



T.C.

ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ



**SİNİR DOKU MÜHENDİSLİĞİ İÇİN HÜCRELERİNDEN
ARINDIRILMIŞ SIĞIR OMURİLİĞİNİN İNSAN ADİPOZ
MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERLE ETKİLEŞİMLERİNİN
İNCELENMESİ**

Burcu EFE

Biyomühendislik ve Malzeme Mühendisliği Anabilim Dalı

ÇANAKKALE

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

**SİNİR DOKU MÜHENDİSLİĞİ İÇİN HÜCRELERİNDEN
ARINDIRILMIŞ SIĞIR OMURİLİĞİNİN İNSAN ADİPOZ
MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERLE ETKİLEŞİMLERİNİN
İNCELENMESİ**

Burcu EFE

Biyomühendislik ve Malzeme Mühendisliği Anabilim Dalı

Tezin Sunulduğu Tarih: 05/01/2018

Tez Danışmanı:

Yrd. Doç. Dr. Yavuz Emre ARSLAN

ÇANAKKALE

Burcu EFE tarafından Yrd. Doç. Dr. Yavuz Emre ARSLAN yönetiminde hazırlanan ve **05/01/2018** tarihinde aşağıdaki jüri karşısında sunulan “**Sinir Doku Mühendisliği İçin Hücrelerinden Arındırılmış Sığır Omuriliğinin İnsan Adipoz Mezenkimal Kök Hücrelerle Etkileşimlerinin İncelenmesi**” başlıklı çalışma, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Biyomühendislik ve Malzeme Mühendisliği Anabilim Dalı**’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak oybirliği ile kabul edilmiştir.

JÜRİ

Yrd. Doç. Dr. Yavuz Emre ARSLAN

Başkan

Prof. Dr. Emel EMREGÜL

Üye

Doç. Dr. Uğur CENGİZ

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.

Burcu EFE

TEŞEKKÜR

Bu tezin gerçekleştirilmesinde, çalışmam boyunca benden yardımlarını esirgemeyen, bilgi ve tecrübesiyle bana ışık tutan saygı değer danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Yavuz Emre ARSLAN 'a

Deneysel çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen çalışma arkadaşlarım, Tuğba SEZGİN ARSLAN, Yusuf Furkan GALATA, Evren ERTEN, Büke DEMİR, Ekin ŞİMŞEK, Eren ÖZÜDOĞRU, Burak KARACA ve Aykut YILDIZ'a

Materyal temininde bize destek olan Veteriner Hekim Kerim DAŞKAN, Veteriner Hekim Deniz ASLANBOĞA ve Mücahit ESEN'e

Fizikokimyasal karakterizasyon ve mikromekanik testlerde destek aldığım değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Burak DERKUŞ'a

Tezin değerlendirmesi ve düzenlenmesi aşamalarında yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Emel EMREGÜL ve Doç. Dr. Uğur CENGİZ'e

Son olarak desteklerini hiç esirgemeyen hayatımın her aşamasında yanımda olan sevgilerini hep hissettiğim kardeşim Burak EFE, annem Nurhan EFE ve babam Mustafa EFE'ye en derin duygularıyla teşekkürlerimi sunarım.

Burcu EFE

Çanakkale, Ocak 2018

SİMGELER VE KISALTMALAR

HDM	Hücre dışı matriks
FTIR	Fourier dönüşümlü kızıl ötesi
TGA	Termal gravimetrik analiz
g	Gram
%	Yüzde oranı
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolyum bromür
SDS-PAGE	Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi
MKH	Mezankimal kök hücre
NHS	N-hidroksi süksinimit
EDC	N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilkarbodiimit
EKH	Embriyonik kök hücre
MES	2- morfolinoetansülfonik asit
PBS	Sodyum klorür içeren fosfat tamponu
PSS	Periferik sinir sistemi
PLA	Poli(laktik asit)
PGA	Poliglikolik asit
PLGA	Poli(D,L-laktik-ko-glikolik asit)
GAG	Glikozaminoglikan
SDS	Sodyum dodesil sülfat
BSA	Sığır serum albumin
SKY	Spinal kord yaralanmaları
EDTA	Etilendiamin tetra asetik asit
iAMKH	İnsan adipoz kaynaklı mezankimal kök hücre
TBE	Tris-Borik asit EDTA
TNBF	Tri(N-Butil) Fosfat
Trizma HCl	Trizma hidroklorür
MSS	Merkezi sinir sistemi
µN	Mikronewton
HADTM	Hücrelerinden arındırılmış doku temelli matriks
HAM	Hücre adezyon molekülleri
3D	Üç boyutlu

GFAP	Glial fibriler asidik protein
DMEM	Dulbecco tarafından modifiye edilen minimum esansiyel besiyeri
mg	Miligram
μ g	Mikrogram
μ L	Mikrolitre
ng	Nanogram
mL	Mililitre
Tris-HCl	Tris-hidroklorür
mM	Milimolar
APS	Amonyum per sülfat
rpm	Dakikadaki devir sayısı
nm	Nanometre

ÖZET

SİNİR DOKU MÜHENDİSLİĞİ İÇİN HÜCRELERİNDEN ARINDIRILMIŞ SIĞIR OMURİLİĞİNİN İNSAN ADİPOZ MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERLE ETKİLEŞİMLERİNİN İNCELENMESİ

Burcu EFE

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyomühendislik ve Malzeme Mühendisliği Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Yavuz Emre ARSLAN

05/01/2018, 109

Bu çalışmada, Balıkesir’de sağlıklı hayvanların kesildiği yerel bir kesimhaneden sığır spinal kordu alınmıştır. Spinal kord kaynaklı iskeleler, sinir doku mühendisliği için en uygun yöntemle deselülerize (hücrelerinden arındırma) edilmiştir. Spinal kord temelli iskeleler Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) Deoksiribonükleaz (DNaz) - Ribonükleaz (RNaz), etanol ve perasetik asit gibi kimyasal ajanlar kullanılarak deselülerize edilmiştir. Hücrelerinden arındırılmış iskeleler; DNA içerik analizi, glikozaminoglikan (GAG) testi, hidroksiprolin analizi, agaroz jel elektroforezi ve Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) analizleri ile karakterize edilmiştir. Satın alınan insan adipoz kaynaklı mezenkimal kök hücreler (iAMKH’ler) deselülerize iskele üzerine ekilmiştir. Deselülerize iskele üzerinde iAMKH’lerin hücre canlılığı 3., 7. ve 10. günler için 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl) -2,5-difenil tetrazolyum bromür (MTT) testi kullanılarak değerlendirilmiştir. MTT testi sonuçlarına göre deselülerize iskelelerin hücre canlılığı üzerinde herhangi bir sitotoksik etkisi görülmemiştir. Ham doku, deselülerize iskele ve hücreli iskele hakkında niteliksel ve niceliksel bilgi elde etmek için, Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM), Enerji Dağılımlı X-Işını Spektroskopisi (EDX) ve histolojik analizler yapılmıştır. Analiz sonuçları, hücrelerin deselülerize iskele üzerinde kümelenmeye doğru gittiğini göstermiştir. Bunun yanı sıra, iskele üzerinde hücre yoğunluğu, hücre-hücre etkileşimleri ve hücre bağlantılarının olduğu SEM ve histolojik analizler ile kanıtlanmıştır. Sonuç olarak, hücrelerinden arındırılmış spinal kord temelli iskelelerin sinir doku mühendisliği uygulamalarında kullanım potansiyelinin olabileceği düşünülmektedir.

Anahtar sözcükler: Biyoiskele, Deselülerizasyon, Hücre Dışı Matriks, İnsan Adipoz Kaynaklı Mezankimal Kök Hücre, Sinir Dokusu, Sinir Doku Mühendisliği.



ABSTRACT

INVESTIGATING THE INTERACTIONS OF HUMAN ADIPOSE MESENCHYMAL STEM CELLS WITH DECELLULARIZED BOVINE SPINAL CORD FOR NEURAL TISSUE ENGINEERING

Burcu EFE

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

05/01/2018, 109

In this study, bovine spinal cord was obtained from slaughterhouse located in Balıkesir, Turkey. Spinal cord derived scaffolds were decellularized with the most convenient optimized method for nerve tissue engineering. Spinal cord-based scaffolds have been decellularized using chemical agents such as Sodium Dodecyl Sulfate (SDS), Deoxyribonuclease (DNase) - Ribonuclease (RNase), ethanol and peracetic acid. The decellularized scaffolds were characterized by using DNA content analysis, glycosaminoglycan (GAG) assay, hydroxyproline assay, agarose gel electrophoresis and sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) analysis. Purchased human adipose tissues derived-mesenchymal stem cells (hAMSCs) were seeded on decellularized scaffold. Cell viability of hAMSCs on decellularized scaffolds were evaluated for 3rd, 7th and 10th days by using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) test. According to the results obtained with MTT assay, there was not any cytotoxic effect of decellularized scaffolds. Scanning Electron Microscopy (SEM), Energy-Dispersive X-Ray Spectroscopy (EDX) and histological analyses were performed in order to obtain qualitative and quantitative information about native tissue, decellularized scaffold and recellularized scaffolds. The results showed that cells on decellularized scaffolds depicted a clustering behaviour. In addition, it was proved by SEM and histological analyses that they also had cellular density, cell to cell interaction and cell attachment. Consequently, it has been considered that decellularized spinal cord-based scaffolds may have significant potential for neural tissue engineering applications.

Keywords: Bioscaffolds, Decellularization, Extracellular Matrix, Human Adipose Derived Mesenchymal Stem Cell, Nerve Tissue, Neural Tissue Engineering.



İÇİNDEKİLER

Sayfa No

TEZ SINAVI SONUÇ FORMU	iii
İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR	v
ÖZET	vii
ABSTRACT.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xv
BÖLÜM 1	
GİRİŞ	16
1.1. Doku mühendisliği.....	17
1.2. Kök Hücreler.....	19
1.3. Biyomalzemeler	24
1.3.1. Sentetik Biyomalzemeler.....	25
1.3.2. Doğal Biyomalzemeler.....	26
1.4. Hücrelerinden Arındırılmış Doku Temelli Biyoiskeleler	27
1.5. Sinir Sistemi.....	30
1.5.1. Sinir Sistemi ve Organizasyonu	30
1.5.2. Sinir Sistemi ve Hücresel İçerikleri.....	32
1.5.3. Spinal Kord ve Periferik Sinir Sistemi Anatomisi	33
1.5.4. Sinir Sistemi Yaralanmaları ve Rejenerasyon.....	36
1.5.5. Sinir Doku Mühendisliği	40
1.5.6. Sinir Sistemi Hastalıklarında Gen Terapisi	44
BÖLÜM 2	
ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	47
BÖLÜM 3	
MATERYAL VE YÖNTEM	50
3.1. Materyal	50
3.1.1. DeneYlerde Kullanılan Materyaller ve Cihazlar.....	50
3.2. Yöntem.....	51
3.2.1. Sığırdan Spinal Kord Çıkartılması	51
3.2.2. HDM-temelli Sığır Spinal Kord İskelelerin Hazırlanması	51
3.2.3. Spinal Kord Deselülerizasyonu	54

3.2.4. DNA İçerik Analizi	56
3.2.5. GAG Tayini	56
3.2.6. Hidrokdiprolin Tayini.....	57
3.2.7. Agaroz Jel Elektforezi.....	57
3.2.8. SDS PAGE Analizi.....	58
3.2.9. Mikro Mekanik Test.....	62
3.2.10. Biyoiskelelerin Fizikokimyasal Analizi	62
3.2.11. Hücre Kültürü Çalışmaları	62
3.2.12. Deselülerize Spinal Kord Biyoiskeleleri Üzerine Hücre Ekilmesi.....	64
3.2.13. Deselülerize İskele Üzerine Ekilen Hücrelerin Canlılık Seviyelerinin Belirlenmesi.....	64
3.2.14. Taramalı Elektron Mikroskop ve EDX Analizi.....	65
3.2.15. Histokimyasal ve İmmünohistokimyasal Karakterizasyon	65
3.2.16. İstatiksel Analiz	67
BÖLÜM 4	
ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	68
4.1. HDM Temelli Sığır Spinal Kord İskelelerin Hazırlanması.....	68
4.2. DNA İçerik Analizi	68
4.3. Agaroz Jel Elektforezi	71
4.4. GAG İçerik Analizi	73
4.5. Hidroksiprolin Analizi	74
4.6. SDS PAGE Analizi	75
4.7. Mikro Mekanik Test.....	77
4.8. Biyoiskelelerin Fizikokimyasal Karakterizasyonu	79
4.9. Hücre Kültürü Çalışmaları	82
4.10. Taramalı Elektron Mikroskop Analizi	88
4.11. Histokimyasal ve İmmünohistokimyasal Karakterizasyon	94
BÖLÜM 5	
SONUÇ VE ÖNERİLER.....	99
KAYNAKLAR	102
ÖZGEÇMİŞ	I

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1.1. Rejeneratif tıp ve doku mühendisliği (Place ve ark., 2009)	19
Şekil 1.2. Kök hücrelerin simetrik ve asimetric bölünmesi (Blanpain ve Fuchs, 2009)	20
Şekil 1.3. Kök hücre tipleri (http://www.institut-biotherapies.fr/en/biotherapies/cell-therapy/stem-cells/ 'den uyarlanmıştır).....	21
Şekil 1.4. Mezenkimal kök hücre kaynakları (Zeidan-Chulia ve Nodab, 2009)	23
Şekil 1.5. Doku mühendisliğinde kullanılan biyomalzemeler (Alaribe ve ark., 2016)	27
Şekil 1.6. İnsan beyni ve spinal kord	31
(http://higheredbcs.wiley.com/legacy/college/tortora/0470565101/hearthis_ill/pa_p13e_ch15_illustr_audio_mp3_am/simulations/hear/sympathetic.html 'den uyarlanmıştır.)	31
Şekil 1.7. Nöronun yapısı (https://www.khanacademy.org/science/biology/human-biology/neuron-nervous-system/a/overview-of-neuron-structure-and-function 'dan uyarlanmıştır).....	32
Şekil 1.8. Merkezi ve periferik sinir sistemi hücreleri (http://philschatz.com/biology-book/contents/m44747.html 'den uyarlanmıştır)	33
Şekil 1.9. Spinal kord anatomisi (https://www.nature.com/articles/nrdp201718 'den uyarlanmıştır)	34
Şekil 1.10. Sinir organizasyonunun şematik gösterimi (https://pocketdentistry.com/25-traumatic-injuries-of-the-trigeminal-nerve/ uyarlanmıştır).....	35
Şekil 1.11. Spinal kord histolojik kesiti Luxol fast blue boyaması (http://www.lab.anhb.uwa.edu.au/mb140/corepages/nervous/nervous.htm uyarlanmıştır)	36
Şekil 1.12. Haziran 2014 yılına ait küresel spinal kord yaralanma insidansı (Singh ve ark., 2014).....	37
Şekil 1.13. Sinir doku mühendisliği için geliştirilen ideal sinir kondüiti (Daly ve ark., 2011).....	40
Şekil 1.14. Hasarlı bölgedeki rejeneratif sinir konditi ve onarım aşamaları (Daly ve ark., 2011).....	41
Şekil 1.15. Hidrojellerin periferik sinir sistemi rejenerasyonunu desteklemesi (Carballo-Molina ve Velasco, 2015)	42
Şekil 1.16. Spinal kord yaralanması sonrası (Mueller ve ark., 2005).....	43
Şekil 1.17. Merkezi sinir sistemi hastalıkları için <i>in vivo</i> ve <i>ex vivo</i> şartlarda gen terapisi (Piguet ve ark., 2017)	45
Şekil 3.1. Spinal kord iskeleleri çapraz bağlama yöntemleri.....	53
Şekil 3.2. Çapraz bağlı ve çapraz bağlı olmayan spinal kord iskeleleri	54
Şekil 3.3. Spinal kord biyoiskele, çapraz bağlama ve hücrelerinden arındırma prosesi.....	56
Şekil 3.4. SDS-PAGE analizi	60
Şekil 3.5. Mikro mekanik test analizi	62
Şekil 3.6. iAMKH'lere ait koloni oluşturan birim.....	63
Şekil 3.7. MTT reaksiyonu	64
(https://www.nature.com/articles/nprot.2008.182 'den uyarlanmıştır).....	65
Şekil 4.1. Sinir dokusu ve hücrelerinden arındırılmış sinir dokusuna ait DNA içerik analizi	69
Şekil 4.2. Agoroz jel elektroforezi.....	72
Şekil 4.3. Sinir dokusu ve hücrelerinden arındırılmış sinir dokusuna ait GAG içerik analizi	73
Şekil 4.4. Sinir dokusu ve hücrelerinden arındırılmış sinir dokusuna ait hidroksiprolin	

içerik analizi.....	74
Şekil 4.5. Spinal kord ve hücrelerinden arındırılmış spinal kord dokusuna ait SDS-PAGE analizi	77
Şekil 4.6. Spinal kord ve hücrelerinden arındırılmış ve çapraz bağlı spinal kord iskelesine ait mikro mekanik test sonucu.....	79
Şekil 4.7. Deselülerize Spinal Kord FT-IR Spektrumu	80
Şekil 4.8. Ham doku spinal kord iskelelerin TGA eğrisi.....	81
Şekil 4.9. Hücrelerinden arındırılmış spinal kord iskelelerin TGA eğrisi.....	82
Şekil 4.10. Kök hücrelerin <i>in vitro</i> çoklu-soy farklılaşma kabiliyetlerinin histolojik analizlerle belirlenmesi Adipoz kaynaklı mezenkimal kök hücreler (A), adipogenezis; oil red O ile boyaması (B, C), osteogenezis; alizarin red S ile boyaması (D, E), kondrogenezis; safranin O boyaması (F) ve alcian blue 8gx boyaması (G).	84
Şekil 4. 11. Deselülerize biyoiskeleler üzerinde iAMKH'lerin 3., 7. ve 10. günlerdeki çoğalma ve canlılık düzeyleri.....	85
Şekil 4.12. Deselülerize biyoiskeleler üzerinde iAMKH'lerin 3, 7 ve 10. günlerdeki çoğalma ve canlılık düzeylerinin makro ve mikro fotoğrafları.....	86
Şekil 4.13. Ham doku (a) ve deselülerize çapraz bağlı biyoiskele (b).....	89
Şekil 4.14. (c) EDX analizi SEM görüntüsü (d)EDX spektrumu	89
Şekil 4.15. Çapraz bağlı hücrelerinden arındırılmış biyoiskelenin gözenekliliğinin x750 büyütmede SEM ile belirlenmesi	91
Şekil 4.16. Çapraz bağlı hücrelerinden arındırılmış hücresiz biyoiskelelerin SEM görüntüsü (A) x250, (B) x750, (C) x1500 büyütme. iAMKH'lerin biyoiskele üzerinde 3.gün SEM mikrografları (D) x250, (E) x750, (F) x1500 büyütme. 7.gün iAMKH'lerin biyoiskele üzerinde SEM görüntüsü (G) x250, (H) x750, (I) x1500 büyütme. Hücreli biyoiskelelerin 10.gün SEM mikrografları (J) x250, (K) x750, (L) x1500 büyütme.....	92
Şekil 4.17. Çapraz bağlı hücrelerinden arındırılmış hücresiz biyoiskelelerin SEM görüntüsü (M) x2500, (N) x5000 büyütme. iAMKH'lerin biyoiskele üzerinde 3.gün SEM mikrografları (O) x2500, (N) x5000 büyütme.7. gün iAMKH'lerin biyoiskele üzerinde SEM görüntüsü (R) x2500, (S) x5000 büyütme. Hücreli biyoiskelelerin 10.gün SEM mikrografları (T) x2500, (U) x5000 büyütme.....	93
Şekil 4.18. Ham doku, deselülerize çapraz bağlı iskele ve hücreli iskelelerin Hematoksilen Eozin boyaması	94
Şekil 4.19. Ham doku, deselülerize çapraz bağlı iskele ve hücreli iskelelerin Toluidin Blue boyaması.....	95
Şekil 4.20. Ham doku, deselülerize çapraz bağlı iskele ve hücreli iskelelerin Nissl boyaması.....	95
Şekil 4.21. Ham doku, deselülerize çapraz bağlı iskele ve hücreli iskelelerin GFAP boyaması.....	96
Şekil 4.22. Ham doku, deselülerize çapraz bağlı iskele ve hücreli iskelelerin Nörofilament boyaması.....	97
Şekil 4.23. Ham doku, deselülerize çapraz bağlı iskele ve hücreli iskelelerin S100 boyaması.....	98

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa No
Çizelge 1.1. Deselüerizasyon yöntemleri (Gilbert ve ark.,2006)	28
Çizelge 3.1. TBE Tamponu hazırlamak için kullanılan kimyasallar	58
Çizelge 3.3. SDS-PAGE jel hazırlama prosedürü ve kullanılan çözeltiler.....	61



BÖLÜM 1

GİRİŞ

Doku mühendisliği hasarlı veya kaybedilmiş doku ve organların tedavisi için; hücre biyoloji, biyomalzemeler ve mühendislik bilimlerini birleştiren multidisipliner bir bilim dalıdır (Akbari ve ark., 2016). Doku mühendisliğinin amacı; herhangi bir yaralanma veya patolojik süreci takiben, kaybedilmiş veya hasar görmüş doku ve organların biyolojik açıdan aktif moleküllerini veya biyolojik materyallerini birleştirerek bulunduğu mikroçevrenin mekanik kuvvetlerini uyararak eksik olan organların anatomik yapısını, işlevlerini yerine koymak veya onarmaktır (Zhang ve ark., 2005).

Doku mühendisliği alanlarından biri olan sinir doku mühendisliği hasar görmüş sinir sisteminin yeniden yapılandırılması için otolog greftler kullanılırken, son dönemlerde geliştirilen terapötik stratejiler ile yeniden sinir dokusu oluşumu hedeflenmektedir. Geleneksel olarak, otolog greftler altın standart tedavi yöntemi olarak görülmekte ve sinirsel kusurları tedavi etmek için kullanılmaktadır. Ancak hastadan alınan otogreftlerin çeşitli sınırlamaları vardır. Özellikle transplantasyon sonrası meydana gelen sinirsel boyuttaki uyumsuzluklar, donör saha morbiditesi, nöroma oluşumu gibi problemlere neden olur ve sonrasında fonksiyonel iyileşme eksikliği görülmektedir. Sinir dokusu onarımı ve yenilenme stratejileri, hastanın yaşam kalitesini doğrudan etkilemektedir. Sinir rejenerasyonunda doku mühendisliğinin ilkeleri uygulanarak sinirsel tedavi yöntemleri geliştirilmektedir. Sinir doku mühendisliği esas olarak, doğal hücre dışı matrikse (HDM) benzeyen ve üç boyutlu hücre kültürünü destekleyebilen biyoiskelelerin geliştirilmesiyle, doku ve hücre davranışının düzenlenmesine dayanmaktadır. Doğal HDM, topografik, elektriksel ve kimyasal özellikleri ile ideal bir ortam sağladığından nöral hücrelerin yapışmasına ve çoğalmasına olanak vermektedir. Kadavralardan elde edilen greftler sınırlı sayıda olmaları ve immün tepkilerinden dolayı çok fazla tercih edilmemektedir. İmmün tepkiyi aşmak için hücrelerinden arındırılmış doku temelli iskeleler (HADTM) üzerine çeşitli çalışmalar yapılmaktadır. Bunun ile ilgili akson uzamasını destekleyen, biyoyumlu, immünolojik olarak inert, iletken yapıda, biyolojik olarak bozunabilir ve enfeksiyona dirençli olacak iskeleler geliştirmeye ihtiyaç vardır (Subramanian ve ark., 2009).

Organ sistemlerindeki birçok hastalık veya fiziksel kusur, özelleşmiş hücrelerin bozulmasına ve kaybına neden olmaktadır. Nörolojik hastalıklar içinde sıklıkla görülen hastalıklardan biri olan Parkinson hastalığı, beyindeki *substantia nigra* bölgesinde bulunan dopaminerjik nöronların zayıflamasına yol açarak distoni ve diskinezi meydana gelmektedir.

Menisküs yırtıkları ve omurilik hasarı gibi yaralanmalar, normal yaşamı etkileyebilecek dejenerasyona ve doku kaybına neden olmaktadır. Buna ek olarak, insüline bağımlı diabetes mellitus, multipl skleroz ve diğer otoimmün bozukluklar, normal metabolizma ve bedensel işlevleri bozarak doku kaybına yol açmaktadır. Bu sebeple hastalıklar için hücre esaslı tedavi yöntemleri kullanmak doku/organ tamiri için umut vaat etmektedir. Hücresel temelli tedaviler doku ve organların normal fonksiyonunu yeniden kazandırarak ve eski haline gelmesini sağlamaktadır. Bunun için dokuya özgü farklılaştırılmış kondrositleri, kemik iliği kök hücreleri veya sinir kök hücreleri gibi spesifik dokulardan izole edilen progenitör hücreler veya gelişmekte olan blastomerin iç hücre kütesinden türetilen embriyonik kök hücreler gibi çeşitli hücreler kullanılmaktadır (Fodor, 2003).

Bu tez çalışmasında sığır kaynaklı spinal kord, hücrelerinden etkili şekilde arındırılarak, sinir doku mühendisliği için biyobozunur deselülerize matris olarak kullanım potansiyeli değerlendirilmiştir. Bu amaçla, sığır kaynaklı spinal kord çeşitli işlemlerden geçirilerek HDM-temelli biyoiskele formuna dönüştürülmüştür. Sonrasında malzemenin dayanıklılığını arttırmak için çapraz bağlama prosedürü uygulanmıştır. Ardından deselülerizasyon adımlarına geçilmiştir. Deselülerizasyon için farklı yöntemler denenmiş ve aralarından en etkili yöntem belirlenerek hücrelerinden arındırılmış gözenekli biyoiskeleler elde edilmiştir. Elde edilen iskelelerde DNA içeriğini belirlemek için DNA içerik analizi ve agaroz jel elektroforezi yapılmıştır. Kollajenin önemli bileşenlerinden olan hidrokisprolin miktarı, hidrokisprolin kit prosedürüne göre gerçekleştirilmiştir. HDM'in yapısını oluşturan elemanlardan biri olan sülfatlanmış glikozaminoglikan miktarı spektrofotometrik olarak analiz edilmiştir. HDM proteinlerin belirlenmesi amacıyla SDS-PAGE analizi yapılmıştır. Ayrıca biyoiskeleler; SEM, Fourier Dönüşüm Kızılötesi (FTIR) ve Termogravimetrik Analiz (TGA) ile karakterize edilmiştir. Satın alınan insan adipoz kaynaklı mezankimal kök hücrelerin (iAMKH) farklılaşma kapasitelerini belirlemek amacıyla çoklu soy farklılaşma (adipojenik, osteojenik ve kondrojenik) çalışması yapılmıştır. Sonrasında kök hücreler, hücrelerinden arındırılmış iskeleler üzerine ekilerek *in vitro* ortamda hücre canlılığı MTT testi ile belirlenmiştir. Çapraz bağlı hücreli ve hücretsiz iskelelerin farklılaşma kapasiteleri histokimyasal ve immünohistokimyasal boyamalar ile karakterize edilmiştir.

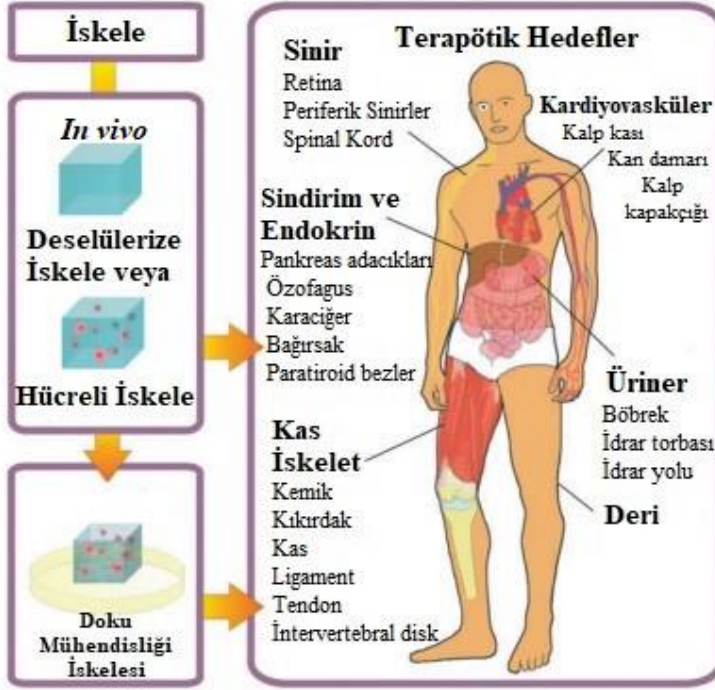
1.1. Doku mühendisliği

Son zamanlarda organ nakillerinin “altın standart tedavi” olarak görülmesine karşın organ hastalığı prevalansı çok yüksektir. Bunun yanında doku ve organ ihtiyacı donör sayısından fazladır. İnsanda hastalık, travma veya yaranma sonucunda meydana gelen

hasarların tedavi edilmesinde ilk olarak hastanın kendisinden alınan (otogreft) veya başka bir bireyden alınan dokunun (allogreft) transplantasyonu yapılır. Bu yöntemler hayat kurtarıcı bir yöntem olmasına rağmen otogreftlerin elde edilmesi pahalı, ağırlı ve anatomiksel olarak sınırlıdır. Bunun yanında hematoma ve enfeksiyondan riskinden dolayı donör saha morbiditesine neden olabilmektedir. Allogreftlerin transplantasyonunda da benzer şekilde doku reddi, enfeksiyon riski gibi sorunlar olduğundan bunlarında transplantasyonu kısıtlıdır. Bütün bu problemlerden yola çıkarak araştırmacılar, doku mühendisliği ve rejeneratif tıp alanına yönelip yeni stratejiler geliştirmeye başlamışlardır (Badylak, 2004).

Doku mühendisliği hasarlı veya kaybedilmiş doku ve organların tedavisi için; hücresele biyoloji, biyomalzemeler ve mühendislik bilimlerini birleştiren multidisipliner bir bilim dalıdır (Akbari ve ark., 2016). Doku mühendisliği; hücrelerinden arındırılmış matriksler ve hücre / matriks yapıları olarak iki grupta incelenebilir. Doku ve organların rejenerasyonu için HDM bileşimine sahip biyolojik iskeleler klinik çalışmalarda yoğun bir şekilde kullanılmaktadır. HDM, içinde bulundurduğu biyoaktif moleküller sayesinde dokuda bulunan hücrelerin bir arada olmasını sağlar. Ayrıca koruyucu ve destekleyici özelliklerinin yanı sıra hücresele davranışların düzenlenmesinde de önemli bir rol oynar. HDM içerisinde bulundurduğu kollajen, elastin, laminin, fibronektin ve glikoaminoglikanlar vs. sayesinde birçok uygulamada kullanılmış ve *in vivo* şartlarda doku-organ morfogenezi ve yara iyileşmesinde önemli olduğu görülmüştür (Arslan ve ark., 2015).

Rejeneratif tıp ve doku mühendisliği; dokuya uygun spesifik hücreler ve biyomateryaller ile çeşitli yaklaşımlar oluşturarak hasarlı olan doku ve organları yeniden yapılandırmaktadır. Doku mühendisliğinin altında yatan kavram, hücrelerin barınması, çoğalması, dokuların yenilenmesi ve dokunun üç boyutlu yönlendirilmesini sağlamak üzere gözenekli bir HDM yapısının oluşturulmasıdır. Bununla beraber hastadan izole edilen hücrelerin, hücre kültürü ortamında çoğaltılıp, hücreler için taşıyıcı görevine sahip olan bir iskele üzerine ekilmesi ve sonrasında ortaya çıkan doku mühendisliği yapısı yedek doku olarak işlev görmektedir (Yang ve ark., 2001). Bu şekilde oluşturulan iskele hastaya transplante edilmektedir (Şekil 1.1).



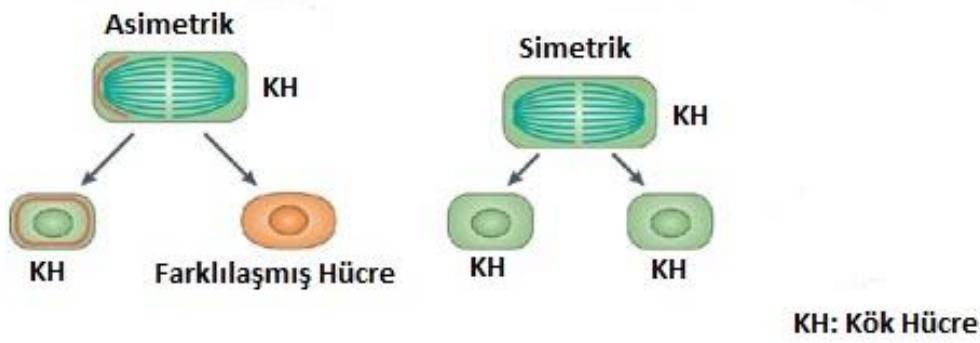
Şekil 1.1. Rejeneratif tıp ve doku mühendisliği (Place ve ark., 2009)

Doku mühendisliği stratejilerinde başarı sağlamada, hücrelerin iskele üzerinde tutunmasının önemli bir yeri olmaktadır. Bunun için hücre adezyon molekülleri (HAM) belirgin bir rol oynamaktadır. HAM, hücre-HDM yapılarının birbiriyle olan bağlantısını artırmak için hücre yüzeyinde reseptör gibi davranan glikoproteinlerdir (Subramanian ve ark., 2009; Mallick ve ark., 2013).

1.2. Kök Hücreler

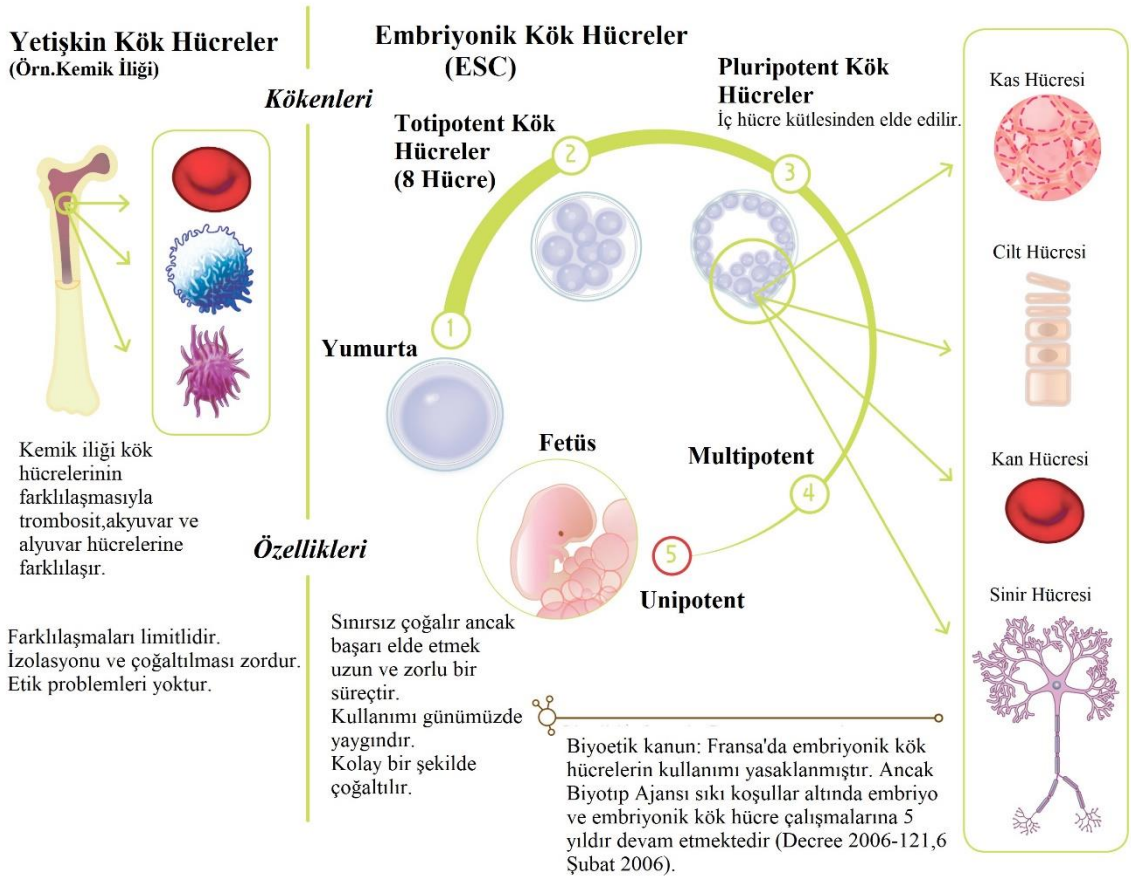
Kök hücreler kendilerini yenileyebilme özelliğinde olan, aldıkları sinyaller sayesinde farklı hücre tiplerine dönüşen çok potansiyelli hücrelerdir. Vücudumuzda bulunan kas, cilt, karaciğer gibi hücreler bölündüklerinde yine kendileri gibi bir hücre oluşturmaktadırlar. Kök hücrelerde ise bu hücrelerden farklı olarak belirlenmiş bir fonksiyonu yoktur. Aldıkları sinyallere göre farklı tip hücrelere dönüşebilirler (Şahin ve ark., 2005).

Kök hücreler simetrik bölünme yaparak kendini yenileyebilme özelliğine sahiptir. Bununla beraber kök hücreler asimetric bölünme yaparak başka hücre tiplerine de farklılaşabilmektedir. Asimetric bölünen her kök hücreden biri sabit kalıp kendi kopyasını oluştururken diğeri belirli bir hücre tipine farklılaşmaktadır (Şekil 1.2) (Blanpain ve Fuchs, 2009).



Şekil 1.2. Kök hücrelerin simetrik ve asimetrik bölünmesi (Blanpain ve Fuchs, 2009)

Kök hücreler konak yerine göre ve alındığı kaynağa göre iki farklı grupta sınıflandırılmaktadır. Kök hücreler konak yerine göre fetüs veya doğum sonrası bireylerden elde edilmektedir. Bunlarda kendi alt dallarında embriyonik kök hücre (EKH) ve yetişkin kök hücre olmak üzere ikiye ayrılır. Kök hücreler gelişme potansiyeline göre totipotent, pluripotent, multipotent ve unipotent olmak üzere dört başlık altında incelenebilirler (Can, 2008). EKH erken embriyo dönemde elde edilen (1-3 gün içinde) totipotent kök hücre özelliğindedir. Totipotent kök hücreler, sınırsız bölünme kapasitesine ve tek bir organizmayı oluşturabilecek güce sahiptirler. Pluripotent kök hücreler ise embriyonun blastokist evresinde (4-14 gün içinde) iç hücre kütleleri adı verilen bölgeden elde edilen ve üç germ tabakasına (endoderm, ektoderm, mezoderm) dönüşebilen kök hücrelerdir (Şekil 1.3). Vücutta 200 ve üzeri hücre tipine dönüşebilmektedirler. Ancak bu kök hücreler tek bir organizmayı meydana getirebilecek güce sahip değildirler. Multipotent kök hücreler ise belirli hücre soylarını meydana getirebilme kapasitesine sahip olup birçok hücre tipine dönüşebilme yeteneğinde olan hücrelerdir. Unipotent kök hücreler ise tek hücre tipine dönüşebilen hücrelerdir (Bongso ve Richards, 2004; Sobhani ve ark., 2017). EKH içerisinde bulunan yüksek telomeraz aktiviteleri ile kültür ortamında uzun vadeli sınırsız çoğalma potansiyeli sergilemektedir. Ayrıca *in vivo* ortama transfer edildiğinde üçlü germ tabakasına farklılaşabilmektedir. EKH çoklu doku tiplerine farklılaşma özellikleri olduğundan doku nakillerinde sınırsız kaynak sağlayabilmektedir. Fakat EKH transplantasyonun çeşitli hastalıkların tedavisi için kullanılması (örneğin, Parkinson hastalığı, diyabet ve kalp yetmezliği) birçok engel teşkil etmektedir. EKH'lerin içerikleri ve genetik alt yapısı tam olarak tanımlanamadığı için transplantasyon sonrasında teratokarsinom oluşturabilmektedirler. Bunun yanında allojenik transplantasyon sonrası olabilecek immün reddi gibi sorunlar ve etik problemlerin hala tartışılır olması EKH'lerin uygulama alanlarını sınırlandırılmıştır (Odorico ve ark., 2001; King ve Perrin, 2014).

