösterir, ancak proteinleri iyonik olmayan deterjanlardan daha fazla denatüre etme eğilimindedir. Literatürde, zwitteriyonik deterjanlar tipik olarak deterjan misellerinin daha sıkı paketlenmesini sağlayan anyonik deterjanlar ile kombinasyon halinde kullanılmaktadır. Zwitteriyonik deterjanlar sinirler için hücrelerinden arındırma stratejilerinde kullanılmaktadır. Genelde, zwitteriyonik deterjanların, yeterli hücre uzaklaştırılmasını sağladıkları ve HDM'yi bir dereceye kadar korudukları için az zararlı deterjanlar olarak düşünülmektedirler (Gilbert ve ark., 2006).

Deterjanların etkisini arttırmak için veya kendi başına bir yöntem olarak, hücrelerin etkili şekilde lize edilmesinin bir yolu olarak hücrelerinden arındırma stratejilerine ozmotik şok dahil edilebilir (Chiono ve ark., 2014). Ozmotik şok için genelde hipotonik bir çözelti ile muamele edildikten sonra hipertonic bir çözelti ile muamele uygulanır. Hipotonik bir çözelti ile ozmotik lizis, hücrelerin şişmesine ve patlamasına neden olur. Suyun hücre içine doğru hareket etmesinden kaynaklanan hücrenin şişmesi de deterjanların hücrel zara girmesini artırabilir. Ters etki, suyun hücreden dışarı doğru hareket ettiği, hücrel dehidrasyon ve büzölmeye neden olan, hücrel ölüme ve matriksten ayrılmaya yardımcı olan hipertonic bir çözeltide meydana gelir. Bu strateji, hücrelerin lizisinde oldukça etkili olmasına rağmen, ortaya çıkan hücrel kalıntıları özellikle artık nükleik asitleri dokudan

çıkarmak için ilave işlem gerekmektedir. Bu nedenle, genelde ilave bir nükleaz enzim sindirim aşaması ozmotik şok işlemini izlemektedir (Knight ve ark., 2008).

Endonükleazlar ve ekzonükleazlar gibi nükleazlar ayrıca enzimatik işlemlere dahil edilebilir. DNazlar ve RNazlar, nükleer artıkların uzaklaştırılmasına yardımcı olmak için deterjan muamelesi ile birlikte hücrelerinden arındırma yöntemlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Proteaz ve nükleaz ile muamelelerde, muamele süresi HDM kompozisyonuna ve yapısına zarar vermeden hücrel antijenleri etkili bir şekilde uzaklaştırmak için optimize edilmelidir. Dolayısıyla, proteaz veya nükleazların kullanıldığı hücrelerinden arındırma protokolleri, *in vivo* implantasyondan önce kalan enzimlerin dokudan arındırılması için etkili adımlar içermelidir (Ngangan ve McDevitt, 2009). Tripsin hücrelerinden arındırma metodolojilerinde en yaygın kullanılan proteolitik enzimlerden biridir ve tipik olarak kalsiyum şelatlama maddesi, etilendiamintetraasetik asit (EDTA) ile birlikte kullanılmaktadır. EDTA, tripsinize edilmiş hücreler tarafından salınan ve HDM bileşenlerini bozma yeteneğine sahip olan hücre içi proteazları etkisizleştirmek için kullanılmaktadır. Tripsin, hücrelerinden arındırma protokollerinde çoğunlukla protein-protein etkileşimlerini bozarak hücrelerin HDM'den uzaklaştırılmasına yardım etmek için kullanılmaktadır. Tripsin, kalp kapakçıkları, vasküler greftler ve perikardiyum dahil olmak üzere birçok dokunun hücrelerinden arındırılması için enzimatik muamelelerin bir parçası olmuştur (Crapo ve ark., 2011).

Bugüne kadar, miyokard (Arslan ve ark., 2018), deri (Chen ve ark., 2004), kıkırdak (Erten ve ark., 2016), spinal kord (Arslan ve ark., 2019), soluk borusu (Batioglu-Karaaltin ve ark., 2015), vb. gibi çeşitli dokular ve organlar başarılı bir şekilde hücrelerinden arındırılmış ve doku mühendisliği uygulamaları için derinlemesine karakterize edilmiştir. Klinik olarak değerlendirildiğinde, domuz ince bağırsağından (SIS) elde edilen RESTORE™ ortopedi cerrahları tarafından onaylanan ilk ticari HDM yamasıdır (Badylak, 2004). Diğer bazı HDM temelli ticari ürünler Çizelge 1.4'de verilmiştir.

Çizelge 1.4. Hücre Dışı Matriks Temelli Ticari Ürünler (Scarritt ve ark., 2019)

Ürün	Firma	Kaynak	Uygulama
AlloDerm™	LifeCell Corporation	İnsan Derisi	Yumuşak doku onarımı
AlloMax™	Becton, Dickinson and Company	İnsan Derisi	Yumuşak doku onarımı
AlloPatch®	Musculoskeletal Transplant Foundation	İnsan Derisi	Tendon ve yumuşak doku onarımı
ArthroFlex®	Arthrex	İnsan Derisi	Yumuşak doku onarımı
Axis™	Coloplast	İnsan Derisi	İdrar tutamama
AxoGuard®	AxoGen	Domuz İnce Bağırsağı	Sinir onarımı
BellaDerm	MTF Biologics	İnsan Derisi	Yumuşak doku onarımı
Biodesign®	Cook Biotech	Domuz İnce Bağırsağı	Dura mater onarımı
CorMatrix®	Cook Biotech	Domuz İnce Bağırsağı	Kalp dokusu onarımı
DermACELL®	Stryker	İnsan Derisi	Yumuşak doku onarımı
DermaMatrix™	DePuy Synthes	İnsan Derisi	Yumuşak doku onarımı
DuraGuard	Baxter	Sığır Perikardiyumu	Dura mater ve yumuşak doku onarımı
DuraMatrix®	Stryker	Sığır Derisi	Dura mater onarımı
FlexHD®	Ethicon	İnsan Derisi	Yumuşak doku onarımı
Glyaderm®	Euro Skin Bank	İnsan Derisi	Deri onarımı ve plastik cerrahi
GraftJacket™	Wright Medical Group	İnsan Derisi	Tendon ve bağdoku onarımı
Integra HuMend™	Integra LifeSciences	İnsan Derisi	Yumuşak doku onarımı
Integra® Reinforcement Matrix	Integra LifeSciences	Domuz Derisi	Tendon ve yumuşak doku onarımı
MIRODERM®	MiroMatrix Medical Inc	Domuz Karaciğeri	Yara onarımı
MIROMESH®	MiroMatrix Medical Inc	Domuz Karaciğeri	Yumuşak doku onarımı
OASIS® Wound Matrix	Smith & Nephew	Domuz İnce Bağırsağı	Yara onarımı
Peri-Guard®	Baxter	Sığır Perikardiyumu	Perikardiyal ve yumuşak doku onarımı

Çizelge 1.4'ün devamı

PerioDerm™	MTF Biologics	İnsan Derisi	Diş ve yumuşak doku onarımı
Permacol™	Medtronic	Domuz Derisi	Yumuşak doku onarımı
PriMatrix®	Integra LifeSciences	Fötal Sığır Derisi	Yara onarımı
SurgiMend®	Integra LifeSciences	Fötal Sığır Derisi	Yumuşak doku onarımı
Suspend®	Coloplast	İnsan Fasya lata	İnme ve idrar kaçırma
TissueMend®	Stryker	Fötal Sığır Derisi	Tendon onarımı
Vascu-Guard®	Synovis Surgical	Sığır Perikardiyumu	Damar onarımı
Veritas™	Baxter	Sığır Perikardiyumu	Yumuşak doku onarımı
Xenform™	Boston Scientific	Fötal Sığır Derisi	Yumuşak doku onarımı
XenMatrix™	Becton, Dickinson and Company	Domuz Derisi	Yumuşak doku onarımı
Zimmer Collagen Repair Patch®	Zimmer Biomet	Domuz Derisi	Tendon onarımı

1.2.2. Doğal Biyomalzemeler

HDM yapı iskelelerinin kullanılma hazır hale getirilmesi oldukça uzun zaman alır. Ek olarak, yetersiz doku ve organ temini yüzünden doğal ve sentetik biyomalzemeler de doku mühendisliği ve rejeneratif tıp alanında sıkça kullanılmaktadır. Bugüne kadar, doğal, sentetik, yarı sentetik ve hibrit malzemeler doku rejenerasyonu için yapı iskeleleri olarak önerilmiş ve test edilmiştir (Elitok ve ark., 2017). Doku mühendisliğinde kullanılan doğal polimerlerden bazıları kollajen, aljinat, agaroz, kitosan, kitin, fibrin, ipek fibroin ve hyaluronik asittir (veya hyaluronan) (Çizelge 1.5). Kollajen, doku mühendisliğinde yaygın olarak kullanılan doğal bir protein materyalidir, çünkü kollajen iskelesinin hücre metabolizması ortamı fizyolojik koşullara yakındır. Ek olarak, kollajenin, doğal polimerler olarak, sentetik polimerlerden daha iyi hücre yapışmasını ve çoğalmasını desteklediği belirtilmiştir (Wang ve ark., 2013). Alternatif olarak fibrin, implantasyondan sonra tamamen parçalanabilir ve vücudun otolog plazmasından toplanabilir. Doğal biyomalzemeler, düşük fiyat, kolay elde edilebilirlik ve hücrelere karşı iyi tolerans avantajlarına sahiptir. Bugüne kadar, doğal biyopolimerler, cilt, kıkırdak, kemik, menisküs, kornea ve sinir dokusu mühendisliği gibi çeşitli doku mühendisliği uygulamalarında başarıyla kullanılmıştır (Chen ve Liu, 2016).

Çizelge 1.5. Doku mühendisliği ve rejeneratif tıpta kullanılan, doğal biyomalzemeler (Kim ve ark., 2011)

Polimer	Biyouyumluluk	Dezavantajı	Biyobozunurluk	Uygulama
Kollajen	Minimum sitotoksosite, minimum enflamasyon	Küçük Helikal olmayan telopeptidlerin proteolitik uzaklaştırılması	Kontrol edilebilir	Deri, kıkırdak, kemik, tendon, damar, sinir, mesane, karaciğer
Hyalüronik asit	Enflamasyona neden olmaz, minimum yabancı doku reaksiyonu	Oldukça viskoz çözelti, Kimyasal modifikasyondan sonra birçok artırma basamağı	1 saatten 1 aya kadar değişebilir	Deri, kıkırdak, kemik, damar, sinir, mesane, karaciğer
Aljinik asit	Enflamasyona neden olmaz, minimum yabancı doku reaksiyonu	Hidrojelini kontrolsüz bir şekilde çözünmesi	1 günden 3 aya kadar değişebilir	Deri, kıkırdak, kemik, pankreas, kas, sinir
Kitosan	Enflamasyona neden olmaz, minimum yabancı doku reaksiyonu	Kontrol edilemeyen deasetilasyon ve moleküler ağırlık	3 günden 6 aya kadar değişebilir	Deri, kıkırdak, kemik, pankreas, kas, sinir
Jelatin	Minimum sitotoksosite, minimum enflamasyon	Zayıf fiziksel özellikler	Kontrol edilebilir	Deri, kemik, kıkırdak, göğüs, bağ doku
Fibrin	Minimum sitotoksosite, minimum enflamasyon	Zayıf fiziksel özellikler	Kontrol edilebilir	Deri, kemik, kıkırdak, tendon, damar, karaciğer, bağ doku
Poli (hidroksialkanoat)	Minimum sitotoksosite, minimum enflamasyon	Pirojenler uzaklaştırılmalı	Kontrol edilebilir	Deri, kemik, tendon, kıkırdak, sinir, bağ doku, damar, kalp, kas
İpek	Minimum sitotoksosite, minimum enflamasyon	Sericin enflamasyonu	Kontrol edilebilir	Deri, kemik, tendon, kıkırdak, sinir, bağ doku, damar

1.2.3. Sentetik Biyomalzemeler

Doğal polimerlerden farklı olarak, sentetik polimerler, istenen boyutlarda ve şekillerde üretilen insan yapımı polimerlerdir (Cheung ve ark., 2007). İşlevsel gruplar ve yan zincirler dahil edilerek, sentetik polimerler ayrıca belirli moleküller ile aktifleştirilebilir ve bunlar biyolojik olarak parçalanabilir. Doku mühendisliğinde yaygın olarak kullanılan sentetik polimerler poliglikolik asit (PGA), polilaktik asit (PLA) ve bunların poli (laktik-koglikolik asit) (PLGA) ve polikaprolakton (PKL) gibi kopolimerleridir (Çizelge 1.6) (Tan ve ark., 2013). Bu malzemeler özel bir mimari yapı ile üretiltikleri için ve polimerin kendisinin veya tek tek polimerin bileşiminin değiştirilmesiyle kontrol edilebilen bozunma özellikleri bakımından büyük başarı göstermiş olsalar da azalan biyoaktivite nedeniyle vücudun reddetme riskini içeren dezavantajları bulunmaktadır. Ek olarak, PGA'nın hidroliz yoluyla parçalandığı, karbondioksit ürettiği ve dolayısıyla hücre ve doku nekrozu ile sonuçlanabilecek yerel pH'ı düşürdüğü için bozunma süreci hakkında endişeler mevcuttur (Elitok ve ark., 2017).

Çizelge. 1.6. Doku mühendisliği ve rejeneratif tıpta kullanılan sentetik biyomalzemeler (Kim ve ark., 2011; Tan ve ark., 2013)

Polimer	Biyouyumluluk	Dezavantajı	Biyobozunurluk	Uygulama
Polilaktik asit	Minimum sitotoksosite, minimum enflamasyon	Bölgesel enflamasyon, rastgele zincir hidrolizi	24 ay	Deri, kemik bağ dokusu, Kıkırdak, sinir, tendon, mesane, damar, karaciğer
Poliglikolik asit	Minimum sitotoksosite, minimum enflamasyon	Bölgesel enflamasyon, rastgele zincir hidrolizi	6-12 ay	Deri, kemik bağ dokusu, Kıkırdak, sinir, tendon, mesane, damar, karaciğer
Poli (laktik-koglikolik asit)	Minimum sitotoksosite, minimum enflamasyon	Bölgesel enflamasyon, rastgele zincir hidrolizi	1-6 ay	Deri, kemik bağ dokusu, Kıkırdak, sinir, tendon, mesane, damar, karaciğer
Polikaprolakton	Minimum sitotoksosite, minimum enflamasyon	Hidrofobik	3 yıl	Deri, kemik bağ dokusu, Kıkırdak, sinir, tendon, mesane, damar
Polietilen oksit	Enflamasyona neden olmaz	Karmaşık biyobozunurluk	1 aydan 5 yıla kadar değişebilir	Deri, kemik, kıkırdak, kas
Polianhidridler	Minimum enflamasyon, minimum yabancı doku reaksiyonu	Sınırlı mekanik özellik	Kontrol edilebilir	Kemik
Polipropilen fumarat	Minimum enflamasyon	Zayıf mekanik özellik	1 haftadan 16 aya kadar değişebilir	Kemik

Çizelge 1.6'nın devamı

Poliortoester	Orta derecede enflamasyon, orta derecede yabancı doku reaksiyonu	Zayıf mekanik özellik	Yaklaşık birkaç ay	Kulak, kemik, kıkırdak
Polifosfazen	Minimum enflamasyon, minimum yabancı doku reaksiyonu	Geniş moleküler ağırlık dağılımı	1 haftadan 3 yıla kadar değişebilir	Deri, kıkırdak, kemik, sinir, bağ doku

1.3. İnsan Adipoz Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücreler

Kök hücreler, kendini yenileme ve çoklu soylara farklılaşma kapasitelerine sahip farklılaşmamış hücreler olarak tanımlanabilir (Zech ve ark., 2011). Embriyonik kök hücrelerin aksine, farklılaşmış dokulardan kaynaklanan kök hücreler immüno-uyumludur ve etik zorluklara tabi değildir (Brignier ve Gewirtz, 2010). Mezenkimal kök hücreler (MKH'ler) rejeneratif tıpta bazı patolojik hastalıklar veya travmalar nedeniyle oluşan doku hasarlarının tedavisi için yaygın olarak uygulanır ve kemik iliği, yağ dokusu, cilt, kas ve tendon gibi farklı dokulardan türetilir (Rocky S Tuan, 2002). Bununla birlikte, bu MKH'ler rejeneratif tıp için klinik olarak uygulanabilirlik, sayı yeterliliği, çoklu soy farklılaşması, güvenli ve etkin transplantasyon ve mevcut iyi üretim uygulamalarına uygun üretim gibi kriterleri yerine getirmek zorundadır. Kemik iliği en iyi kök hücre kaynağıdır ancak insan adipoz kaynaklı mezenkimal kök hücreler (iAMKH) klinik alanda alternatif bir kaynak olabilir, çünkü her ikisi de morfoloji, çoğalma ve bazı spesifik belirteçler bakımından benzer özellikler göstermektedir (Nepali ve ark., 2018). Adipoz ve kemik iliği kaynaklı kök hücrelerin ifade ettiği belirteçler Çizelge 1.7.'de gösterilmiştir. Sonuç olarak, vücutta yağ dokusunun bolluğu, cerrahi olarak kolay erişilebilir olması, multipotent özellik göstermesi, doku mühendisliği ve rejeneratif tıbbın yağ dokusuna MKH temini için olan ilgisini artırmaktadır.

