BİYOMİMETİK APATİT KAPLI VE HEPARİN FONKSİYONALİTESİNE SAHİP KİTOSAN DOKU İSKELELERİNDE KONDROSİT VE OSTEOBLAST AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ

INVESTIGATION OF CHONDROCYTE AND OSTEOBLAST ACTIVITIES ON BIOMIMETIC APATITE-COATED AND HEPARIN-FUNCTIONALIZED CHITOSAN SCAFFOLDS

SEZİN ADAY

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim – Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

BİYOMÜHENDİSLİK Anabilim Dalı İçin Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ

olarak hazırlanmıştır.

2008

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Bu çalışma jürimiz tarafından **BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI** 'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Başkan
.....
Prof. Dr. Zümriye AKSU

Üye (DANIŞMAN)
.....
Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU

Üye
.....
Doç. Dr. Mehmet Ali ONUR

ONAY

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

Prof.Dr. Erdem YAZGAN
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Eşsiz anneme, babama ve kardeşime...

BİYOMİMETİK APATİT KAPLI VE HEPARİN FONKSİYONALİTESİNE SAHİP KİTOSAN DOKU İSKELELERİNDE KONDROSİT VE OSTEOBLAST AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ

Sezin Aday

ÖZ

Sunulan çalışmanın amacı, doğal bir polimer olan kitosandan hazırlanan ve biyomimetik apatit ile kaplanan ya da heparin ile işlevsel hale getirilen doku iskelelerinin karakterizasyonunun yapılarak, bu yapıların kemik ve kıkırdak hücrelerinin aktiviteleri üzerindeki etkilerinin belirlenebilmesidir.

Çalışma kapsamında kitosan doku iskeleleri, > % 85 deasetilasyon derecesine (DD) sahip kitosan kullanılarak dondurarak-kurutma tekniğiyle hazırlanmıştır. % 2'lik kitosan çözeltilerinden hazırlanan bu iskelelerin gözenek boyutu ~ 100 μm'dir. Hazırlanan doku iskeleleri daha sonra 10 kat konsantrasyondaki sentetik vücut sıvısı (10X SBF) çözeltisi kullanılarak apatit ile kaplanmış ya da heparinin yapıya kovalent veya elektrostatik olarak bağlanmasıyla fonksiyonel hale getirilmiştir.

Hazırlanan kitosan doku iskelelerinde osteoblast ve kondrositlerin davranışları (yapışma, yayılma, üreme ve farklılaşma) hücre kültürü testleriyle incelenmiştir. Bu çalışmalarda, pre-osteoblast hücre hattı MC3T3-E1 ve kondrojenik hücre hattı ATDC5 kullanılmıştır. Hücre üremesi MTT (3-(4,5-dimethylthiazoyl-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) ile değerlendirilirken, morfolojik gözlemler SEM (taramalı elektron mikroskobu) ve CLSM (konfokal lazer taramalı mikroskobu) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Hücre farklılaşmasının belirlenmesi amacıyla kemik hücreleri için osteokalsin testi, ALP (alkalen fosfataz) aktivitesi ölçümü ve von Kossa boyaması yapılırken; kıkırdak hücrelerinin farklılaşması, GAG (glikozaminoglikan) miktarlarının ölçümüyle değerlendirilmiştir.

MC3T3-E1 hücreleri ile gerçekleştirilen çalışmalar, kaplama içermeyen iskelelerle karşılaştırıldığında, apatit kaplı doku iskelelerinin hücre üremesini uyardığını göstermiştir. Özellikle 24 sa SBF muamelesi görmüş doku iskelelerindeki hücrelerin farklılaşma değerlerinin (ALP ve osteokalsin miktarları), kültürün ilerleyen günlerinde arttığı gözlemlenmiştir. Heparin bağlı yüzeylerde ise MC3T3-E1 hücrelerinin gerek üremesi, gerekse farklılaşması uyarılmıştır. ATDC5 hücreleriyle yapılan çalışmalarda, heparinin özellikle kültürün 2. haftasından sonra hücre üremesini arttırdığı ortaya konmuştur. ATDC5 hücre kültür çalışmalarında kullanılan tüm doku iskelelerinin farklılaşmayı desteklediği; ancak serbest heparinin diğer gruplara göre çok daha yüksek GAG değerleri verdiği görülmüştür.

Çalışmalardan elde edilen sonuçlar, kitosan doku iskelelerinin kemik ve kıkırdak doku mühendisliği çalışmaları için uygun malzemeler olabileceğini ortaya koymuştur.

Anahtar Kelimeler: Kitosan, dondurarak kurutma, heparin, SBF (simulated body fluid), doku mühendisliği.

Danışman: Prof.Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU, Hacettepe Üniversitesi, Kimya Mühendisliği / Biyomühendislik Anabilim Dalı

INVESTIGATION OF CHONDROCYTE AND OSTEOBLAST ACTIVITIES ON BIOMIMETIC APATITE-COATED AND HEPARIN-FUNCTIONALIZED CHITOSAN SCAFFOLDS

Sezin Aday

ABSTRACT

The purposes of the present study are to characterize the scaffolds which are prepared using a natural polymer, chitosan, and coated with biomimetic apatite or functionalized with heparin and to identify the effects of these structures on the activity of bone and cartilage cells.

In this study, chitosan scaffolds were prepared by freeze-drying technique using chitosan with the deacetylation degree (DD) of >85 %. The pore size of these scaffolds which were prepared by 2 % (w/v) chitosan solution was ~ 100 µm. The scaffolds were then coated with apatite by using 10X synthetic body fluid (SBF) solution or functionalized with covalently or electrostatically bound heparin.

The behaviours (attachment, spreading, proliferation and differentiation) of osteoblasts and chondrocytes were investigated with cell culture tests. In these studies, pre-osteoblast MC3T3-E1 and chondrogenic ATDC5 cell lines were used. Cell proliferation was evaluated by MTT (3-(4,5-dimethylthiazoyl-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) and morphological observations were carried out using SEM (scanning electron microscope) and CLSM (confocal laser scanning microscope). In order to detect cellular differentiation, osteocalcin test, ALP (alkaline phosphatase) activity measurement and von Kossa staining were performed for bone cells and GAG (glycoseaminoglycans) measurement was used for cartilage cells.

The studies carried out using MC3T3-E1 cells showed that apatite-coated scaffolds stimulated cell proliferation compared to non-coated scaffolds. Especially, cell differentiation values (ALP and osteocalcin) of the cells on 24h SBF-treated scaffolds increased in the following days of the culture. Both proliferation and differentiation of MC3T3-E1 cells were stimulated on heparin-immobilized surfaces. In the studies carried out using ATDC5 cells, it was shown that heparin induced cell proliferation particularly after the second week of the culture. It was seen that all the scaffolds used in ATDC5 cell culture studies were supported differentiation, however, free-heparin indicated higher GAG values compared to other groups.

The results of these studies were indicated that chitosan scaffolds may be suitable materials for bone and cartilage tissue engineering studies.

Keywords: Chitosan, freeze-drying, heparin, SBF (simulated body fluid), tissue engineering.

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

TEŞEKKÜR

Engin bilgi ve tecrübeleri ile yoluma ışık tutan, tez çalışmamın gerçekleştirilmesi ve sonuca ulaştırılması için gerekli deste□i hiçbir zaman esirgemeyen, karşılaşılan güçlüklerin aşılmasında yol gösterici olan, de□erli danışmanım Sayın Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDEREL□O□LU'na,

Her durumda deste□ini yanımda hissetti□im, bizlere ö□rettiklerinin yanında hayatımıza kattıklarıyla da eşsiz olan, sonsuza kadar örnek alaca□ım, çok de□erli hocam, ikinci annem, Sayın Prof. Dr. S. □smet DEL□LO□LU GÜRHAN'a,

2210 kodlu Yurt □çi Yüksek Lisans Burs Programı kapsamında destek sa□layan TÜB□TAK (Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu) B□DEB'e (Bilim □nsanı Destekleme Daire Başkanlı□ı),

Tez jürimde yer alan de□erli hocalarım Sayın Prof. Dr. Zümriye AKSU'ya ve Sayın Doç. Dr. Mehmet Ali ONUR'a,

Konfokal lazer taramalı mikroskopi çalışmalarında deneyimleri ve bilgisiyle destek olan, ODTÜ Merkezi Laboratuvar Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji AR-GE Merkezi'nde görevli, Sayın Dr. Can ÖZEN'e,

Hayatımın en güzel 4 yılını geçirmemi sa□layan, bizleri hep bir adım ileriye götürebilmek için çalışan, ikinci ailem Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü çalışanlarına,

□nsanın hayatında bir kez karşılaşabilece□i kadar özel ve içten olan, can dostlarım Dr. Zehra BOYACIO□LU, Cengiz AKKALE ve Araş. Gör. Işıl GERÇEK BEŞKARDEŞ'e,

Destekleri ve yardımlarıyla yanımda olan çok de□erli dostlarım Özge KARADAŞ, F.Gökşin BAHAR, Anıl Sera KAHRAMAN, Emel SEM□Z, Melih DA□DEV□REN, Turgay BARUT'a,

Laboratuvar arkadaşlarım Berna BAŞBA□, Nur Merve KAZARO□LU, Soner ÇAKMAK ve Tu□rul Tolga DEM□RTAŞ'a,

Bana uçmayı ö□reten, bazen bu, onlardan uzaklaşmam anlamına gelse de kanatlarımı elimden almayan; çocuklarına duydukları sevgiyi onlara duydukları güvenle perçinleyen; her başarımın asıl sahipleri, hayatımın en vazgeçilmezleri canım anneme, babama ve en büyük deste□im, dostların en de□işilmezi, "Almanca Profesörü" birtanecik kardeşime,

En içten teşekkürlerimi sunarım…

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ALP	Alkaline phosphatase
CLSM	Confocal laser scanning electron microscopy
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
ECM	Extracellular Matrix
EDAC	1-ethyl-3-(3-dimethylamino-propyl carbodiimide)
EIA	Enzyme Immunoassay
FBS	Fetal bovine serum
FDA	Florescein diacetate
GAG	Glycosaminoglycan
HA	Hydroxyapatite
HS	Heparan sulfate
ITS	Insulin, transferrin, selenium
MES	2-[N-morpholino] ethanesulfonic acid
MTT	3-(4,5-dimethylthiazoyl-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NHS	N-hydroxysuccinimide
PBS	Phosphate Buffer Saline
SBF	Simulated Body Fluid
SEM	Scanning electron microscopy
UV	Ultraviolet
v/v	Volume/volume
w/v	Weight/volume
XRD	X-ray Diffraction

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

Sayfa

ÖZ.....i

ABSTRACT……ii

TEŞEKKÜR……...iii

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ……iv

İÇİNDEKİLER DİZİNİ……v

ŞEKİLLER DİZİNİ……ix

ÇİZELGELER DİZİNİ……....xiv

1. GİRİŞ……..……..1

2. GENEL BİLGİLER ..... ……4

2.1. Kıkırdak ve Kemik Biyolojisi……...4

2.1.1. Kıkırdak dokusunun yapısı ve işlevleri……....4

Hiyalin Kıkırdak……..……..5
Elastik Kıkırdak……..……..……..……...9
Fibröz Kıkırdak (Fibrokıkırdak)……..……..…..9

2.1.2. Kemik dokusunun yapısı ve fonsiyonları…… 10

Kemik Zarları……12
Periosteum……..……12
Endosteum……..……13
Kemik Hücreleri……..……13
Osteoprogenitör Hücreler……..13
Osteoblastlar……..……..……..……..13
Osteositler……..……..14
Osteoklastlar……..……..14
Kemik Matrisi……..……14
Kemik Oluşumu (Osteogenezis)……...15

2.2. Doku Mühendisliği……..16

2.3. Kitosan ve Kitosan-Temelli Doku İskeleleri……18

2.3.1. Kitosanın yapısal özellikleri……..18

2.3.2. Kitosan doku iskelesi fabrikasyonu……22

2.3.3. Kitosanın Doku Mühendisliği Uygulamaları…….24

2.4. Kalsiyum Fosfat Tuzları ve Simule Vücut Sıvısı (SBF)……..27

2.5. Heparin……...32

3. DENEYSEL ÇALIŞMA……38
3.1. Kitosan Doku İskelelerinin Hazırlanması ve Modifikasyonu 38
3.1.1. Gözenekli kitosan doku iskelelerinin hazırlanması..…..38
3.1.2. Kitosan doku iskelelerinin biyomimetik apatit ile kaplanması……..……38
3.1.2.1. SBF stok çözeltisinin hazırlanması……..38
3.1.2.2. Kitosan doku iskelelerinin kaplanması……...39
3.1.3. Kitosan doku iskelelerinin heparin ile modifiye edilmesi……40
3.2. Karakterizasyon Çalışmaları…….41
3.2.1. Taramalı elektron mikroskop (SEM) ile analiz ……..41
3.2.2. Doku iskelesi gözenekliliğinin belirlenmesi…….41
3.2.3. XRD analizi…….…41
3.2.4. İnvert mikroskop ile oluşan biyomimetik apatit yapılarının incelenmesi……41
3.2.5. Elementel analiz…….42
3.2.6. Toluidine mavisi testi……... 42
3.2.7. In vitro salım çalışmaları……. 43
3.2.8. Mekanik test…… 43
3.3. Hücre Kültürü Çalışmaları…….……...43
3.3.1. MC3T3-E1 hücre karakterizasyon çalışmaları……....43
3.3.1.1. MTT analizi…….....44
3.3.1.2. Hücre sayımı…….44
3.3.1.3. Floresan mikroskobu ile analiz……....44
3.3.1.4. Kristal viyole ile boyama..…….....45
3.3.2. Pre-osteoblast MC3T3-E1 hücreleri ve kitosan doku iskeleleri ile yapılan çalışmalar…….…45
3.3.2.1. MTT analizi…….46
3.3.2.2. Taramalı elektron mikroskop (SEM) ile analiz… 47
3.3.2.3. Konfokal lazer taramalı mikroskop (CLSM) ile analiz……..47
3.3.2.4. Hücre farklılaşmasının test edilmesi ……....47

3.3.2.5. Matris mineralizasyonu……...48
3.3.3. Kondrojenik ATDC5 hücreleri ve kitosan doku iskeleleri ile yapılan çalışmalar……..…….…..…48
3.3.3.1. MTT testi…….…….49
3.3.3.2. Taramalı elektron mikroskop (SEM) ile analiz… 49
3.3.3.3. Konfokal lazer taramalı mikroskop (CLSM) ile analiz……..49
3.3.3.4. Biyokimyasal analiz…….……...49
3.4. İstatistiksel Analiz…….……....50

4.DENEYSEL SONUÇLAR VE TARTIŞMA..... 51
4.1. Kitosan Doku İskelelerinin Hazırlanması, Modifikasyonu ve Karakterizasyonu……51
4.1.1. Gözenekli kitosan doku iskelelerinin hazırlanması ve hazırlanan yapıların karakterizasyonu……...…..51
4.1.2. Kitosan doku iskelelerinin biyomimetik apatit ile kaplanması ve apatit kaplı iskelelerin karakterizasyonu…….55
4.1.3. Kitosan doku iskelelerinin heparin ile modifiye edilmesi ve elde edilen doku iskelelerinin karakterizasyonu……...…..60
4.2. Hücre Kültürü Çalışmaları…..…….……...68
4.2.1. MC3T3-E1 hücre karakterizasyon çalışmaları……..68
4.2.2. Pre-osteoblast MC3T3-E1 hücreleri ve kitosan doku iskeleleri ile yapılan çalışmalar……..…73
4.2.2.1. MTT analizi…….73
4.2.2.2. Taramalı elektron mikroskop (SEM) ile analiz……...76
4.2.2.3. Konfokal lazer taramalı mikroskop (CLSM) ile analiz……..81
4.2.2.4. Hücre farklılaşmasının test edilmesi…….……..84
4.2.3. Kondrojenik ATDC5 hücreleri ve kitosan doku iskeleleri ile yapılan çalışmalar……..……...…..89
4.2.3.1. MTT testi…….…….89
4.2.3.2. Taramalı elektron mikroskop (SEM) ile analiz……...90
4.2.3.3. Konfokal lazer taramalı mikroskop (CLSM) ile analiz……..92

4.2.3.4. Biyokimyasal analiz……..……..……..95
5. GENEL SONUÇLAR..... 97
KAYNAKLAR DİZİNİ…….. ..... .100
EK-1……. ..... .111
EK-2……. ..... .112
EK-3……. ..... .115
ÖZGEÇMİŞ ..... .116

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. Kıkırdak matrisinde moleküler organizasyon……....6

Şekil 2.2. Hiyalin kıkırdağın a) hematoksilen-eozin boyaması, b) şematik gösterimi……...7

Şekil 2.3. Hiyalin kıkırdağın histogenezisi: A) Mezenkim dokusu, B) Mezenkimal hücrelerin hızla üremesi sonucu oluşan yüksek oranda hücresel doku, C) Matris oluşumu sonucu kıkırdak hücrelerinin birbirinden ayrılması, D) Kıkırdak hücrelerinin üremesi sonucu oluşan izojen gruplar ve bu hücre gruplarını çevreleyen teritoryal matris……...8

Şekil 2.4. (a) Elastik, (b) fibröz kıkırdağın yapısı……...9

Şekil 2.5. Kemik dokusunda bulunan lakünler ve kanalikuli adı verilen ışınsal yapılar……....11

Şekil 2.6. Kemik dokusunda bulunan lakünler ve kanalikuli adı verilen ışınsal yapılar……....12

Şekil 2.7. İntramembranöz kemikleşme sırasında meydana gelen olaylar…….16

Şekil 2.8. Kitin ve kitosanın hazırlanış aşamaları……..….19

Şekil 2.9. Kitosanın kimyasal yapısının şematik gösterimi……....20

Şekil 2.10. Eklem kıkırdağında bulunan GAG'lar, hiyaluronik asit ve kitosan arasındaki yapısal benzerlikler……..….20

Şekil 2.11. Elektro-eğirme yöntemi ile hazırlanmış kitosan-PEO nanofibelerin SEM görüntüleri (A) % 90 kitosan-% 10 PEO, (b) % 60 kitosan-% 40 PEO…….23

Şekil 2.12. Elektrobirikim mekanizması…….……23

Şekil 2.13. SBF ile muamele edilmiş biyoaktif malzemelerde görülen özel nanokristalin apatit yapısı: (a) PCL-biyoaktif cam kompoziti, (b-c) Mikroark oksidizasyon sonucu elde edilen kaplama (SBF içerisinde 14.gün), (d) Titanyum (SBF içerisinde 14.gün). ……....29

Şekil 2.14. $Ca(OH)_2$ ile muamele sonrası, SBF içerisinde tutulan karboksimetillenmiş kitin fabrikler üzerinde belli süreler sonucunda oluşan hidroksiapatit yapıları……30

Şekil 2.15. Titanyum örnekler üzerinde oluşan hidroksiapatit yapıları: (a) SBE içerisinde 1. gün, (b) SBE içerisinde 21. gün, (c) SBF içerisinde 1.gün (d) SBF içerisinde 21. gün……..31

Şekil 2.16. Heparinle kaplanmış nanotüplerde görülen kan uyumluluğu……....32

Şekil 2.17. Heparinin 2 ve 3 boyutlu yapıları……....33

Şekil 4.1. Kemik mimarisi (solda) ile dondurara-kurutma yöntemiyle hazırlanan kitosan doku iskelelerinin SEM görüntülerinin (sağda) karşılaştırılması……..….53

Şekil 4.2. Kitosan iskeleleri üzerinde 6 saat sonunda oluşan hidroksiapatit kristalleri: (a) X 7920 büyütme, (b) X 17.45 büyütme; 24 saat SBF kaplı iskelelerin genel görünümü: (c) X 490 büyütme, (d) X 1000 büyütme; 24 saat SBF kaplı iskelelerin üzerinde oluşan kemik-benzeri apatit yapıları: (e) X 5000 büyütme, (f) X 15000 büyütme……..57

Şekil 4.3. 24 saat SBF kaplı iskelelerin üzerinde oluşan kemik-benzeri apatit yapıları: (a) X 5000 büyütme, (b) X 15000 büyütme; 24 saat SBF kaplı kitosan doku iskeleleri kesit görüntüleri: (c) X 2940 büyütme, (d) X 14090 büyütme……..58

Şekil 4.4. 24 saat SBF muamelesi sonunda kitosan doku iskelesinin XRD deseni…….59

Şekil 4.5. Farklı yayma preparatlarda, 24 saat sonunda oluşan apatit yapılarının invert mikroskop görüntüleri (10X)…….59

Şekil 4.6. EDC/NHS aktivasyon ajanları kullanılarak gerçekleştirilen immobilizasyon mekanizması (1, heparini; 2 ise kitosanı göstermektedir)……..62

Şekil 4.7. Toluidine mavisi testi sonucu kitosan iskelelerin görüntüsü…….64

Şekil 4.8. Heparin ve kitosan arasındaki elektrostatik etkileşim……..……..65

Şekil 4.9. Kitosan iskelelere bağlanan heparin miktarları……...66

Şekil 4.10. Elektrostatik etkileşim örnekleri için heparin salım grafiği (37°C'de, PBS içerisinde)……...67

Şekil 4.11. MTT testleri sonucu elde edilen üreme grafiği…….68

Şekil 4.12. Sayım testleri sonucu elde edilen MC3T3-E1 üreme grafiği (a) ve özgül üreme hızının hesaplanmasında kullanılan lnx-t grafiği (b)……...69

Şekil 4.13. Kristal viyole ile boyanmış MC3T3-E1 hücrelerinin optik mikroskop görüntüleri: (a) 1. gün, 10X; (b) 1. gün, 20X; (c) 1. gün, 40X; (d) 3. gün, 10X; (e) 3. gün, 20X; (f) 3. gün, 40X……..…70

Şekil 4.14. Kristal viyole ile boyanmış MC3T3-E1 hücrelerinin optik mikroskop görüntüleri: (a) 9. gün, 10X; (b) 9. gün, 20X; (c) 30. gün, 10X; (d) 30. gün, 20X...71

Şekil 4.15. MC3T3-E1 hücrelerinin floresan boyanması: (a) 7. gün, 20X; (b) 7. gün, 40X; (c) 9. gün, 20X; (d) 9. gün, 40X…….72

Şekil 4.16. MC3T3-E1 hücrelerinin FDA ile boyanması: (a) 4. gün, 20X; (b) 4. gün 40X; (c) 13. gün, 4X; (d) 13. gün, 20X……...72

Şekil 4.17. Biyomimetik apatit kaplı kitosan doku iskeleleriyle yapılan çalışmalar sonucu elde edilen MC3T3-E1 üreme (MTT) değerleri (İstatistiksel önem farklılığı, n=3, kontrol grubu kitosan, *: p<0.0001, * * : p<0.0005, * * * : p<0.005 ve * * * * : p<0.05)……73

Şekil 4.18. Heparin-bağlı kitosan doku iskeleleriyle yapılan çalışmalar sonucu elde edilen MC3T3-E1 üreme (MTT) grafiği (İstatistiksel önem farklılığı, n=3, kontrol grubu kitosan, *: p<0.0001 ve * * : p<0.005)……75

Şekil 4.19. 6 sa SBF ile muamele edilmiş kitosan doku iskeleleri üzerindeki MC3T3-E1 hücrelerinin SEM fotoğrafları: (a) 7. gün, 2.61 KX; (b) 7. gün, 7.49 KX; (c) 7. gün, 4.89 KX; (d) 13. gün, 3.00 KX; (e) 13. gün, 4.00 KX; (f) 13. gün, 3.00 KX; 24 sa SBF ile muamele edilmiş kitosan doku iskeleleri üzerindeki MC3T3-E1 hücrelerinin SEM fotoğrafları: (g) 7. gün, 3.00 KX; (h) 7. gün, 3.00 KX……...77

Şekil 4.20. 24 sa SBF ile muamele edilmiş kitosan doku iskeleleri üzerindeki MC3T3-E1 hücrelerinin SEM fotoğrafları: (a) 13. gün, 250 X; (b) 13. gün, 500 X; (c) 13. gün, 3.00 KX; (d) 13. gün, 3.00 KX; Muamele görmemiş kitosan doku iskeleleri üzerindeki MC3T3-E1 hücrelerinin SEM fotoğrafları: (e) 13. gün, 1.50 KX; (f) 13. gün, 3.00 KX; (g) 13. gün, 6.00 KX; (h) 13. gün, 3.00 KX……..78

Şekil 4.21. Kitosan doku iskeleleri üzerindeki MC3T3-E1 hücrelerinin SEM fotoğrafları, 4.gün. Elektrostatik etkileşimle heparin bağlanmış doku iskeleleri: (a) 3.00 KX; (b) 3.00 KX; Kovalent bağlı heparin içeren doku iskeleleri: (c) 1.53 KX; (d) 3.00 KX; (e) 1.50 KX; (f) 500 X; Serbest heparin (10 USP ünitesi/ ml): (g) 3.00 KX; (h) 3.00 KX…….79

Şekil 4.22. Kitosan doku iskeleleri üzerindeki MC3T3-E1 hücrelerinin SEM fotoğrafları, 11.gün. Elektrostatik etkileşimle heparin bağlanmış doku iskeleleri: (a) 5.11 KX; Kovalent bağlı heparin içeren doku iskeleleri: (b) 140 X; (c) 2.50 KX; Aktif kitosan: (d) 1.50 KX; (e) 750 X; Serbest heparin (10 USP ünitesi/ ml): (f) 5.00 KX; (g) 1.00 KX…….80

Şekil 4.23. SBF kaplı doku iskelelerinde MC3T3-E1 hücrelerini gösteren konfokal mikroskop fotoğrafları: Muamele görmemiş kitosan iskele: (a) 20X, 8.gün; 6 sa SBF ile muamele edilmiş iskele: (b) 10X, 8. gün; (c) 20X, 8. gün; (d) 40X, 8. gün; 24 sa SBF ile muamele edilmiş iskele: (e) 10 X, 4.gün; (f) 20 X, 4.gün; (g) 10X, 8. gün (h) 40X, 8.gün……..……82

Şekil 4.24. Kovalent bağlı heparin içeren kitosan iskelelerde farklı derinliklerdeki MC3T3-E1 hücre yoğunlukları……83

Şekil 4.25. Modifiye edilmemiş kitosan iskelelerde farklı derinliklerdeki MC3T3-E1 hücre yoğunlukları……83
Şekil 4.26. Tüm katmanların üst üste konulması sonucu elde edilen ve hücrelerin 3 boyutlu iskele içerisindeki dağılımını gösteren konfokal mikroskop görüntüleri: modifiye edilmemiş kitosan (solda), serbest heparin içeren yapılar (ortada), heparin bağlı kitosan (kovalent etkileşim) (sağda)……..84

Şekil 4.27. SBF kaplı doku iskeleleri üzerindeki MC3T3-E1 hücreleri için bulunan ALP absorbans değerleri……85

Şekil 4.28. Heparin immobilize edilmiş kitosan doku iskeleleri üzerindeki MC3T3-E1 hücreleri için bulunan ALP absorbans değerleri……85

Şekil 4.29. SBF kaplı doku iskeleleri üzerindeki MC3T3-E1 hücreleri için bulunan osteokalsin miktarları……86

Şekil 4.30. Heparin immobilize edilmiş kitosan doku iskeleleri üzerindeki MC3T3-E1 hücreleri için bulunan osteokalsin miktarları……...87

Şekil 4.31. Von Kossa boyaması sonuçları……..88

Şekil 4.32. Farklı kitosan doku iskelelerinde ATDC5 hücreleri üreme testi (MTT) sonuçları (İstatistiksel önem farklılığı, n=3, kontrol grubu kitosan, *: p<0.0001 ve * * : p<0.0005)……..90

Şekil 4.33. ATDC5 hücrelerinin SEM görüntüleri (5. gün): (a) aktif kitosan, 1.00 KX; (b) aktif kitosan, 5.00 KX; (c) kovalent heparin, 5.00 KX; (d) kovalent heparin, 4.16 KX; (e) serbest heparin, 5.00 KX; (f) modifiye edilmemiş kitosan, 5.00 KX……90

Şekil 4.34. ATDC5 hücrelerinin SEM görüntüleri (13. gün): (a) aktif kitosan, 1.00 KX; (b) aktif kitosan, 5.00 KX; (c) serbest heparin, 5.00 KX; (d) modifiye edilmemiş kitosan, 5.00 KX……91

Şekil 4.35. Boş (modifiye edilmemiş) kitosan iskelelerde farklı derinliklerdeki ATDC5 hücre yoğunlukları……..92

Şekil 4.36. Aktif kitosan iskelelerde farklı derinliklerdeki ATDC5 hücre yoğunlukları……93

Şekil 4.37. Serbest heparin içeren grupta farklı derinliklerdeki ATDC5 hücre yoğunlukları……93

Şekil 4.38. Kovalent bağlı heparin içeren kitosan iskelelerde farklı derinliklerdeki ATDC5 hücre yoğunlukları……..94

Şekil 4.39. Tüm katmanların üst üste konulması sonucu elde edilen ve ATDC5 hücrelerinin 3 boyutlu iskele içerisindeki dağılımını gösteren konfokal mikroskop görüntüleri: (a) boş (modifiye edilmemiş) kitosan, (b) aktif kitosan, (c) serbest heparin içeren yapılar, (d) heparin bağlı kitosan (kovalent etkileşim)……94

Şekil 4.40. GAG test sonuçları (İstatistiksel önem farklılığı, n=3, kontrol grubu kitosan, *: p<0.0001 ve * * : p=0.0031)…….……95

Şekil 4.41. Dimetimetilen mavisi ile boyanan doku iskelelerindeki hücrelerin görünümü (10X büyütme): (a) modifiye edilmemiş iskele, (b) aktif kitosan, (c) serbest heparin, (d) kovalent heparin ...……96

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 3.1. SBF reçeteleri: Taş ve Bhaduri tarafından kullanılan (üstte), bu çalışmada kullanılan (altta) (Maviş *et al.*, 2007)……...39

Çizelge 4.1. Heparin immobilizasyonunda kullanılan çözeltilerin pH değerleri...62

Çizelge 4.2. Toluidine mavisi testi sonucu elde edilen absorbans değerleri……63

1. GİRİŞ

Kemik yüksek oranda vaskülerize ve oldukça dinamik bir dokudur. Vücutta hayati önem taşıyan birçok işlevin yerine getirilmesinden sorumlu olan bu dokuda yaralanma, hastalık ya da genetik bozukluklar sonucu meydana gelebilecek hasarların iyileştirilmesi, vücudun dengesinin korunması açısından son derece önemlidir.

Kemik dokusunun aksine, kan damarları içermeyen kıkırdak dokusunda beslenme difüzyon yoluyla gerçekleşmektedir. Gerek dokunun avasküler yapısından gerekse kıkırdak hücrelerinin zor çoğalması ve büyük ölçüde hareketsiz olmasından dolayı kıkırdakta meydana gelebilecek bir hasarın iyileştirilmesi ve dokunun rejenere olması son derece zordur (Akay, 2006).

Doku mühendisliği, hücrelerin, doku iskelelerinin ve büyüme faktörlerinin tek başına veya birlikte kullanımıyla dokuların onarımını ya da yenilenmesini amaçlayan; bu amaca ulaşmak için biyoloji, kimya ve mühendislik prensiplerini kullanan oldukça yeni bir alandır (Laurencin *et al.*, 1999). Doku mühendisliği kapsamında birçok farklı yaklaşım kullanılsa da bu yaklaşımların neredeyse tümü biyoaktif molekülleri içeren doku iskeleleri ile hücrelerin birlikte kullanımı esasına dayanmaktadır.