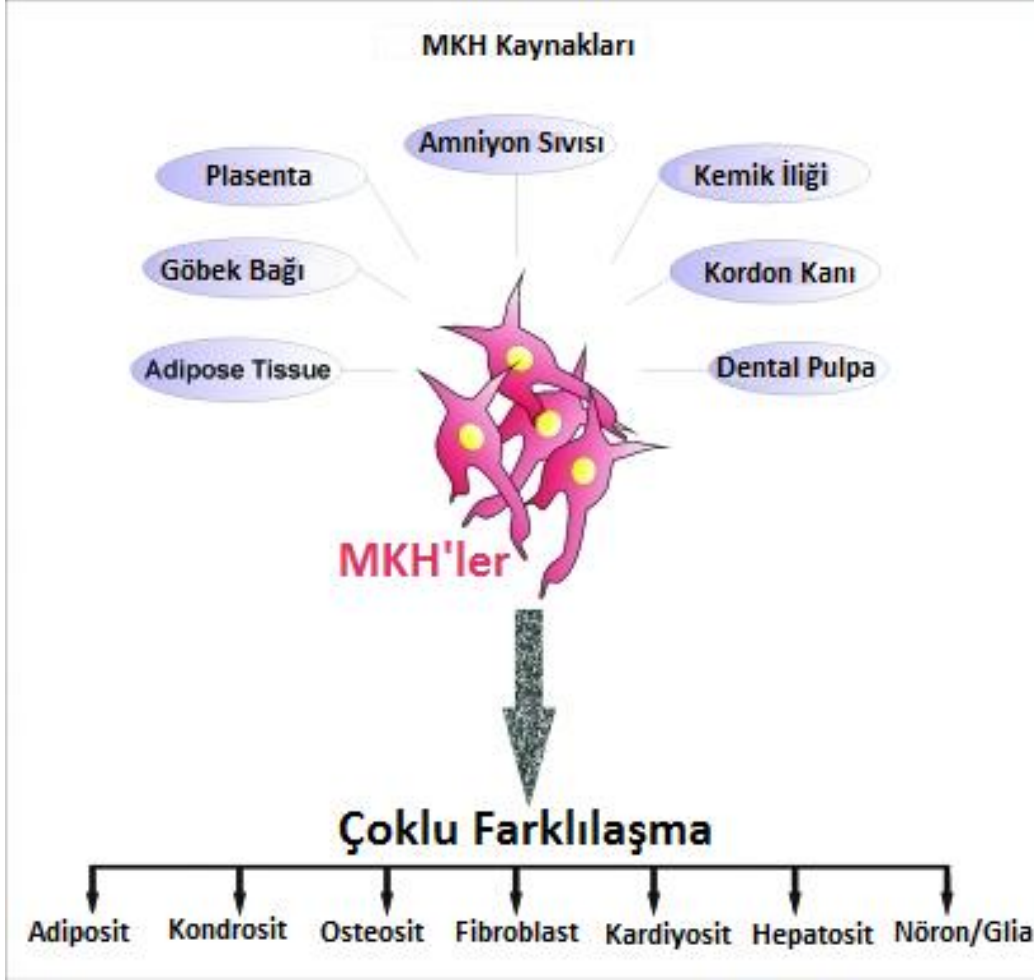


Şekil 1.3. Kök hücre tipleri (<http://www.institut-biotherapies.fr/en/biotherapies/cell-therapy/stem-cells/>'den uyarlanmıştır)

Erişkin kök hücreler, yetişkin bir organizmanın birçok dokusunda var olan, kendini yenileyebilme özelliğine sahip, farklılaşmamış hücrelerden oluşan ve çeşitli özel hücre tiplerine (kan, kas ve sinir hücreleri gibi) dönüşebilme becerisine sahip hücrelerdir. İnsan vücudunda dokuya özgü erişkin kök hücreler, çok fazla sayıda bulunmaktadır ve bunlar yoğun bir şekilde kök hücre popülasyonu içermektedir. Kemik iliği en az iki tür kök hücre içeriğine sahiptir. Hematopoetik kök hücre popülasyonu vücudun her türden kan hücresini oluşturmaktadır. İkinci sırada ise kemik iliği stromal hücreleri adı verilen bir popülasyon gelmektedir. Kemik iliği stromal hücreleri (mezenkimal kök hücreler), kemik hücreleri (osteositler), kıkırdak hücreleri (kondrositler), yağ hücreleri (adipositler) ve tendonlar gibi bağ dokusunu meydana getiren hücre türlerini oluşturmaktadır. Yetişkin kök hücreler farklılaşma veya plastisite olarak bilinen özellikleri ile canlı bir organizmada, bulunduğu

dokuyu korumak onarmak ve dokuya özel hücre tiplerini oluşturmada önemli bir rolü bulunmaktadır (Hosseinkhani ve ark., 2014).

MKH'ler, mezodermal mezenkimden türetilen stromal hücreler olup kendini yenileyebilme, kemik, kırıkta yağ gibi çoklu soy farklılaşması yeteneğine sahip hücrelerdir (Liu ve ark., 2013; Rankin, 2012). MKH'ler, kemik iliği, göbek kordonu dokusu, göbek kordonu kanı, sinoviyal membran, periferik kan ve yağ dokusu dâhil olmak üzere çeşitli dokulardan elde edilebilir (Şekil 1.4). MKH olarak sınıflandırılacak hücreler için mezenkimal yüzey işaretleyicileri CD105, CD90 ve CD73 pozitif işaretleyici; CD45, CD14 ve CD34 gibi hematopoietik kök hücrelere ait hücre yüzey antijenlerine ise negatif olmaktadır. Bu işaretleyicilere ek olarak MKH'ler genellikle CD13, CD29, CD44, CD166 pozitif işaretleyici olup trombosit türevli büyüme faktörü reseptörünü de ifade etmektedirler. MKH'lerin terapötik uygulamaları, üçlü soy farklılaşma kapasiteleri, doku onarımı ve doku mühendisliği uygulamalarında önemli hale gelmektedir. Özellikle son zamanlarda yapılan tedavi yöntemleri sayesinde iyileşmeyen kırıklarda, artrit veya kemik tedavisinde kırıkta üretmeye odaklı çalışmalar yapılmaktadır. Bu uygulamalara ilaveten, MKH'lerin hem *in vitro* hem de *in vivo* ortamda güçlü antiinflamatuvar ve immünomodülatör etkinlikler sergilediği keşfedilmiştir. *In vitro* MKH'lerin, T ve B lenfositler ve doğal öldürücü hücrelerin çoğalmasını inhibe ettiği ayrıca monositlerin dendritik hücrelere farklılaşmasını önleyerek antijen sunma işlevini bozduğu görülmüştür. Son zamanlarda yapılan çalışmalar, MKH'lerin, vasküler endotelial büyüme faktörü, anjiyopoyetin I, keratinosit büyüme faktörü ve hepatosit büyüme faktörü dahil olmak üzere sitokinler ve büyüme faktörleri üretimiyle doku onarımını destekleyebileceğine dair kanıt sağlanmıştır (Rankin, 2012). MKH kaynağı olarak, adipoz kaynaklı mezenkimal kök hücreler (AMKH) kullanılmaktadır. AMKH'ler otolog hücre transplantasyonu için dokularda bolca bulunan, kolay erişilebilir olması nedeniyle son zamanlarda çok fazla tercih edilmektedir. AMKH'ler ve kemik iliğinden izole edilen mezenkimal kök hücreler karşılaştırmalı analizi sonucunda her iki popülasyonun bağışıklık fenotipi, izolasyon başarı oranı, koloni frekansı ve farklılaşma potansiyeli ortak bir morfoloji sergilemektedir (Marconi ve ark., 2012).



Şekil 1.4. Mezenkimal kök hücre kaynakları (Zeidan-Chulia ve Nodab, 2009)

Rejeneratif tıp ve doku mühendisliğinin çeşitli uygulamalarında *in vivo* ve *in vitro* şartlarda kullanılan birçok hücre tipi vardır. Kök hücreleri kullanan rejeneratif tıp, doku kusurlarının tedavisinde hızla gelişen bir alandır. Bu alan belirli bir dokunun yapısını, fonksiyonunu veya kompozisyonunu taklit eden düzenleyici bir biyosistem geliştirmek için uygun bir hücre tipinin ve biyobozunur iskele matrisini taşıyıcı özel moleküllerle akıllıca tasarlamasına dayanır (Mallick ve ark., 2013). Hücre tabanlı doku mühendisliği iskeleleri doku rejenerasyonunu teşvik etmede önemli bir rolü vardır. Doku mühendisliğine yapılan bu yaklaşımlar sayesinde klinik öncesi kalp kapakçıkları ve idrar torbası yapımı, *ex vivo* şartlarda burun kıkırdağı üretimi gibi çalışmalar potansiyel bir kullanım alanı meydana getirmiş olup gün geçtikçe bu liste artmaktadır (Bianco ve Robey, 2001).

Doku mühendisliği ve rejeneratif tıp alanında kullanılan kök hücreler ve biyobozunur malzemeler, üç boyutlu (3D) *in vivo* modellerin tasarımında, kök hücre kaynaklı doku oluşumunu indüklemeye önemli olmaktadır (Hosseinkhani ve ark., 2014). Kök hücre çalışmaları; gün geçtikçe ilerleyen bir alan olup, hücre esaslı çalışmalarda ve

doku mühendisliği alanında yeni alternatif tedavi seçeneği sunmaktadır (Eberli ve Atala, 2006).

1.3. Biyomalzemeler

İnsan vücudundaki doku ve organların fonksiyonunu yitirmesi veya hasar görmesi sonucunda doku ve organların otomatik olarak kendini yenileme kapasitesi sınırlı olmaktadır. Travma, konjenital anomaliler ve dejeneratif hastalıklar ile giderek artan bir yük ile karşı karşıya kalan doku mühendisliği ve rejeneratif tıp şu anda tedavi edilmesi zor olan çeşitli hastalıkların tedavisi için yeni biyolojik tedavi yöntemleri geliştirmeye çalışmaktadır. Bu tür araştırmalar ile hastaya özgü tedavi yöntemleriyle zarar görmüş, kötüleşmiş veya kaybedilmiş doku ve organlara alternatif olarak biyolojik dokular geliştirilmiş ve böylece rejenerasyon süresi de hızlanmaya başlamıştır. Bu terapötik stratejiler sayesinde, hasarlı olan kısımlar fizyolojik şartlar altında zamanla normal doku onarımını ve rejenerasyon mekanizmalarını taklit ederek yeni bir tedavi yöntemi başlatmıştır. Doku mühendisliğinin başarısında önemli bir role sahip olan biyomalzemeler; doku veya organlardaki zayıf iyileşme kapasitesini telafi etmek amacıyla, iyileşme basamağında meydana gelen biyolojik süreçlerin potansiyel bir terapötik seçeneği olarak kullanılmaktadır. Bu amaçla biyomalzemeler, hasar gören dokuların rejenerasyonunu teşvik etmek veya bozulmuş / bozulan organları değiştirmek için bir iskele / destek malzemesi olmakla beraber büyüme uyarıcı biyoaktif faktörlerin ve hedef hücrelerin uyumlu bir kombinasyonunu kullanmaktadır. Biyomalzemeler; biyomedikal ve doku mühendisliği alanlarının geliştirilmesinde doku ve organlara ait rejenerasyon potansiyelinin devamı için normal vücut fonksiyonlarının bozulmuş olan bir bölümünü tamir etmek veya yeniden kurmayı amaçlayan bir alan olarak öne çıkmaktadır. Rejeneratif biyomalzemelerdeki ilerlemeler, yeni doku oluşumundaki rolleri sayesinde, hızla büyüyen rejeneratif tıp alanında da potansiyel olarak yeni bir teknik oluşturmaktadır (Chen ve Liu, 2016). Doku mühendisliği, izole edilmiş hücrelerden yeni doğal dokular üretmek için üç boyutlu Hücre Dışı Matriks (HDM) yapılarını kullanmaktadır. Bu sayede tasarlanan HDM, dokularda doğal olarak bulunan HDM'in işlevlerini taklit etmektedir (Rosso ve ark., 2005). HDM, doku ve organlarda çeşitli yapısal ve işlevsel rollere sahip olan hücrelerden oluşan bir yapıdır. Hücre popülasyonu ile dinamik bir denge halinde olan HDM, hücrelerin veya organının değişen çevresel koşullara ve işlevsel taleplerine cevap vermektedir. Dokuları ve organları yeniden oluşturmak için alınan yaklaşımlar tipik olarak hücreler, iskeleler ve biyoaktif moleküllerin bir kombinasyonunu içermektedir (Badylak, 2005). Son yirmi yılda, araştırmacılar yaralanma

veya hastalıklardan sonra doğal dokuların yenilenmesini kolaylaştırmak ve işlevsel yapılar oluşturmak için hücreleri, biyomalzemeleri, büyüme faktörlerini ve diğer destekleyici bileşenleri kullanmaktadır. Özellikle umut verici bir doku mühendisliği yaklaşımı, hücre farklılaşmasını, göçünü ve çoğalmasını kolaylaştırarak; hedef dokuların rejenerasyonunu desteklemek ve yönlendirmek için biyomalzemeler ve hücrelerden oluşan 3D yapılar olan "doku iskeleleri" nin geliştirilmesini içermektedir. Doku iskeleleri, birbirine bağlı belli bir mimariye sahip gözenekli yapılardır ve hücrenin mikroçevresini taklit ederek hücrelerin metabolik faaliyetlerinin yürütülmesinde kolaylık sağlamaktadır. Doku iskelelerinin vücut içi transplantasyonuna izin vermesi için yüksek yoğunluklarda bulunan hücrelerin büyümesinde, hücrelerin beslenmesi ve atık ürünlerinin uzaklaştırılmasında, çok sayıdaki kan damarlarının infiltrasyonunu ve oluşumunu kolaylaştırılmasında çok iyi gözenekliliğe sahip olması gerekmektedir. Ayrıca bu yapı hem *in vitro* hem de *in vivo*'da istikrarını korumak için uygun mekanik destek sağlamaktadır. İdeal doku iskeleleri doku rejenerasyonu için belli bir oranda biyo-parçalanabilir olmalıdır (Ning ve Chen, 2017; Zhang ve ark., 2005). İskele biyomalzemeleri, hücre adezyon moleküllerini, çok sayıda hücrel büyüme ve farklılaşma faktörlerini ve mekanik sinyalleri de içeren biyoaktif molekülleri harekete geçirerek kök hücre bölünmesini yeniden başlatıp yeni doku oluşumuna olanak sağlamaktadır. Bu sayede biyomalzemeler, hasarlı alanlarda bulunan hücrelerin mikroçevresi için doku rejenerasyonunu teşvik etmektedir. Hücrelerin barınması ve kütle transferi için uygun bir biyomalzemenin tanımlanması doku mühendisliği tasarımında önemli olmaktadır. Spesifik bir biyomalzemenin tasarlanması için çok fazla seçenek mevcuttur. Bunlar sentetik biyomalzemeler, doğal biyomalzemeler, olmakla beraber iki veya daha fazla materyalden oluşan kompozit malzemeler de kullanılmaktadır (Chen ve Liu, 2016).

1.3.1. Sentetik Biyomalzemeler

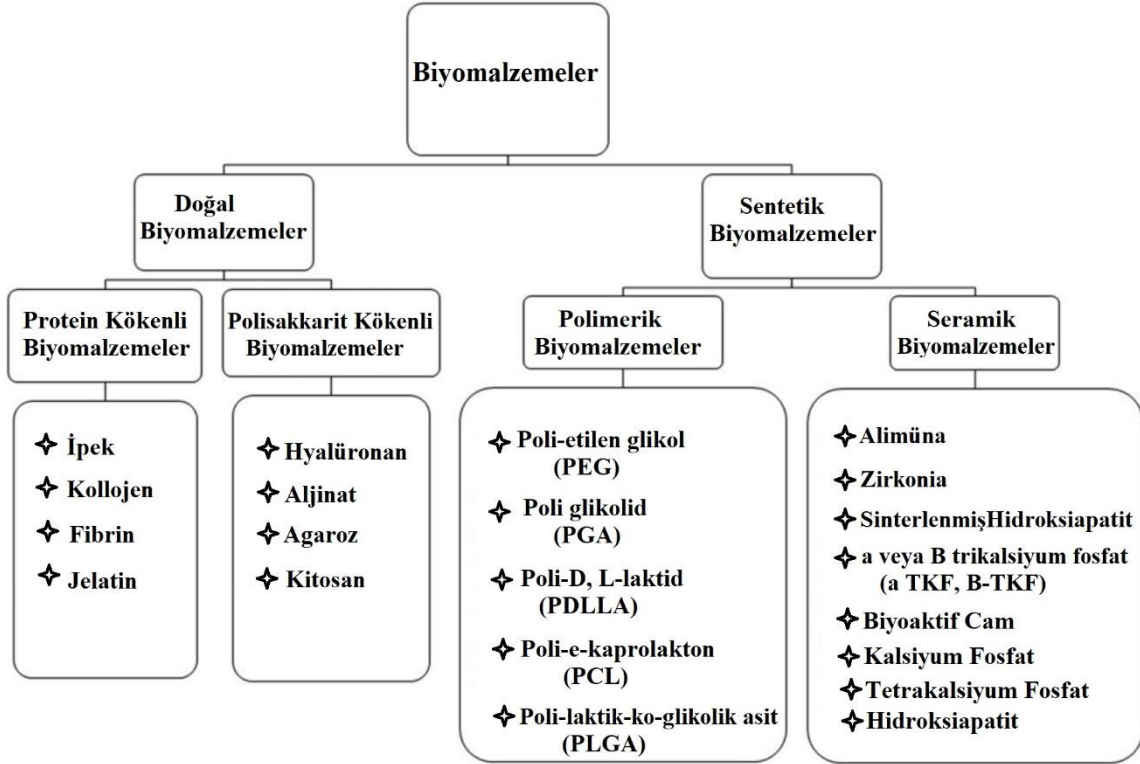
Biyolojik olarak parçalanabilir sentetik biyomalzemeler, doku mühendisliğinde iskele geliştirmeye yönelik, diğer biyomalzemelerle kıyaslandığında bir takım avantajlar sunmaktadır. Sentetik biyomalzemeler çeşitli uygulamalarda kullanılmak üzere, mekanik özellikleri ve bozunma hızları ayarlanabilmektedir. Son zamanlarda ilgi çekici bir alan haline gelen sentetik biyomalzemeler, istenilen gözenek boyutu ve morfolojik özellikleri, yapısında bulundurduğu fonksiyonel gruplar ile farklı şekillerde tasarlanarak hücrelerin büyümesini teşvik etmektedir. Sentetik biyomalzemelerin biyomühendislikte kullanılması doğal kaynaklı biyomalzemelere kıyasla birkaç önemli avantajı bulunmaktadır. Bunlar insan

HDM sistemlerini taklit ederek gerek şekil, gerek mimarisi, gerekse kimyasal yapısının kontrol edilmesinde alternatifler üretmek üzere cazip seçenekler sunar. Doku rejenerasyonu için en yaygın kullanılan sentetik polimerler, polilaktik asit (PLA), poliglikolik asit (PGA) ve bunların kopolimer poli (laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) içeren poli α -hidroksi asitlerdir (Şekil 1.5). Polimerlerin toksik olmayan parçalanma ürünleri (laktik asit ve glikolik asit) oluşturmaktadır ve bu polimerler basit bir şekilde kimyasal hidroliz yoluyla üretilir ve normal metabolik yollarla dışarı atılabilmektedir. Sentetik polimerlerin çekme mukavemeti, mekanik modül ve parçalanma oranı gibi özellikleri, oranları ve polimerizasyon parametreleri değiştirilerek hedef uygulamalara kolayca uyarlanabilir (Chen ve ark., 2016). Birçok sentetik polimer (ör., PLGA, PEG, PCL, poliakrilik asit, polivinil alkol ve polivinilpirolidon) geniş biyomedikal uygulamalarına sahip olup, biyomimetik özellikleriyle doğal HDM benzeri mikro/nano ölçekli fiberlere sahip olması, işlenebilirlik ve biyouyumluluk özelliklerini beraberinde getirirken, poli (α -hidroksi esterler) gibi bazı sınıflar gözenekli bir iskele haline getirilebilmesine rağmen, çevre dokuların pH'ını değiştirebilen asidik bozulma ürünleri üretmektedir. Sentetik polimerlerin bozumasından sonra meydana gelen pH değişimi, hücre davranışını ve hayatta kalmasını etkileyerek dokularda inflamatuvar reaksiyonlara neden olabilmektedir. Bu dezavantajlar nedeniyle sentetik polimerlerin kullanımı sınırlı olmaktadır (Chen ve Liu, 2016).

1.3.2. Doğal Biyomalzemeler

Doğal biyomalzemeler, biyoaktivitesi, biyouyumluluk, biyobozunur olmaları yanı sıra mekanik ve kinetik özellikleriyle yerli doku HDM'in yapısal benzerliklerine bağlı olarak doku mühendisliği uygulamalarında kullanılmak üzere biyomalzemelerin önemli bir alt kümesini oluşturmaktadır. Doğal biyopolimerler, çevre dostu olup genellikle suda çözünebilen yöntemler kullanılarak işlenmektedir. Biyolojik sistemler içerisinde uygulandıklarında, bozunma sırasında sitotoksik özellik göstermezler. Doğal biyomalzemeler, malzeme oranı ve işleme koşullarının değiştirilmesiyle bozunma hızları da ayarlanabilmektedir. Doğal polimerlerden oluşan iskeleler, barındırdıkları peptidler, polisakkaritler de dahil olmak üzere biyoaktif moleküllere sahip olduğundan doku veya organlarda var olan hücreler tarafından kolay bir şekilde tespit edilebilmektedir. Doğal biyomalzemeler içerisinde bulundurdukları biyoaktif bileşenler sayesinde hücre adezyonunu ve fonksiyonunu pozitif yönde desteklemektedir. Yaygın olarak kullanılan doğal polimerler; kitosan, kollajen, laminin, jelatin, matrijel, sodyum alginat ve hyalüronik asit (hyalüronan) yer almaktadır (Şekil 1.5). Doğal polimerlerin yüksek biyouyumluluk göstermelerine

rağmen moleküler yapısının kompleks olması malzemenin performansını yetersiz kılmaktadır. Doğal biyomalzemelerin en büyük kısıtlamalarından biri, implantasyon sonrasında ortaya çıkan immünojenik yanıtlar ve bunun yanı sıra hayvansal kaynakla ilişkili olan lottan lota değişen moleküler yapıda meydana gelen değişikliklerdir. Ayrıca doğal polimerlerin karşılaştığı diğer bir problem ise erime noktasının altında hemen denature olmaları ve mukavemet özelliklerinin zayıf olmasıdır (Chen ve Liu, 2016; Ige ve ark., 2012).



Şekil 1.5. Doku mühendisliğinde kullanılan biyomalzemeler (Alaribe ve ark., 2016)

1.4. Hücrelerinden Arındırılmış Doku Temelli Biyoiskeleler

Dünyada birçok hasta, organ nakli için uzun süre beklemek zorunda kalmaktadır. Otolog greft, implantasyon için "altın standart" olarak görülmektedir. Fakat otolog greftlerin sınırlı sayıda olması hasta ihtiyaçlarını karşılayamamaktadır. Dolayısıyla otogreft ve zenogreft bazı işlemlerden geçirilerek HADTM yani "deselülerizasyon" adıyla yeni bir yöntem ortaya çıkmıştır. Deselülerizasyon doku ve organların birçok işlemde geçirilerek içerisinde bulunan tüm hücresel içeriklerin atılarak tam bir HDM yapısı oluşturulmasını hedeflemektedir. Dahası, hücresel içerikte olan bir HDM'in deselülerizasyon işlemleri ile hücre kültürü için bir doku iskelesi olarak kullanılmasını hedeflemektedir. Deselülerizasyon

işlemleri fiziksel, kimyasal ve enzimatik yöntemlerle gerçekleştirilmektedir (Gilbert ve ark., 2006) (Çizelge 1.1).

Çizelge 1.1. Deselüerizasyon yöntemleri (Gilbert ve ark., 2006)

Metot	Etki Şekli	Hücre Dışı Matriks Etkileri
Fiziksel		
Sıvıya Daldırıp Dondurma	Hücre içi buz kristalleri hücre membranını bozar.	HDM hızlı donma esnasında yapısında çatlaklar oluşur ve matriksin yapısı bozulur.
Mekanik Kuvvet	Basınç hücreleri patlatabilir	HDM zarar verebilir
Mekanik Çalkalama	Hücrelerin lizisine sebep olur. Bunun yanı sıra hücre malzemenin uzaklaştırılması için kimyasallara beraber kullanılır.	Agresif çalkalama veya sonikasyon, HDM'in yapısının bozarak hücre malzemesini çıkarılmasını sağlar.
Kimyasal		
Alkali; asit	Hücrelerin sitoplazmik bileşenlerini çözünür hale getirerek nükleik asitlerin yapısını bozmaktadır.	HDM bileşenlerinden olan GAG'ları ortadan kaldırır.
İyonik Olmayan Deterjanlar		
Triton X-100	Protein-protein interaksyonlarını bozulmadan bırakarak lipid-lipid ve lipid-protein etkileşimlerini bozar.	Karışık sonuçlar; Dokuya bağlı verimlilik, GAG'ları yok eder.
İyonik Deterjan		
SDS	Sitoplazmik ve nükleer hücre malzemesini çözünür hale getirir. Proteinleri denatüre etmeye eğilimlidir.	Nükleer kalıntıları ve sitoplazmik proteinleri yok eder; HDM'in doğal yapısını bozma eğilimi gösterir, GAG'ları ortamdan çıkarır ve yapıdaki kollajene zarar verir.
Sodyum Deoksikolat		Dokulara SDS'den daha fazla zarar verir.

Çizelge 1.1.'in devamı

Triton X-200		Zwitterionik deterjanlarla beraber kullanıldığında etkin hücre uzaklaştırılmasını sağlar.
Zwitteriyonik Deterjanlar		
CHAPS	İyonik ve iyonik olmayan deterjanların özelliklerini gösterir.	Triton X-100 e benzer, HDM yapısını bozarak hücrelerin uzaklaştırılmasını sağlar.
Sülfobetain-10 ve 16 (SB-10,SB-16)		Triton X-200 ile beraber HDM yapısını bozarak etkin hücre uzaklaştırılmasını sağlamaktadır.
Tri(n-bütül)fosfat	Organik solvent sınıfındadır, protein-protein etkileşimlerini bozar.	Mekanik özelliklerinin etkisi sınırlı olmasına rağmen farklı tipteki hücreleri matriksten çıkarma ve kollajen içeriğini azaltmaktadır.
Hipotonik ve Hipertonik Solüsyonlar	Osmotik şok ile hücreler lizise uğratılır.	Hücre lizisinde etkilidir. Ancak hücre kalıntıları etkin bir biçimde uzaklaştıramamaktadır.
Etilendiamin tetra asetik asit (EDTA)	Şelatlama ajanlarıdır, iki değerlikli metal iyonlarını bağlayarak HDM'in yapısında bulunan hücre adezyon moleküllerinin yapısını bozarlar.	Genellikle enzimatik yöntemlerle kullanılmaktadır. (örn., Tripsin)
Enzimatik		
Tripsin	Peptid bağlarını koparır.	Uzun süre maruz kalındığında HDM'in yapısında bulunan laminin, fibronektin, elastin ve GAG'ın yapısını bozarak ortadan kaldırabilir.
Endonükleaz	Ribonükleotid ve deoksiribonükleotid zincirlerinin iç bağlarının hidrolize etmektedir.	Dokudan çıkarılması zordur ve immün yanıt oluşturabilir.
Ekzonükleaz	Ribonükleotid ve deoksiribonükleotid zincirlerinin terminal bağlarının hidrolizini katalize etmektedir.	

Deselüerizasyon ajanları hücre ve HDM bileşenlerini spesifik olarak etkilemekte ve böylece bütün hücre komponentleri atılırken, maksimum HDM içeriği ile deselüerizasyon işlemi gerçekleştirilmektedir. Deselüerizasyonun etkinliği, bağlı olduğu doku ve organın tipine göre farklılık göstermektedir. Örneğin bir dokuyu deselüerize etmek için deterjan çok iyi bir ajan olmasına rağmen, başka bir doku için aynı şey söylenemez (Gilbert ve ark., 2006).

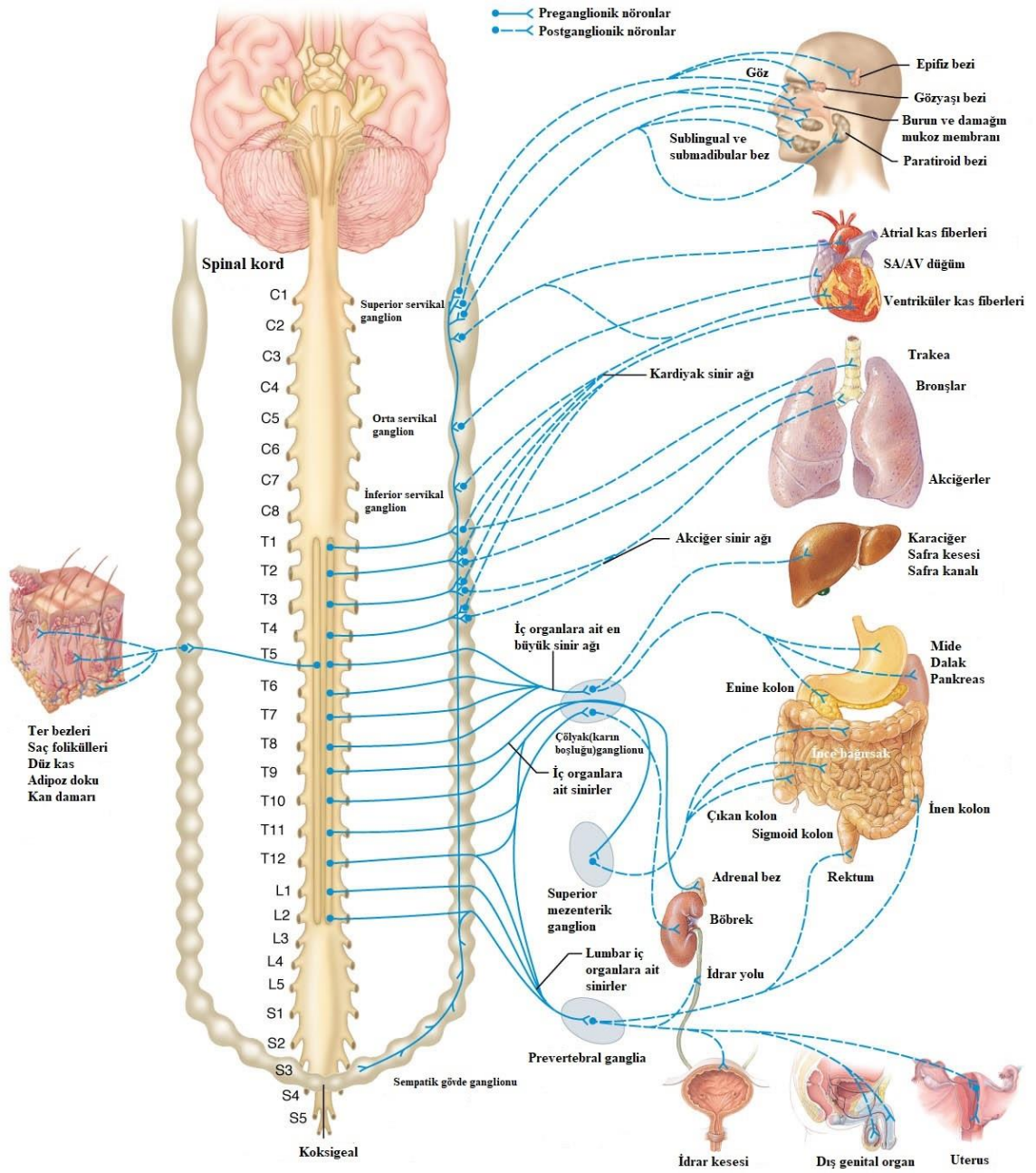
Doğal biyomalzemelerin bir diğer sınıfı da doğal dokudan veya organlardan tüm hücresel ve nükleer materyallerin ortadan kaldırılmasıyla yaratılan, desellüerize dermis, kalp kapakları, kan damarları, ince bağırsak submukozası ve karaciğer gibi desellüerize doku türevi biyomalzemelerdir. Bu desellüerize doku türevi biyomalzemeler içerisinde organik veya inorganik bileşenler bulundurmakta aynı zamanda hücre adezyonu ve proliferasyonu için gerekli olan yüzey ligandlarını içermektedir (Şekil 1.6).

Hücre adezyonu ve hücre aktivitesi, hücreler ve hücreleri çevreleyen HDM'ler arasındaki spesifik integrin-ligand etkileşimleri aracılığı ile gerçekleşir. Böylece işlenen HDM, hasarlı doku veya organa implante edildiğinde o bölgenin onarımında, yenilemesinde ve hücrelerin tutunmasında görev almaktadırlar (Chen ve Liu, 2016).

1.5. Sinir Sistemi

1.5.1. Sinir Sistemi ve Organizasyonu

Sinir sistemi, merkezi sinir sistemi (MSS) (beyin ve omurilik dahil) ve periferik sinir sistemi (PSS) olarak iki ana bölümden oluşmaktadır (Zhang ve ark., 2005). Şekil 1.6'da insan spinal kord anatomisi gösterilmiştir.

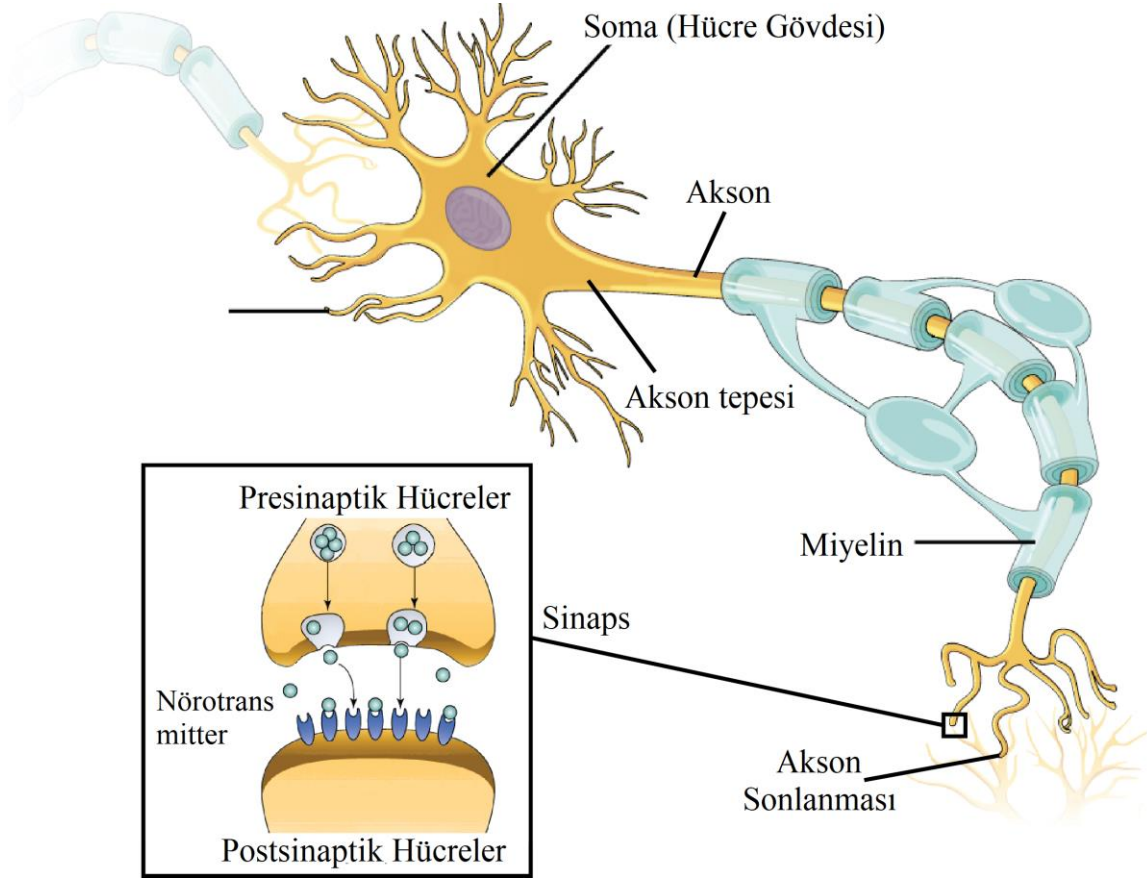


Şekil 1.6. İnsan beyni ve spinal kord

(http://higheredbcs.wiley.com/legacy/college/tortora/0470565101/hearthis_ill/pap13e_ch15_illustr_audio_mp3_am/simulations/hear/sympathetic.html'den uyarlanmıştır.)

Sinir sistemi nöron adı verilen sinir hücrelerinden oluşmaktadır (Şekil 1.7). Her nöron bir hücre gövdesi olup bir veya birden fazla akson ve dendritten oluşmaktadır. Dendritler çevreden gelen sinyalleri almak için tıpkı bir anten gibi işlev görürken aksonlar çevreden gelen uyarıları hücre gövdesine aktarmaktadır. Uyarıların iletimi, bir nöronun

aksonuyla diğeri arasında dendritleri arasında sinaps adı verilen etkileşimle sağlanmaktadır (N. Zhang ve ark., 2005).

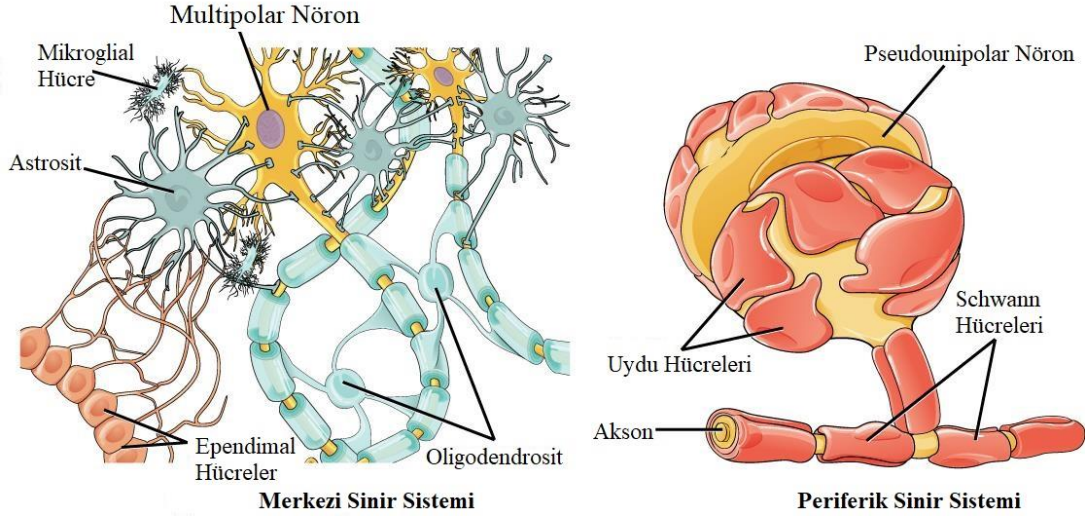


Şekil 1.7. Nöronun yapısı (<https://www.khanacademy.org/science/biology/human-biology/neuron-nervous-system/a/overview-of-neuron-structure-and-function>'dan uyarlanmıştır)

PSS beyinden çıkan kafa sinirleri, spinal korddan (omurilik) çıkan omurilik sinirleri ve duysal sinir hücrelerinden oluşmaktadır. Periferik sinirler kas dokusuna bağlıdır, uyarılar PSS'den spinal korda ve sonrasında beyine iletilmektedir (Schmidt ve Leach, 2003)

1.5.2. Sinir Sistemi ve Hücresel İçerikleri

Nöronlar, sinir sisteminin temel yapı taşlarıdır. Hücre gövdesinden (soma) ve uzantılarından (aksonlar ve dendritler) oluşur. Glial hücreler veya nöroglia, nöronların işlevine yardımcı olan destek hücreleridir ve bunlar PSS'de Schwann hücreleri, MSS'de astrositler ve oligodendrositler olarak yapıya katılmışlardır (Şekil 1.8).

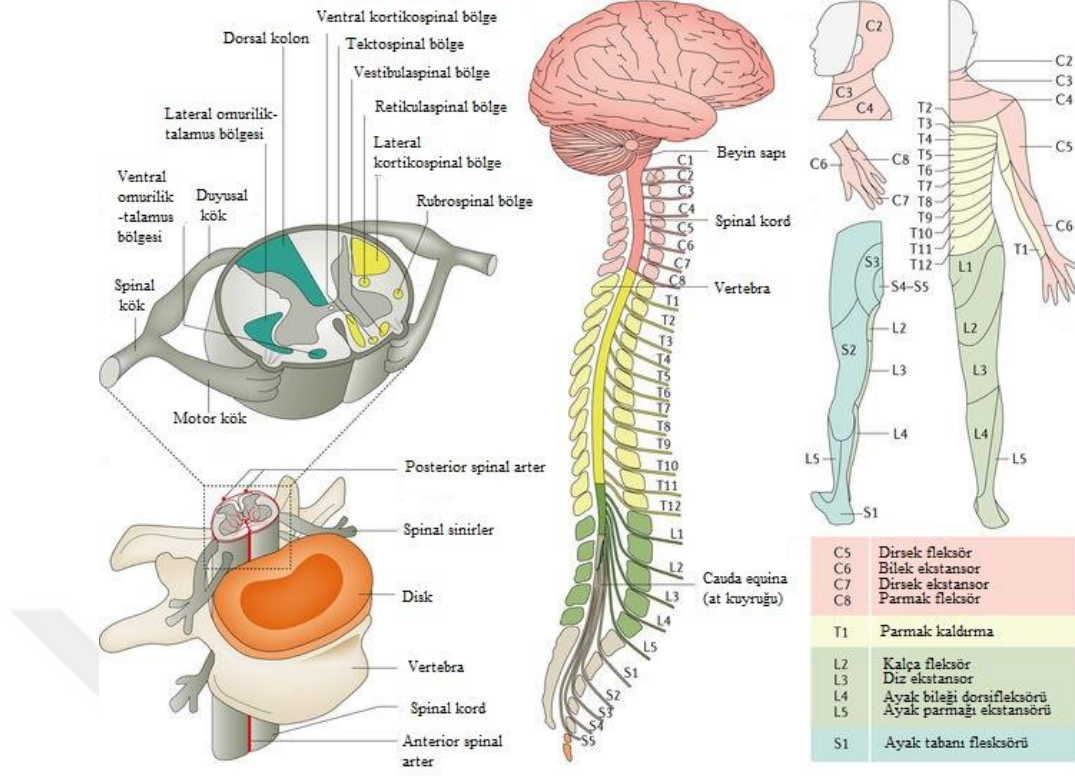


Şekil 1.8. Merkezi ve periferik sinir sistemi hücreleri (<http://philschatz.com/biology-book/contents/m44747.html>'den uyarlanmıştır)

Glial hücreleri sayıca nöronlardan daha fazladır ve nöronların aksine mitoz bölünme geçirmektedirler. Nöronlar mitoz bölünme yapmasalar da belirli koşullar altında kopmuş bir bölümünü yeniden oluşturabilirler. PSS'de, aksonların tamamı Schwann hücreleri tarafından sarılmıştır. Bu Schwann hücre tabakasının dış yüzeyinde, epitel tabakaya benzer bazal bir membran olan nörolema bulunur. Bunun aksine MSS'de, bazal membran ve Schwann hücreleri bulunmamaktadır. Çoğu aksonlar miyelin kılıf tabakasıyla sarılmıştır ve bu tabakalar yoğun, yalıtıcı özelliklerdedir. Myelin kılıf özellikle aksonlarda, uzun mesafeler için impulsunun yayılım hızını arttırmayı sağlamaktadır (Schmidt ve Leach, 2003; Yücel,2009).