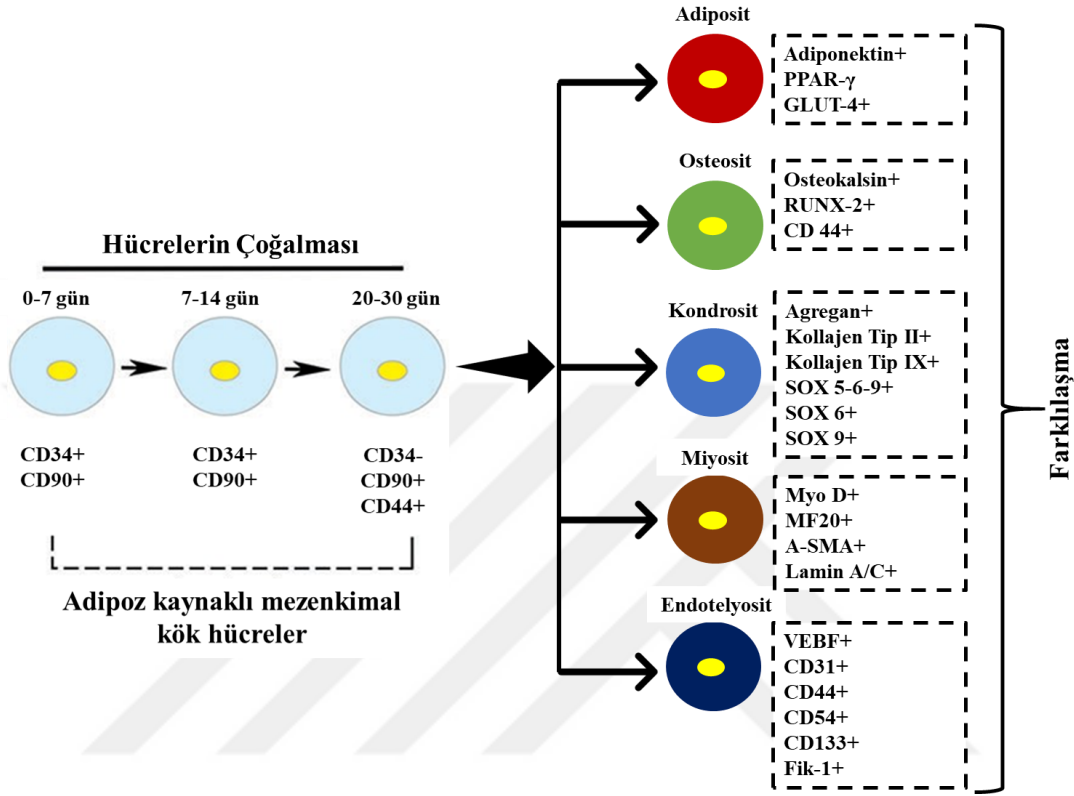
Çizelge 1.7. Adipoz ve kemik iliği kaynaklı kök hücrelerin ifade ettiği belirteçler. ++, > %70; +, %30-70; —, %10-30; -, %2-10; —, < %2 (Woodruff ve ark., 2012)

<i>CD</i>	<i>Adipoz Kaynaklı</i>	<i>Kemik İliği Kaynaklı</i>
CD9	++	+
CD10	++	—
CD11a	—	+
CD11b	—	+
CD11c	—	+

Çizelge 1.7'nin devamı

CD13	++	++
CD14	—	—
CD16	—	+
CD18	—	+
CD29	++	++
CD31	-	+
CD34	+	-
CD44	++	++
CD45	—	-
CD49b	-	++
CD49d	-	++
CD49e	++	++
CD50	—	+
CD51	++	++
CD54	-	+
CD55	++	++
CD56	—	+
CD59	++	++
CD61	-	-
CD62e	-	+
CD63	-	-
CD71	-	+
CD73	+	++
CD90	++	++
CD104	—	-
CD105	++	++
CD106	-	+
CD117	-	++
CD133	-	++
CD140a	-	+
CD146	-	++
CD166	+	+

iAMKH'ler adipojenik, osteojenik, kondrojenik, endotelial hücreler, miyojenik hücreler ve epitel hücelere farklılaşma yetenekleri gösterebilen kök hücrelerdir (Huang ve ark., 2013). Şekil 1.2.'de iAMKH'lerin çoklu soy farklılaşması ifade ettikleri belirteçler ile birlikte şematik olarak gösterilmiştir.

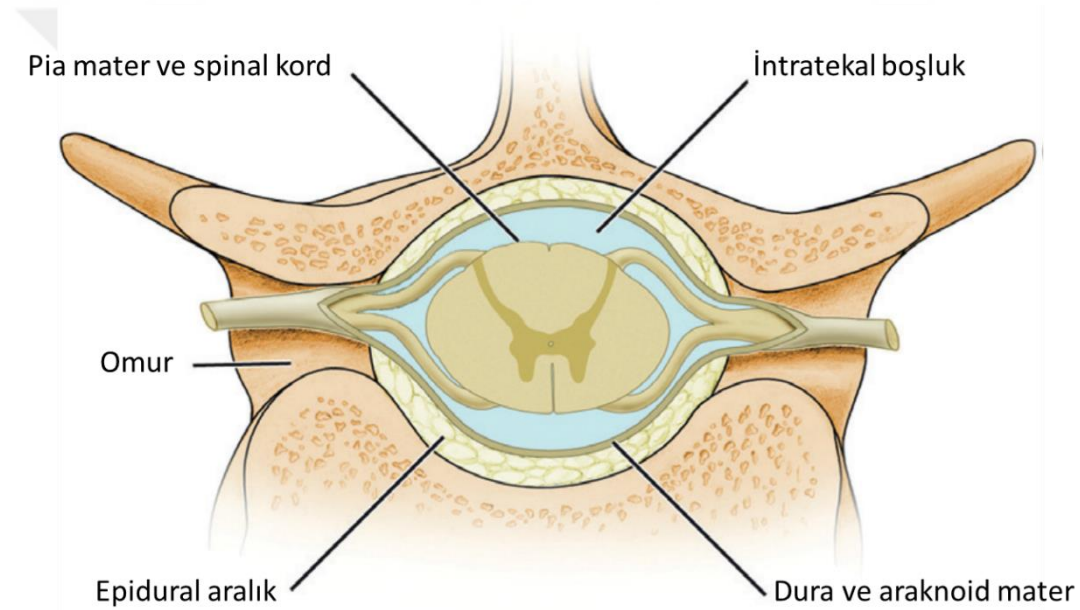


Şekil 1.3. iAMKH'lerin çoklu soy farklılaşması ifade edilen belirteçlerle ile birlikte şematik gösterimi (Woodruff ve ark., 2012)

1.4. Spinal Meninksin Yapısı ve İşlevi

Meninklerin ve beyin omurilik sıvısının ilk bilinen anatomik tanımları, cerrahi travma üzerine eski bir Mısır tıbbi metni olan Edwin Smith Papirüs'te bulunmuştur (yaklaşık M.Ö. 1600). Metinde, Mısırlı bir doktor olan Imhotep'e atfedilen önceki yazılar bulunmaktadır (Decimo ve ark., 2012). Meninks, öncelikle beyin koruyucuları olarak bilinen üç zar olan dura mater, araknoid ve pia mater'den oluşmaktadır (Şekil 1.3). Dura mater dış zardır ve diğer meninksel katmanları sarmaktadır. Leptomeninks (lepto-, ince) iki katmandan oluşan iç zarlardır: dış kısım araknoid (arakn, örümcek) ve iç pia mater (pia-, hassas) olarak adlandırılır. Genel olarak meninks, yaralanmaları engelleyen beyin-omurilik sıvısı ile doludur ve her ikisinin birincil görevi merkezi sinir sistemini (MSS) korumaktır (Patel ve Kirmi, 2009).

Parankima içindeki stratejik pozisyonları ve damar yapısı ile olan bağlantıları nedeniyle, meninksler gelişmekte olan beyin yapılarının sinir hücrelerine kısa menzilli faktörler sağlama potansiyeline sahiptir. Stromal türevli faktörü ve CXC kemokin reseptörü 4 bağımlı yolu içeren sinyal bu faktörlere örnek olabilir. Bu sinyal, çeşitli kök hücrelerinin toplanmasında rol oynar (Siegenthaler ve ark., 2009). Meninksler, yaşam boyunca MSS'nin fizyolojik ve patolojik olaylarının çoğunu düzenleyebilmektedir. Meninks kortikal gelişimin çok erken embriyonik aşamalarından beri mevcuttur ve normal kortikogenez ve beyin yapılarının oluşumu için gerekli görünmektedir. Yetişkinlik döneminde meninks, birçok trofik faktörü salgılayarak nöral doku homeostazisine katkıda bulunur (Decimo ve ark., 2012).



Şekil 1.4. Spinal kordun anatomisi. Sinir dokusu, omur, dura, araknoid ve pia mater tarafından korunur (Hashemi ve ark., 2015)

Meninksel fonksiyon ve mikro-mimarisi üzerine yapılan daha derinlemesine çalışmalar son zamanlarda meninkslerin yalnızca koruyucu bir zar olmadığını göstermektedir. Meninks, kök hücre homeostazını ve kortikal fonksiyonu modüle etme potansiyeline sahip büyüme faktörlerini salgılayan laminince zengin bir HDM içermektedir. Ayrıca meninks HDM'si çok miktarda kollajen tip I, III ve IV' e ek olarak fibronektin, tenaskin gibi kollajen olmayan proteinler içermektedir (Decimo ve ark., 2012). Bunlara ek olarak, spinal meninks HDM'sinde bazik fibroblast büyüme faktörü (Mercier ve Hatton, 2001), insülin benzeri büyüme faktörü-II (Stylianopoulou ve ark., 1988), stromal hücre

türevi faktör I (Reiss ve ark., 2002), retinoik asit (Siegenthaler ve ark., 2009) ve heparan sülfat (Mercier ve Arikawa-Hirasawa, 2012) bulunmaktadır.



BÖLÜM 2

ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Vishwakarma ve arkadaşlarının yayınladıkları bir çalışmada insan beyni meninksleri, Tween-20 ve sodyum dodesil sülfat kullanılarak etkin bir şekilde hücrelerinden arındırılmıştır. Daha sonra, hücrelerinden arındırılan insan beyni türevli meninkse, insan fotal subventriküler bölgeden elde edilen insan nöral progenitor hücreleri ekilmiştir. Hücresel davranışlar, gen ifadesi, western blot, histolojik ve immünohistokimyasal analizler ile *in vitro* olarak değerlendirilmiştir. Sonuçlar, hücrelerinden arındırılan meninksin yeterli mekanik kuvvete, gerekli aktif moleküllere, büyüme faktörlerine sahip olduğunu ve nöronal hücre büyümesi sağladığını göstermiştir. Sonuç olarak, yazarlar hücrelerinden arındırılan meninksin omurilik zedelenmesinden muzdarip hastaların tedavisi için kullanılacak potansiyele sahip olabileceğini düşünmektedir (Vishwakarma ve ark., 2018).

BÖLÜM 3

MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Deneyleerde Kullanılan Materyaller ve Cihazlar

Sığır spinal meninks spinal kord ile beraber, Çanakkale ilinin Lapseki ilçesinde bulunan bir kesimhanedeki ticari amaçlar için kesimi yapılan sığırlardan elde edilmiştir ve laboratuvara soğuk zincir ile transfer edilmiştir. Daha sonra laboratuvarında spinal kord spinal meninksten uzaklaştırılmıştır. Spinal meninksler kullanılacağı zamana kadar -26 °C’de (Siemens KG57NPW24N, Almanya) muhafaza edilmiştir. Bu tez çalışmasında kullanılan sığır spinal meninks ticari amaçla kesimi yapılan bir kaynaktan temin edildiği için etik kurul iznine gerek kalmamıştır. Tüm kimyasallar ve reaktifler, aksi belirtilmedikçe Merck’ten (Sigma-Aldrich) temin edilmiştir.

Spinal meninks ham ve hücrelerinden arındırılmış dokularının içerdiği çift sarmal DNA miktarı genomik DNA saflaştırma kiti olan GeneJET DNA saflaştırma (Thermo Scientific, ABD), hidrokspirolin içeriği hidrokspirolin analiz kiti (Merck, kat. no: MAK008) ile belirlenmiştir.

Deneyleerde Merck-Millipore marka Milli Direct-Q 3UV (Almanya) model saf su sisteminden elde edilen Tip I ve Tip III saf su kullanılmıştır. Tartım işlemleri için Shimadzu ATX224 (Japonya) marka hassas terazi kullanılmıştır. Deneyleer sırasında yapılan karıştırma işlemleri Jeitech (Kore) marka çoklu karıştırıcıda gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan tampon ve çözeltilerin pH değerleri Mettler Toledo (ABD) marka pH metrede ölçülmüştür. Deneyleerdeki santrifüj işlemlerinde Hettich Micro 120 (Almanya) marka santrifüj kullanılmıştır. Elma S 30H (Almanya) marka ultrasonik banyo çözeltilerde katı maddelerin sıvı içinde tamamen çözünmesini sağlamak için kullanılmıştır. GAG, hidrokspirolin ve çift sarmal DNA içeriği analizlerinin spektrofotometrik ölçümleri Shimadzu UVmini-1240 (Japonya) marka spektrofotometrede kuvars mikroküvetler kullanılarak (Quartz SUPRASIL®, Hellma®, Almanya) tayin edilmiştir. Hücrelerinden arındırılmış gözenekli doku iskelelerinin üretimi için Telstar LyoQuest (İspanya) model liyofilizatör (dondurma-kurutma) kullanılmıştır. Hücrelerinden arındırma işlemi sırasında istenen sıcaklık değeri ve hücrelerinden arındırma işlemi için hazırlanan çözeltilerin doku parçalarının tüm yüzeylerine temas etmesi için gerekli dairesel hareket Benchmark marka Incu-Shaker Mini inkübatör (ABD) kullanılarak sağlanmıştır. GAG içeriği analizi sırasında dokuları sindirmek için kullanılan papain enziminin 100 °C’de inaktivasyonu için Jeitech (Kore) blok ısıtıcı

kullanılmıştır. Biyoiskeleleri fizyokimyasal olarak analiz etmek için ATR-FTIR (Nicolet iS50, Thermo Scientific, ABD) ve TGA analizi (TGA 8000 Perkin Elmer, ABD) yapılmıştır. Ayrıca, üretilen biyoiskelenin Dinamik-mekanik analizi DMA 8000 (Perkin Elmer, ABD) cihazı ile yapılmıştır.

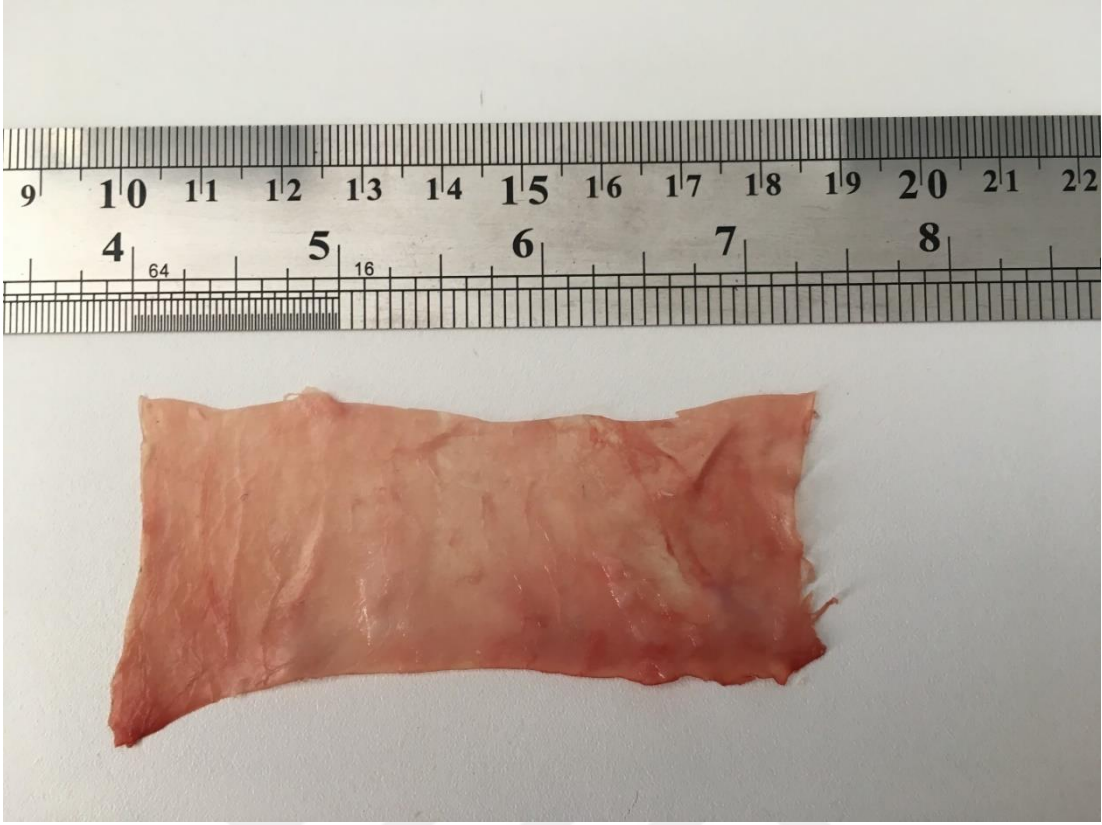
Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan iAMKH'ler (Merck-Millipore, lot no: QVP1303200) yurt dışından satın alınmıştır. Kültür, mezenkimal kök hücrelerin uygun büyümesi için tüm gereklilikleri sağlayan spesifik bir ortam kullanılarak sürdürülmüştür (Mezenkimal kök hücre ortamı, kat. no. #7501, ScienCell, ABD). Hücre kültürü çalışmalarında steril hücre kültürü plastikleri (Corning, NY, ABD) kullanılmıştır. Kök hücreleri pasajlamak için tripsin/EDTA çözeltisi (Merck, Almanya) kullanılmıştır. Biyoiskelelere ekilen kök hücrelerin canlılık durumları ve çoğalma miktarları MTT (3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il-2,5-difenil tetrazolyum bromür) hücre çoğalma kiti (Merck, kat no: SGD1, ABD) kullanarak spektrofotometrik mikro plaka okuyucu (Thermo-Scientific, Multiskan™ mdrop™ plate, ABD) ile tespit edilmiştir. Hücre kültürü çalışmalarının tamamı Class II A-2 laminar akışlı kabinde kabinde (Telstar Bio II Advance, İspanya) gerçekleştirilmiştir. iAMKH'ler doğal vücut ortamı şartlarını taklit eden Panasonic, MCO-18AC-PE (Japonya) marka inkübatörde inkübe edilmiştir. Hücrelerin çoğalmalarını ve farklılaşmalarını gözlemlemek için Zeiss Primovert (Almanya) invert faz-kontrast mikroskopu kullanılmıştır.