Kitinin deasetillenmiş formu olan kitosan, biyobozunur, biyouyumlu, nonantijenik, nontoksik ve biyofonksiyonel özellikleri nedeniyle yara giysilerinden ilaç dağıtım sistemlerine kadar birçok alanda yaygın kullanıma sahiptir. Ayrıca bu doğal polimer, immobilizasyon desteği, hemostatik ajan ve biyomateryal olarak da sıklıkla kullanılmaktadır (Wise, 2000; Elder *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2003b). Kıkırdak ve kemik ECM'sinin (hücre dışı matris, ekstrasellüler matris) yapısında bulunan glikozaminoglikanlara olan benzerliği, bu polimeri kemik ve kıkırdak doku mühendisliği çalışmaları açısından tercih edilen bir malzeme haline getirmektedir.

Fakat polimerik malzemeler, mekaniksel zayıflık ve biyoaktivite eksikliği gibi önemli dezavantajlara sahiptir (Oungbho, 1997; Kong *et al.*, 2006; Zhang and Zhang, 2001b). Bu problemlerin üstesinden gelebilmek amacıyla literatürde birçok seramik-polimer kompoziti kullanılmıştır (Wang, 2006).

SBF, insan plazmasına benzer kalsiyum ve fosfat iyon konsantrasyonuna sahip bir çözeltidir. Bu çözelti, oldukça uzun süredir malzemelerin biyouyumluluklarının belirlenebilmesi amacıyla kullanılmaktadır. Biyouyumlu malzemeler, SBF çözeltileri içerisinde inkübe edildiklerinde yüzeylerinde apatit yapıları oluşmaktadır. Son yıllarda, bu özelliğinden dolayı SBF çözeltileri, doku iskelelerinin apatit ile kaplanması ve bu şekilde biyouyumluluklarının arttırılması çalışmalarında kullanılmıştır (Kong *et al.*, 2006).

GAG ailesinin bir üyesi olan heparin, yaygın olarak yüzeylerde trombus oluşumunun önlenmesi amacıyla kullanılmaktadır. Ancak, doku ECM'sini oluşturan GAG'lara benzerliği ve bazı eşsiz özellikleri heparini son yıllarda sıklıkla çalışılan bir polimer haline getirmiştir. Heparinin hücre yapışmasında görevli molekülleri, büyüme faktörleri ve sitokinleri kendisine bağladığı bilinmektedir (Canalis, 2000; Kreke *et al.*, 2005).

Sunulan çalışmada, bu bilgiler ışığında, kitosan doku iskelelerinin SBF ile muamele edilerek apatit ile kaplanması veya heparin ile fonksiyonel hale getirilmesi, daha sonra bu iskelelerin doku mühendisliği uygulamalarında kullanımının incelenmesi amaçlanmıştır. Literatürde, heparinin farklı hücre türleri üzerindeki etkilerine ilişkin birçok farklı görüş yer almaktadır. Örneğin heparin immobilizasyonunun endotelyal hücre üremesi üzerindeki etkisine yönelik yapılan çalışmalar birbiri ile tutarlı değildir. Literatürde heparinin endotelyal hücre üremesini hem inhibe ettiği (Nojiri *et al.*, 1987) hem de arttırdığını (Bos *et al.*, 1999) öne süren çalışmalar vardır. Sunulan çalışmada, heparinin farklı hücre hatları (MC3T3-E1 ve ATDC5) üzerindeki etkilerinin incelenmesi, bu sayede literatürde bulunan çelişkili sonuçlara bir açıklık getirilmesinin amaçlanması çalışmanın ilk özgün noktasını oluşturmaktadır. İkinci özgün nokta olarak, heparin immobilize edilmiş doku iskelelerinin hazırlanması ve kemik doku mühendisliği alanında kullanımı sayılabilir. Literatürde çeşitli 2-boyutlu kültürlerde heparin etkisiyle ilgili birbiriyle çelişen çalışmalar bulunmasına rağmen bu molekülün 3-boyutlu sistemlerdeki etkisi çalışılmamıştır. SBF'nin doku iskeleleri üzerinde biyomimetik apatit kaplama oluşturmak amacıyla kullanılmasına ilişkin çalışmalar özellikle son yıllarda büyük önem kazanmıştır. SBF içerisinde 6 sa ve 24 sa gibi oldukça kısa inkübasyon periyotları sonucunda 3-boyutlu HA/kitosan kompozit

doku iskelelerinin eldesi ve bu yapıların kemik hücreleri üzerindeki etkilerinin belirlenmesi tez çalışmasının bir diğer özgün noktasıdır.

Tezin ilk kısmında, yüksek oranda gözenekli kitosan doku iskeleleri hazırlanmış ve bu malzemeler, apatitle kaplanarak ya da heparinle fonksiyonel hale getirilerek modifiye edilmiştir. Elde edilen doku iskelelerinin karakterizasyon çalışmaları yapıldıktan sonra, ikinci aşamada, hücrelerin bu iskeleler üzerindeki davranışları MC3T3-E1 ve ATDC5 hücre hatları kullanılarak incelenmiştir. Hücre üremesi MTT ile ölçülürken, morfolojiler SEM ve CLSM kullanılarak görüntülenmiştir. Osteojenik farklılaşmanın tespiti için osteokalsin testi, ALP aktivite ölçümü ve von Kossa boyaması yapılırken kondrojenik farklılaşma, GAG miktarlarının ölçümü ile gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar, istatistiksel açıdan değerlendirilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

Tez kapsamında, kitosan doku iskelelerinin, kıkırdak ve kemik doku mühendisliği alanında kullanımının değerlendirilmesine yönelik çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Bu doğrultuda, aşağıda konuyla ilgili genel literatür bilgisine yer verilmiştir. Öncelikle kemik ve kıkırdak biyolojisi ele alınmış ve bu dokularda meydana gelebilecek hasarlara ilişkin bilgiler sunulmuştur. Sonraki bölümde ise doku mühendisliği konusuna kısaca değinilerek çalışma kapsamında kullanılan kitosan doku iskeleleri, simule vücut sıvısı (SBF) ve heparin hakkında temel bilgiler verilmiştir.

2.1. Kıkırdak ve Kemik Biyolojisi

2.1.1. Kıkırdak dokusunun yapısı ve işlevleri

Kıkırdak dokusu, destek dokusunun özel bir çeşididir. Bu doku, kollajen ve elastin iplikçikler ile etkileşen makromoleküller, glikozaminoglikanlar ve proteoglikanlar bakımından zengin bir ECM ile karakterize edilmektedir. Matris bileşimindeki değişiklikler, üç tip kıkırdağın ortaya çıkmasında etkilidir. Embriyonik dönemde, hızlı büyüme yeteneği ve sertliği nedeniyle embriyo için önemli bir iskelet materyali oluşturan kıkırdak, ECM'si sayesinde mekanik strese dayanabilmektedir. Kıkırdak, düzgün yüzeyli ve basınçlara dayanıklı yapısı nedeniyle, eklemler için darbe absorbe edici, kayganlaştırıcı bir bölge oluşturarak hareketi sağlamakta, bunun yanında yumuşak dokulara destek olmaktadır. Tüm bu işlevlerinin yanında, kıkırdak ayrıca uzun kemiklerin büyümesi ve gelişmesi için de önemlidir. Kulak ve solunum yolu gibi bölgelerde ise esnek ve dayanıklı bir çerçeve gibi işlev göstererek organların kapanıp içine çökmesini engellemektedir (Junqueira and Carneiro, 2005; Akay, 2006).

Kıkırdak, kondrosit adı verilen kıkırdak hücreleri ile iplikçiklerden oluşan bir ECM'den meydana gelmektedir. Kondrositler, matriste, lakün adı verilen boşluklarda tek tek ya da küçük gruplar (izojen=kondron) halinde bulunabilmektedir (Akay, 2006). Kıkırdak hücreleri, protein salgılayan bir hücrenin yapısal özelliklerinden olan, iyi gelişmiş granüllü endoplazmik retikuluma, golgi aygıtına ve iri bir çekirdeğe sahiptir. Bu hücreler, erişkin kıkırdakta nadiren bölünse de ECM döngüsünde yerine konulmak üzere sürekli proteoglikanları

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

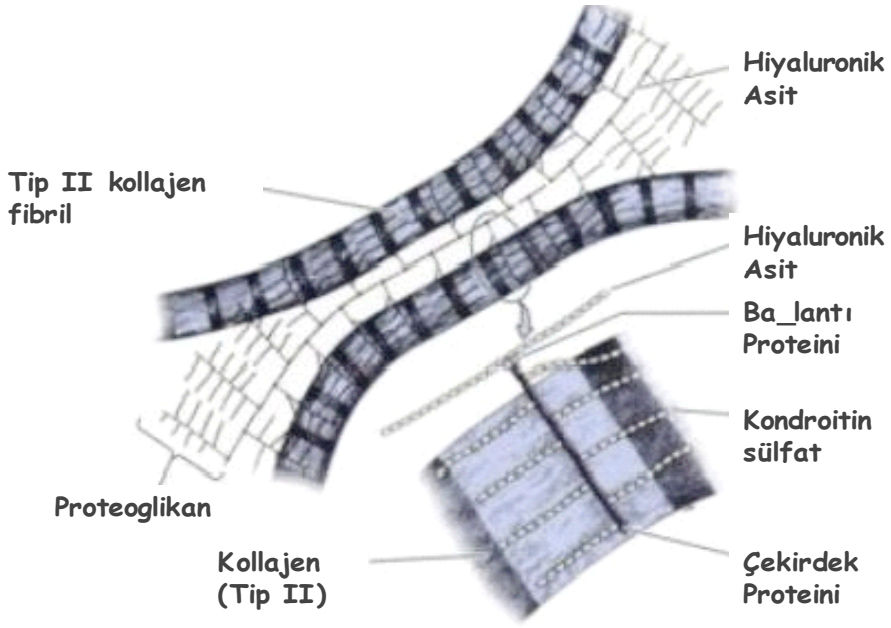
Kıkırdağın etrafını saran ve sıkı bağ dokusundan oluşan perikondriyum, avasküler kıkırdak için vasküler bir destek sağlamaktadır. Ayrıca, sinir ve lenfatik damarlar da yine perikondriyum içerisinde yer almaktadır. Avasküler bir dokuda bulunan hücrelerden beklendiği üzere, kondrositler düşük metabolik aktivite göstermektedir. Hareketli eklemlerin kemik yüzeylerinde bulunan artikular kıkırdak ise perikondriyum içermemekte; bu kıkırdak tipinde, oksijen ve besin maddeleri sinoviyal sıvıdan difüzyonla alınmaktadır (Junqueira and Carneiro, 2005).

Agrekan, kıkırdağın karakteristik proteoglikanıdır. Transkripsiyon faktörü Sox9, tip II kollajen ve agrekan gibi kıkırdağa özgü ECM bileşenlerinin ekspresyonu için gereklidir. Bu genin ekspresyonunun eksikliği, kondrojenik tabakanın kondrositlere farklılaşmasını engellemektedir (Kierszenbaum, 2006).

Hiyalin Kıkırdak

En yaygın kıkırdak tipi olan hiyalin kıkırdak, embriyoda geçici bir iskelet olarak görev yapmaktadır. Yetişkin memelilerde ise, hareketli eklemlerin yüzeylerinde, solunum yolunda (burun, larinks, trake ve bronşlar), kaburganın ventral sonlarında yer almaktadır (Junqueira and Carneiro, 2005).

Hiyalin kıkırdak temelde Tip II kollajenden oluşmaktadır. Ancak tip IX, X, XI ve diğer kollajen tiplerini de az miktarda da olsa bulundurmaktadır (Junqueira and Carneiro, 2005; Akay, 2006). Kıkırdak matrisinin esas glikozaminoglikanları kondroitin sülfat, keratan sülfat ve hiyaluronik asittir (Akay, 2006). Kıkırdak proteoglikanları (kondroitin 4-sülfat, kondroitin 6-sülfat ve keratan sülfat) çekirdek proteinlerine kovalent olarak bağlanmaktadır. Bu proteoglikanların 200 kadarı hiyaluronik asidin uzun molekülleri ile non-kovalent etkileşime girerek kollajenle etkileşen proteoglikan agregatlarını oluşturmaktadır (Şekil 2.1.). Negatif yüklü glikozaminoglikanlara bağlı olan yüksek miktardaki su, özellikle artikular kıkırdakta darbe emiliminde önemlidir (Junqueira and Carneiro, 2005).

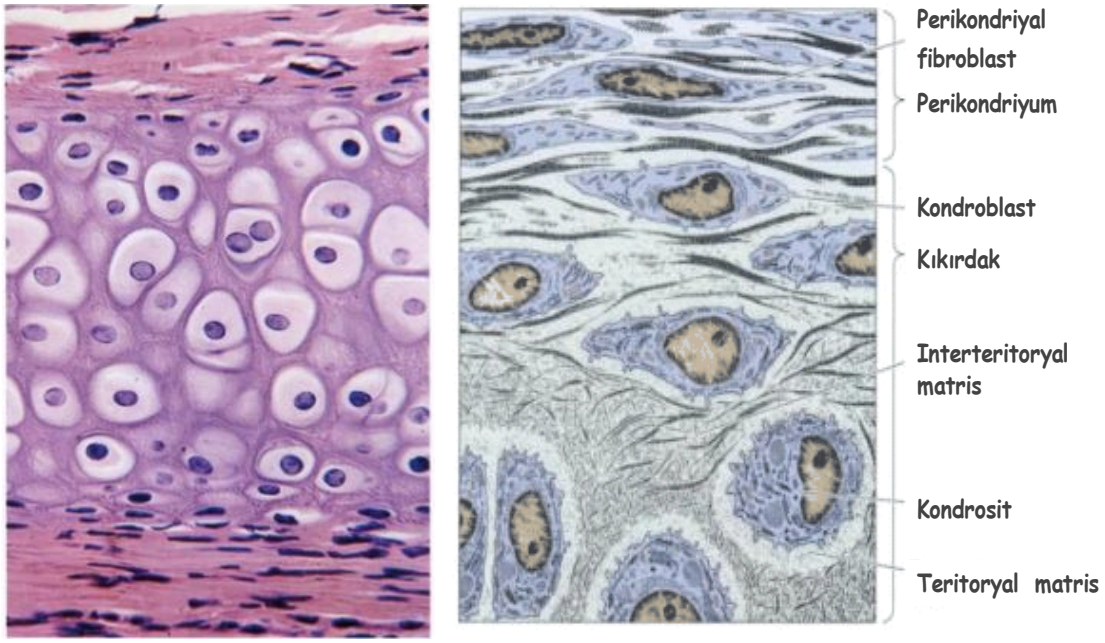


Şekil 2.1. Kıkırdak matrisinde moleküler organizasyon (Junqueira and Carneiro, 2005).

Tip II kollajen ile proteoglikana ek olarak bulunan ve yapısal bir glikoprotein olan kondronektin, özgül olarak glikozaminoglikanlara ve tip II kollajene bağlanmakta; kondrositlerin ECM'ye bağlanmasını yönlendirmektedir. Kondrositleri çevreleyen matris, glikozaminoglikanlarca zengin (özellikle kondroitin sülfat), kollajence ise fakirdir. Territoriyal ya da kapsüler matris adı verilen bu bölge, matrisin diğer kısmından farklı boyanmaktadır (Şekil 2.2.). Hücre grupları arasında kalan daha

açık renkli boyanan alanlara ise interteritoriyal matris adı verilmektedir (Akay, 2006).

Yoğun bir bağ dokusu olan perikondriyum, kıkırdağın gelişimi ve devamı için oldukça önemlidir. Kollajen tip I'ce zengin olan bu yapı, çok sayıda fibroblast içermektedir. Kıkırdak aktif olarak büyürken perikondriyum, dışta fibrilli ve içte hücresel (kondrojenik) olmak üzere 2 tabakaya ayrılır. Fibrilli tabaka, mekanik destek, koruma, diğer yapılara tutunma gibi görevleri yerine getirirken içteki hücresel tabaka, büyüme sırasında yeni kıkırdak hücrelerinin oluşumunu sağlamaktadır. Çok yavaş büyüyen kıkırdakta ya da aktif olarak yeni kıkırdak üretmeyen perikondriyumda bu tabakalaşma görülmemektedir (Akay, 2006). Perikondriyumun iç tabakasında yer alan hücreler, fibroblastlara benzeseler de bunlar, kondrositlere kolaylıkla farklılaşabilen kondroblastlardır (Akay, 2006; Junqueira and Carneiro, 2005).

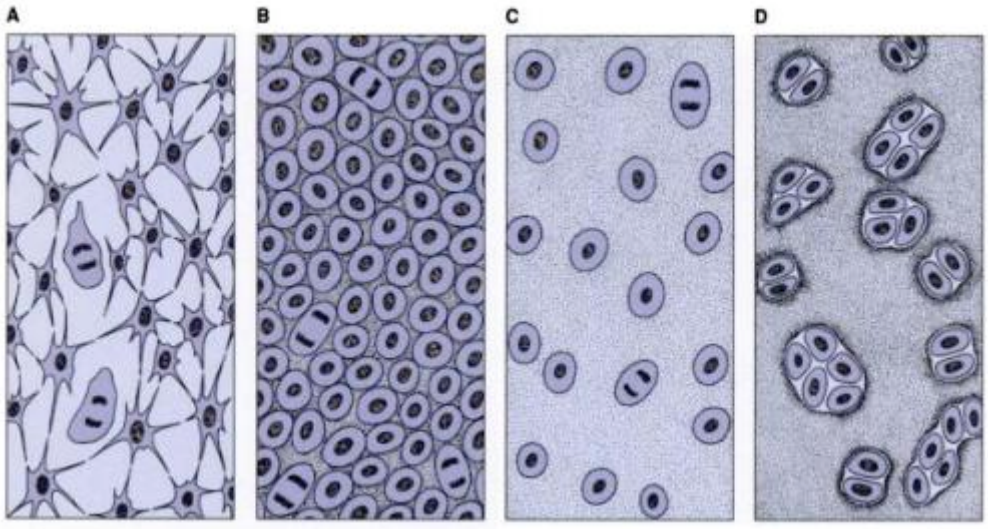


Şekil 2.2. Hiyalin kıkırdağın a) hematoksilen-eozin boyaması (Hücreler lakünler içerisinde yer almaktadır. Şeklin alt ve üst kısımları pembe ile boyanmış perikondriyumu göstermektedir), b) şematik gösterimi (Junqueira and Carneiro, 2005).

Kondrositler, kollajen ve diğer matris moleküllerini sentezler. Hiyalin kıkırdak hücreleri, glikozu, temelde anaerobik glikolizis ile metabolize etmekte ve bunun sonucunda da laktik asit üretmektedir. Kandaki besin maddeleri perikondriyum ve ardından daha derinde bulunan kıkırdak hücrelerine orta kıkırdağın kompresyon

ve dekompresyon ile yarattığı pompa etkisiyle geçmektedir. Bu nedenden ötürü, kıkırdağın maksimum kalınlığı sınırlıdır (Junqueira and Carneiro, 2005).

Kıkırdak, mezenkimden köken almaktadır. Görülen ilk modifikasyon mezenkimal hücrelerin yuvarlaklaşması ve hızla bölünmesidir. Sayıları artan ve kalabalık, yoğun gruplar oluşturan bu hücreler, protokondral doku (blastem) ya da kıkırdaklaşma merkezi adını almaktadır (Akay, 2006). Mezenkimal hücrelerinin direkt farklılaşması ile oluşan, ribozomca zengin bazofilik sitoplazmaya sahip olan bu hücreler, kondroblast adını alırlar. Matrisin sentezlenerek depolanmaya başlaması hücreleri birbirinden ayırır (Şekil 2.3.). Büyüme sırasında farklılaşma merkezden çevreye doğru olduğundan, merkezdeki hücreler kondrosit karakteristiği gösterirken periferal hücreler tipik kondroblastlara benzerler. Yüzeysel mezenkim ise perikondriyumu oluşturur (Junqueira and Carneiro, 2005).



Şekil 2.3. Hiyalin kıkırdağın histogenezisi: A) Mezenkim dokusu, B) Mezenkimal hücrelerin hızla üremesi sonucu oluşan yüksek oranda hücresel doku, C) Matris oluşumu sonucu kıkırdak hücrelerinin birbirinden ayrılması, D) Kıkırdak hücrelerinin üremesi sonucu oluşan izojen gruplar ve bu hücre gruplarını çevreleyen teritoryal matris (Junqueira and Carneiro, 2005).

Kıkırdağın büyümesi interstisiyel (iç) ve apozisyonel (yüzeysel) olmak üzere iki şekilde gerçekleşmektedir. Bunların ilkinde büyüme, kıkırdak içindeki kondrositlerden kaynaklanırken ikincisinde kıkırdak yüzeyi ya da perikondriyumdaki farklılaşmamış hücreler görev almaktadır (Kierszenbaum, 2006). Apozisyonel büyümede, yeni kıkırdak, önceden var olan kıkırdak yüzeyine eklenmektedir. İnterstisiyel büyüme, sadece kıkırdak oluşumunun erken

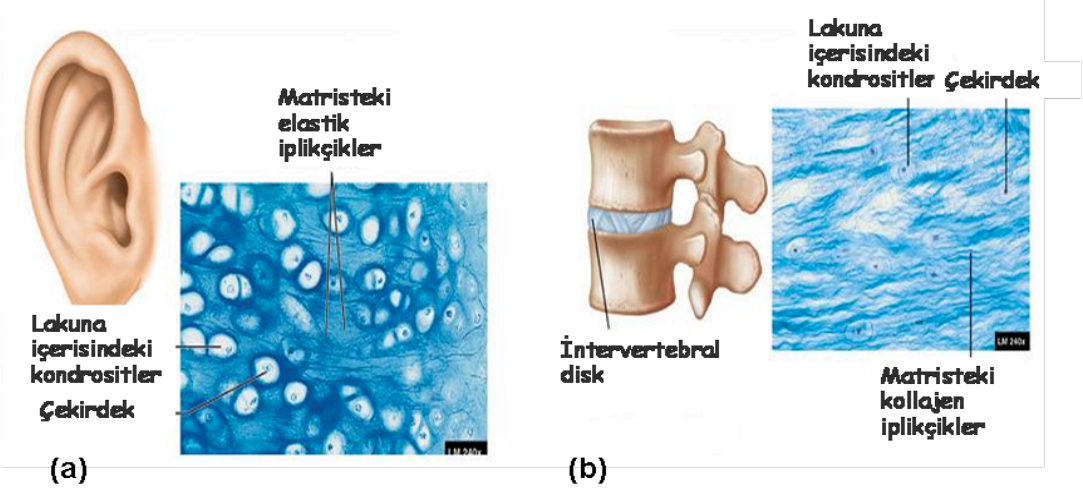
aşamalarında olmakta ve matrisle tamamen çevrilmiş olan osteositlerin bölünme ve yeni matris sentezleyebilme özellikleri sayesinde gerçekleşmektedir. Interstisiyel büyümede, kıkırdak içten büyüyüp gelişmektedir. Bu tip büyüme ayrıca, uzun kemiklerin epifizyal plaklarında ve artikular kıkırdakta görülmektedir. Epifizyel plaklarda isterstisiyel büyüme, uzun kemiklerin boyunun uzamasında ve enkondral kemik oluşumunda kıkırdak model oluşturmada önemlidir. Tek bir prekürsör kondrositten izojenik grupların oluşumu, bu büyüme şeklinin kanıtıdır (Henrikson *et al.*, 1997; Junqueira and Carneiro, 2005; Akay, 2006; Kierszenbaum, 2006).

Elastik Kıkırdak

Dış kulak, epiglotis ve işitme kanalında bulunan; basınca karşı pek dayanıklı olmayan elastik kıkırdak, hiyalin kıkırdağa oldukça benzer yapıdadır. Bu yapıyı hiyalin kıkırdaktan ayıran en önemli özellik tip II kollajene ek olarak yüksek miktarda elastik lifleri içermesidir (Şekil 2.4.a). Bu kıkırdak tipi de hiyalin kıkırdağa benzer şekilde perikondriyum içermektedir. Elastik kıkırdak, hiyalin kıkırdak gibi kemikleşememektedir (Akay, 2006; Junqueira and Carneiro, 2005).

Fibröz Kıkırdak (Fibrokıkırdak)

Fibröz kıkırdak, sıkı bağ dokusu ile hiyalin kıkırdak arasında bulunan bir dokudur. İntervertebral diskler, dizin artikular diskleri, mandibula, pubik simfizde yaygın olarak bulunur. Bu kıkırdak, sıkı bağ dokusu ile bağlantılıdır ve bu iki doku arasındaki sınır bölgeleri kademeli bir geçiş göstermektedir. Tip I kollajence zengin olan matrisi, asidofilik karakterdedir. Bu kıkırdak tipi perikondriyum içermez.



Şekil 2.4. (a) Elastik, (b) fibröz kıkırdağın yapısı (http://www.vcharkarn.com/Vblog /18613).

Fibröz kıkırdak, mikroskop altında incelendiğinde, demetler halinde düzenlenmiş fibröz bağ dokusundan oluştuğu gözlenebilir (Şekil 2.4.b.). Demetler arasında kıkırdak hücreleri yer almaktadır. Bu özelliğinden dolayı bu kıkırdak türü, vücutta basınca en dayanıklı bölgelerde bulunmaktadır (Akay, 2006; Junqueira and Carneiro, 2005; Henrikson *et al.*, 1997).

2.1.2. Kemik dokusunun yapısı ve fonsiyonları

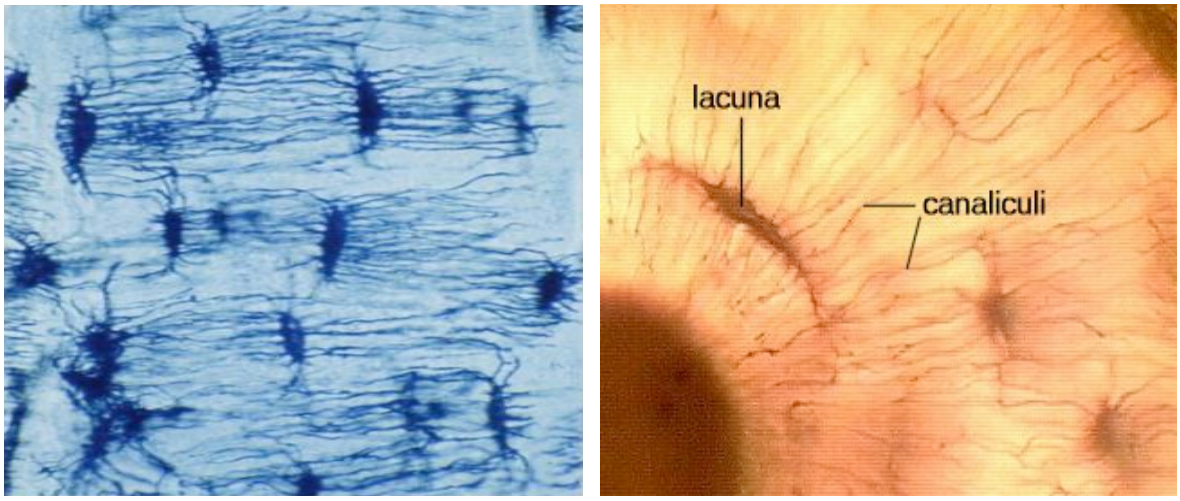
Yüksek oranda vaskülerize olan kemik dokusu, interselüler kalsifiye materyal, kemik matrisi ve hücrelerden (osteosit, osteoblast, osteoklast) oluşan özelleşmiş bir bağ doku tipidir. Kemik, metabolik olarak oldukça aktif ve fazlaca damarlı bir dokudur. Kas ve tendonların tutunma yeri olan kemikler, hareket etmeye yardımcı olmanın dışında, baş ve göğüs boşluğundaki hayati organların korunmasında, kulak yolunda sesin iletiminde (çekiç, örs ve üzengi kemikleri ile) görev almaktadır. Ayrıca organizmada kalsiyum ve fosfor deposu olarak görev yapmaktadır (Akay, 2006; Salgado *et al.*, 2004; Sharma and Elisseeff, 2004; Solomon, 2002).

Kemik, dayanıklılığı ve sertliğine rağmen sürekli yıkılarak yeniden yapılan aktif bir dokudur. Makroskobik yapısına göre, **süngerimsi (spongiyöz)** ve **kompakt** kemik olarak ikiye ayrılmaktadır. Kompakt kemik, sıkı düzenlenmiş, boşluk içermeyen bir doku iken süngerimsi kemik dokusu, gevşek, boşluklu bir yapı göstermektedir. Süngerimsi kemik, kemik iliği tarafından doldurulan boşluğu sınırlayan spikül ya da trabeküllerden oluşmaktadır. Bu yapı, kemiğe sünger görünümü vermektedir. Kemikte bulunan hücreler, trabeküllerin yapısını oluşturan, birbirine paralel kemik lamelleri üzerinde yer almakta ve besinlerini trabeküller arası boşlukta bulunan kemik iliğindeki damarlardan temin etmektedir (Bayçu, 1995; Akay, 2006; Kierszenbaum, 2006).

Büyümekte olan uzun kemikler, epifiz (uç kısım), metafiz (ara bölge) ve diyafiz (gövde) olmak üzere üç kısımdan meydana gelmektedir. Metafiz bölgesi, kemiğin oluşumunda rol oynayan kıkırdağımsı bir doku içermektedir (epifiz plağı). Diyafiz, sert kemikten oluşmuştur. Kısa ve uzun kemiklerin eklem yüzeyinde bulunan sert kemik tabakası, eklem kıkırdağı ile örtülüdür. Sert kemik, mikroskopla

incelendiğinde, lamel ve kanal sistemlerinden oluşan düzenli bir yapıda olduğu görülür. Tüm kemikler, hem içte, hem de dışta osteojenik hücreleri içeren doku tabakaları ile kaplanmıştır. Bu tabakalardan endosteum, iç yüzeyin üzerinde, periosteum ise dış yüzeyin üzerinde yer almaktadır (Bayçu, 1995; Akay, 2006).