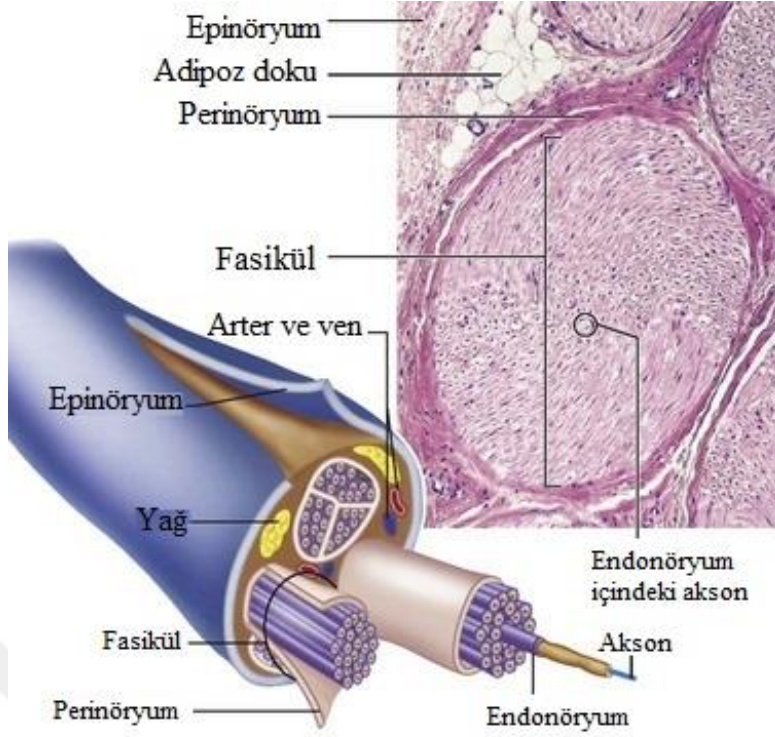
1.5.3. Spinal Kord ve Periferik Sinir Sistemi Anatomisi

Spinal kord, merkezi sinir sisteminin serebrum ve serebellumla birlikte periferik sinirleri ve organları birbirine bağlayan önemli yolları barındıran bir köprü gibi konumlanmıştır. Spinal kord kemik bir yapı içerisinde korumaya alınmıştır (Yılmaz, 2007) (Şekil 1.9).



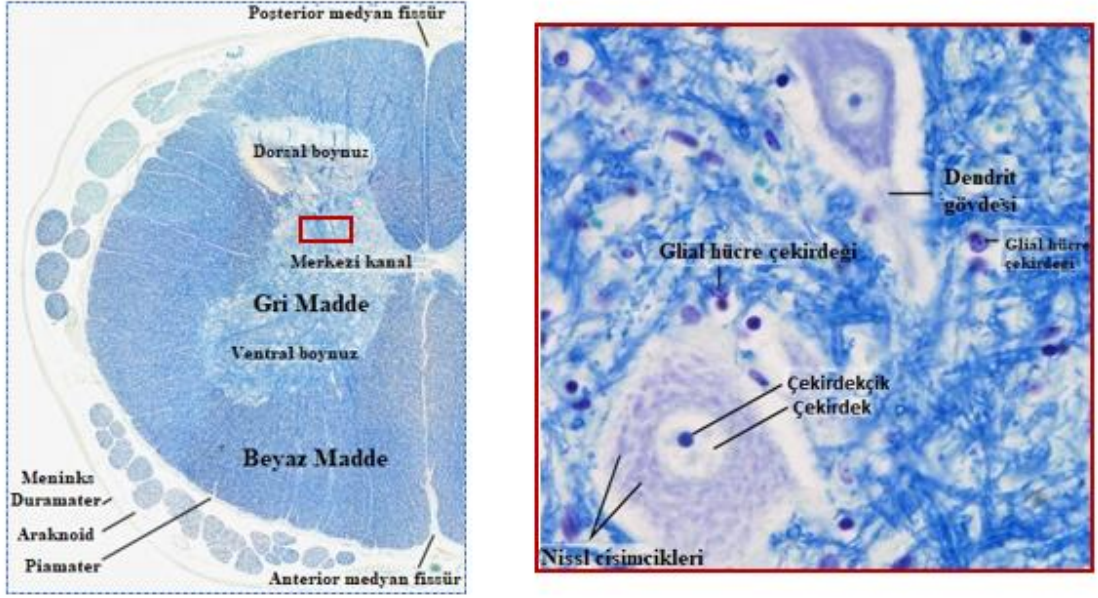
Şekil 1.9. Spinal kord anatomisi (<https://www.nature.com/articles/nrdp201718>'den uyarlanmıştır)

Periferik sinir, motor ve duysal aksonların bir araya gelmesiyle, anatomik olarak tanımlanmış bir gövde üzerinde destek dokusu tarafından oluşmaktadır (Schmidt ve Leach, 2003; Yücel, 2009). Endonöryum, aksonları ve Schwann hücrelerini saran kollojen fibrillerden oluşmaktadır. Daha sonra, birçok tabaka ve yassı hücrelerden oluşan perinöryum tabakası gelmektedir. Bu tabaka da fasikül oluşturmak için akson gruplarının etrafını sarmaktadır. Son olarak epinöryum tabakası gelmektedir. Bu tabakada gevşek bir fibrokollojen dokusu ile sarılmakta sinir gövdesindeki sinir fasiküllerini bağlamaktadır (Şekil 1.10). Periferik sinirler, kılcal damarlar tarafından yoğun bir şekilde sarılmış olup sinir gövdesinde bulunan destek dokusu içindeki kılcal damarlar ise sinirlere nüfuz eden bölgelerde bulunan arterler ve venler tarafından iyi bir şekilde vaskülarize (damarlanma) edilir.



Şekil 1.10. Sinir organizasyonunun şematik gösterimi (<https://pocketdentistry.com/25-traumatic-injuries-of-the-trigeminal-nerve/> uyarlanmıştır)

Spinal kord hücre gövdesi, akson ve dendritten oluşmaktadır. Gri madde olarak bilinen kelebek şeklindeki bölge omuriliğin tam merkezindeki bölge olup bu bölge uyarıcı nöronların hücre gövdeleri, glial hücreleri ve kan damarlarından oluşmaktadır. Gri maddenin etrafında beyaz madde bulunmaktadır (Şekil 1.11). Bu da spinal kordun bulunduğu bölgede izole bir şekilde korunmasını sağlamaktadır. Aksonlar beyaz madde içinde demetler halinde bulunmaktadır. Fasikül olarak bilinen kısımlar ise spinal kolon ve kemiklerin arasından çıkan kısımlarda PSS-MSS arasındaki geçiş bölgesinden geçerek PSS giren yapıları oluşturmaktadır. Geçiş bölgesi, PSS' nin aksine MSS' de bulunan glial hücreleri açısından zengindir (Schmidt ve Leach, 2003; Yücel, 2009).



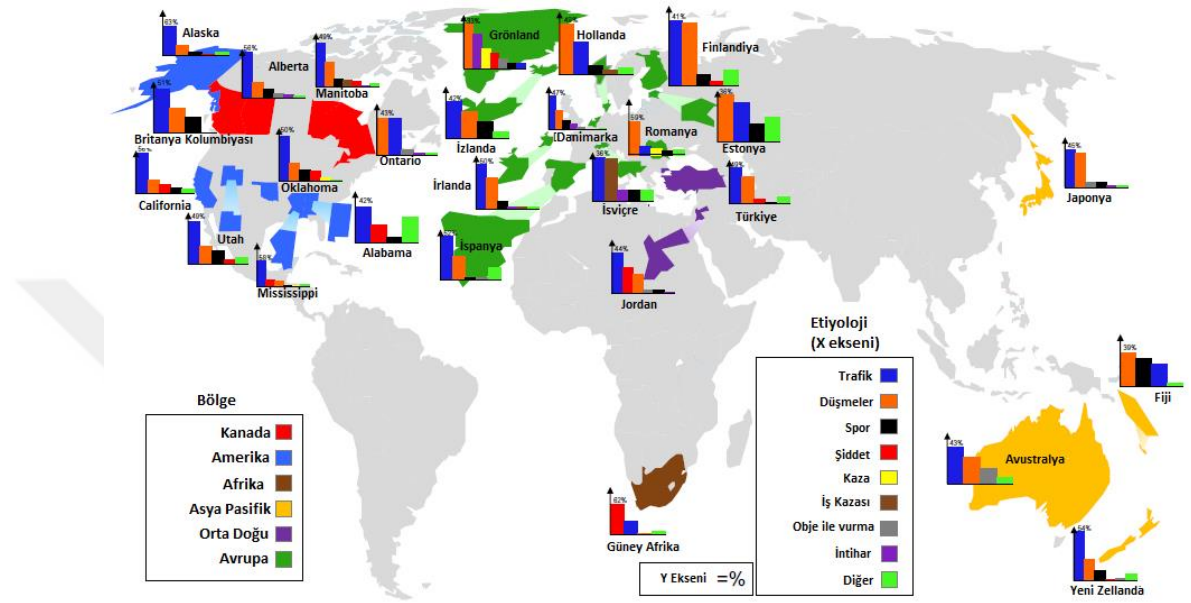
Şekil 1.11. Spinal kord histolojik kesiti Luxol fast blue boyaması (<http://www.lab.anhb.uwa.edu.au/mb140/corepages/nervous/nervous.htm> uyarlanmıştır)

1.5.4. Sinir Sistemi Yaralanmaları ve Rejenerasyon

Dünya Sağlık Örgütü 2013 yılının Kasım ayı verilerine göre her yıl dünyada herhangi bir nedenden kaynaklanan spinal kord yaralanmalarına (SKY) ilişkin ülke düzeyinde insidans, yılda bir milyon nüfus başına 40 ile 80 arasında yeni vaka oluşmaktadır (Şekil 1.12). Bu da her yıl 250,000 ile 500,000 kadar insanın spinal kord hasarına maruz kaldığını göstermektedir. 2012’de elde edilen verilere göre dünya çapında spinal kord hasarlı 2 milyondan fazla hasta bulunmaktadır (Rosner ve ark., 2012). Tüm dünyada toplam gelişmiş ülke popülasyonu içinde yılda 32,000 lezyon meydana gelmekte, bu da her 16 dakikada bir lezyona tekabül etmektedir. Amerika Birleşik Devletleri’nde spinal kord travma oranı yılda 40/1,000,000’dir ve her yıl 10,000 yeni vaka meydana gelmektedir (Yılmaz, 2007). Türkiye’de spinal kord yaralanması ile ilgili yapılan bir çalışmada insidans 12,7 / 1,000,000 olarak hesaplanmıştır (Koçyiğit ve ark., 2015). SKY büyük travmatik durumlara yol açar ve bu vakaların başlıca nedeni çoğunlukla trafik kazası, düşme ve şiddet olmaktadır. Ulusal Spinal Kord Yaralanmaları Veritabanı, düşmelerin yol açtığı SKY vakalarının yüzdesinin 1970’lerde %17 iken 2010-2013 döneminde %31’e yükseldiğini göstermektedir (Chen ve ark., 2016).

PSS ile MSS’nin yaralanma sonrasındaki fizyolojik tepkileri karşılaştırıldığında birbirlerinden oldukça farklı olduğu görülmektedir. En önemli farklardan biri PSS’ nin MSS’

ne göre yenilenme kapasitesinin olmasıdır. MSS doğal hücre dışı ortamında (miyelin) bulunan birçok glikoprotein inhibe olurlar. MSS yaralanmalarındaki fizyolojik cevap PSS'ne kıyasla oldukça farklıdır. MSS hasar gördükten sonra, makrofajlar PSS'deki makrofaj infiltrasyonuna göre yaralanma bölgesine çok daha yavaş sızar, inhibitör (miyelinin) çıkarılmasını geciktirir.



Şekil 1.12. Haziran 2014 yılına ait küresel spinal kord yaralanma insidansı (Singh ve ark., 2014)

Bu olay kan-beyin bariyerinin bir sonucudur. Çünkü MSS'de kan-beyin bariyeri olduğundan yaralanma bölgesine gelen makrofajların girişimi zayıftır dolayısıyla yaralanmış sinir dokusuna makrofajların girmesi sınırlandırılmıştır. Buna ek olarak PSS'de olduğu gibi yaralı omuriliğin distal ucundaki hücre adezyon molekülleri de up regüle olmadıklarından makrofaj alımı arttırılamamaktadır. Son olarak MSS'de bulunan astrositler PSS'deki Schwann hücrelerine benzer bir şekilde proliferer olurlar ama glial yara izi adı verilen "reaktif astrositler" üreterek lezyonlu bölgedeki rejenerasyonu inhibe etmektedir (Schmidt ve Leach, 2003).

MSS yaralanmaları, klinik tedavilerde çok az bir mesafe kaydetmiştir. Hasar sonrası bölgede kırılmış olan kemik parçaları yaralanma bölgesinde tehlike oluşturmaktadır. Bunun yüzden ikincil yaralanma riskini azaltmak için ameliyat yapılabilmektedir. Ayrıca ikincil yaralanmayı azaltmak için metilprednizon gibi antienflamatuar ilaçlar sıklıkla uygulanmaktadır. Ama ne yazık ki, şu anda sinir doku fonksiyonunu tamamen düzeltmek

için herhangi bir tedavi yöntemi mevcut değildir. Yaralanma sonrasında meydana gelen sinir kayıplarını telafi etmek için hastalar uzun süre rehabilitasyona başlarlar. Spinal sinirlerin yeniden oluşma yeteneği 1980 yılına kadar kesin olarak gösterilmemiştir. Daha sonra bu alandaki araştırmalar hızla gelişmiştir fakat yapılan birçok çalışmada sonuçların tartışmalı olması bu alandaki gelişmeleri zorlaştırmıştır. Hem embriyonik omurilik greftleri hem de periferik sinir dokusu greftlerinin MSS'nin rejenerasyonu destekleyebileceği gösterilmiştir. Fakat bu greftlerin yapısında bulunan fiberler sıklıkla PSS-MSS arası geçiş bölgesi boyunca aynı başarıyı elde edememiştir (Schmidt ve Leach, 2003).

Birincil ve ikincil SKY, omuriliğin homeostazının bozulmasına neden olur. Birincil yaralanma hücrelerin ve aksonların hasarına, kan damarlarının kopmasına ve omuriliğin dokusunda fiziksel yaralanmalara yol açar. İkincil yaralanma birincil yaralanma seviyesinin daha ileriki aşamalarını oluşturmaktadır. Bölgesel iyon konsantrasyonu değişimi, omurilik kan akışında azalma, kan-beyin bariyeri hasarı sonucu serbest radikal oluşumu ve sitotoksik nörotransmitterlerin serbest kalması gibi sonuçlar meydana gelmektedir. Birincil ve ikincil yaralanmalar sinirsel iletim bloğuna yol açmaktadır. Mikroglial ve astrositler aşırı derecede birikip ve çoğalarak glial skar doku oluşturmaktadır. Bu skar doku, monosit ve makrofajların fagositozu ile kaldırılarak bir kavite (boşluk) meydana gelmektedir. Glial skar alanındaki sinir hücrelerinin kontrol altına alınması aksonal rejenerasyonu engellemede kalıcı bir bariyer haline gelmektedir. SKY sonrası erken dönemde astroglisis, nöronal sağkalım ve yenilenme üzerinde koruyucu bir etkiye sahip olmaktadır. Bununla birlikte, olgun astrositler ve mikroglia inhibitör faktörleri (proteoglikan, nitrik oksit gibi) salgılar ve sinir yenilenmesini engelleyecek biyolojik bir glial bariyeri oluşturmaktadır. Glial hücrelerin aşırı derecede çoğalması ve glial skar oluşumu mekanik bozukluklara neden olmakta ve aksonal birleşmeyi, uzamayı ve rejenerasyonu etkilemektedir. Glial skar doku, kan damarları üzerinde bulunan mikro kan damarları ile spinal kordun bölgesel kan ihtiyacını azaltmaktadır. Bu nedenle glial skar dokunun negatif etkilerinin azaltılmasında sinir rejenerasyonu, spinal kord tedavisinde en önemli noktalardan biri haline gelmiştir (Ban ve ark., 2017).

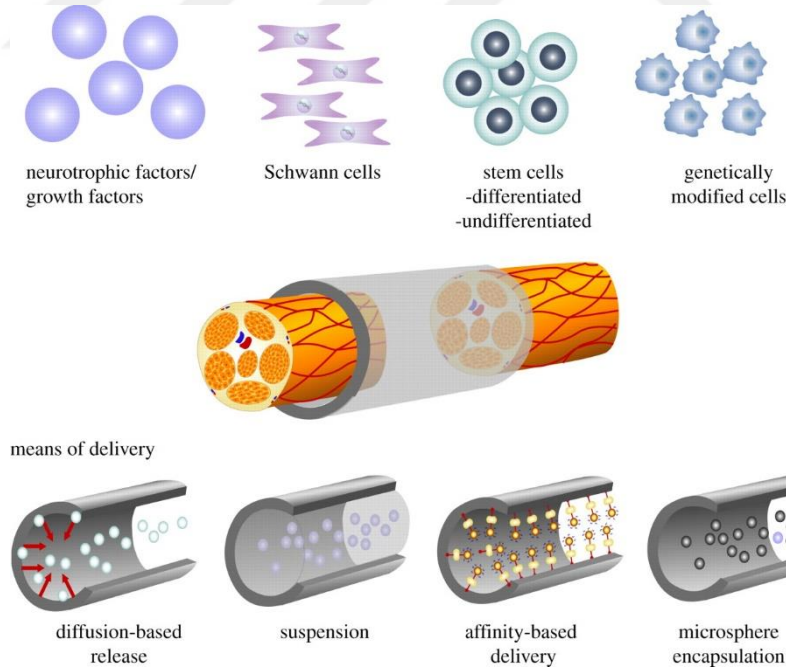
SKY sonrasında aktive olmuş birçok mikroglia ve makrofaj hücreleri hasarlı bölgeye hemen göç ederler. Burada hasar gören hücreleri, mikropları ve artıkları temizlemede önemli role sahiptirler. Yaralanmanın 3 ile 5. gününe kadar oligodendrosit öncülleri, meningesitlerden birçoğu ve astrositlerin çoğu lezyonlu bölgede gelerek glial skar doku oluşturmak için sıkı bir şekilde iç içe geçmiş çok sayıda sitokin salgılar. Sinir rejenerasyonunun sağlanması ve daha iyi bir mikroçevre oluşturmada glial skar dokusu

büyük önem taşımaktadır. Fiziksel ve kimyasal bariyerler nedeniyle glial skar doku sinir rejenerasyonu için zayıf bir mikroçevre oluşturmaktadır. Ayrıca spinal kord yaralanmasından sonra mekanik stres ve ikincil yaralanmalar aksonal dejenerasyona sebep olmaktadır. Aksonal rejenerasyon için bazı tedavi yöntemleri olmasına rağmen hasar gören aksonları tamamen tedavi etmek olanaksızdır (Ban ve ark., 2017). Aksonları kesilmiş nöronlar, hayatta kalıp kendini yenileyebilmesi için çevre dokular tarafından tamir edilmektedir. Kronik yaralanmadan sonra aksonal gelişme oldukça zor olmaktadır. Bu durumda, lezyon bölgesine fibroblastlar, astrositler, meningeal hücreler ve diğer hücreler tipleri ile bunlardan türeyen çeşitli inhibitör moleküller gelerek lezyon bölgesini yoğun skar dokusu ile kaplamaktadır. Aksonlar yara bölgesi etrafına yönlendirildiğinde, hedef bölge ile arasındaki bağlantıda kopmalar olabilmektedir. Bu nedenle, aksonların rejenerasyonuna yardım eden çapraz lezyon bölgeleri erken rejenerasyonda biyomühendislik yaklaşımlarıyla beraber önemli bir adım temsil etmektedir (Zhang ve ark., 2005).

Sonuç olarak spinal kord yaralanması kordun fonksiyonlarını yitirmesine sebebiyet verebilen, fiziksel, psikolojik, sosyal ve ekonomik boyutları olan patolojik bir durumdur. Yaralanmalarının beraberinde getirdiği psikososyal sorunlar ve nörolojik problemler, kişinin sosyal yaşamını etkileyen ciddi maddi ve manevi kayıplara neden olmaktadır. Spinal kord yaralanmalarının çoğu önlenebilir kazalar olup; özellikle trafik kazaları, ev ve iş kazaları, spor kazaları, ateşli silah, kesici alet yaralanmaları vb. sebepler olabilmektedir (Yılmaz, 2007; Koçyiğit ve ark., 2015). Nöronlar ve onların destekleyici hücreleri arasındaki etkileşimin bozulması ile sinir hücreleri ve hedef bölge arasındaki iletişim kesintiye uğramakta ve kan-beyin bariyerinin tahrip olması ile sonuçlanmaktadır (Yücel,2009). Ölümcül sonuçlara sebep olan omurilik hasarları, rejenerasyonu konusunda pek çok klinik çalışma yapılsa da yaralanmış omuriliğin rejenerasyonu tam anlamıyla başarılı olamamıştır (Yılmaz, 2007). Spinal kordun kendini yenileme kapasitesi sınırlıdır. Bu yüzden yaralanmanın seviyesine bağlı olarak, motor ve duyuşal nöronların geniş bir alanda kaybı, demiyelinizasyonu, periferal nöronların fonksiyon kaybı, apoptozis, glial hücrelerin hasar görmesi, nöropatik ağrı, idrar, solunum bozukluğu, metabolik problemler, kistik kavitasyon gibi çeşitli hasarlar meydana gelmektedir (Liu ve ark., 2013; Volpato ve ark., 2013). Hasarların tedavi edilebilmesi için farklı deneysel tedavi stratejileri oluşturulmuştur. Bugüne kadar yaygın olarak kabul görmüş tedavi stratejileri, uygulanan cerrahi müdahaleler, ilaç tedavileri ve rehabilitasyonlar geniş çaplı hasarların tedavi edilmesinde başarılı olamamıştır (Volpato ve ark., 2013).

1.5.5. Sinir Doku Mühendisliği

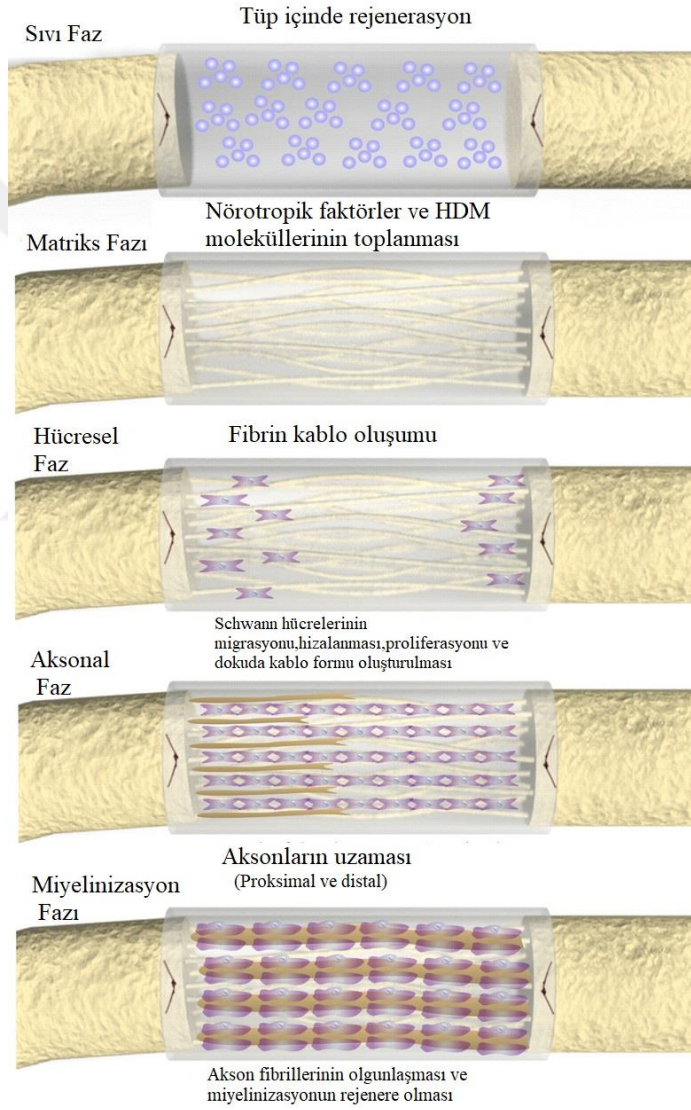
Doku mühendisliğinin amacı; herhangi bir yaralanma veya patolojik süreci takiben, kaybedilmiş veya hasar görmüş doku ve organların biyolojik açıdan aktif moleküllerini veya biyolojik materyallerini birleştirerek bulunduğu mikroçevrenin mekanik kuvvetlerini uyararak eksik olan organların anatomik yapısını, işlevlerini yerine koymak veya onarmaktır (Zhang ve ark., 2005). Doku mühendisliği ile beraber rejeneratif tıp alanında da son bir kaç yıldır alternatif biyomateryaller ve çeşitli tedavi yöntemleri sayesinde heyecan verici araştırmalar yapılmaktadır (Zhang ve Webster, 2009). Bu araştırma alanlarından biri olan sinir sisteminde özellikle MSS’de meydana gelen hasarların, iyileşmesi zor ve kalıcı etkilerinden dolayı, yaralanmadan sonra MSS’de onarımı kolaylaştırmayı amaçlayan kapsamlı çalışmalar yapılmaktadır. Aksonal reinnervasyonu (yeniden sinirle donatma) sağlamak ve aksonların büyümelerini yönlendirmek için birçok strateji geliştirilmiştir. Örneğin çeşitli biyomateryallerden oluşan köprüler, periferik sinir greftleri, hücrelerinden arındırılmış kas greftleri, kan damarları ve fetal doku greftleri gibi sentetik veya biyolojik materyalleri kullanan çeşitli biyomalzemeler geliştirilmektedir (Zhang ve ark., 2005) (Şekil1.13).



Şekil 1.13. Sinir doku mühendisliği için geliştirilen ideal sinir kondüiti (Daly ve ark., 2011)

Sinir doku mühendisliği (SDM) için kullanılacak materyaller rejenerasyon tamamlandıktan sonra, implant alanında bozularak, yabancı cisim yanıtı ve enfeksiyona

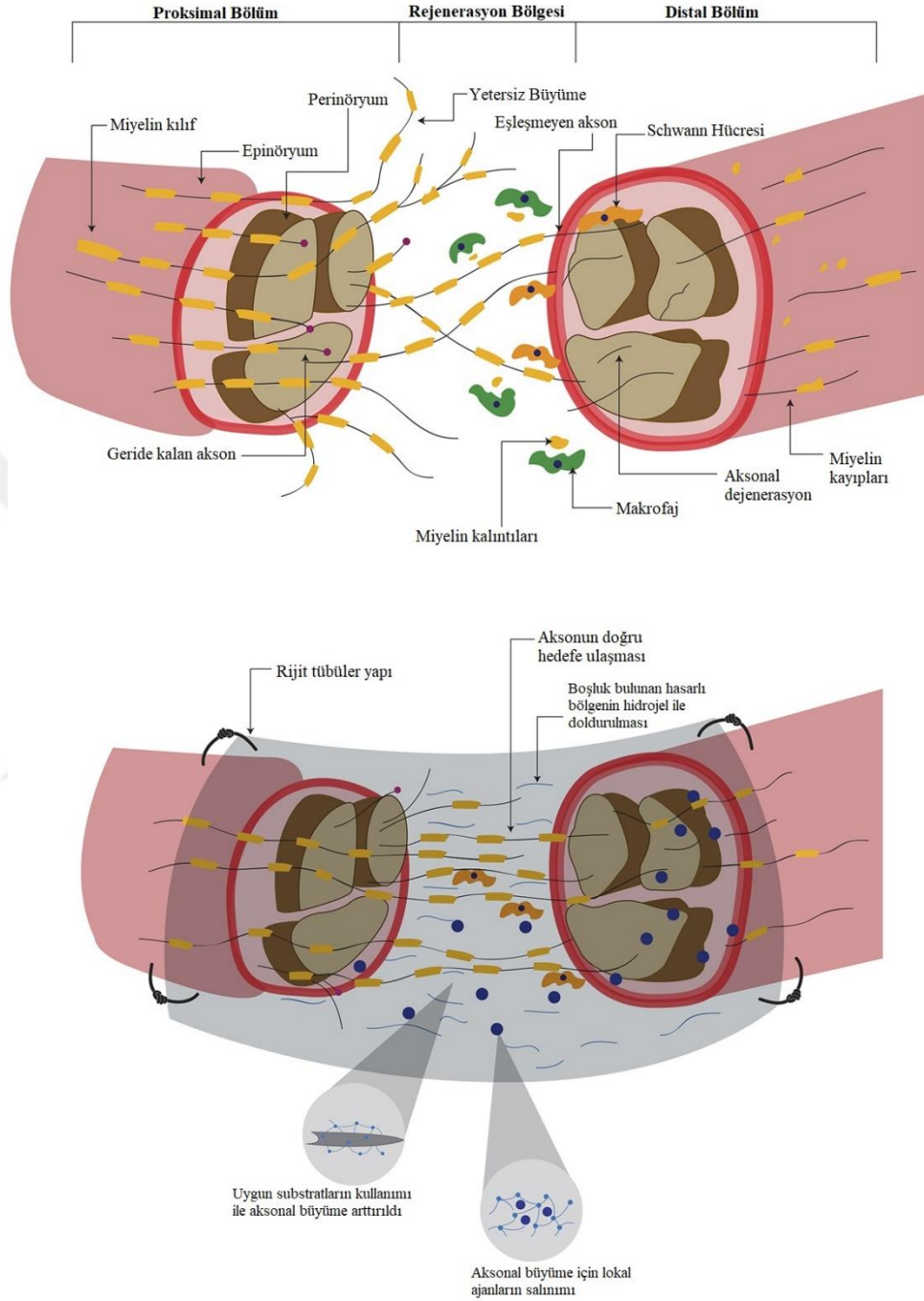
bağlı komplikasyonların olasılığını ortadan kaldırmaktadır (Şekil 1.13). Özellikle tübüler şekilde tasarlanan biyomalzemeler fibröz dokunun infiltrasyonunu azaltarak nörotropik faktörlerin salınmasını sağlamaktadır. Tübüler kanal içerisinde bulunan endojen protein konsantrasyonu makromoleküllerin geçişinde bariyer görevi görür. Endojen protein konsantrasyonundaki artış kanal içinde ve çevresinde meydana gelen difüzyonu sınırlandırmıştır (Yücel,2009). Şekil 1.14’de rejeneratif bir sinir kondütinin, hasarlı bir bölgede meydana getirdiği onarım aşamaları gösterilmiştir.



Şekil 1.14. Hasarlı bölgedeki rejeneratif sinir konditi ve onarım aşamaları (Daly ve ark., 2011)

PSS'de hasar gören aksonlar yaralanma sonrası kendini yenileyerek çoğalır. Bunun yanı sıra PSS’de bulunan Schwann hücreleri de hasarlı bölgenin proliferasyonunda önemli

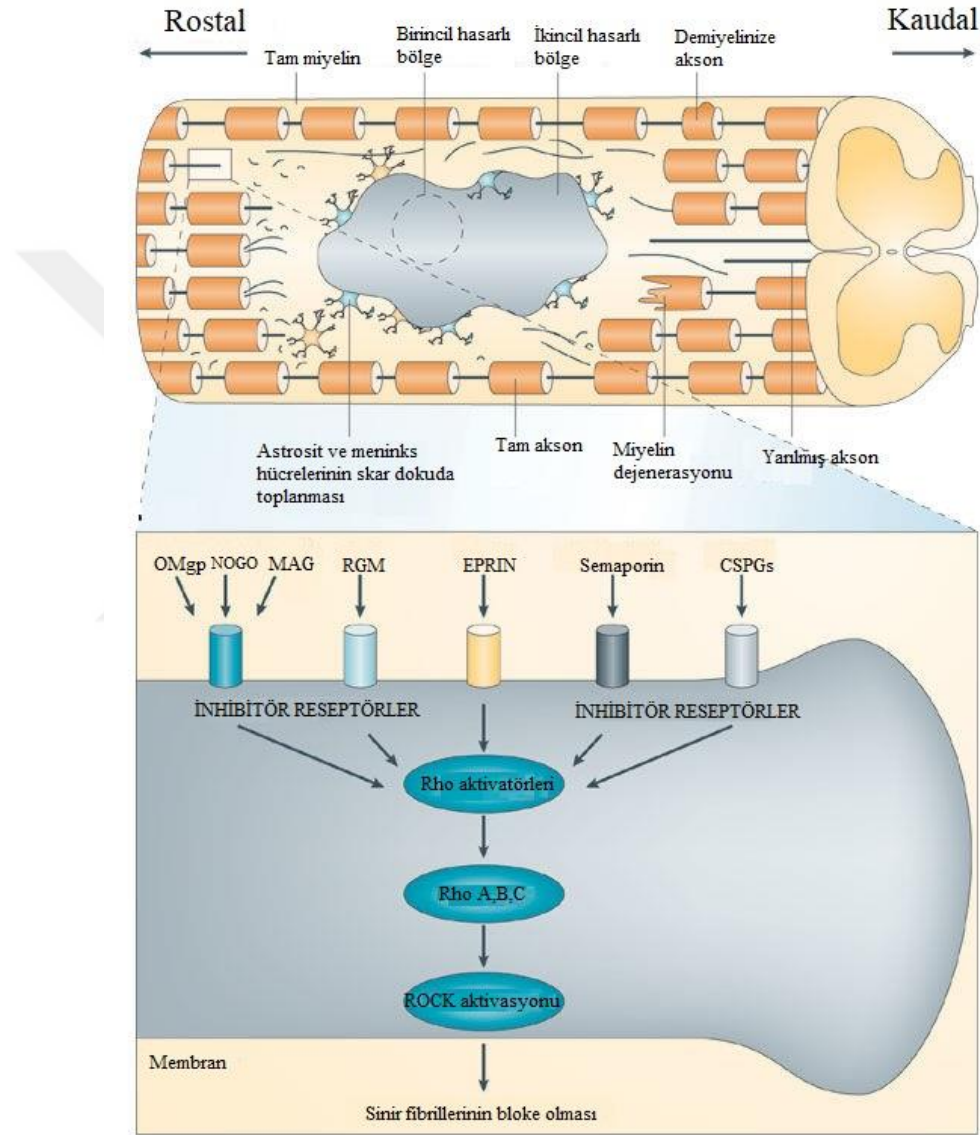
role sahiptir. Bununla beraber geliştirilen yeni biyomalzemeler ve hücrel terapilerle PSS rejenerasyonunda önemli başarılar elde edilmiştir (Şekil 1.15).



Şekil 1.15. Hidrojellerin periferel sinir sistemi rejenerasyonunu desteklemesi (Carballo-Molina ve Velasco, 2015)

MSS'de (Schwann hücrelerinin bulunmaması vs.) meydana gelen hasarların iyileştirilmesi için aksonları uzatmak ve yeniden innervasyonunu sağlamak zordur. MSS'de meydana gelen hasarlarda kullanılan sinir doku biyomalzemelerinin bugün akson ve nöron

rejenerasyonunda yetersiz kalmalarının sebeplerinden biri de; yaralanan bölgeye göç eden astrosit, meningeal hücreleri ve oligodendrositlerin oluşturduğu kalın glial skar dokusudur. Bu doku nakledilen biyomalzemelerin etkisini engellemektedir. Dolayısıyla MSS'de meydana gelen hasarların PSS'e göre onarımı ve tedavisi zor olmaktadır (Zhang ve Webster, 2009) (Şekil 1.16).



Şekil 1.16. Spinal kord yaralanması sonrası (Mueller ve ark., 2005)

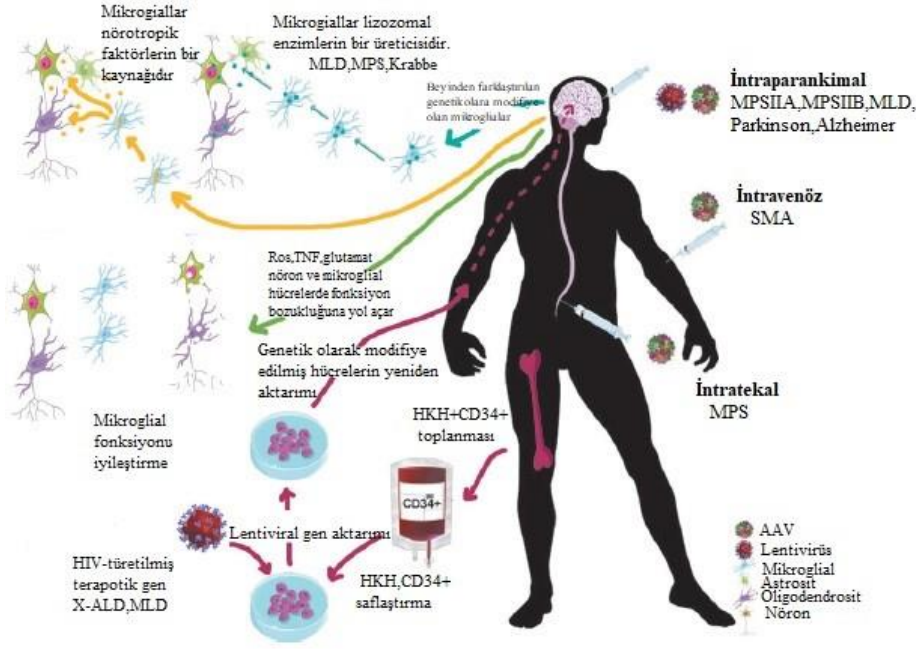
Daha spesifik olarak, SKY'dan kaynaklanan sinir doku tamirinin tedavisi, ilave bir bakım veya yeni medikal tedaviler gerektirmektedir. Çünkü hasar meydana gelmiş

aksonların doğal dokuda bulunan sağlıklı ve hasar görmemiş aksonlara göre önemli ölçüde rejenerasyon kapasitesi düşüktür. Bu sebeple son zamanlarda SDM'de önemli çalışmalar yapılmaktadır. Meydana gelen gelişmeler sayesinde sinir yenilenmesi de alternatif bir alan olarak görülmektedir (Yang ve ark., 2005). Sonuç olarak; MSS hasarlarında, sadece biyomalzeme veya sadece hücrelerin kullanımına ilişkin stratejiler rejenerasyon kapasitesinde yetersiz olduğu görülmektedir. Bu nedenle yönlendirilmiş HDM'ler, hücreler ve çeşitli biyomateryallerin kombinasyonunun, mühendislik tasarımlarıyla beraber aksonal rejenerasyon ve fonksiyonel iyileşmede destekleme potansiyeline sahip olmaktadır. Mevcut girişimlerle daha güvenli ve daha etkili bir sinir dokusu onarımı, nöronal köprüleme cihazları SDM çalışmaları için, oldukça verimli cevaplar almakta ve yeni tasarımlarını araştırmaya odaklanmaktadır. Bu yaklaşımlar sayesinde hasar görmüş bir sinirin yapısını ve fonksiyonelliğini geri getirmek SDM çalışmalarında umut verici olmaktadır (Yücel,2009).

1.5.6. Sinir Sistemi Hastalıklarında Gen Terapisi

Gen tedavisi, genetik materyalin eksikliği sonucunda hedef doku / hücreleri farmakolojik yaklaşımlar ve terapötik gen kombinasyonları ile iyileştirilemeyen hastalıkların tedavisine yönelik çalışmaları kapsamaktadır. Gen terapisi uygulamalarının ilk yıllarında meydana gelen olumsuz sonuçlar son on yılda özellikle kan hastalıkları (primer immün yetmezlikler, hemoglobinopatiler ve hemofili), akciğer hastalıkları, kanser ve nörolojik hastalıkların tedavisi için önemli ilerlemeler kaydetmektedir (Piguet ve ark., 2017).

Sinir sisteminin temel biyolojisi ve nörolojik hastalıkların altında yatan hücresel / moleküler mekanizmalar son yirmi yıl içerisinde kayda değer bir gelişme göstermiştir. Bu gelişmeler sayesinde gen terapisi, tedavisi mümkün olmayan hastalıklara bir çare olarak düşünülmüştür. Özellikle genlerin terapötik salınım mekanizmalarında meydana gelen dejenerasyonlar, eksiklikler ve hasarlar sonucunda gen terapisi uygulamaları, bölgede bulunan hücrelerin yeniden fonksiyon kazanmasını ve yenilenmesini sağlamaktadır. Bununla beraber yapılan moleküler tabanlı çalışmalar ile klinik tedaviler de nörolojik hastalıkların prognozunu (hastalığın seyri) değiştirmiştir (Tuszynski, 2003). Ayrıca gen terapisi, bazı kanser tiplerinin tedavisi için de yeni bir tedavi yaklaşımı olarak görülmektedir (Bentires-Alj ve ark., 2000). Gen tedavisinde virüs tabanlı vektörlerin kullanılması, tedavinin gerek başarısı ve gerekse güvenliği açısından klinik müdahaleler için uygun bir seçenek haline gelmektedir (Şekil 1.17).