Biyoiskelelerin yüzey morfolojileri 10 kilovolt (kV) gerilim altında SEM cihazı (JSM-7100F, Jeol, Nieuw-Vennep, Japonya) ile gözlenmiştir. Analiz öncesi biyoiskeler, kaplama cihazı ile (SC7620, Mini Sputter Coater, Quorum, Laughton, East Sussex, İngiltere) Au-Pa kaplanmıştır. Deney sonuçlarının istatistiksel analizleri ve grafik çizimleri için Origin Pro 8SR0 (v8.0724, OriginLab Corporation, MA, ABD) programı kullanılmıştır. Elde edilen sonuçların standart sapma (\pm) değerleri Microsoft Office 365 Pro Plus Excel programı kullanılarak hesaplanmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Sığır Spinal Meninksin Temini

Kesimi yapılan bir sığırın servikal omurları çıkarılmış, omurlar kırılarak spinal kord elde edilmiştir. Çıkarılan spinal kord soğuk zincir vasıtasıyla laboratuvara ulaştırılmıştır. Spinal meninksin spinal korddan ayrılması sağlanmış (Şekil 3.1) ve meninks saf su ile yıkanarak -26 °C'ye ayarlı buzdolabına konulmuştur.

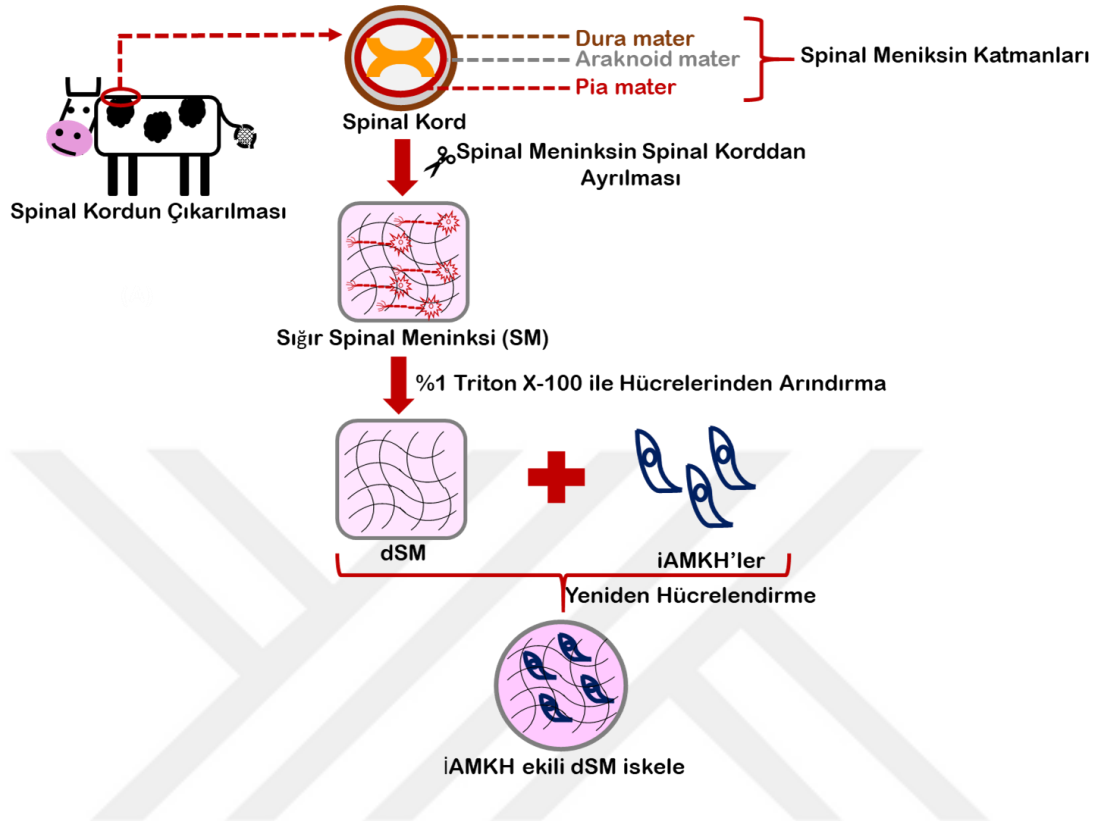


Şekil 3.1 Spinal korddan ayrılmış ham spinal meninks dokusu

3.2.2. Spinal Meninksin Hücrelerinden Arındırılması

Spinal meninks hücrelerinden arındırmak için ilk olarak hipotonik 10 mM Trizma hidroklorür (Tris.HCl) ve 5 mM EDTA çözeltisi pH'ı 8 olacak şekilde hazırlanmıştır. Daha sonra spinal meninksler bu çözeltiyle 24 saat boyunca muamele edilmiştir. Hipotonik çözeltiden alınan meninksler ultra saf su ile 24 saat yıkanmıştır. Bu işlemin devamında meninksler içerisinde %1 Triton X-100 (v/v) deterjanı bulunan hipertonic 50 mM Trizma HCl, 5 mM EDTA (pH:8,0) çözeltisinde 48 saat boyunca çalkalanmıştır. Deterjan çözeltisinden alınan meninksler ultra saf su ile 24 saat yıkanmıştır. Devamında iskeleler 10 mM MgCl ve 50 mM Trizma (pH: 7,5) tamponda hazırlanmış DNaz (Deoksiribonükleaz) (200 µg/mL) ve RNaz (Ribonükleaz) (50 µg/mL) çözeltileri ile 24 saat boyunca 37,5 °C'de muamele edilmiştir. Bu süre sonunda birkaç tur ultra saf su ile yıkanmışlardır. Yıkama işleminin ardından 5 saat boyunca dekontaminasyon (%4 ethanol (v/v) ve %0,1 (v/v) perasidik asit) işlemi uygulanmıştır. Dekontaminasyon işleminden sonra iskeleler saf su ile 24 saat yıkanmak üzere çalkalamaya bırakılmıştır. Yıkama işlemiyle kimyasal kalıntılardan arındırılan iskeleler liyofilizasyon işlemine hazır olmaları için bir gece boyunca -26 °C'de bekletilmiştir. Hazır hale gelen iskeleler liyofilize edilmiştir. Liyofilize edilen biyo-iskeleler

saklanmak üzere +4 °C'ye konulmuştur. Şekil 3.2'de spinal kordun disekte edilmesinden iAMKH ekili dSM iskele elde edilmesine kadar yapılan işlemlerin özeti görülmektedir .



Şekil 3.2. Sığır spinal meninksin hücrelerinden arındırılması işleminin şematik gösterimi

3.2.3. Çift Sarmal DNA İçeriği Analizi

Hücrelerinden arındırılmış spinal meninkslere ve üzerinde bir işlem uygulanmamış ham doku spinal meninksin steril şartlar altında kesilerek çift sarmal DNA içerik analizi yapılmıştır. DNA içerik analizi için satın alınan GeneJET DNA saflaştırma kiti (Thermo Scientific, ABD) talimatları uygulanmıştır. İzole edilen DNA'ları içeren çözelti kuvars mikroküvetlere aktarılmış, 260 nm ve 280 nm dalga boyundaki ölçümleri Shimadzu UV mini-1240 UV-Vis cihazında alınarak ortalama DNA konsantrasyonu ve saflığı aşağıdaki aşağıdaki'deki eşitliğe göre hesaplanmıştır (Erten ve ark., 2016; Arslan ve ark., 2018).

$$DNA\ Konsantrasyonu\ (ng/\mu l) = (A_{260} - A_{320}) \times 50 \quad (3.1)$$

3.2.4. GAG İçeriği Analizi

Hücrelerinden arındırılmış spinal meninksin içerdiği sülfatlanmış GAG içeriği miktarı Erten ve ark. (2016) tarafından daha önce tanımlanan yöntem ile belirlenmiştir. Hem hücrelerinden arındırılan hem de ham doku spinal meninksler blok ısıtıcıda bir gece boyunca papain çözeltisi (100 mM Na₂HPO₄, 10 mM Na₂EDTA, 10 mM L-sistein ve 0,125 mg/mL papain, ultra saf su içerisinde pH: 7,5) ile 65 °C’de hafifçe çalkalanarak sindirilmiştir. Sindirme işlemi tamamlandıktan sonra papain enzimi 100 °C’de 15 dakika bekletilerek inaktif hale getirilmiştir. Bu işlemin devamında örneklere 1,9-dimetil-metilen mavisi boyası uygulanmıştır. Metilen mavisi ile muamele edilen örnekler 525 nm dalga boyunda spektrofotometrik ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Aşağıdaki denkleme göre GAG içeriği belirlenmiştir.

$$GAG \text{ Kuru Ağırlık } (\mu g/mg) = [(OD_{525}/eğim) \times (seyreltme \text{ faktörü} \times toplam \text{ hacim})]/(spinal \text{ meninks dokusunun ağırlığı } (mg)) \quad (3.2)$$

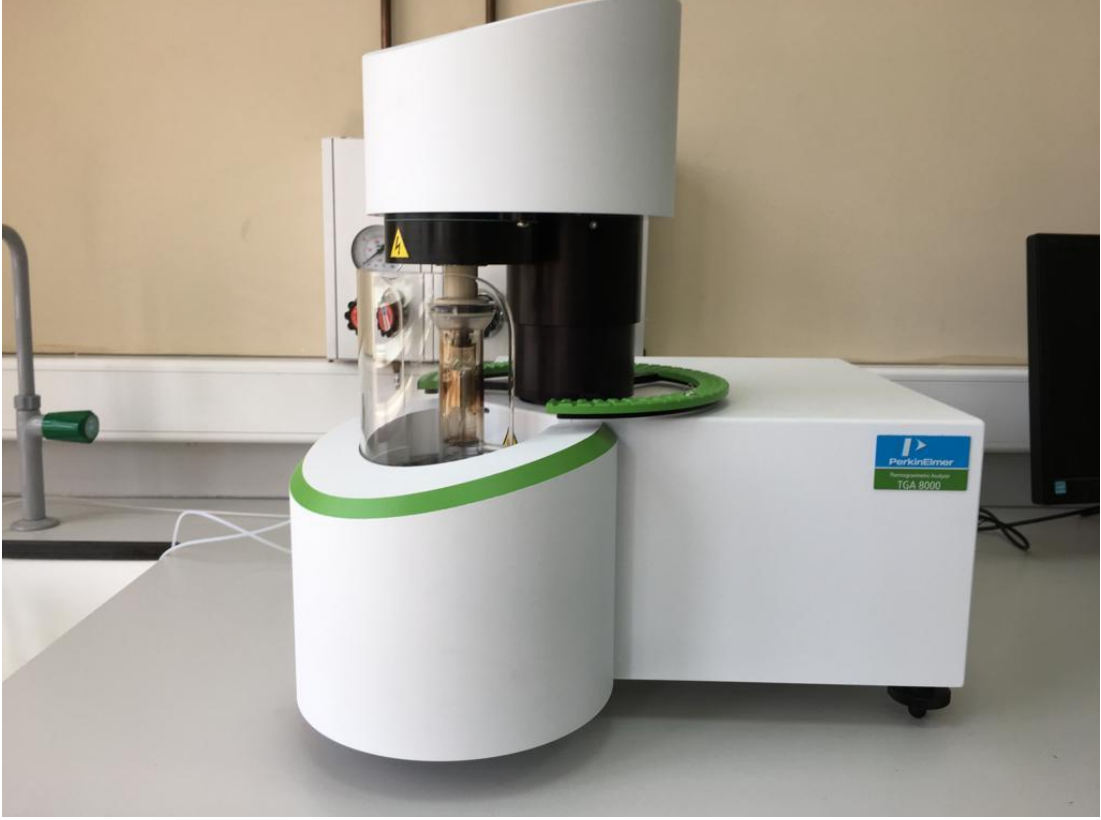
3.2.5. Hidroksiprolin İçeriği Analizi

Bu analiz için satın alınan hidroksiprolin test kiti (Merck, Almanya) kullanılmıştır. Öncelikle, hücrelerinden arındırılmış ve ham doku spinal meninks örnekleri 5 mg olacak şekilde tartılmış, daha sonra 100 µL 12 M HCl ve 100 µL ultra saf su içerisinde 120 °C’de 3 saat boyunca hidroliz edilmiştir. Hidroliz işlemi tamamlandıktan sonra örneklerdeki çözünmeyen parçacıkların uzaklaştırılması için 14000 rpm’de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Bu işlemin ardından hidroksiprolin kitindeki talimatlar gerçekleştirilmiş ve örnekler 96 kuyucuk içeren plakaya 2’şer µL konularak 60 °C’ye ayarlı etüvde kuruyana kadar bekletilmiştir. Hidroksiprolin içeriğinin belirlenebilmesi için spike kullanılmıştır. Ardından, kloramin T/oksidasyon tampon karışımı ve 4-(Dimetilamino) benzaldehit ilave edilmiş ve 5 dakika boyunca inkübe edilmiştir. Son olarak 560 nm dalga boyundaki ölçümleri spektrofotometrik olarak yapılmıştır. Hidroksiprolin miktarı aşağıda verilen eşitliğe göre hesaplanmıştır;

$$Hidroksiprolin \text{ miktarı} = [(A_{560})_{numune}/((A_{560})_{spike \text{ kontrol}} - (A_{560})_{numune}) \times 0,4 (\mu g)] \quad (3.3)$$

3.2.6. Termogravimetrik Analiz

Ham ve deselüerize spinal meninks iskelelerin termal özelliklerini belirlemek için Perkin Elmer TGA 8000™ cihazı kullanılmıştır (Şekil 3.3). Termogravimetrik analiz, inert azot gazı altında (15 ml azot/dakika), 30 °C başlangıç sıcaklığından 800 °C son sıcaklığa, dakikada 10°C artış olacak şekilde yapılmıştır. Böylece biyoiskelelerin termal bozunmasını belirlenmiştir.



Şekil 3.3. TGA cihazı

3.2.7. Dinamik Mekanik Analiz

Hücrelerinden arındırılmış spinal meninks dokusu 30 x 8 mm boyutlarında kesilip DMA cihazı için uygun boyutlara getirilmiştir. Dinamik mekanik analiz (DMA), boyutları ayarlanan örnekler stres kontrol modu altında gerilime maruz bırakılarak, Perkin Elmer DMA 8000™ cihazında yapılmıştır (Şekil 3.4). DMA analizi sıcaklık artış hızı 1 °C/dk., 25 °C başlangıç, 40 °C son sıcaklık 2 mm genlik ve frekansı 1 Hz olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.4. DMA cihazı

3.2.8. Atenüe Toplam Reflektans Fourier DönüŖümlü Kızılötesi Spektroskopisi

Ham ve hücrelerinden arındırılmış spinal meninks dokusunun kimyasal bağları arasındaki farklılıkları belirlemek için Nicolet IS50 Flex Gold Kızılötesi Spektrometre (Thermo Fisher Scientific, Madison, WI, ABD) cihazı kullanılarak ATR-FTIR analizi gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.5). Her bir IR spektrumu, 64 tarama ile $650\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$ frekans aralığında ve 16 cm^{-1} çözünürlükte kaydedilmiştir. Ek olarak, arka plan spektrumları ölçümden önce toplanmış ve spektrumlar ortamdaki değişiklikler için otomatik olarak hesaplanmıştır.



Şekil 3.5. ATR-FTIR analiz cihazı

3.2.9. Şişme ve PBS Alım Testi

Şişme ve PBS alım analizleri Kaczmarek ve ark. tarafından yapılan çalışmaya göre yapılmıştır (Kaczmarek ve ark., 2018). Öncelikle, dSMler (n=3) 1 cm x 1 cm olacak şekilde kesilmiş ve daha sonra tartımları yapılmıştır. Tartılan dSM'ler, 10'ar ml PBS (pH 7,2-7,4) içerisinde 37 °C'de 1 saat boyunca bekletilmiştir. Bu işlemin ardından dSM'ler tekrar tartılmış ve şişme oranları yüzde olarak aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır:

$$\text{Şişme [\%]} = [(m_t - m_0)/(m_0)] \times 100 \quad (3.4)$$

Burada m_t iskelelerin PBS'e daldırıldıktan sonraki kütesini, m_0 ise ilk kütesini temsil etmektedir.

Sıvı alımı, iskelelerin bir sıvıya daldırma işleminden sonraki kalan sıvı içeriği yüzdesidir. İskelelerin kütle değişimleriyle ilgilidir. Bu amaçla iskelelerin sıvı emme kapasitesi yüzde (%) olarak PBS alım testi ile belirlenmiştir. dSM iskeleler (n=3) 10 ml PBS'e (m_0) yerleştirilmiş ve 1 saatin ardından sıkmadan nazikçe çıkarılmıştır. PBS çözeltisinin geri kalanı tartılmış (m_t) ve iskelelerin sıvı alımı aşağıdaki denkleme göre hesaplanmıştır:

$$\text{PBS alımı [\%]} = [(m_t - m_0)/(m_0)] \times 100 \quad (3.5)$$

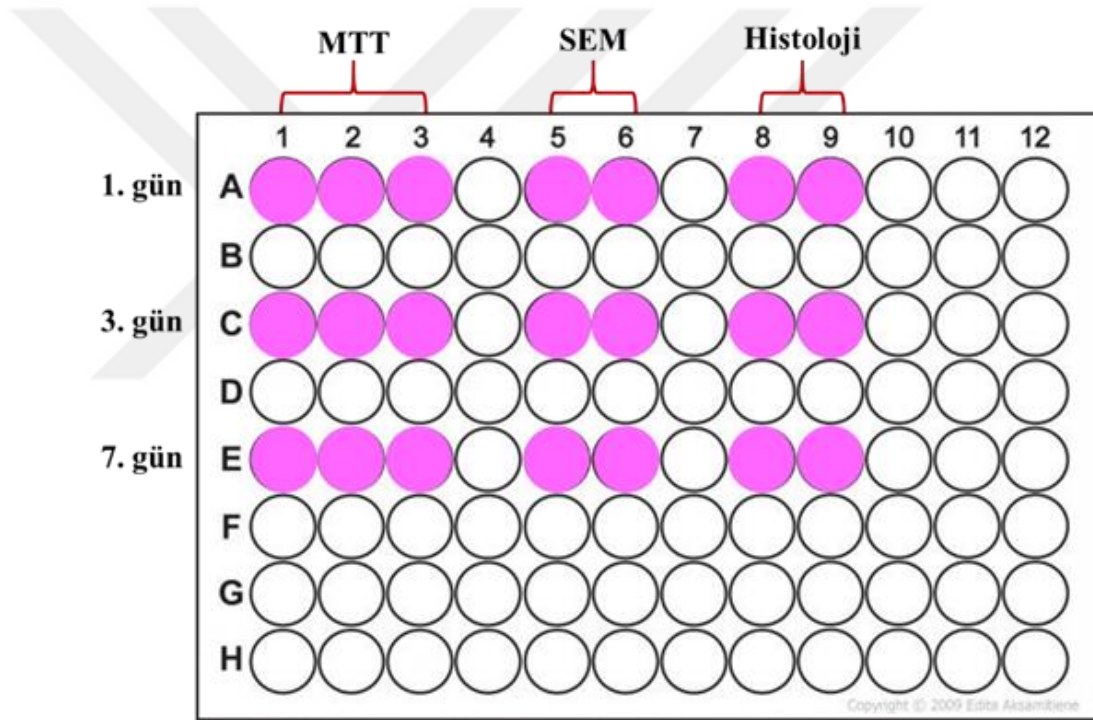
m_t içerisinde iskeleler alındıktan sonra PBS'in kütlesini, m_0 ise PBS'in ilk kütlesini temsil etmektedir.