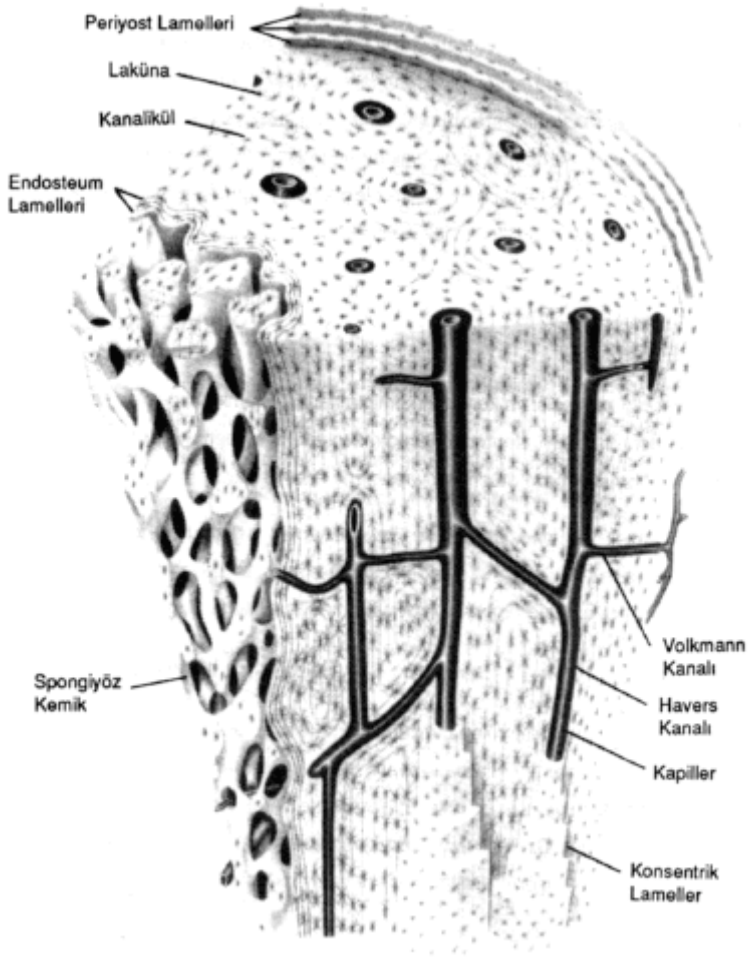
Uzun kemiğin gövde kısmından alınan enine bir kesit mikroskopta incelendiğinde, hücrelerin kemik kütlesinin oldukça az bir kısmını oluşturduğu görülür. Kemik dışındaki destek dokularda, sadece organik bir matris yapısı gözlenirken, kemikte hem organik, hem de inorganik maddeler bulunur. Kıkırdağın aksine, kemik dokusu bol damarlıdır. Fakat matrisinin sert yapısı, difüzyona elverişli değildir. Bu nedenle dokunun beslenmesi, **kanaliküller** aracılığıyla gerçekleştirilmektedir. **Lakün** adı verilen boşluklarda bulunan osteositler bu sitoplazmik uzantılar sayesinde birbirleri ya da damarlarla ilişki kurmaktadır (Şekil 2.5.). Osteoblastlar, matrisin organik bileşenlerini sentezlemekte, çok çekirdekli dev hücreler olan osteoklastlar ise kemik dokusunun resorpsiyonu ve yeniden modellenmesinde görev almaktadır (Junqueira and Carneiro, 2005).



Şekil 2.5. Kemik dokusunda bulunan lakünler ve kanalikuli adı verilen ışınsal yapılar (http://www.mhhe.com/biosci/ap/histology_mh/suppct.html, Junqueira and Carneiro, 2005).

Kemiğin içerisinde, kan damarlarını içeren kemik kanalları, **Havers** ve **Volkmann** kanalları olarak adlandırılmaktadır. Havers kanalı ile onun etrafındaki lamellerin tümüne birden **osteon (Havers sistemi)** adı verilmektedir. Volkmann kanalları, kemiğin enine yerleşim gösteren kanalları olup kemiğin periosteumundan endosteumuna kadar uzanmaktadır. Kemik hücreleri, bu kanalların içerisinde yer

alan kan damarlarının getirdiği besin maddeleri ile beslenmektedir (Bayçu, 1995; Akay, 2006). Kemiğin makroskobik yapısı, Şekil 2.6.'da verilmiştir.



Şekil 2.6. Kemik dokusunda bulunan lakünler ve kanalikuli adı verilen ışınsal yapılar (Bayçu, 1995).

Kemik Zarları

Periosteum

Kemikler, eklem kıkırdaklarıyla örtülü olan uç kısımları hariç, kemik oluşturma potansiyeline sahip periosteum ile örtülüdür. Sıkı bir bağ dokusu tabakası olan periosteum, kemik beslenmesi, gelişimi ve tamirinde büyük önem taşımaktadır. Bu tabakada, kan ve lenf damarları ile duyu sinirlerinden oluşan yoğun bir ağ bulunmaktadır. Lenf damarları sadece periosteumda bulunmaktadır (Akay, 2006). Periosteum, sıkı bağ dokusu yapısında olan dış tabaka ile gevşek bağ dokusunca zengin iç tabaka olmak üzere 2 kısımdan oluşmaktadır. Bu tabakalardan dışta

olanı kollajen ve elastinden oluşmakta, damarları içermektedir. İç tabakanın hücreleri, kemiğin yaralanması durumunda osteoblast haline dönüşmekte, bu şekilde yeni kemik dokuyu oluşturmaktadır (Bayçu, 1995).

Endosteum

Kemik iliği boşluğunu ve kompakt kemiğin kanal sistemlerini çevreleyen bu hücresel tabaka, periosteumdan daha incedir. Endosteum, kemik hücrelerini ve hemopoietik hücreleri yapabilme özelliğindedir.

Kemik Hücreleri

Osteoprogenitör Hücreler

Kemiğin ana hücreleri olan osteoprogenitör hücreler, mezenkim kaynaklıdır. Farklılaşmamış yapıda olan bu osteojenik hücreler olgun kemiklerin zarlarında, Havers ve Volkmann kanallarının örtüsünde ve büyüyen kemiklerin metafizinde bulunan kıkırdak matrisinin trabeküllerinde bulunmaktadır. Osteoprogenitör hücreler kemiğin zarar görmesi durumunda mitozla olgun kemik hücrelerine farklılaşabilmektedir (Bayçu, 1995; Akay, 2006).

Osteoblastlar

Kemik matrisinin organik bileşenlerinin (tip I kollajen, proteoglikanlar ve glikoproteinler) sentezinden sorumlu olan osteoblastlar, kemik dokusunun yüzeyinde, basit epitelyum yapısına uygun şekilde sıralanmıştır. Bu hücreler, iri nukleuslara, gelişmiş golgi ve endoplazmik retikulumlara sahiptir. Kemiğin inorganik bileşenlerinin birikmesi, kuvvetli alkalen fosfataz pozitif reaksiyonu veren canlı osteoblastların varlığına bağlıdır. Alkalen fosfataz, kalsifikasyonda rol alan önemli bir enzimdir. Fosfatı hidroliz ederek bölgesel inorganik fosfat konsantrasyonunu arttıran bu enzim sayesinde kalsiyum iyonlarının kalsiyum tuzları halinde dokuya çökmesi sağlanmaktadır (Bayçu, 1995; Junqueira and Carneiro, 2005).

Bazı osteoblastlar, yeni oluşturulan matris ile çevrelenerek osteosit adını almaktadır. Bu işlem sırasında, lakün adı verilen boşluklar oluşmaktadır.

Osteoblastlar, polarize hücrelerdir. Matris bileşenleri, hücre yüzeyinde sentezlenmektedir. Eski kemik matrisiyle bağlantı halinde olan yeni, kalsifiye olmamış matris, osteoit olarak adlandırılmaktadır. Kemik apozisyonu olarak adlandırılan bu süreç, kalsiyum tuzlarının yeni oluşan matriste birikmesiyle tamamlanmaktadır (Bayçu, 1995; Akay, 2006; Junqueira and Carneiro, 2005).

Osteositler

Osteoblastlardan köken alan osteositler, lakünlerde, matrisin lamelleri arasında yer almaktadır. Her bir lakünde sadece bir osteosit bulunmaktadır. Osteoblastlarla karşılaştırıldığında yassı, badem şeklinde olan osteositler, belirgin oranda azalmış endoplazmik retikulum ve golgi kompleksine sahiptirler. Bu hücreler, aktif olarak kemiksi matrisin sürdürülmesinde görev almaktadır ve ölümleri, bu matrisin rezorbsiyonu ile sonuçlanmaktadır (Junqueira and Carneiro, 2005).

Osteoklastlar

Kemikte yıkım ve rezorbsiyondan (çevre dokularca emilim) sorumludurlar. 20-100 µm çapında çok büyük hücreler olan osteoklastlar, birçok monositin birleşmesiyle meydana gelmektedir. 50'ye yakın çekirdeğe sahip olan bu hücrelerin çok sayıda lizozomları, mitokondrileri, iyi gelişmiş bir golgi kompleksleri vardır. İçerdikleri kollajenaz ve diğer proteolitik enzimlerle kemiğin rezobsiyonunu sağlamaktadır. Osteoklastları içerisinde bulunduran ve kemik yüzeyinde bulunan sığ çukurlara Howship lakünleri adı verilmektedir. Kemiğin yıkımından sorumlu olan tarafta, hücre yüzeyinin genişletilmesinde rol oynayan fırça kenarlı hücre uzantıları gözlenmektedir (Bayçu, 1995; Akay, 2006).

Kemik Matrisi

Kemik matrisi, inorganik ve organik olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Organik kısmın büyük bölümü kollajen liflerden (Tip I ve V), protein (osteokalsin, osteonektin, osteopontin gibi glikoproteinler ve birkaç sialoprotein) ve glikozaminoglikanlardan (kondroitin sülfat, keratan sülfat, hiyaluronik asit) oluşan temel maddeden yapılmıştır.

Kemiğe sertlik kazandıran inorganik maddelerin başında, kalsiyum, fosfat, sitrat, magnezyum gibi maddeler gelir. Kemikte, başlangıçta kalsiyum fosfat şekilsiz olarak depolanmakta, daha sonra hidroksiapatit kristalleri şeklinde yeniden şekillenmektedir. Son aşamada ise kalsiyum fosfat çok ince plakalar ya da çubuk şeklindeki kristaller halinde (13-30 Å kalınlığında ve 400Å uzunluğunda) bulunmaktadır. Kemik, zayıf asitler ya da şelatlandırıcı ajanlarla muamele edildiğinde inorganik tuzlar yapıdan ayrılmaktadır. İnorganik kısım, hidroksiapatit şeklinde bulunan kalsiyum fosfatın yanında, kalsiyum karbonat, kalsiyum florür, magnezyum florür, magnezyum hidroksit ve magnezyum sülfat bileşiklerini de içermektedir (Bayçu, 1995; Akay, 2006).

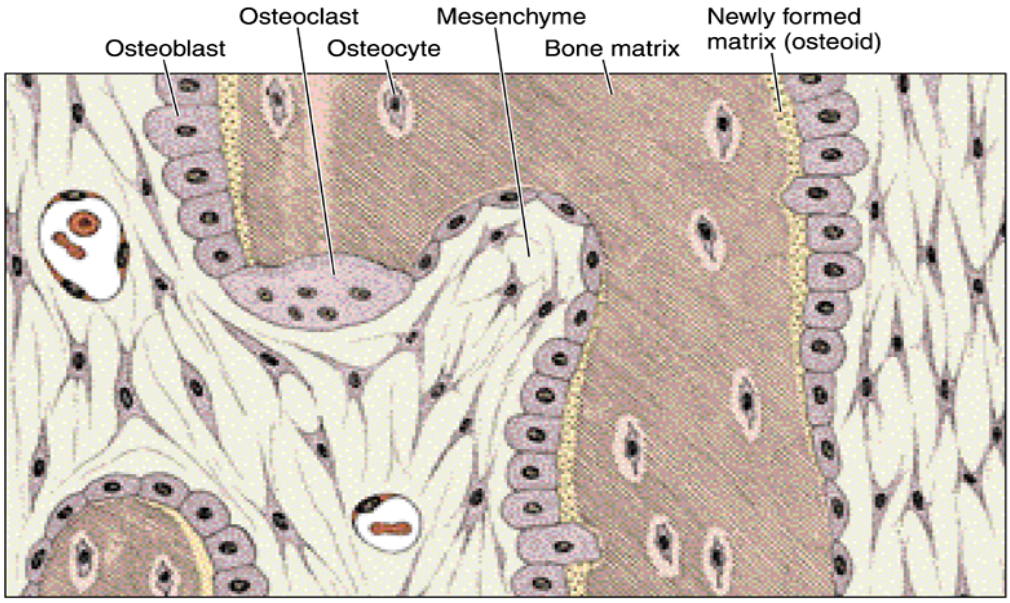
Kemik Oluşumu (Osteogenezis)

İntramembranöz ve enkondral kemikleşme olmak üzere 2 tür kemikleşme vardır. Kemik oluşumu, doğrudan bağ dokusunun katılımıyla gerçekleşiyorsa "zarlararası kemikleşme", kıkırdak dokusunun katılımı ile gerçekleşiyorsa "kıkırdakiçi kemikleşme" olarak adlandırılır. Her iki kemikleşme sonucu oluşan ilk kemik dokusu primer (olgunlaşmamış) kemiktir. Bu kemik daha sonra yerini olgun lamelli kemik dokuya bırakmaktadır.

Kafatasının bazı yassı kemikleri ile mandibula ve maksillanın bazı kısımları intramembranöz kemikleşme ile oluşmaktadır. Bu tip kemik oluşacağı zaman öncelikle mezenkim hücreleri damarlar etrafında toplanarak birbirleriyle ilişki kurar (Şekil 2.7.). Hücreler arasındaki boşluklar kollajen liflerle doldurulur. Birçok kemikleşme merkezi gelişir ve bu merkezler birleşerek süngere benzeyen trabeküllerin bir ağını oluşturur. Kalsiyum fosfat apozisyon ile uzanan kemik matrisinde depo edilir, kemik matrisi mineralizasyonu sonucu, osteoblastlar osteositler şeklinde hapsedilir ve perivasküler kanalların kısmen kapanmasıyla mezenkim hücreleri, kan yapıcı hücrelere dönüşür (hematopoez). En son ağsı kemik lamelli kemiğe dönüşür, dış ve iç bağ dokusu periosteum ve endosteumu oluşturmak üzere yoğunlaşır (Bayçu, 1995; Akay, 2006; Kierszenbaum, 2006).

Bu tür kemikleşme, hiyalin kıkırdak hücreleriyle oluşmaktadır. "İntrakartilajenöz kemikleşme" olarak da bilinen bu durumda, kondrositler belirgin şekilde büyür ve kıkırdak modelin orta noktasında hipertrofi olur. Bu şekilde bir kemikleşme merkezi

oluşur (birincil kemikleşme merkezi) ve hipertrofik kondrositler perikondriyumdan kan damarlarının filizlenmesini indüklemek amacıyla VEGF (vasküler endotelyal büyüme faktörü) salgılar. Bunu, matrisin kalsifikasyonu ve hipertrofik kondrositlerin apoptozu izler.



Şekil 2.7. İntramembranöz kemikleşme sırasında meydana gelen olaylar (Junqueira and Carneiro, 2005).

2.2. Doku Mühendisliği

Doku mühendisliği, hücrelerin, doku iskelelerinin ve büyüme faktörlerinin tek başına veya birlikte kullanımıyla dokuların onarımını ya da yenilenmesini amaçlayan; bu amaca ulaşmak için biyoloji, kimya ve mühendislik prensiplerini kullanan oldukça yeni bir alandır (Laurencin *et al.*, 1999). Mühendislik yoluyla doku eldesine yönelik olarak birçok farklı yaklaşım kullanılmış olsa da bu yaklaşımların neredeyse tümü biyoaktif molekülleri ve/veya hücreleri içeren malzemelerin kullanımına dayanmaktadır. Bir biyobozunur biyomalzemenin önemli özelliklerinin bazıları şu şekilde sıralanabilmektedir (Llyod, 2002):

- Malzeme, vücutta güçlü bir enflamasyon ya da toksik etki oluşturmamalıdır.
- Malzeme, uygun raf ömrüne sahip olmalıdır.
- Malzemenin bozunma süresi, iyileşme ya da rejenerasyon süresine yakın olmalıdır.
- Malzeme, uygulamaya uygun mekanik özelliklere sahip olmalıdır.

- Bozunma ürünleri toksik olmamalı ve vücut tarafından metabolize edilebilmelidir.
- Malzeme, kullanılacağı alana uygun bir şekilde işlenebilmelidir.

Dinamik, kompleks ve yüksek oranda vaskülerize bir doku olan kemik, vücutta birçok önemli işlevin yerine getirilmesinden sorumludur. Organlar ve diğer dokular için destekleyici bir çatı oluşturan kemikler, ayrıca, hayati organları koruma, kas kasılmasını destekleme, kırmızı kan hücresi üretme, kalsiyum ve fosfor gibi mineralleri depolama ya da salıverme gibi birçok görevi üstlenmektedir (Salgado *et al.*, 2004; Sharma and Elisseeff, 2004; Solomon, 2002). Tüm bu önemli görevlerinden dolayı, bir yaralanma ya da hastalık sonrası dokuda meydana gelecek hasarın iyileştirilmesi vücudun dengesinin korunması açısından oldukça önemlidir (Salgado *et al.*, 2004).

Bir yıl içerisinde, kemik-greft prosedürlerine ihtiyaç duyulan kabaca 1 milyon iskelet defekti vakası gerçekleşmektedir (Yaszemski *et al.*, 1994). Bu defektlerin iyileştirilmesi amacıyla otolog ve allojenik kemik greftleri ya da metalik ve seramik implantlar kullanılmaktadır (Yaszemski *et al.*, 1994; Spitzer *et al.*, 2002; Simon *et al.*, 2002; Rose and Oreffo, 2002; Petite *et al.*, 2000). Hastanın sağlıklı bölgesinden alınan kemiğin defekt bölgesine transferi olarak tanımlanabilen otolog kemik grefti yaklaşımı, osteojenik hücrelerle birlikte kemik iyileşimi için gerekli osteoindüktif faktörlerin sağlanması nedeniyle kemik yenilenmesi açısından altın standart olarak görülse de bu uygulamanın otolog greftin alındığı alanda morbiditeye neden olması büyük bir problem olarak görülmektedir (Yaszemski *et al.*, 1994; Spitzer *et al.*, 2002; Simon *et al.*, 2002; Rose and Oreffo, 2002; Petite *et al.*, 2000; Asahina *et al.*, 1999).

Kemik greftinin başka bir kişinin vücudundan alınarak hastaya nakledilmesine dayanan allogreft yaklaşımı, otolog greftlere bir alternatif olarak kullanılmaktadır. Fakat bu yaklaşımda da dokuyla birleşmenin otogreftlere göre daha az olması, bağışıklık yanıt oluşturarak doku reddine neden olması, transplantasyon sonrası enfeksiyonlar, vericiden alıcıya patojen geçişi gibi çeşitli sorunlar ortaya çıkabilmektedir (Yaszemski *et al.*, 1994; Spitzer *et al.*, 2002; Simon *et al.*, 2002; Rose and Oreffo, 2002; Petite *et al.*, 2000; Williams, 1999). Bu iki yaklaşıma alternatif olan seramik ve metallerin kullanımı da yine birçok dezavantaja sahiptir.

Örneğin metaller mekanik bir destek sağlasalar da implante edildikleri bölgedeki dokuya zayıf bir uyum göstermektedirler. Seramiklerin ise düşük gerilme kuvvetleri ve kırılganlıkları nedeniyle kullanımları kısıtlıdır (Yaszemski *et al.*, 1994).

Kıkırdak zarar gördüğünde, çocuklar hariç, oldukça zor rejenere olmakta ve sıklıkla tam bir rejenerasyon sağlanamamaktadır. Kıkırdağın rejenerasyonunda perikondriyum, yeni kıkırdağın oluşturulmasında görev almaktadır. Fakat geniş zararın oluştuğu bölgelerde, perikondriyum, yeni bir kıkırdak oluşturmak yerine sıkı bağ doku yapısında bir skar dokusu oluşturmaktadır (Junqueira and Carneiro, 2005). Ayrıca perikondriyumun kıkırdak oluşturma yeteneğinin bir süre devam ettiği; ancak erişkin bireylerde işlevselliğini yitirdiği bilinmektedir. Kıkırdağın damardan yoksun olması, kondrositlerin hareketsizliği ve çok zor çoğalabilmeleri kıkırdak doku onarımını zorlaştıran faktörler arasında yer almaktadır. Özellikle eklem kıkırdaklarında iyileşme çok zordur ve eğer hasar büyükse kıkırdak kireçleşerek yerini kemiğe terk etmektedir (Akay, 2006).

Doku mühendisliği, yaralanma ya da hastalık sonucu hasara uğrayan kemik ve kıkırdak dokularının tamiri ya da hasara uğramış dokunun sağlıklı doku ile değiştirilmesi çalışmalarında ümit vadeden yeni bir alandır. Doğal ECM, hücreleri bir doku oluşturmak üzere bir araya getirir, doku yapısını kontrol eder ve hücre fenotipini düzenler (Alberts *et al.*, 1994). Doku mühendisliğinde yapay ECM'ler olarak görev yapan biyomalzemeler ise hücrelerin ve/veya biyoaktif faktörlerin vücutta istenilen bölgelerde lokalizasyonunu ya da taşınımını sağlar. *In vivo* güçlere karşı mekanik destek vererek doku büyümesi süresince önceden belirlenmiş yapının sürdürülmesine katkıda bulunur (Kim ve Money, 1998; Kim *et al.*, 2000a). Hücre süspansiyonlarının direkt olarak vücuda enjekte edilmesine yönelik çalışmalar yapılmış olsa da bu yaklaşımın bazı sakıncaları bulunmaktadır. Bunlar arasında transplante edilen hücrelerin lokalizasyon kontrolünün zor olması ve çoğu memeli hücre tipinin yüzey-bağımlı karakteri yer almaktadır.

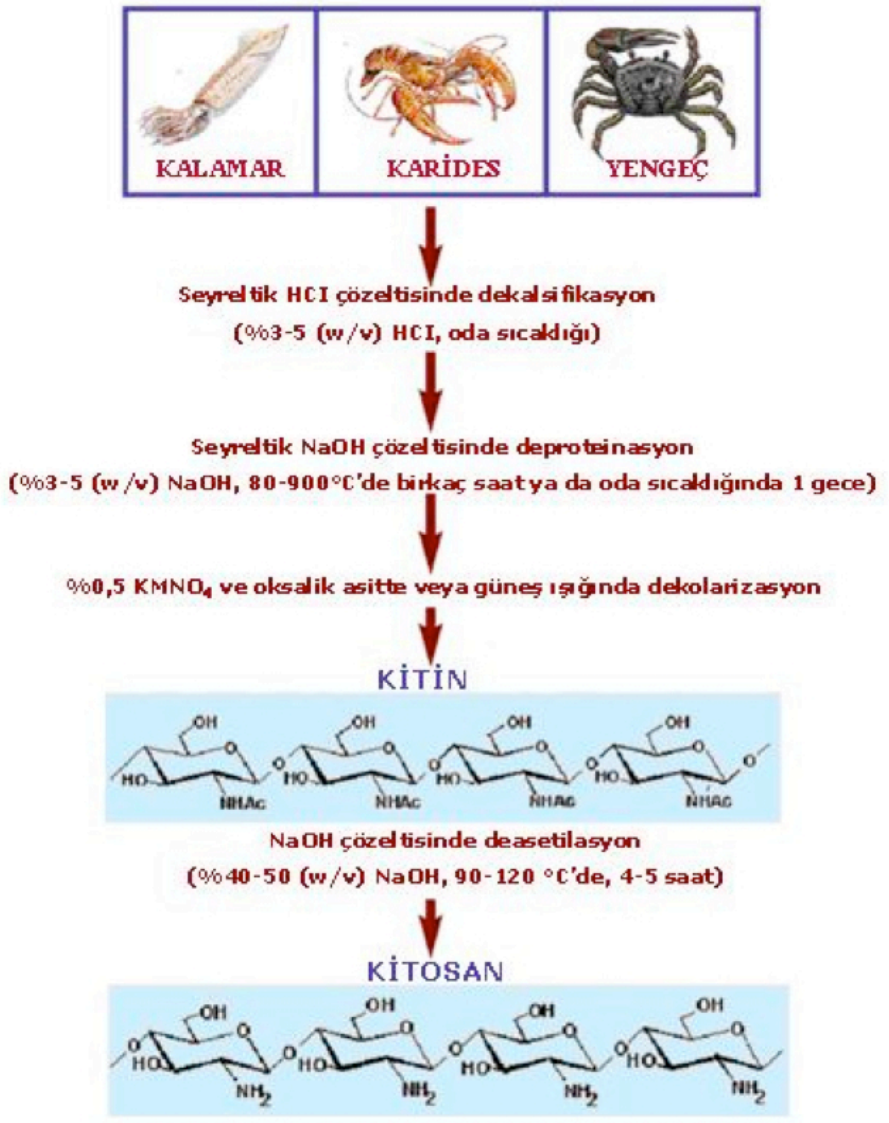
2.3. Kitosan ve Kitosan-Temelli Doku İskeleleri

2.3.1. Kitosanın yapısal özellikleri

Kitinin kısmi deasetilasyonu sonucu elde edilen kitosan (poly[β-(1,4)-2-amino-2-deoxy-D-glucose]), lineer bir amino polisakkarittir (Suh and Matthew, 2000; Wise,

2000). Kitinin N-deasetilasyonu, genellikle arttırılmış bir sıcaklıkta, güçlü alkalilerle (% 50 NaOH gibi) muamele sonucunda gerçekleşmektedir (Elder *et al.*, 2003).

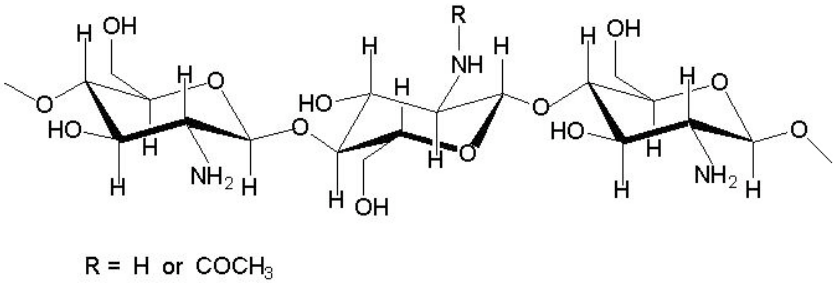
Kitinin tam olarak deasetilasyonu sağlanamadığından, kitosan, glikozamin ve N-asetilglikozaminden oluşan bir kopolimerdir. Şekil 2.8.'de kitosan eldesindeki sentez ve deasetilasyon aşamaları şematik olarak ifade edilmiştir.



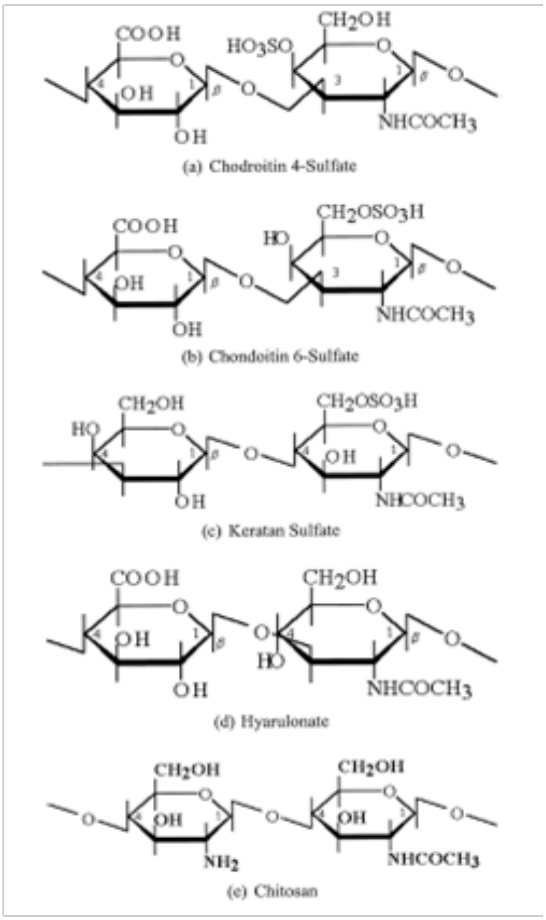
Şekil 2.8. Kitin ve kitosanın hazırlanış aşamaları (http://members.tripod.com/~Dalwoo/preparation.htm).

Doğal bir polimer olan kitosan, kabukluların dış iskeleti ile fungusların hücre çeperinde bulunur ve β-[1→4]-bağlı, farklı sayıda rastgele konumlanmış N-asetil-glikozamin ve D-glikozamin kalıntılarından oluşur (Şekil 2.9.). Bu nedenle eklem

kıkırdağında bulunan glikozaminoglikanlar (GAG) ve hiyaluronik asitle bazı benzer karakteristikleri paylaşır (Suh and Matthew, 2000). Şekil 2.10.'da kitosan ve eklem kıkırdağını oluşturan bileşenler arasındaki yapısal benzerlikler gösterilmektedir. Kitosan iyi belirlenmiş tek bir yapıya sahip değildir ve moleküler ağırlığı, asetilasyon derecesi ve sekansı değişebilmektedir. Bu yapısal farklılıklardan dolayı, kitosanın özellikleri de (örneğin pKa) farklılık göstermektedir.



Şekil 2.9. Kitosanın kimyasal yapısının şematik gösterimi.



Şekil 2.10. Eklem kıkırdağında bulunan GAG'lar, hiyaluronik asit ve kitosan arasındaki yapısal benzerlikler.

Fiziksel özellikler ve kitosana verilen biyolojik cevap, deasetilasyon derecesine ve moleküler ağırlığa bağlıdır. Deasetilasyonun derecesi, N-asetilglukozamin ünitelerinin molar fraksiyonu olarak tanımlanmaktadır (Elder *et al.*, 2003). Biyobozunur, katyonik bir polimer olan kitosanın kaynağına ve hazırlanma yöntemine göre ortalama molekül ağırlığı 50-1000 kDa arasında değişmektedir. Ticari olarak bulunan kitosanın deasetilasyon derecesi ise % 50-90 arasındadır (Suh and Matthew, 2000). Daha yüksek deasetilasyon derecesine sahip olan kitosan-bazlı materyaller, daha fazla asetamid grubuna sahip olan materyallere göre az nem absorplama, yavaş parçalanma ve yüksek gerilme kuvvetine sahip olma eğilimindedir. Ayrıca daha yüksek derecede deasetillenmiş kitosan substratlarının hücre yapışmasını daha düşük derecede asetilenmiş olanlara göre iyi bir şekilde desteklediği bildirilmiştir (Elder *et al.*, 2003). Kitosan yarı-kristalin bir polimerdir ve kristalinite derecesi, deasetilasyon derecesinin bir fonksiyonudur.

Kitosan, kararlı, kristalin yapısı nedeniyle normalde pH'ı 7'nin üzerinde olan sulu çözeltilerde çözünmezken seyreltik asitlerde serbest amino grupları protonlanmakta ve molekül pH 5'in altında tamamen çözünür hale gelmektedir. Kitosanaz, lizozim ve papain gibi enzimlerin *in vitro*'da kitosanı parçaladığı bilinmektedir (Nordtveit *et al.*, 1996). Kitosanın *in vivo* parçalanmasında ise lizozim enzimi görev almaktadır. Parçalanma, asetillenmiş kalıntıların hidrolizi ile gerçekleşmektedir (Nair ve Laurencin, 2007). Bozunma ürünleri farklı uzunluklarda oligosakkaritlerdir. Bozunma hızı ile asetilasyon derecesi ve kristalinitesi arasında ters bir ilişki bulunmaktadır (Shi *et al.*, 2006). Kitosanın yüksek oranda deasetile formları (örneğin deasetilasyon derecesi % 85'ten büyük olanları) daha düşük bozunma hızları gösterirken deasetilasyon derecesi daha küçük olan örnekler daha hızlı bozunmaktadır (Suh and Matthew, 2000). Yüksek asetilasyon derecesinin söz konusu olduğu durumlarda, parçalanma süresi *in vivo*'da aylarca sürebilmektedir.

Kitosanın biyolojik olarak yenilenebilir olması; biyobozunur, biyouyumlu, nonantijenik, nontoksik ve biyofonksiyonel özellikleri, bu polimerin ve bu polimer kullanılarak elde edilen komplekslerin yara örtü malzemesi (Mi *et al.*, 2001), ilaç dağıtım sistemleri (Aiedeh *et al.*, 1997) gibi biyomedikal uygulamalarda kullanılmasına olanak sağlamıştır. Ayrıca polimer, immobilizasyon desteği,

hemostatik ajan ve biyomateryal olarak da potansiyel kullanıma sahiptir (Wise, 2000; Elder *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2003b).