Şekil 1.17. Merkezi sinir sistemi hastalıkları için *in vivo* ve *ex vivo* şartlarda gen terapisi (Piguet ve ark., 2017)

In vivo ortamda kullanılan viral vektörler gen taşınmasında sentetik nanopartikül ve lipozom vektörlerinden daha verimli olduğu ve hedef hücrelerin ise birçoğunu etkilediği görülmüştür. Farmakolojik olarak avantajları göz önüne alındığında viral vektörler genomlarına entegre edilen normal bir genin kopyasını getirip arızalı geni değiştirmeyi hedeflemektedir. Böylece hücreden üretilen soy genetik olarak değiştirilmektedir. Vektör olarak kullanılan adeno-ilişkili virüsler nörolojik hastalıkların tedavisi için viral vektörlere göre oldukça önemlidir. Bugünkü çalışmalarda da halen kullanılan ve merkezi sinir sisteminde klinik denemeler için en sık kullanılan viral vektörlerdendir. Hücre bölünmesi ve hücre bölünme sonrasındaki evrelerde hücrelere gen aktarmada aracılık eder fakat genomik entegrasyonu düşüktür. Patojenite veya sitotoksosite göstermez hafif derecede immünojeniteye sahiptir. Bununla birlikte adeno-ilişkili virüs vektörlerinin hayvan deneylerinde yeterince başarılı olamaması, kargo kapasitelerinin düşük olmasından dolayı istenilen doza ulaşamamış ve hedef dağılımı sağlamadaki yetersizliklerden ötürü kullanımını sınırlandırmıştır (Choudhury ve ark., 2017).

Gen tedavileri genel anlamda, merkezi sinir sistemi hastalıkları tedavisi için de dikkat çekici bir alan olarak öne çıkmaktadır. Ancak merkezi sinir sisteminin anatomik konumu, çeşitli sınırlamaları (beyinde sistemik tedaviye izin vermeyen kan-beyin bariyeri sınırı) beraberinde getirirken, kullanılan vektörlerin avantaj ve dezavantajları göz önüne

alındığında nörodejeneratif hastalıkların ve hücre etkileşimlerinin patofizyolojisinin karmaşıklığının yanı sıra çoğu ilaç ve nörocerrahi prosedürleri nörolojik rahatsızlıkları iyileştirilebilecek en zor patolojiler arasındadır (Piguet ve ark., 2017).



BÖLÜM 2

ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Liu ve ark., (2013) tarafından yapılmış bir çalışmada SKY oluşturulan sıçanlar üzerinde spinal kord kaynaklı HADTM olan bir biyomalzeme hazırlamışlardır. Hazırlanan bu biyomalzemeye insan göbek kordonu kaynaklı MKH'ler ekilmiştir. SKY oluşturulan sıçanlara hücreli ve hücreli olmayan üzere biyomalzeme nakledilmiştir. Bütün sıçanların 8 hafta boyunca davranışları Basso-Beattie-Bresnahan testi kullanılarak incelenmiştir. Hücreli nakledilen iskele, hücreli olmayan nakledilen iskeleye göre yara bölgesinde belirgin bir iyileşme olduğunu göstermiştir. 5- Bromodeoksiüridin işaretli göbek kordonu kaynaklı MKH'ler transplantasyondan sonra, iki hafta boyunca davranışları izlenmiş ve konak nöral hücreler (esas olarak oligodendrositler) grefte göç etmişlerdir. Biyotin-dekstran-amin izleme testi ile miyelinli aksonların greft içinde başarılı bir şekilde çoğalıp daha sonra yara bölgelerinde aksonal rejenerasyonu arttırdığı göstermiştir. Sıçanlar üzerinde yapılan bu çalışmada HADTM yaralanma bölgesindeki boşluğu doldurarak köprü görevi görmekte ve ayrıca uzun mesafeli akson rejenerasyonunu ile fonksiyonel bir iyileşme sağladığı görülmektedir (Liu ve ark., 2013).

Ghasemi-Mobarakeh ve ark. (2008), polikaprolakton (PCL) / jelatin materyallerini farklı oranlar kullanarak elektroegirme yöntemi kullanarak doku iskelesi tasarlanmıştır. İskele nanofibrillerinin karakterizasyonu için FTIR, gözeneklilik, temas açısı ve çekme testi çalışmaları yapılmıştır. Ayrıca farklı oranlar kullanılarak hazırlanan PCL / jelatin temelli iskelelerin *in vitro* ortamda bozunma hızları değerlendirilmiştir. *In vitro* ortamda kullanılan sinir kök hücreleri (C17.2 hücreleri) için en uygun iskele oranı PCL / jelatin 70:30 olarak bulunmuştur. Bunun yanı sıra, C17.2 hücre hattının iskele üzerindeki farklılaşması ve proliferasyonu incelenmiştir. Hücre adezyon testi ve SEM sonuçlarında PCL / jelatin 70:30 oranlarındaki doku iskelesinin, PCL temelli doku iskelesiyle karşılaştırıldığında; PLC / jelatin 70:30 oranında kullanılan nanofiberlerin biyokompozisyonu hücrelerin proliferasyonunda sinir kök hücrelerinin farklılaşmasında ve aksonların uzamasında pozitif bir etkisi olduğu görülmüştür (Ghasemi-Mobarakeh ve ark., 2008).

Medberry ve ark. (2013), beyin ve spinal kord HDM'ni hidrojel formuna getirip elde ettikleri malzemenin biyokimyasal kompozisyonunu, mekanik özelliklerini değerlendirmişlerdir. Daha sonra beyin türevli bir hücre hattı kullanarak bu malzemelerin nörotropik potansiyellerini idrar kesesi HDM ile karşılaştırmışlar ve sonuçlarda da kullanılan her üç matriks yapısında da belirgin farklılıklara rastlamışlardır. Özellikle hidrojel

formdaki spinal kord HDM' nin reolojik modülü beyin HDM ve idrar kesesi HDM'den daha yüksek çıkmıştır. Tüm HDM' lerde aksonları ifade eden hücrelerin sayısında bir artış olduğu görülmüş, ancak sadece beyin HDM'de akson uzunluğunun arttığı, bunun sebebinin ise dokunun kendine özgü bulundurduğu spesifik etkileşimler olduğu öne sürülmüştür. 7 gün süren kültür süresi sonunda tek ve iki kutuplu akson uzamasını tüm hidrojellerin desteklediği görülmüş olup, spinal kord HDM' nin *in vivo* ortamda aksonal tamiri teşvik etmede destek bir iskele olduğu görülmüştür (Medberry ve ark., 2013).

Zhang ve ark. (2010) sinir rejenerasyonu için zenojenik hücrelerinden arındırılmış sinir temelli matrikse; otolog (hasta sıçandan) kaynaktan aldıkları AMKH'leri entegre ederek bir *in vivo* çalışma gerçekleştirmişlerdir. Ksenojenik sinir matriksi bazı aşamalardan geçirilerek, yapıda var olan miyelin kılıf ve hücreler matriksten tamamen uzaklaştırılmıştır. Bu işlemler ksenojenik sinir matriksinin doğal yapısını bozmadan (büyüme faktörlerini matriksin mimarisini, gözenekliliğini ve bazal laminasını) yapılmıştır. Ksenojenik hücrelerinden arındırılmış sinir temelli matriksin, hücrelerin çoğalması, tutunması ve proliferasyonunu desteklediği ayrıca immünojenik reddetme tepkisinin de oluşmadığı görülmüştür. Ksenojenik hücrelerinden arındırılmış sinir temelli matriks üzerine hasta sıçandan alınan AMKH ekildikten sonra sinir hücrelerine farklılaştırılmış ve sonrasında hücrelerden sürekli olarak sinir büyüme faktörü, glial hücre hattından köken alan nörotropik faktörlerden ve beyinden köken alan nörotropik faktörlerin kalıcı şekilde ekspresyonu gözlenmiştir. Transplantasyondan 7 gün sonra glial hücreleri tarafından sinir rejenerasyonu başlamıştır. 1cm'lik siyatik sinir defekti oluşturulan farede bu sinir boşluğu yenilenmesi elektrofizyolojik ve histolojik analizlerle gösterilmiştir (Zhang ve ark., 2010).

Baiguera ve ark. (2014) sinir doku mühendisliğinde kullanılmak üzere iki çeşit biyomalzeme geliştirmişlerdir. Biri *in vitro* şartlarda elektroğirme yöntemiyle yaptıkları jelatin temelli iskele diğeri ise sıçan beyninin HDM' ni içeren HADTM' dir. Bu iki malzemeye ektikleri allojenik mezenkimal stromal hücreler ile malzeme içinde hücrelerin tutunmasını, yayılmasını, proliferasyonunu incelemişlerdir. HADTM dışarıdan herhangi bir müdahale olmadan beyindeki yaralamayı ve doku rejenerasyonunu teşvik ettiği görülmüştür. Hasarlı olan kısımda hücrelerin sağ kalımı, çoğalması, nöronal farklılaşma, hücrelerin migrasyonu, iyonik denge ve beslenme homeostazın düzenlenmesinde HADTM yapısının rolü büyük olduğu görülmüştür. Aslında jelatin tabanlı hazırlanmış iskelenin işleme özellikleri HADTM'e göre daha avantajlı olmasına rağmen hücreler, HADTM'i kendi mikroçevreleri olarak görmektedir. Dolayısıyla yeni doku rejenerasyonuna olanak sağlanmaktadır. Jelatin iskele hem genipin ile çapraz bağlı olduğu için hem de HADTM

yapısında bulunan özel bileşenleri içermediğinden hücre tutunması yayılması ve proliferasyonuna izin vermemiştir. Tüm bu sonuçlar da SEM mikrografları ile Hematoksilen-Eozin ve 4',6-Diamidino-2-fenilindol dihidroklorür boyamalarıyla gösterilmiştir (Baiguera ve ark., 2014).

Jiang ve ark. (2013) doku mühendisliği uygulamaları için sıçan spinal kordu kullanılarak deselülerizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Deselülerizasyon %1 Triton X-100 ve %1 Sodyum deoksikolat gibi kimyasalların farklı kombinasyonlarıyla gerçekleştirilmiştir. Deselülerizasyon işleminden sonra spinal kord genipin ve gluteraldehit ile çapraz bağlama gerçekleştirilmiştir. Genipin ile çapraz bağlı deselülerize spinal kord ortalama gözenek çapı 31,10 μm ve porozite %81 olarak belirlenmiştir. Gluteraldehit ile çapraz bağlanan spinal kordun gözenek çapı 32,80 μm ve porozite %82 bulunmuştur. Ayrıca malzemelerin su tutma kapasiteleri de belirlenmiştir. Genipin ile çapraz bağlanan iskelelerde su tutma kapasitesi %229 iken gluteraldehit ile bağlanan iskeleler %220 olarak bulunmuştur. Genipin ile çapraz bağlı spinal kord iskelelerin maksimum gerilme mukavemeti ve elastik modülü, $0,19 \pm 0,06$ MPa ve $1,54 \pm 0,08$ MPa olarak belirlenirken, gluteraldehit ile çapraz bağlı spinal kord iskelelerin maksimum gerilme mukavemeti ve elastik modülü $0,22 \pm 0,02$ MPa ve $1,53 \pm 0,07$ MPa belirlenmiştir. Gluteraldehit ile çapraz bağlanmış HADTM'ler ve genipin ile çapraz bağlanmış HADTM'ler karşılaştırıldığında, her iki matriksin yapısı da benzer mikroyapı ve mekanik özellikler göstermekle birlikte sitotoksosite sonuçları ise kullanılan MKH'lerin iskele üzerinde yüksek biyouyumluluk gösterdiği belirlenmiştir. Hücreler, birbirine çapraz bağlanmış iskele içinde gözenekli yapı boyunca tüm yüzeylere göç etmiştir. Genipinin düşük sitotoksitede olması sebebiyle iskele üzerinde 7 gün içinde hücre proliferasyonu ve HDM salgısını *in vitro* ortamda oldukça kolaylaştırmıştır. Dolayısıyla, genipin ile çapraz bağlı spinal kord iskeleleri, doku mühendisliği uygulamaları için büyük umut vermektedir (Jiang ve ark., 2013).

BÖLÜM 3

MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. DeneYlerde Kullanılan Materyaller ve Cihazlar

Sığır spinal kordu Balıkesir ilinde veteriner kontrolü altında kesimi yapılan sağlıklı sığırlardan temin edilmiş, soğuk zincirle 4-5 saat içerisinde laboratuvara ulaştırılmıştır. (Bu işlem için etik kurul izni gerekmemektedir.)

Hücrelerinden arındırma işlemi için kullanılan kimyasallar Sigma-Aldrich'ten temin edilmiştir. Sığır spinal kordunun ve hücrelerinden arındırılan spinal kordun DNA içeriği satın alınan kit (Thermo Scientific, GeneJET), hidroksiprolin miktarı hidroksiprolin test kiti (Sigma-Aldrich, Almanya) ile belirlenmiştir. Biyoiskele haline getirilmiş spinal kordun dayanıklılığını arttırmak amacıyla çapraz bağlama işlemi N-hidroksi süksinimit (NHS) (Sigma Aldrich) ve N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil) karbodiimit hidroklorür (EDC) (Merck) ile gerçekleştirilmiştir.

iAMKH'ler (Merck-Millipore, lot no: QVP1303200) hücre kültürü çalışmaları için satın alınmıştır. Kök hücrelerin çoklu soy farklılaşma potansiyellerinin belirlenmesi için osteogenezis (Gibco, A10066-01), kondrogenezis (Gibco, A10064-01) ve adipogenezis (Gibco, A10064-01) kitleri kullanılmıştır. Osteojenik farklılaşmanın histokimyasal karakterizasyonu için Alizarin Red S (Sigma Aldrich, A5533) boyası, kondrojenik farklılaşmanın histokimyasal karakterizasyonu için Safranin O (Sigma Aldrich, S8884) ve Alcian Blue 8gX (Sigma Aldrich, A3157) boyları, adipojenik farklılaşmanın histokimyasal karakterizasyonu için Oil Red O (Sigma Aldrich, A0625) boyası kullanılmıştır. Hücre kültürü çalışmalarında kök hücreler için steril doku kültür kapları (Corning, NY, ABD) ve özel bir besiyeri (Merck-Millipore Human Mesenchymal –LS Supplement Kit, Lot: 2395792) kullanılmıştır. Ayrıca iAMKH'lerin pasajlanma işlemi için tripsin/EDTA çözeltisi (Sigma Aldrich) kullanılmıştır. İskeleler üzerindeki hücre canlılığı ve çoğalma düzeyleri MTT testi (Sigma Aldrich) ile belirlenmiştir.

DeneYlerde (Tip I ve Tip III) Merck-Millipore marka Milli Q model saf su sistemi kullanılmıştır. Çözeltilerin karıştırılma işlemleri için çoklu karıştırıcı (Jeiotech, Kore) kullanılmıştır. Tampon ve çözeltilerin pH ölçümleri için (Mettler Toledo, ABD) pH metre, istenmeyen maddelerin uzaklaştırılması ve safsızlıkları önlemede (Hettich Micro120, Almanya) santrifüj, gerekli tartımlar için (Shimadzu ATX224, Japonya) hassas terazi kullanılmıştır. Çözeltilerin ve tamponların hazırlanmasında (Elma S 30H, Almanya)

ultrasonik banyo kullanılmıştır. Hidroksiprolin, GAG ve DNA içerik analizi için (Shimadzu UVmini-1240, Japonya) spektrofotometre kullanılarak belirlenmiştir. İskelelerin düzgün ve homojen bir şekilde hazırlanması için homojenizatör (IKA T-18 Basic Ultra TURRAX, Almanya) kullanılmıştır. Biyoiskelelerin gözenekli bir hale gelebilmesi için (Telstar LyoQuest, İspanya) liyofilizatör (dondurma-kurutma) kullanılmıştır. Hücrelerinden arındırma için uygun sıcaklık ve çalkama işlemleri (Incu-Shaker Mini Benchmark, ABD, Lot:13N205BC160) kullanılmıştır. Spinal kord ve hücrelerinden arındırılmış iskelelerde bulunan proteinlerin ve nükleik asitlerin karakterizasyonu için agoroz jel ve SDS-PAGE jel elektroforezi analizleri yapılmıştır. Bunun için (Thermo Dual-Gel Vertical Electrophoresis Systems P8DS, MA, ABD) jel sistemi kullanılmıştır. Agoroz jel elektroforezi için (Thermo Owl EASYCAST B1, ABD) marka jel sistemi kullanılmıştır. Jel görüntüleme, (Biorad Gel Doc XR+, ABD) jel görüntüleme cihazından alınmıştır. Üretilen biyoiskeleler ve spinal kord derin dondurucuda (Siemens KG57NPW24N, Almanya) saklanmıştır. Biyoiskelelerin karakterizasyonu için FTIR (Shimadzu IRAffinity-1, Japonya) ve TGA analizi (Shimadzu DTA60, Japonya) yapılmıştır. Biyoiskelelerin dayanıklılığını ölçmek için mikro mekanik test (Cell Scale, Kanada) yapılmıştır. Biyoiskeleler üzerinde hücrelerin canlılığı ve çoğalma düzeyleri spektroskopik olarak mikro plaka okuyucu (Thermo-Scientific, Multiskan™ mdrop™ plate, ABD) kullanılarak ölçülmüştür. Hücre kültürü ile ilgili çalışmalarının tamamı Class II A-2 laminar akışlı kabinde (Panasonic MCO-18AC-PE, Japonya) gerçekleştirilmiştir. Kök hücreler %5 CO₂, %95 hava, %90 bağıl nem, 37 °C'da sıcaklık sağlayan inkübatörde (Telstar Bio II Advance, İspanya) kültüre edilmiş, mikroskopik görüntüleme invert faz-kontrast mikroskobu ve (Zeiss, Primovert, Almanya) ışık mikroskobu (Zeiss, Primostar, Almanya) kullanılmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Sığırdan Spinal Kord Çıkartılması

Sığır spinal kordu 16 aylık alaca renk erkek sığır türünden torakal 2-11 bölgesi alınmış ve soğuk zincirle 4-5 saat içinde laboratuvara ulaştırılmıştır. Laboratuvara getirilen spinal kord ultra saf su ile yıkandıktan sonra -26 °C'da saklanmıştır.

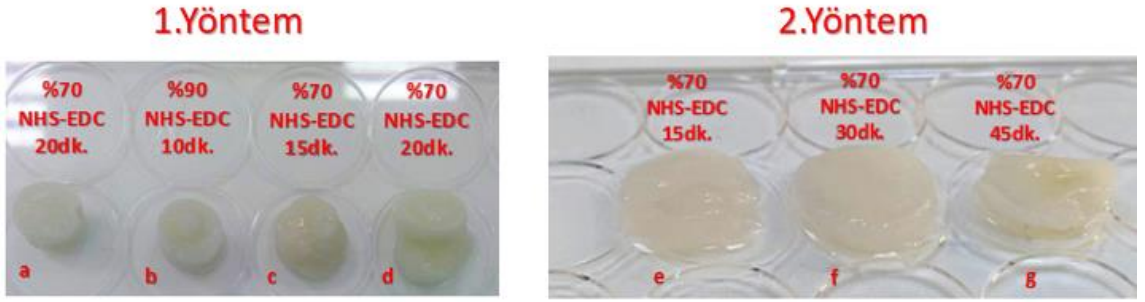
3.2.2. HDM-temelli Sığır Spinal Kord İskelelerin Hazırlanması

Sığırdan izole edilen spinal kord literatürde yer alan yöntemler ile kıyaslama yapıp Erten ve ark. (2016)'nın yapmış oldukları çalışmanın modifiye edilmesiyle yeni bir deselülerizasyon yöntemi geliştirilmiştir. Bu amaçla ilk olarak spinal kord saran meninks,

kord üzerinden temizlenerek uzaklaştırıldı. Ardından spinal kord homojenizasyon işlemi için yaklaşık 2 mm boyutunda olan küçük parçalara bölündü. Islak formda olan spinal kord parçaları hassas terazide yaklaşık 5 gram tartıldı ve ardından doku parçaları ultra saf su ile yıkanarak üzerinde olabilecek kalıntılar dokudan uzaklaştırıldı. Doku parçalarının üzerine 0,1 M NaOH çözeltisi eklenerek toplam hacim 30 mL olacak şekilde, 10000 rpm, 15 dakika boyunca homojenizasyon işlemi gerçekleştirildi. Hazırlanan jel kıvamındaki çözelti özel polipropilen kalıplara ve her bir kalıp için 200 µL çözelti hacmi olacak şekilde dökülmüştür. HDM-temelli spinal kord iskeleleri özel kalıplara döküldükten sonra bir gece boyunca -26 °C'da donmaya bırakılmıştır. Daha sonra liyofilize edilerek üç boyutlu gözenekli iskeleler elde edilmiştir.

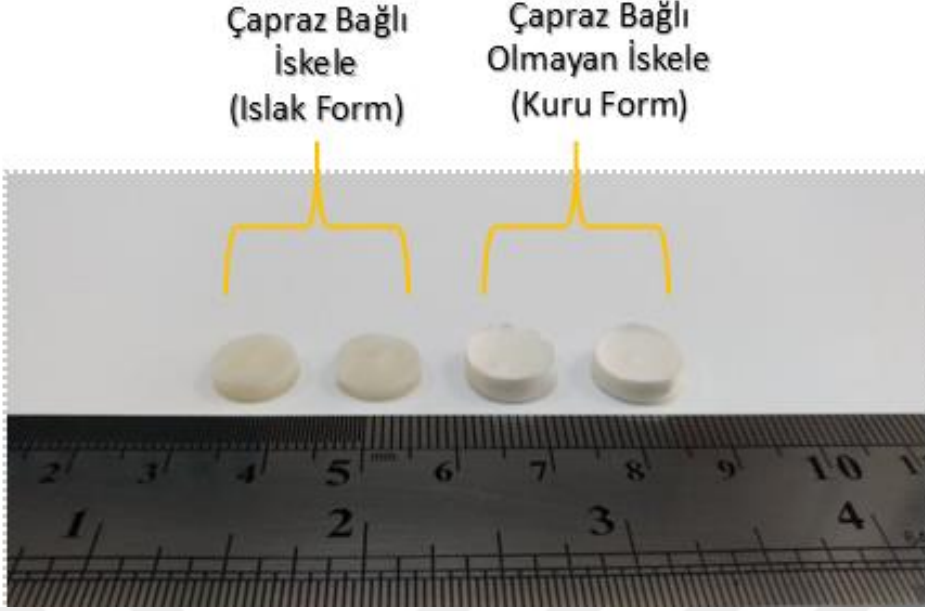
İskelelerin dayanıklılığını arttırmak amacıyla NHS ve EDC gibi kimyasallar kullanılarak çapraz bağlama işlemi gerçekleştirilmiştir. Çapraz bağlama işlemi, Sezgin Arslan (2016) tarafından yapılan çalışmadaki prosedür modifiye edilerek uygulanmıştır. Öncelikle prosedür için gerekli çözeltiler hazırlanmıştır. Bunun için 0,05 M 2-morfolinoetansülfonik asit (MES) tamponu ultra saf suda çözünmüş ve pH'sı 5,5'e ayarlanmıştır. Hazırlanan çözeltilerle iki farklı yöntem oluşturularak çapraz bağlama prosedürleri uygulanmıştır. 1. yöntemde a, b, c ve d olmak üzere farklı çapraz bağlama işlemi gerçekleştirilmiştir. 75 mg olarak tartılan iskeleler %99,99'luk etanolde 30 dakika bekletilmiştir. Ardından tampon çözelti ve %99,99'luk etanol, 3:7 oranında karıştırılmıştır. 1 mL çapraz bağlama çözeltilerinde 6,72 mg NHS, 13,8 mg EDC olacak şekilde çapraz bağlayıcı çözelti hazırlanmıştır. Bu oranlara göre iskeleler üzerindeki alkol atılıp, üzerine 2'şer mL çapraz bağlama çözeltisi eklenerek 20 dakika hafif çalkalama yapılarak oda sıcaklığında inkübe edilmiştir (Şekil 3.1.a). Şekil 3.1.b'de %99,99 etanolde 30 dakika bekletilen iskeleler üzerinden alkol atılıp, tampon çözeltisi ve etanol oranı 1:9 olacak şekilde hazırlanmış 1 mL çapraz bağlayıcı çözelti içinde (NHS-EDC oranı 6,72 mg-13,8 mg) 10 dakika hafif çalkalama yapılarak çapraz bağlanmıştır. Şekil 3.1.c ve Şekil 3.1.d'deki işlemlerde %99,99 etanolde bekletilen iskeleler ardından tampon çözeltisi ve etanol, 3:7 oranında karıştırılmıştır. 1 mL çapraz bağlama çözeltilerinde 6,72 mg/13,8 mg oranında NHS-EDC bulunmaktadır. Bu oranlara göre iskeleler üzerindeki alkol atılıp, üzerine 2'şer mL çapraz bağlama çözeltisi eklenerek 15 ve 20 dakika boyunca çapraz bağlama yapılmıştır. Şekil 3.1.a'da 30 dakika çapraz bağlanan iskelelere aynı çapraz bağlama prosedürü uygulanarak 1, 2, 3, 5 saat gibi farklı süreler belirlenerek de çapraz bağlama çalışmaları yapılmıştır. 2. yöntemde Buttafoco ve ark. (2006) yapmış olduğu prosedür modifiye edilerek çapraz bağlama işlemi gerçekleştirilmiştir. 2. yöntem için iskeleler 25 mg tartılarak

kullanılmıştır. Buna göre 0,05 M MES tamponu %70 etanol içinde çözdürülmüştür. 215 mL MES/g örnek oranında MES çözeltisi hazırlanmıştır. Çapraz bağlayıcı oranları ise 1 g örnek için NHS miktarı 0,56 g ve EDC miktarı 2,3 g olarak MES tamponu içinde hazırlanmıştır. Bu oranlara göre iskeleler %99,99'luk etanolde 30 dakika tutulup sonrasında 2. yöntemdeki oranlara göre hazırlanan NHS-EDC çapraz bağlayıcı çözeltisi ile muamale edilmiştir. Buna göre 15, 30 ve 45 dakikalık sürelerle çapraz bağlanmıştır (Şekil 3.1.e) (Şekil 3.1.f) (Şekil 3.1.g).



Şekil 3.1. Spinal kord iskeleleri çapraz bağlama yöntemleri

Birinci ve ikinci yönteme göre gerçekleştirilen tüm çapraz bağlama işlemleri oda sıcaklığında ve hafif çalkalama yapılarak gerçekleştirilmiştir. Ardından iskeleler üzerindeki çapraz bağlayıcı çözelti atılıp, saf suda bir saat yıkama işlemine geçilmiştir. Çapraz bağlı olmayan iskelelerin yüksekliği 3 mm ve çapı ise 8 mm olarak ölçülürken çapraz bağlanan iskelelerin yüksekliği 1,2 mm, çapı 6 mm olarak ölçülmüştür (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Çapraz bağlı ve çapraz bağlı olmayan spinal kord iskeleleri

3.2.3. Spinal Kord Deselülerizasyonu

Sığır spinal kordun hücrelerinden arındırılması için 8 farklı yöntem denenmiştir. İlk olarak hipotonik çözelti için; 10 mM Trizma hidroklorür (Trizma HCl) ve 5 mM EDTA çözeltisi hazırlanmıştır. Trizma HCl ve EDTA ultra saf suda çözülmüş ve pH: 8,0 ayarlanmıştır. Sonrasında ham dokudan alınan spinal kord parçaları bu çözelti içinde 24 saat boyunca muamele edilmiştir. Ardından hipertonik çözelti için Trizma HCl ve EDTA ultra saf suda çözülmüş ve 50 mM Trizma HCl, 5 mM EDTA pH: 8,0 olacak şekilde çözeltiler hazırlanarak, 24-96 saat arası hipertonik çözeltiyle maruz bırakılmıştır.

2. yöntemde dokular hipotonik (10 mM Trizma HCl ve 5 mM EDTA pH: 8,0) çözeltide 24 saat muamele edilmiş ve sonra içinde %0,1 Tri-n-bütil fostat (v/v) içeren hipertonik (50 mM Trizma HCl, 5 mM EDTA pH: 8,0) çözeltide 96 saat boyunca çalkalamaya bırakılmıştır. Ardından 3 tur sodyum klorür içeren fosfat tamponu (PBS) (pH: 7,4) ile 1,5 saat yıkanmıştır.

3. yöntemde hipotonik (10 mM Trizma HCl ve 5 mM EDTA pH: 8,0) ortamda 48 saat boyunca çalkalanan dokular ardından içinde %0,1 Tri-n-bütil fostat (v/v) içeren hipertonik (50 mM Trizma HCl, 5 mM EDTA pH: 8,0) çözeltiye 48 saat boyunca maruz kalmıştır. 48 saatin sonunda kalan doku parçaları 3 tur PBS ile yıkanmıştır.

4. yöntem için hipotonik (10 mM Trizma HCl ve 5 mM EDTA pH: 8,0) çözeltide 48 saat kalan spinal kord doku parçaları, içinde %0,1 Tri-n-bütil fostat (v/v) içeren hipertonik (50 mM Trizma HCl, 5 mM EDTA pH: 8,0) çözeltide 96 saat boyunca kalarak hücrelerinden

arındırma işlemine tabi tutulmuştur. Ardından doku parçaları 24 saat boyunca yıkamaya bırakılmıştır.

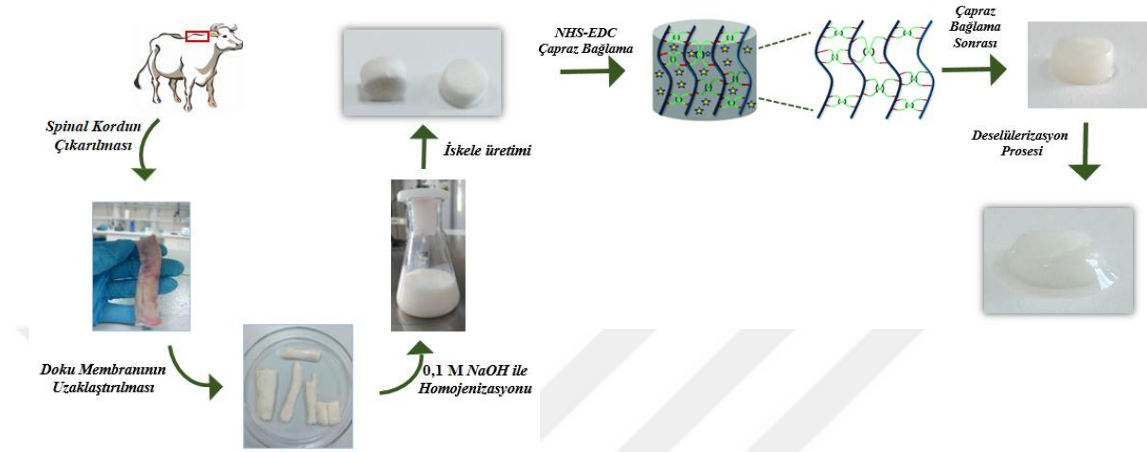
5.yöntemde dokular 0,1 M NaOH ile homojenizasyon işlemine tabi tutulup özel polipropilen kalıplara dökülerek biyoiskele formuna dönüştürülmüştür. Ardından biyoiskelelere 1. çapraz bağlama yöntemine göre 5 saat çapraz bağlama prosedürü uygulanmış ve hücrelerinden arındırma işlemine geçilmiştir. 5. yöntemdeki işlemlerde iskeleler hipotonik (10 mM Trizma HCl ve 5 mM EDTA pH: 8,0) ortamda 96 saat kalmıştır. Ardından iskeleler üç ayrı deterjan prosedürü ile ayrı ayrı hücrelerinden arındırılmaya çalışılmıştır. Birincisinde %0,1 Triton X-100 (v/v) içeren hipertonik çözelti (50 mM Trizma HCl, 5 mM EDTA pH: 8,0) 48 saat, ikincisinde %0,1 SDS (w/v) içeren hipertonik çözelti (50 mM Trizma HCl, 5 mM EDTA pH: 8,0) 48 saat ve üçüncüsünde %0,5 SDS (w/v) içeren hipertonik çözelti (50 mM Trizma HCl, 5 mM EDTA pH: 8,0) 48 saat boyunca çalkalamaya bırakılmıştır. 48 saatin sonunda iskeleler iyice deterjandan arındırılarak bolca ultra saf suda yıkanmıştır.

6. yöntemdeki işlemlerde 1. çapraz bağlama yöntemi kullanılarak iskeleler 2 saat çapraz bağlanmışır. Çapraz bağlı olan biyoiskeleler hipotonik (10 mM Trizma HCl ve 5 mM EDTA pH: 8,0) ortamda 72 saat çalkalamaya bırakılıp, ardından içerisinde %0,1 SDS (w/v) bulunan hipertonik çözelti (50 mM Trizma HCl, 5 mM EDTA pH: 8,0) içerisinde 96 saat boyunca muamele edilmiştir. Bu işlemin ardından iskeleler PBS ile 2 saat çalkalanmış ve sonra 2 gün ultra saf su ile yıkanmıştır.

7. yöntemde iskeleler 1.çapraz bağlama yöntemine göre 2 saat çapraz bağlanmışır. Çapraz bağlı iskeleler %1 Sodyum deoksikolat (w/v) içeren hipertonik (50 mM Trizma HCl ve 5 mM EDTA pH: 8,00) çözeltide 72 saat çalkalamaya bırakılmıştır. 72 saat sonra hipertonik ortamdan alınan iskeleler 2 gün ultra saf su ile yıkanmıştır. Sonrasında iskelelere %4 etanol (v/v) ve %0,1 perasedik asit (v/v) içeren sulu çözelti ile 5 saat boyunca dekontaminasyon işlemi uygulanmıştır.

8. yöntemde 2.çapraz bağlama yöntemi kullanılarak iskeleler 10 dakika çapraz bağlanmışır Şekil 3.3. Sonrasında içerisinde %1 SDS (w/v) bulunan hipertonik (50 mM Trizma HCl, 5 mM EDTA pH: 8,0) çözelti içinde 72 saat çalkama işlemine maruz bırakılmıştır. 72 saat sonunda iskeleler 2 gün boyunca ultra saf su ile yıkanmışlardır. Ardından iskeleler 10 mM MgCl ve 50 mM Trizma pH: 7,5 olacak şekilde tamponda hazırlanmış DNAaz (Deoksiribonükleaz) (200 µg/mL) ve RNAaz (Ribonükleaz) (50 µg/mL) çözeltileri ile 24 saat boyunca 37,5 °C'da muamele edilmiştir. Daha sonra iskeleler 2 gün ultra saf su ile yıkanmıştır. Yıkama işlemi sonrasında iskeleler, %4 etanol (v/v) ve

%0,1 perasedik asit (v/v) içeren sulu çözeltisi ile 5 saat boyunca dekontaminasyon işlemine tabi tutulmuştur. Dekontaminasyon işleminin ardından iskeleler ultra saf su ile 24 saat yıkanmıştır. Yıkanan dokular liyofilizasyon işlemi için 24 saat boyunca -26°C’de donmaya bırakılmıştır. Ardından iskeleler liyofilize edilmiştir.



Şekil 3.3. Spinal kord biyoiskele, çapraz bağlama ve hücrelerinden arındırma prosesi

3.2.4. DNA İçerik Analizi

Deselülerize spinal kord iskeleleri ve herhangi bir işleme maruz bırakılmamış ham doku spinal kord steril koşullarda kesilerek DNA içerik analizi yapılmıştır. DNA içerik analizi için satın alınan kit (Thermo Scientioc, GeneJET) talimatları uygulanmıştır. 260 nm ve 280 nm dalga boyunda ölçümleri alınarak ortalama DNA konsantrasyonu ve saflığı aşağıdaki 3.1’deki eşitliğe göre hesaplanmıştır.

$$DNA\ konsantrasyonu\ \left(\frac{\mu g}{mL}\right) = (A_{260} - A_{320}) \times 50 \left(\frac{10}{0,51}\right) \quad (3.1)$$

3.2.5. GAG Tayini

Sülfatlanmış GAG miktarı Erten ve ark. (2016) tarafından belirlenen yöntem ile tespit edilmiştir. 8.yöntem ile hücrelerinden arındırılan ve ham doku spinal kord örnekleri 65 °C’da blok ısıtıcı yardımıyla bir gece boyunca papain çözeltisi (100 mM Na₂ HP0₄, 10 mM Na₂ EDTA, 10 mM L-sistein ve 0,125 mg/mL papain, ultra saf su içinde pH 7,5) ile hafifçe çalkalanarak sindirilmiştir. Papain reaktifi 100 °C’da 10 dakika bekletilerek inaktive edilmiştir. Ardından doku örnekleri 1,9-Dimetil-Metilen mavisi boya reaktifi ile muamele edilmiştir. Sonrasında 525 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçümü

gerçekleştirilmiştir. 3.2’de verilen denkleme göre GAG içeriği hesaplanmıştır (Erten ve ark., 2016).

$$GAG \text{ kuru ağırlık } \left(\frac{\mu g}{mg} \right) = \left[\left(\frac{OD525}{Eğim} \right) \times (Seyreltme \text{ Faktörü} \times Toplam \text{ Hacim}) \right] \div (Spinal \text{ Kord Dokusu}(mg)) \quad (3.2)$$

3.2.6. Hidroksiprolin Tayini

Ham doku ve 8.yönteme göre hücrelerinden arındırılan biyoiskele örneklerinin hidroksiprolin miktarının belirlenmesi için satın alınan hidroksiprolin testi (Sigma-Aldrich, Almanya) kullanılmıştır. Hücrelerinden arındırılmış spinal kord ve ham doku 5 mg tartılarak, 100 µL 12 M HCl ve 100 µL ultra saf su içerisinde 120 °C’da 3 saat hidrolize edilmiştir. Hidroliz edildikten sonra kömür haline gelen örneklerdeki partiküllerin uzaklaştırılması için 14000 rpm’de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Örnekler hazır duruma geldiğinde hidroksiprolin kiti uygulanmış ve 96 kuyucuklu plakaya 2 µL örneklerden konularak 60 °C’lık etüvde kurutulmuştur. Hidroksiprolin miktarının tam bir şekilde belirlenebilmesi için spike kullanılmıştır. Devamında kloramin T/oksidasyon tampon karışımı ve 4-(Dimetilamino) benzaldehit eklenmiş ve inkübasyona bırakılmıştır. Bekleme süresinin ardından spektrofotometrik olarak 560 nm dalga boyunda ölçümü alınmış ve hidroksiprolin konsantrasyonu aşağıda verilen denkleme göre hesaplanmıştır (3.3).

$$Hidroksiprolin \text{ Miktarı} = \frac{(A560)_{numune}}{((A560)_{spike \text{ kontrol}} - (A560)_{numune})} \times 0,4 (\mu g) \quad (3.3)$$

3.2.7. Agaroz Jel Elektroforezi

Agaroz jel elektroforezi DNA moleküllerinin ayrımı, tanımlanması ve saflaştırılması için kullanılan standart bir yöntemdir. Belirli büyüklükteki bir DNA parçası agarozun konsantrasyonuna bağlı olarak jel içinde farklı hızlarda hareket etmektedir. Bu metoda göre öncelikle Tris-Borik asit EDTA (TBE) (1X) (pH: 8,3) tamponu Çizelge 3.1’e göre hazırlanmıştır.

Çizelge 3.1. TBE Tamponu hazırlamak için kullanılan kimyasallar

Tris-Borik asit EDTA tamponu (1X) (pH:8,3)	
Tris 10,8 gram	Na ₂ EDTA 0,94 gram
Borik asit 5,5 gram	Ultra saf su 1000 mL

%1,5'lük 60 mL agoroz jel için 24 g agoroz 60 mL TBE tamponu içinde hafifçe çalkalanarak karıştırılır. Sonrasında örnek mikrodalga fırına konulup kaynamaya başlayana kadar çalıştırılır. Aralıklarla örnek mikrodalgadan çıkarılıp çalkalanmaktadır. Tamamen eriyene kadar bu işleme devam edilmektedir. Hazırlanan çözelti 50 °C'a kadar soğutulup içerisine 3 µL Red Safe (Intron Biotechnology) eklenerek yavaşça pipetlendi ve çözelti, tarakları yerleştirilen jel tankına dökülmüştür. Çözeltinin polimerize olması için 1 saat oda sıcaklığında bekletilmiştir. 1 saatin sonunda tarak çıkartılmış ve örneklerin jele yüklenmesi için örnek yükleme tamponu Çizelge 3.2'ye göre hazırlanmıştır.