3.2.10. Hücre Kültürü

Hücre kültürü çalışmaları Class II A-2 laminar akışlı kabinde (marka, model, ülke) gerçekleştirilmiştir. Bu deneylerde, satın alınmış ve daha sonra 5-7 kez pasajlanmış şekilde -80 °C'deki dondurucuda kriyovial içinde saklanan insan adipoz mezenkimal kök hücreler (iAMKH) (Lot numarası: QVP1303200, ABD) kullanılmıştır. Bir kriyovial yaklaşık olarak 1×10^6 iAMKH içermektedir. İlk olarak, hücreler -80 °C'den alınmış ve 37 °C su banyosunda çözdürülmüştür. Daha sonra pipetleme işlemi yapılmıştır. Ardından, hücreler içerisinde; fetal sıgır serumu (%5) (ScienCell, kat. no. 0025, ABD), penisilin (%1) (ScienCell, kat. no. 0503, ABD), büyüme faktörü çözeltisi (%1) (ScienCell, kat. no. 7552, ABD), mezenkimal kök hücre bazal vasatı (%93) (ScienCell, kat. no. 7501, ABD) bulunan ve önceden 37 °C'ye ısıtılmış kök hücre çoğaltma vasatına eklenmiştir. Donma aşamasında hücreleri buz kristallerinden korumak için dondurma çözeltisine eklenen ve hücreler için 4 °C'nin üstündeki sıcaklıklarda toksik olan dimetilsülfoksit (DMSO)'i ortamdaki uzaklaştırmak için hücreler 300xg kuvvetinde, 25 °C'de 5 dakika santrifüj yapılmıştır. Santrifüj işleminden sonra süpernatant atılmış ve pellet 3 ml mezenkimal kök hücre tam besi yeri ile tekrar süspanse edilmiştir. Hücreleri besi yeri içerisinde homojen olarak dağıtmak için pipetleme işlemi yapılmıştır. Ardından, 3 ml hücre içeren besi yeri inkübatörde bulunan ve içerisinde 10'er ml tam besi yeri bulunan 3 T75 flaska 1'er ml olacak şekilde pay edildikten sonra tekrar %5 CO₂, 37 °C sıcaklık ve %95 bağıl nem koşullarındaki inkübatöre yerleştirilmiştir. Hücreler T75 flaskan %80-90'ını doldurana dek inkübe edilmiştir. Yeteri kadar çoğalan kök hücrelerin invert faz-kontrast mikroskobu ile fotoğrafları çekilmiştir. T75 flasklardaki besi yeri çekilerek atılmış ve serumun tripsin enzimini inhibe etmesini engellemek için flasklar 10'er ml PBS (sodyum klorür içeren fosfat tamponu) (pH 7,4) ile yıkanmıştır. Devamında, her bir T75 flaska 2'er ml steril PBS içerisinde hazırlanmış %0,25 Tripsin-0,53 mM EDTA çözeltisi ilave edilmiş ve hücreler 37 °C'de 3 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası hücrelerin üzerine 8'er ml tam besi yeri eklenmiş ve hücrelerin tamamen besi yerine geçmesi için pipetaj yapılmıştır (tripsinizasyon). T75 flasklardaki hücreler iki ayrı 15 ml'lik falkon tüpe alınarak 300xg kuvvetinde, 25 °C'de 5 dakika santrifüj işlemi uygulanmıştır.

3.2.11. Biyoiskelelerin Tekrar Hücrelendirilmesi

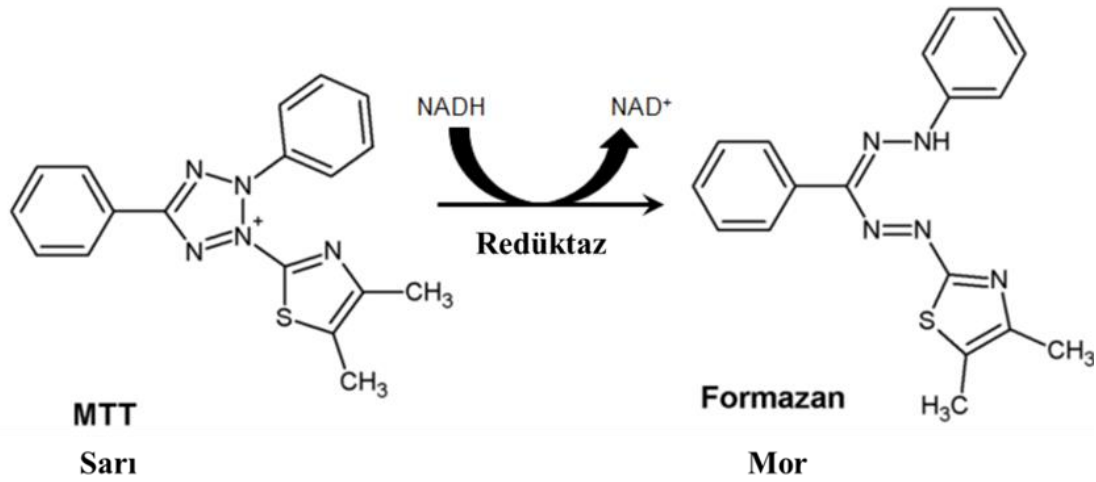
Biyoiskeleler laminar akışlı kabine yerleştirilmiş ve iskelelere UV ışık (254 nm) altında 1 saat boyunca sterilizasyon işlemi uygulanmıştır. Ardından, iskeleler 96 kuyucuklu hücre kültürü plastiğine yerleştirilmiştir. İskelelerin ıslanması için her bir iskele 200 μ L PBS ile muamele edilmiş ve inkübatörde 45 dakika bekletilmiştir. Daha sonra, kuyucuklardaki PBS çekilerek atılmıştır. Bu işlemin devamında, pasajlanma sayısı 5-7 olan hücreler 10.000 hücre/iskele yoğunluğunda olacak şekilde iskelelere ekilmiştir. İskelelerin üzerine 200 μ L mezenkimal kök hücre tam besi yeri konulmuş ve iAMKH içeren iskeleler %5 CO₂, 37 °C sıcaklık ve %95 bağıl nem koşullarında inkübasyona bırakılmıştır. Besi yeri 2-3 günde bir yenilenerek kültüre 1, 3 ve 7. günler baz alınacak şekilde devam edilmiştir (Şekil 3.6).



Şekil 3.6. Hazırlanan deney setinin gösterimi

3.2.12. Hücrelerinden Arındırılan dSM İskelelerin Üzerine Ekilen Hücrelerin Canlılık Düzeylerinin Belirlenmesi

MTT, redoks potansiyelinin bir fonksiyonu olarak hücre canlılığını değerlendirmek için kullanılır. Aktif olarak solunum yapan hücreler suda çözünür MTT'yi çözünmeyen mor formazan'a dönüştürür (Şekil 3.7). Formazan daha sonra çözündürülür ve optik yoğunlukları belirlenir.



Şekil 3.7. MTT testinde formazan mor rengi dönüşümünün kimyasal süreci (Sittampalam ve ark., 2019)

MTT analizi için 96 kuyucuklu hücre kültürü plastiğinde bulunan dSM biyoiskelelerin üzerinde bulunan besiyeri, çekilerek uzaklaştırılmıştır. Daha sonra iskeleler 3 kez PBS ile yıkanmış ve üzerlerine her dSM iskelesi için 180 µl serumsuz vasat ve 20 µl MTT reaktifi içeren çözelti eklenerek %5 CO₂ ve %90 bağıl nem içeren 37 °C'deki inkübatörde yaklaşık 4 saat inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda iskele üzerindeki çözelti tamamen uzaklaştırılarak her bir iskele üzerine MTT çözücüsü (0,1 M HCl içinde hazırlanan susuz izopropanol) 200 µl eklenmiştir. İskeleler ependorfa aktarılmış ve iskelelere 1500 rpm'de 3 dakika vorteks uygulanmıştır. Meydana gelen mor renkli çözeltinin 570 nm'de absorbanısı ölçülmüştür, işlemler kültürün 1., 3. ve 7. günlerinde tekrar uygulanmıştır.

3.2.13. Taramalı Elektron Mikroskopisi

dSM iskelelerin yüzey morfolojisini ve ayrıca hücrelerin dSM iskelelere tutunmasını, göçünü ve çoğalmasını gözlemlemek için taramalı elektron mikroskopu (FE-SEM JFM 7100F EDS, JEOL, Japonya) kullanılmıştır. Tekrar hücrelendirilmiş dSM iskelelerden görüntü alınabilmesi için ilk olarak kültür ortamındaki vasat tamamen uzaklaştırılmış, ardından hücreli iskeleler steril PBS ile 2-3 kez yıkanmış ve iskeleler PBS içerisinde hazırlanan hacimce %2,5 glutaraldehit içeren çözelti ile en az 24 saat olacak şekilde fikse edilmiştir. Devamında, iskeleler ultrasaf su ile yıkanmış ve iskeleler her etanol serisinde 5 dakika boyunca muamele edilecek şekilde artan etanol serilerinden geçirilerek (%50, %70, %80, %90, %95 ve %100) oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Kurutulan iskeleler 90 saniye boyunca bir mini püskürtmeli kaplayıcı tarafından (SC7620, Mini Sputter Coater,

İngiltere) Au (%80) – Pd (%20) ile kaplanmıştır. Örneklerin görüntüleri yüksek vakum altında, 10 kV gerilimde ve farklı büyütmelemlerde elde edilmiştir.

3.2.14. Histokimyasal Karakterizasyon

Hücrelerinden arındırılmış spinal meninks iskeleleri ve iAMKH'lerin ekili olduğu iskeleler histolojik olarak değerlendirmek için H&E boyalarıyla boyanmıştır. Öncelikle, tüm iskeleler %10'luk nötr tamponlu formaldehit çözeltisinde beklemeye bırakılmıştır. Daha sonra örnekler akan su altında durulanmıştır. Bu işlemin devamında örnekler etil alkol serilerinden (%60, %70, %80, %90, %96 ve %100) geçirilerek dehidrate edilmiş, parafine gömülmüş ve 3-5 µm'lik kesitlere ayrılmıştır. Su bazlı boyaların dokulara penatre olabilmesi için kesitleri alınan dokulardan parafinin uzaklaştırılması ve örneklerdeki su içeriğinin geri kazandırılmalıdır. Bu nedenle örneklerden parafin uzaklaştırılması işlemi yapılmıştır. Parafin uzaklaştırılması için örneklere aşağıdaki adımlar uygulanmıştır:

- I. Doku kesitlerinin kurutulmasını, lam ile örnekler arasındaki tutunmayı arttırmak ve parafinin eritilmesi için örnekler 15 dakika boyunca 55 °C'ye ayarlanan bir etüv içerisinde bekletilmiştir.
- II. Örneklerden parafin uzaklaştırılması için örnekler 5'er dakika olacak şekilde iki kez ksilen ile muamele edilmiştir.
- III. Örneklerin her biri azalan alkol serilerinden geçirildikten sonra (%100, %95 ve %70) 10 dakika distile suda bekletilerek iskelelere su içeriği tekrar kazandırılmıştır.

Parafin uzaklaştırıldıktan sonra örneklere standart H&E boyama protokolü uygulanmıştır.

3.2.15. İstatistiksel Analiz

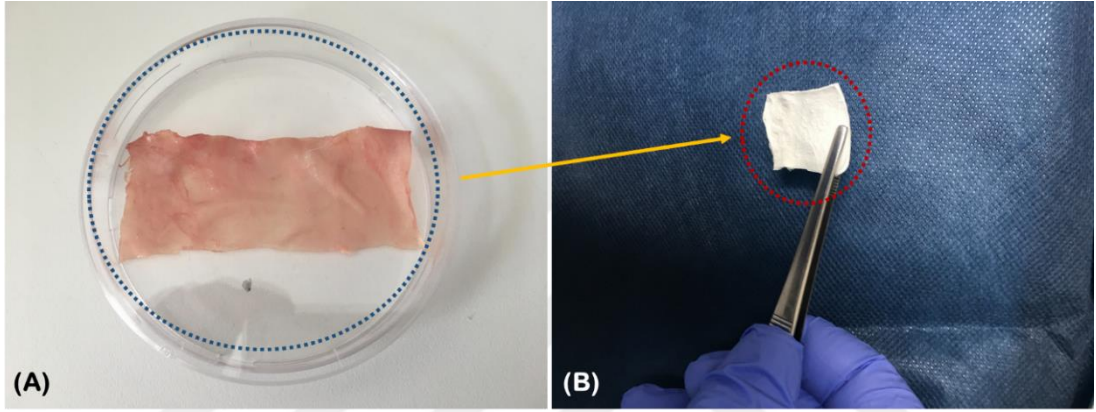
Deneysel veriler ve verilerin standart sapmaları Microsoft Office 365 Pro Plus Excel programı ile hesaplanmıştır. Aynı deney grubundaki gruplar arasındaki istatistiksel anlamlılık, Origin Pro 8SR0 (v8.0724, Origin Lab Corporation, MA, ABD) kullanılarak Tukey testi tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile tespit edilmiştir. 0,05'ten küçük p değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiş ve Prism'in sınıflandırma sistemi anlamlılık derecelerini belirlemek için kullanılmıştır (0,0001<p<0,001 = son derece anlamlı (***), 0,001<p<0,01 = çok anlamlı (**), 0,01 <p<0,05 = anlamlı (*) ve p>0,05 = anlamlı değil).

BÖLÜM 4

ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

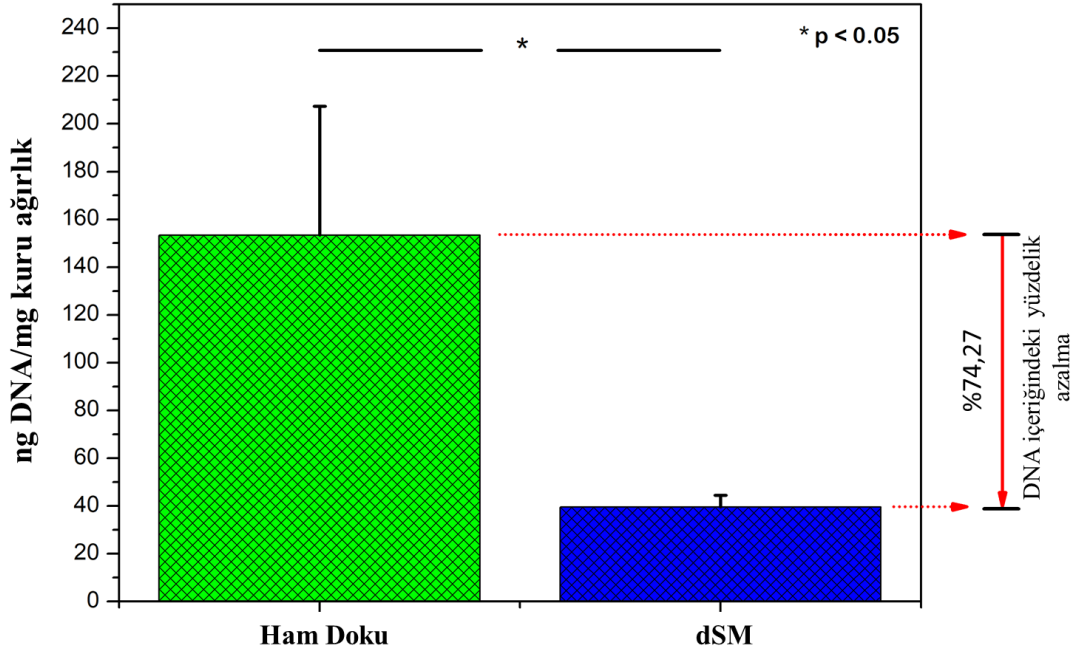
4.1. Sığır Spinal Meninksin Hücrelerinden Arındırılması ve DNA içerik analizi

Sığır spinal meninks dokusu hipotonik (10mM Trizma ve 5mM EDTA), hipertonic (%1 Triton X-100, 50mM Trizma ve 5mM EDTA pH:8.00), DNaz, RNaz (10Mm MgCl, 50Mm Trizma) ve PAA çözeltileri kullanılarak hücrelerinden arındırılmıştır. Şekil 4.1'de ham ve deselülerize spinal meninksin görsel olarak farkı gösterilmiştir.