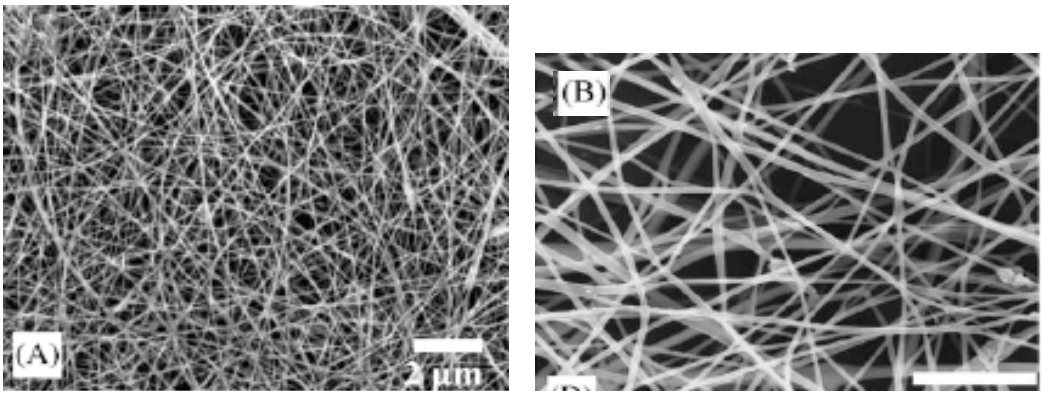
Kitosan zayıf asitlerde çözülebilmektedir ve bunun sonucunda yüksek yük yoğunluğuna sahip, katyonik bir polimer oluşmaktadır. Bu özelliğinden dolayı kitosan, birçok anyonik polimerle polielektrolit kompleksler oluşturabilmektedir (Khor ve Lim, 2003). Kitosanın makrofajlar üzerinde uyarıcı ve nötrofiller üzerinde de kemoatraktif özellikler gösterdiği bilinmektedir (Suh ve Matthew, 2000). Bu özelliklerin yanında antibakteriyel ve hemostatik özellikleri de kitosanın yara iyileşmesine yönelik uygulamalarda kullanılma potansiyelini arttırmıştır (Stone *et al.*, 2000; Burkatovskaya *et al.*, 2006). *In vivo*'da lizozim ile parçalanması, makrofajları aktive eden oligomerlerin oluşmasını sağlamaktadır (Nair ve Laurencin, 2007). Parçalanma, dermal dokuların önemli bir bileşeni olan N-asetilglikozaminlerin oluşumunu sağlayarak yara dokusunun iyileşmesine katkıda bulunmaktadır. Kitosan, güçlü pozitif yükleri sayesinde negatif yüklü mukoz membranla etkileşerek bir mukozadezif gibi davranmaktadır. Mukoadhezif özelliğinin yanında sıkı bağlantılarda (tight-junction) görevli proteinlerin yapısal olarak yeniden düzenlenmesini sağlayarak hücre membranı ile etkileşime girmesi (permeasyon arttırıcı olarak davranması), oral ve nazal uygulamalarda kullanılmasını da mümkün kılmaktadır (Nair ve Laurencin, 2007). DNA ile kompleksler oluşturabilme özelliğinden dolayı da viral olmayan gen taşınım araçları olarak kullanılmaktadır (Mao *et al.*, 2001).

2.3.2. Kitosan doku iskelesi fabrikasyonu

Doğada selülozdan sonra en fazla bulunan polimer olan kitosanın en önemli özelliklerinden biri, yapısının, membran, ince filmler ve üç boyutlu iskelelerin eldesinde birçok yöntemin kullanılmasına olanak sağlamasıdır. Bu yapıların eldesinde dökme (casting) (Ma *et al.*, 2001), eğirme (spinning) (Bhattarai *et al.*, 2005), elektrobirikim (Yi *et al.*, 2005) gibi yöntemler kullanılmaktadır. Kitosan, seyreltik asit çözeltilerinde çözündüğünden membran ve film halinde dökümü yapılabilmektedir (Yi *et al.*, 2005). Bunun yanında gözenekli yapılar, dondurma ve liyofilizasyon ile elde edilebilmektedir (Lu *et al.*, 2006, Tığlı *et al.*, 2007). Ma ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada, dökme ve liyofilizasyon yöntemlerini beraber kullanarak deri doku mühendisliği kapsamında kullanmak üzere iki tabakalı kitosan

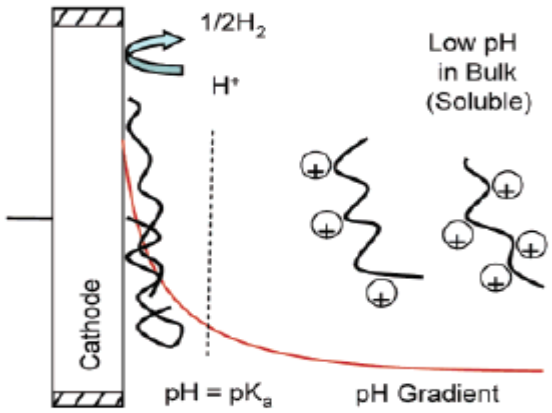
iskeleler elde etmişlerdir (Ma *et al.*, 2001). Bu yöntemle biri sıkı, diğeri gözenekli olmak üzere 2 tabaka elde edilmiştir.

Diğer bir çalışmada, farklı oranlarda kitosan-PEO (polietilen oksit) çözeltileri hazırlanmış ve bu çözeltiden elektro-eğirme yöntemi ile çapı birkaç mikrondan ~40 nm'ye kadar olan kitosan fiberler elde edilmiştir (Bhattarai *et al.*, 2005). Elde edilen bu polimerik nanofiberler, özellikle ECM (extracellular matrix-hücredışı matris)'yi yapı ve fonksiyon bakımından taklit etmeleri açısından oldukça önemlidir (Şekil 2.11.).



Şekil 2.11. Elektro-eğirme yöntemi ile hazırlanmış kitosan-PEO nanofibelerin SEM görüntüleri (A) % 90 kitosan-% 10 PEO, (b) % 60 kitosan-% 40 PEO.

Tüm bu yöntemlerin yanında, kitosanın bir katot yüzeyine elektrobirikimi ve bu yolla ince kitosan filmlerinin oluşturulması da olasıdır. Şekil 2.12.'de kitosan için elektrobirikim mekanizması gösterilmiştir (Yi *et al.*, 2005).



Şekil 2.12. Elektrobirikim mekanizması.

Doku mühendisliği alanında kullanılan doku iskelelerinin gözenekli ve bu gözeneklerin birbirleriyle bağlantılı olması hücrelerin göçü; besin maddelerinin ve hücresel atıkların transferi açısından oldukça önemlidir (Salgado *et al.*, 2004; Sharma, 2004; Hutmacher, 2000). Özellikle 100-150 μm boyutundaki gözenekler hücrelerin doku iskelesinin iç kısımlarına doğru ilerlemesine olanak sağlamaktadır (Zeltinger *et al.*, 2001). Tüm bu nedenlerden dolayı doku iskelesi eldesinde kullanılan tekniğin gözeneklilik, gözenek boyutu, gözenek dağılımı ve gözeneklerin birbirleriyle olan bağlantısı açısından tutarlı olması gereklidir (Salgado *et al.*, 2004). Dondurarak-kurutma tekniği ile 100 μm boyutunda gözeneklerin eldesi mümkündür (Arpornmaeklong *et al.*, 2007). Bu yöntemde, dondurma prosesi sırasında, çözelti içerisinde buz kristalleri oluşmakta ve daha sonra bu kristaller liyofilizasyon ile uzaklaştırılarak gözenekli bir yapı elde edilmektedir. Oluşan yapının gözenek boyutu, dondurma hızı ile değiştirilebilmektedir (Suh and Matthew, 2000). Seol ve arkadaşları, 100-200 μm boyutunda gözeneklere sahip kitosan doku iskelelerini dondurarak-kurutma yöntemi ile elde etmişlerdir (Seol *et al.*, 2004).

Kitosan, aktif gruplarının varlığı nedeniyle kolaylıkla modifiye edilebilmektedir. Kitosanın birçok türevi, kimyasal ve fiziksel modifikasyonla elde edilmiştir. Bunun yanında kitosanın modifikasyonu için çapraz bağlama (Mi *et al.*, 2002), karıştırma (blending) (Cheng *et al.*, 2003), aşılama (grafting) (Li *et al.*, 2005a) ve γ-ışınları ile irradiasyon (Renbutsu *et al.*, 2005) gibi birçok yöntem kullanılmıştır. Bu bağlamda kitosan-jelatin yapı iskelelerinin hücresel uyumluluğunu bozmadan mekanik özelliklerini iyileştirmek amacıyla bu iskelelerin poli(DL-laktik asit) ile modifikasyonları yapılmış (Liu *et al.*, 2005), TGF-β1'in (transforming growth factor) kontrollü salımını gerçekleştiren kitosan yapı iskeleleri hazırlanmış (Lee *et al.*, 2004) ya da kitosan iskeleleri üzerine hücre yapışmasının arttırılması amacıyla RGD veya GRGDS (Gly-Arg-Gly-Asp-Ser) sekansı immobilize edilmiştir (Gönen Karakeçili *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2006; Tığlı and Gümüşderelioğlu, 2008).

2.3.3. Kitosanın Doku Mühendisliği Uygulamaları

Kitosan, hem kimyasal olarak modifiye edilebilen reaktif amino ve hidroksil grupları içerdiğinden, hem de fiziksel olarak farklı gözenek yapıları için manipule edilmesinin kolaylığından dolayı doku mühendisliği uygulamaları için yüksek potansiyele sahiptir. Kitosanın doku iyileşmesi üzerindeki en ilginç etkilerinden

birisi, anjiyogenez ile birlikte granülasyon dokusunun oluşumudur. Kitosanın fibroblastları, fibroblast ve vasküler endotel hücrelerinin çoğalması ile hücre göçünde görevli olan interlökin-8 salımı için indüklediği rapor edilmiştir. Fakat kitosanın yüksek trombojenik özelliği onun kan-temaslı biyomateryallerde kullanımını sınırlamıştır (Wang *et al.*, 2003b).

Kitosanın kemik oluşumunu ve yara iyileşmesini arttırdığı (Wang and Hon, 2003a), bunun yanında hücre yapışması ve üremesinde önemli rol oynadığı (Zhu *et al.*, 2002) bilinmektedir. Özellikle osteouyumlu ve osteoindüktif özellikleri nedeniyle kemik doku mühendisliği çalışmalarında tercih edilmektedir (Seol *et al.*, 2004). Kitosanın dezavantajları içerisinde en önemlisi zayıf fiziksel özellikleridir. Bu dezavantajın ortadan kaldırılması amacıyla literatürde birçok çalışma yapılmıştır. Özellikle kitosanın diğer polimerlerle ya da seramiklerle kompozitlerinin oluşturulması sıkça kullanılan yaklaşımlar arasında yer almaktadır.

Örneğin kitosanın mekanik olarak zayıf olması ve biyoaktivite eksikliği nedeniyle kemik tamiri ve rejenerasyonu çalışmalarında kitosan-kalsiyum fosfat kompozitleri kullanılmıştır (Zhang and Zhang, 2001b). Yu ve arkadaşları kollajen/kitosan/heparin komplekslerini hepatosit kültürlerinde çalışmışlardır (Yu *et al.*, 2005). Çapraz bağlanmış kollajen/kitosan matriks (CCM) de karaciğer rejenerasyonu için uygun bir ortam sağlayabileceği düşüncesiyle çalışılmıştır. CCM'nin oluşturulması, NHS (N-hydroxysuccinimide) ve MES (2-morpholinoethane sulfonic acid) tampon sistemi içinde bir çapraz bağ ajanı olan EDC (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide)'nin kullanılmasıyla sağlanmıştır. Sonuçta EDC çapraz bağlı CCM'nin mekanik gücü azalttığı, hepatositlerle uyumlu olduğu, mükemmel kan uyumluluğu sağladığı görülmüştür ve bu da CCM'nin implante edilebilir biyoyapay karaciğerler için aday bir matris olabileceğini göstermiştir (Wang *et al.*, 2003b). Kollajen/kitosan kompozit matrisinin yanısıra aljinat/kitosan ve kitosan/jelatin karışımlarının da hepatosit kültürleri üzerindeki etkileri incelenmiştir. Yapılan incelemeler sonucunda kitosan/kollajen ve kitosan/jelatinden oluşan karışımların diğer materyallere göre daha üstün olduğu, bu kompozit matrislerde hepatositlerin fonksiyonlarını ve canlılıklarını uzun süre korudukları bulunmuştur (Li *et al.*, 2005b). Kitosan ve

jelatinden oluşan kompozit mikrotaşıyıcılar hepatositlerin immobilizasyonu için de kullanılmıştır (Li *et al.*, 2004).

Bunların yanında kendiliğinden düzenlenmiş (self-assembled) nano-hidroksiapatit-kollajen kompozit tozlarının yüklenmesi ile elde edilen çapraz bağlı kollajen-kitosan matrisler (Cui *et al.*, 2004), kitosan-kollajen (Peng *et al.*, 2006b), kitosan-jelatin-hiyaluronik asit (Liu *et al.*, 2006), kitosan-jelatin (Shen *et al.*, 2000), kitosan-aljinat (Li and Zhang, 2005c), kitosan-β-trikalsiyum fosfat-poli(metilmetakrilat) (Kuo *et al.*, 2003), kitosan-kondroitin sülfat (Peng *et al.*, 2006a) kompozitleri gibi yapılarla gerçekleştirilen çalışmalar da rapor edilmiştir.

Bir kez zarar gördüğünde, avasküler yapısından dolayı, eklem kıkırdağının kendiliğinden iyileşme kapasitesi oldukça düşüktür. GAG'ların kondrogenezisi arttırdığı bilindiğinden glikozaminoglikanların ve bunların analoglarının kıkırdak doku iskeleleri olarak kullanılması oldukça akılcı bir davranıştır. GAG'lar, büyüme faktörleri, reseptörler ve yapışma proteinleriyle özel etkileşim içerisindedir. Bunlara yapısal olarak benzeyen kitosanın da benzer biyoaktiviteye sahip olabileceği belirtilmiştir (Suh and Matthew, 2000). Ayrıca kitosanın çeşitli büyüme faktörleri ve yapışma proteinleri ile etkileşerek kondrogeneziste rol oynadığı belirtilmiştir (Suh and Matthew, 2000; Lindahl and Hook, 1978; Chen and Abatangelo, 1999).

Grubumuz tarafından dondurarak-kurutma tekniğiyle hazırlanan kitosan doku iskeleleri çeşitli biyosinyal moleküller (RGD, EGF, BMP-6) ile modifiye edilmiş ve ATDC5 kondrojenik hücre hattı kullanılarak kıkırdak doku mühendisliğine yönelik çalışmalar yapılmıştır (Gümüşderelioğlu, 2008).

Şenköylü ve arkadaşları, kondrositlerin kitosan yüzeyine sıkı bir şekilde bağlandıklarını göstermişlerdir (Şenköylü *et al.*, 2001). Yan ve arkadaşları ise kollajen/kitosan/hiyaluronandan oluşan gözenekli yapıyı dondurarak-kurutma yöntemi ile elde etmişler ve bu yapı üzerinde kondrositlerin üreme ve farklılaşmayı sürdürme kapasitesini incelemişlerdir (Yan *et al.*, 2006). 21 günün sonunda gözenekli iskelenin kıkırdak dokusu ile kaplandığı gözlemlenmiştir.

Bir başka çalışmada, partikül agregasyonu yöntemi kullanılarak % 30 gözenekliliğe ve 100-400 μm gözenek büyüklüğüne sahip kitosan doku iskeleleri elde edilmiştir

(Malafaya *et al.*, 2005). Bu iskeleler, kıkırdak ve osteokondral doku mühendisliği açısından test edilmiştir. Subramanian ve Lin, kitosanın NH_2 gruplarını çapraz bağlayarak daha sert bir yapı elde etmişler ve bu sert yüzeylerin kondrositlerin üremesini arttırdığını belirlemişlerdir (Subramanian and Lin, 2005). Ayrıca, kitosan kaplı yüzeylerde kültüre edilen kondrositlerin *in vivo*'dakine benzer küresel yapılarını korudukları ve canlılıklarını sürdürdükleri rapor edilmiştir (Lahiji *et al.*, 2000).

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

2.4. Kalsiyum Fosfat Tuzları ve Simule Vücut Sıvısı (SBF)

Kemik matrisi, 2.1.2.'de anlatıldığı gibi, mineral (hidroksiapatit kristalleri) ve organik (glikoprotein ve proteoglikanlar) olmak üzere iki kısımdan meydana gelen kompozit bir yapıdır (Salgado *et al.*, 2004). Kemiğin bu kompozit yapısından dolayı, hidroksiapatit (HA), trikalsiyum fosfat ve kalsiyum tuzları gibi inorganik bileşikleri içeren doku iskeleleri osteokondüktiviteyi arttırmak için kullanılmıştır (Sharma and Elisseeff, 2004; Cancedda *et al.*, 2003; Hutmacher *et al.*, 2001; Shikinami and Okuno, 1998). Kemiğin inorganik komponenti ile kalsiyum fosfat molekülleri arasındaki benzerlikler, seramikleri kemik tamiri için önemli adaylar haline getirmektedir (Gazdag *et al.*, 1995; Cornell and Lane, 1992).

Seramik malzemenin biyoaktivitesi, bir yüzey özelliğidir ve malzeme ile yaşayan dokular arasında fibröz enkapsülasyon görülmeksizin bir bağ oluşumunu sağlamaktadır. Bu mekanizmanın en önemli kısmı, *in vivo*'da malzeme yüzeyinde kalsiyum fosfatların mineralize olma yeteniğidir (Lööf *et al.*, 2008). Hench ve arkadaşlarının, 1972'de "Bioglass"ın fibröz doku oluşturmaksızın canlı kemiğe

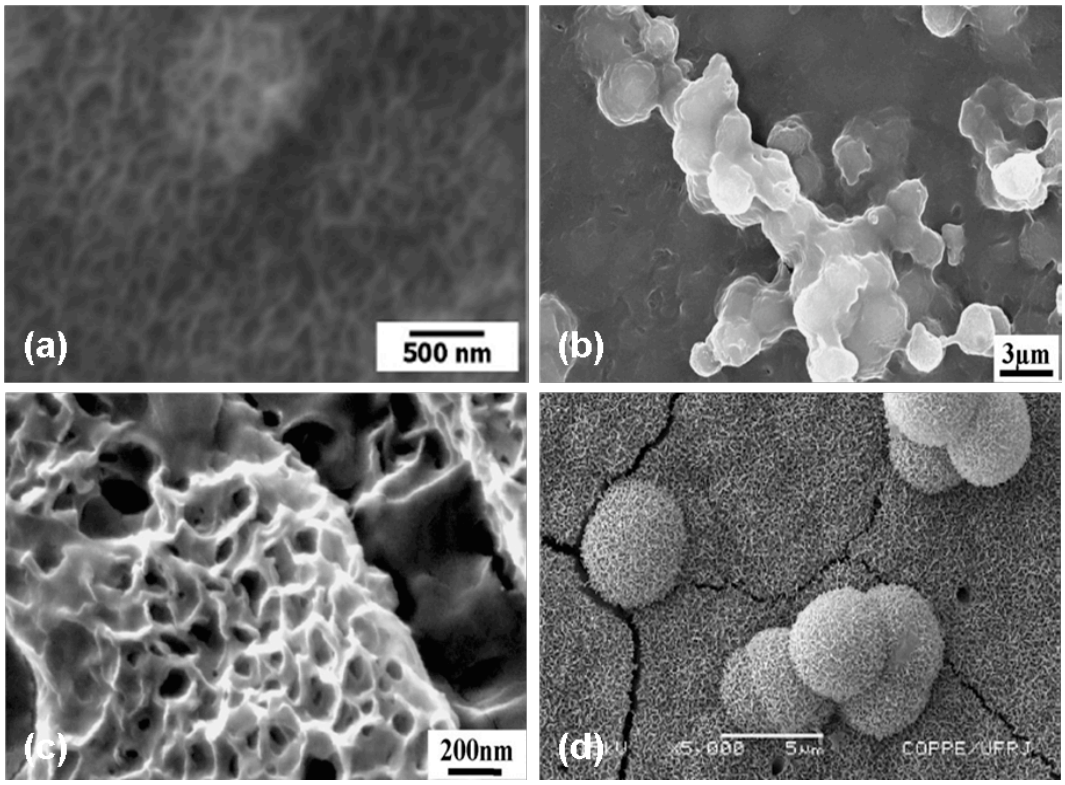
bağlandığını göstermesinden bu yana, vücut içerisinde, birçok seramiğin yüzeyinde kemik-benzeri bir apatit tabakasının oluştuğu ve kemiğe, bu apatit tabakası aracılığıyla bağlandığı ortaya konmuştur (Kokubo *et al.*, 2004). Fakat seramik malzemeler, kırılgan olma (Kong *et al.*, 2006), kendilerini çevreleyen kemik dokusu ile mekanik olarak uyumlu olmama (Kokubo and Takadama, 2006) gibi birçok dezavantaja sahiptir. Petite ve arkadaşları, iyi mekanik özellikleri ve kemik doku mühendisliği açısından oldukça önemli olan açık gözenekliliği (open porosity) sağlamak için doğal mercanı kullanmışlardır (Petite *et al.*, 2000). Xu ve arkadaşları ise CPC (calcium phosphate cement)'nin gücünü arttırmak için, CPC-kitosan-mannitol kompozit doku iskelelerini oluşturmuşlardır (Xu and Simon Jr., 2005).

Doku iskelelerinin kaplanması ya da doku iskelesi içerisinde biyoseramiklerin ikinci bir faz olarak dağıtılması ile elde edilen kompozitler (Wang, 2006), birçok farklı çalışmanın konusunu oluşturmuştur. Doku iskelesi üretiminde gözeneklerin oluşturulması, metallerden ve seramiklerden daha düşük mukavemete sahip olan polimerin dayanımını daha da azaltmaktadır (Wang, 2006; Gibson and Asby, 1997). Polimerlerin kuvvetinin ya da doku iskelesinin biyoaktif özelliğinin arttırılması, yapıya seramiklerin eklenmesi ile mümkün olmaktadır (Wang, 2006). Zhang ve Zhang, bu amaçla, β-trikalsiyum fosfat ve kalsiyum fosfat inert camı ile güçlendirilmiş kitosan doku iskeleleri hazırlamışlardır (Zhang and Zhang, 2001a). Hidrofobik polimer yüzeyleri ile karşılaştırıldığında, seramik partiküllerin yapıya emdirilmesinin, serum proteinlerinin iskele içinde yayılımını arttırdığı bilinmektedir (Hutmacher *et al.*, 1998).

Malzemelerin kemik-bağlanma yeteneği, iyon konsantrasyonu neredeyse insan kan plazmasına eşit olan ve SBF (Simulated Body Fluid) adı verilen bir çözelti sayesinde belirlenmektedir. Bu çözelti içerisinde, malzeme yüzeyinde apatit oluşumu, malzemenin biyoaktivitesinin *in vitro* olarak belirlenmesi açısından oldukça önemlidir (Kokubo and Takadama, 2006; Lööf *et al.*, 2008). Yöntem kısaca, malzemenin belirli sürelerde SBF içerisinde bırakılması, daha sonra farklı yüzey analiz teknikleri ile HA tabakasının varlığının ve bu tabakanın ne kadar süre içerisinde oluştuğunun belirlenmesine dayanmaktadır. Bir malzemenin, hayvan çalışmaları yapılmadan, *in vitro* olarak biyoaktivitesinin belirlenmesi, sadece

zaman kazancı sağlamakla kalmamakta, aynı zamanda gereksiz hayvan deneyi yapılmasından doğacak masrafı da engellemektedir (Lööf *et al.*, 2008).

Gu *et al.*, plazma-spreylenmiş hidroksiapatit (HA)/Ti-6Al-4V kompozit yapısında biyoaktiviteyi değerlendirmek amacıyla, bu malzemeyi 8 haftaya kadar SBF çözeltisi içerisinde tutmuşlardır (Gu *et al.*, 2003). Lee *et al.* ise elektroeğirme ile elde ettikleri nanofibröz biyoaktif camı, santetik bir polimer olan polikaprolakton (PCL) ile birleştirmişler ve bu şekilde elde ettikleri kompozit membranın *in vitro* biyoaktivitesini belirlemek amacıyla yine SBF çözeltisini kullanmışlardır (Lee *et al.*, 2008). Plazma elektrokimyasal bir yöntem olan mikroark oksidizasyonu sonucu elde edilen kaplama (Wei *et al.*, 2008) ve titanyum yüzeyler (Resende *et al.*, 2008) üzerinde görülen apatit yapıları Şekil 2.13.'de gösterilmiştir.

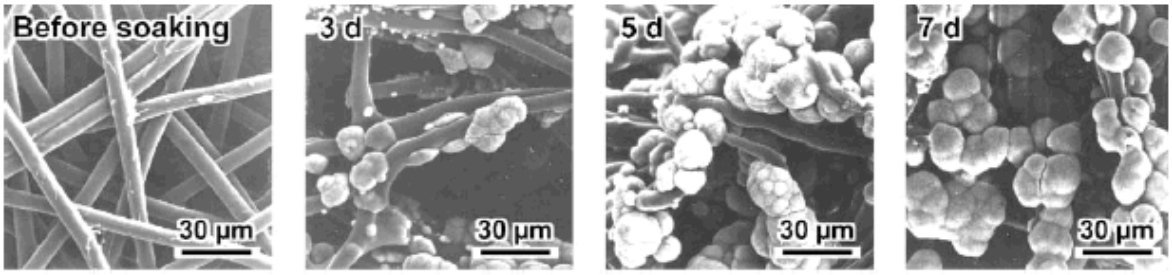


Şekil 2.13. SBF ile muamele edilmiş biyoaktif malzemelerde görülen özel nanokristalin apatit yapısı: (a) PCL-biyoaktif cam kompoziti, (b-c) Mikroark oksidizasyon sonucu elde edilen kaplama (SBF içerisinde 14.gün), (d) Titanyum (SBF içerisinde 14.gün).

SBF çözeltisi, biyoaktivitenin belirlenmesi yanında, özellikle kemik doku mühendisliği alanında, yüzey-aktif doku iskelelerinin hazırlanması amacıyla da kullanılmaktadır (Kong *et al.*, 2006; Barrere *et al.*, 2002a). Bu yöntemin, diğer

apatit-kaplama yöntemleri ile karşılaştırıldığında, kolay ve hızlı olma (Rezwan *et al.*, 2006), özel ekipmanlara ya da yüksek işleme sıcaklıklarına ihtiyaç duymama (Kong at al., 2006) gibi bazı avantajları bulunmaktadır (Clemens *et al.*, 1999). pH ve sıcaklık açısından ılımlı ortam şartları nedeniyle, polimerler gibi sıcaklık-duyarlı ya da gözenekli implantlar gibi kompleks şekilli malzemelerin kaplanması, SBF çözeltisine daldırma ile mümkün olmaktadır (Barrere *et al.*, 2002a).

Kokubo *et al.* (2004), karboksimetillenmiş kitin fabrikleri, $Ca(OH)_2$ ile muamele sonrası SBF çözeltisi içerisinde tutmuşlar ve fiberler üzerinde 3 gün içerisinde apatit tabakanın oluştuğunu gözlemlemişlerdir (Şekil 2.14.). Elde edilen bu apatit-kitin kompozit yapısı, sıvı ortamda kararlı kalmakta, bu da oluşan kompozit malzemenin esnek, biyoaktif bir kemik-tamir malzemesi olarak kullanımını mümkün kılmaktadır.



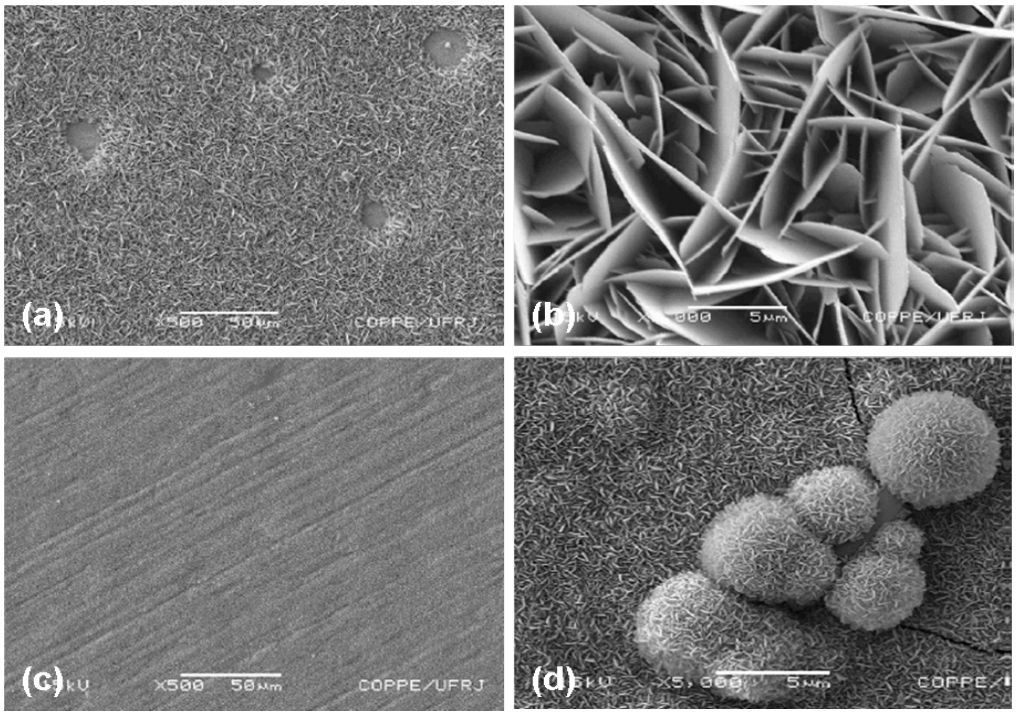
Şekil 2.14. $Ca(OH)_2$ ile muamele sonrası, SBF içerisinde tutulan karboksimetillenmiş kitin fabrikler üzerinde belli süreler sonucunda oluşan hidroksiapatit yapıları.

Jalota *et al.*, herhangi bir muamele görmemiş, NaOH ile muamele görmüş ve SBF ile kaplanmış titanyum köpükler elde etmişler ve bu yapılar içerisinde SBF-kaplı yüzeylerin en yüksek protein üretimi ve hücre bağlanma özelliklerine sahip olduğunu göstermişlerdir (Jalota *et al.*, 2007).