Çizelge 3.2. Örnek yükleme tamponu hazırlamak için kullanılan kimyasallar

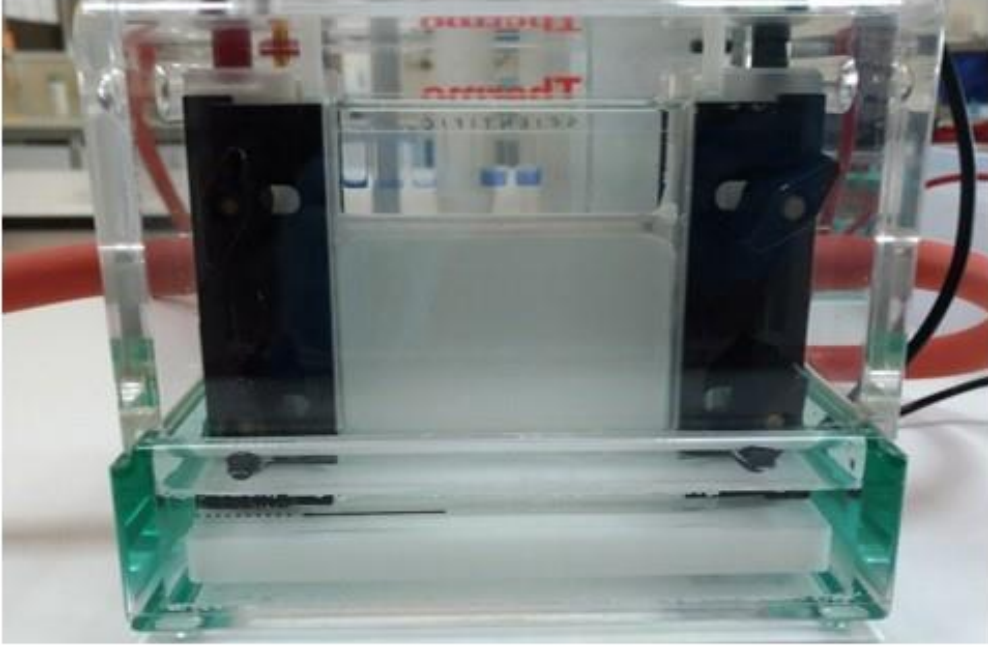
Örnek Yükleme Tamponu	
Bromfenol Mavisı 250 mg	Sükroz 40 gram
--	Ultra saf su 100 mL

Buna göre jel tanka yerleştirilmiştir. Tank jelin üstünü kapatacak kadar TBE tamponu ile doldurulmuştur. Küçük bir parça parafilm kesilerek yükleme tamponundan 2 µL, hücrelerinden arındırılmış iskele ve ham doku için 12 µL olacak şekilde karıştırılarak jele yüklenmiştir. Bir kuyucuğa da marker konularak 300 volt 15 miliampere sabitlenen güç kaynağı 10°C'ta 2 saat yürütülmüştür. Ardından DNA'nın jeldeki konumu UV ışık altında Biorad görüntüleme cihazı ile belirlenmiştir.

3.2.8. SDS PAGE Analizi

Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrez (SDS-PAGE) proteinleri moleküler büyüklüklerine göre birbirinden ayırmayı sağlayan ve proteinlere özgü spesifik bantları göstermede kullanılan bir elektrofrez yöntemidir. Genellikle moleküller izoelektrik noktalarına ve büyüklüklerine göre ayrılmaktadır. SDS-PAGE analizi en fazla kullanılan metotlardan biri olan Laemmli (1970) metoduna göre yapılmıştır. Bu metoda göre; 8.yöntem ile hücrelerinden arındırılan spinal kord iskeleleri, spinal kord ham dokusu, Sığır serum albumin (BSA), sıçan kuyruğu tip I kollajeni için %12'lik ayrıştırıcı jel ve %4'lük yükleme jeli hazırlanmıştır. Jel prosedürü ve kullanılacak çözeltiler Çizelge 3.3'de gösterilmiştir.

BSA için konsantrasyonu 0,2 mg/mL olacak şekilde ultra saf su içerisinde, sıçan kuyruğu tip I kollajenin konsantrasyonu 10 mg/mL olacak şekilde 0,1 M asedik asit çözeltisi içinde hazırlanmıştır. Hücrelerinden arındırılmış spinal kord ve ham dokunun çözünür proteinlerinin eldesi Gil-Dones ve ark. (2009) metoduna göre yapılmıştır. Bu metoda göre 300 mg ham doku ve 60 mg hücrelerinden arındırılmış spinal kord kullanılmıştır. Çözünür proteinlerin eldesi için bir ekstraksiyon çözeltisi (10 mM Trizma pH: 7,5, 500 mM NaCl (w/v), %0,1 Triton X-100 (v/v), %1 β -mercaptoetanol (v/v) hazırlanmıştır. Ardından ham doku ve hücrelerinden arındırılmış doku için 300 μ L ekstraksiyon çözeltisinden eklenerek iyice vortekslenmiştir. Numuneler 5 dakika ultrasonik banyoda tutulmuş ve sonra 1 gece çalkalamaya bırakılmıştır. Bu işlem tamamlanınca 4 °C'da 10 dakika inkübasyona bırakılmış ve sonra 14000 rpm'de 30 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant kısmından örnekler alınmıştır. Ham doku ve hücrelerinden arındırılmış biyoiskeleler için çözünür protein konsantrasyonu 0,1 mg/ μ L olacak şekilde ayarlanmıştır. Örnekler hazırlandıktan sonra jel sistemi ve jel tankı düz bir zemin üzerine yerleştirilmiştir. Sonrasında %12'lik ayırma jeli hazırlanmış jelin hava almaması ve düzgün polimerleşmesi için %99,9 izopropil alkol ilave edilmiştir. 1 saat sonunda polimerleşen jelin üzerindeki alkol dökülmüş ve ayırma jel overlay çözeltisi ile 2 defa yıkanmıştır. Ardından jel filtre kâğıdı ile iyice kurulanmıştır. Bu işlemden sonra yükleme jeli hazırlanmıştır. Yükleme jeli uygulandıktan sonra kuyucuk açmak için tarak kullanılmıştır. Yürütme jeli yükleme jeli arasında yaklaşık 1 cm mesafe olacak şekilde tarak yerleştirilmiştir. 30 dakika sonunda donan yükleme jeli dikey yürütme tankına alınmış ve yürütme tamponu ile iyice ıslanan jelden tarağın nazikçe alınmasıyla kuyucukların oluşması tamamlanmıştır. Proteinler jele yüklenmeden önce numune tamponu ile 1:1 oranında seyreltilmiştir. İyice karıştırılan protein çözeltileri blok ısıtıcıda 100 °C'ta 5 dakika denatüre edilmiştir. Kuyucuklara protein marker (Biolabs, P7712S, Color Prestained Protein Standard, 11–245 kDa), BSA ve sıçan kuyruğu tip I kollajeninden 5'er μ L; hücrelerinden arındırılmış doku ve ham dokudan da 15'er μ L alınarak numuneler yüklenmiştir. Sonrasında güç kaynağı 300 volt ve 15 miliampere ayarlanmış, toplam deney süresi 2 saat sürmüştür (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. SDS-PAGE analizi

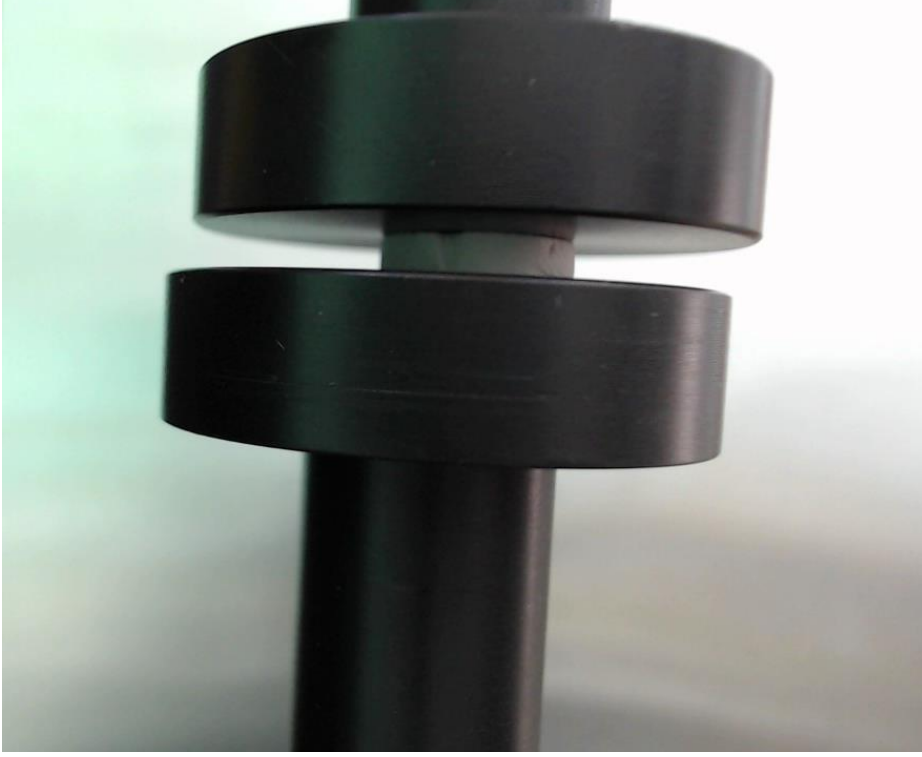
Bu süre sonunda jel, çeşme suyu altında alındıktan sonra 1 saat Coomassie Blue (Brilliant Blue R250, %40 v/v metanol, %7 asetik asit) boyaması yapılarak bantların belirgin hale gelmesi sağlanmıştır. Boyama çözeltisi prosedürü Çizelge 3.3'de verilmiştir. Jel, jel boya geri alma I (%40 (v/v) metanol ve %7 (v/v) asetik asit) çözeltisinde 30 dakika ardından jel boya geri alma II (%5 (v/v) metanol ve %7 (v/v) asetik asit) çözeltisinde arka planın rengi iyice açılıp bantlar belirgin hale gelene kadar bekletilmiştir. Bu işlemden sonra jelin görüntüsü, Biorad jel görüntüleme cihazı ile alınmıştır.

Çizelge 3.3. SDS-PAGE jel hazırlama prosedürü ve kullanılan çözeltiler

Kullanılan Çözeltiler	%12'lik 10 ml yürütme jeli
Akrilamid çözeltisi (%30 (w/v) ve akrilamid ve %0,8 (w/v) bisakrilamid suda çözülmüştür.)	4 mL
4X ayırma jeli tamponu (1,5 M Tris-hidroklorür (Tris-HCl) suda çözülmüştür. (pH: 8,8)	2,5 mL
%10 SDS (%10 (w/v) SDS suda çözülmüştür.)	0,1 mL
Ultra Saf su	3,35 mL
Amonyum per sülfat (APS) (%10 (w/v) Amonyum per sülfat suda çözülmüştür.)	50 µL
TEMED (Ticari olarak satın alınmıştır.)	3,3 µL
%4 lük 10mL yükleme jeli	
Akrilamid çözeltisi	1,33 mL
%10 SDS	0,1 mL
Ultra saf su	6 mL
4X yükleme jeli tamponu (0,5 M Tris-CI suda çözülmüştür (pH:6,8)	2,5 mL
APS	50 µL
TEMED	5 µL
Diğer Çözeltiler	
Elektroforez tamponu (0,025 M Tris, 0,192 M glisin, %0,1 SDS suda çözülmüştür. (pH: 8,3)	
2X numune hazırlama tamponu (0,125 M Tris-HCl, %4 SDS %20 (v/v) gliserol, 0,2 M 2-merkaptetanol, %0,02 (w/v) bromofenol blue suda çözülmüştür (pH:6,8).	
Ayırma jeli overlay (0,375 M Tris-HCl, %0,1 SDS suda çözülmüştür pH: 8,8)	

3.2.9. Mikro Mekanik Test

Hücrelerinden arındırılmış spinal kord ve ham dokunun basınç dayanımı, basma testi cihazı (Cell Scale Testing, Kanada) ile belirlenmiştir. Çapraz bağlı ve deselülerize iskele kalınlığı 1,5 mm, ham doku spinal kord kalınlığı ise 3 mm'dir. Gerinim süresi 1 dakika olup 0,1-10 N'luk hücre kullanılmıştır (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. Mikro mekanik test analizi

3.2.10. Biyoiskelelerin Fizikokimyasal Analizi

Hücrelerinden arındırılmış spinal kord biyoiskelelerin fizikokimyasal karakterizasyonu için FTIR (Shimadzu IRAffinity-1, Japonya) analizi yapılmıştır. FTIR analizi için 1000-1700 cm^{-1} aralığında taramalar yapılarak spektrumlar elde edilmiştir.

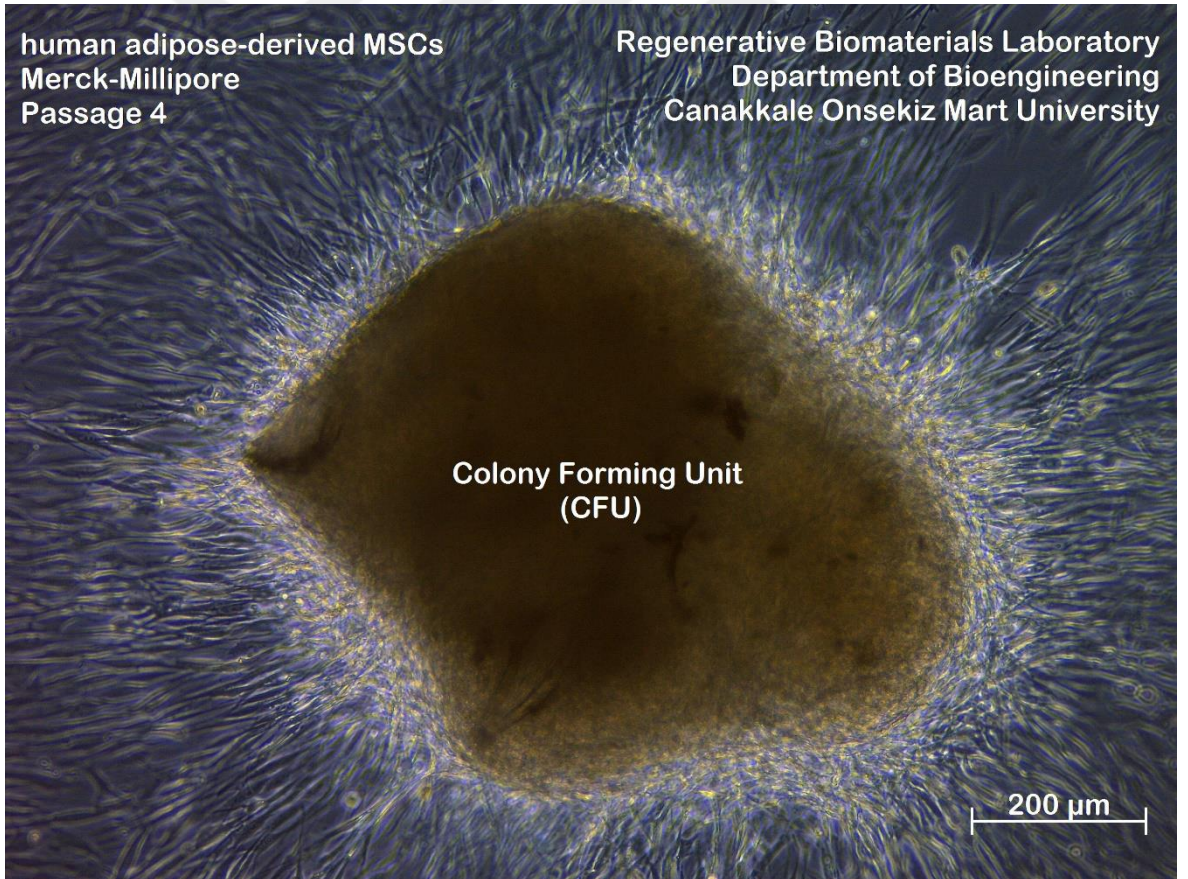
Shimadzu DTA60 cihazı kullanılarak elde edilen deselülerize spinal kord iskelelerin TGA analizi yapılmıştır. Ölçümler sırasıyla 600 °C ve 800 °C'a kadar azot ve oksijen atmosferi altında gerçekleştirildi.

3.2.11. Hücre Kültürü Çalışmaları

Hücre kültürü çalışmaları Class II A-2 laminar akışlı kabinde yapılmıştır. Pasaj sayısı P6-P8 olan, içerisinde 1×10^6 hücre bulunan iAMKH'ler -80 °C'dan alınarak, 37 °C'daki su banyosuna konulmuş ve hücre çözme işlemi gerçekleştirilmiştir. Kriyotüp içerisindeki

hücreleri dimetilsülfoksitten uzaklaştırılmak için kök hücre çoğaltma vasatı ilave edilmiştir. İçeriğinde rhFGF-b (5 ng/mL), Askorbik Asit (50 µg/mL), L-Glutamin (7,5 mM), hidrokortizon hemisüksinat (1 µg/mL), rh İnsülin (5 µg/mL) ve Fötal Sığır Serum (2%) bulunan kök hücre çoğaltma vasatı ve iAMKH'ler 300xg'de 5 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Çöken hücre pelleti 3 mL kök hücre vasatı ile pipetlenip 3 adet T75 doku kültürü kaplarına ekilerek %5 CO₂, 37 °C sıcaklık ve %80-90 bağıl nem sağlayan bir inkübatöre alınmıştır. Hücreler invert faz-kontrast mikroskobu ile görüntülenmiştir (Şekil 3.6). Yeterli bolluğa (%80) ulaşan hücreler PBS (sodyum klorür içeren fosfat tamponu) (pH: 7,4) içerisinde hazırlanmış %0,25 Trypsin ve 0,53 mM EDTA çözeltisi (steril filtreden geçirildi) ile muamele edilerek doku kültürü plastiğine yapışan kök hücrelerin besiyerine geçmesi sağlanmıştır (Trypsinizasyon). Trypsinizasyon işleminden sonra hücreler pasajlanmıştır.

iAMKH'lerin *in vitro* çoklu-soy farklılaşma kapasitelerinin belirlenmesi için adipojenik, osteojenik ve kondrojenik indüksiyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir (Sezgin Arslan, 2016).



Şekil 3.6. iAMKH'lere ait koloni oluşturan birim

3.2.12. Deselülerize Spinal Kord Biyoiskeleleri Üzerine Hücre Ekilmesi

Hücrelerinden arındırılmış sığır spinal kord iskeleleri laminar akışlı kabinde UV ışık (254 nm) altında 1 saat boyunca steril edilmiştir. Ardından 48 kuyucuklu doku kültür kaplarına alınarak pasaj P6-P8 arası çoğaltılmış hücreler 300,000 hücre/iskele yoğunluğunda ekilmiştir. İskeleler üzerine kök hücre çoğaltma vasatı %10 Fötal Sığır Serumu, %1 L-glutamin, %1 penisilin-streptomisin ve %88 DMEM yüksek konsantrasyonlu glikoz vasatı (Biological Industries, ABD) içeren besiyeri ilave edilmiş ve hücreler inkübasyona (%5 CO₂, %95 hava ve %90 bağıl nem içeren 37 °C sıcaklığa ayarlı) bırakılmıştır. Besiyeri 2-3 günde bir tazelenerek kültüre 3,7 ve 10 gün boyunca devam edilmiştir

3.2.13. Deselülerize İskele Üzerine Ekilen Hücrelerin Canlılık Seviyelerinin Belirlenmesi

MTT testi indirekt olarak hücre canlılığı veya çoğalma düzeyini değerlendirmeyi amaçlayan, hücre kültürü esasına dayanan canlılık/sitotoksosite gösterilmesi testidir. Bu yöntem ile bir hücre topluluğundaki canlı hücrelerin oranı kalorimetrik yöntemle kantitatif olarak saptanmaktadır. Bu amaçla hücrelerin proliferasyonuna bağlı olarak artan dehidrogenaz enzim aktivitesi ile sarı renkli tetrazolyumu kullanarak mor renkli formazan kristallerini üretmesi sonucu görülen renk değişiminin spektrofotometrik olarak 570 nm dalga boyunda absorbansının ölçülmesi esasına dayanmaktadır (Şekil 3.5). Tetrazolium halkasının parçalanması sonucu soluk sarı renkli MTT reaktifi koyu mavi-mor formazan ürününe dönüşmektedir. Sonuç olarak canlı ve mitokondri fonksiyonu bozulmamış hücreler mor renkte boyanmakta, ölü ya da mitokondri fonksiyonu bozulmuş hücrelerde boyanmamaktadır.



Şekil 3.7. MTT reaksiyonu

(<https://www.nature.com/articles/nprot.2008.182>'den uyarlanmıştır)

MTT testi için hücrelerinden arındırılmış spinal kord iskelelerin üzerindeki besiyeri, tamamen atılmıştır. Sonra iskeleler başka bir steril 48 kuyucuklu kültür kabına alınarak her bir iskele için 270 µl serumsuz vasat ve 30 µl MTT reaktifi içeren çözelti ilave edilerek %5 CO₂, %95 hava ve %90 bağıl nem içeren 37 °C sıcaklığa ayarlı inkübatöre yerleştirilerek yaklaşık 4 saat inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre sonunda iskele üzerindeki çözelti tamamen atılarak her bir iskele üzerine MTT solüsyonu (0,1 M HCl içinde hazırlanan susuz izopropanol) 300 µl ilave edilmiştir. Elde edilen mor renkli çözeltinin 570 nm'de absorbansı ölçülerek bu işlemler kültürün 3., 7. ve 10. gününde tekrarlanmıştır

3.2.14. Taramalı Elektron Mikroskop ve EDX Analizi

Hücrelerinden arındırılmış spinal kord ve işlenmemiş spinal kord iskelelerinin mikromimarisi ve hücresel davranışı için SEM (FE-SEM JFM 7100F EDS, JEOL, Japonya) ve kimyasal analizleri yapmak için EDX (Oxford Instruments X-Max^N, İngiltere) kullanılmıştır. Hücreli iskelelerin SEM görüntülemesi için öncelikle kültür ortamındaki vasat tamamen atılmış, PBS içinde hazırlanan %2,5 glutaraldehit ile fikse edilmiştir. Sonrasında fiksatif ortamdan alınarak iskeleler bolca ultra saf su ile yıkanmış, %50, %70, %80, %90, %95 ve %100'lük etanol serilerinden geçirilerek dehidrate edilmiş ve oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Hücreli ve çapraz bağlı hücresiz iskeleler 90 saniye süreyle Au-Pd (424 nm) ile kaplanmış. İletken örneklerin görüntüleri 10 kilovoltta farklı büyütmelemlerde ve yüksek vakum altında belirlenmiştir.

3.2.15. Histokimyasal ve İmmünohistokimyasal Karakterizasyon

Spinal kord dokusu, hücrelerinden arındırılmış spinal kord biyoiskeleleri ve iAMKH'lerin ekilmiş olduğu biyoiskeleler histolojik olarak değerlendirilmiştir. Tüm doku örnekleri ışık mikroskopik inceleme için ilk olarak %10' luk nötr tamponlu formaldehit solüsyonunda bekletilmiştir. Sonra doku örnekleri akar su altında 1 saat boyunca yıkanmıştır. Suyun uzaklaştırılması için dokular artan alkol serilerinden (%60, %70, %80, %90, %96 ve %100) geçirilmiştir. Sonrasında dokular parlatılmaları amacıyla ksilolden geçirilmiş ve ardından erimiş parafine gömülmüştür. Hazırlanan parafin bloklardan 3 µm kalınlığında kesitler alınmıştır. Histokimya analizi için Hematoksilen-Eozin, Toluidin Blue ve Nissl boyaması; immünohistokimyasal analiz için Nörofilament, Glial fibriler asidik protein (GFAP) ve S100 boyaması yapılmıştır.

Hematoksilen-Eozin boyaması için alınan kesitler 60 °C'daki etüvde, 1 saat

bekletildikten sonra, 3x10 dakika ksilole alınarak parafinden arındırılmaları sağlanmıştır. Daha sonra lamlar sırasıyla azalan alkol serilerinden geçirilip (%100, %96, %90 ve %70). 1 dakika akar suda yıkandıktan sonra, Harris Hematoksilen'de 2 dakika boyandı ve 2x2 dakika akar suda yıkanmıştır. %1 amonyak-su karışımına batırılıp tekrar 1 dakika akar suda yıkanmıştır. Lamlar 2 dakika Eozinde bekletilip artan alkol serilerinden geçirilerek (%70, %80, %96 ve %100), 2x1 dakika ksilole alınmış ve entellan ile kapatılmıştır.

Toluidin Blue boyaması için alınan kesitler 60 °C'daki etüvde 1 saat bekletildikten sonra, 3x10 dakika ksilole alınarak parafinden arındırılmaları sağlanmıştır. Daha sonra kesitler sırasıyla azalan alkol serilerinden geçirilip (%100, %96, %80 ve %70) 1 dakika akar suda yıkandıktan sonra Toluidin Blue boyasında 30 dakika boyanmıştır. Boyanan kesitler artan alkol serilerinden geçirilerek suyu alındıktan sonra 5 dakika şeffaflaştırmak için ksilolde bekletilmiştir. Ardından entellan ile kapatılmıştır.

Nissl boyaması için alınan kesitler 60 °C'daki etüvde 1 saat bekletildikten sonra, 3x10 dakika ksilole alınarak parafinden arındırılmaları sağlanmıştır. Daha sonra lamlar sırasıyla azalan alkol serilerinden geçirilip (%100, %96, %80 ve %70) 1 dakika akar suda yıkandıktan sonra, Nissl boyasında 10 dakika boyanmıştır. Boyanan kesitler artan alkol serilerinden geçirilerek suyu alındıktan sonra 5 dakika şeffaflaştırmak için ksilolde bekletilmiştir. Ardından entellan ile kapatılmıştır.

İmmünohistokimyasal analiz (GFAP, Nörofilament, S 100) için sinir dokusu örneklerinden 3 µm kalınlığında kesitler alınmıştır. Kesitler 60 °C'daki etüvde 1 saat bekletildikten sonra, 3x10 dakika ksilole alınarak deparifizasyonları sağlanmıştır. Daha sonra lamlar sırasıyla azalan alkol serilerinden (%100, %96, %80 ve %70) geçirilmiştir. Kesitler alkolden arındırılmak amacıyla iki kez 1'er dakika distile sudan geçirilmiştir. Antijen maskesini kaldırmak için 1/10 oranında seyreltilmiş EDTA (AP-9004-999 Thermo scientific) kullanılmıştır. Bu işlemin ardından kesitler, saf su ile yıkandıktan sonra 10 dakika %3'lük hidrojen peroksit (TA-125-HP ThermoScientific) çözeltisinde bekletilmiştir. PBS ile yıkanan kesitler 10 dakika Protein Bloke (TA-125-PBQ ThermoScientific) edilmiştir. Ardından kesitler 2 saat nemli ortamda primer antikor (GFAP (MS-1376-P1 LabVision/ThermoScientific), Nörofilament (MS-359-S1 LabVision/ThermoScientific), S100 Protein (MS-296-P1 LabVision/ThermoScientific)) ile inkübe edilmiştir. Bu işlemden sonra kesitler, Amplifier Quanto'da (TL-125-QPB ThermoScientific) 30 dakika, HRP Polymer Quanto'da (TL-125-QPH ThermoScientific) 30 dakika bekletilmiştir. Daha sonra kesitlere Harris Hematoksilen'de 30 saniye karşıt boyama yapılmış ve kesitler 2x1 dakika akar suda yıkanmıştır. Kesitler %1 amonyak-su karışımına batırılıp tekrar 1 dakika akar suda

yıkanmıştır. Boyanan kesitler artan alkol serilerinden (%70, %80, %96 ve %100) geçirilip suyu alındıktan sonra 5 dakika şeffaflaştırmak için ksilolde bekletilmiştir. Ardından kesitler entellan ile kapatılmış ve ışık mikroskobu altında görüntülemeler yapılmıştır.

3.2.16. İstatiksel Analiz

İstatistiksel analizler Orijin Pro 8SR0 (v.0724, OriginLab Corporation, MA, USA) programı kullanılarak yapılmıştır. Tüm değişkenlerin \pm standart hatalarını belirlemek için Microsoft Office Professional Plus 2016 Excel programı kullanılmıştır. İstatistiksel farklılıklar ANOVA (one-way analysis of variance) Tukey test ile belirlenmiştir. $p \leq 0,05$ durumunda farklılıkların istatistiksel olarak anlamlı olduğu kabul edilmiştir.



BÖLÜM 4

ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

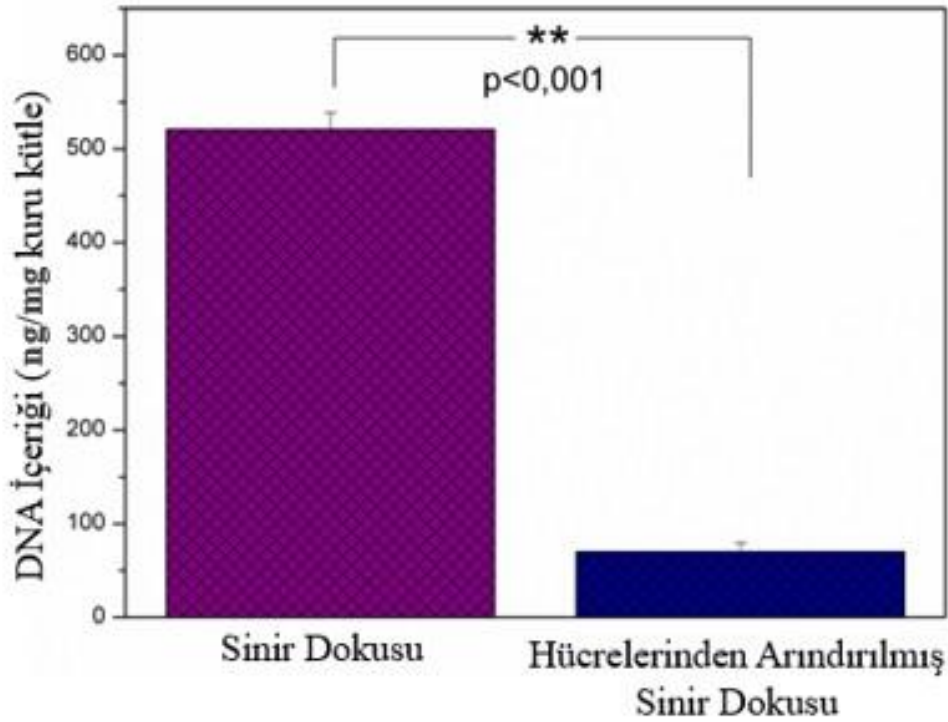
4.1. HDM Temelli Sığır Spinal Kord İskelelerin Hazırlanması

Sığır spinal kordu, 0,1 M NaOH ile yapılan homojenizasyon işlemi sonucunda homojen bir çözelti haline gelmiş ve hazırlanan çözelti özel polipropilen kalıplara dökülerek başarılı bir şekilde biyoiskele formuna getirilmiştir. Ham doku spinal kord yapılan homojenizasyon işlemi ve iskele hazırlanması sonrasında dokunun doğal yapısı değişmiştir. Spinal kordun yoğun yapısı, gözenekli iskele haline dönüştürülmüş ve böylece hücrelerinden arındırma işlemleri için avantajlı bir yöntem olmuştur (Erten ve ark., 2016). Bu gözenekli yapı sayesinde hücrelerinden arındırma işlemlerinde kullanılan çözeltiler biyoiskele içine daha iyi nüfuz ettikleri için etkin bir deselülerizasyon çalışması gerçekleştirilmiştir. Ayrıca bu yöntem, HDM bileşenleri ile birlikte istenen boyut ve gözenekliliğe sahip iskele hazırlamada da önemli bir fırsat sağlamaktadır. Hazırlanan HDM-temelli sığır spinal kord iskelelerinin dayanıklılıklarını artırmak amacıyla yapılan çapraz bağlama işlemi başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Bu sayede iskelelerin dayanıklılıkları artırılmış ve hücre kültürü çalışmaları için istenilen sağlamlıkta olduğu tespit edilmiştir.

4.2. DNA İçerik Analizi

Spinal kordun hücrelerinden arındırılması için literatürde var olan birçok yöntem modifiye edilerek ideal bir deselüerizasyon yöntemi geliştirilmeye çalışılmıştır. Hücrelerinden arındırma işlemi için sekiz farklı yöntem denenmiştir. Bu yöntemlerin bazıları ham doku spinal kordun iskele formuna getirilmeden direkt olarak hücrelerinden arındırma işlemine tabi tutulmasıyla gerçekleştirilmiştir. Ancak ham doku spinal kordun doğal yapısının zayıf mekanik özelliklere sahip olması, deselüerizasyon işlemleri sonrasında çok fazla ham doku kaybına neden olmuştur. Bu problemin giderilmesi için ham doku spinal kord 3D gözenekli biyoiskele formuna dönüştürülmüş ve çapraz bağlama işlemleriyle biyoiskelenin mekanik dayanımı artırılmıştır. Hücrelerinden arındırma işlemleri için denenilen 5.,6.,7. ve 8. yöntemlerde spinal kord, öncelikle 3D gözenekli biyoiskele formuna dönüştürülüp ardından çapraz bağlanarak deselüerizasyon işlemine tabi tutulmuştur. Bu yöntemler içerisinde 8. yöntem yeni geliştirilen ve en etkili hücrelerinden arındırma işlemi olarak belirlenmiştir. HDM-temelli spinal kord, biyoiskele formuna dönüştürüldükten sonra 8. yöntemle hücrelerinden arındırılmış ve karakterize edilmiştir. HDM temelli spinal kord iskelelerinde; çapraz bağlama yöntemi olarak 2.yöntem seçilmiş

ve NHS/EDC kimyasalları ile 10 dakika çapraz bağlanmıştır. Deselülerizasyon işlemleri için SDS içeren hipertonic çözelti, DNase-RNase ve dekontaminasyon çözeltileri kullanılmıştır. Deselülerizasyon işlemleri sonrasında hücrelerinden arındırılmış iskele ve ham doku için DNA içerik analizi yapılmıştır. Ham doku spinal kord için DNA içerik analizi $520,76 \pm 18,11$ ng/mg kuru ağırlık (n=3) bulunurken, hücrelerinden arındırılan spinal kord için DNA içerik analizi $69,90 \pm 0,19$ ng/mg kuru ağırlık (n=3) olarak bulunmuştur. Hücrelerinden arındırma işlemi için en ideal yöntemin 8. yöntem olduğu ve DNA içeriğinin %86,57 oranında azaldığı tespit edilmiş ve etkili bir deselülerizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.1). Hücrelerinden arındırma işlemi için denenen diğer yöntemlerde ise DNA içeriği %40 ile %70 arasında değişen oranlarda azaltılabilmektedir.



Şekil 4.1. Sinir dokusu ve hücrelerinden arındırılmış sinir dokusuna ait DNA içerik analizi

Hem kimyasal hem de enzimatik işlemler kullanılarak yapılan deselülerizasyon çalışmaları ile hücreler lizise uğramakta ve hücrelere ait kalıntılar matriksten uzaklaştırılmaktadır. Hücrelerinden arındırma işleminde kullanılacak fiziksel, kimyasal ve biyolojik ajanların etki mekanizmaları birbirinden farklı olmaktadır. Hücrelerinden arındırma işlemlerinde sıkça kullanılan iyonik ve iyonik olmayan deterjanlar, hücre membranının yapısını bozarak hücre kalıntılarının dokudan atılmasını sağlamaktadır. İyonik olmayan deterjan sınıfından biri olan Triton X-100 de delipidizasyon işlemleri için

kullanılmaktadır. İyonik deterjanlardan biri olan SDS, hücre yoğunluğu fazla olan doku ve organlarda kullanılan güçlü deterjanlardan biridir (Crapo ve ark., 2011). SDS, tripsin gibi kimyasallar HDM yapısında bulunan laminin fibronektin, GAG ve adezyon molekülleri üzerinde olumsuz etkilere neden olmaktadır (Zhang ve ark., 2010). Hipotonik veya hipertonic deterjanlar ile birlikte kullanılan EDTA, şelatlayıcı ajan olarak kullanılır ve HDM’de bulunan hücrelerin adezyonunu ve protein-protein etkileşimlerini bozmaktadır. Nükleazlar sınıfından olan DNAaz ve RNAaz dokularda meydana gelen lizisten sonra nükleik asit sekanslarını parçalayarak nükleotitlerin uzaklaştırılmasına yardımcı olmaktadır. Deselülerizasyon çalışmalarında kullandığımız kimyasallardan biri de alkol ve asit çözeltileridir. Özellikle perasetik kullanımı mikroplara karşı koruma sağlayıp malzemenin dezenfeksiyonu için önemli bir role sahiptir. İzopropanol, metanol, etanol gibi alkoller; doku ve organlarda bulunan lipitlerin çözünür hale getirilmesinde ve dokulardan uzaklaştırılmasında etkili olmaktadır. Bunun yanında histolojide doku fiksatiflerinin kullanımında, proteinlerin çöktürülmesinde kullanıldığından HDM altyapısına zarar verebileceğinden deselülerizasyon çalışmalarında dikkatli oranlarda kullanılması gerekmektedir (Crapo ve ark., 2011).

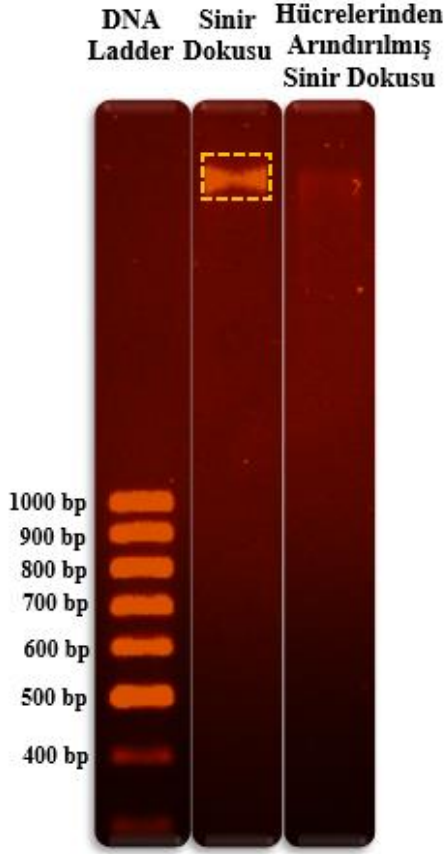
Deselülerize iskelelerin bozunma hızının büyük oranda azaltılması, lezyonlu dokuların hücreler tarafından yeniden düzenlenmesini engelleyerek, konak immun tepkisi oluşturabilmektedir. Bu yüzden düşük sitotoksik etkisi olan çapraz bağlama reaktiflerinin kullanılması gereklidir. EDC gibi bazı çapraz bağlayıcılar düşük sitotoksik etkiye sahiptir (Zhang ve ark., 2010). Bu çapraz bağlayıcıların kullanımı ile deselülerize iskelelerin mekanik gücü arttırılmaya çalışılmıştır. EDC ile çapraz bağlama sonrası iskelelerin bozunması ve termal özellikleri karakterize edilmiş ve sonuçların ham doku ile benzer olduğu gösterilmiştir.

Deselülerizasyon işlemleri, meydana gelebilecek immün tepkiyi de azaltmaktadır. Etkili bir deselülerizasyon için doku ve organların yapısı, deselülerize edilecek bölümün hücre yoğunluğu ve kalınlığı, HDM içerikleri büyük önem taşımaktadır (Crapo ve ark., 2011). Ayrıca deselülerizasyon çalışmalarında HDM’in yapısı en az zararlı işlenerek, bu yapının doğal halini koruması ve dengeli bir deselülerizasyon işlemi yapılması gerekmektedir (Zhang ve ark., 2010). Bu amaçla sinir dokusu deselülerizasyonu ile ilgili Chan ve ark. (2012) yapmış oldukları intervertebral disk deselülerizasyonu ile hücresel içerik %71-76 oranında uzaklaştırmıştır. Ayrıca Crapo ve ark. (2012) domuzdan izole ettikleri spinal kordu; tripsin, EDTA, Triton X-100, sodyum deoksikolat, perasetik asit gibi kimyasallar kullanılarak hücrelerinden arındırma işlemine tabi tutmuşlardır. Yapılan

çalışmalar sonucunda deselülerize spinal kord DNA içeriği 37,90 ng/mg kuru ağırlık olarak bulunmuştur (Crapo ve ark., 2012). Bu çalışmalar göz önüne alındığında; ham doku spinal kord ve deselülerize iskeleye ait DNA içerik analizi sonuçlarının, literatürle uyumlu olduğu ve spinal kordun başarılı bir şekilde hücrelerinden arındırıldığı belirlenmiştir.

4.3. Agaroz Jel Elektroforezi

Biyolojik matriks materyalinde DNA, konakçı immün yanıtı bakımından en ölümcül zenogeneik antijen olarak kabul edilmektedir. Bu çalışmada, gelecekteki sinir doku mühendisliği ve rejeneratif tıp uygulamaları için bir alternatif seçenek sunması bakımından; ham doku ve hücrelerinden arındırılmış spinal kord iskelelerindeki DNA miktarı, DNA içerik analizi ile kantitatif olarak ölçülmüştür. Bu sonuçlara göre deselülerize dokudaki DNA içeriği, ham dokudaki DNA içeriğiyle kıyaslandığında %86,57 oranında bir azalma meydana geldiği belirlenmiştir. Bu çalışmayla beraber hücrelerinden arındırılmış spinal kord ve ham dokuda bulunan DNA fragmanlarının uzunluğunu ortaya çıkarmak için agaroz jel elektroforezi yapılmıştır. 8.yönteme göre deselülerize edilen iskelede belirgin bir DNA bandı görülmezken buna karşılık, ham dokuda DNA geniş ve belirgin bir bant görülmüştür (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Agoroz jel elektroforezi

DNA içeriğinin belirlenmesi için Ban ve ark. (2017) yapmış oldukları çalışmada sıçandan izole edilen spinal kord, hücrelerinden arındırılarak agoroz jel elektroforezi yapılmıştır. Yapılan agoroz jel elektroforezinde deselülerize dokuya ait hiçbir DNA bandı görülmemiştir. Bu da deselülerizasyon sonunda DNA içeriğinin dokudan tamamen çıkarıldığının bir göstergesidir.