Şekil 4.1. Ham (A) ve deselülerize spinal meninks (B)

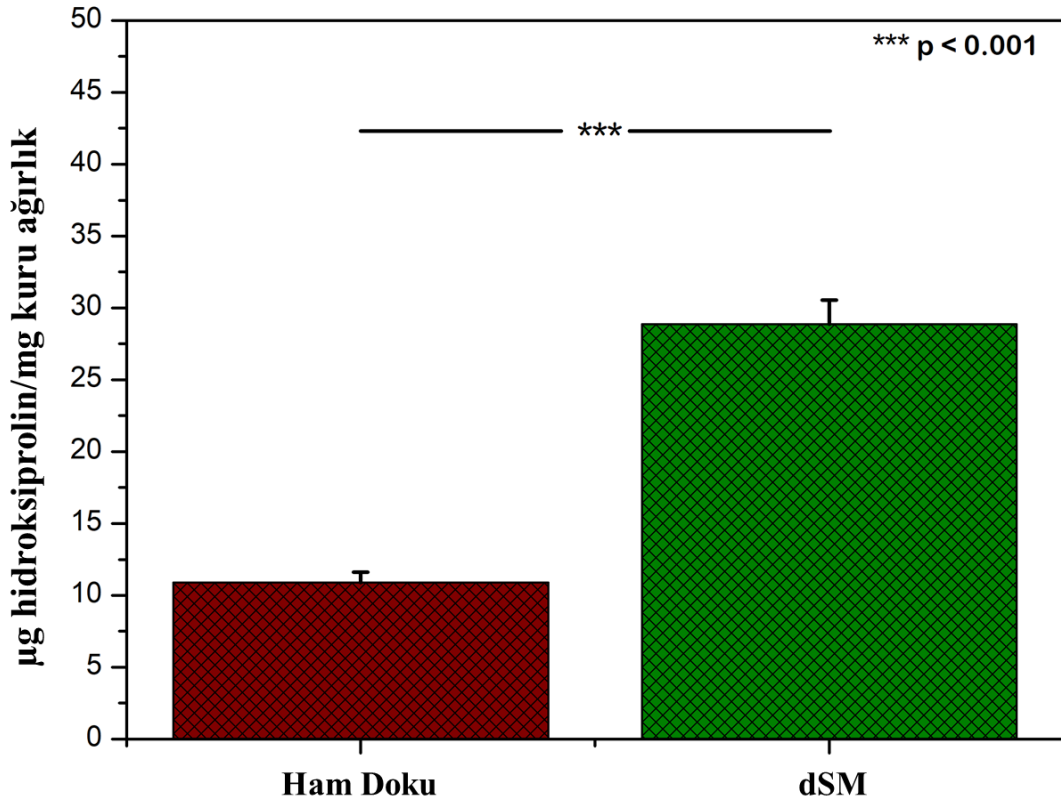
Çift sarmal DNA içerik analizi, hücrelerinden arındırma işleminin başarısını değerlendirmek için rutin olarak yapılan bir analizdir ve etkili bir hücrelerinden arındırma işleminden bahsedebilmek için çift sarmal DNA içeriği miktarı 50 ng/mg kuru ağırlığı geçmemelidir (Crapo ve ark., 2011). Yapılan çift sarmal DNA içerik analizi sonucu ham spinal meninks ve hücrelerinden arındırılmış spinal meninks dokuları için DNA içeriği miktarı sırasıyla $153,39 \pm 53$ ve $39,47 \pm 4,93$ ng/mg kuru ağırlık ($n = 3$; $p < 0.05$; ANOVA; Şekil 4.2.) olarak bulunmuştur. Gerçekleştirilen hesaplamalar sonucunda çift sarmal DNA içeriğinin yaklaşık olarak %74,27 oranında azaltıldığı ve başarılı bir hücrelerinden arındırma işlemi gerçekleştirildiği belirlenmiştir.



Şekil 4.2. DNA içerik analizi

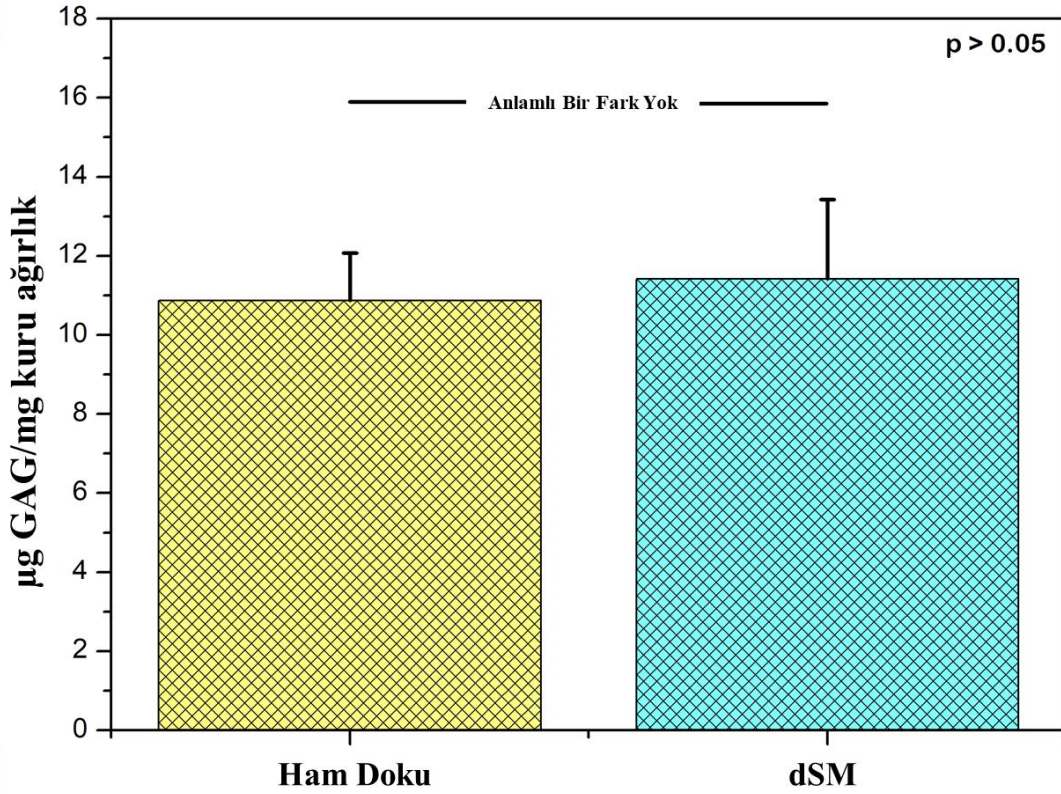
4.2. Hidroksiprolin ve Glikozaminoglikan İçeriği

HDM, doğal hücreler tarafından üretilen benzersiz bir biyolojik iskele ve hücreleri, senfoni orkestrasını yöneten bir maestro gibi yönlendirmektedir. Çok sayıda yapısal ve fonksiyonel protein, GAG, glikoprotein, hormon ve sinyal molekülünden (yani büyüme faktörleri) oluşan HDM, dokuya özgü bir 3 boyutlu bir çerçevedir (Srokowski ve Woodhouse, 2017; Erten ve Arslan, 2018). Bu nedenle, hücrelerinden arındırma işlemi sırasında HDM'nin zararını en aza indirmek hayati önem taşımaktadır. HDM hasarını değerlendirmek için, hücrelerinden arındırma işleminden önce ve sonra GAG ve HPR içerik analizleri yapılmıştır. Doku hidrolizatlarındaki HPR, kollajen miktarının doğrudan bir ölçümüdür (Wu ve ark., 2011). Ham SM dokusunun ve dSM'nin HPR miktarları sırasıyla $10,91 \pm 0,72$ ve $28,86 \pm 1,68$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ kuru ağırlık olarak hesaplanmıştır ($n=3$; $p<0,001$; ANOVA; Şekil 4.3.).



Şekil 4.3. Hidroksiprolin içeriği analizi

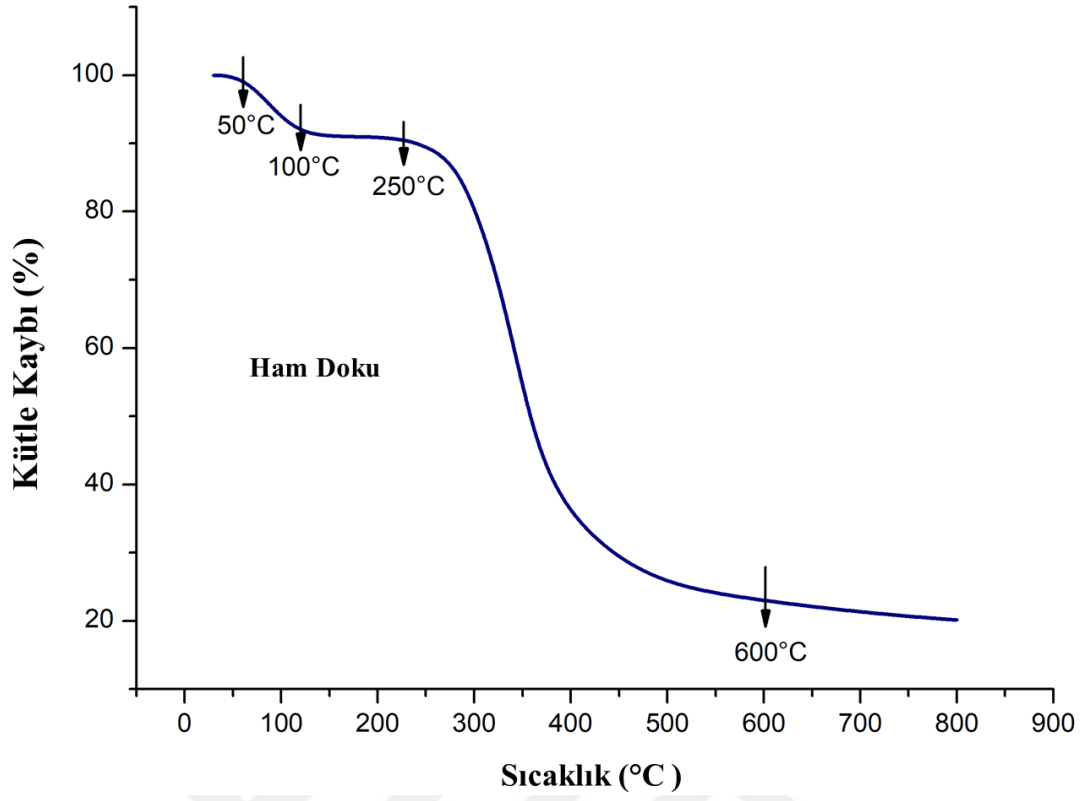
Negatif yüklü polisakaritler olan sülfatlanmış GAG'lar çoğunlukla bağ dokularında, HDM'de ve sayısız hücre türünün yüzeyinde bulunmaktadır (Yoon ve Halper, 2005). Ham SM dokusu ve dSM için sülfatlanmış GAG içeriği, sırasıyla $10,87 \pm 1,20$ ve $11,42 \pm 2,01$ µg/mg kuru ağırlık olarak tespit edilmiştir ($n=3$; $p>0,05$; ANOVA; Şekil 4.4.). Sonuçlar, GAG ve HPR seviyelerinin hücrelerinden arındırma işleminden sonra arttığını göstermektedir. dSM'deki sülfatlanmış GAG'lerin ve HPR'nin miktarlarının, ham SM dokusundan daha fazla olmasının nedeni, hücresel bileşenlerin kaybı ya da lipitler ve benzeri gibi diğer çözünebilir yapıların salınması ile ilişkili olabilir (Hussein ve ark., 2016).



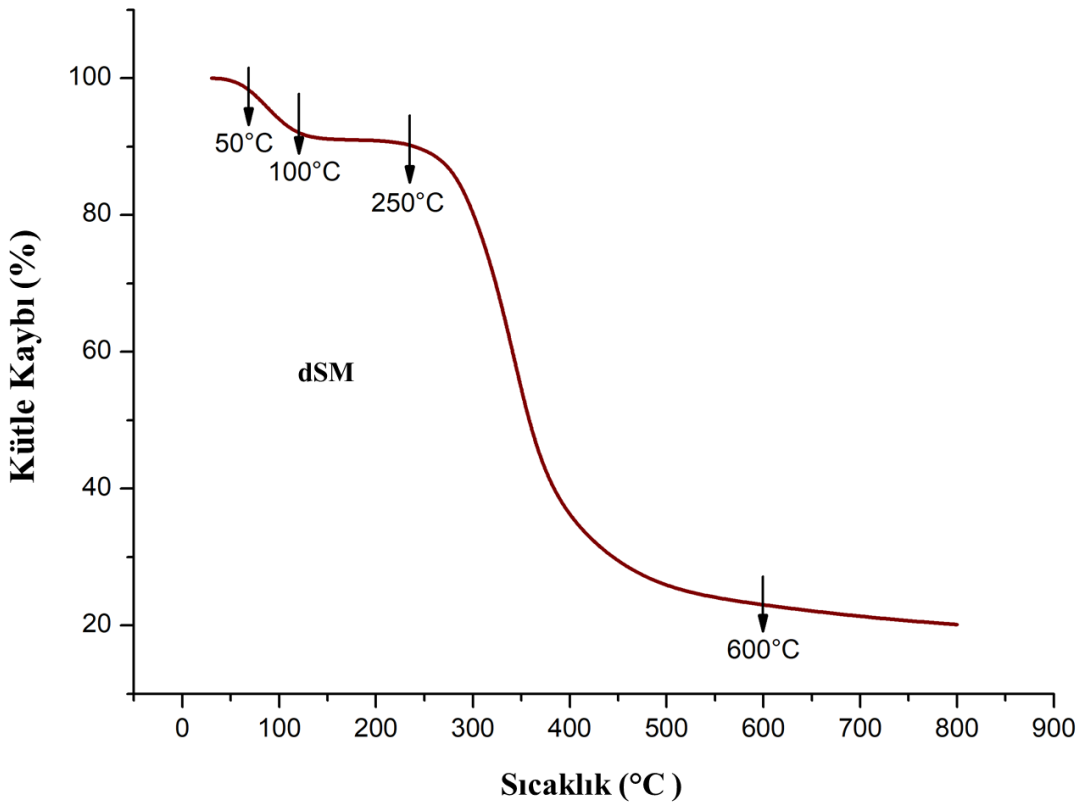
Şekil 4.4. Glikozaminoglikan içeriği analizi

4.3. Termal ve Biyomekanik Karakterizasyon

Şekil 4.5 ve Şekil 4.6.'da sunulan TGA kütle kaybı eğrileri, ham SM dokusunun ve dSM'nin termal özelliklerinin benzer olduğunu ortaya koymuştur. Termogramlarda iki keskin kütle kaybı eğrisi görülür ve termogram, malzemenin 50-600 °C sıcaklık aralığında bozunduğunu göstermektedir. 50-100 °C arasındaki ilk kütle kaybı eğrisi her iki örnek için toplam nem kaybını göstermektedir (Jun ve ark., 2019). 250-600 °C arasındaki ikinci keskin kütle kaybı eğrisi, proteinlerin (örneğin kollajen ve kollajen olmayan proteinler) termal bozunmasını göstermektedir (Lee ve ark., 2014). Ham SM ve dSM için kütle kaybının, 50-600 °C arasındaki sıcaklık aralığında yaklaşık olarak %79,84 olduğu hesaplanmıştır.

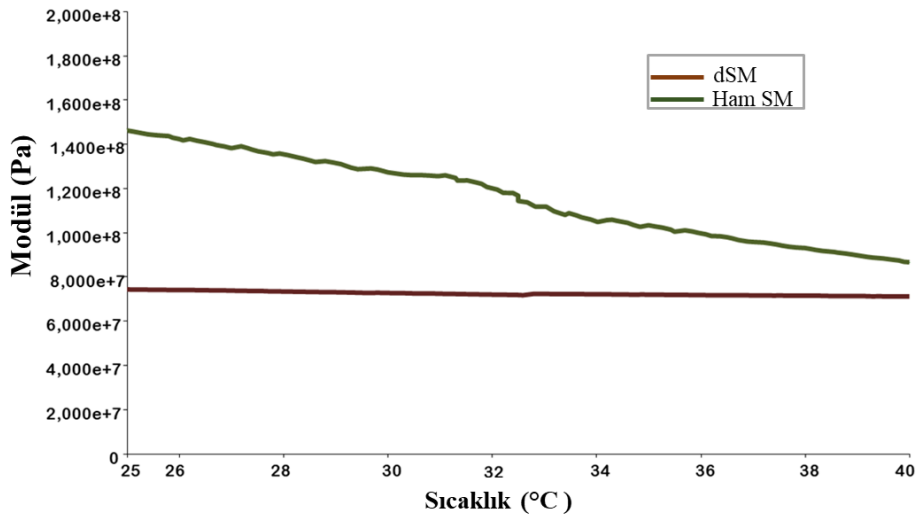


Şekil 4.5. Ham spinal meninks dokusunun TGA grafiği



Şekil 4.6. Hücrelerinden arındırılmış spinal meninks dokusunun TGA grafiği

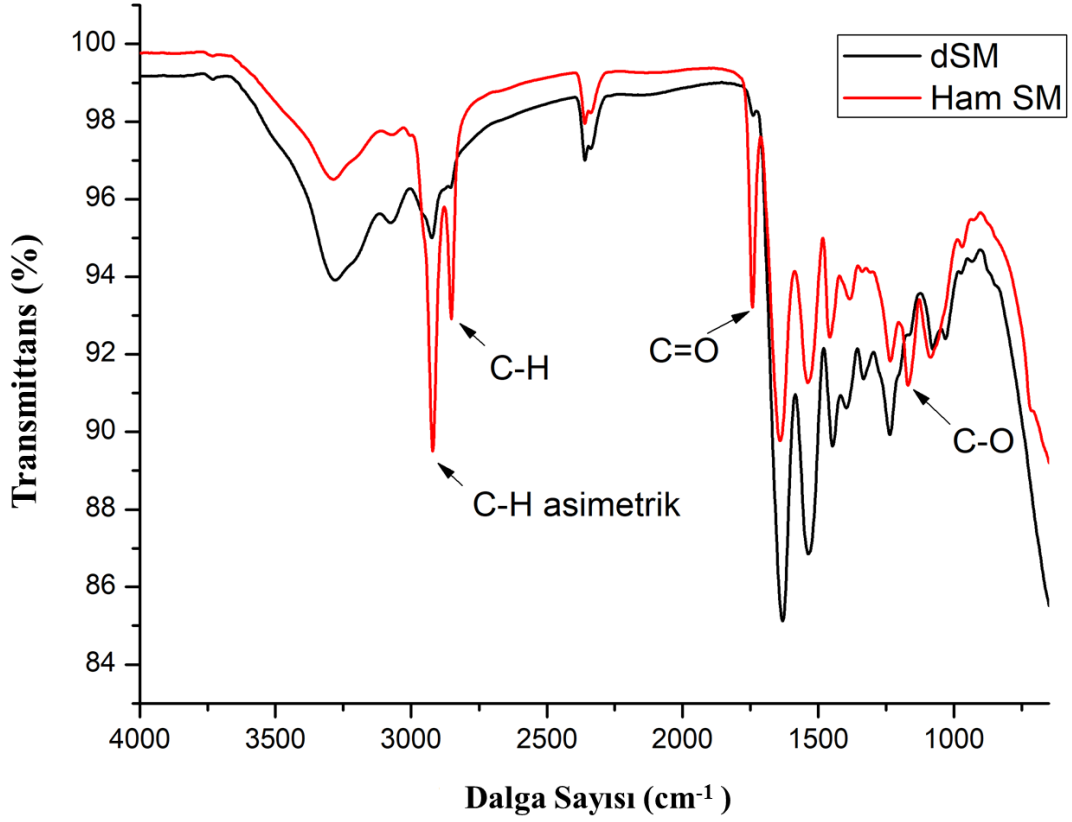
Sıcaklığa bağlı mekanik davranışlar (25-40 °C), yani DMA eğrileri Şekil 4.7'de verilmiştir. Malzemenin elastik özelliğini gösteren depolama modülü, hücrelerinden arındırma işleminden sonra beklendiği gibi hafifçe azalmıştır. Ham SM ve dSM için maksimum depolama modülü sırasıyla $1,46 \times 10^2$ ve $0,74 \times 10^2$ MPa olarak bulunmuştur. Rahman ve arkadaşları da yaptıkları bir çalışmada hücrelerinden arındırma işleminin ardından malzemenin elastik özelliklerinde azalma meydana geldiği sonucuna ulaşmışlardır (Rahman ve ark., 2018). Yukarıdaki sonuçlar uygulanan hücrelerinden arındırma işleminin HDM'ye minimum zarar verilerek gerçekleştirildiğini desteklemektedir.