SBF'nin kullanıldığı biyomimetik prosesin en büyük dezavantajı, kaplama için gereken uzun sürelerdir (Resende *et al.*, 2008). Araştırmacılar bu problemi ortadan kaldırmak için sodyum silikat gibi çekirdeklenme ajanları kullanmışlardır (Rigo *et al.*, 2004). Bunun yanında birçok çalışma, 2X'den daha fazla iyon konsantrasyonu kullanılarak kaplama miktarının arttırılabileceğini ve kaplama süresinin kısaltılabileceğini ortaya koymuştur (Kong *et al.*, 2006). Barrere *ve ark*., 5X SBF çözeltisinde, CO_2'yi kullanarak Ti6Al4V yüzeyinde 24 saatten kısa bir

sürede Ca-P kaplaması oluşturmuşlardır (Barrere *et al.*, 2002a, Barrere *et al.*, 2002b). Taş ve Bhaduri ise insan kan plazmasının 10 katı kadar kalsiyum ve fosfat iyon konsantrasyonuna sahip olan bir çözelti (10X SBF) hazırlayarak kaplama oluşum kinetiğini desteklemiş ve aynı zamanda kaplama süresini de azaltmışlardır. Bu yöntem sayesinde, Ti6Al4V yüzeylerinde 2-6 saat içerisinde kemik-benzeri apatitik kalsiyum fosfat oluşumunu sağlamışlardır (Taş and Bhaduri, 2004).

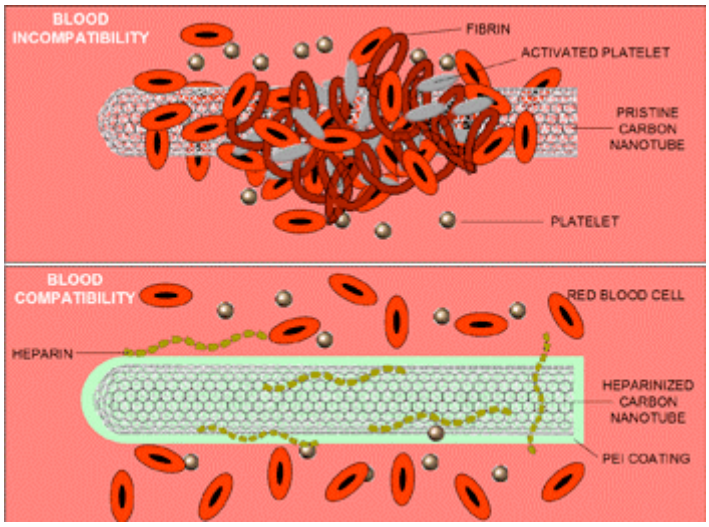
Yeni bir yaklaşım olarak, Resende *et al.*, birikimi arttırmak amacıyla SBE (solution for bioactivity evaluation) adı verilen bir çözelti kullanmışlar, bu sayede çökme reaksiyonu için temel olmayan iyonları elimine etmişlerdir (Resende *et al.*, 2008). Kalsiyum fosfat oluşumu için gerekli elementleri içeren bu çözelti, biyomalzemelerin biyoaktivitesinin değerlendirilmesinde de kullanılabilmektedir. Yüksek iyon aktivitesi, daha fazla negatif serbest Gibbs varyasyon enerjisi gibi termodinamik özelliklerinin yanında, fizyolojik koşullarda SBF'den daha yüksek çekirdeklenme sürücü gücü oluşturması, SBE'nin avantajları arasında yer almaktadır (Bastos *et al.*, 2008; Resende *et al.*, 2008). Şekil 2.15.'te titanyum yüzeylerde SBE ve SBF çözeltileri muamele sonucu oluşan apatit yapıları gösterilmiştir.



Şekil 2.15. Titanyum örnekler üzerinde oluşan hidroksiapatit yapıları: (a) SBE içerisinde 1. gün, (b) SBE içerisinde 21. gün, (c) SBF içerisinde 1.gün (d) SBF içerisinde 21. gün.

2.5. Heparin

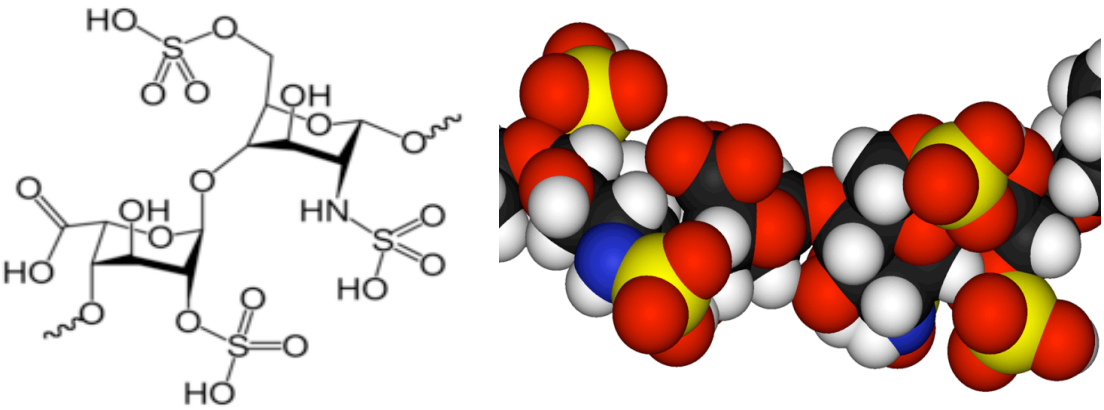
GAG ailesinin bir üyesi olan heparin, özellikle akciğer, karaciğer, deri ve intestinal mukozada mast hücreleri tarafından sentezlenen immün mediatörlerden birisidir (Onat *et al.*, 2002). Serin proteaz inhibitörleri (serpinler) ile aktivasyonu sonucunda antikoagulant olarak davranmaktadır. Protrombinin trombine ve fibrinojenin fibrine dönüşümünü engelleyen heparin, klinik olarak tromboz, flebit ve emboli tedavisi için parenteral olarak uygulanmaktadır. Heparin, yapay yüzeylerde trombus oluşumunu minimize etmek amacıyla klinik olarak kullanılan önemli bir antikoagulanttır (Şekil 2.16.) ve birçok proteinle birleşebilme yeteneğine sahiptir. Fakat bazen istenmeyen akut (hemoraj ve anafilaksi gibi) ve kronik (osteoporozis ve hiperlipidemi gibi) komplikasyonlara neden olabilmektedir (Denizli, 1999).



Şekil 2.16. Heparinle kaplanmış nanotüplerde görülen kan uyumluluğu (http://www.physorg.com/news65974347.html).

Heparan sülfatın yüksek oranda sülfatlanmış biçimi olan bu lineer polisakkarit, β-D-glukuronik asit ya da α-L-iduronik asite 1,4-glikozik bağlarıyla bağlı glikozamin kalıntılarından oluşmaktadır (Şekil 2.17.). Bu karbonhidrat kalıntıları GAG zinciri boyunca heterojen olarak dağılmaktadır (Cindhuchao *et al.*, 2003). GAG ailesinin üyeleri arasında heparan sülfat (HS), kondroitin sülfat (CS), dermatan sülfat (DS), keratan sülfat (KS) ve hiyaluronik asit bulunmaktadır. Heparin ve heparan sülfat, tekrarlanan D-glikozamin ve heksuronik asit (D-glukuronik asit ya da L-iduronik asit) disakkarit ünitelerinden oluşmaktadır.

GAG'lar ekstrasellüler matrisin (ECM) ya da hücre yüzeyinde bulunan proteoglikanların önemli bileşenleridir. Heparin/HS, fibroblast büyüme faktörleri (FGF), hepatosit büyüme faktörü (HGF), granülosit-makrofaj koloni stimüle edici faktör (GM-CSF) ve interlökin-3 gibi birçok büyüme faktörü ve sitokine bağlanmaktadır. Sonuçta oluşan kompleks, bu büyüme faktörleri ve sitokinlerin çoğunlukla hücre yüzeyindeki yüksek afiniteli reseptörlerle etkileşerek biyolojik aktivitelerini göstermelerine izin vermektedir (Mori *et al.*, 2005). FGF-2, çekirdek proteinlerine (core proteins) kovalent olarak bağlanarak HS proteoglikanları oluşturan heparin/heparan sülfat gibi glikozaminoglikanlara oldukça yüksek bağlanma afinitesi göstermektedir (Nikitovic *et al.*, 2008). Membran HSproteoglikanlarının uzaklaştırılması, bu büyüme faktörüne verilen cevabı bozmaktadır. Kondroitin sülfat içeren proteoglikanların (CSPGs), FGF-2 sinyalinde görev aldığına dair birçok kanıt bulunmaktadır (Bao *et al.*, 2004; Molteni *et al.*, 1999; Smith *et al.*, 2007). CSPG'ler, FGF-2'nin FGFR'lere (fibroblast growth factor family receptors) düşük afiniteli bağlanma bölgeleri yoluyla ya da HS (heparan sülfat) zincirleri aracılığı ile bağlanmasını ayarlamaktadır (Smith *et al.*, 2007; Deepa *et al.*, 2004).



Şekil 2.17. Heparinin 2 ve 3 boyutlu yapıları.

Fibroblastlarda mitogenezisi stimüle eden bFGF (bazik fibroblastik büyüme faktörü), heparine bağlanmakta ve bunun sonucunda da fibroblastik üreme ortaya çıkmaktadır. Bazik fibroblast büyüme faktörünün bağlanması ve mitojenik aktivitesi, ikili bir reseptör sistemi ile gerçekleşmektedir (Klagsburn, 1991). Sinyal-çevirici kısım, tirozin kinaz fibroblast büyüme faktörü reseptörlerinin bir ailesinden

oluşmaktadır (Day and Forbes, 1999). bFGF'in bağlanması için gerekli olan diğer element ise sindekan-1 olduğuna inanılan hücre-yüzey heparan sülfat proteoglikanıdır (Bernfield *et al.*, 1992). Klagsbrun ve Baird (1991), heparan sülfat proteoglikanların bFGF'in konformasyonunu değiştirdiğini ya da reseptörün yapısını değiştirerek reseptör-büyüme faktörü bağlanmasını sağladığını öne sürmüşlerdir. Hücreler, yüksek afiniteli reseptör bölgeleri eksprese etseler dahi heparan sülfat proteoglikanlarını eksprese etmedikleri sürece bFGF'i bağlayamazlar (Yayon *et al.*, 1991).

Heparin bazlı polimerik büyüme faktörü dağıtıcı sistemleri doğal ECM'ye benzer şekilde büyüme faktörlerini depolayabilmektedir. Bu *in vivo* depolama mekanizmasına dayalı heparin-sefaroz konjugatları (Edelman *et al.*, 1992), heparin taşıyan polistiren-bağlı kollajen substratlar (Ishihara *et al.*, 2001), heparin içeren aljinat jelleri (Tabata ve Ikada, 1999) kullanılmıştır. Heparin, insan mezenkimal kök hücrelerinin yapışmasında (fibronektin, vitronektin gibi), üremesinde (bFGF gibi) ve osteojenik farklılaşmada (kemik morfojenik proteinleri gibi) görevli birçok protein ile etkileşime girme kabiliyetindedir (Canalis, 2000; Kreke *et al.*, 2005). Benoit ve Anseth, heparin fonksiyonalitesine sahip hidrojellerin insan mezenkimal kök hücrelerinin (hMSCs) canlılığını ve osteojenik farklılaşmasını arttırdığını göstermişlerdir (2005). Sığır aort düz kas hücrelerinin ise olgun osteoblastlara dönüşümünün ve mineralizasyonun heparin tarafından inhibe edildiği bildirilmiştir (Yang *et al.*, 2005). Kemiklerde travma sonrası onarım sırasında travmaya vücudun yanıtı olarak salınan faktörler ile dış faktörler, onarım bölgesinde önemli olmaktadır. Biyokimyasal açıdan önem taşıyan dış faktörler arasında ise trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), mezenkimal hücrelerin kondrositlere dönüşümünü hızlandıran ve son yıllarda bulunmuş bir faktör ile heparin yer almaktadır. Bu faktörler, hasar bölgesindeki hücrelerde bulunan özel reseptörlerle etkileşime girerek osteojenik ve farklılaşmamış mezenkimal hücreleri etkilemektedir (Onat *et al.*, 2002).

Glikozaminoglikanlar, düz kas hücrelerinin üremesini inhibe eden ECM polisakkaritleridir. Zhu ve arkadaşları heparinin de bir GAG olması gerçeğinden yola çıkarak PLA/Kitosan/Heparin yüzeylerinin hiperplazya sorununu çözebileceğini düşünmüşlerdir (2002). Ancak Underwood ve arkadaşları, heparinin

FBS varlığında düz kas hücrelerinin üremesini inhibe ederken insan serumu içerisinde bu etkilerini yitirdiğini ortaya koymuşlardır (Underwood, 1998). Cindhuchao ve arkadaşları ise, BPASMC (bovine pulmonary artery smooth muscle cells), HPASMC (human pulmonary artery smooth muscle cells) ve BAOSMC (bovine aortic smooth muscle cells) kullanarak yaptıkları çalışmada bu durumun tam tersi bir sonuç elde etmişlerdir (2003). Garg ve arkadaşları glikozaminoglikanlardaki konformasyonel değişimlerin heparinin antiproliferatif etkisini değiştirdiğini ortaya koymuşlardır (2006).

Heparin, kitosanın bir analoğudur. Biyoyapay karaciğer çalışmalarında ECM bileşenleri yanında uygun karaciğer mimarisinin geliştirilmesi de oldukça önemlidir. Bu amaçla Wang ve arkadaşları PLGA filmlerini kitosan ve heparin ile modifiye etmişlerdir. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında kitosan ve kitosan/heparin modifiye filmlerin çok iyi antikoagulant özellik gösterdikleri belirlenmiştir. Ayrıca hepatosit yapışma ve çoğalması da modifiye PLGA (poly(lactic acid-co-glycolic acid) filmlerinin kullanımıyla artmıştır (Wang *et al.*, 2003c). Benzer şekilde Zhu ve arkadaşları PLA (poly-L-lactic acid) yüzeyine kitosan ve kitosan/heparin immobilize ederek bu yüzeylerde fibroblast yapışmasının arttığını gözlemlemişlerdir (2002).

Heparin immobilizasyonunun endotelyal hücre üremesi üzerindeki etkisine yönelik yapılan çalışmalar birbiri ile tutarlı değildir. Literatürde heparinin endotelyal hücre üremesini hem inhibe ettiği (Nojiri *et al.*, 1987) hem de arttırdığını (Bos *et al.*, 1999) öne süren çalışmalar vardır. Anjiyogeneziste, hücrelerin integrinler yardımıyla fibronektinin hücre-bağlanma bölgesi ile etkileşime girmesi oldukça önemlidir. Her ne kadar fibronektinin hücre-bağlanma bölgesi ile integrin arasındaki ilişkinin anjiyogenezisi düzenlediği gösterilmiş olsa da (Kim *et al.*, 2000b), fibronektinin diğer bölgelerinin anjiyogenezisteki biyolojik rolü henüz açık değildir. Heparin-bağlanma bölgesi, hücre yüzey heparan sülfat proteoglikanları ile etkileşime girerek hücre yapışması ve yayılmasını etkilemesi nedeniyle oldukça ilgi çekici bir yapısal bağlanma bölgesi haline gelmiştir. Bu amaçla Viji *et al.* (2008), insan göbek kordonu endotel hücrelerini kullanarak fibronektinin heparin-bağlama bölgesinin anjiyogenezisteki rolünü belirlemeye çalışmışlardır. Yaptıkları çalışma sonucunda, endotelyal hücrelerin, fibronektinin heparin-bağlama bölgesine bağlanmasının heparin tarafından inhibe edildiğini ortaya koymuşlardır. Heparinin

inhibitör etkisi, heparin-bağlanma bölgesi ile kaplı yüzeylerde (% 65), fibronektin kaplı yüzeylere (% 25) göre çok daha belirgin bir şekilde kendisini göstermiştir. Bunun nedeni ise hücrelerin heparin-bağlanma bölgesi ile etkileşiminin hücre yüzeyindeki heparin-benzeri moleküllerden kaynaklanabileceği gerçeğidir.

Grubumuz tarafından L929 fare fibroblastları ile yapılan çalışmalarda, heparin-immobilize NWPF (non-woven polyester fabric) yapıların, düşük serum içeren ortamlarda, fibroblast mitozunu uyaran molekülleri (bFGF gibi) kendisine bağlayarak kültürün geç döneminde hücre üremesini arttırdığı ortaya konulmuştur (Türkoğlu Şaşmazel *et al.*, 2007)

Afinite membran kromotografisi tekniğinde de heparinin fibronektini bağlama özelliğinden yararlanılmış, jelatin immobilize makrogözenekli cam afinite membranları içeren bir kartuş ile heparin immobilize membranları içeren ikinci bir kartuşun ardı ardına kullanılmasıyla 1 ml insan kan plazmasından 0.18 mg fibronektinin ayrılması mümkün olmuştur (Guo and Ruckenstein, 2003). Benzer şekilde, güçlü bir anti-tümörojenik sitokin olan TNF-alfanın saflaştırılması amacıyla heparin-sefaroz affinite kromatografisinden yararlanılmıştır (Kenig *et al.*, 2008). Trimerik TNF-alfa proteinin N-ucunda bulunan VRSSSR amino asit sekansı, TNF-alfanın immobilize heparine bağlanmasından sorumludur. Söz konusu çalışmada, TNF-alfa ve bu yapının analogları heparin-sefaroza bağlanırken, N-ucunda VRSSSR sekansını içermeyen formların bağlanma göstermediği ortaya konmuştur.

Walter *et al.* (2008) ise sert doku onarımında kullanılan bir TiO_2/cam kompoziti olan Ecopore'u BMP-2 (bone morphogenic protein-2) ile modifiye etmek amacıyla heparinize kollajen yapıları kullanmıştır. Kollajen, yapıyı biyouyumlu hale getirmek, heparin ise heparin-bağlanma bölgesi üzerinden BMP-2'nin bağlanmasını sağlamak amacıyla kullanılmıştır. Çalışmada, bağlanan BMP-2 miktarının heparinize kollajen yapılarda, yalnızca kollajen içeren yapılardan çok daha yüksek olduğu ve BMP-2 salımının heparin modifikasyonu ile yavaşladığı gözlemlenmiştir (96 saat sonunda faktörün % 10'u salınmıştır).

İnsan ve hayvanlarla gerçekleştirilen yanık çalışmalarında, glikozaminoglikanların birçok terapötik etkisi olduğu ortaya konulmuştur. Heparin, yanık kaynaklı enflamasyonun, acının ve basmakla solan eritemlerin (blanched erythema) inhibe

edilmesinde önemlidir. Heparinle tedavi edilen yanıklarda, kan akışı daha kısa bir sürede restore edilmekte ve iskemik doku revaskülarize olmaktadır. Heparin ayrıca, kollajenaz ile kompleks oluşturarak yara bölgesinde kollajenin yeniden oluşturulmasını etkilemektedir (Jin *et al.*, 2007). Jin *et al.,* (2007), *in vivo*'da heparin ve kitosanın yanık üzerine etkilerini incelemişlerdir. Yaptıkları çalışmada, heparinin ve heparin-kitosan karışımının enflamatuar reaksiyonu inhibe ettiği gözlemlenmiştir. Fakat kitosandan farklı olarak heparinin, yanık yaralanmasının başlangıçtaki yayılmasını arttırdığı gözlemlenmiştir.

Literatürde, heparinin hücre yapışmasındaki rolü ile ilgili bilgiler de birbiriyle çelişki içerisindedir. Protein içermeyen (protein-free) hücre kültür ortamlarında, hücre yapışması, RGD (Arg-His-Asp) peptidlerinin, heparinin ya da polilizinin eklenmesi ile ayarlanabilmektedir (Spier, 2000). Bunun yanında, literatürde, hücre ayırmada (cell detachment) kullanılan enzimatik-olmayan yöntemler arasında heparin kullanımı da yer almaktadır. San Antonio *et al.*, heparinin Balb/c-3T3 fare fibroblastlarının kollajen substratlara yapışmasını ve büyümesini engellediğini göstermişlerdir (Koda *et al.*, 1985). Bu olay, heparin-kollajen arasındaki ilişkinin hücre-kollajen bağlanmasına engel olmasıyla açıklanmaktadır. Fakat, heparin yalnızca Balb/c-3T3 fare fibroblastlarının kollajen I ve V'e yapışmasını engellemekte; tip III kollajende aynı etkiyi göstermemektedir. Bu inhibisyon mekanizmasının altında heparan sülfat proteoglikanın ektodomainin doğal tip I kollajene bağlanması yatmaktadır. Bu mekanizmada, heparin de heparan sülfat gibi etki göstermektedir (Koda *et al.*, 1985). Bunun yanında, hücreler uzun süre heparin içerisinde bırakıldığında, heparinin ECM ile olan ilişkisi sonucu hücre üremesi azalmakta; hatta inhibe edilmektedir (San Antonio *et al.*, 1992). Yapılan çalışmalar, CHO (Chinese Hamster Ovary) hücrelerinin yapışmasında da heparinin inhibe edici bir rolü olduğunu ortaya koymuştur (LeBaron *et al.*, 1989). Ancak hücrelerin heparin ile yüzeyden kaldırılması, hücre tipine bağlı olmakta; rekombinant CHO bu mümkün iken MDCK ve Vero gibi hücre hatlarında heparin ile yüzeyden kaldırılamamaktadır (Merten *et al.*, 1997).

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Sunulan çalışmada, kitosan bazlı gözenekli doku iskeleleri hazırlanmış ve bu yapılar üzerinde pre-osteoblast MC3T3-E1 ile kondrojenik ATDC5 hücre hatlarının üreme davranışları ve aktiviteleri incelenmiştir. Bu bölümde, tez kapsamında gerçekleştirilen deneysel çalışmalar ve kullanılan yöntemler açıklanmıştır. Öncelikle, kitosan doku iskelelerinin hazırlanması, SBF ile kaplanması, heparin ile fonksiyonel hale getirilmesi ve karakterizasyonuna yönelik çalışmalar sunulmuştur. Sonraki bölümde ise bu iskeleler üzerinde MC3T3-E1 ve ATDC5 hücre hatları ile gerçekleştirilen kültür çalışmaları hakkında bilgi verilmiştir.

3.1. Kitosan Doku İskelelerinin Hazırlanması ve Modifikasyonu

3.1.1. Gözenekli kitosan doku iskelelerinin hazırlanması

Gözenekli kitosan doku iskeleleri, dondurarak-kurutma (freeze-drying) yöntemi ile hazırlanmıştır. Deasetilasyon derecesi (DD) >% 85 olan kitosanın (Sigma-Aldrich, ABD), 0.2 M asetik asit içerisinde çözülmesiyle % 2 ağırlık/hacim (w/v) konsantrasyonuna sahip polimer çözeltileri elde edilmiştir. Çözeltiler, safsızlıkların giderilmesi için filtreden geçirilmiş ve 1.5 cm çapına sahip 24 gözlü polistiren kültür kaplarına (Nunc, Danimarka) dökülerek -20˚C'de dondurulmuştur. Bu şekilde hazırlanan örnekler dondurarak-kurutma cihazına (Christ, Almanya) transfer edilerek -80˚C'de tamamiyle kuruyuncaya kadar (yaklaşık 4 gün) liyofilize edilmiştir. Böylece gözenekli ve içsel bağlantıları olan doku iskeleleri elde edilmiştir. Liyofilize doku iskelelerinin kararlı hale gelmesi için etanol ile rehidratasyonu sağlanmıştır. Bu amaçla doku iskeleleri % 96'lık (v/v) etanol içerisinde 24 saat, % 70'lik (v/v) etanol içerisinde ise 1 saat bekletilmiştir. Stabilizasyon işleminden sonra iskeleler tekrar dondurarak-kurutma cihazına alınarak kurumaya bırakılmıştır.

3.1.2. Kitosan doku iskelelerinin biyomimetik apatit ile kaplanması

3.1.2.1. SBF stok çözeltisinin hazırlanması

Bu çalışmada, insan plazmasının 10 katı kadar kalsiyum ve fosfat iyon konsantrasyonuna sahip 10X SBF-benzeri çözelti, kitosan doku iskeleleri üzerinde biyomimetik apatit kaplamanın oluşturulması için kullanılmıştır. Çizelge 3.1.'de kullanılan SBF-benzeri çözelti reçetesi verilmiştir. Çözelti, 1'den 5'e kadar olan

kimyasalların oda sıcaklığında sırayla 900 ml ultra-saf deiyonize suya eklenmesi ve çözeltinin manyetik karıştırıcı üzerinde sürekli karıştırılmasıyla hazırlanmıştır. İlk 4 kimyasal eklendikten sonra pH ~5.85 olarak ölçülmüştür. $NaH_2PO_4.H_2O$ eklenmesinden sonra ise değer, ~4.17'ye düşmüştür. Her bir basamakta, eklenen kimyasalın tamamen çözüldüğünden emin olunduktan sonra bir sonraki kimyasala geçilmiştir.

Çizelge 3.1. SBF reçeteleri: Taş ve Bhaduri tarafından kullanılan (üstte), bu çalışmada kullanılan (altta) (Maviş *et al.*, 2007).

Kimyasallar	Konsantrasyon (g/2L)
NaCl	116.8860
KCl	0.7456
$CaCl_2.2H_2O$	7.3508
$MgCl_2.6H_2O$	2.0330
NaH_2PO_4	2.3996

Kimyasallar	Konsantrasyon (g/2L)
NaCl	116.8860
KCl	0.7456
$CaCl_2.2H_2O$	7.3508
$MgCl_2.6H_2O$	2.0330
$NaH_2PO_4.H_2O$	0.500

Bu şekilde hazırlanan stok çözeltileri, oda sıcaklığında, kapaklı bir cam balon joje içerisinde kullanılıncaya kadar saklanmıştır.

3.1.2.2. Kitosan doku iskelelerinin kaplanması

Kaplamadan önce, 10 mm çapında ve 2 mm kalınlığındaki kitosan doku iskeleleri bir cam beher içerisine alınmış ve stok SBF çözeltisi kullanılarak vakum etüvü içerisinde çöktürülmüştür. 200 ml stok SBF çözeltisi içerisine 0.168 g $NaHCO_3$ (10 mM'ye eşdeğer) eklenmiş ve çözünmesi sağlandıktan sonra bu çözeltiden her bir behere 80 ml alınmıştır. İskeleler bu çözelti içerisine daldırılmış ve oda sıcaklığında değişen sürelerde (6 sa veya 24 sa) inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süreleri sonunda iskeleler ultra saf su ile iyice yıkanarak tüm tuz

kalıntılarının uzaklaştırılması sağlanmıştır. Elde edilen biyomimetik apatit kaplı yapılar dondurarak-kurutma cihazına alınarak -80˚C'de tamamiyle kuruyuncaya kadar bekletilmiştir.

3.1.3. Kitosan doku iskelelerinin heparin ile modifiye edilmesi

Hazırlanan kitosan doku iskelelerine heparin immobilizasyonu amino grupları üzerinden gerçekleştirilmiştir. Bunun için stabilizasyonu yapılmış kitosan doku iskeleleri heparin (202 USP ünite/mg; Sigma, ABD), EDAC (1-ethyl-3-(3-dimethylamino-propyl carbodiimide) (Sigma, ABD), NHS (n-hydroxysuccinimide) (Fluka, ABD), MES (2-[N-morpholino] ethanesulfonic acid) (Sigma, ABD) solüsyonu (50 ml MES tamponu içerisinde % 0.5 (w/v) heparin, 0.40 g EDAC ve 0.097 g NHS'in çözünmesi ile hazırlanan) içerisinde +4°C'de, 1 gece inkübasyona bırakılmıştır. Reaksiyon tamamlandığında kitosan iskeleler ultra saf suyla 4-5 kez yıkanmış ve daha sonra dondurarak kurutulmuştur.

Kitosan iskeleler için en uygun heparin bağlama yönteminin belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmalarda ise aynı miktarlarda NHS, EDAC ve heparin içeren sodyum sitrat tamponu (0.2325 g sitrik asit.H_2O ve 0.4075 g sodyum sitratın 250 ml saf suda çözülmesiyle hazırlanmıştır.) içerisinde, aynı koşullarda (+4°C'de, 1 gece) immobilizasyon gerçekleştirilmiştir. Söz konusu çalışmada, farklı tampon çözeltilerinin bağlanma üzerindeki etkisinin yanında farklı yöntemlerle stabilize edilmiş kitosan iskelelerin etkisi de incelenmiştir. Bu amaçla, liyofilize edilmiş doku iskeleleri 0.4 M NaOH çözeltisi içerisinde (% 50 etanol+% 50 su) 24 saat inkübe edilmiş ve daha sonra saf su ile 4-5 defa yıkama yapılmıştır. Elde edilen iskeleler, etanolle stabilize edilmiş örnekler için kullanılan yönteme göre heparinle modifiye edilmiştir.

Elektrostatik etkileşimle heparin bağlanması ise, stabilize edilmiş kitosan örneklerin % 0.5 (w/v) heparin içeren PBS içerisinde +4°C'de, 1 gece inkübasyonu ile elde edilmiştir. Reaksiyon tamamlandığında doku iskeleleri ultra saf suyla 4-5 defa yıkanmış ve daha sonra dondurarak kurutulmuştur.

3.2. Karakterizasyon Çalışmaları

3.2.1. Taramalı elektron mikroskop (SEM) ile analiz

Boş (modifiye edilmemiş) ve biyomimetik apatit kaplı kitosan doku iskelelerinin yüzey ve kesit morfolojileri, altınla kaplandıktan sonra taramalı elektron mikroskobu (Zeiss Evo 50, Almanya) ile incelenmiştir.

3.2.2. Doku iskelesi gözenekliliğinin belirlenmesi

Doku iskelelerinin gözenekliliği, sıvı değişimi (liquid displacement) yöntemi ile belirlenmiştir (Zhang and Zhang, 2001b). Değişim sıvısı olarak, iskele şişmesine ya da büzülmesine neden olmayan n-hekzan kullanılmıştır. Doku iskelesi, 5 dakika bilinen hacimdeki n-hekzan içerisine daldırılmış ve hekzan emdirilmiş iskelenin hacmi V_2 olarak kaydedildikten sonra iskele içerisine girmeyen (kalan) hekzan hacmi V_3 olarak kaydedilmiştir. Malzemenin toplam hacmi (V) 3.1. numaralı denklikte verilmiştir:

$$V = (V_2-V_1) + (V_1-V_3) = V_2-V_3 \qquad (3.1.)$$

Denklikte V_2-V_1, polimer yapının hacmini, V_1-V_3 ise doku iskelesi içerisindeki hekzan hacmini vermektedir. Yapının gözenekliliği (ε), 3.2. numaralı denklik kullanılarak hesaplanmıştır:

$$\varepsilon\ (\%) = (V_1-V_3) / (V_2-V_3) \times 100 \qquad (3.2.)$$

3.2.3. XRD analizi

Apatit tabakasındaki bileşenleri belirlemek için örnekler Cu Kα radyasyonlu bir X-ray difraktometresi (Rigaku D-Max B) kullanılarak incelenmiştir. 2θ: 20°-80° arasında ölçüm alınmış ve analiz koşulları 0.05 adım, 1.5 dwell olarak belirlenmiştir.

3.2.4. İnvert mikroskop ile oluşan biyomimetik apatit yapılarının incelenmesi

Gözenekli kitosan doku iskelelerinin kaplanmasında kullanılan SBF çözeltisinin 10 ml'si doku iskelesi içermeyen bir beher içerisine alınarak çökmeye bırakılmıştır. 24 saat sonunda süpernatant atılmış ve behere bir miktar (1-2 ml) etanol eklenmiştir.

Beherin dibinde oluşan tabaka bir kazıyıcı yardımıyla kazınmış ve polipropilen bir tüp içerisine alınmıştır. Sanrifüj ile apatit tabakası çöktürülmüş ve bu çökeltiden yayma preparatlar hazırlanarak invert mikroskop (Olympus IX71) altında incelenmiştir.