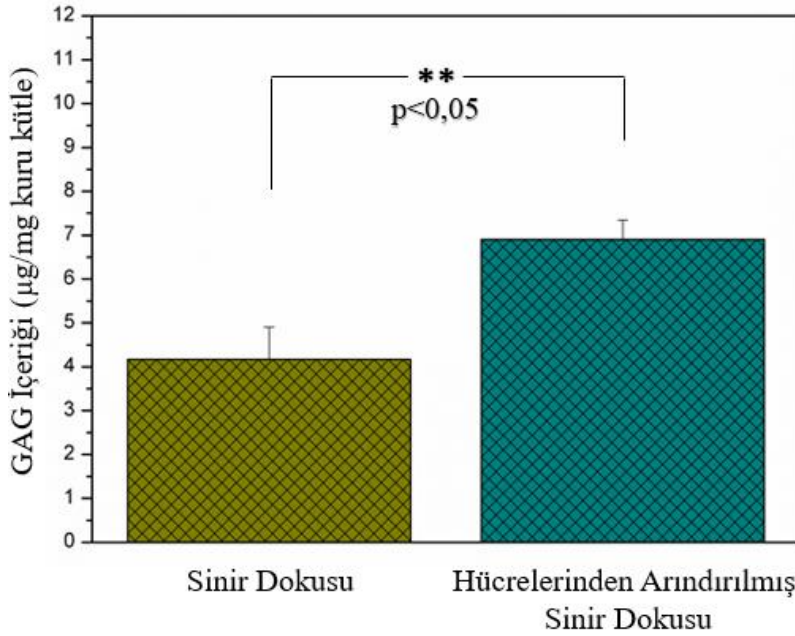
Yapılan başka bir çalışmada ise domuzdan izole edilen spinal kord; tripsin, EDTA, Triton X-100, sodyum deoksikolat, perasetik asit gibi kimyasallar kullanılarak hücrelerinden arındırma işlemi gerçekleştirilmiştir. Hücrelerinden arındırılan spinal kord dokusunda DNA içeriği 37,90 ng/mg kuru ağırlık olarak bulunmuştur. Ardından agoroz jel elektroforezi yapılmış ve sonucunda ham dokuya ait spesifik bantlar görülürken deselülerize iskelelere ait DNA bantlarına rastlanmamıştır. Bu da etkili bir deselülerizasyon yapıldığını göstermektedir (Crapo ve ark., 2012).

Sinir dokusunun hücrelerinden arındırması için denenen 8 yöntemde farklı tip kimyasal ajanlar kullanılmıştır. Özellikle SDS dışında kullanılan deterjanlardan biri olan Triton X-100, DNA içerik analizi ve agoroz jel elektroforezi çalışmalarında DNA

kalıntılarını yeterince gideremediği görülmüştür. Bu sonuç Crapo ve ark. (2011) çalışmasıyla da uyumaktadır. Böylece nükleik asit kalıntılarının giderilmesinde SDS, Triton X-100'den daha ideal bir deterjan olduğu ortaya konulmuştur.

4.4. GAG İçerik Analizi

Ham doku ve desellülerize spinal kord iskelelerinin HDM kompozisyonunu karakterize etmek amacıyla sülfatlanmış GAG içeriği araştırılmıştır. Hücrelerinden arındırılmış iskelelerdeki GAG miktarı 8. yöntemde belirtilen deselülerizasyon çalışmaları sonucunda elde edilmiştir. Buna göre hücrelerinden arındırılmış spinal kord ve ham doku için sırasıyla GAG miktarı $6,90 \pm 0,45$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ kuru ağırlık (n=3), $4,17 \pm 0,73$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ kuru ağırlık (n=3) olarak hesaplanmıştır. Yapılan ANOVA testi sonucu, her iki dokuda da GAG miktarının istatistiksel olarak birbirinden farklı olduğu belirlenmiştir ($p < 0,05$) (Şekil 4.3).



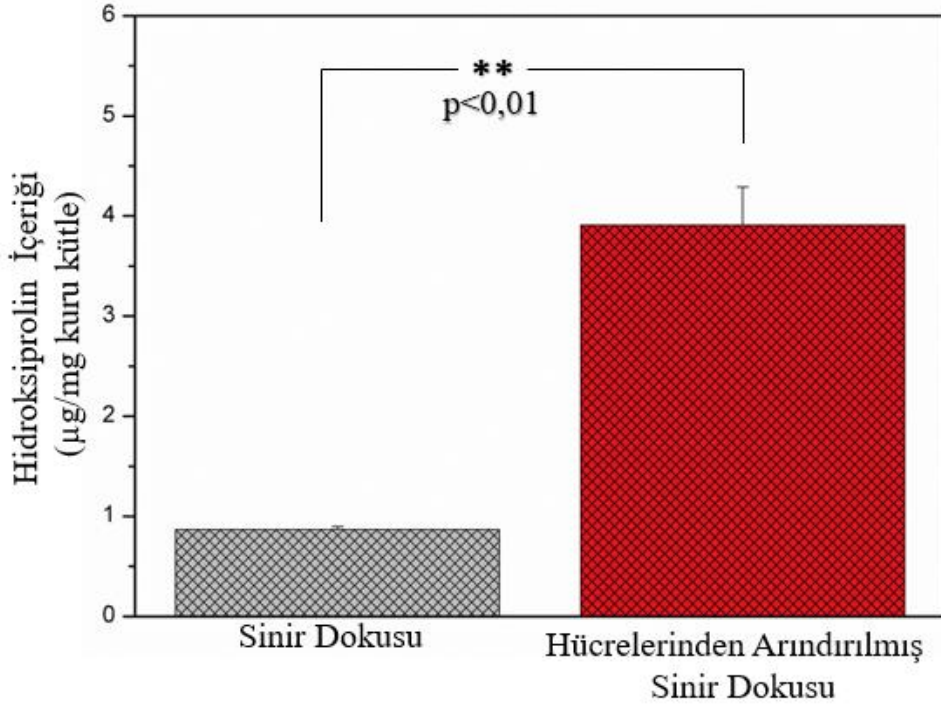
Şekil 4.3. Sinir dokusu ve hücrelerinden arındırılmış sinir dokusuna ait GAG içerik analizi

Şekil 4.3'e göre hücrelerinden arındırılmış spinal kordun GAG içeriği ham dokuya göre anlamlı bir artış göstermektedir. Yapılan deselülerizasyon sonucu, GAG miktarında oransal bir azalma meydana gelmemiştir. GAG miktarındaki bu artış Wilshaw ve ark., (2006) yapmış olduğu GAG içerik analiziyle benzerlik göstermektedir. Hücrelerinden arındırma işlemi sonrası meydana gelen artışın sebebinin deselülerizasyon sonrası hücrelerin ve çözünür bileşenlerin (çözünbilir proteinler, lipidler, nükleik asitler) kaybedilmesine

bağlı olabileceği düşünülmektedir. Bunun için hücrelerinden arındırılmış iskelelerde çözünür bileşenlerin miktarını hesaplamak gerekmektedir. Ancak hücrelerinden arındırılmış iskelelerde çözünür bileşenlerin miktarını hesaplamak için etkili yöntem henüz bulunamamıştır. GAG analizi kantitatif biyokimyasal analiz yöntemi olmasına rağmen deselülerize matriksin yapısal bütünlüğünü değerlendirmek oldukça zordur (Wilshaw ve ark., 2006).

4.5. Hidroksiprolin Analizi

Kollojen; üçlü α -heliks konfigürasyon ve yüksek miktarda hidroksiprolin, prolin ve glisin ile karakterize edilen, HDM'in yapısal protein ailesindedir (Alovskaya ve ark., 2007). Hidroksiprolin kiti, hücrelerinden arındırılmış iskele ve ham dokuda bulunan hidroksiprolin miktarının belirlenmesi için kullanılmıştır. Hidroksiprolin kit protokolleri uygulanarak elde edilen sonuçlar ile hidroksiprolin içeriği, hücrelerinden arındırılmış iskele ve ham doku için sırasıyla $3,91 \pm 0,38 \mu\text{g}/\text{mg}$ kuru ağırlık (n=3), $0,87 \pm 0,03 \mu\text{g}/\text{mg}$ kuru ağırlık (n=3) olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. Sinir dokusu ve hücrelerinden arındırılmış sinir dokusuna ait hidroksiprolin içerik analizi

8.yönteme göre yapılan deselülerizasyon sonucu elde edilen hidroksiprolin içeriği ham dokuda bulunan hidroksiprolin içeriği karşılaştırıldığında, hücrelerinden arındırılmış sinir dokusundaki hidroksiprolin içeriği ham doku hidroksiprolin içeriğine göre daha fazla çıkmıştır. Ayrıca veriler arasında istatistiksel olarak bir fark bulunduğu yapılan ANOVA testi sonucuna göre de açıkça ortaya konulmuştur ($p < 0,01$).

Hidroksiprolin içerik analizi ile ilgili Novak ve ark. (2016) yapmış oldukları kıkırdak deselülerizasyonu sonucunda ham doku hidroksiprolin içeriği, deselülerize dokuya göre daha düşük oranda bulunmuştur. Buna ek olarak Wilshaw ve ark. (2006) insan amniyotik membranını hücrelerinden arındırarak alternatif bir biyomalzeme geliştirmişlerdir. Gerçekleştirdikleri bu çalışmada hücrelerinden arındırılmış amniyotik membran ve ham doku amniyotik membrana ait hidroksiprolin içerik analizi yapılmıştır. Sonuçlar ham doku amniyotik membran için hidroksiprolin içeriği 34,70 $\mu\text{g}/\text{mg}$ bulunurken hücrelerinden arındırılmış amniyotik membran için hidroksiprolin içeriği 49,70 $\mu\text{g}/\text{mg}$ bulunmuştur. Bu sonuçlardan yola çıkarak deselülerize spinal kord hidroksiprolin içeriğinin, ham doku spinal kord hidroksiprolin içeriğine göre artış göstermesi literatürde yapılmış olan çalışmalarla benzer sonuçlar elde ettiğimizi göstermektedir. Bunun sebebinin ise deselülerizasyon sonrası hücresel içeriğin ve çözünür bileşenlerin kaybedilmesi sonucunda daha saf bir malzeme elde ettiğimizi göstermektedir (Novak ve ark., 2016). Sonuç olarak deselülerize iskelede bulunan hidroksiprolin miktarının birim ağırlığı başına arttığı ve böylece hücrelerinden arındırılmış spinal kord hidroksiprolin miktarı, ham doku spinal kord hidroksiprolin miktarına göre oransal açıdan daha fazla olduğu tespit edilmiştir.

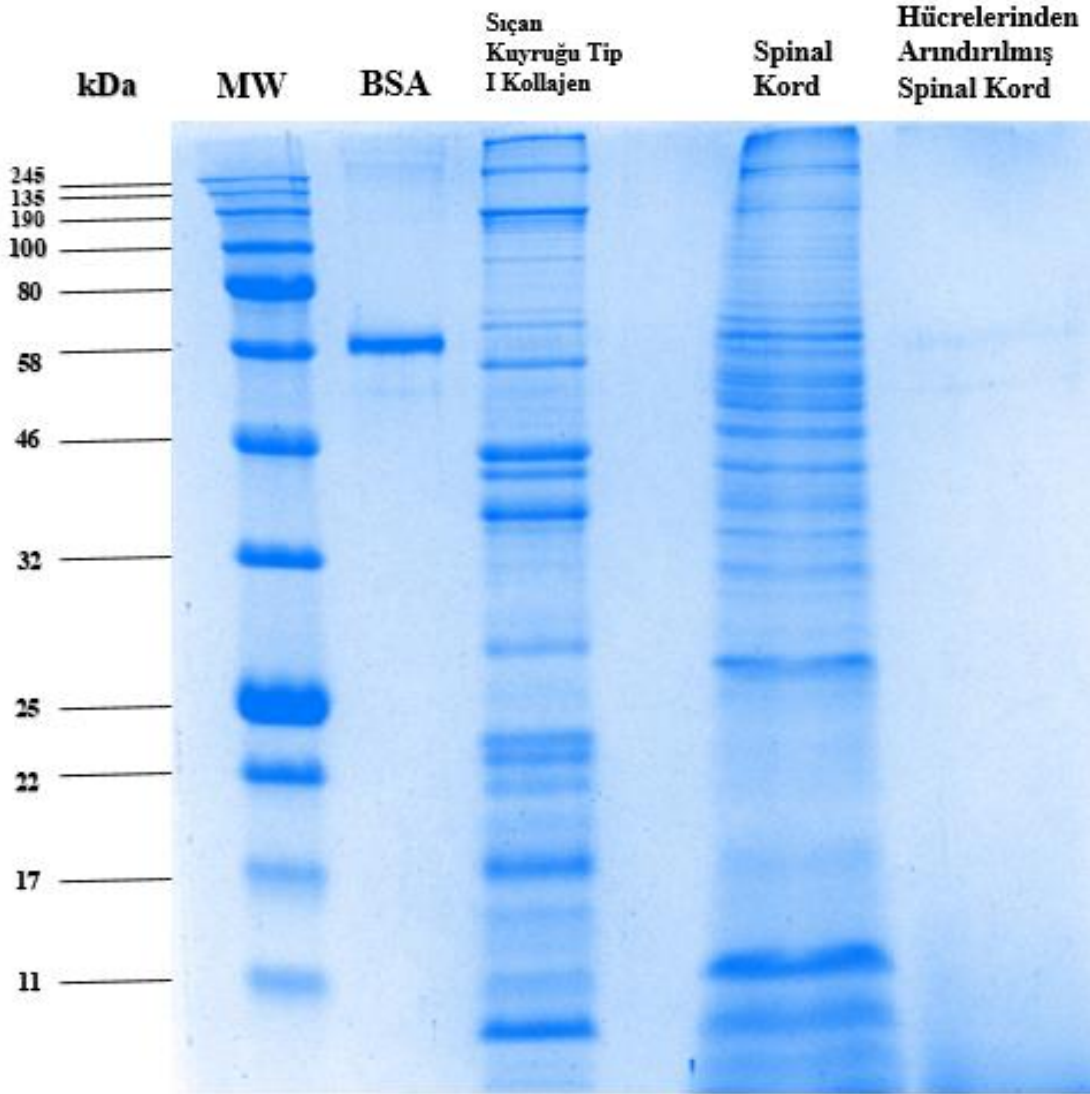
4.6. SDS PAGE Analizi

Ham doku spinal kord, hücrelerinden arındırılmış iskele, BSA ve sıçan kuyruğu tip I kollajenine ait spesifik bantlar %12'lik ayırma jeli ve %4'lük yürütme jeli ile görüntülenmiştir. BSA, SDS-PAGE analizinde negatif kontrol olarak kullanılmıştır.

Sinir sisteminde bulunan fibroblastlar, üçlü α -helezonik konfigürasyona sahip olan ve yüksek miktarda hidroksiprolin, prolin ve glisin içeren, hücre dışı yapısal protein ailesinden olan kollajeni üretirler. Sinir sisteminde fibril oluşturan kollajen tip I, III ve IV bulunmaktadır. Bununla beraber bazal membranın yapısına katılan laminin, fibronektin bulunur. Bazal membranın ana bileşeni olan ve en önemli non-fibril oluşturucu kollojen tip IV de sinir sistemi dokusunda yoğun olarak bulunmaktadır. Bazal membran, içerisinde birçok zengin bileşen barındırır da kollajen tip IV, sinir hücrelerinin çoğalması için yapıda hem iskele hem de matrijel gibi işlev görmektedir (Alovskaya ve ark., 2007; Wilshaw ve

ark., 2006; Zhang ve ark., 2010). Ayrıca kollajen tip IV 95 kDa üzerinde bant vermektedir (Sutmuller ve ark., 1997).

Yapılan SDS-PAGE analizinde spinal kord dokusunda bulunan kollajen tip I, sıçan kuyruğu tip I kollajeni ile kıyaslandığında her iki dokuda bulunan kollajen tip I bantları görülmekte ancak hücrelerinden arındırılmış spinal kord ile karşılaştırıldığında bu bantların korunamadığı tespit edilmiştir (Şekil 4.5). Çözünür protein elde etmede kullandığımız Gil-Dones ve ark. (2009) tarafından oluşturulmuş prosedür, modifiye edilerek, ham doku ve hücrelerinden arındırılmış spinal kord örnekleri üzerinde uygulanmıştır. Sonuç olarak hücrelerinden arındırma işlemi, çözünür proteinlerin kaybına neden olmuş ve yapılan SDS-PAGE analizinde deselülerize dokuya ait bir protein bandı görülmemiştir. Benzer olarak, Zhang ve ark. (2010) domuz interkostal sinirini, %0,1 SDS, %0,025 Tripsin, %3 Triton X-100 ve %0,1 EDTA içeren çözeltide hücrelerinden arındırma işlemine tabi tutmuştur. Bu işlem sonucunda deselülerize doku ve ham doku örnekleri 1 mg/ml proteaz enzimi içeren 0,01 M HCl çözeltisi içinde sindirilmiştir. Ardından hazırlanan örneklere %12'lik jelde SDS-PAGE analizi yapılmıştır. SDS-PAGE analizi sonucunda deselülerize doku ile ham doku karşılaştırıldığında, deselülerize dokuya ait bazı bantların korunduğu, bazı protein bantlarında ise kayıp olduğu sonucuna varılmıştır. Bunun altında yatan sebeplerin; çapraz bağlayıcıların bazılarının az derecede de olsa girişim yapabileceği, çapraz bağlama ile yapının yeterince parçalanamayıp proteinlerin elde edilmesinin zorluğu ve bunların yanı sıra hücrelerinden arındırma işlemleri için kullanılan çözeltilerin bazı protein-protein etkileşimlerini bozup yapıya zarar verdiği düşünülmektedir (Zhang ve ark., 2010).



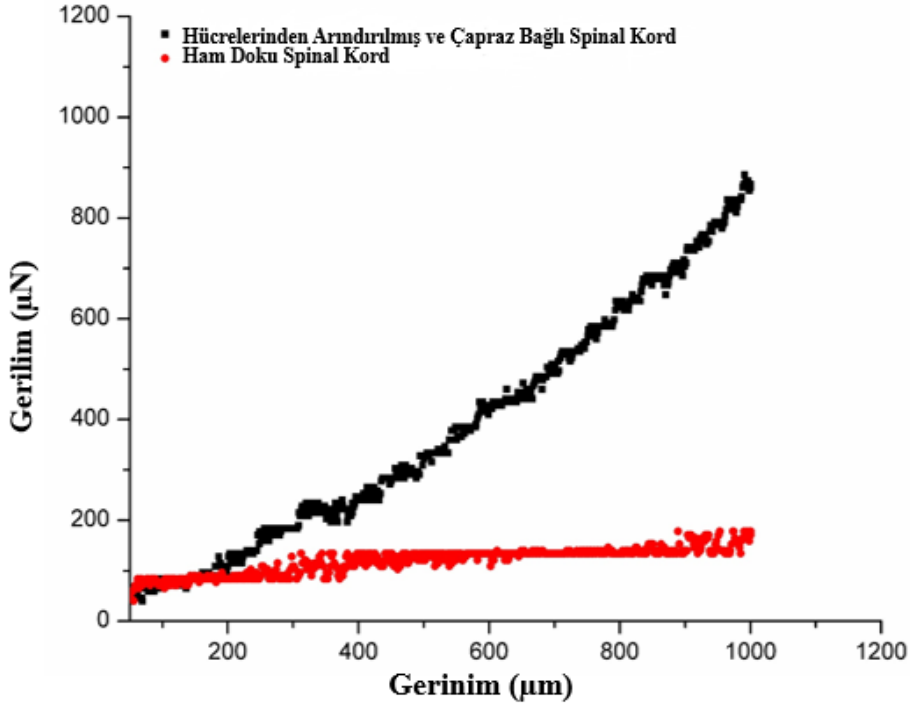
Şekil 4.5. Spinal kord ve hücrelerinden arındırılmış spinal kord dokusuna ait SDS-PAGE analizi

4.7. Mikro Mekanik Test

Hücrelerinden arındırılmış spinal kord ve ham doku spinal kordun mekanik özelliklerinin belirlenmesi için basma testi yapılmıştır. Basma testinde, iki basma kafası arasına yerleştirilen numuneye sabit hızla artan bir basma yükü uygulanmaktadır. Bu basma yükü neticesinde, numune boyu sürekli kısalırken, numunenin kesit alanında sürekli artmaktadır. Buna göre çapraz bağlı hücrelerinden arındırılmış biyoiskele ve ham doku spinal kordun basma testi sonuçları incelendiğinde deselülerize iskeleler için en yüksek gerilim yaklaşık 900 μ N olurken ham doku için yaklaşık 180 μ N olarak bulunmuştur (Şekil 4.6). Yapılan mikromekanik analiz sonucu ile deselülerize çapraz bağlı iskelenin mekanik

dayanımı ham dokuya göre oldukça yüksek çıkmıştır. Bu da yapılan çapraz bağlama işlemlerinin yapıyı daha sağlam ve dayanıklı hale getirdiğinin bir göstergesidir.

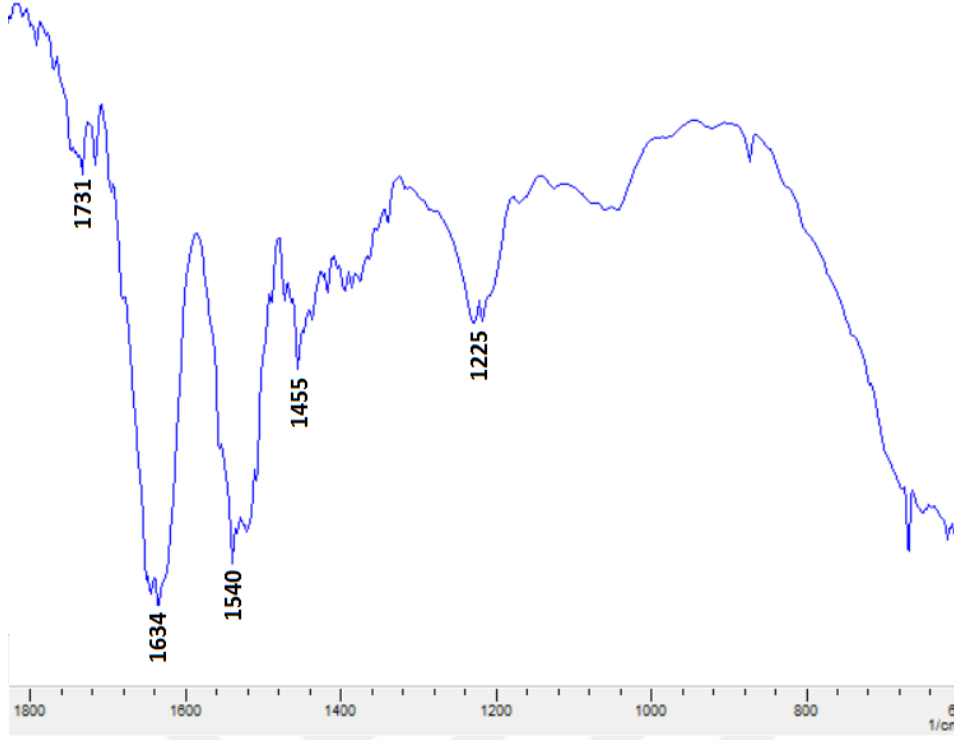
Mekanik test ile ilgili literatürde Jiang ve ark. (2013) sıçan spinal kordu %1 Triton X-100 ve %1 Sodyum deoksikolat gibi kimyasallar kullanarak hücrelerinden arındırmıştır. Ardından hücrelerinden arındırdığı spinal kord dokularını glutraldehit ve genipin ile çapraz bağlamıştır. Çapraz bağlama sonrası yapılan mekanik test sonucu ile ilgili ham doku ve hücrelerinden arındırılmış spinal kord arasında önemli bir fark bulunmadığı tespit edilmiştir. Anisimova ve ark. (2015) kemik doku defektlerinin tedavisi için hayvansal doku kaynaklı dirsek kemiğini hücrelerinden arındırmışlardır. Sonrasında ham doku ve deselülerize dokunun mekanik özelliklerini belirlemek için mekanik test analizi yapılmış ve analiz sonuçlarına göre ham doku için en yüksek gerilim 125 megapaskal bulunurken deselülerize dokuda en yüksek gerilim 129 megapaskal olarak bulunmuştur (Anisimova ve ark., 2015). Elde edilen bu sonuçlarda deselülerize ve ham doku arasında mekanik özellikler açısından önemli bir fark olmadığı ortaya konmuştur. Deeken ve ark. (2011) yapmış olduğu başka bir çalışmada ise domuz tendonunu %1 Tri-n-butyl fosfat (v/v) kullanarak hücrelerinden arındırmıştır. Ardından karbodiimid çapraz bağlayıcı kullanılarak düşük oranlarda çapraz bağlama işlemleri gerçekleştirilmiştir. Ham doku ve hücrelerinden arındırılmış dokuda yapılan mekanik test sonucu ham doku için %29,60 olarak bulunurken hücrelerinden arındırılmış iskele için %72,70 olarak bulunmuştur. Yapılan basma testi sonuçları, Deeken ve ark. (2011) yapmış olduğu mekanik test sonuçları ile karşılaştırıldığında benzer sonuçları elde ettiğimizi ve çapraz bağlama işlemlerinin dokunun mekanik özelliklerini değiştirmede önemli rol oynadığı tespit edilmiştir. Kullanılan çapraz bağlayıcıların özellikleri, çapraz bağlama süresi, dokunun mekanik özelliklerini etkileyerek dayanıklılığını arttırmakta ve yapıyı daha sağlam bir hale getirmektedir (Anisimova ve ark., 2015; Deeken ve ark., 2011).



Şekil 4.6. Spinal kord ve hücrelerinden arındırılmış ve çapraz bağlı spinal kord iskelesine ait mikro mekanik test sonucu

4.8. Biyoiskelelerin Fizikokimyasal Karakterizasyonu

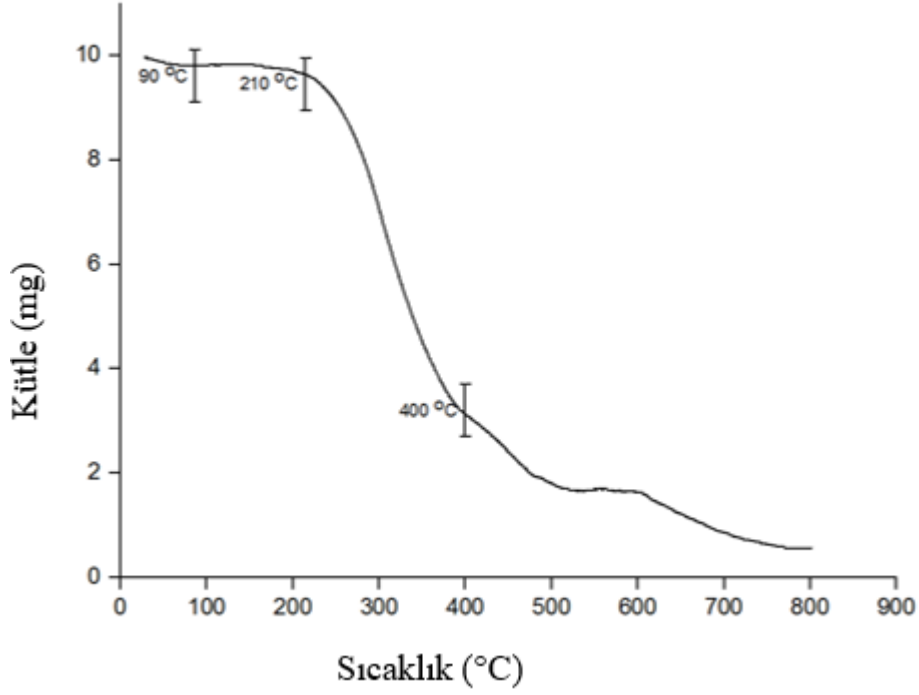
Deselülerize spinal kord iskeletinin ayrıntılı kimyasal karakterizasyonu için FT-IR spektroskopisi kullanılmıştır (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. Deselülerize Spinal Kord FT-IR Spektrumu

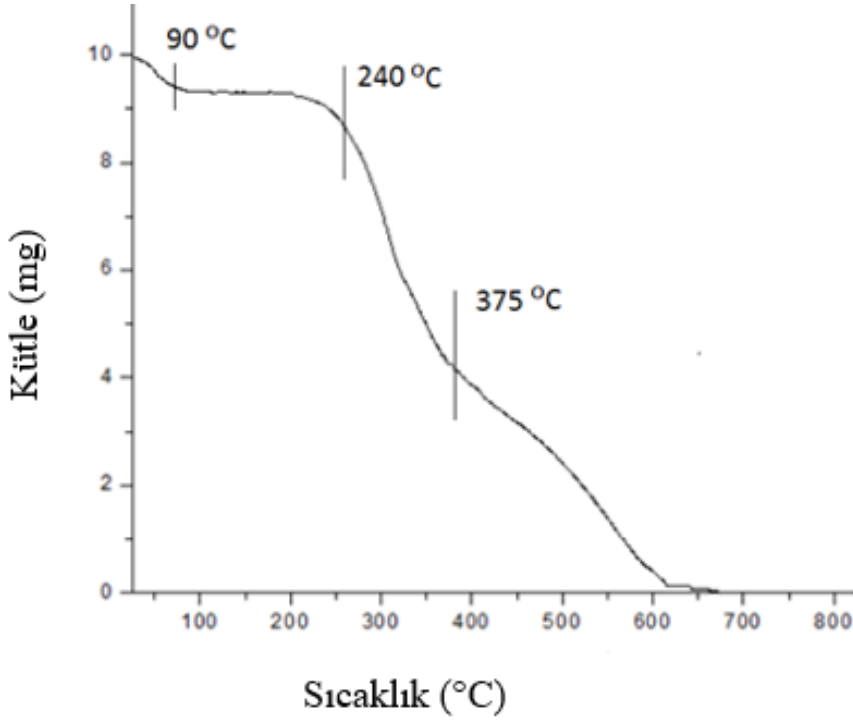
Deselülerize spinal kord iskelesi için yapılan FT-IR analizinde, 1731 cm^{-1} pikinde C=O bağlarının gerilme titreşimleri, 1634 cm^{-1} ve 1540 cm^{-1} pikleri ise sırasıyla amid I, amid II (C-N) bandına aittir. 1425 cm^{-1} , 1225 cm^{-1} piklerinde ise sırayla δ [(CH₂)], (PO₂⁻) bantları gelmiştir. Bu sonuçlar, omurilik yaralanmalarını araştıran Tamosaitye ve ark. (2015) yapmış oldukları sıçan omuriliği FT-IR spektrumu ile benzer sonuçlar elde ettiğimizi göstermiştir. Spinal kord dokusunun en belirgin bantlarının (proteinler ve polipeptid) karakteristik titreşimleri, 1634 cm^{-1} amid I ve 1540 cm^{-1} amid II bandı olarak tespit edilmiştir. Ayrıca spinal kordun miyelinlenmiş nöronlardan oluşan dış tarafı beyaz maddeyi içerdiğinden, 1731 cm^{-1} ve 1225 cm^{-1} 'de lipid ile ilişkili bantlar görülmüştür (Tamosaitye ve ark., 2015).

Ham doku ve deselülerize spinal kord iskelesinin TGA sonuçları Şekil 4.8 ve Şekil 4.9'de verilmiştir.



Şekil 4.8. Ham doku spinal kord iskelelerin TGA eğrisi

Ölçümler sırasıyla 600 °C ve 800 °C'ye kadar azot ve oksijen atmosferi altında gerçekleştirilmiştir. Ham doku için kütle kaybı suyun yapıdan çıkarılması ile başlar ve ardından proteinlerin termal bozunması şeklinde devam etmektedir. Ham doku spinal kord yapısal olarak bağlı olan suyunu, yaklaşık 50-90 °C sıcaklık aralığında kaybetmektedir. Termal bozunma sıcaklığı ise 210-400 °C arasında değişmektedir. Bu aralıkta ham doku ağırlığının yaklaşık %57-64 kaybetmiştir.



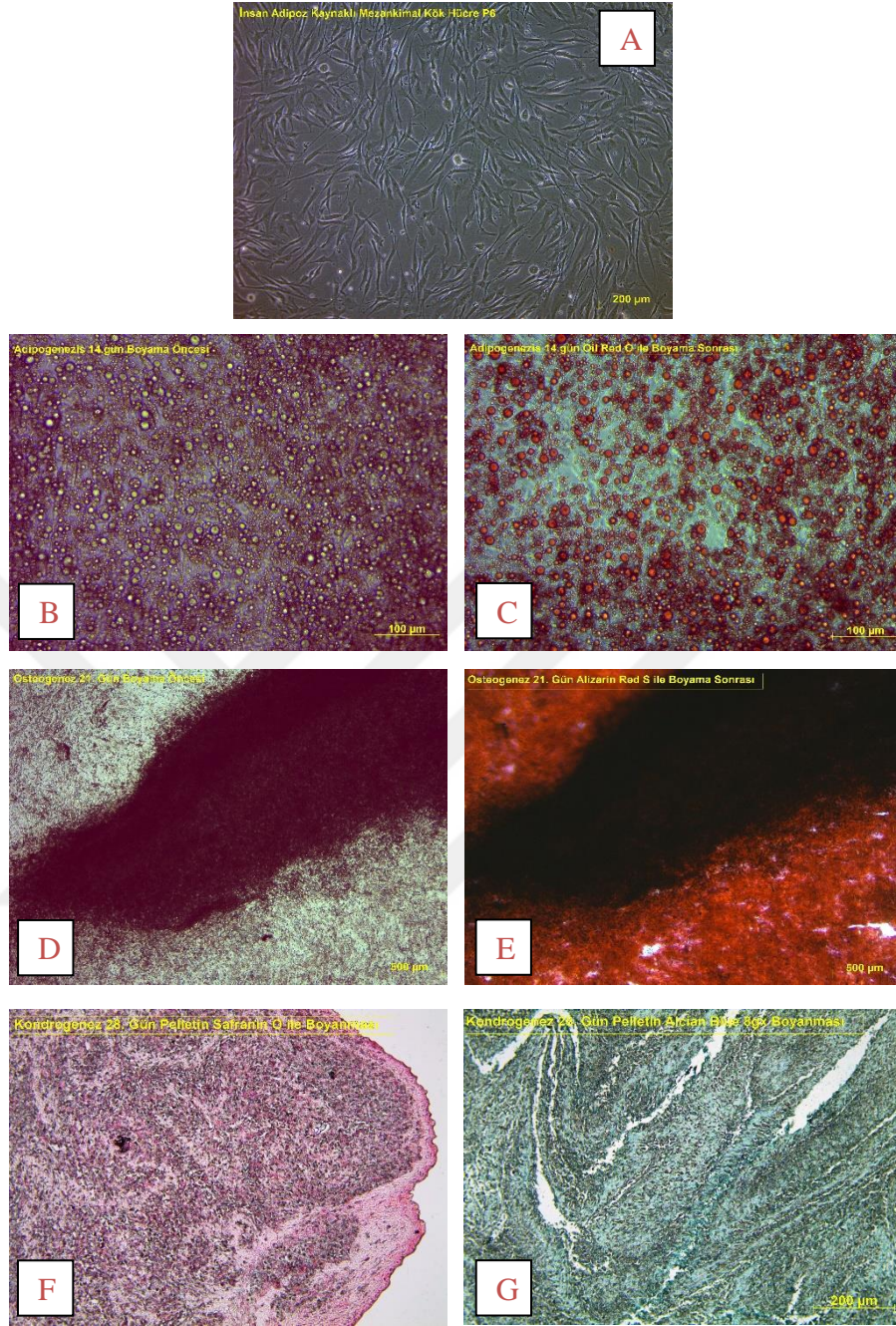
Şekil 4.9. Hücrelerinden arındırılmış spinal kord iskelelerin TGA eğrisi

Ölçümler sırasıyla 600 °C ve 800 °C'ye kadar azot ve oksijen atmosferi altında gerçekleştirilmiştir. Hücrelerinden arındırılmış iskele için kütle kaybı iki basamakta gerçekleşmektedir; ilk olarak suyun yapıdan çıkarılması ve ardından proteinlerin termal bozunmasıyla devam etmiştir. Hücrelerinden arındırılmış iskele yapısal olarak bağlı olan suyunu, yaklaşık 50-90 °C sıcaklık aralığında kaybetmektedir. Termal bozunma sıcaklığı 240 ila 375 °C arasında değişmektedir ve bu bozunma iskelenin büyük bir kısmını teşkil eden yapıdaki proteinlerin bozunması ile ilgilidir. Bu aralıkta, iskele ağırlığının yaklaşık %45-50'sini kaybetmektedir. Sonuç olarak, termal bozunma beklendiği gibi gerçekleşmiştir. Hem hücrelerinden arındırılmış iskele hem de ham doku için termal dayanımların benzer olduğu sonucuna varılmıştır.

4.9. Hücre Kültürü Çalışmaları

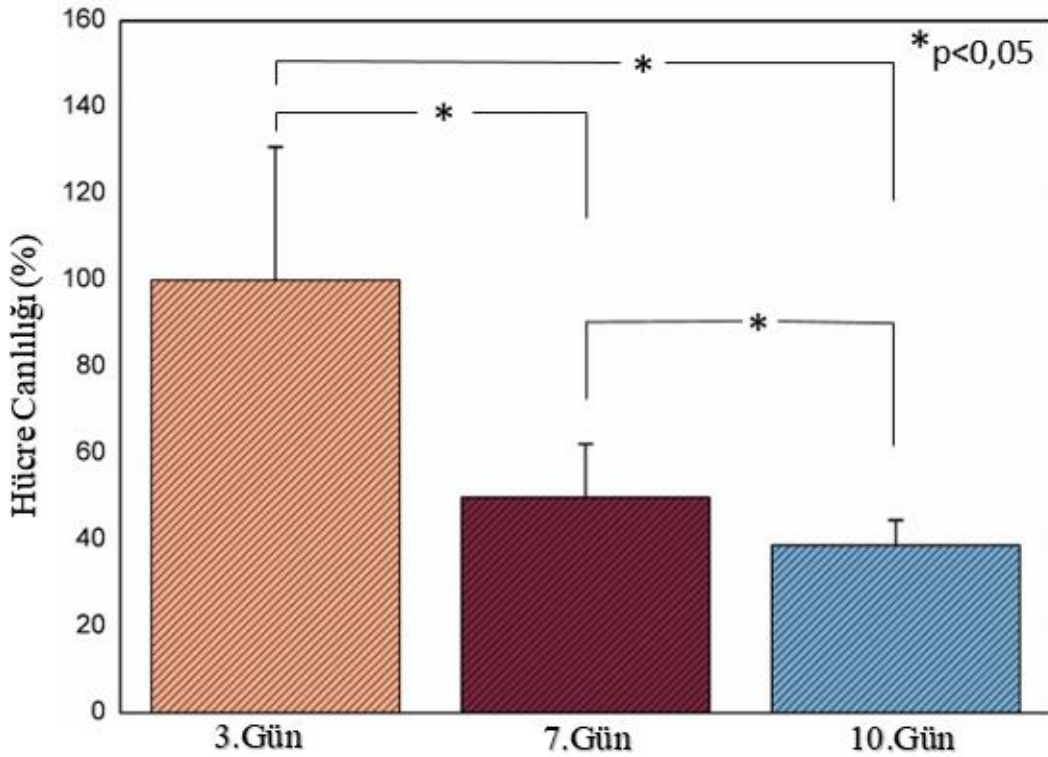
iAMKH'ler satın alınan kök hücre çoğaltma vasatında (P6-P8) çoğaltılmıştır. iAMKH'lerin mikroskopik görüntüleri Şekil 4.10'da gösterilmiştir. iAMKH'lerin T75 kültür plastiğine tutunduğu ve mezankimal kök hücreler için karakteristik bir özellik olan iğsi morfolojileri görülmektedir (Şekil 4.10 (A)). Çoklu soy farklılaştırma çalışması için adipojenik, osteojenik ve kondrojenik indüksiyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Farklılaştırma çalışmaları indüksiyon koşullarına göre dizayn edilmiştir. İndüksiyon

çalışmalarında kitler kullanılmış ve indüksiyon sonrası farklılaşma düzeyleri histokimyasal olarak karakterize edilmiştir (Şekil 4.10). iAMKH'ler başarılı bir şekilde farklılaştırılarak her hücre tipi histolojik boyamadan sonra kendi spesifik özelliklerini göstermiştir (Şekil 4.10 (A)). Şekil 4.10 (B)'de 14 günün sonunda kök hücrelerin adipojenik farklılaşması incelendiğinde kültür plastiği yüzeyini kaplayan hücreler tarafından üretilen yağ damlacıkları gözlemlenmiştir. Şekilde 4.10 (C)'de görüldüğü gibi adipogenezis, 14. günün sonunda Oil Red O boyaması ile karakterize edilmiş ve adiposit/pre-adiposit hücreleri tarafından üretilen yağ damlacıkları boyanmıştır. 21. gün sonunda oluşan osteojenik farklılaşma, Alizarin Red S boyaması ile karakterize edilmiş ve osteosit/osteoblast hücreleri tarafından üretilen kalsiyumun boyandığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.10 (D)). 28. günün sonunda kondrojenik farklılaşma tamamlanmış ve ardından Safranin O ve Alcian Blue 8gx (Safranin O (Şekil 4.10 (F)) ve Alcian Blue 8gx (Şekil 4.10 (G)) boyaması yapılmıştır.