Şekil 4.7. DMA analizi

4.4. ATR-FTIR Analizi

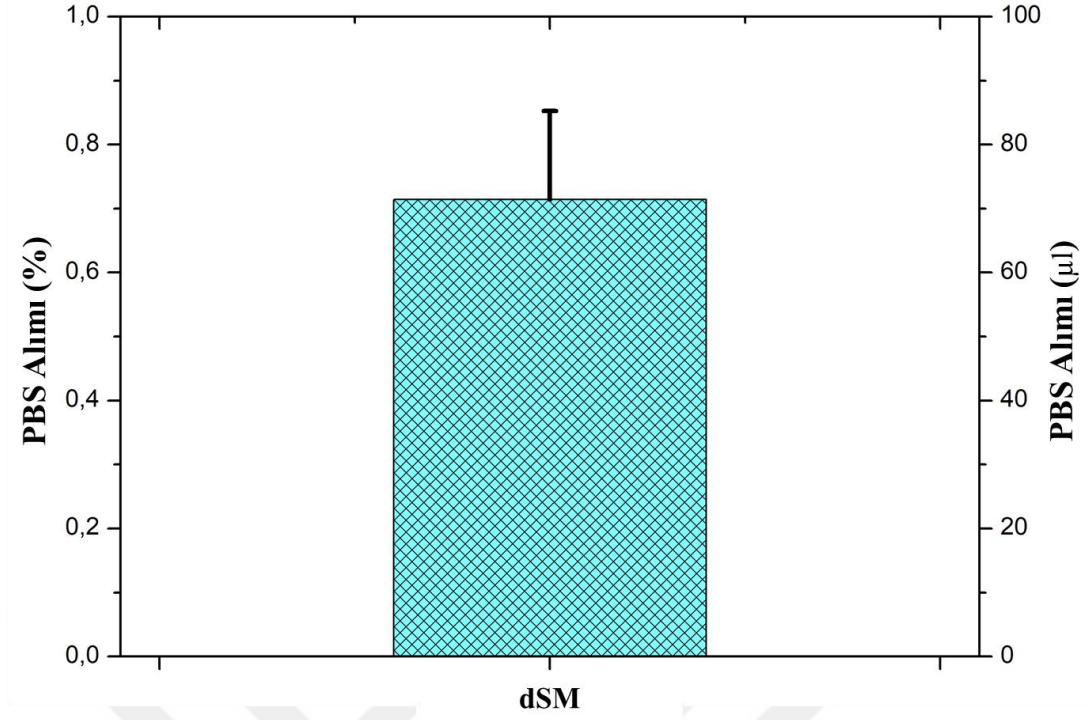
Ham SM ve dSM'nin kimyasal bağları arasındaki farkları belirlemek için ATR-FTIR analizi yapılmıştır. Şekil 4.8'de vurgulandığı gibi, 2852 cm^{-1} ve 2919 cm^{-1} 'deki keskin pikler, asetillenmiş GAG'ye ait asimetrik ve simetrik C-H gerilmesidir. 1749 cm^{-1} 'deki diğer keskin pik, karbonil/karboksilik asit ester parçalarının C = O titreşimine karşılık gelir (Chi Ting Au-Yeung ve ark., 2017). Ayrıca, 1168 cm^{-1} 'de zayıf pik ortaya çıkmıştır, bu pik serin, treonin ve tirozin gibi hücre proteinlerindeki C-O gerilmesini göstermektedir (Ke ve ark., 2012). Sonuç olarak, ATR-FTIR spektrumları, hücrelerinden ayırma işleminden sonra bağların yoğunluğunu göstermiştir. Ham SM ve dSM'nin kimyasal bağları arasındaki bu küçük değişiklikler, Triton X-100'ün neden olduğu HDM'nin zararı ile ilgili olabilir.



Şekil 4.8. ATR-FTIR analizi

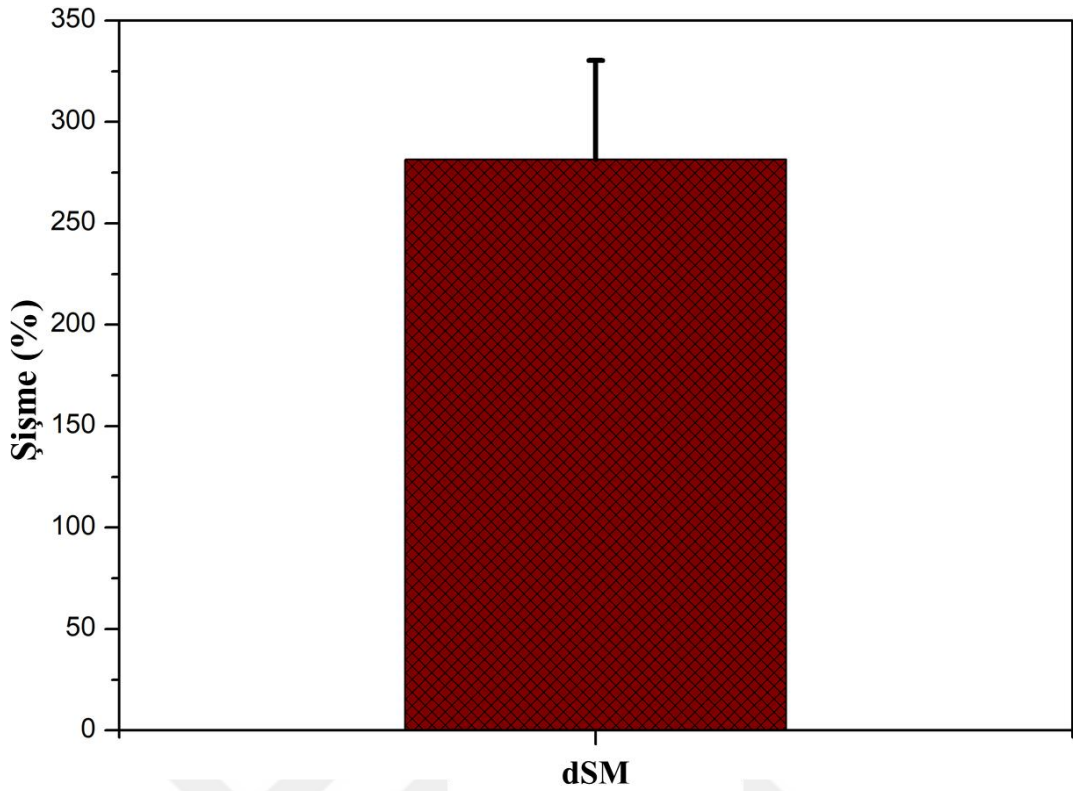
4.5. dSM İskelelerin PBS Alımı ve Şişme Özellikleri

PBS alımı, iskelelerin gözenekliliğini temsil eder, yani iskeleler, sıvıyı gözenek büyüklüğünün izin verdiği ölçüde emebilir. Yapılan hesaplamalar sonucunda PBS alımının $71,39 \pm 13,89 \mu\text{l}$ olduğu bulunurken, yüzde olarak 10 ml PBS'in $\%0,71 \pm 0,14$ 'ünü ifade etmektedir ($n = 3$) (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. PBS alım testi

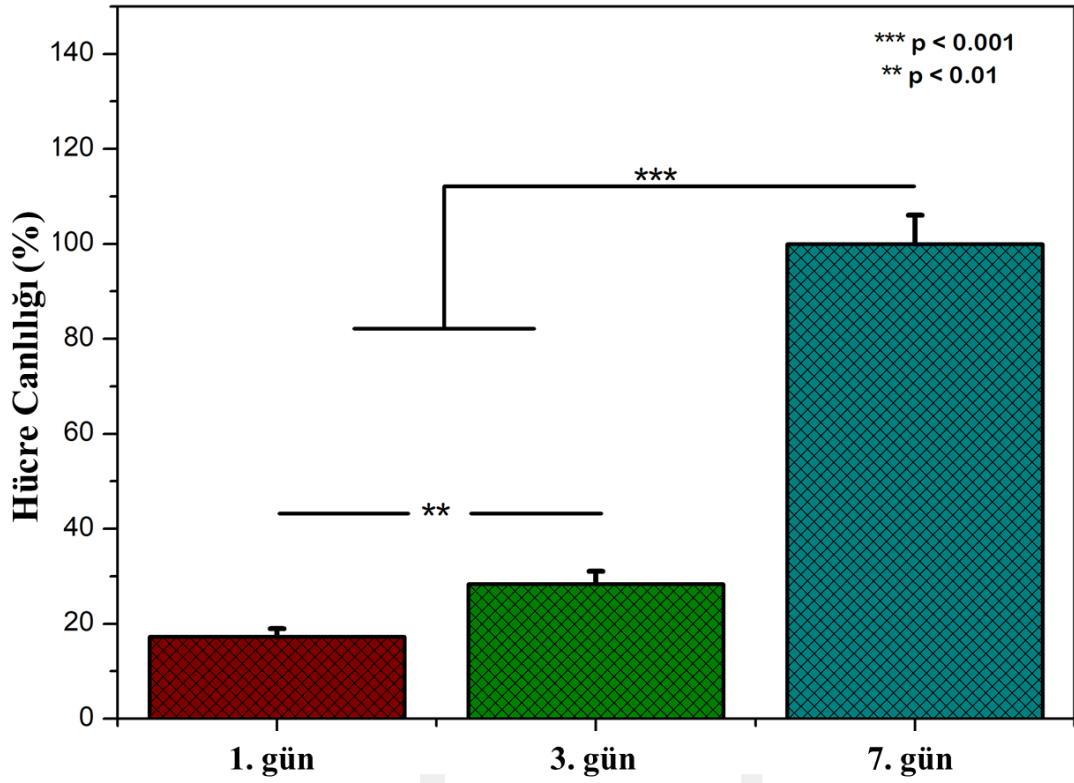
Diğer taraftan, şişme oranı, iskelenin su emme seviyesi ile ilgilidir. Bu deneyde, dSM'nin (n = 3) PBS'deki (pH 7.2-7.4) şişme oranının $\%286,56 \pm 48,83$ olduğu gözlenmiştir Şekil 4.10). Bu veriler şişme oranını $\%561 \pm 19,3$ olarak bulan Song ve ark.'nın yaptığı çalışma ile karşılaştırılabilir. (Song ve ark., 2018). Burada dSM iskelelerinin şişme oranının düşük olması spinal meninksin eşsiz kompakt mikromimarısından kaynaklanıyor olabilir.



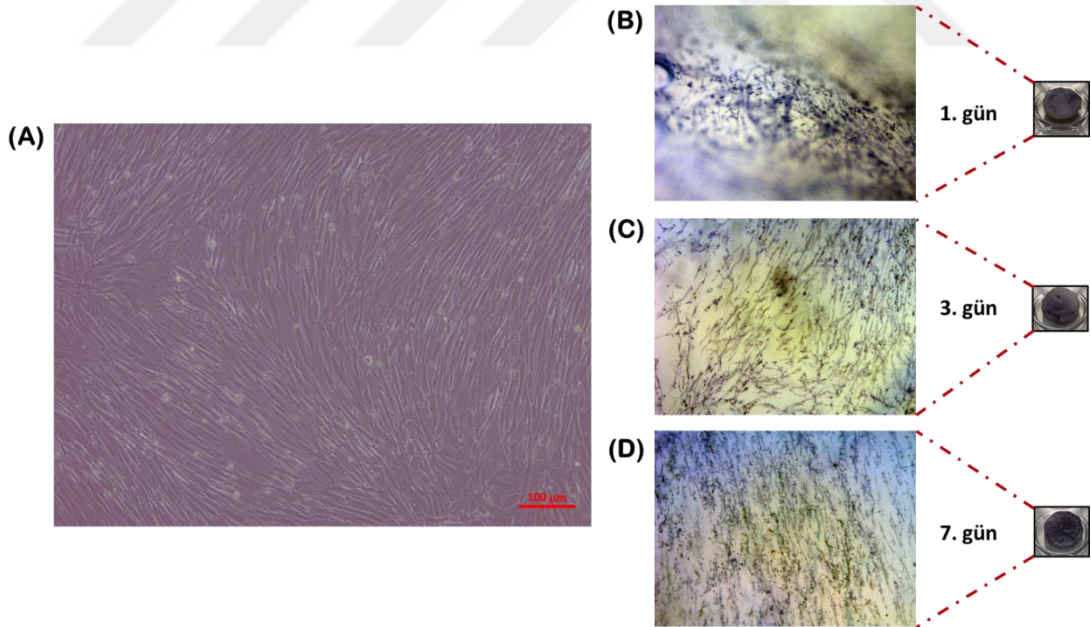
Şekil 4.10. Şişme testi

4.6. dSM İskelelerinin *In Vitro* Hücre Uyumluluğu

iAMKH'ler kök hücrelerin çoğaltılması için özel tasarlanan besi yerinde çoğaltılmıştır. iAMKH'lerin mikroskop fotoğrafları Şekil 4.12'de verilmiştir. Şekilde iAMKH'lerin T75 kültür plastiğine tutundukları ve mezankimal kök hücrelere spesifik bir özellik olan iğsi morfolojileri görülmektedir (Şekil 4.12-A). iAMKH'lerin dSM üzerinde 1., 3. ve 7. günlerindeki hücre canlılığını ve çoğalmalarını doğrulamak için MTT analizi gerçekleştirilmiştir. dSM üzerine ekilmesine karar verilen ilk hücre yoğunluğu, önceki deneyimlerimize dayanarak tanımlanmıştır. Şekil 4.11'deki hücre canlılığı grafiği incelendiğinde hücre sayısının günden güne arttığı böylece dSM iskelelerin hücreler üzerinde herhangi bir sitotoksik etki göstermediği görülmüştür ($n = 3$; $p < 0,01$; ANOVA). Hücre desenlerini gösteren yeniden hücrelendirilmiş dSM'nin makro ve mikro görüntüleri de Şekil 4.12'de gösterilmiştir. MTT sonuçları, dSM iskelesinin doku mühendisliğinde kullanım potansiyeline sahip bir iskele olduğunu ortaya koymuştur.



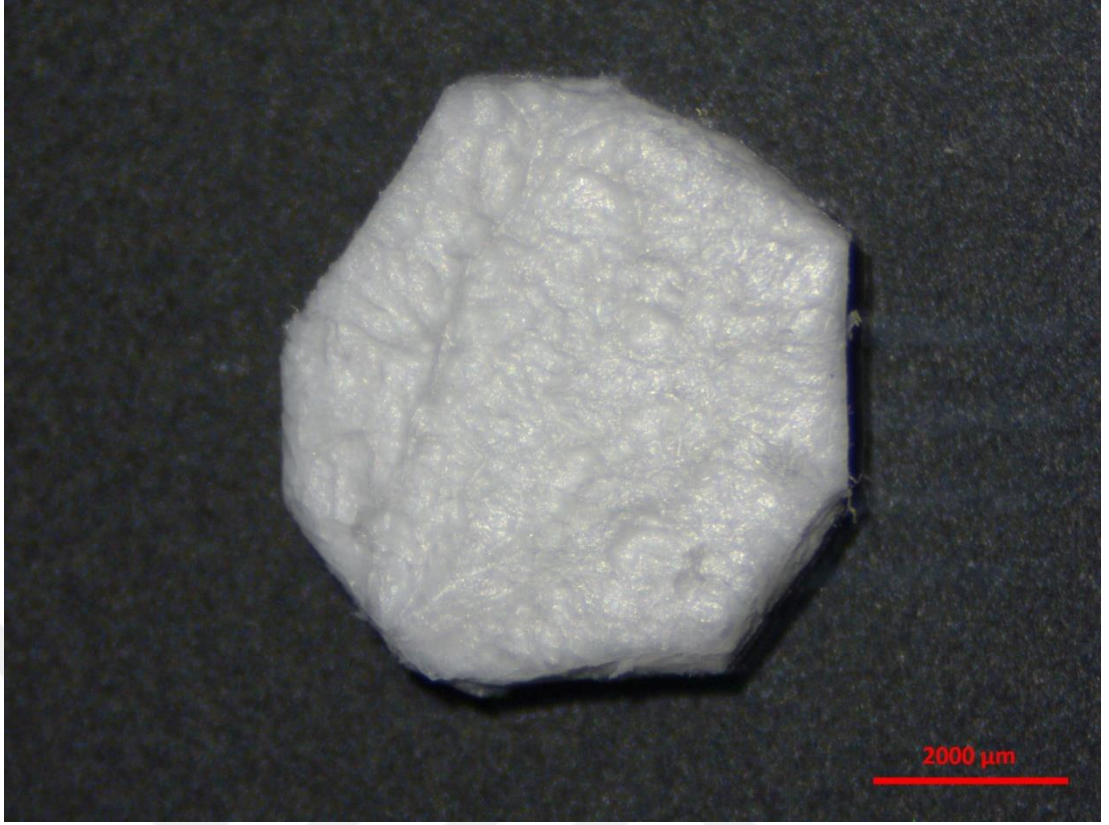
Şekil 4.11. iAMKH'lerin *in vitro*'da 1., 3. ve 7. günlerdeki hücre canlılığı (%) grafiği