3.2.5. Elementel analiz

Yapıya katılan heparinin gösterilmesi amacıyla boş (modifiye edilmemiş) ve heparin ile fonksiyonel hale getirilmiş kitosan doku iskelelerinin elementel analizi TÜBİTAK ATAL (Ankara Test ve Analiz Laboratuvarı)'da gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla doku iskeleleri bistüri yardımıyla mümkün olduğunca küçük parçalara ayrılmış ve CHNS element analizleri Elementar Analysensysteme GmbH varioMICRO CHNS cihazı ile yapılmıştır.

3.2.6. Toluidine mavisi testi

Kitosan doku iskelelerinin yapısına katılan heparinin nicel ve nitel olarak belirlenmesi amacıyla Toluidine mavisi testi gerçekleştirilmiştir (Kang *et al.*, 1996). 25 mg Toluidine mavisi (Sigma, Almanya) % 0.2 NaCl (w/v) içeren 0.01 N HCl içerisinde çözülmüş ve bu şekilde çalışmada kullanılacak olan toluidine mavisi çözeltisi hazırlanmıştır. Kalibrasyon grafiğinin çıkarılması amacıyla, bilinen miktarlarda heparin içeren sulu çözelti (2 ml), bu çözeltiye eklenmiş ve vortekslenmiştir. 3 ml n-hekzan eklenmesinden sonra karışım iyi bir şekilde karıştırılarak toluidine mavisi-heparin kompleksinin organik tabakaya geçmesi sağlanmıştır. Sulu fazda kalan toluidine mavisi miktarı, Labomed Inc. UV-VIS Double Beam cihazı ile 631 nm'de absorbans ölçümü yapılarak belirlenmiştir. Bu şekilde elde edilen absorbans-heparin miktarı grafiği (Ek-1) daha sonraki çalışmalarda kalibrasyon grafiği olarak kullanılmıştır. Doku iskelelerine bağlı heparin miktarının belirlenmesi için 3 ml Toluidine mavisi çözeltisi 2 ml su ile karıştırılmış ve heparin içeren kitosan doku iskeleleri bu çözelti içerisinde yarım saat bekletilmiştir. Çözeltinin üzerine 3 ml n-hekzan eklendikten sonra karışım vortekslenmiştir. Daha sonra sulu fazda kalan Toluidine mavisi miktarı 631 nm'de absorbans ölçümü yapılarak belirlenmiştir.

3.2.7. *In vitro* salım çalışmaları

Heparinin salım çalışmaları, 1 ml fosfat tampon çözeltisi (pH 7.4) içeren polipropilen tüpler içerisinde, 37°C'de 20 rpm'de gerçekleştirilmiştir. Salım ortamı her gün değiştirilmiş ve iskeleler üzerinde kalan heparin miktarı Toluidine mavisi testi ile belirlenmiştir.

3.2.8. Mekanik test

2 mm kalınlığındaki kitosan iskeleler mekanik test incelemesinden önce PBS içerisinde denge şişme değerine ulaşana kadar şişirilmiştir. 500 N yüke sahip bir başlık (Lloyd Ins., İngiltere) malzeme üzerine 10 mm/dk'lık sabit bir hızda basılmıştır. Testin sonunda malzemelerin sıkıştırma modülleri hesaplanmıştır.

3.3. Hücre Kültürü Çalışmaları

3.3.1. MC3T3-E1 hücre karakterizasyon çalışmaları

Üreme grafiği çalışmasında kullanılan MC3T3-E1 hücreleri, RIKEN Hücre Bankası (Saitama, Japan)'ndan elde edilmiştir. Hücrelerin subkültür işlemleri, % 10 FBS (fetal bovine serum; Hyclone, ABD) ile zenginleştirilmiş α-modifiye MEM Eagle (Minimum Essential Medium Eagle Alpha Modification; HyClone, ABD) ortamı içeren flasklarda (Orange Scientific, Belçika), 37˚C'lik inkubatörde (% 5 CO_2, % 95 nemlilik; Hereaus, Almanya) gerçekleştirilmiştir.

Hücre üreme grafiği çalışmaları için çok gözlü polistiren kültür kapları (Nunc, Danimarka) ve Petri kapları (TPP, İsviçre) kullanılmıştır. Hücreler, tripsinle (% 0.05; Hyclone, ABD) muamele edilerek aktif olarak üredikleri flask yüzeylerinden kaldırılmış ve çok gözlü kültür kapları ile Petri kaplarına ekilmiştir. Sayım testleri 6 gözlü, MTT testleri ise 24 gözlü kültür kaplarında gerçekleştirilmiştir. Hücrelerin yapışma, yayılma ve üreme karakteristikleri, 5 cm'lik Petri kaplarında, invert mikroskop (Olympus, ABD) kullanılarak gözlemlenmiştir. Ayrıca 3.5 cm'lik Petri kapları kullanılarak hücrelerin floresan boyama çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Tüm örnekler için, ortam, her üç günde bir veya pH'ın düşmesi durumunda gerekli görüldüğü takdirde yarı yarıya taze besi ortamıyla değiştirilmiştir.

3.3.1.1. MTT analizi

MTT (3-(4,5-dimethylthiazoyl-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) çalışmaları için, 24 gözlü kültür kaplarının her bir gözüne 1 ml, $3x10^4$ hücre/ml konsantrasyonunda hücre ekimi yapılmıştır. Kültürün farklı zamanlarında (2, 4, 7, 13, 21, 33 ve 37. günlerinde) hücrelerin üzerindeki kültür ortamı uzaklaştırılmış, 24 gözlü kabın her bir gözüne 60 µl MTT (2.5 mg/ml, PBS içerisinde) ve 600 µl taze ortam eklenmiştir. Örnekler, 37°C'de 3 saat bekletildikten sonra, ortam uzaklaştırılmış ve her göze 400 µl 0.04 M HCl içeren izopropanol çözeltisi eklenerek oluşan mor formazan kristallerinin çözünmesi sağlanmıştır. Elde edilen çözelti 96-gözlü ELISA pleytine aktarılmış (200 µl/göz) ve pleyt okuyucu kullanılarak (ASYS Hitech UVM 340 Plate Reader, Avusturya) 690 nm referans olmak üzere 570 nm'de absorbans ölçümü yapılmıştır.

3.3.1.2. Hücre sayımı

Hücre sayım testleri 6 gözlü polistiren kültür kaplarında (Nunc, Danimarka) gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma için, 6 gözlü kültür kabının her bir gözüne 3.10^4 hücre/ml konsantrasyonunda hücre ekimi yapılmıştır. Kültürün farklı zamanlarında (2, 4, 7, 13, 21, 33 ve 37. günlerinde) hücrelerin üzerindeki kültür ortamı uzaklaştırılmış ve hücreler tripsinize edilmiştir. Hücreler tamamen kalktıktan sonra, elde edilen hücre süspansiyonu tripan mavisi ile boyanmış, Neubauer lamı kullanılarak canlı hücrelerin sayımı yapılmıştır. Hemositometre ile sayıma ilişkin daha fazla bilgi Ek-2'de verilmiştir.

3.3.1.3. Floresan mikroskobu ile analiz

3.5 cm'lik Petri kaplarındaki hücre iskeleti organizasyonu kültürün 7. ve 9. günlerinde değerlendirilmiştir. Hücreler 2 kez PBS ile yıkandıktan sonra PBS (pH 7.4) içerisinde hazırlanmış % 2.5 (v/v) glutaraldehit çözeltisi ile 10 dakika muamele edilmiştir. Bu şekilde gerçekleştirilen fiksasyon işleminden sonra, % 0.1 Triton X-100 (PBS içerisinde) ile 5 dakika boyunca muamele edilerek hücre membran geçirgenliği arttırılmıştır. Hücrelerin flamentöz aktinleri (F-aktin), BSA/PBS çözeltisi içerisinde hazırlanmış % 2.5'lik (v/v) Alexa Fluor 488 phalloidin ile 20 dakika, hücre çekirdeği ise 10 µg/mL propidyum iyodür (Sigma, ABD) ile 5 dakika muamele

edilerek boyanmıştır. Örnekler floresan mikroskobu (Olympus, ABD) kullanılarak görüntülenmiştir.

Hücre morfolojilerinin belirlenmesi için kültürün 4. ve 13. günlerinde hücreler FDA (floresan diasetat; Sigma, ABD) ile boyanmıştır. Kültür ortamı uzaklaştırılarak hücreler 2 kez PBS ile yıkanmış ve FDA (5µg/ml, PBS içerisinde) ile 30 dakika inkübe edilmiştir. 2 kez PBS ile yıkamadan sonra floresan mikroskobu (Olympus, ABD) kullanılarak hücrelerin gözlemleri yapılmıştır.

3.3.1.4. Kristal viyole ile boyama

5 cm'lik Petri kaplarındaki hücrelerin üzerindeki kültür ortamı uzaklaştırılmış ve hücreler 2 defa PBS ile yıkanmıştır. 1 kısım PBS, 1.5 kısım metanol karışımı ile hücrelerin yıkama ve ön fiksasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Fiksasyon için hücreler 10 dakika metanolle muamele edildikten sonra yüzeyi kaplayacak kadar kristal viyole boyası eklenerek 5 dakika bekletilmiştir. Akan suyun altında boya kalıntıları tamamen uzaklaşıncaya kadar yıkama yapılmış ve hücreler invert mikroskop altında incelenmiştir.

3.3.2. Pre-osteoblast MC3T3-E1 hücreleri ve kitosan doku iskeleleri ile yapılan çalışmalar

SBF ile muamele edilmiş, biyomimetik apatit kaplı kitosan iskeleler ile heparin fonksiyonalitesine sahip doku iskelelerinin kemik hücrelerinin üreme davranışları, morfolojileri ve aktiviteleri üzerindeki etkilerinin incelenmesi amacıyla MC3T3-E1 hücre hattı kullanılarak hücre kültür çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Yenidoğan fare kafatası çatısı (calvaria) kökenli olan MC3T3-E1 hücreleri RIKEN Hücre Bankası (Saitama, Japan)'ndan elde edilmiştir. Hücrelerin subkültürü flasklarda, bölüm 3.3.1.'de anlatılan şekilde yapılmıştır. Doku iskeleleri ile yapılan hücre kültürü çalışmalarında parafilm ile kaplanmış 24 gözlü kültür kapları kullanılmıştır. Parafilmler, 24 gözlü kapların tabanını kaplayacak şekilde kesilmiş ve kullanılıncaya kadar % 70 etanol içerisinde bekletilmiştir. Hücre kültürü çalışmasından önce parafilmler, kapların içerisine yerleştirilmiş; 30 dakika % 70 etanol ve 45 dakika UV ile sterilize edilmiştir. 10 mm çapında ve 2 mm kalınlığında doku iskeleleri 24 gözlü kültür kaplarına yerleştirilmiş ve iskelelerin de sterilizasyon

işlemleri 30 dakika % 70 etanol ve 45 dakika UV ile muamele edilerek gerçekleştirilmiştir. Yalnızca heparin içeren örneklerin sterilizasyon koşulları 30 dakika % 70 etanol ve sonrasında 20 dakika UV ile muamele olarak belirlenmiştir. Ekimden önce iskeleler 2 kez PBS, 1 kez de serum içermeyen hücre kültür ortamı ile yıkanmış, böylelikle etanolün uzaklaşması sağlanmıştır. MC3T3-E1 hücreleri aktif olarak üredikleri flasklardan tripsin yardımıyla kaldırılmış ve apatit-kitosan kompozitlerle gerçekleştirilen çalışmada her bir iskelenin üzerine (24 gözlü kültür kabının her bir gözüne) 1.5 ml $8x10^4$ hücre/ml konsantrasyonunda, heparin-kitosan doku iskeleleri ile gerçekleştirilen çalışmalarda ise 1.5 ml $1x10^5$ hücre/ml konsantrasyonunda hücre ekimi yapılmıştır. İskelelerle yapılan çalışmalarda % 10 FBS (HyClone, ABD), % 1 penisilin-streptomisin (HyClone, ABD), 2 mM L-glutamin (Sigma, USA), 10 mM β-gliserolfosfat (Sigma, USA) ve 50 µg/ml L-ascorbic acid (Sigma, USA) ile zenginleştirilmiş α-modifiye MEM Eagle ortamı kullanılmıştır. Hücreler 37˚C'lik inkubatörde (% 5 CO_2, % 95 nemlilik; Hereaus, Almanya) inkübe edilmiş ve her üç günde bir veya pH'ın düşmesi durumunda gerekli görüldüğü takdirde ortam değiştirilmiştir. Serbest heparinin etkisinin belirlenebilmesi için hazırlanan deney setinde, ortam değişimlerinin yapıldığı günlerde 10 USP ünitesi/ml konsantrasyonunda heparin eklemesi de yapılmıştır.

3.3.2.1. MTT analizi

Kültürün farklı zamanlarında iskelelerin üzerindeki kültür ortamı çekilmiş, 24 gözlü kabın her bir gözüne 90 µl MTT (2.5 mg/ml, PBS içerisinde) ve 900 µl taze ortam eklenerek 37°C'de 3 saat bekletilmiştir. İnkübasyon periyodundan sonra, ortam uzaklaştırılmış ve doku iskeleleri başka bir 24 gözlü kültür kabına aktarılmıştır. Her göze 400 µl 0.04 M HCl içeren izopropanol çözeltisi eklenerek oluşan mor formazan kristallerinin çözünmesi sağlanmıştır. Elde edilen çözelti 96-gözlü ELISA pleytine aktarılmış (200 µl/göz) ve pleyt okuyucu kullanılarak (ASYS Hitech UVM 340 Plate Reader, Avusturya) 690 nm referans olmak üzere 570 nm'de absorbans ölçümü yapılmıştır. MTT testi kontrol olarak hücre içermeyen doku iskelelerine de uygulanmış ve elde edilen değer ölçüm değerlerinden çıkartılmıştır.

3.3.2.2. Taramalı elektron mikroskop (SEM) ile analiz

Hücrelerin iskele içerisindeki morfolojileri kültürün farklı günlerinde (apatit kaplı kitosan iskeleler için 7. ve 13., heparin ile modifiye iskeleler içinse 4. ve 11. günlerde) taramalı elektron mikroskobu ile incelenmiştir. İskeleler PBS ile yıkandıktan sonra hücreler PBS (pH=7.4) içerisinde hazırlanan % 2.5'luk (v/v) glutaraldehit çözeltisi ile oda sıcaklığında, 10 dakika fikse edilmiştir. Sonrasında iskeleler etanol çözeltileri (% 30, % 50, % 70, % 90, % 96 (v/v)) içerisinde dehidre edilmiştir. Örnekler hekzametildisilazan ile yıkandıktan sonra kurumaya bırakılmıştır. İskeleler taramalı elektron mikroskobu (Zeiss Evo 50, Almanya) ile incelenmeden önce altınla kaplanmıştır.

3.3.2.3. Konfokal lazer taramalı mikroskop (CLSM) ile analiz

Kitosan doku iskeleleri 2 kez PBS ile yıkandıktan sonra PBS (pH 7.4) içerisinde hazırlanmış % 2.5 (v/v) glutaraldehit çözeltisi ile 10 dakika fikse edilmiştir. Fiksasyon işleminden sonra, % 0.1 Triton X-100 (PBS içerisinde) ile 5 dakika boyunca muamele edilerek hücre membran geçirgenliği arttırılmıştır. Hücrelerin filamentöz aktinleri (F-aktin), BSA/PBS çözeltisi içerisinde hazırlanmış % 2.5'lik (v/v) Alexa Fluor 488 phalloidin ile 20 dakika, hücre çekirdeği ise 10 µg/mL propidyum iyodür (Sigma, ABD) ile 5 dakika muamele edilerek boyanmıştır. Örnekler Orta Doğu Teknik Üniversitesi Merkezi Laboratuvarı'nda bulunan konfokal lazer taramalı mikroskobu (CLSM, Zeiss LSM 510, Germany) kullanılarak incelenmiştir.

3.3.2.4. Hücre farklılaşmasının test edilmesi

Doku iskeleleri üzerindeki hücrelerinin aktivitesi, alkalen fosfataz (ALP) testi ile belirlenmiştir. Kültürün 15. ve 21. gününde doku iskelelerinin üzerindeki ortam uzaklaştırılmış ve iskeleler başka bir kültür kabına aktarılarak test yapılıncaya kadar -80°C'de saklanmıştır. -80°C'den çıkarılan iskeleler liyofilizatörde kurutulduktan sonra bistüri yardımıyla küçük parçalara ayrılmış ve Ependorf tüplerine alınmıştır. Örnekler 500 µl lizis çözeltisi (% 0.01 Triton X-100) içerisinde, 4°C'de 30 dakika inkübe edildikten sonra 12000 rpm'de, 4°C'de, 10 dakika santrifüjlenmiştir. 50 µl triton lizatı 96 gözlü ELISA kaplarına aktarılmış ve üzerine

125 µl ALP çözeltisi (1 mM $MgCl_2$ (Merck, Almanya) ve 56 mM 2-amino-2-metil-1-propanol (Aldrich, ABD) içeren p-nitrofenil fosfat sıvı substrat sistemi (Sigma, ABD) eklenmiştir. 37°C'de 30 dakika inkübasyondan sonra reaksiyon 2.5 M sodyum hidroksit ile durdurulmuş ve ALP aktivitesi, p-nitrofenolün absorbansının 405 nm'de bir mikropleyt okuyucu (ASYS Hitech UVM 340 Plate Reader, Eugendorf, Avusturya) ile ölçülmesiyle belirlenmiştir.

Geç dönem osteoblast farklılaşması, hücreler tarafından salınan osteokalsin miktarının ölçümü ile belirlenmiştir. Kültürün 15. ve 21. gününde doku iskelelerinin üzerindeki ortam uzaklaştırılmış ve iskeleler başka bir kültür kabına aktarılarak test yapılıncaya kadar -80°C'de saklanmıştır. -80°C'den çıkarılan iskeleler liyofilizatörde kurutulduktan sonra Ependorf tüplerine alınmış ve 1 ml % 40 (v/v) formik asit çözeltisi ile muamele edilmiştir. Örnekler vortekslendikten sonra aynı çözelti içerisinde 10 gün boyunca 4°C'de bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda çözelti liyofilizatöre konularak formik asit uzaklaştırılmıştır. Çökelti ultra saf su ile süspanse hale getirilerek osteokalsin EIA kit (Biosource, Belçika) ile tayini yapılmıştır.

3.3.2.5. Matris mineralizasyonu

Kültür sonrasında malzeme PBS (pH 7.4) ile yıkanmış ve soğuk (ice-cold) saf etanolle oda sıcaklığında 20 dakika fiksasyon gerçekleştirilmiştir. Doku iskeleleri deiyonize su ile yıkandıktan sonra % 5'lik (v/v) $AgNO_3$ ile karanlıkta inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından örnekler deiyonize su ile yıkanmış ve 2 dakika UV'ye maruz bırakılmıştır.

3.3.3. Kondrojenik ATDC5 hücreleri ve kitosan doku iskeleleri ile yapılan çalışmalar

Heparin immobilize doku iskelelerinin, kıkırdak hücrelerinin üreme davranışları, morfolojileri ve aktiviteleri üzerindeki etkilerinin incelenmesi amacıyla gerçekleştirilen hücre kültürü çalışmalarında, ATDC5 fare embriyonel karsinoma hücre hattı (RIKEN Hücre Bankası, Saitama, Japan) kullanılmıştır.

Hücrelerin subkültürü, % 10 FBS (fetal bovine serum; Hyclone, ABD) ile zenginleştirilmiş Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient F-12 Ham (Sigma,

ABD) ortamı içeren flasklarda (Orange Scientific, Belçika), 37˚C'lik inkubatörde (% 5 CO_2, % 95 nemlilik; Hereaus, Almanya) gerçekleştirilmiştir. Doku iskeleleri ile yapılan hücre kültürü çalışmalarında parafilm ile kaplanmış 24 gözlü kültür kapları kullanılmıştır. Parafilmlerin ve doku iskelelerinin sterilizasyonu bölüm 3.3.2.'de anlatıldığı şekilde yapılmıştır. ATDC5 hücreleri flasklardan tripsin yardımıyla kaldırılmış ve 10 mm çapında, 2 mm kalınlığında doku iskelelerinin üzerine 1.5 ml $1x10^5$ hücre/ml konsantrasyonunda hücre ekimi yapılmıştır. İskelelerle yapılan çalışmalarda % 10 FBS (HyClone, ABD), %1 penisilin-streptomisin (HyClone, ABD) ve % 0.5 ITS karışımı (insülin, 10 µg/mL; transferin, 5.5 µg/mL; selenyum, 5 ng/mL) (Sigma, ABD) içeren DMEM /F-12 Ham ortamı kullanılmıştır. Hücreler 37˚C'lik inkubatörde (% 5 CO_2, % 95 nemlilik; Hereaus, Almanya) inkübe edilmiş ve her üç günde bir ya da gerekli görülen durumlarda ortam değiştirilmiştir. Serbest heparinin etkisinin belirlenebilmesi için hazırlanan deney setinde, ortam değişimlerinin yapıldığı günlerde 10 USP ünitesi/ml konsantrasyonunda heparin eklemesi de yapılmıştır.

3.3.3.1. MTT testi

Test yöntemi bölüm 3.3.2.1.'de verilmiştir.

3.3.3.2. Taramalı elektron mikroskop (SEM) ile analiz

Doku iskelesi üzerindeki hücrelerin morfolojileri ve yayılımlarının analizi 3.3.2.2.'de verilen yöntem kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.3.3.3. Konfokal lazer taramalı mikroskop (CLSM) ile analiz

Hücrelerin iskelet organizasyonu ve doku iskelesi içerisindeki yayılımları bölüm 3.3.2.3.'de verilen yöntem kullanılarak incelenmiştir.

3.3.3.4. Biyokimyasal analiz

Hücre kültürü sonunda, doku iskeleleri dondurulup, liyofilize edilmiş ve doku iskelesinin 4-40 mg kuru ağırlığı başına 1 ml papain çözeltisi kullanılarak parçalanmıştır (Obradovic *et al.*, 2001). Glikozaminoglikan (GAG) içeriği dimetilmetilen mavisi (Goldberg and Kolibas, 1990) kullanılarak spektrofotometrik

olarak (ASYS Hitech UVM 340 Plate Reader, Eugendorf, Avusturya; Labomed Inc. UV-VIS Double Beam) belirlenmiştir.

3.5. İstatistiksel Analiz

Çalışma sonuçlarının tümü GraphPad Software Instant programı kullanılarak istatiksel açıdan değerlendirilmiştir.

Veriler n≥3 için ± standart sapma olarak ifade edilmiş ve farklı deney grupları için çift kuyruklu (two-tailed) p değerleri hesaplanmıştır.

4. DENEYSEL SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Bu bölümde, doku mühendisliği uygulamaları için tasarlanmış kitosan doku iskelelerinin karakterizasyonu ve biyoaktivitesinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen deneysel çalışmaların sonuçları sunulmuş ve sonuçlar üzerinde gerekli tartışmalar yapılmıştır.

Deneysel sonuçlar, öncelikle kitosan doku iskelelerinin hazırlanması, modifikasyonu ve karakterizasyonu ile ilgili analiz sonuçları, daha sonra ise hücre kültür çalışmaları sonuçları olmak üzere iki alt başlık halinde sunulmuştur.

4.1. Kitosan Doku İskelelerinin Hazırlanması, Modifikasyonu ve Karakterizasyonu

4.1.1. Gözenekli kitosan doku iskelelerinin hazırlanması ve hazırlanan yapıların karakterizasyonu

Gözenekli kitosan doku iskeleleri, dondurarak-kurutma (freeze-drying) yöntemi ile hazırlanmıştır. β-[1→4]-bağlı N-asetil-D-glukozamin ve D-glukozamin ünitelerinden oluşan kitosan, özellikle kemik ve kıkırdağın hücredışı matrisinde (extracellular matrix-ECM) bulunan glikozaminoglikanlarla büyük bir benzerlik göstermektedir (Arpornmaeklong *et al.*, 2007). Ayrıca, kitosanın osteokondüktif özellik gösterdiği de bilinmektedir (Seol *et al.*, 2004).

Doku mühendisliği alanında kullanılan doku iskelelerinin birbiriyle bağlantılı (interconnected) gözeneklere sahip olması hücrelerin yayılması, besin maddelerinin taşınımı ve vasküler dokuların iskelenin içerisine doğru göç etmesi bakımından oldukça önemlidir (Freyman *et al.*, 2001; Arpornmaeklong *et al.*, 2007). Bunun yanında gözeneklerin çok küçük olması durumunda gözenekler hücreler tarafından tıkanacak; bu da hücre penetrasyonu, ECM oluşumunu ve doku iskelesinin iç kısımlarının vaskülerize olmasını engelleyecektir (Salgado *et al.*, 2004). Özellikle kemik doku mühendisliği göz önüne alındığında, kemiğin metabolik karakteristiklerinden dolayı, *in vitro* ortamda dahi yüksek kütle transfer hızları beklenmektedir (Freed ve Vunjak Novakovic, 1998).

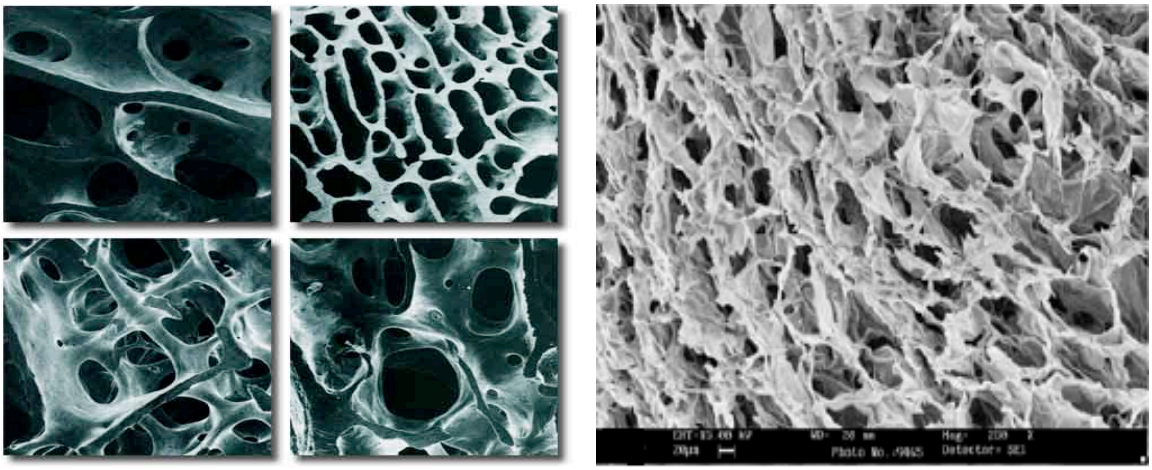
Minimum 100-150 μm arasında değişen gözenek büyüklüğü, dokunun iskelenin içerisine doğru yayılmasını sağlamaktadır (Zeltinger *et al.*, 2001). Kısacası

gözenek yapısı, hücre bağlanması ve *in vitro* hücre migrasyonunu etkilemektedir (van Tienen *et al.*, 2002). Bu nedenle doku iskelesi üretiminde kullanılan yöntem, gözeneklilik, gözenek boyutu ve dağılımı açısından kararlı olmalıdır (Salgado *et al.*, 2004).

Dondurarak-kurutma yöntemi, polimer çözeltilerinin dondurulması ve dondurma sonucu oluşan buz kristallerinin yapıdan uzaklaştırılması şeklinde tanımlanabilir. Çözelti içerisindeki buz kristallerinin süblimleşmesi sonucu süngerimsi yapılar elde edilebilmektedir. İşlemlerin düşük sıcaklıklarda gerçekleşmesi nedeniyle, bu yöntem özellikle proteinlerin polimer yapılara immobilizasyonu açısından önemlidir (Whang *et al.*, 1999). Arpornmaeklong ve arkadaşları (2007), dondurarak-kurutma yönteminden yararlanarak kemik doku mühendisliği uygulamalarında kullanılmak üzere 100 µm gözenek büyüklüğüne sahip doku iskeleleri elde etmişlerdir. Seol ve arkadaşları ise 100-200 µm gözenek büyüklüğüne sahip kitosan sünger yapılarını yine bu yöntemi kullanarak hazırlamışlardır (Seol *et al.*, 2004).

Yapılan çalışmalar, 100 µm'den büyük gözenek boyutlarının osteoblast hücrelerinin yapı içerisine doğru büyümesini arttırabileceğini göstermiştir (Mao *et al.*, 2003; Yin *et al.*, 2003). Ancak *in vivo* kemik rejenerasyonu söz konusu olduğunda, 300-400 µm boyutundaki gözenekler, özellikle kan damarlarının göçü ve iskele içinde hücrelerin daha çabuk yayılmasını sağlaması bakımından optimum değer olarak kabul edilmektedir (Tsuruga *et al.*, 1997; Kuboki and Takita, 2001). Holy ve arkadaşları (2000) ise gözenek boyutunun 1.2-2.0 mm arasında olması gerektiğini savunmuşlardır. Bu gözenek boyutu, yüksek yüzey alanı/hacim oranı nedeniyle hücre, doku ve kan damarının doku iskelesinin içerisine doğru göç etmesine olanak sağlasa da mekanik açıdan önemli bölgelerdeki kullanımı kısıtlıdır (Salgado *et al.*, 2004).

Sunulan tez kapsamında, ~100 µm gözenek büyüklüğüne sahip kitosan doku iskeleleri dondurarak-kurutma yöntemiyle üretilmiştir (Tığlı *et al.*, 2007). Osteoblast hücreleri, 10-30 µm uzunluğunda olduğundan, bu değer hücrelerin doku iskelesi içerisine göçüne izin vermektedir (Seol *et al.*, 2004). Şekil 4.1.'de Tığlı ve arkadaşları tarafından hazırlanan, birbiriyle bağlantılı gözeneklere sahip doku iskelelerine ait SEM görüntüsü, kemik mimarisi ile karşılaştırmalı olarak sunulmuştur.



Şekil 4.1. Kemik mimarisi (solda) ile dondurara-kurutma yöntemiyle hazırlanan kitosan doku iskelelerinin SEM görüntülerinin (sağda) karşılaştırılması.

Kitosan yapıların gözenekliliği, sıvı değişim yöntemiyle hesaplanmış ve hazırlanan iskeleler için gözeneklilik değeri % 81.8+1.7 olarak bulunmuştur. Yüksek oranda gözenekli yapılar, doku mühendisliği çalışmaları için istenen özellikte malzemelerdir. Yapılan çalışmalar, % 80 gözenekliliğe sahip malzemelerin, kondrositlerin ortamda bulunan besin maddelerine ulaşımı açısından önemli olduğunu ortaya koymuştur (Guo *et al.*, 2006). Kemik, yüksek oranda vaskülerize bir dokudur. Bu nedenle kemik doku mühendisliğinde kullanılacak olan malzemelerin anjiyogenezisi sağlaması oldukça önemlidir. Anjiyogenezis ise büyük oranda malzemenin gözenekliliğinden etkilenmektedir (Madihally *et al.*, 1999).