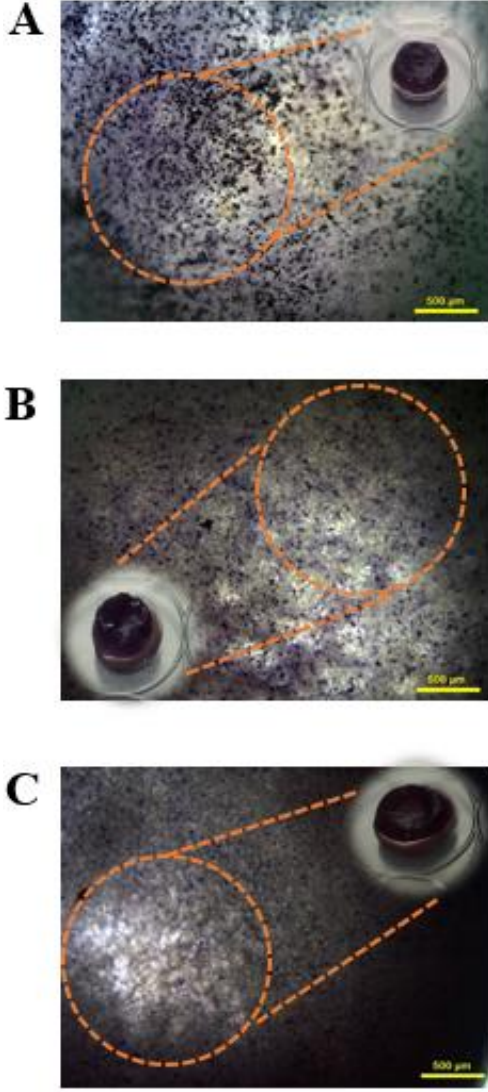


Şekil 4.10. Kök hücrelerin *in vitro* çoklu-soy farklılaşma kabiliyetlerinin histolojik analizlerle belirlenmesi Adipoz kaynaklı mezenkimal kök hücreler (A), adipogenezis; oil red O ile boyaması (B, C), osteogenezis; alizarin red S ile boyaması (D, E), kondrogenezis; safranin O boyaması (F) ve alcian blue 8gx boyaması (G).

iAMKH'ler çoklu soy farklılaşması tamamlandıktan sonra hücrelerinden arındırılmış spinal kord iskeleleri üzerine ekilmiştir. İskele üzerindeki hücre canlılığı ve proliferasyonu 3.,7. ve 10. günlerde yapılan MTT testi ile belirlenmiştir. Şekil 4.11'deki MTT grafiği incelendiğinde hücrelerinden arındırılmış iskele üzerinde günden güne hücre proliferasyonunda bir düşüş meydana geldiği görülmüş ancak iskelelerin herhangi bir sitotoksik etki göstermediği belirlenmiştir. Hücre proliferasyonunda görülen bu düşüş yapılan ANOVA testi sonucunda da istatistiksel olarak birbirinin aynısı olduğu sonucuyla desteklenmektedir. Ayrıca iskelelerin MTT reaktifi ile boyanmış mikroskobik ve makroskobik fotoğrafları çekilmiştir (Şekil 4.12). Şekil 4.12'de formazan kristallerinin mor renginin şiddeti makroskobik iskele fotoğrafları ile iskele içindeki hücre canlılığı ise mikroskobik fotoğraflarla desteklenmiş ve sonuç olarak iskelelerde 3,7 ve 10 gün boyunca hücre canlılığı açık bir şekilde görülmektedir.



Şekil 4. 11. Deselülerize biyoiskeleler üzerinde iAMKH'lerin 3., 7. ve 10. günlerdeki çoğalma ve canlılık düzeyleri



Şekil 4.12. Deselüerize biyoiskeleler üzerinde iAMKH'lerin 3, 7 ve 10. günlerdeki çoğalma ve canlılık düzeylerinin makro ve mikro fotoğrafları

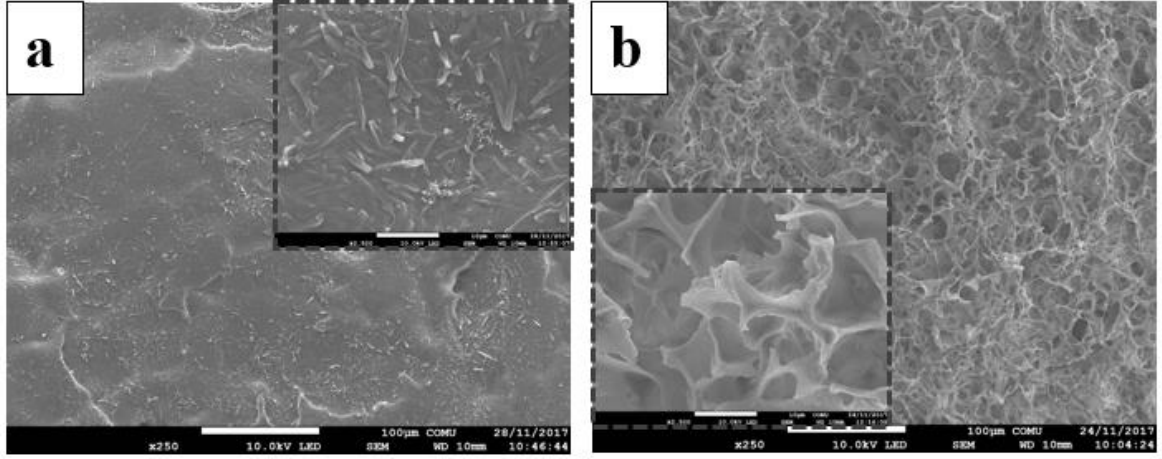
Hücre kültürü çalışmaları ile ilgili olarak literatürde Jiang ve ark. (2013) sıçan spinal kordu %1 Triton X-100 (v/v) ve %1 Sodyum deoksikolat (w/v) gibi kimyasallar kullanarak hücrelerinden arındırma işlemi uygulamıştır. Ardından deselüerize dokuları gluteraldehit ve genipin ile çapraz bağlamıştır. Çapraz bağlama sonrasında hücrelerinden arındırılmış iskelelere sıçan MKH'ler ekilmiş ve iskelelerin hücreler üzerindeki sitotoksik etkisi araştırılmıştır. Gluteraldehit ile yapılan çapraz bağlama, MKH'ler üzerinde oldukça yüksek bir sitotoksik etki göstermiştir. Genipinin ile çapraz bağlanmış iskelede MKH'ler iskele içine penetre olmuşlardır. Ayrıca genipinin düşük sitotoksitesisi sayesinde iskele üzerine ekilen MKH'lerin, 7 gün içinde in vitro ortamda hücre proliferasyonunun da arttığı görülmüştür. Dolayısıyla, genipin ile çapraz bağlı sinir doku iskeleleri, doku mühendisliği uygulamaları

için uygun bir biyomalzeme olduğu belirlenmiştir (Jiang ve ark., 2013). Aynı şekilde Deeken ve ark. (2010) domuz tendonunu %1 Tri-n-butil fosfat (v/v) kullanarak hücrelerinden arındırmış ve sonra deselülerize tendonu düşük oranlarda karbodiimid çapraz bağlayıcı kullanarak, çapraz bağlama işlemleri gerçekleştirmişlerdir. Bu işlemin ardından L 929 sıçan fibroblast hücreleri, deselülerize ve ham doku üzerine ekilerek 3 gün sonunda hücre canlılığı Flow sitometrisi ile belirlenmiştir. Flow analizi sonucu kontrol gruptaki hücre canlılığı 86 ± 8 , ham dokudaki hücre canlılığı 72 ± 4 ve hücrelerinden arındırılmış olan dokuda 9 ± 3 olarak bulunmuştur. İstatiksel olarak da bu sonuçların birbiriyle aynı olduğu hücre canlılığında önemli bir fark olmadığı bildirilmiştir (Deeken ve ark., 2010). Yapılan başka bir çalışmada Caron ve ark. (2016), içinde karbomer, agoroz, polietilen glikol ve arginin-asparagin-glisin aminoasitlerini içeren bir hidrojel geliştirmişlerdir. iMKH'lerin biyomalzeme üzerine tutunmasını, geliştirdikleri farklı hücre ekim yöntemleriyle değerlendirmişlerdir. İlk olarak liyofilize halde olan biyomalzeme üzerine iMKH'lerin ekimi yapılmış, diğer yöntemde ise jel halindeki biyomalzemeye iMKH'ler eklenip karıştırılmış ve ardından hücre canlılık testi yapılmıştır. Bu iki farklı yöntem sonucunda iMKH'ler jel formunda yüklenen biyomalzemede 1,7,14 ve 21 gün boyunca hücre proliferasyonu günden güne artış gösterirken, liyofilize halde hücre ekimi gerçekleştirilen biyomalzemede; 1-7. gün arasında azda bir düşüş gösterirken 7-14. günlerde hücre canlılığı artmıştır. Ancak 14- 21. günden sonra hücre canlılığında kayda değer bir azalma meydana gelmiştir. Böylece hidrojel formunda olan biyomalzemelerinin hücre canlılığını daha çok desteklediği ortaya konulmuştur. Ayrıca liyofilize halde hücre ekimi yapılan biyomalzemenin yeterince hücre canlılığını destekleyememesinin sebebi yapının mekanik özellikleri ile ilgili (liyofilize) olduğu ve dolayısıyla hücrelerin iskeleye yeterince nüfuz edemediğini göstermektedir. Ancak liyofilize halde kullanılan bu tip biyomalzemelerin *in-situ* ortamda olabilecek çevresel dejenerasyonlara karşı hem iskele içinde bulunan hücrelere hem de iskelenin kendi yapısını koruyabilmede bir savunma mekanizması olarak pozitif bir katkısı olduğu düşünülmektedir. Bu özelliği ile de liyofilize biyomalzemelerin kullanılabilir olduğu yapılan çalışmalarla desteklemiştir. Hücre kültürü çalışmalarında kullanılabilecek bu iki farklı formdaki biyomalzemelerin farklı yöntemler geliştirilerek sürdürülebilir ve umut verici stratejiler olacağı ortaya konmuştur (Caron ve ark., 2016). Yapılan başka bir çalışmada Ban ve ark. (2017), sıçan spinal kordunu %3 Triton X-100 (v/v) %0,02 trypsin (w/v), %0,05 EDTA (w/v) çözeltileri yardımıyla hücrelerinden arındırmışlardır. Sonrasında sıçandan izole ettikleri nöron hücrelerini deselülerize spinal kord üzerine ekmişlerdir. İzole edilen nöron hücrelerinin büyüme eğrisi sonucunda 1-4 gün içinde nöron hücreleri sayısında

artış meydana gelmektedir. 5. günde nöron sayısı maksimuma ulaşmıştır. 5. günden sonra hücre büyümesi sabit kalmış, 7. günden sonra hücre sayısı azalmaya başlamıştır. Hücrelerinden arındırılan spinal kord iskelesi üzerine ekilen nöron hücreleri MTT testi ile hücre canlılığı belirlenmiştir. Nöronların iskele üzerindeki hücre canlılığı kontrol grubuyla karşılaştırıldığında belirgin bir fark olmadığı hücrelerin iskeleyi tamamen doldurduğu tespit edilmiştir (Ban ve ark., 2017). Ayrıca Tukmachev ve ark. (2016) domuz spinal kordunu hücrelerinden arındırılarak hidrojel formuna getirilmiş ardından biyoiskeleleri insan kordon kanı hücreleri ile etkileştirerek *in vitro* ortamda hücre canlılığı ve proliferasyonu ile ilgili bir çalışma gerçekleştirmiştir. Yaklaşık 500,000 hücre/kuyucuk ekilen kültürde 1-3 gün arası hücre canlılığında artış gözlenirken 3-7 gün arasında durağan kalan kodon kanı kök hücreleri 7. günden sonra azalmaya başlamış ve 14. gün hücrelerin kaydadeğer bir şekilde azaldığı sonucuna varılmıştır. Sonuç olarak yapılan MTT testi, literatürde yapılan bu çalışmaların sonuçları ile karşılaştırılmıştır. Elde edilen sonuçların, literatürdeki çalışmalarla uyumlu olduğu ve deselülerize sinir greftinin hücreler üzerinde toksik etki göstermediği tespit edilmiştir. Bunlara ek olarak MTT testinde günlere bağlı olarak meydana gelen azalmanın nedeni, kök hücrelerin iskele içinde farklılaştığını ancak kök hücre besiyerinin farklılaşan nöron/nöroblast hücrelerini belirli bir aşamaya kadar hayatta tutabildiğini göstermektedir. Bunun için de nöron/nöroblast hücreler için özel besiyerlerinin kullanılması gerektiği öngörülmektedir. Sonuç olarak hücrelerin proliferasyon kapasitesinin daha ileriki çalışmalarla arttırılabileceği düşünülmektedir.

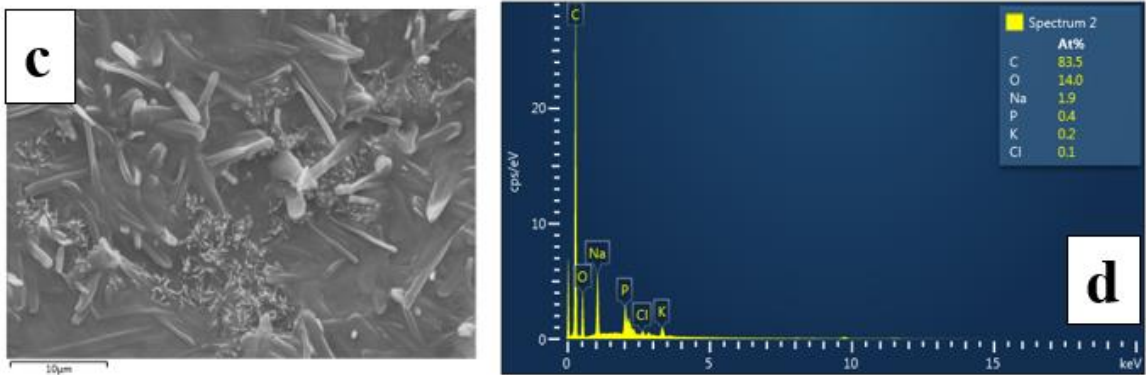
4.10. Taramalı Elektron Mikroskop Analizi

Hücrelerinden arındırılmış iskele üzerine ekilen iAMKH'ler 3.,7. ve 10. gün SEM mikrografları çekilmiştir. SEM analizi, hücrelerin iskele üzerinde tutunması, morfolojisi ve yoğunluğunu tespit etmede önemlidir. Ham doku spinal kord biyoiskelesi ile hücresiz deselülerize çapraz bağlı biyoiskelenin SEM mikrografları incelendiğinde aralarında belirgin bir fark bulunmaktadır (Şekil 4.13). Ham doku spinal kord iskelesinde bulunan çeşitli bileşenler, hücre kalıntıları; çapraz bağlama ve hücrelerinden arındırma işlemi sonrasında yapıdan uzaklaştırılmıştır. Böylece yapı kompakt bir halden çıkıp gözenekli bir biyoiskele formuna dönüşmüştür.



Şekil 4.13. Ham doku (a) ve deselüerize çapraz bağlı biyoiskele (b)

SEM mikrograflarında ham doku spinal kord biyoiskelesi yüzeyinde bazı kalıntılar görülmüş ve bunların kimyasal olarak belirlenebilmesi için EDX analizi yapılmıştır. Şekil 4.14’de görülen EDX analizi sonucunda yüzeyde bulunan çubuksu kalıntıların NaOH kristalleri olduğu sonucuna varılmıştır. Yüzeydeki bu kristal kalıntıların sebebi, spinal kord biyoiskele haline getirirken 0,1 M NaOH çözeltisi ile homojenizasyon işlemine maruz bırakılmasından kaynaklanmaktadır. Ayrıca EDX analizinde kullanılan ham doku spinal kord iskelesi organik kaynaklı olduğundan, karbon ve oksijenin kütlece yüzdesi en yüksek çıkmıştır. Karbon ve oksijenden sonra sodyumun pikinin en yüksek çıkmasında yapıda NaOH kristallerinin bulunduğu bir göstergesidir.

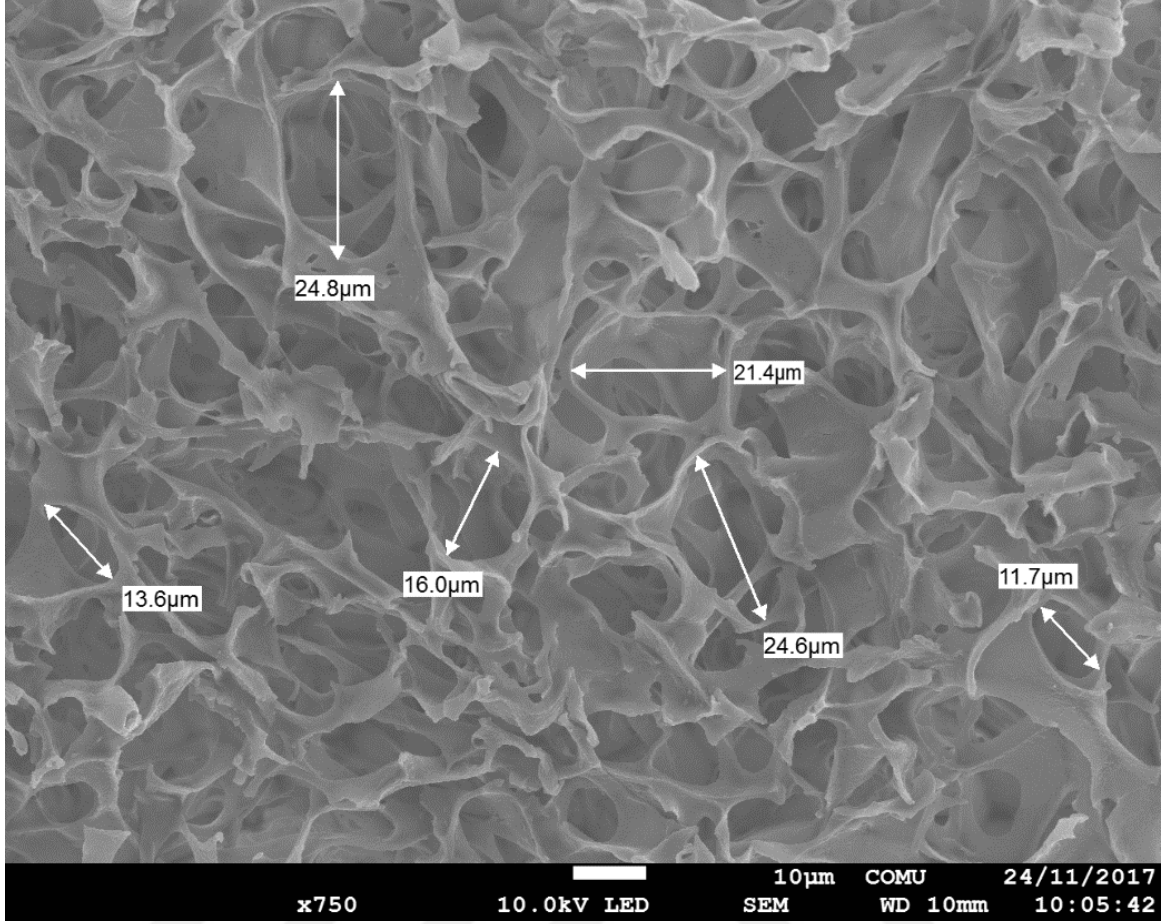


Şekil 4.14. (c) EDX analizi SEM görüntüsü (d)EDX spektrumu

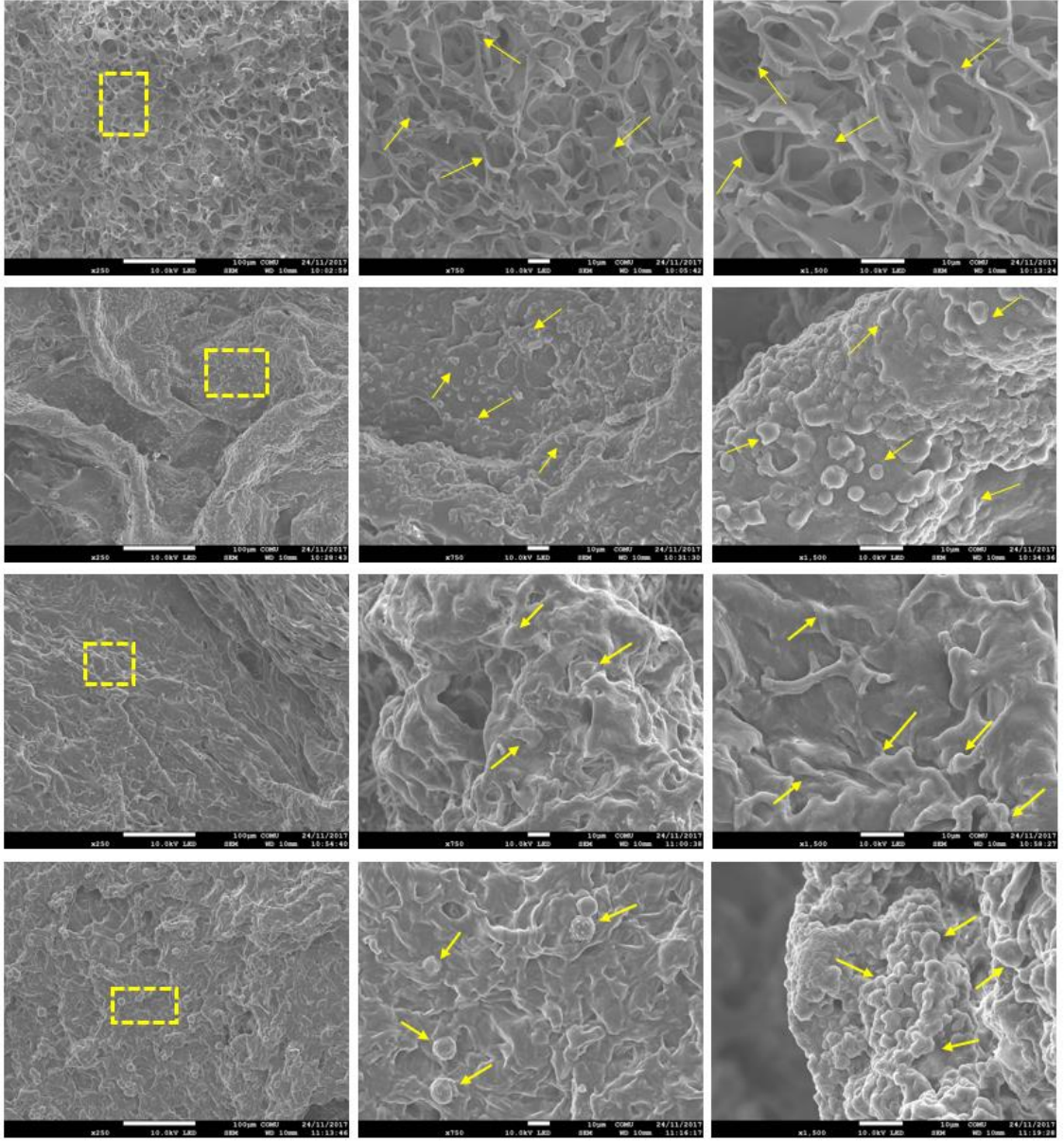
Hücresiz deselüerize çapraz bağlı biyoiskelenin SEM mikrografları incelendiğinde çapraz bağlama ve hücrelerinden arındırma işlemi başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir.

Ayrıca hücreleriz biyoiskele hücrelerin tutunması için yeterli gözeneklilikte olduğu görölmüştür.

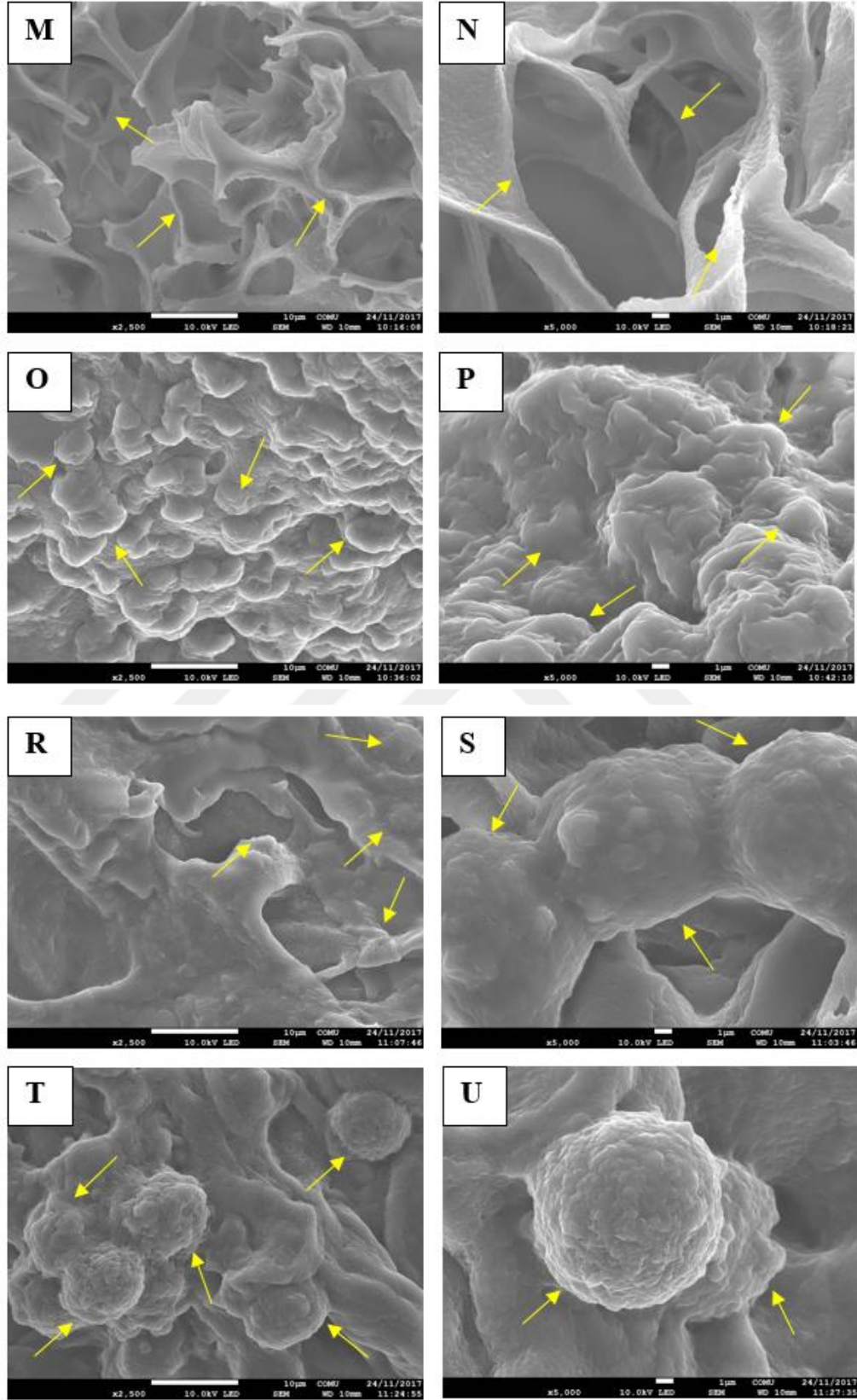
Deselülerize spinal kord iskelelerin ideal şekilde çapraz bağlanıp uygun gözenekliliğin sağlanmasıyla, fizyolojik tampon ortamında dağılmadan dayanıklı halde kalmasını sağlanmıştır. Bu sayede hücreler, iskele üzerinde metabolik atıklarını rahatça uzaklaştırmakla beraber hücre adezyonu, migrasyonu ve proliferasyonu da tetiklenmektedir (Sezgin Arslan, 2017). Bu amaçla gerçekleştirilen çapraz bağlama ve liyofilizasyon işlemleri sonucunda gözeneklilik, SEM analizleriyle çeşitli büyütmelede gözenek çapı hesaplanmıştır. Şekil 4.15 incelendiğinde deselülerize spinal kord iskelelerin homojen ve oldukça gözenekli bir yapıya sahip olduğu görölmektedir. Ham doku ve deselülerize iskelelerin gözenek çapları x750 büyütmede 6 farklı bölgeden ölçüm alınarak belirlenmiştir. SEM gözeneklilik testi sonucunda gözenek çapı ortalama 18,67 µm olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.15). Hücrelerinden arındırılmış spinal kord iskeleleri gözenekli yapısı ile etkin hücre bağlanmasını sağlayan ağısı bir morfolojide olduğu görölmektedir. Şekil 4.15 SEM analizinden de anlaşılacağı üzere x750 büyütmede alınan mikrograflar çapraz bağlı deselülerize spinal kord iskelelerine genel bir bakış sunmaktadır. Çapraz bağlı deselülerize iskeleler üzerine ekilen iAMKH'ler 3,7 ve 10 gün boyunca gözenekli iskelenin tüm yüzeylerini kaplamıştır (Şekil4.16) (Şekil 4.17). SEM mikrografları ile görüntölen iskelenin mikromimarisi incelenmiştir. İskelelerin gözenek çaplarının hücre tutunması ve çoğalması için ideal olabileceği belirlenmiştir. İskelelerde bulunan gözeneklilik ne oranda fazlaysa hücre infiltrasyonu da bu oranda arttığı düşünölmektedir (Lu ve ark., 2004). Çünkü iskelede gözenekliliğin artmasıyla o bölgede yoğun bir hücre göçü meydana gelmektedir. Hücre göçü meydana gelen gözenekli iskelede, hücrelerin proliferasyonuda artmaktadır. Bu sebeple çapraz bağlama ve gözeneklilik, hücre infiltrasyonu için büyük önem taşımaktadır. Düşük gözeneklilik ile azalan hücre göçü, iskelenin biyobozunurluluğunu da azaltmaktadır. Bu şekilde elde edilen iskele, ideal bir doku mühendisliği iskelesinin özellikleride taşımamaktadır.



Şekil 4.15. Çapraz bağlı hücrelerinden arındırılmış biyoiskelenin gözenekliliğinin x750 büyütmede SEM ile belirlenmesi



Şekil 4.16. Çapraz bağlı hücrelerinden arındırılmış hücresiz biyoiskelelerin SEM görüntüsü (A) x250, (B) x750, (C) x1500 büyütme. iAMKH'lerin biyoiskele üzerinde 3.gün SEM mikrografları (D) x250, (E) x750, (F) x1500 büyütme. 7.gün iAMKH'lerin biyoiskele üzerinde SEM görüntüsü (G) x250, (H) x750, (I) x1500 büyütme. Hücreli biyoiskelelerin 10.gün SEM mikrografları (J) x250, (K) x750, (L) x1500 büyütme.

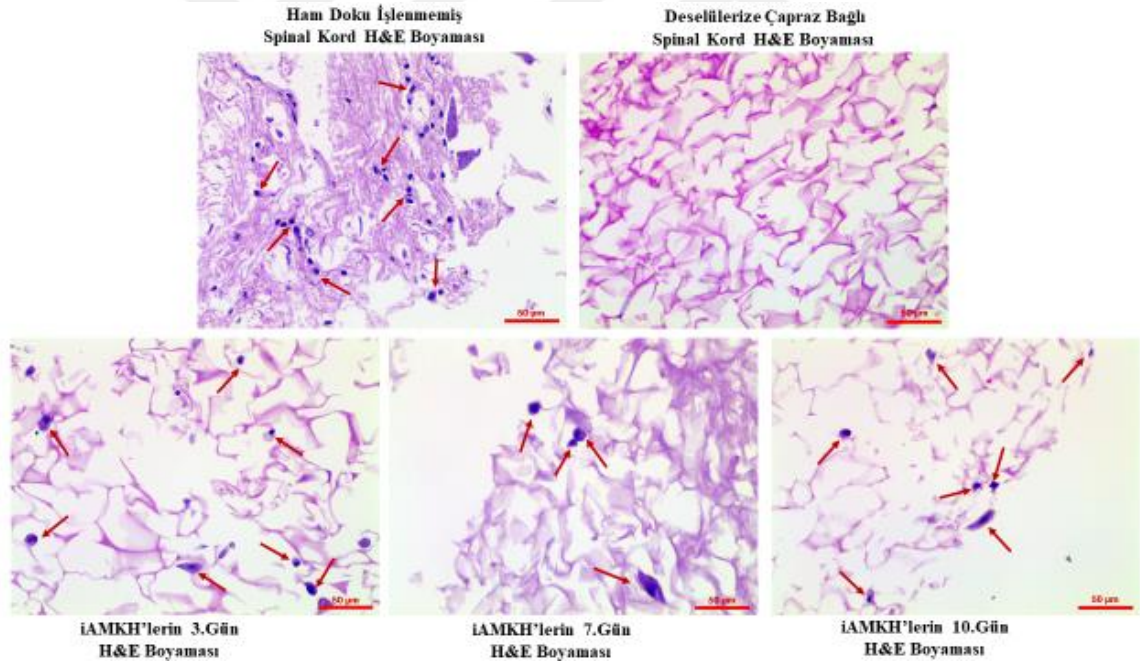


Şekil 4.17. Çapraz bağlı hücrelerinden arındırılmış hücresiz biyoiskelelerin SEM görüntüsü (M) x2500, (N) x5000 büyütme. iAMKH'lerin biyoiskele üzerinde 3.gün SEM mikrografları (O) x2500, (N) x5000 büyütme.7. gün iAMKH'lerin biyoiskele üzerinde SEM görüntüsü (R)

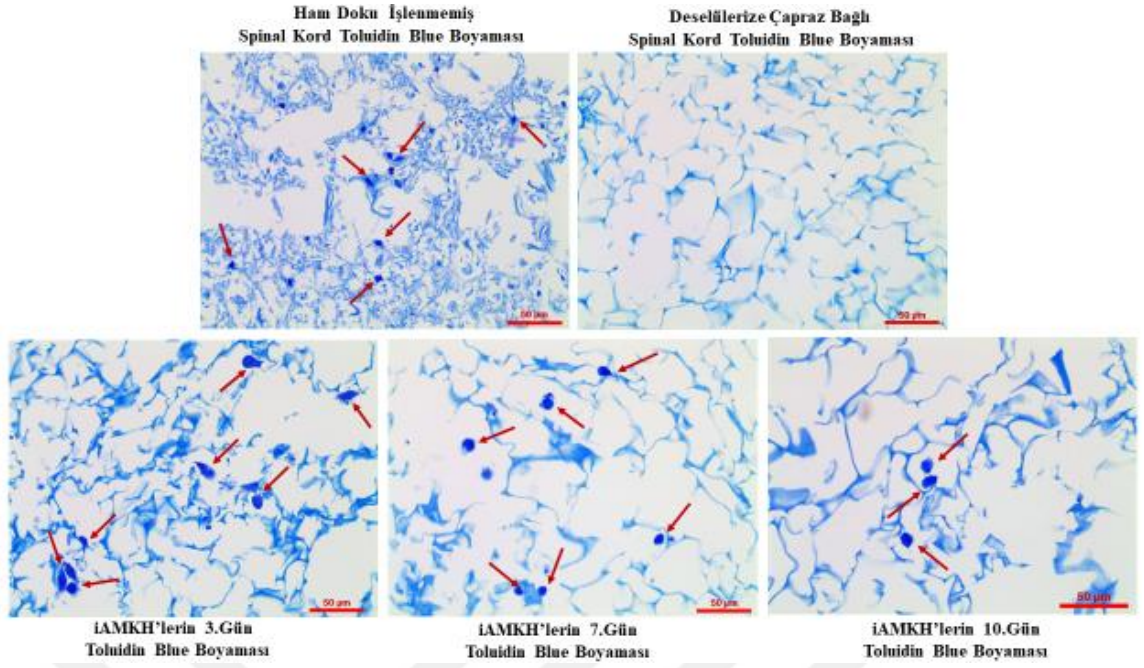
x2500, (S) x5000 büyütme. Hücreli biyoiskelelerin 10.gün SEM mikrografları (T) x2500, (U) x5000 büyütme.

4.11. Histokimyasal ve İmmünohistokimyasal Karakterizasyon

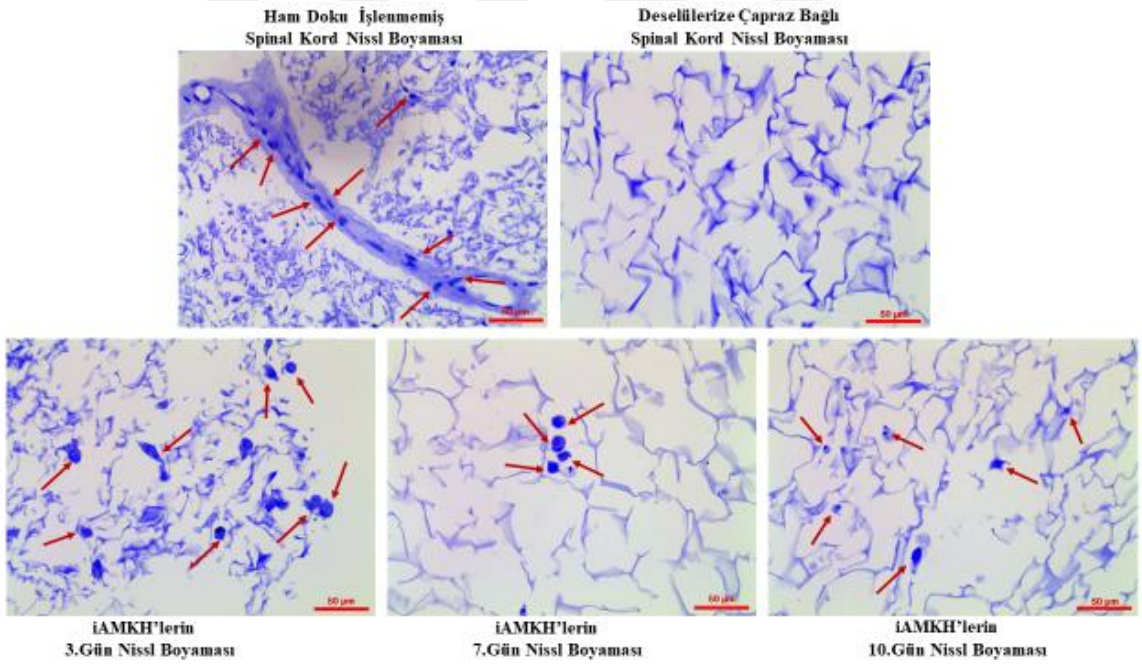
Ham doku spinal kord, deselülerize çapraz bağlı iskeleler ve iAMKH ekilmiş iskeleler histokimyasal ve immünohistokimyasal olarak karakterize edilmiştir (Şekil 4.18) (Şekil 4.19) (Şekil 4.20) (Şekil 4.21) (Şekil 4.22) (Şekil 4.23). Deselülerize spinal kord iskelelerinde herhangi bir hücre varlığına rastlanmamıştır. Bu sonuçlar da DNA içerik analizi ve agaroz jel elektroforezi analiz sonuçlarını desteklemektedir. Böylece iskelelerin başarılı bir şekilde hücrelerinden arındırıldığı kanıtlanmıştır. 3.,7. ve 10. günlerde yapılan histokimyasal (Hematoksilen Eozin, Toluidin Blue, Nissl Boyaması) ve immünohistokimyasal (GFAP, Nörofilament, S100) analiz sonuçlarında, hücrelerin iskeleye tutunduğu ve iskele içinde bazı bölgelerde hücre yoğunluğunun fazla olduğu görülmüştür. Bu sonuçlar, yapılan SEM analizi ile de desteklenmiştir.