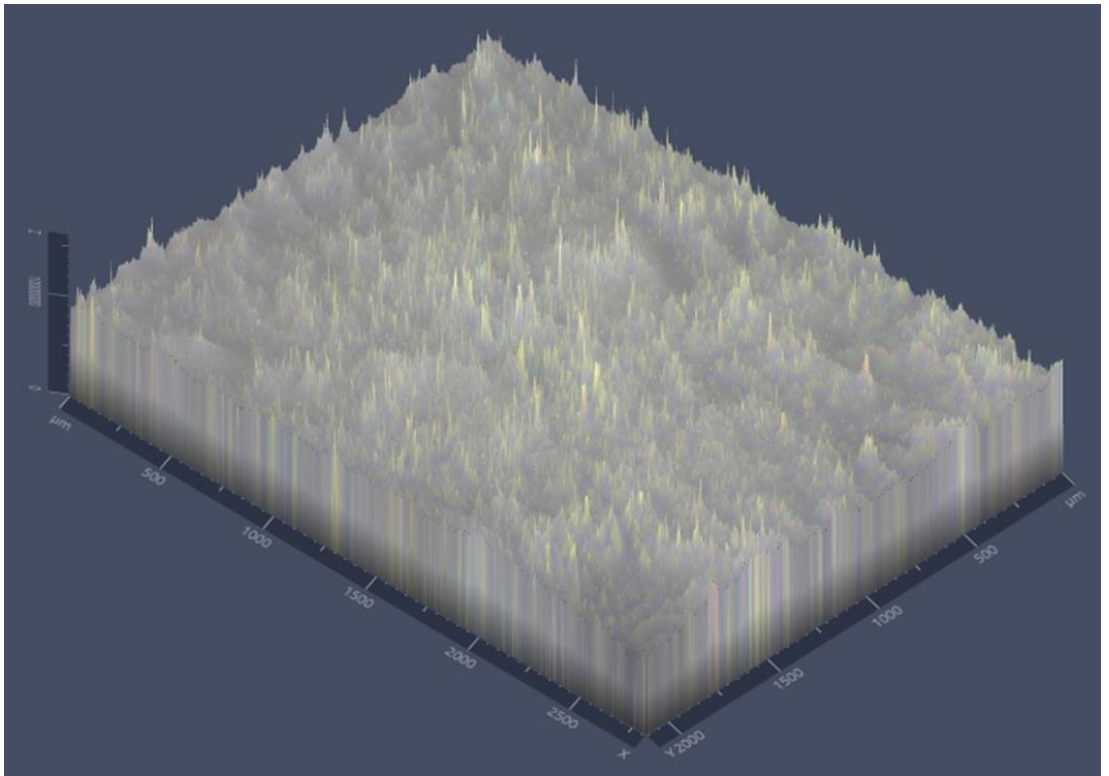
Şekil 4.12. Yeterli bolluğa ulaşan iAMKH'lerin 10x büyütme altındaki mikroskopik görünüşü (A), tekrar hücrelendirilen dSM'nin 1. (B), 3. (C) ve 7. (D) günlerdeki makroskopik görüntüleri (Kırmızı bar 100 µm'yi göstermektedir)

4.7. dSM İskelelerinin Morfolojik Karakterizasyonu

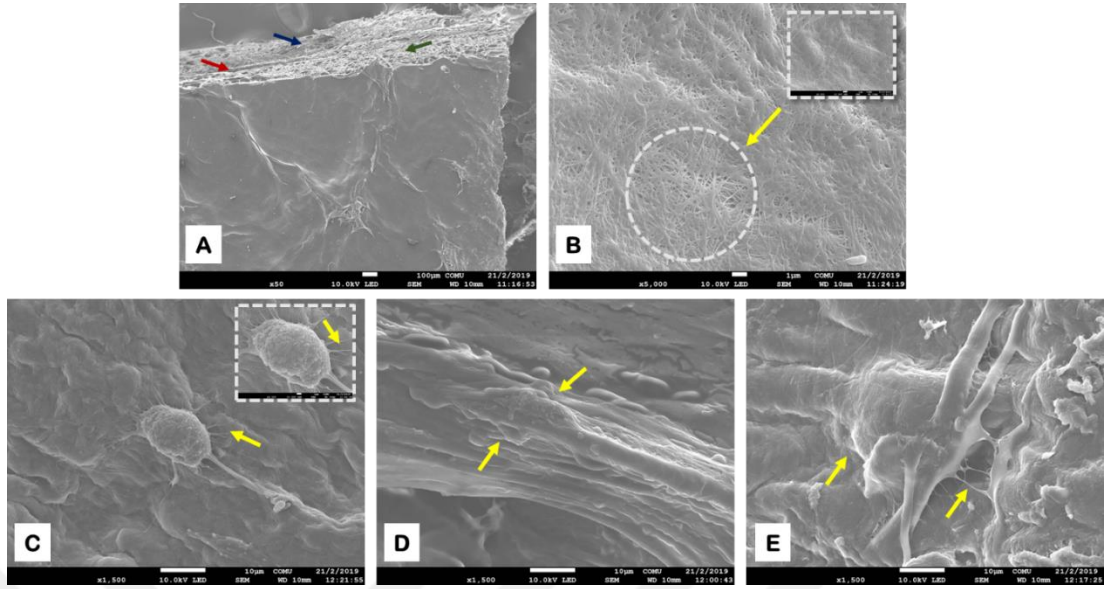
HDM, hücrelerin çoğalmasını ve farklılaşmasını düzenlemenin yanı sıra, hücre yüzeyindeki reseptörlerle etkileşime girerek hücre bağlanmasına izin veren eşsiz protein bazlı fibril motifleri içerir (Petreaca ve Martins-Green, 2011). Şekil 4.13.'te dSM iskelesinin yüzey morfolijisi stereo mikroskop ile görüntülenmiştir. Ayrıca Şekil 4.14'de dSM iskelesinin yüzeyinin 2,5 boyutlu (2,5B) bir gösterimi bulunmaktadır. iAMKHlerin iskelelere bağlanmasını ve iskeleler üzerindeki göçünü gözlemlemek için, yeniden hücrelendirilen dSM'nin hücre kültüründeki 1., 3. ve 7. günlerinde SEM görüntüleri alınmıştır. Şekil 4.15A-B, hücrelerinden arındırılmış iskelenin mikromimarisini gösterirken, Şekil 4.15C-E, yeniden hücrelendirilmiş dSM'yi göstermektedir. Spinal meninks katmanları olan dura, araknoid ve pia mater, Şekil 4.15-A'da verilmiştir. HDM üzerindeki hücre-hücre etkileşimi, optimal doku rejenerasyonu için kritik bir olgudur. dSM'nin benzersiz HDM ağı (Şekil 4.15-B) doku yenilenmesini destekleyebilir; bununla birlikte, yoğun ağ PBS alım testinde belirtildiği üzere spinal meninkslerin ıslanabilirlik özelliğini azaltmıştır. dSM'nin yüzeyine bağlanmış hücreler ve hücrelerin filopoduları kültürün ilk gününden itibaren gözlenebilmektedir (Şekil 4.15-C). Filopodia'nın hücreler için rolü, hücrelerin yüzeye erken yapışmasını, çevreyi keşfetmesini ve göç etmesini sağlamak olarak özetlenebilir. Yüzeylerin pürüzlülüğü (yani mikromotifler), hücrelerin yayılma dinamikleri için gerekli olan filopodia oluşumunu uyarır (Albuschies ve Vogel, 2013). Şekil 4.15C-E'de görülebildiği gibi, dSM'nin mikro yapıları hücrelerin bağlanma, göçme, bölünme ve yayılmalarını sağlar. SEM görüntülerinde hücre yoğunluğunun dSM'de günden güne arttığı, bunun da MTT sonuçları ile yakın bir uyum içinde olduğu görülmektedir. Son olarak, dSM'nin kalınlığı yaklaşık 250 µm, ortalama fibril kalınlığı yaklaşık 0.093 ± 0.024 µm (n = 6) olarak ölçülmüştür. Diğer taraftan, ticari bir dura mater ikamesi olan PRECLUDE® (GORE® Medical) da 300 µm kalınlığa sahiptir.



Şekil 4.13. dSM iskelesinin stereo mikrosokop görüntüsü (kırmızı bar 2000 μm'yi göstermektedir)



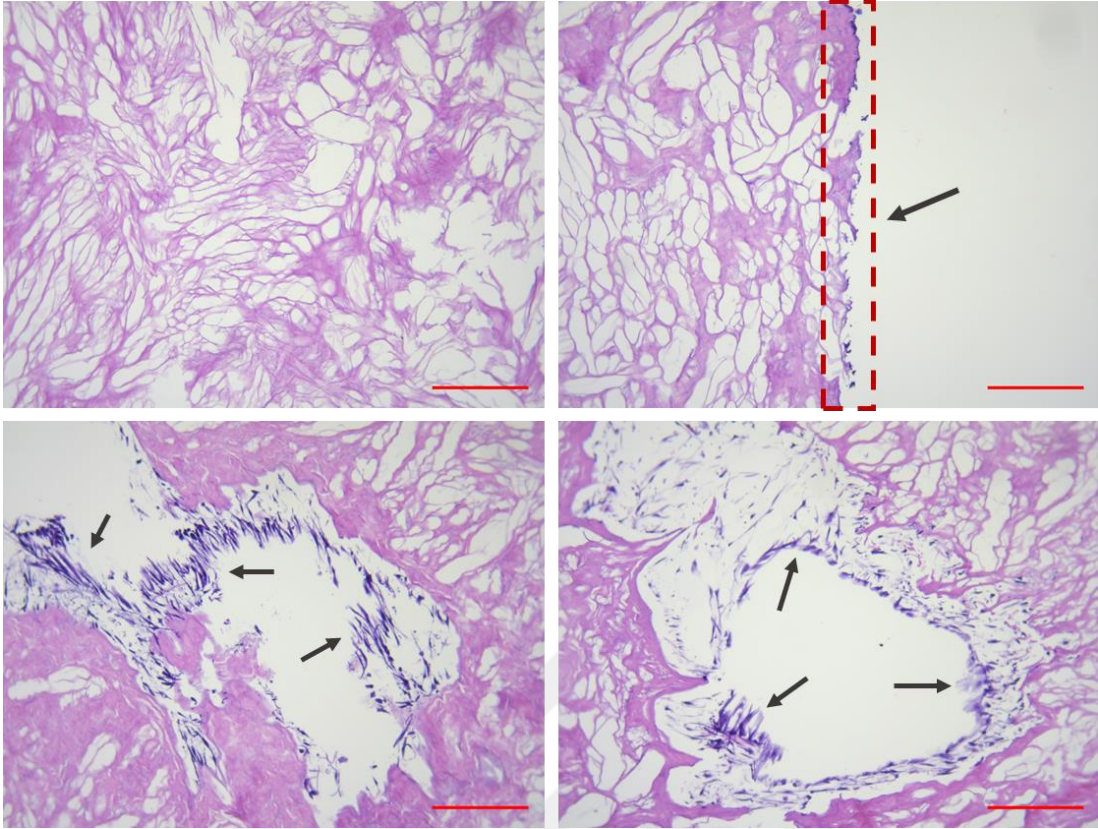
Şekil 4.14. dSM iskelenin 2.5-B'lu görüntüsü



Şekil 4.15. dSM ve yeniden hücrelendirilmiş dSM'nin farklı büyütme seviyelerinde (x50, x1500 ve x5000) SEM görüntüleri. Dura (yeşil ok), araknoid (kırmızı ok) ve spinal meninglerin pia (mavi ok) katmanları (A), dSM'nin ağ yapısı (B), iAMKH'lerin dSM iskeleyle tutunmalarını sağlayan filopodia yapıları (C), iAMKH'lerin 3. (D) ve 7. (E) günlerdeki yayılması ve çoğalması

4.8. Histolojik Analiz

Biyomatriks, hücrelerin büyümesini ve hayatta kalmasını etkiler; bu nedenle H&E boyama, 1., 3. ve 7. günlerde yeniden hücrelendirilmiş dSM üzerindeki hücre davranışları tanımlamak için gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.16'A'da hemen hemen hiç çekirdek boyanmadığı görülmektedir. Bu sonuç, uygun hücrelerinden arındırma protokolü kullanılarak hücrelerin başarılı bir şekilde uzaklaştırıldığını göstermektedir. 1. günde dSM'nin fibril motiflerine bağlanmış hücreler (Şekil 4.16-B) ve 3. (Şekil 4.16-C) ve 7. günlerde (Şekil 4.16-D) sıkı ağ üzerinde yayılmaya başlamışlardır. Bu bulgular aynı zamanda SEM görüntüleri ve MTT sonuçları ile de örtüşmektedir.



Şekil 4.16. H&E boyama sonrası alınan kesitlerin fotoğrafları. SM dokusunun mikromimari yapısı (A), hücre kültürünün birinci gününde iskeleye tutunan iAMKH'ler (B), 3. (C) ve 7. (D) günlerde hücrelerin göçü ve dağılımı (Kırmızı barlar 200 μm 'yi göstermektedir)

BÖLÜM 5

SONUÇ VE ÖNERİLER

Doku mühendisliği, biyomühendislik, malzeme bilimi ve yaşam bilimleri ilkelerini ve yöntemlerini, hastalık veya travmatik süreçlerin neden olduğu hasarı takiben dokuların fonksiyonlarını geri kazanmalarını sağlayacak biyolojik ikamelerin geliştirilmesine yönelik disiplinlerarası bir alandır. Doku mühendisliğinin genel ilkeleri, canlı hücrelerin yerini alacağı doku ile işlevsel, yapısal ve mekanik olarak eşit veya daha iyi özelliklere sahip ve üç boyutlu bir niş oluşturan doğal veya sentetik bir biyomalzeme ile entegrasyonunu içermektedir. Bu oluşum için dört temel materyalin detaylı bir şekilde seçilmesini gerekir: 1) iskele, 2) büyüme faktörleri, 3) hücre dışı matriks ve 4) hücreler. Doku mühendisliği alanında çok ilerleme kaydedilmiştir, ancak organ ve doku değişimine yönelik daha fazla çalışma gereklidir. Optimum hücre kaynağı, iskele tasarımı ve *in vitro* biyoreaktörler, vaskülarize doku ve organları oluşturmak için mikrofabrikasyon teknolojisinin kullanımı ve geliştirilmesi halen araştırılmaktadır. Yapay transplantasyon veya nakledilen organlar tedavi edilemez son dönem hastalıklar veya doku kaybı için başarılı bir tedavi yöntemidir. Bununla birlikte, bu tür müdahaleler organ temini sayısındaki sıkıntılar, yaşam boyu immünosupresyon gerekliliği ve ciddi komplikasyon potansiyeli ile karşı karşıya kalmaktadır. Doku mühendisliği, bu sorunları gidermek için hızla genişleyen bir yaklaşım olarak ortaya çıkmıştır ve rejeneratif tıbbın önemli bir bileşenidir. İskele malzemeleri, hücreleri, büyümesi ve farklılaşması için organize eden üç boyutlu yapılardır. Biyoiskeleler, vücuda entegre oldukları yani vücut dokuları/sıvılarıyla temas ettikleri ve herhangi bir immün tepkiye neden olmamak için biyoyumlu olmalıdır. Ayrıca, kültürde bulunan hücrelerin besin, oksijen ihtiyaçları ve atık ürünlerin tahliyesi için özel olarak tasarlanmış olmalıdır. pH, sıcaklık, oksijen miktarı ve mekanik kuvvetler gibi çevresel faktörler hücrenin türüne ve iskelenin özelliklerine göre belirlenerek hücrelerin HDM türevli iskelelere tutunması, çoğalması ve farklılaşması için en uygun koşullar sağlanmalıdır.

Dokuların/organların tedavileri için yenilikçi biyomalzemelerin üretilmesi, hastaların yaşam kalitesini artırmak için temel bir konudur. Şirketler ve bilim insanları son zamanlarda karşılanmamış tıbbi talepler için hücrelerinden arındırılmış dokular veya organlar kullanan olağanüstü biyolojik ikameler geliştirmeye odaklanmışlardır. Bunun nedeni olarak geleneksel sentetik ürünler sınırlı kapasiteye sahip olmaları ve implantasyon yerinde yapısal destek sağlamanın ötesine geçememeleri gösterilebilir. Bu amaçla, sıgır spinal meninkslerini hücrelerinden arındırmak için %1 Triton X-100 deterjanı ile 48 saat muamele edilmiştir.

Deterjan çözeltilerinden alınan meninksler ultra saf su ile 24 saat yıkanmıştır. Devamında iskelelere 37,5 °C'de 24 saat boyunca tamponda hazırlanmış ve RNaz çözeltileri uygulanmıştır. Bu süre sonunda birkaç tur ultra saf su ile yıkanmışlardır. Yıkama işleminin ardından 5 saat boyunca etanol ve perasidik asit içeren bir çözelti ile dekontaminasyon işlemi uygulanmıştır. Dekontaminasyon işleminden sonra iskeleler saf su ile 24 saat yıkanmak üzere çalkalamaya bırakılmıştır. Yıkama işlemiyle kimyasal kalıntılardan arındırılan iskeleler liyofilizasyon işlemine hazır olmaları için bir gece boyunca -26 °C'de bekletilmiştir. Hazır hale gelen iskeleler liyofilize edilmiştir. Hücrelerinden arındırma işleminin etkinliğini belirlemek için yapılan çift sarmal DNA miktarı analizi sonucu çeşitli deterjan ve enzimler kullanılarak çift sarmal DNA içeriğinin yaklaşık olarak %74,27 oranında azaltıldığı ve başarılı bir hücrelerinden arındırma işlemi gerçekleştirildiği belirlenmiştir. GAG ve hidroksiprolin analizi sonuçlarına göre gerçekleştirilen hücrelerinden arındırma işleminin HDM'ye ciddi bir zarar vermediği sonucuna varılmıştır. dSM iskelelerin ve ham dokunun mekanik dayanımını belirlemek için dinamik mekanik analiz, termal özellikleri için TGA ve içerdiği kimyasal bağları karakterize etmek için ATR-FTIR analizi uygulanmıştır. Karşılaştırmalı sonuçlara göre dSM ve ham dokunun hem mekaniksel dayanımlarının hem de termal stabilitelelerinin birbirlerine çok yakın olduğu gözlenmiştir. dSM iskelelere uygulanan şişme ve PBS alım testleri, spinal meninks HDM'sinin yoğun ve kompakt ağ yapısı PBS alım testinde belirtildiği üzere spinal meninkslerin ıslanabilirlik özelliğini azaltmıştır. Elde edilen biyoiskelelerin üzerine iAMKH'ler 10.000 hücre/iskele olacak şekilde ekilmiştir. Biyoiskelelere ekilen kök hücrelerin canlılık seviyeleri 1, 3 ve 7. günde yapılan MTT testi ile ölçülmüştür. Belirli günlerde yapılan MTT testi verilerine göre hücre canlılığının arttığı belirlenmiştir. Bu sonuca göre biyoiskelelerin hücreler için toksik olmadığı kanıtlanmıştır. dSM iskelelerin kalınlığı yaklaşık olarak 250 µm (n=6) olarak ölçülmüştür. Bu kalınlık doğal dokuyla uyumluluk göstermektedir. İlk olarak hücresiz biyoiskelelerin SEM fotoğrafları ardından hücre ekilen biyoiskelelerin 1, 3 ve 7. günlerdeki SEM fotoğrafları çekilmiştir. SEM görüntüleri incelendiğinde, hücresiz biyoiskelelerin hücrelerin tutunması ve göç etmesi için uygun yoğun ağı bir yüzeye sahip olduğu görülmüştür. iAMKH ekilmiş biyoiskelelerin SEM görüntüleri incelendiğinde ise gün geçtikçe hücrelerin çoğalarak biyoiskele yüzeyini kapladığı görülmektedir. dSM ve iAMKH ekili biyoiskelelerin H & E boyama sonuçlarına bakıldığında, hücre ekilmemiş biyoiskelelerde hücre veya çekirdeğe rastlanmamıştır. Bu veri bize uygun hücrelerinden arındırma protokolü kullanılarak hücrelerin başarılı bir şekilde dokudan uzaklaştırıldığını göstermektedir. Yeniden hücrelendirilen biyoiskelelerin

1, 3 ve 7. günlerde boyama görüntüleri hücrelerin biyoiskele yüzeyine tutunduğunu ve günden güne hücre sayısının arttığını göstermektedir. Sonuçlarımız HDM'e ciddi bir zarar vermeden hücrelerinden arındırma işleminin gerçekleştirildiğini göstermektedir. Sonuç olarak, dSM'nin cerrahi operasyonlar için umut vaat eden bir biyomatriks olacağı düşünülmektedir.