Yüksek oranda gözeneklilik, birbiriyle bağlantılı gözenek yapıları ve özel gözenek boyutları, çevre dokudan göçü teşvik etmektedir (Kim *et al.*, 2000a). Yetişkin iskeletindeki kemik dokusu, 2 farklı formdan oluşmaktadır. Bunlardan ilki olan trabeküler (süngerimsi) kemik toplam iskelerin % 20'lik bir kısmını oluştururken kortikal (sert) kemik % 80'lik kısmını oluşturmaktadır (Salgado *et al.*, 2004). Sert kemik, % 10 gibi bir gözenekliliğe sahipken süngerimsi kemik % 50-90 gibi bir gözeneklilik göstermektedir. Bu nedenle elastik modülü ve basınç dayanımı yaklaşık 20 kat daha azdır (Sikavitsas *et al.*,2001; Temenoff *et al.*, 1999). Benzer şekilde yüksek oranda gözeneklilik, malzemenin mekanik özelliklerini etkilemekte (Shor *et al.*, 2007); bu nedenle kompozit malzemelerin kullanımı daha da önem kazanmaktadır.

Tığlı ve arkadaşları, yüksek deasetilasyon derecesine sahip kitosan iskelelerin yüksek büyüme indeksi değerleri gösterdiğini ortaya koymuştur (2007). Bunun nedeni, deasetilasyon derecesinin artmasıyla katyonik polimerin taşıdığı primer amin gruplarının artmasıdır. Böylece hücreler, membranları vasıtasıyla kitosan iskelelerdeki protonlanmış amin gruplarına bağlanmaktadır. Ayrıca, yine aynı çalışmada, % 3'lük bileşime sahip iskelelerdeki gözenek boyutunun küçük olması nedeniyle hücre sayılarının 4. gün sonunda keskin bir şekilde düştüğü gözlemlenmiştir (Tığlı *et al.*, 2007). Tüm bu nedenlerden dolayı, çalışmamızda deasetilasyon derecesi % 85'ten büyük olan kitosanın % 2'lik çözeltileri kullanılmıştır.

Liyofilize doku iskelelerinin kararlı hale gelmesi için etanol ile rehidratasyonu yapılmıştır. Yeni liyofize edilmiş iskeleler, sert, esnek olmayan bir yapı göstermektedir. Ayrıca liyofilize form, çözünebilir kitosan asetat içerdiğinden nötral bir sıvı ortam içerisine konulduğunda hızla şişmekte ve parçalanmaktadır (Madihally and Matthew, 1999; Tığlı *et al.*, 2007). Literatürde doku iskelelerinin seyreltik NaOH (0.1 M) ya da etanol serileri (% 100, 70, 50, 0 gibi) ile stabilize edilebileceği belirtilmektedir. Etanol ile stabilizasyonda, örnekler en az 30 dakika çözelti ile dengeye getirilmelidir (Madihally and Matthew, 1999). NaOH ile hidrate edilen doku iskelelerinde büzülme ve biçim bozukluğu meydana gelmektedir. Bu problemler, kristalinitedeki değişimlerle ilişkilidir ve iskelelerin pH'ı 7 olan sıvı çözeltilere transfer edilmesi durumunda yalnızca kısmi olarak tersine çevrilebilmektedir (Rathke and Hudson, 1994). Ancak etanol içerisinde hidrate edilen örneklerde herhangi bir hacim ya da biçim değişikliği görülmemekte; ayrıca bu yöntemde saf alkolün düşük yüzey gerilimi nedeniyle NaOH kullanımına göre çok daha iyi bir hidratasyon sağlanarak daha az hava kabarcığı oluşmaktadır (Madihally and Matthew, 1999). Doku mühendisliğinin en önemli kısmını oluşturan hücre kültür çalışmalarında sterilite çok büyük önem taşımaktadır. Etanolle stabilizasyon sırasında aynı zamanda sterilizasyon da sağlanmakta; bu da zaman ve hücre kültürü çalışmaları açısından büyük avantaj sağlamaktadır.

Çalışmamızda % 96 (v/v) etanolde 1 gün, % 70 etanolde ise 1 saat bekletilerek kararlı hale getirilmiş olan iskeleler, stabilizasyon sonrası şekilsel olarak hiçbir değişime uğramamış ve esnek, süngerimsi yapılarını korumuşlardır. Söz konusu

yapılar, sulu ortam içerisine alındığında herhangi bir çözünme olmaksızın kontrollü bir şekilde şişmişlerdir.

4.1.2. Kitosan doku iskelelerinin biyomimetik apatit ile kaplanması ve apatit kaplı iskelelerin karakterizasyonu

Kemik doku mühendisliği, yaralanma, genetik bozukluklar ya da hastalıklardan kaynaklanan kemik defektlerinin tedavisi için kullanılan yeni ve oldukça önemli bir yaklaşımdır (Holy *et al.*, 2000). Doku mühendisliği kapsamında sıklıkla kullanılan polimerik malzemelerin en önemli dezavantajları arasında mekaniksel zayıflık ve biyoaktivitelerinin arttırılması gereksinimi yer almaktadır (Oungbho, 1997; Kong *et al.*, 2006; Zhang and Zhang, 2001b). Tüm bu problemlerin üstesinden gelebilmek amacıyla literatürde birçok seramik-polimer kompoziti kullanılmıştır (Wang, 2006). Doku mühendisliği alanında, hücrelere destek sağlayan ve hücre-hücre etkileşiminde görev alan doğal ECM'ye uygun biyolojik ve mekanik özellikler gösteren yapıların eldesi ve yapay bir hücredışı matris gibi fonksiyon gören malzemelerin üretilmesi oldukça önemlidir. Her ne kadar kitosan osteouyumluluğu ve osteokondüktif özellikleri nedeniyle kemik doku mühendisliği çalışmalarında tercih edilen bir malzeme olsa da zayıf fiziksel özellikleri ve kemik doku onarımı için biyoaktivitesinin geliştirilmesinin gerekliliği bu malzemenin kompozitlerinin kullanımını zorunlu kılmıştır. Kitosanın biyouyumluluğunu arttırmak amacıyla kemik ECM'sinin temel elemanı olan kollajenle (Arpornmaeklong *et al.*, 2007) ya da kemiğin inorganik kısmını oluşturan kalsiyum fosfat yapılarıyla (Zhang and Zhang, 2001b; Zhang *et al.*, 2007) kompozitleri yapılmıştır.

SBF çözeltilerinin osteoindüktif malzemeler üzerinde apatitik kalsiyum fosfatların oluşumunu sağladığı uzun zamandır bilinmektedir. Ancak özellikle son yıllarda bu çözeltilerden yararlanılarak malzemelerin kemik benzeri apatitle kaplanması ve bu şekilde kompozit yapıların oluşturulması esasına dayanan çok sayıda çalışma gerçekleştirilmiştir. Bu şekilde çok daha uyumlu koşullarda, özel ekipmanlara ihtiyaç duyulmadan kompozit doku iskeleleri hazırlanabilmektedir.

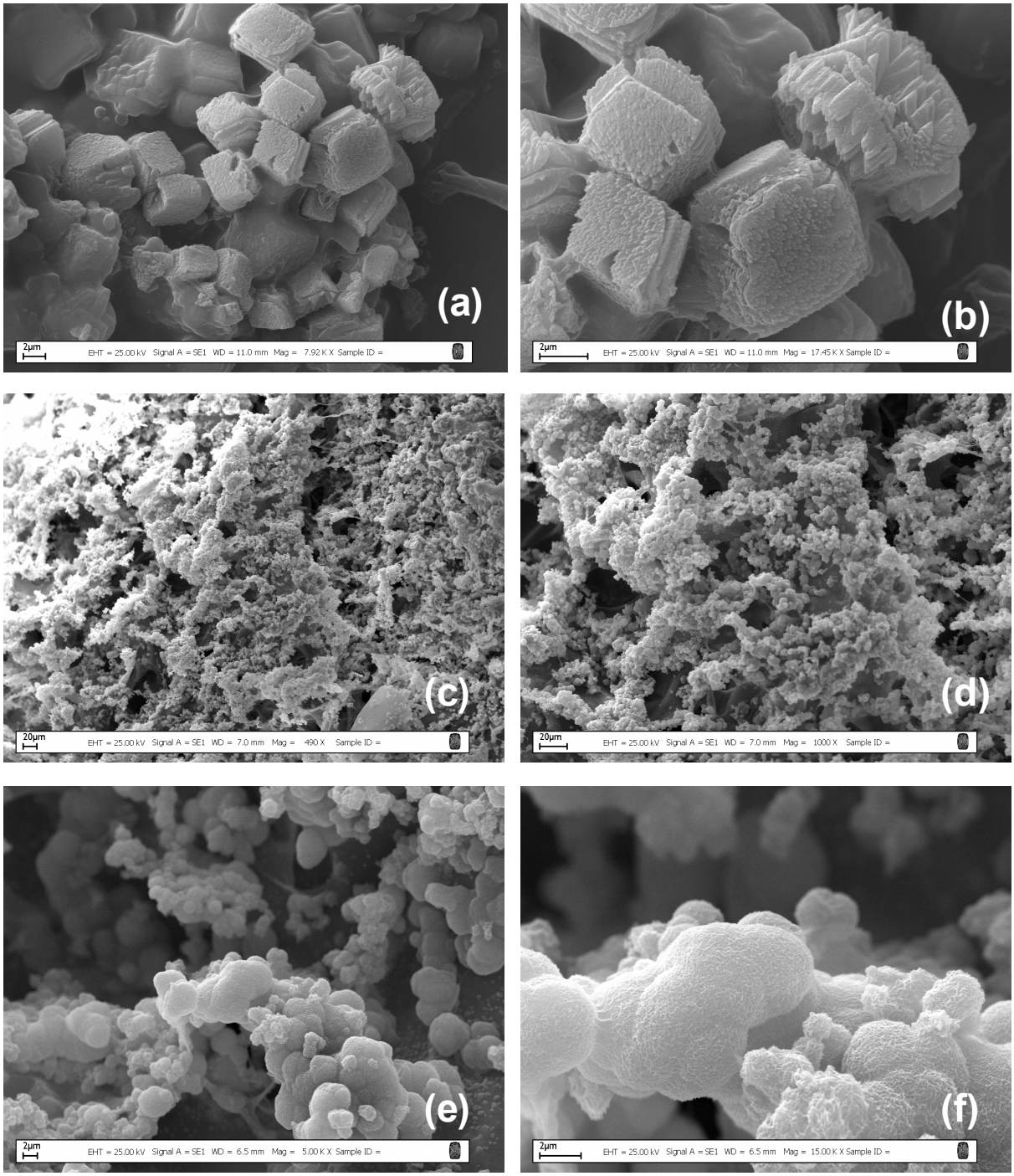
Sunulan çalışmada, insan plazmasının 10 katı kadar kalsiyum ve fosfat iyon konsantrasyonuna sahip 10X SBF-benzeri çözelti, kitosan doku iskeleleri üzerinde biyomimetik apatit kaplamanın oluşturulması için kullanılmıştır. Söz konusu çözelti

Çizelge 3.1.'de verilen kimyasalların oda sıcaklığında sırayla 900 ml ultra-saf deiyonize suya eklenmesi ile hazırlanmıştır. İlk 4 kimyasal eklendikten sonra pH ~5.85 olarak ölçülmüştür. $NaH_2PO_4.H_2O$ eklenmesinden sonra ise değer, ~4.17'ye düşmüştür. Taş ve Bhaduri tarafından kullanılan reçeteden farklı olarak çalışmamızda kullanılan reçetede NaH_2PO_4'ın yerini $NaH_2PO_4.H_2O$ almıştır. İstenilen özellikte kaplamanın elde edilebilmesi ve istenmeyen dev kristallerin oluşumunun önlenebilmesi için uygun $H_2PO_4^-$ ve HCO_3^- iyon konsantrasyonlarının ayarlanması önemlidir. Laboratuvarımızda, bu amaçla 4 farklı SBF reçetesi denenmiş ve bu denemelerin sonunda oluşan apatit yapısı, Ca/P oranı (~2.2) ve kaplama süresi bakımından en uygun olan reçete daha sonraki çalışmalarda kullanılmıştır (Maviş *et al.*, 2007).

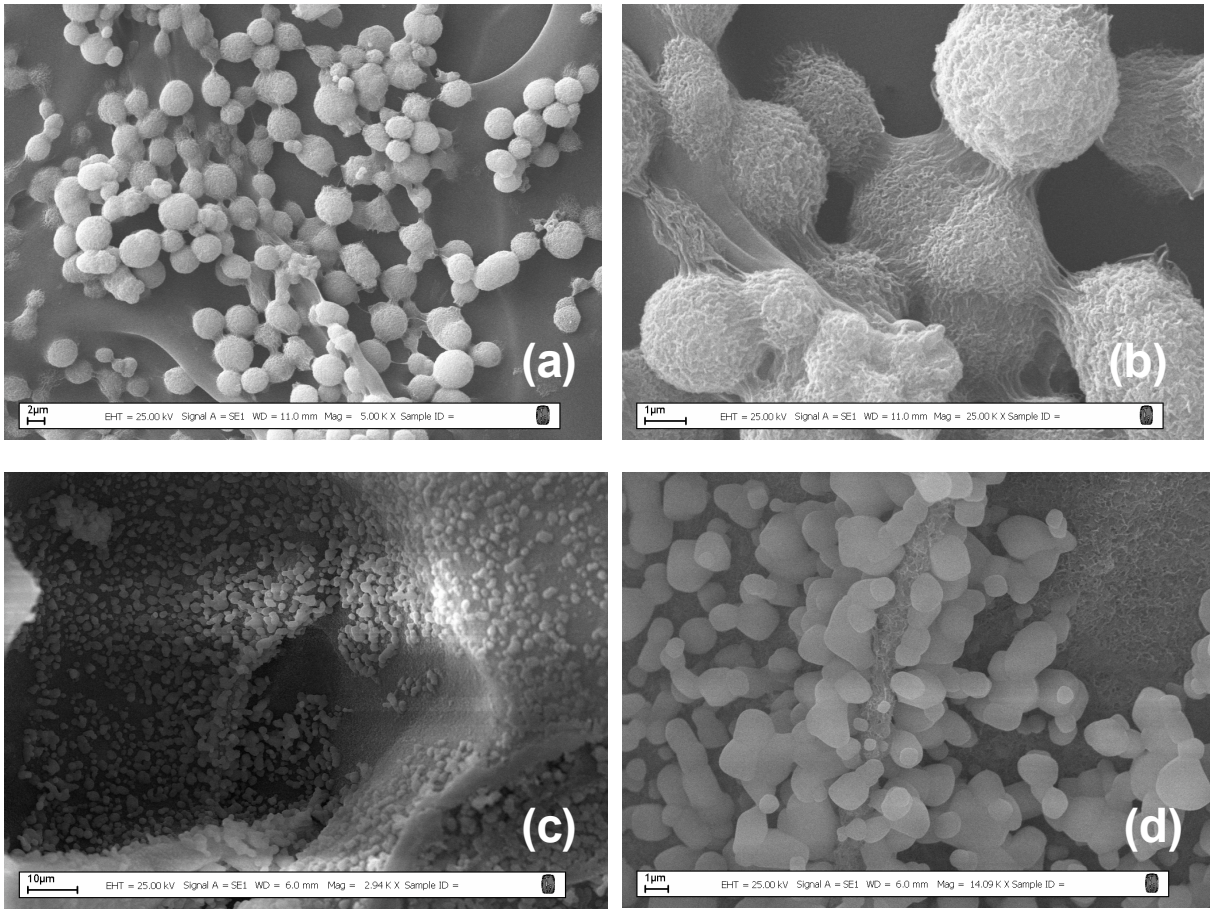
Kong ve arkadaşları 5X SBF çözeltisi kullanarak kitosan ve kitosan/nanohidroksit kompozit malzemeler üzerinde 36 saat sonunda hidroksiapatit yapıları elde etmişlerdir (Kong *et al.*, 2006). Taş ve arkadaşları ise Ti6Al4V yüzeylerde 2-6 saat içinde kemik benzeri apatitik kalsiyum fosfat çökmesini sağlamışlardır (2004). Tez kapsamında yapılan çalışmalarda, kitosan doku iskeleler üzerinde 6 saat sonunda hidroksiapatit kristal yapıları oluşmuştur. Ancak istenilen özellikteki kemik-benzeri apatit yapıları ancak 24 saatin sonunda gözlemlenebilmiştir. SBF çözeltileriyle yapılan kaplamalarda, öncelikle doku iskelesi üzerinde çekirdeklenme bölgeleri oluşmakta ve daha sonra bu bölgeler üzerinden çökme gerçekleşmektedir. Tez kapsamında yapılan çalışmalar sonucunda, 6 sa sonunda kristal apatit yapılarının oluştuğu, daha sonra bunların lahana benzeri morfolojileriyle karakterize, kat kat, nanodesenli yapılara dönüştüğü gözlenmiştir (Şekil 4.2., 4.3.). Doğal kemikteki Ca/P oranının sağlanması sonucu ortaya çıkan bu görünüm, istenilen biyomimetik apatit kaplanmanın gerçekleştiğinin ilk kanıtıdır.

Şekil 4.2.'den de görülebileceği gibi, 24 saat SBF muamelesi sonucunda yüzey tamamen ve homojen bir şekilde biyomimetik apatit ile kaplanmıştır. Doku iskelesinin kesiti alınarak çekilen SEM görüntülerinde ise iç kısımlarda çekirdeklenme bölgelerinin ve bu bölgelerde şekilsiz, amorf yapıların oluşmaya başladığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.3.). Buradan, apatit yapılarının kitosan içerisinde oluşumunun SBF ile muamele zamanının uzatılmasıyla arttırılabileceği sonucu çıkarılabilmektedir. Kokubo ve arkadaşları da dokunmamış karboksimetillenmiş

kitin fabrik yapılarla yaptıkları çalışmalarda apatit yoğunluğunun daldırma zamanı ile arttığını göstermişlerdir (2004).



Şekil 4.2. Kitosan iskeleleri üzerinde 6 saat sonunda oluşan hidroksiapatit kristalleri: (a) X 7920 büyütme, (b) X 17.45 büyütme; 24 saat SBF kaplı iskelelerin genel görünümü: (c) X 490 büyütme, (d) X 1000 büyütme; 24 saat SBF kaplı iskelelerin üzerinde oluşan kemik-benzeri apatit yapıları: (e) X 5000 büyütme, (f) X 15000 büyütme.

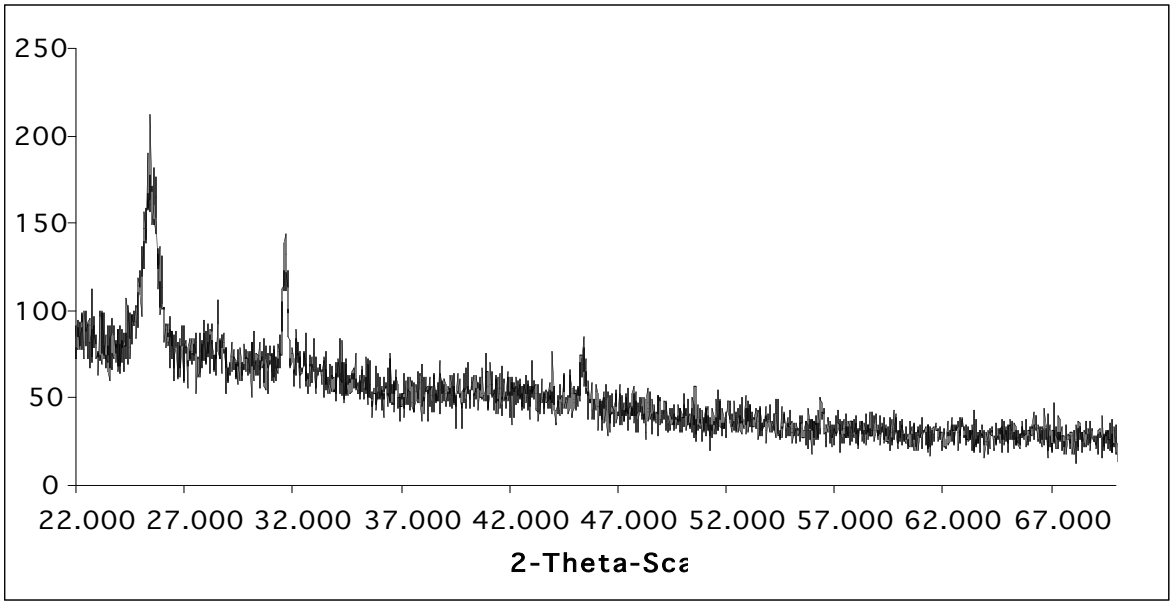


Şekil 4.3. 24 saat SBF kaplı iskelelerin üzerinde oluşan kemik-benzeri apatit yapıları: (a) X 5000 büyütme, (b) X 15000 büyütme; 24 saat SBF kaplı kitosan doku iskeleleri kesit görüntüleri: (c) X 2940 büyütme, (d) X 14090 büyütme.

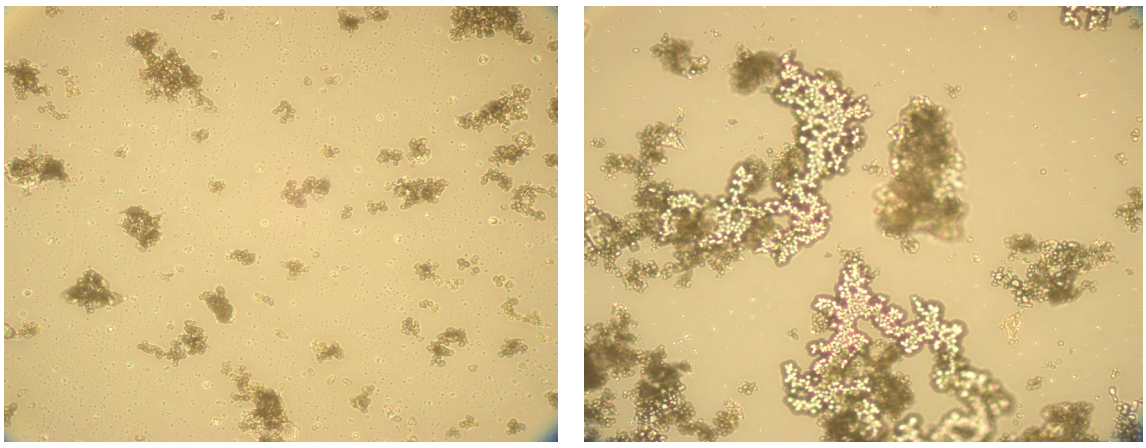
Yapıya katılan apatit tabakasının bileşiminin belirlenmesi için örneklere XRD analizi yapılmıştır. 24 saat SBF ile inkübasyon sonunda örnekler, hidroksiapatitin karakteristik piklerini (31.7°, 45°) göstermişlerdir. Bu pikler, literatürde verilen değerlere uygundur (Kong *et al.*, 2006; Jayasuriya, 2008). Ayrıca, Kong ve arkadaşları tarafından verilen 25.8° değerine benzer şekilde 25.5°'te bir pik daha görülmüştür (Şekil 4.4.).

SBF çözeltisi kullanılarak gerçekleştirilen bütün çalışmalarda çözeltinin bir kısmı boş bir behere alınmış ve çökelme bu kaplarda gözlemlenmiştir. Ayrıca deney sonunda oluşan apatit tabakasından yayma preparatlar hazırlanmış ve istenmeyen kristal oluşumunun gerçekleşmediğinden emin olmak amacıyla mikroskop altında incelenmiştir (Şekil 4.5.).

Yapılan incelemeler sonunda mikroskop altında cam kırığı şeklinde görülen kristal yapılarının oluşmadığı, istenilen özellikte, küresel formda biyomimetik apatit yapılarının elde edildiği gözlemlenmiştir.



Şekil 4.4. 24 saat SBF muamelesi sonunda kitosan doku iskelesinin XRD deseni.



Şekil 4.5. Farklı yayma preparatlarda, 24 saat sonunda oluşan apatit yapılarının invert mikroskop görüntüleri (10X).

Son olarak elde edilen kitosan-hidroksiapatit kompozit yapılarının mekanik testleri yapılmıştır. Mekanik test sonunda, kaplanmamış, 6 sa SBF ile muamele edilmiş ve 24 sa SBF ile muamele edilmiş kitosan iskelelerin sıkıştırma modülleri sırasıyla 1.993+0.035, 3.492+0.325 ve 3.525+0.341 N/mm^2 olarak bulunmuştur. Değerlerden de görüldüğü gibi, yapıya apatit katılması sıkıştırma modül değerini arttırarak mekanik özellikleri olumlu yönde etkilemiştir.

4.1.3. Kitosan doku iskelelerinin heparin ile modifiye edilmesi ve elde edilen doku iskelelerinin karakterizasyonu

Glikozaminoglikan üyesi, yüksek oranda sülfatlanmış lineer bir polisakkarit olan heparin, trombus oluşumunu önlemek amacıyla yaygın olarak kullanılan bir antikoagulanttır. Bu özelliğinin yanında, bazı büyüme ve yapışma faktörlerini kendisine bağlaması nedeniyle ayırma kolonlarının yapımında yaygın kullanım olanağı bulmuştur. Özellikle son yıllarda, heparinin hücre yapışma ve üremesi açısından oldukça önemli olan biyosinyal moleküllerine olan ilgisi, araştırmacıların oldukça dikkatini çekmiş; heparin ile modifiye edilmiş malzemelerin üretimini ve biyosinyallere bağlanma mekanizmalarının temellerini konu alan birçok çalışma yapılmıştır.

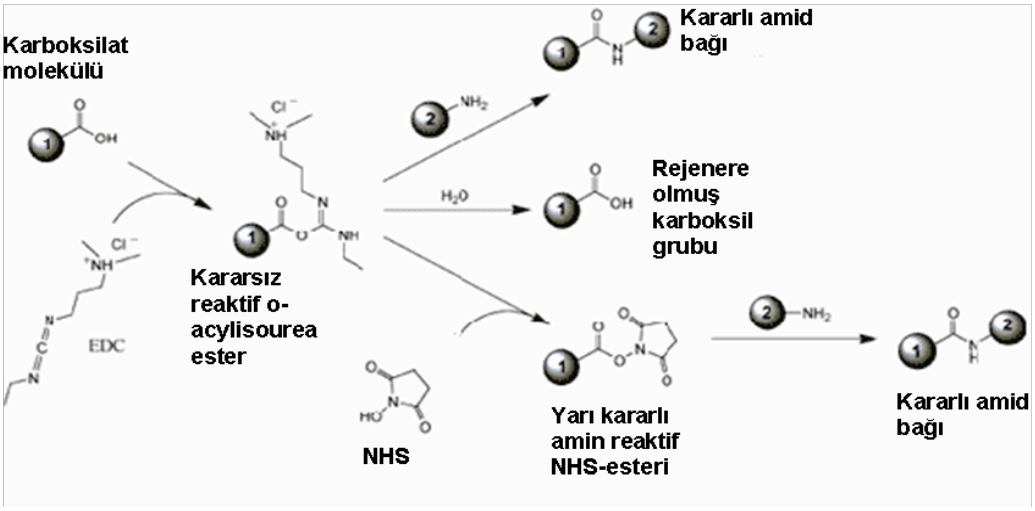
Çalışmamızda, heparin glikozaminoglikan ailesinin bir üyesi olması nedeniyle özellikle tercih edilmiştir. Bilindiği gibi, kemik ve kıkırdak hücredışı matrisleri, kondroitin sülfat, hiyaluronat gibi birçok glikozaminoglikandan oluşmaktadır. Bu tür moleküllerin doku iskelesi eldesinde kullanımı özellikle biyomimetik malzemelerin üretilmesi açısından oldukça önemlidir. ECM içerisinde GAG'lar kovalent, iyonik etkileşimlerle ya da hidrojen bağlarıyla bağlanmaktadır. Bu arayüz ortamında, GAG-büyüme faktörü etkileşimlerinin 3 boyutlu doğasının, çözeltideki etkileşimlerden farklı olabileceği düşünülmektedir (Tillman *et al.*, 2006). Bu nedenle heparinin serbest formu yerine doku iskelesine immobilize formlarının kullanılması, hücrelerin doğal çevresinin çok daha iyi taklit edilebilmesi bakımından oldukça önemlidir.

Laboratuvarımızda önceden heparin immobilize dokunmamış poliester fabrik disklerle (NWPF) yapılan çalışmalarda, immobilizasyon işlemi iki basamakta gerçekleştirilmiştir. İlk basamakta, heparin 4°C'de 5 saat EDC ile muamele edilmiş ve bu sayede heparin üzerindeki karboksilik asit grupları aktive edilmiştir (Türkoğlu Şaşmazel *et al.*, 2007). Sonrasında ise NWPF diskler, daha önceden aktive edilmiş heparini içeren sodyum sitrat tamponu içerisinde 24 saat 4°C'de inkübe edilmiştir. Wang ve arkadaşları, kitosan ve heparini PLGA yüzeylere kovalent olarak bağlamak amacıyla çapraz bağlayıcı ajanlar NHS (N-hydroxysuccinimide) ve EDC (1-ethyl-(dimethylaminopropyl) carbodiimide)'yi kullanmışlardır. Bu şekilde tek bir basamakta yapılara heparin immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Tez

kapsamında, Wang ve arkadaşlarının kullandığı yöntem, ufak birtakım modifikasyonlar yapılarak kullanılmıştır. Söz konusu çalışmada, yapıya heparin katılması oda sıcaklığında 4 saat içerisinde gerçekleştirilirken tez kapsamında bu koşullar +4°C'de 1 gece olarak değiştirilmiştir. Literatürde membranlar için çoğunlukla % 1 ve üzeri konsantrasyondaki (Wissink *et al.*, 2001; Zhu *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2003) heparin çözeltileri kullanılarak immobilizasyon sağlanmasına rağmen bu değer çalışmamızda % 0.5 (w/v)'e indirilmiştir. Ayrıca, aktivasyon çözeltisinin (heparin içermeyen EDAC/NHS/MES çözeltisi) doku iskelesi üzerindeki etkilerinin anlaşılabilmesi için aktif kitosan doku iskelesi şeklinde isimlendirdiğimiz ve heparin içermeyen; ancak aktif fonksiyonel gruplar içeren doku iskeleleri de hazırlanmıştır. Daha sonra bu iskelelerin hücre davranışlarına nasıl etki ettiğinin anlaşılması amacıyla hücre kültür çalışmaları yapılmıştır.

NHS, karboksilik asitler için bir aktivasyon ajandır. Karboksilik asitler aminlerle etkileştiğinde sadece tuz oluşturmaktadır. Oysaki NHS, karboksilik asitlerin aminlerle etkileşerek amid oluşturabilmesini sağlamak amacıyla kullanılmaktadır. EDC ise karboksil ya da fosfatı aktive ederek "o-acylisourea" oluşumunu sağlamaktadır. Oluşan bu ara ürün ise, nükleofillerle çok hızlı bir şekilde reaksiyona girmektedir. Ancak bu ara ürün bir aminle karşılaşmazsa karboksil grubunu hidrolize ederek değiştirmektedir (Hermanson, 1996). Bu nedenle EDC, sıklıkla NHS ile birlikte kullanılmaktadır. Sıfır-uzunlukta (zero-length) çapraz bağlayıcı olarak da bilinen EDC, sülfo NHS varlığında, karboksil gruplarının amin reaktif sülfo-NHS esterlerine dönüştürülmesinde kullanılabilmektedir. Tez kapsamında, kitosan doku iskelelerine heparinin kovalent immobilizasyonunda, çok sık kullanılan EDC ve NHS çapraz bağlayıcılarından yararlanılmıştır. Şekil 4.6.'da EDC/NHS etki mekanizması gösterilmektedir.