Şekil 4.18. Ham doku, deselülerize çapraz bağlı iskele ve hücreli iskelelerin Hematoksilen Eozin boyaması

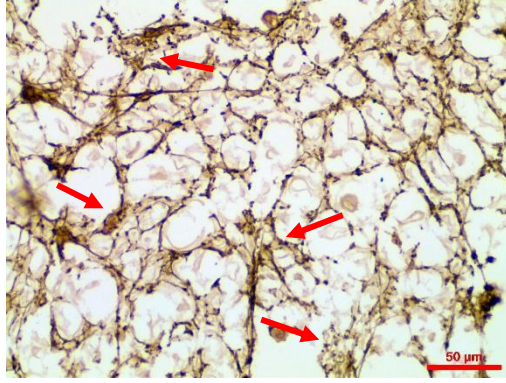


Şekil 4.19. Ham doku, deselülerize çapraz bağı iskele ve hücreli iskelelerin Toluidin Blue boyaması

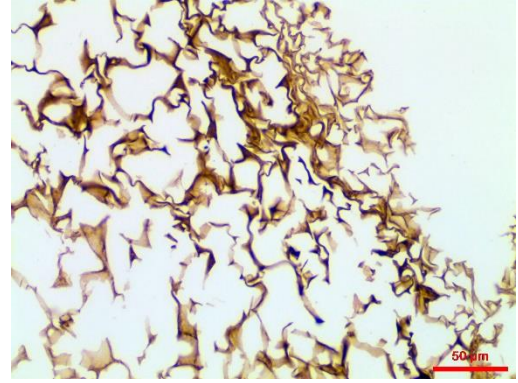


Şekil 4.20. Ham doku, deselülerize çapraz bağı iskele ve hücreli iskelelerin Nissl boyaması

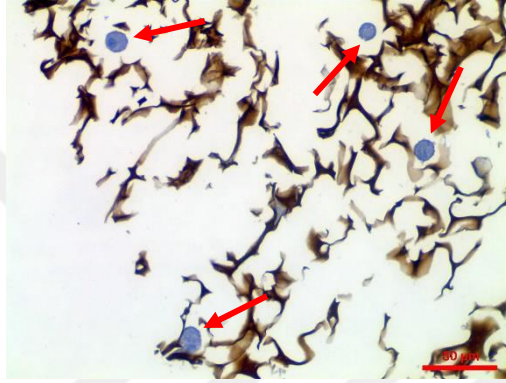
**Ham Doku İşlenmemiş
Spinal Kord GFAP Boyaması**



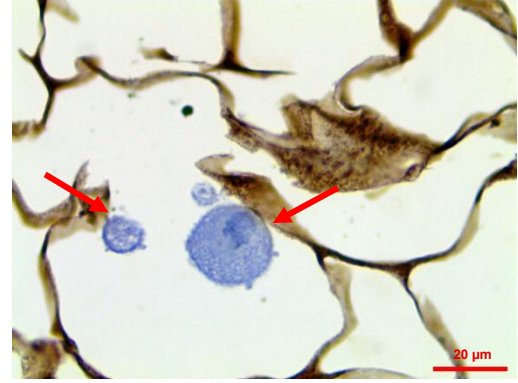
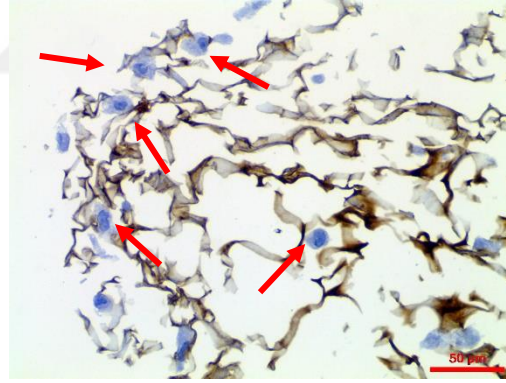
**Deselülerize Çapraz Bağlı
Spinal Kord GFAP Boyaması**



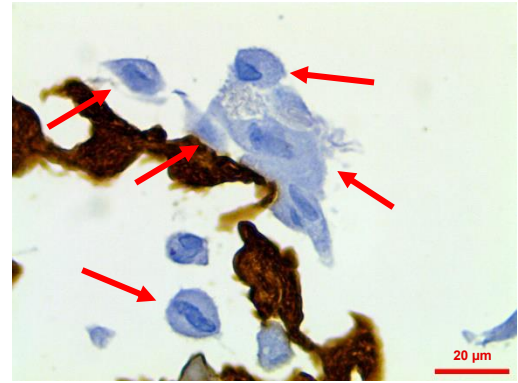
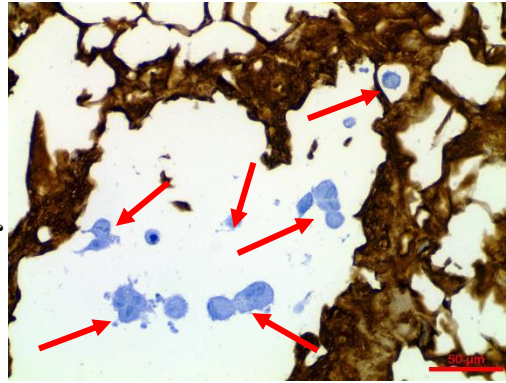
**iAMKH'lerin 3.Gün
GFAP Boyaması**



**iAMKH'lerin 7.Gün
GFAP Boyaması**



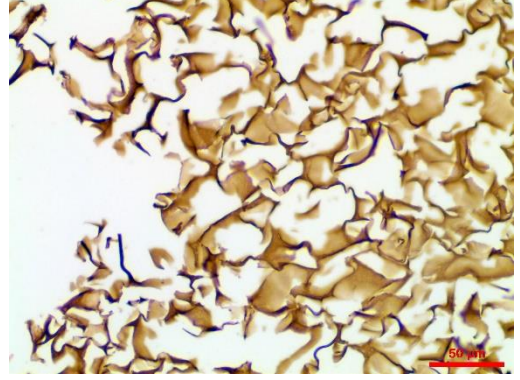
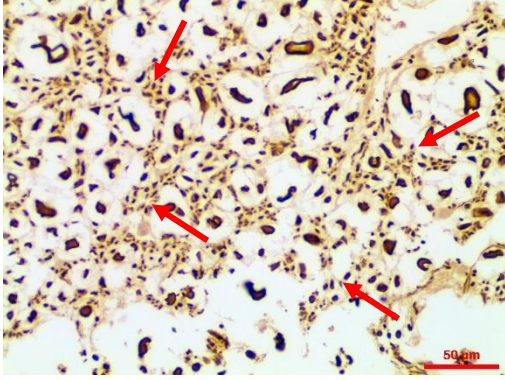
**iAMKH'lerin 10.Gün
GFAP Boyaması**



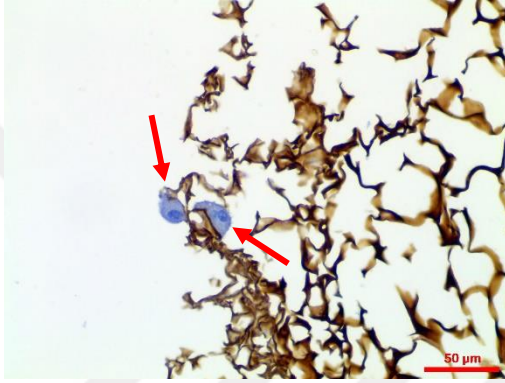
Şekil 4.21. Ham doku, deselülerize çapraz bağlı iskele ve hücreli iskelelerin GFAP boyaması

**Ham Doku İşlenmemiş Spinal Kord
Nörofilament Boyaması**

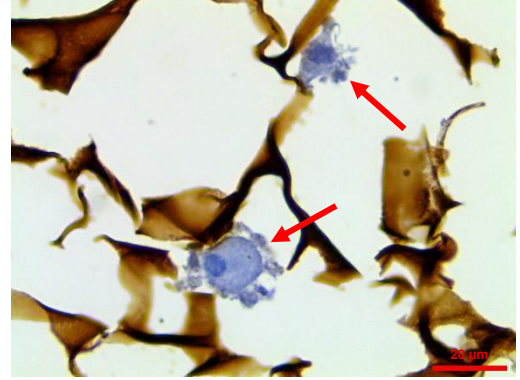
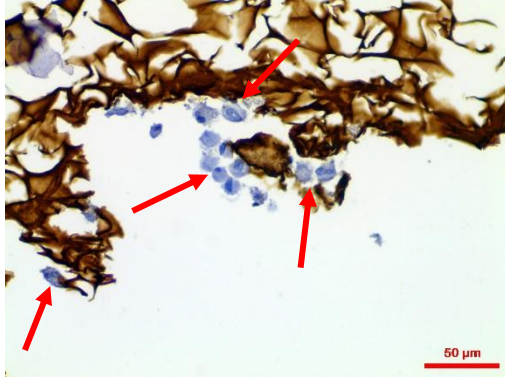
**Deselülerize Çapraz Bağlı Spinal
Kord Nörofilament Boyaması**



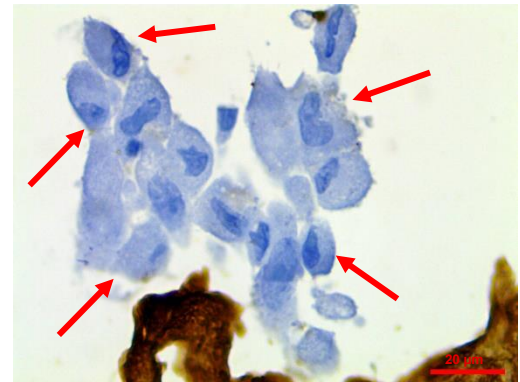
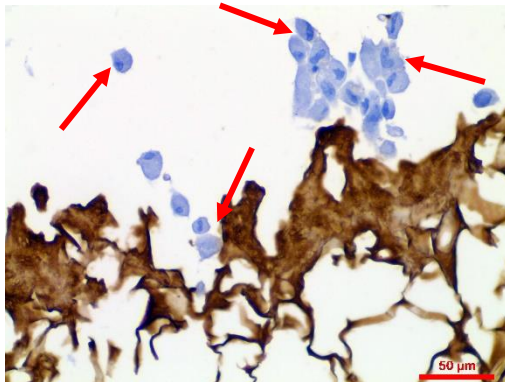
**iAMKH'lerin 3.Gün
Nörofilament Boyaması**



**iAMKH'lerin 7.Gün
Nörofilament Boyaması**



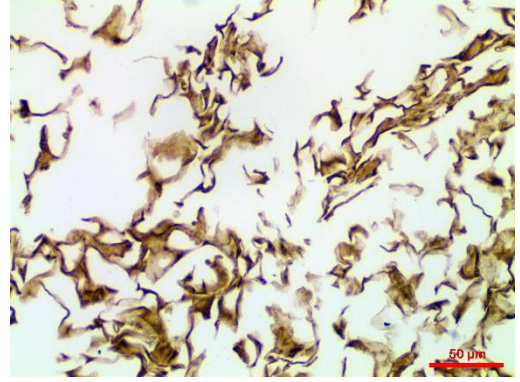
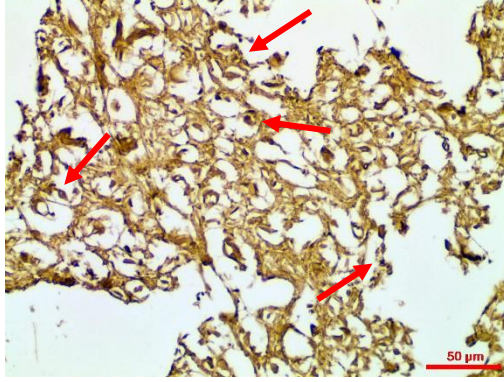
**iAMKH'lerin 10.Gün
Nörofilament Boyaması**



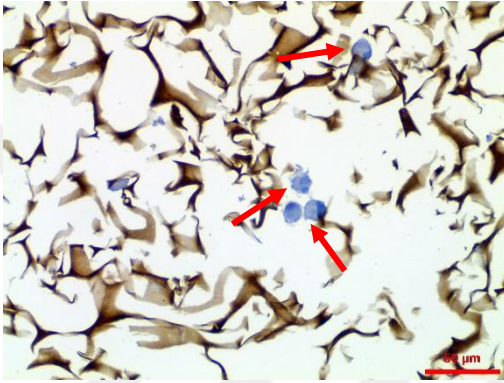
Şekil 4.22. Ham doku, deselülerize çapraz bağlı iskele ve hücreli iskelelerin Nörofilament boyaması

**Ham Doku İşlenmemiş Spinal Kord
S 100 Boyaması**

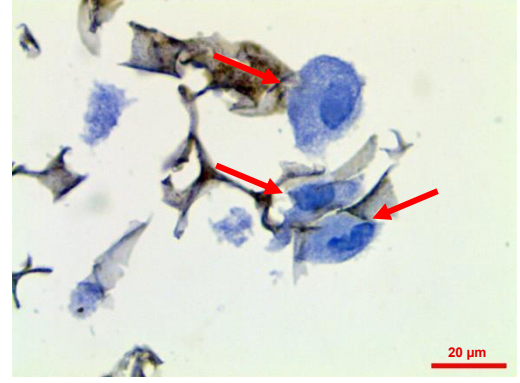
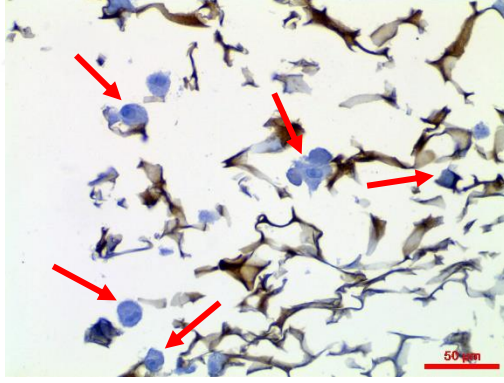
**Deselülerize Çapraz Bağlı Spinal
Kord S 100 Boyaması**



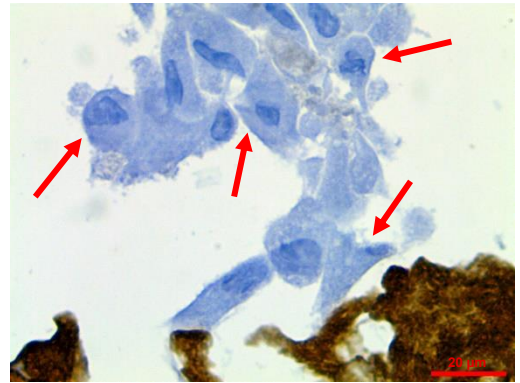
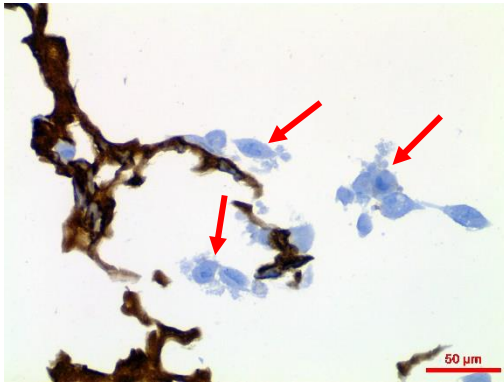
**iAMKH'lerin 3.Gün
S 100 Boyaması**



**iAMKH'lerin 7.Gün
S 100 Boyaması**



**iAMKH'lerin 10.Gün
S 100 Boyaması**



Şekil 4.23. Ham doku, deselülerize çapraz bağlı iskele ve hücreli iskelelerin S100 boyaması

BÖLÜM 5

SONUÇ VE ÖNERİLER

Doku ve organ ihtiyacının her yıl dünyada artması ve uygun donör bulunamaması doku mühendisliğine olan ilgiyi arttırmaktadır. Doku mühendisliği hastalık ya da travma sonucu, kaybedilmiş/hasarlı doku ve organların tedavisi için hücre biyoloji, biyomalzemeler ve mühendislik bilimlerini kullanarak hücreler, iskeleler ve biyoaktif moleküllerin kombinasyonlarının bir arada olduğu multidisipliner bir alandır. HDM'in son yıllarda doku mühendisliği ve rejeneratif tıp alanındaki kullanımını oldukça popüler olmuştur. HDM, bir doku veya organın yerleşik hücrelerini barındırarak yapısal ve işlevsel rollere hizmet etmektedir. HDM, hücre popülasyonu ile dinamik bir denge halindedir. Ayrıca doku ve organların değişen çevresel koşullarına cevap vermektedir. Doku mühendisliği ve rejeneratif tıp uygulamalarında kullanılan biyomalzemeler de doğal HDM'in yapısını taklit etmede kullanılmaktadır. Bu malzemelerde, doğal veya sentetik kaynaklı olarak farklı alt dallara ayrılmaktadır. Doğal veya sentetik kaynaklı biyomalzemelerin kullanımında bazı avantaj ve dezavantajlar bulunmaktadır. Örneğin immünojenite, doku uyumsuzlukları, biyobozunma ve işleme zorluğu gibi dezavantajlar bunların başlıca olanlarıdır. Bu konuda yapılan çalışmalar son yıllarda hız kazanmış olup yeni alternatif çalışmalar yapılmaktadır. Sinir mühendisliğinde yapılan çalışmalarda otolog greft kullanımında meydana gelen kısıtlamalar (ikincil ameliyat ve enfeksiyon riski) sonucu allogreftlere olan ilgi artmıştır. Ancak allogreftlerde meydana gelen donör saha morbiditesi, doku uyumsuzluğu/reddi, enfeksiyon riski gibi problemler allogreft kullanımını sınırlandırmıştır. Bilim insanları yapılan bu çalışmalara ek olarak hücrelerinden arındırılmış doku temelli matriksleri son dönemde yaygın bir şekilde kullanmaktadır. Bu sayede elde edilen HDM, doğal HDM'e en yakın özellikte olmaktadır. Ayrıca bu şekilde elde edilen biyomalzemelerde doku uyumsuzluğu, enfeksiyon riski gibi problemler en aza indirilmektedir. Hücrelerinden arındırılmış HDM, hasarlı doku veya organa implante edildiğinde o bölgenin onarımında, yenilemesinde ve hücrelerin tutunmasında görev almaktadırlar.

Bu sonuçlardan yola çıkarak gerçekleştirilen tez çalışmasında; sığır kaynaklı spinal kord dokusu 0,1 M NaOH çözeltisi ile homojenize edilerek biyoiskele haline getirilmiştir. Ardından iskelelerin dayanıklılığını arttırmak amacıyla NHS-EDC ile çapraz bağlama işlemleri yapılmıştır. Çapraz bağlama işleminin ardından iskelelerin mekanik dayanım kazandığı, tampon/deterjan çözeltisi içerisinde parçalanmadığı ve hücre kültürü çalışmaları için de uygun sağlamlıkta olduğu gözlemlenmiştir. Bu basamaktan sonra 8 farklı yöntem

denenerek hücrelerinden arındırma işlemi gerçekleştirilmiştir. 8. Yöntemde; içinde %1 SDS bulunan hipertonic çözelti içinde 72 saat çalkama işlemine maruz bırakılmıştır. Ardından 2 gün boyunca ultra saf su ile yıkanmışlardır. Sonrasında iskeleler tamponda hazırlanmış DNAaz ve RNAaz çözeltisi içinde 37,5 °C'da 24 saat boyunca muamele edilmiştir. Bu işlemin ardından 2 gün ultra saf suda yıkanan iskeleler etanol-perasedik asit içeren çözeltisi ile 5 saat boyunca dekontaminasyon işlemine tabi tutulmuş ve sonrasında ultra saf su ile yıkanmıştır. Ardından iskeleler liyofilize edilmiştir Hücrelerinden arındırılma işlemi çeşitli deterjan enzimler kullanılarak %86,57 oranında DNA içeriğinin azaltılmasıyla etkili bir deselülerizasyon işlemi yapılmıştır. İşlenmemiş ham doku ve hücrelerinden arındırılmış spinal kord için DNA içerik analizi, agaroz jel elektroforezi, SDS-PAGE, glikozaminoglikan analizi ve hidroksprolin testi gibi çeşitli yöntemler kullanılarak karakterize edilmiştir. Hücrelerinden arındırılmış biyoiskelelerin ve ham dokunun mekanik dayanımını belirlemek için mikro mekanik test, fizikokimyasal karakterizasyonları için TGA, FTIR analizleri yapılmıştır. Bu analizler sonucunda iskelelerin mekaniksel dayanımlarının *in vitro* ortamda kullanılabilceği sonucuna varılmıştır. Spinal kordun doğal yapısı, zayıf ve yoğun bir matrikse sahip olduğundan çapraz bağlama ve deselülerizasyon işlemleri, üretilen 3D iskeleye pozitif bir katkı sağlamıştır. Ancak iskelelere çok fazla çapraz bağlama işlemi yapılması sonucunda, hem hücrelerinden arındırma işlemi için (kimyasalların yapı içinde birikip iskeleden dışarı çıkamaması) hem de iskelelerin *in vitro* şartlarda hücreler üzerinde yaratacağı olumsuz durumlar göz önüne alındığında (hücrelerin yapıya nüfuz edememesi, hücre adezyonu ve migrasyonunda problemler yaşanması) en uygun çapraz bağlama yöntemi tercih edilmelidir. Aksi takdirde gözenek çapları hücrelerin tutunamamasına, yapının su tutma kapasitesinin düşmesine neden olur. Bu sonuçların gerçekleşmesi halinde, hücreler iskele içine giremeyerek gerekli faaliyetleri gösterememektedir. Bu yüzden aşırı çapraz bağlama yöntemlerinden de kaçınılması gerekmektedir. Ayrıca biyoiskele oluşturma aşamasında kullanılan 0,1 M NaOH çözeltisi, spinal kordun yapısında bolca bulunan bulunan lipidler (fosfolipid ve galaktolipidleri) için iyi bir solvent olduğu düşünülmektedir. Bunun dışında kullanılan örneğin asidik çözeltilerde, yapı yeterince çözünememekte ve süspanse halde kalmaktadır. Asidik çözeltilerin kullanılmasıyla geliştirilen biyoiskelede olumsuz durumlar (liyofilizasyon sonrası çökme, yapının hidrofobik hale gelmesi) meydana gelmektedir. Bu sebeple spinal kord homojenizasyonu için asidik çözeltiler uygun olmamaktadır. Bu doğrultuda gerçekleştirilen hücre kültürü çalışmalarında hücrelerinden arındırılmış biyoiskeleler üzerine iAMKH'ler ekilerek *in vitro* koşullarda hücre canlılığı ve proliferasyon kapasitesi belirlenmiştir. Ayrıca iAMKH'ler ile çoklu soy farklılaşma

çalışmalarında yapılmıştır. Bu çalışmalar sonucunda iAMKH'ler başarılı bir şekilde adipojenik, osteojenik ve kondrojenik soylara farklılaştığı, yapılan boyama çalışmaları ile gösterilmiştir. Hücrelerinden arındırılmış iskeleler üzerine 300,000 hücre/iskele olacak şekilde iAMKH'ler ekilmiştir. İskele üzerindeki iAMKH'lerin hücre canlılığı 3., 7. ve 10. günlerde yapılan MTT testi ile belirlenmiştir. Yapılan MTT testi sonucunda hücre canlılığında az da olsa bir düşüş görüldüğü ancak istatistiksel olarak bir fark olmadığı sonucuna varılmıştır. Ayrıca biyoiskelelerin herhangi bir sitotoksik etkisinin olmadığı tespit edilmiştir. Deselülerize iskelelerin morfolojik olarak karakterizasyonunda gözeneklilik çapı çeşitli büyütmelemlerde yapılan SEM analizleri ile belirlenmiştir. Ayrıca 3.,7. ve 10. gün için yapılan SEM analizleri sonucunda iskelenin mikromimarisi incelenmiştir. İskele üzerine ekilen iAMKH'ler gözenekli bir yapıya sahip olan iskelenin tüm yüzeylerini kaplamıştır. SEM mikrografları ile görüntülen iskelelerin gözenek çaplarının hücre tutunması ve çoğalması için ideal olabileceği belirlenmiştir. Bununla beraber deselülerize iskele ham doku iskele ile karşılaştırıldığında, çapraz bağlama ve hücrelerinden arındırma yöntemleri başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiş ve hücreler iskeleyi kaplamışlardır. Yapılan analizler sonucunda, hücrelerinden arındırılmış spinal kord iskeleleri tek başına klasik kültür şartları (%10 Fötal Sığır Serum, %1 L-glutamin, %1 penisilin-streptomisin ve %88 DMEM yüksek konsantrasyonda glikoz içeren) altında nöroindüktif etki göstermediği görülmüştür. Ancak yapılan histolojik analizler sonucu klasik kültür şartlarında iskelelerin bazı bölgelerinde hücre yoğunluğunun fazla olduğu ve bu bölgelerde bulunan hücrelerin küresel formda kaldığı görülmüş, buna ek olarak hücrelerin kümelenmeye doğru gittiği gözlemlenmiştir. Hücrelerin küresel formda olması “nörogenesis” adı verilen nöronal gelişim evresi için önemlidir. Hücrelerin daha ileriki aşamalara giderek astrosit, oligodendrosit ve glial hücreler gibi olgun sinir hücresine dönüşebilmesi için özel nörobazal medyum ve büyüme faktörleri içeren besiyerleri tercih edilebilir. Bu bulgular ışığında hücrelerinden arındırılmış spinal kord biyoiskelelerin sinir doku mühendisliğinde kullanılan eşdeğer biyomalzemelere kıyasla daha iyi bir nöroindüktif etki gösterebileceği tahmin edilmektedir. Bu da ileri çalışmalarla mutlaka desteklenmelidir. Sonuç olarak geliştirilen çapraz bağlı ve hücrelerinden arındırılmış biyoiskelelerin sinir doku mühendisliği uygulamaları için kullanılabilecek potansiyel bir biyomalzeme olduğu düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Akbari M., Tamayol A., Bagherifard S., Serex L., Mostafalu P., Faramarzi N., Mohammadi M. H. ve Khademhosseini A. 2016. Textile Technologies and Tissue Engineering: A Path Toward Organ Weaving. *Advanced Healthcare Materials*, 5(7), 751–766. doi:10.1002/adhm.201500517.
- Alaribe F. N., Manoto S.L., Motaung S.C.K.M. 2016. Scaffolds from biomaterials: advantages and limitations in bone and tissue engineering. *Section Cellular and Molecular Biology*, 71/4:353-366.
- Alovskaya a, Alekseeva T., Phillips J. B., King V. ve Brown R. 2007. Components of Extracellular Matrix for Nerve regeneration. *Topics in Tissue Engineering*, 3.
- Anisimova N. Y., Kiselevsky M. V., Sukhorukova I. V., Shvindina N. V. ve Shtansky D. V. 2015. Fabrication method, structure, mechanical, and biological properties of decellularized extracellular matrix for replacement of wide bone tissue defects. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 49, 255–268. doi:10.1016/j.jmbbm.2015.05.009
- Arslan Y. E., Hiz M. M. ve Arslan Sezgin T. 2015. The Use of Decellularized Animal Tissues in Regenerative Therapies *Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi*, 21(1), 139–145. doi:10.9775/kvfd.2014.11663.
- Arslan Sezgin T. 2017. Keratin Temelli İskele Üretimi Ve Doku Mühendisliği Uygulamaları İçin Etkinliğinin Değerlendirilmesi. Yüksek Lisans Tezi. Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Türkiye.
- Badylak S. F. 2004. Xenogeneic extracellular matrix as a scaffold for tissue reconstruction. *Transplant Immunology*, 12(3–4), 367–377. doi:10.1016/j.trim.2003.12.016
- Badylak S. F. 2005. Regenerative medicine and developmental biology: The role of the extracellular matrix. *Anatomical Record - Part B New Anatomist*, 287(1), 36–41. doi:10.1002/ar.b.20081

- Baiguera S., Del Gaudio C., Lucatelli E., Kuevda E., Boieri M., Mazzanti B., Bianco A. ve Macchiarini P. 2014. Electrospun gelatin scaffolds incorporating rat decellularized brain extracellular matrix for neural tissue engineering. *Biomaterials*, 35(4), 1205–1214. doi:10.1016/j.biomaterials.2013.10.060
- Ban D. X., Liu Y., Cao T. W., Gao S. J. ve Feng S. Q. 2017. The preparation of rat's acellular spinal cord scaffold and co-culture with rat's spinal cord neuron in vitro. *Spinal Cord*, 55(4), 411–418. doi:10.1038/sc.2016.144
- Bentires-Alj M., Hellin A. C., Lechanteur C., Princen F., Lopez M., Fillet G., Gielen J., Merville M. P. ve Bours V. 2000. Cytosine deaminase suicide gene therapy for peritoneal carcinomatosis. *Cancer gene therapy*, 7(1), 20–6. doi:10.1038/sj.cgt.7700093
- Bianco P. ve Robey P. G. 2001. Stem cells in tissue engineering. *Nature*, 414(6859), 118–121. doi:10.1038/35102181
- Blanpain C. ve Fuchs E. 2009. Epidermal homeostasis: A balancing act of stem cells in the skin. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10(3), 207–217. doi:10.1038/nrm2636
- Bongso A. ve Richards M. 2004. History and perspective of stem cell research. *Best Practice and Research: Clinical Obstetrics and Gynaecology*, 18(6), 827–842. doi:10.1016/j.bpobgyn.2004.09.002.
- Can A. 2008. A concise review on the classification and nomenclature of stem cells, 25(2), 57–59.
- Carballo-Molina O. A., Velasco I. 2015. Hydrogels as scaffolds and delivery systems to enhance axonal regeneration after injuries. *Cellular Neuroscience*, doi: 10.3389/fncel.2015.00013.

- Caron I., Rossi F., Papa S., Aloe R., Sculco M., Mauri E., Sacchetti A., Erba E., Panini N., Parazzi V., Barilani M., Forloni G., Perale G., Lazzari L. ve Veglianese P. 2016. A new three dimensional biomimetic hydrogel to deliver factors secreted by human mesenchymal stem cells in spinal cord injury. *Biomaterials*, 75, 135–147. doi:10.1016/j.biomaterials.2015.10.024.
- Chan L. K.Y., Leung V.Y.L., Tam V., Lu W.W., Sze K.Y. , Cheung K.M.C. 2012. Decellularized bovine intervertebral disc as a natural scaffold for xenogenic cell studies. *Acta Biomaterialia*, doi: 10.1016/j.actbio.2012.09.005.
- Chen F. M. ve Liu X. 2016. Advancing biomaterials of human origin for tissue engineering. *Progress in Polymer Science*, 53, 86–168. doi:10.1016/j.progpolymsci.2015.02.004
- Chen Y., Tang Y., Allen V. ve DeVivo M. J. 2016. Fall-induced spinal cord injury: External causes and implications for prevention. *Journal of Spinal Cord Medicine*, 39(1), 24–31. doi:10.1179/2045772315Y.0000000007
- Choudhury S. R., Hudry E., Maguire C. A., Sena-Esteves M., Breakefield X. O. ve Grandi P. 2017. Viral vectors for therapy of neurologic diseases. *Neuropharmacology*, 120, 63–80. doi:10.1016/j.neuropharm.2016.02.013
- Crapo P. M., Gilbert T. W. ve Badylak S. F. 2011. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials*, 32(12), 3233–3243. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.01.057.
- Crapo P.M., Medberry C.J., Reing J.E. , Tottey S., Merwe Y.V.D., Jones K.E., Badylak S.F. 2012. Biologic scaffolds composed of central nervous system extracellular matrix. *Biomaterials*, doi:10.1016/j.biomaterials.2012.01.044.
- Deeken C. R., White A. K., Bachman S. L., Ramshaw B. J., Cleveland D. S., Loy T. S. ve Grant S. A. 2011. Method of preparing a decellularized porcine tendon using tributyl phosphate. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*, 96 B(2), 199–206. doi:10.1002/jbm.b.31753.
- Daly W., Yao L., Zeugolis D., Windebank A., Pandit A. 2011. A biomaterials approach to peripheral nerve regeneration: bridging the peripheral nerve gap and enhancing

- functional recovery. *J. R. Soc. Interface.*, doi:10.1098/rsif.2011.0438.
- Eberli D., Atala A. 2006. Tissue engineering using adult stem cells. *Methods Enzymol.*, 420:287-302.
- Erten E., Arslan S. 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 Advance*, 6: 94236–94246.
- Fodor W.L. 2003. Tissue engineering and cell based therapies, from the bench to the clinic: The potential to replace, repair and regenerate. *Reprod Biol Endocrinol.*, 1:102. doi: 10.1186/1477-7827-1-102.
- Ghasemi-Mobarakeh L., Prabhakaran M. P., Morshed M., Nasr-Esfahani M. H. ve Ramakrishna S. 2008. Electrospun poly(ϵ -caprolactone)/gelatin nanofibrous scaffolds for nerve tissue engineering. *Biomaterials*, 29(34), 4532–4539. doi:10.1016/j.biomaterials.2008.08.007
- Gil-Dones F., Alonso-Orgaz S., Avila G., Martin-Rojas T., Moral-Darde V., Barroso G., Vivanco F., Scott-Taylor J. ve Barderas M. G. 2009. An Optimal protocol to Analyze the Rat spinal cord proteome. *Biomarker Insights*, 4, 135–164.
- Gilbert TW, Sellaro TL, Badylak SF. 2006. Decellularization of tissues and organs. *Biomaterials*, DOI: 10.1016/j.biomaterials.2006.02.014.
- Hosseinkhani M., Mehrabani D., Karimfar M. H., Bakhtiyari S., Manafi A., Shirazi R., Hosseinkhani M., Mehrabani D., Mh K. ve Bakhtiyari S. 2014. Tissue Engineered Scaffolds in Regenerative Medicine. *World J Plast Surg*, 33(11), 3–7.
- Ige O. O., Umoru L. E. ve Aribo S. 2012. Natural Products: A Minefield of Biomaterials. *ISRN Materials Science*, 2012, 1–20. doi:10.5402/2012/983062
- Jiang T., Ren X. J., Tang J. L., Yin H., Wang K. J. ve Zhou C. L. 2013. Preparation and characterization of genipin-crosslinked rat acellular spinal cord scaffolds. *Materials Science and Engineering C*, 33(6), 3514–3521. doi:10.1016/j.msec.2013.04.046
- King N. M. ve Perrin J. 2014. Ethical issues in stem cell research and therapy. *Stem Cell Research & Therapy*, 5(4), 85. doi:10.1186/scrt474

- Koçyiğit B. F., Akaltun M. S., Altındağ Ö., Aydeniz A., Gürsoy S. ve Gür A. 2015. Spinal kord yaralanmalı hastaların epidemiyolojik ve klinik verileri: Merkezimizin beş yıllık deneyimi. *Journal of Clinical and Experimental Investigations*, 6(2), 140–143. doi:10.5799/ahinjs.01.2015.02.0505.
- Liu J., Chen J., Liu B., Yang C., Xie D., Zheng X., Xu S., Chen T., Wang L., Zhang Z., Bai X. ve Jin D. 2013. Acellular spinal cord scaffold seeded with mesenchymal stem cells promotes long-distance axon regeneration and functional recovery in spinal cord injured rats. *Journal of the Neurological Sciences*, 325(1–2), 127–136. doi:10.1016/j.jns.2012.11.022
- Lu Q., Ganesan K., Simionescu D. T. ve Vyavahare N. R. 2004. Novel porous aortic elastin and collagen scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials*, 25(22), 5227–5237. doi:10.1016/j.biomaterials.2003.12.019.
- Mallick K. K. , Cox S. C. 2013. Biomaterial scaffolds for tissue engineering. *Frontiers in Bioscience*, 341-360.
- Marconi S., Castiglione G., Turano E., Bissolotti G., Angiari S., Farinazzo A., Constantin G., Bedogni G., Bedogni A. ve Bonetti B. 2012. Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells Systemically Injected Promote Peripheral Nerve Regeneration in the Mouse Model of Sciatic Crush. *Tissue Engineering Part A*, 18(11–12), 1264–1272. doi:10.1089/ten.tea.2011.0491
- Medberry C. J., Crapo P. M., Siu B. F., Carruthers C. A., Wolf M. T., Nagarkar S. P., Agrawal V., Jones K. E., Kelly J., Johnson S. A., Velankar S. S., Watkins S. C., Modo M. ve Badylak S. F. 2013. Hydrogels derived from central nervous system extracellular matrix. *Biomaterials*, 34(4), 1033–1040. doi:10.1016/j.biomaterials.2012.10.062
- Mueller B.K.,Mack H.,Teusch N. 2005.Rho kinase, a promising drug target for neurological disorders.*J.Neurochem.,Nature Reviews Drug Discovery*,doi:10.1038/nrd1719, 4, 387–398.
- Ning L. ve Chen X. 2017. A brief review of extrusion-based tissue scaffold bio-printing. *Biotechnology Journal*, 12(8), 1–16. doi:10.1002/biot.201600671

- Novak T., Fites Gilliland K., Xu X., Worke L., Ciesielski A., Breur G. ve Neu C. P. 2016. *In Vivo* Cellular Infiltration and Remodeling in a Decellularized Ovine Osteochondral Allograft. *Tissue Engineering Part A*, 22(21–22), 1274–1285. doi:10.1089/ten.tea.2016.0149
- Odorico J. S., Kaufman D. S. ve Thomson J. a. 2001. Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 19(3), 193–204. doi:10.1634/stemcells.19-3-193
- Piguet F., Alves S. ve Cartier N. 2017. Clinical Gene Therapy for Neurodegenerative Diseases: Past, Present, and Future. *Human Gene Therapy*, 28(11), 988–1003. doi:10.1089/hum.2017.160
- Place E. S., George J. H., Williams C. K. ve Stevens M. M. 2009. Synthetic polymer scaffolds for tissue engineering. *Chemical Society Reviews*, 38(4), 1139. doi:10.1039/b811392k
- Rankin S. 2012. Mesenchymal stem cells. *Thorax*, 67(6), 565–566. doi:10.1136/thoraxjnl-2012-201923
- Rosner J., Avalos P., Acosta F., Liu J. ve Drazin D. 2012. The potential for cellular therapy combined with growth factors in spinal cord injury. *Stem Cells International*, 2012. doi:10.1155/2012/826754
- Rosso F., Marino G., Giordano A., Barbarisi M., Parmeggiani D. ve Barbarisi A. 2005. Smart materials as scaffolds for tissue engineering. *Journal of Cellular Physiology*, 203(3), 465–470. doi:10.1002/jcp.20270
- Schmidt C. E. ve Leach J. B. 2003. Neural Tissue Engineering: Strategies for Repair and Regeneration. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 5(1), 293–347. doi:10.1146/annurev.bioeng.5.011303.120731.
- Singh A., Tetreault L., Kalsi-Ryan S., Nouri A., Fehlings M. 2014. Global prevalence and incidence of traumatic spinal cord injury. *Clin Epidemiol.*, 10.2147/CLEP.S68889; 6: 309–331.

- Sobhani A., Khanlarkhani N., Baazm M., Mohammadzadeh F., Najafi A., Mehdinejadi S. ve Aval F. S. 2017. Multipotent Stem Cell and Current Application. *Acta Med Iran*, 55(1), 6–23.
- Subramanian A., Krishnan U. ve Sethuraman S. 2009. Development of biomaterial scaffold for nerve tissue engineering: Biomaterial mediated neural regeneration. *Journal of Biomedical Science*, 16(1), 108. doi:10.1186/1423-0127-16-108
- Sutmuller M., Bruijn J. A. ve De Heer E. 1997. Collagen types VIII and X, two non-fibrillar, short-chain collagens. Structure homologies, functions and involvement in pathology. *Histology and Histopathology*, 12(2), 557–566.
- Tamosaityte S., Galli R., Uckermann O., Sitoci-Ficici K. H., Later R., Beiermeister R., Doberenz F., Gelinsky M., Leipnitz E., Schackert G., Koch E., Sablinskas V., Steiner G. ve Kirsch M. 2015. Biochemical monitoring of spinal cord injury by FT-IR spectroscopy-effects of therapeutic alginate implant in rat models. *Plos ONE*, 10(11), 1–16. doi:10.1371/journal.pone.0142660.
- Tukmachev D., Forostyak S., Koci Z., Zaviskova K., Vackova I., Vyborny K., Sandvig I., Sandvig A., Medberry CJ., Badylak SF., Sykova E., Kubinova S. 2016. Injectable Extracellular Matrix Hydrogels as Scaffolds for Spinal Cord Injury Repair. *Tissue Eng Part A*, 22(3-4):306-17, doi: 10.1089/ten.TEA.2015.0422.
- Tuszynski M. H. 2003. Gene therapy for neurological disease. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 3(5), 815–828. doi:10.1517/14712598.3.5.815
- Volpato F. Z., Führmann T., Migliaresi C., Hutmacher D. W. ve Dalton P. D. 2013. Using extracellular matrix for regenerative medicine in the spinal cord. *Biomaterials*, 34(21), 4945–4955. doi:10.1016/j.biomaterials.2013.03.057
- Yang F., Murugan R., Wang S. ve Ramakrishna S. 2005. Electrospinning of nano/micro scale poly(l-lactic acid) aligned fibers and their potential in neural tissue engineering. *Biomaterials*, 26(15), 2603–2610. doi:10.1016/j.biomaterials.2004.06.051
- Wilshaw S.-P., Kearney J. N., Fisher J. ve Ingham E. 2006. Production of an Acellular Amniotic Membrane Matrix for Use in Tissue Engineering. *Tissue Engineering*, 12(8),

2117–2129. doi:10.1089/ten.2006.12.2117

Yang S., Leong K.-F., Du Z. ve Chua C.-K. 2001. The Design of Scaffolds for Use in Tissue Engineering. Part I. Traditional Factors. *Tissue Engineering*, 7(6), 679–689. doi:10.1089/107632701753337645.

Yılmaz G. 2007. Deneysel Spinal Kord Yaralanma Modelinde Clopidogrel'in Koruyucu Ve Tedavi Edici Etkisinin Araştırılması. Uzmanlık Tezi Haydarpaşa Numune Eğitim Ve Araştırma Hastanesi Nöroşirürji Kliniği. Türkiye.

Yücel D. 2009. Stem Cell Based Nerve Tissue Engineering On Guided Constructs. Orta Doğu Teknik Üniversitesi. Doktora Tezi. Türkiye.

Yang F., Murugan R., Wang S. ve Ramakrishna S. 2005. Electrospinning of nano/micro scale poly(l-lactic acid) aligned fibers and their potential in neural tissue engineering. *Biomaterials*, 26(15), 2603–2610. doi:10.1016/j.biomaterials.2004.06.051.

Yang S., Leong K.-F., Du Z. ve Chua C.-K. 2001. The Design of Scaffolds for Use in Tissue Engineering. Part I. Traditional Factors. *Tissue Engineering*, 7(6), 679–689. doi:10.1089/107632701753337645.

Zeidan-Chuliaa F., Nodab M. 2009. Opening The Mesenchymal Stem Cell Tool Box. *Eur J Dent.*, 3(3): 240–249.

Zhang L. ve Webster T. J. 2009. Nanotechnology and nanomaterials: Promises for improved tissue regeneration. *Nano Today*, 4(1), 66–80. doi:10.1016/j.nantod.2008.10.014

Zhang N., Yan H. ve Wen X. 2005. Tissue-engineering approaches for axonal guidance. *Brain Research Reviews*, 49(1), 48–64. doi:10.1016/j.brainresrev.2004.11.002

Zhang Y., Luo H., Zhang Z., Lu Y., Huang X., Yang L., Xu J., Yang W., Fan X., Du B., Gao P., Hu G. ve Jin Y. 2010. A nerve graft constructed with xenogeneic acellular nerve matrix and autologous adipose-derived mesenchymal stem cells. *Biomaterials*, 31(20), 5312–5324. doi:10.1016/j.biomaterials.2010.03.029

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı: Burcu EFE

Doğum Yeri: Balıkesir

Doğum Tarihi: 02.06.1992

EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi: Fırat 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:

Efe B., Galata Y.F., Arslan Y.E., Yener A.Ü., "The cytotoxicity evaluation of Melia azedarach extracts on human adipose Mesenchymal stem cells", International Congress on Fundamental and Applied Sciences, İstanbul, Türkiye, 22-26 Ağustos 2016, pp.189-190

c) Katıldığı Projeler:

TÜBİTAK 1001- Hüresiz Rejeneratif Terapi: Nöral Progenitör Hücre Türevli Eksozomların İzolasyonu, Moleküler İçeriğinin Belirlenmesi Ve Rat Omurilik Yaralanma Modelinde Etkilerinin *In Vivo* Değerlendirilmesi. Proje kodu: 217S386. Çalışma süresi: 10.11.2017-31.1.2018, bursiyer.

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri. Melia azedarach L. Ekstraktlarının Hazırlanması ve İnsan Adipoz Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre Davranışları Üzerine Etkisinin Değerlendirilmesi. Proje kodu: FBA-2015-549. Çalışma süresi: 2015-2016, araştırmacı.

İLETİŞİM

E-posta Adresi: efeburcu@outlook.com.tr