KAYNAKLAR

- Albuschies J., Vogel V., 2013. The role of filopodia in the recognition of nanotopographies. *Scientific Reports*, 3.
- Arslan Y. E., Efe B., Sezgin Arslan T., 2019. A novel method for constructing an acellular 3D biomatrix from bovine spinal cord for neural tissue engineering applications. *Biotechnology Progress*, e2814.
- Arslan Y. E., Galata Y. F., Sezgin Arslan T., Derkus B., 2018. Trans-differentiation of human adipose-derived mesenchymal stem cells into cardiomyocyte-like cells on decellularized bovine myocardial extracellular matrix-based films. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 29(8): 127.
- Badylak S. F., 2004. Xenogeneic extracellular matrix as a scaffold for tissue reconstruction. *Transplant Immunology*, 12(3–4): 367–377.
- Badylak S. F., Freytes D. O., Gilbert T. W., 2015. Reprint of: Extracellular matrix as a biological scaffold material: Structure and function. *Acta Biomaterialia*, 23(S): S17–S26.
- Bajaj P., Schweller R. M., Khademhosseini A., West J. L., Bashir R., 2014. 3D Biofabrication Strategies for Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 16(1): 247–276.
- Batioglu-Karaaltin A., Karaaltin M. V., Ovali E., Yigit O., Kongur M., Inan O., Bozkurt E., Cansiz H., 2015. In Vivo Tissue-Engineered Allogenic Trachea Transplantation in Rabbits: A Preliminary Report. *Stem Cell Reviews and Reports*, 11(2): 347–356.
- Berthiaume F., Maguire T. J., Yarmush M. L., 2011. Tissue Engineering and Regenerative Medicine: History, Progress, and Challenges. *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering*, 2(1): 403–430.
- Brien F. J. O., 2011. Biomaterials and scaffolds for tissue engineering. *Materials Today*, 14(3).
- Brignier A. C., Gewirtz A. M., 2010. Embryonic and adult stem cell therapy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(2 SUPPL. 2): S336–S344.

- Chen F.-M., Liu X., 2016. Advancing biomaterials of human origin for tissue engineering. *Progress in Polymer Science*, 53: 86–168.
- Chen R. N., Ho H. O., Tsai Y. T., Sheu M. T., 2004. Process development of an acellular dermal matrix (ADM) for biomedical applications. *Biomaterials*, 25(13): 2679–2686.
- Cheung H. Y., Lau K. T., Lu T. P., Hui D., 2007. A critical review on polymer-based bio-engineered materials for scaffold development. *Composites Part B: Engineering*, 38(3): 291–300.
- Chi Ting Au-Yeung G., Sarig U., Sarig H., Bogireddi H., Bronshtein T., Baruch L., Spizzichino A., Bortman J., Freddy B. Y. C., Machluf M., Venkatraman S. S., 2017. Restoring the biophysical properties of decellularized patches through recellularization. *Biomaterials Science*, 5(6): 1183–1194.
- Chiono V., Nardo T., Ciardelli G., 2014. *Bioartificial Biomaterials for Regenerative Medicine Applications. Regenerative Medicine Applications in Organ Transplantation*. Elsevier Inc.
- Crapo P. M., Gilbert T. W., Badylak S. F., 2011. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials*, 32(12): 3233–3243.
- Decimo I., Fumagalli G., Berton V., Krampera M., Bifari F., 2012. Meninges: from protective membrane to stem cell niche. *American journal of stem cells*, 1(2): 92–105. Erişildi adresinden <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3636743&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Elitok M. S., Gunduz E., Gurses H. E., Gunduz M., 2017. *Tissue engineering: Towards development of regenerative and transplant medicine. Omics Technologies and Bio-engineering: Towards Improving Quality of Life (C. 1)*. Elsevier Inc.
- Erten E., Arslan Sezgin T., Derkus B., Arslan Y. E., 2016. Detergent-free decellularization of bovine costal cartilage for chondrogenic differentiation of human adipose mesenchymal stem cells in vitro. *RSC Advances*, 6: 94236–94246.
- Erten E., Arslan Y. E., 2018. *The Great Harmony in Translational Medicine: Biomaterials and Stem Cells. Advances in Experimental Medicine and Biology (C. 1119, p. 21–39)*.

- Fitzpatrick L. E., McDevitt T. C., 2015. Cell-derived matrices for tissue engineering and regenerative medicine applications. *Biomaterials Science*, 3(1): 12–24.
- Furth M. E., Atala A., Van Dyke M. E., 2007. Smart biomaterials design for tissue engineering and regenerative medicine. *Biomaterials*, 28(34): 5068–5073.
- Gattazzo F., Urciuolo A., Bonaldo P., 2014. Extracellular matrix: A dynamic microenvironment for stem cell niche. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1840(8): 2506–2519.
- Gilbert T. W., Freund J. M., Badylak S. F., 2009. Quantification of DNA in Biologic Scaffold Materials. *Journal of Surgical Research*, 152(1): 135–139.
- Gilbert T. W., Sellaro T. L., Badylak S. F., 2006. Decellularization of tissues and organs. *Biomaterials*, 27(19): 3675–3683.
- Gilpin A., Yang Y., 2017. Decellularization Strategies for Regenerative Medicine: From Processing Techniques to Applications. *BioMed Research International*, 2017: 1–13.
- Hashemi M., Mofrad M. K., Mohajerani S. A., Kazemi S. M., Radpey B., Zali A., 2015. Anatomical Flow Pattern of Contrast in Lumbar Epidural Space: A Human Study with a Midline vs. Parasagittal Interlaminar Approach under Fluoroscopy. *Pain physician*, 18(4): 317–24. Erişildi adresinden <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26218934>
- Hollister S. J., 2009. Scaffold engineering: A bridge to where? *Biofabrication*, 1(1).
- Huang S.-J., Fu R.-H., Shyu W.-C., Liu S.-P., Jong G.-P., Chiu Y.-W., Wu H.-S., Tsou Y.-A., Cheng C.-W., Lin S.-Z., 2013. Adipose-Derived Stem Cells: Isolation, Characterization, and Differentiation Potential. *Cell Transplantation*, 22(4): 701–709.
- Hussein K. H., Park K. M., Ghim J. H., Yang S. R., Woo H. M., 2016. Three dimensional culture of HepG2 liver cells on a rat decellularized liver matrix for pharmacological studies. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 104(2): 263–273.
- Hutmacher D. W., 2006. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *The Biomaterials: Silver Jubilee Compendium*, 21: 175–189.
- Javadzadeh Y., Hamedeyaz S., 2014. Floating Drug Delivery Systems for Eradication of

- Helicobacter pylori in Treatment of Peptic Ulcer Disease. Trends in Helicobacter pylori Infection (C. i, s. 13). InTech.
- Jun L. Y., Mubarak N. M., Yon L. S., Bing C. H., Khalid M., Jagadish P., Abdullah E. C., 2019. Immobilization of Peroxidase on Functionalized MWCNTs- Buckypaper/Polyvinyl alcohol Nanocomposite Membrane. Scientific Reports, 9(1): 2215.
- Kaczmarek B., Sionkowska A., Gołyńska M., Polkowska I., Szponder T., Nehrbass D., Osyczka A. M., 2018. In vivo study on scaffolds based on chitosan, collagen, and hyaluronic acid with hydroxyapatite. International Journal of Biological Macromolecules, 118(Pt A): 938–944.
- Ke Y., Li Y., Wang Z.-Y., 2012. The Changes of Fourier Transform Infrared Spectrum in Rat Brain*. Journal of Forensic Sciences, 57(3): 794–798.
- Khan F., Tanaka M., 2018. Designing smart biomaterials for tissue engineering. International Journal of Molecular Sciences, 19(1): 1–14.
- Kim B.-S., Park I.-K., Hoshiba T., Jiang H.-L., Choi Y.-J., Akaike T., Cho C.-S., 2011. Design of artificial extracellular matrices for tissue engineering. Progress in Polymer Science, 36(2): 238–268.
- Kim K. ., Evans G. R. ., 2005. Tissue Engineering: The Future of Stem Cells. Topics in tissue engineering (p. 1–21). © Copyright 2003 Elsevier Science B.V., Amsterdam.
- Kimber I., Dearman R. J., 2002. Immune responses: Adverse versus non-adverse effects. Toxicologic Pathology, 30(1): 54–58.
- Kleinman H. K., Philp D., Hoffman M. P., 2003. Role of the extracellular matrix in morphogenesis. Current Opinion in Biotechnology, 14(5): 526–532.
- Knight M. A. F., Evans G. R. D., 2004. Tissue engineering: Progress and challenges. Plastic and Reconstructive Surgery, 114(2): 26–37.
- Knight R. L., Wilcox H. E., Korossis S. A., Fisher J., Ingham E., 2008. The use of acellular matrices for the tissue engineering of cardiac valves. Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: Journal of Engineering in Medicine, 222(1): 129–143.
- Lee D. J., Padilla R., Zhang H., Hu W.-S., Ko C.-C., 2014. Biological Assessment of a

- Calcium Silicate Incorporated Hydroxyapatite-Gelatin Nanocomposite: A Comparison to Decellularized Bone Matrix. *BioMed Research International*, 2014: 1–12.
- Lygre H., 2002. Prosthodontic biomaterials and adverse reactions: A critical review of the clinical and research literature. *Acta Odontologica Scandinavica*, 60(1).
- Mercier F., Arikawa-Hirasawa E., 2012. Heparan sulfate niche for cell proliferation in the adult brain. *Neuroscience Letters*, 510(2): 67–72.
- Mercier F., Hatton G. I., 2001. Connexin 26 and basic fibroblast growth factor are expressed primarily in the subpial and subependymal layers in adult brain parenchyma: Roles in stem cell proliferation and morphological plasticity? *The Journal of Comparative Neurology*, 431(1): 88–104.
- Murphy C. M., Haugh M. G., O'Brien F. J., 2010. The effect of mean pore size on cell attachment, proliferation and migration in collagen-glycosaminoglycan scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 31(3): 461–466.
- Nepali S., Park M., Lew H., Kim O., 2018. Comparative Analysis of Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells from Orbital and Abdominal Fat. *Stem Cells International*, 2018: 1–9.
- Ngangan A. V., McDevitt T. C., 2009. Acellularization of embryoid bodies via physical disruption methods. *Biomaterials*, 30(6): 1143–1149.
- Ott H. C., Matthiesen T. S., Goh S. K., Black L. D., Kren S. M., Netoff T. I., Taylor D. A., 2008. Perfusion-decellularized matrix: Using nature's platform to engineer a bioartificial heart. *Nature Medicine*, 14(2): 213–221.
- Patel N., Kirmi O., 2009. Anatomy and Imaging of the Normal Meninges. *Seminars in Ultrasound, CT and MRI*, 30(6): 559–564.
- Petreaca M., Martins-Green M., 2011. Cell-ECM Interactions in Repair and Regeneration. *Principles of Regenerative Medicine* (p. 19–65). Elsevier.
- Rahman S., Griffin M., Naik A., Szarko M., Butler P. E. M., 2018. Optimising the decellularization of human elastic cartilage with trypsin for future use in ear reconstruction. *Scientific Reports*, 8(1): 3097.

- Reiss K., Mentlein R., Sievers J., Hartmann D., 2002. Stromal cell-derived factor 1 is secreted by meningeal cells and acts as chemotactic factor on neuronal stem cells of the cerebellar external granular layer. *Neuroscience*, 115(1): 295–305.
- Rocky S Tuan G. B. and R. T., 2002. Adult mesenchymal stem cells and cell-based. *Arthritis Research and Therapy*, 5(1).
- Scarritt M., Murdock M., Badylak S. F., 2019. Biologic Scaffolds Composed of Extracellular Matrix for Regenerative Medicine. *Principles of Regenerative Medicine* (p. 613–626). Elsevier.
- Sicari B. M., Londono R., Badylak S. F., 2014. Extracellular Matrix as a Bioscaffold for Tissue Engineering. *Tissue Engineering (Second Edi., p. 149–175)*. Elsevier.
- Siegenthaler J. A., Ashique A. M., Zarbali K., Patterson K. P., Hecht J. H., Kane M. A., Folias A. E., Choe Y., May S. R., Kume T., Napoli J. L., Peterson A. S., Pleasure S. J., 2009. Retinoic Acid from the Meninges Regulates Cortical Neuron Generation. *Cell*, 139(3): 597–609.
- Sittampalam G. S., Coussens N. P., Brimacombe K., Grossman A., Arkin M., Auld D., Austin C., Baell J., Bejcek B., Caaveiro J. M. M., Chung T. D. Y., Dahlin J. L., Devanaryan V., Foley T. L., Glicksman M., Hall M. D., Haas J. V., Inglese J., Iversen P. W., Kahl S. D. ve ark., 2019. *Assay Guidance Manual*, (Md).
- Song M., Liu Y., Hui L., 2018. Preparation and characterization of acellular adipose tissue matrix using a combination of physical and chemical treatments. *Molecular Medicine Reports*, 17(1): 138–146.
- Srokowski E. M., Woodhouse K. A., 2017. 2.20 Decellularized Scaffolds. *Comprehensive Biomaterials II (C. 2)*. Elsevier Ltd.
- Stylianopoulou F., Herbert J., Soares M. B., Efstratiadis A., 1988. Expression of the insulin-like growth factor II gene in the choroid plexus and the leptomeninges of the adult rat central nervous system. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85(1): 141–145.
- Tan L., Yu X., Wan P., Yang K., 2013. Biodegradable Materials for Bone Repairs: A Review. *Journal of Materials Science and Technology*, 29(6): 503–513.

- Theocharis A. D., Skandalis S. S., Gialeli C., Karamanos N. K., 2016. Extracellular matrix structure. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 97: 4–27.
- Tottey S., Corselli M., Jeffries E. M., Londono R., Peault B., Badylak S. F., 2011. Extracellular Matrix Degradation Products and Low-Oxygen Conditions Enhance the Regenerative Potential of Perivascular Stem Cells. *Tissue Engineering Part A*, 17(1–2): 37–44.
- Vats A., Tolley N. S., Polak J. M., Buttery L. D. K., 2002. Stem cells: sources and applications. *Clinical otolaryngology and allied sciences*, 27(4): 227–32.
- Vishwakarma S. K., Bardia A., Lakkireddy C., Paspala S. A. B., Khan A. A., 2018. Bioengineering Human Neurological Constructs Using Decellularized Meningeal Scaffolds for Application in Spinal Cord Injury. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 6(November): 1–19.
- Wang H. Y., Wei R. H., Zhao S. Z., 2013. Evaluation of corneal cell growth on tissue engineering materials as artificial cornea scaffolds. *International Journal of Ophthalmology*, 6(6): 873–878.
- Woodruff M. A., Lange C., Reichert J., Berner A., Chen F., Fratzl P., Schantz J.-T., Hutmacher D. W., 2012. Bone tissue engineering: from bench to bedside. *Materials Today*, 15(10): 430–435.
- Wu G., Bazer fuller W., Burghardt R. C., Johnson G. A., Kim S. W., Knabe D. A., Li P., Li X., McKnight J. R., Satterfield M. C., Spencer T. E., 2011. Proline and hydroxyproline metabolism: implications for animal and human nutrition. *Amino Acids*, 40(4): 1053–1063.
- Zech N. H., Preisegger K.-H., Hollands P., 2011. Stem cell therapeutics—reality versus hype and hope. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 28(4): 287–290.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı: Eren ÖZÜDOĞRU

Doğum Yeri: ÇANAKKALE

Doğum Tarihi: 8.05.1992

EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi: Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi

Biyomühendislik Bölümü

Yüksek Lisans Öğrenimi: Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik ve Malzeme Mühendisliği Anabilim Dalı

Bildiği Yabancı Diller: İngilizce

BİLİMSEL FAALİYETLERİ

a) Yayınlar -SCI -Diğer

b) Bildiriler -Uluslararası -Ulusal:

Özüdoğru E., Karaca B., Uzun M., Arslan Y.E., "Isolation And Culture Of Neural Stem/Progenitor Cells From Rat Subventricular Zone For Use In Neural Tissue Engineering", II. International Joint Science Congress of Materials and Polymers, Durres, ARNAVUTLUK, 9-12 Kasım 2018, pp.71-73

Özüdoğru E., Arslan Y.E., "Decellularization of Bovine Spinal Meninges and Evaluating Their Efficacy as a Regenerative Biomaterial", II. International Joint Science Congress of Materials and Polymers, Durres, ARNAVUTLUK, 9-12 Kasım 2018, pp.114-114

c) Katıldığı Projeler

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri. Sinir Doku Mühendisliğinde Kullanmak Amacıyla Nöral Progenitör-Kök Hücrelerin Sıçan Beyninin Subventriküler Bölgesinden İzolasyonu ve Kültürü. Proje kodu: FBA-2018-2593. Çalışma süresi: 2018-2019, araştırmacı.

İLETİŞİM

E-posta Adresi: erenozudogru@gmail.com