Wissink ve arkadaşları, EDC/NHS/MES (2-morpholinoethane sulfonic acid) tamponu kullanarak gerçekleştirdikleri çalışmalarında, kollajen yüzeylere heparin immobilizasyonunu sağlamışlardır. Söz konusu çalışmada, pH'ı 5.6 olan 0.05 M MES tamponu içerisinde % 2'lik heparin çözeltisi hazırlamışlar; bu çözeltiye EDC ve NHS çapraz bağlayıcı ajanları (EDC:NHS:Hep-COOH molar oranları sırasıyla 0.4:0.24:1.0) ekleyerek heparinin karboksilik asit gruplarını aktive etmişlerdir. Bu şekilde gerçekleştirilen immobilizasyon işleminin süresi ise 2 sa olarak verilmiştir.



Şekil 4.6. EDC/NHS aktivasyon ajanları kullanılarak gerçekleştirilen immobilizasyon mekanizması (1, heparini; 2 ise kitosanı göstermektedir).

Tez kapsamında öncelikli olarak Wang ve Wissink tarafından verilen bu reçetenin kullanılması uygun görülmüştür. Ancak, pH'ı 5.6 olan MES tamponuna EDC ve NHS çapraz bağlayıcı ajanların eklenmesi pH'ı düşürmekte; bu da kitosan iskelelerin parçalanmasına neden olmaktadır. Bazı durumlarda ise kitosan iskeleleri süngerimsi yapılarını kaybederek jel haline geçmekte; kurutulduktan sonra sulu çözeltilere konulduğunda şişme göstermemektedir. Kitosanın seyreltik asitlerde amino gruplarının protonlanması sonucu çözünür hale geldiği ve pH 5'in altında tamamen çözündüğü bilinmektedir. Her ne kadar literatürde pH 4.5-6.5 arasında yapılan çalışmalar sonucu pH 5.6'da maksimum heparin immobilizasyonunun sağlandığı bulunmuş olsa da sunulan tez kapsamında, kitosanın yapısı da göz önüne alınarak immobilizasyon çalışmaları pH 6'nın üzerinde yürütülmüştür. Çizelge 4.1.'de immobilizasyonda kullanılan çözeltiler ve bu çözeltilerin pH değerleri verilmiştir. Çalışma sırasında MES'in tamponlama aralığı olan 5.5-6.7'nin dışına çıkılmamaya özen gösterilmiştir.

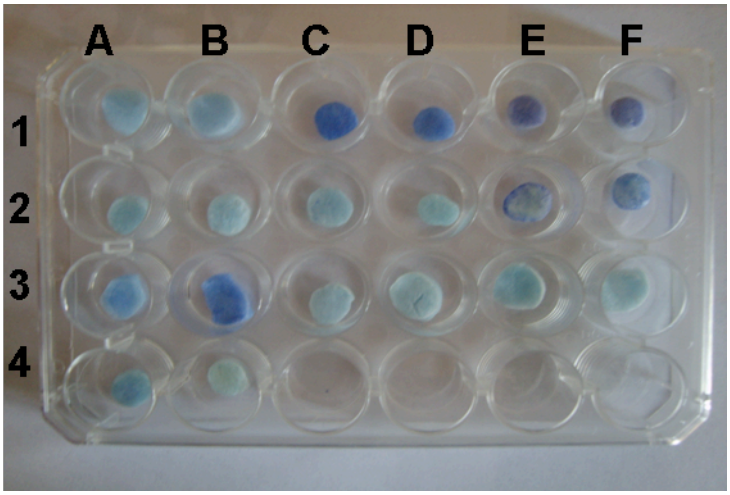
Çizelge 4.1. Heparin immobilizasyonunda kullanılan çözeltilerin pH değerleri.

Çözelti	**pH**
MES	9.79
Heparin/PBS	7.37
EDAC/NHS/MES	6.49
Heparin/EDAC/NHS/MES	6.70

En verimli heparin immobilizasyon yönteminin bulunması amacıyla farklı yöntemler (elektrostatik etkileşim ve kovalent bağlama), farklı doku iskeleleri (etanolle ve 0.4 M NaOH ile stabilize edilmiş) ve farklı tamponlar (sodyum sitrat ve MES) kullanılarak bir deney seti hazırlanmış, hazırlanan heparin bağlı kitosan iskeleleri Toluidine mavisi kullanılarak test edilmiştir. % 0.5 (w/v) Toluidine mavisi kullanılarak gerçekleştirilen bu çalışmanın sonucunda elde edilen absorbans değerleri ve doku iskelesi fotoğrafları sırasıyla Çizelge 4.2. ve Şekil 4.7.'de verilmiştir.

Çizelge 4.2. Toluidine mavisi testi sonucu elde edilen absorbans değerleri.

ÖRNEK KODU	ÖRNEK ADI	ABSORBANS (631 nm)
-	Kontrol (İskele içermeyen örnek)	0.758
Etanol ile stabilize edilmiş örnekler		
A 1,2	Boş Kitosan (Heparin içermeyen örnek)	0.812
A 3,4	Kitosan+% 0.25 Heparin (MES Tamponu)	0.445
A 5,6	Kitosan+% 0.25 Heparin (Sodyum Sitrat Tamponu)	0.510
B 1,2	Aktive Edilmiş Kitosan (MES Tamponu)	0.781
B 3,4	Aktive Edilmiş Kitosan (Sodyum Sitrat Tamponu)	0.768
B 5,6	Kitosan+% 0.3 Heparin (Elektrostatik Etkileşim, PBS)	0.691
NaOH ile stabilize edilmiş örnekler		
C 1,2	Kitosan+% 0.25 Heparin (MES Tamponu)	0.608
C 3,4	Kitosan+% 0.25 Heparin (Sodyum Sitrat Tamponu)	0.754
C 5,6	Aktive Edilmiş Kitosan (Sodyum Sitrat Tamponu)	0.779
D 1,2	Kitosan+% 0.3 Heparin (Elektrostatik Etkileşim, PBS)	0.639



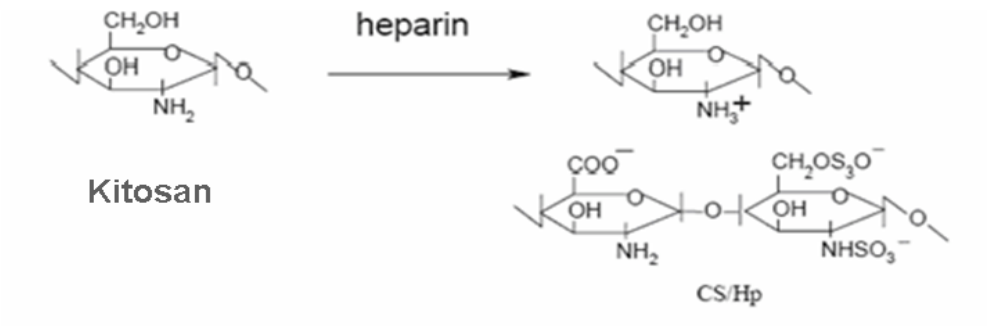
Şekil 4.7. Toluidine mavisi testi sonucu kitosan iskelelerin görüntüsü.

Deney sonucunda, etanolle stabilize edilmiş örneklere MES tamponu içerisinde heparin immobilizasyonunun yapılması uygun bulunmuştur. Ayrıca % 0.25-0.3 konsantrasyonundaki heparinin özellikle kovalent yöntem kullanıldığında hemen hemen bütün yüzeyi kapladığı görüldüğünden daha sonraki çalışmalarda kullanılacak heparin miktarında % 0.5 (w/v)'in üzerine çıkılmasının gerekli olmadığına karar verilmiştir.

Heparin immobilize yüzeylerin karakterizasyonunda genellikle metilen ve Toluidine mavisi gibi katyonik boyalarla heparin arasındaki metakromatik etkileşimlere dayanan yöntemler kullanılmaktadır (Oliveria *et al.*, 2003). Yaygın olarak kullanılan Toluidine mavisi testinde, heparin, boyaya bağlanmakta ve çözeltinin rengini maviden mora çevirmektedir. N-hekzan eklenmesi sonucu sulu fazdaki heparin boya kompleksi organik faza geçmekte; bu da sulu Toluidine mavisi çözeltisinde bir renk açılmasına neden olmaktadır. Çözelti içerisindeki heparin miktarı arttıkça çözelti çok daha açık bir renk almakta, bunun sonucu olarak da testte kullanılan kalibrasyon grafiklerinin eğimleri negatif olmaktadır (Ek 1). Literatürde genellikle Toluidine mavisinin % 25 (w/v)'lik çözeltileri kullanılırken (Türkoğlu Şaşmazel *et al.*, 2007) çalışmalarımızda % 0.5 (w/v) konsantrasyon tercih edilmiştir. Bunun nedeni, daha yüksek konsantrasyonda Toluidine mavisinin kullanıldığı çalışmalarda birbirine yakın absorbans değerleri arasındaki farkların tam olarak belirlenememesidir. Çözelti seyreltik halde kullanıldığında çok daha hassas okumalar yapılabilmektedir.

Madihally ve arkadaşları (1999), dondurarak-kurutma yöntemiyle hazırladıkları kitosan doku iskeleleri ve membran yapılarını heparin çözeltileri kullanarak fonksiyonel hale getirmişlerdir. Liyofilize edilmiş kitosan iskelelerin % 0.7 heparin ile rehidratasyonu, kitosan-asetat yapısını kitosan-GAG kompleksine çevirmiştir. Ancak kitosanın katyonik gruplarıyla GAG'ların anyonik grupları arasındaki elektrostatik etkileşimlere dayanan bu bağlanma yönteminin kullanımı sonucu elde edilen yapıların yüzeyleri SEM'de incelendiğinde, gözeneklerin tamamen kapandığı görülmüştür. Kesit alınarak SEM incelemeleri yapıldığında iç kısımlardaki gözenekli yapının bozulmadığı gözlemlenmiştir.

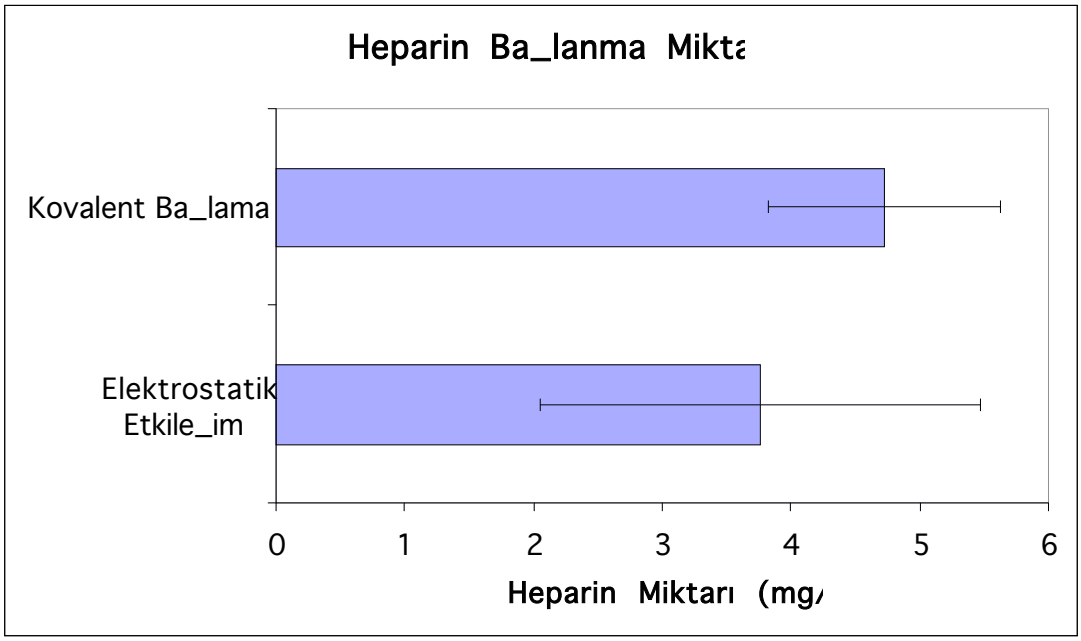
Heparin bağlanmasına yönelik olarak yapılan çalışmalarda, elektrostatik etkileşim ile bağlama da denenmiş; ancak Madihally ve arkadaşlarının çalışmalarında belirtildiği gibi rehidratasyon sırasında yapı hızla şişerek jel görünümü kazanmıştır. Malzemede kalıcı bir değişim olup olmadığının anlaşılması amacıyla iskeleler kurutulduktan sonra tekrar su içinde şişmeye bırakılmış; ancak elde edilen doku iskelesinin süngerimsi yapısının bozulduğu ve şişme özelliklerinin değiştiği gözlemlenmiştir (1999). Bu nedenle, heparinin kitosana elektrostatik olarak bağlanması, stabilize edilen kitosan iskelelerin % 0.5 (w/v) heparin içeren PBS içerisinde +4°C'de 1 gece inkübe edilmesiyle sağlanmıştır. Bu şekilde elde edilen yapının genel görünümünde ya da şişme davranışında herhangi bir değişiklik gözlemlenmemiştir. Heparinin elektrostatik etkileşimle kitosana bağlanma mekanizması Şekil 4.8.'de verilmiştir.



Şekil 4.8. Heparin ve kitosan arasındaki elektrostatik etkileşim.

Yapıya katılan heparinin nicel olarak belirlenmesi amacıyla Toluidine mavisi testi yapılmış ve bulunan değerler Şekil 4.9.'da birim kütle (g) başına düşen heparin

miktarı (mg) olarak verilmiştir. Bu değer, elektrostatik heparin bağlı iskeleler için 3.8+0.8 iken kovalent heparin immobilize yapılar için 4.7+0.4'tür. İki kuyruklu t-testi (two-tailed) kullanılarak yapılan istatistiksel analizde, p değeri 0.31 olarak bulunmuş, başka bir deyişle iki immobilizasyon yöntemi arasında heparin bağlanması açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır.

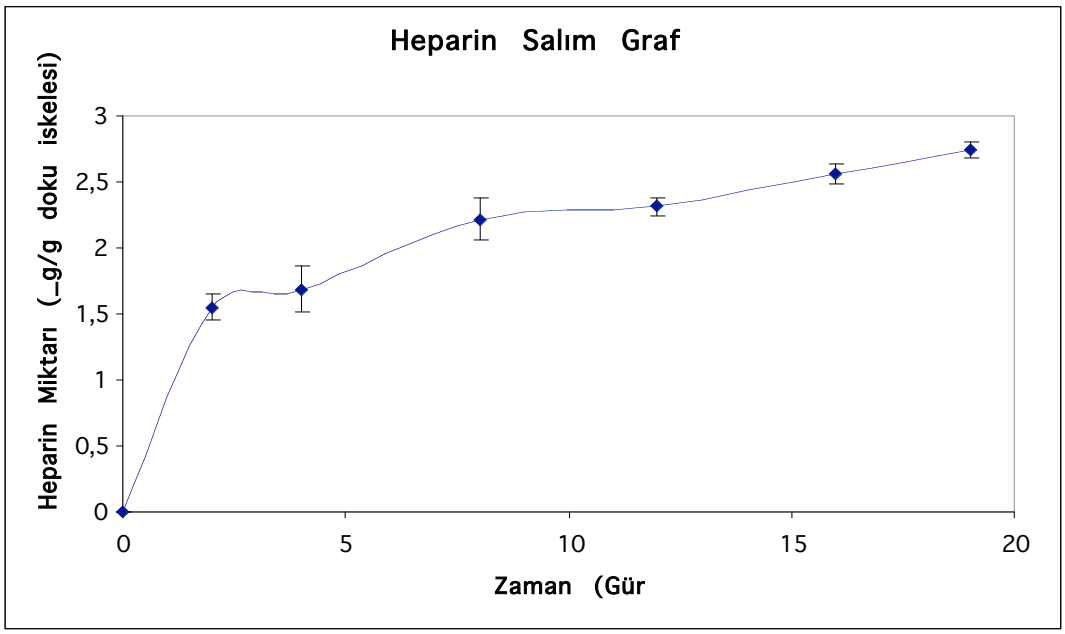


Şekil 4.9. Kitosan iskelelere bağlanan heparin miktarları.

Kitosanların yapısında bulunan heparin, aynı zamanda elementel analiz ile de kanıtlanmıştır. Kitosan, yapısında kükürt bulundurmamakta, heparin ise bu elementi yapısında bulundurmaktadır. Bu nedenle yapıdaki kükürtün tamamı heparinden gelmektedir. Modifiye edilmemiş, elektrostatik ve kovalent heparin bağlı kitosan iskelelerde elementel analiz sonucu elde edilen kükürt yüzdeleri sırasıyla % 0.210, 2.044 ve 1.478'dir. Aktif kitosan iskelelerde de boş kitosana benzer şekilde kükürt yüzdesi oldukça düşüktür (% 0.767) ve ortamdaki bir kükürt kontaminasyonu nedeniyle bu iki iskelede de kükürte rastlanmıştır. Ayrıca kovalent bağlı heparin içeren iskelelerde azot yüzdesi (% 7.41), boş kitosana göre (% 6.60) daha yüksektir. Bunun nedeni de yine heparinden gelen azottur.

Farklı fonksiyonalizasyon teknikleri arasında, moleküllerin substrat yüzeyine kovalent olarak bağlanması birçok avantaj sağlamaktadır. Bu avantajlar arasında, molekül oryantasyonunun kontrolü, spesifik olmayan etkileşimlerin minimizasyonu,

molekülün çözünme (dissolution), yüzeyden salınım (desorption) ve bozunmasının (degradation) engellenerek fonksiyonel yüzeyin kararlılığını daha uzun süre devam ettirmesi yer almaktadır (Sargeant *et al.*, 2008). Tez kapsamında yapılan salım çalışmaları, kovalent bağlı heparinin, elektrostatik etkileşimlerle bağlanan heparine göre yapıda çok daha uzun süre kaldığını göstermiştir. 20 günlük salım deneyi sonucunda iskelelerde kalan heparin miktarlarının belirlenmesi amacıyla Toluidine mavisi testi uygulanmış; ancak kovalent heparin bağlı iskelelerde anlamlı bir salım profili elde edilememiştir. Bunun, iskelelerden salınan heparin miktarının Toluidine mavisi testiyle hassas bir şekilde ölçülemeyecek kadar düşük olmasından kaynaklandığı düşünülmüştür. Elektrostatik etkileşimle bağlanan heparinde ise bağlanan miktarın (29 µg) yaklaşık % 47'si, 20 günlük inkübasyon süresi sonunda salınmıştır (Şekil 4.10.).



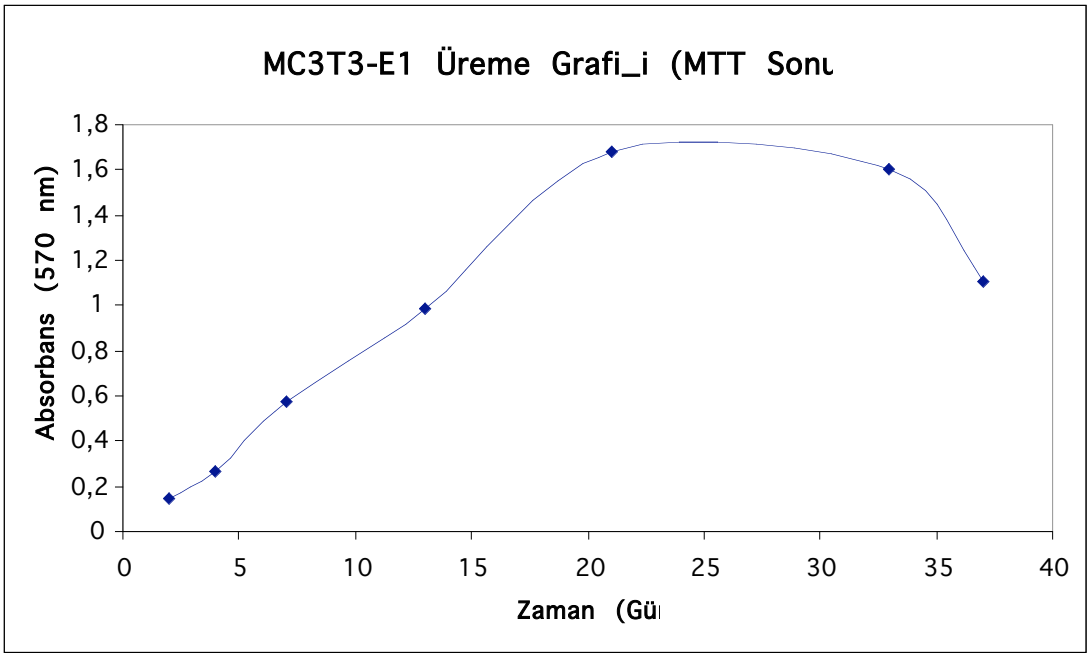
Şekil 4.10. Elektrostatik etkileşim örnekleri için heparin salım grafiği (37°C'de, PBS içerisinde).

Son olarak elde edilen kovalent heparin immobilize kitosan yapılarının mekanik testleri yapılmıştır. Mekanik test sonunda, kaplanmamış ve kovalent heparin immobilize kitosan iskelelerin sıkıştırma modülleri sırasıyla 1.993+0.035 ve 2.853+0.429 N/mm^2 olarak bulunmuştur. Yapıya heparinin girmesi, sıkıştırma modül değerini arttırarak mekanik özellikleri olumlu yönde etkilemiştir.

4.2. Hücre Kültürü Çalışmaları

4.2.1. MC3T3-E1 hücre karakterizasyon çalışmaları

Üreme grafiği çalışmalarında yenidoğan fare kafatası çatısı (calvaria) kökenli olan pre-osteoblast MC3T3-E1 hücreleri kullanılmıştır. Hücrelerin üremesi ve morfolojileri polistiren kültür kaplarında yaklaşık 40 gün boyunca izlenmiştir. Hücrelerin 40 günlük inkübasyonu boyunca hücre sayımı sonucu hesaplanan hücre sayısı değerleri ile MTT testi sonucu elde edilen absorbans değerlerine karşılık zaman grafikleri çizilmiş, bu sayede hücre büyüme eğrisinin lag (hazırlık aşaması), log (aktif üreme fazı), durgun ve ölüm fazları gösterilmiştir (Şekil 4.11. ve 4.12.).



Şekil 4.11. MTT testleri sonucu elde edilen üreme grafiği.

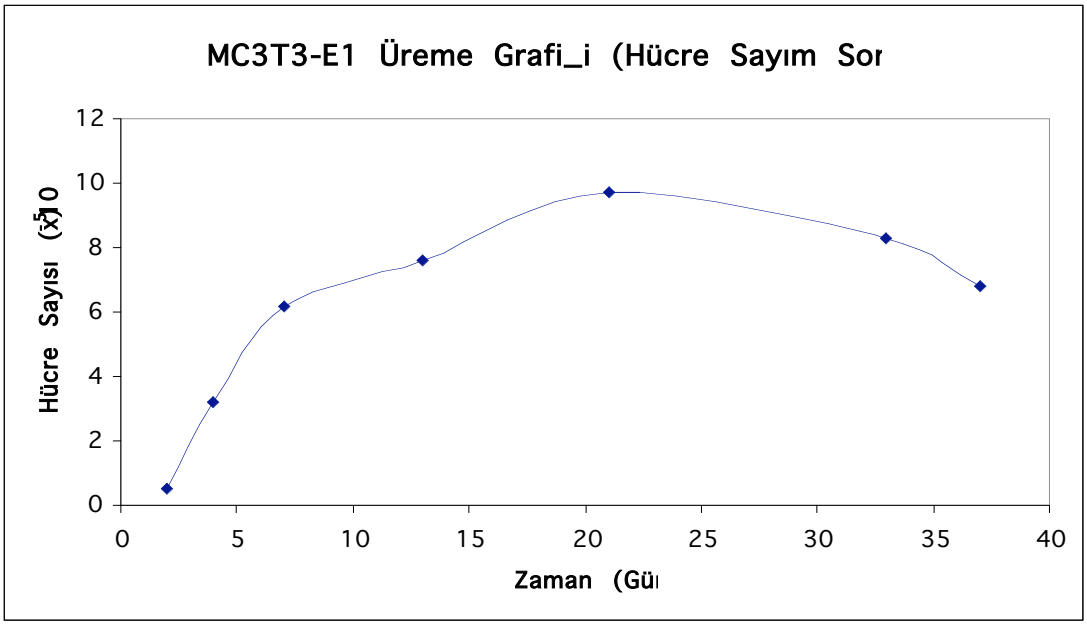
Bu grafiklerde hücrenin 4. günde logaritmik faza girdiği görülmektedir. Üstel üreme fazında (logaritmik faz), hücrelerin ikilenme süresi 4.2. numaralı denklik kullanılarak hesaplanmıştır:

$$dx/dt = \mu x/ dt \qquad (4.1.)$$

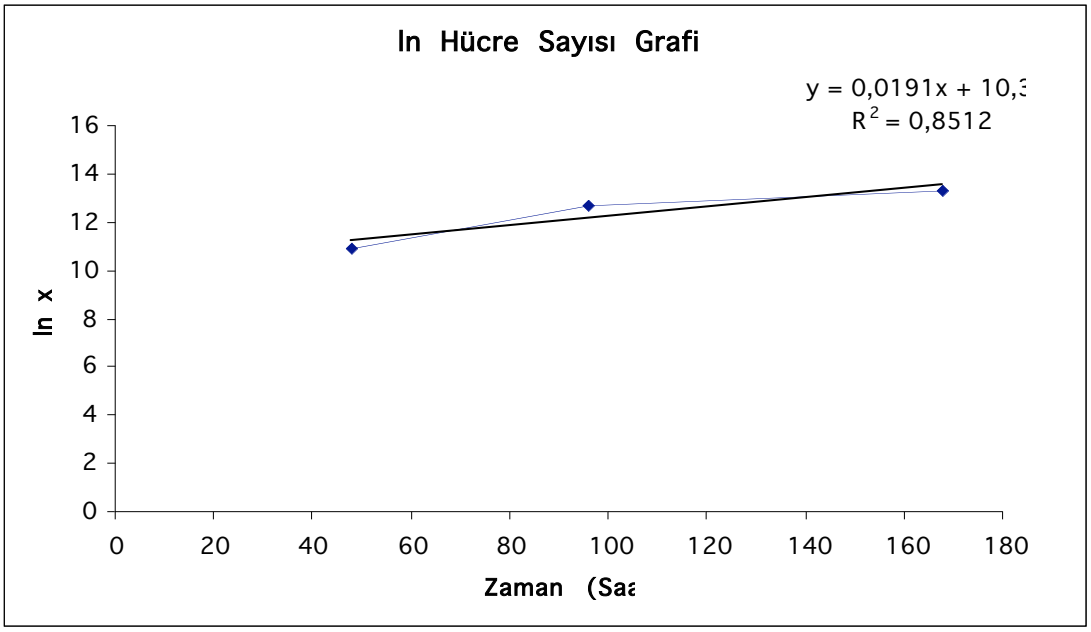
Bu denklik düzenlendiğinde;

$$\mu t = \ln x \qquad (4.2.)$$

şekline dönüşmektedir. Burada x, hücre sayısını, μ, özgül üreme hızını ve t de zamanı göstermektedir.



(a)

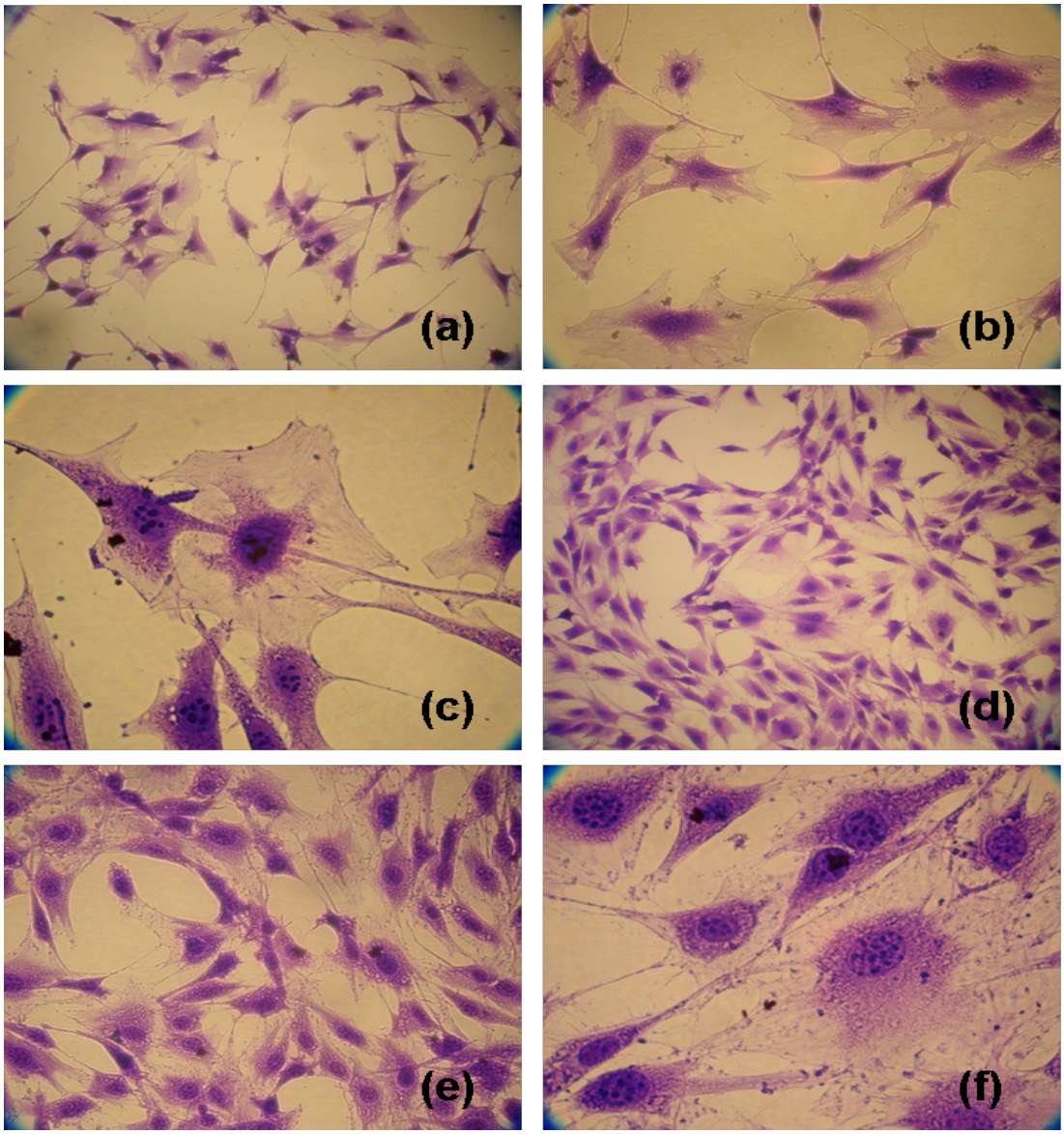


(b)

Şekil 4.12. Sayım testleri sonucu elde edilen MC3T3-E1 üreme grafiği (a) ve özgül üreme hızının hesaplanmasında kullanılan lnx-t grafiği (b).

Eşitlikten de görülebileceği gibi lnx'e larşı t'nin grafiği çizildiğinde, grafiğin eğimi özgül üreme hızını (μ) vermektedir (Şekil 4.12.b). Çalışmamızda, MC3T3-E1 için özgül üreme hızı, 0.019 h^{-1}, ikilenme süresi ise 36 saat olarak bulunmuştur.

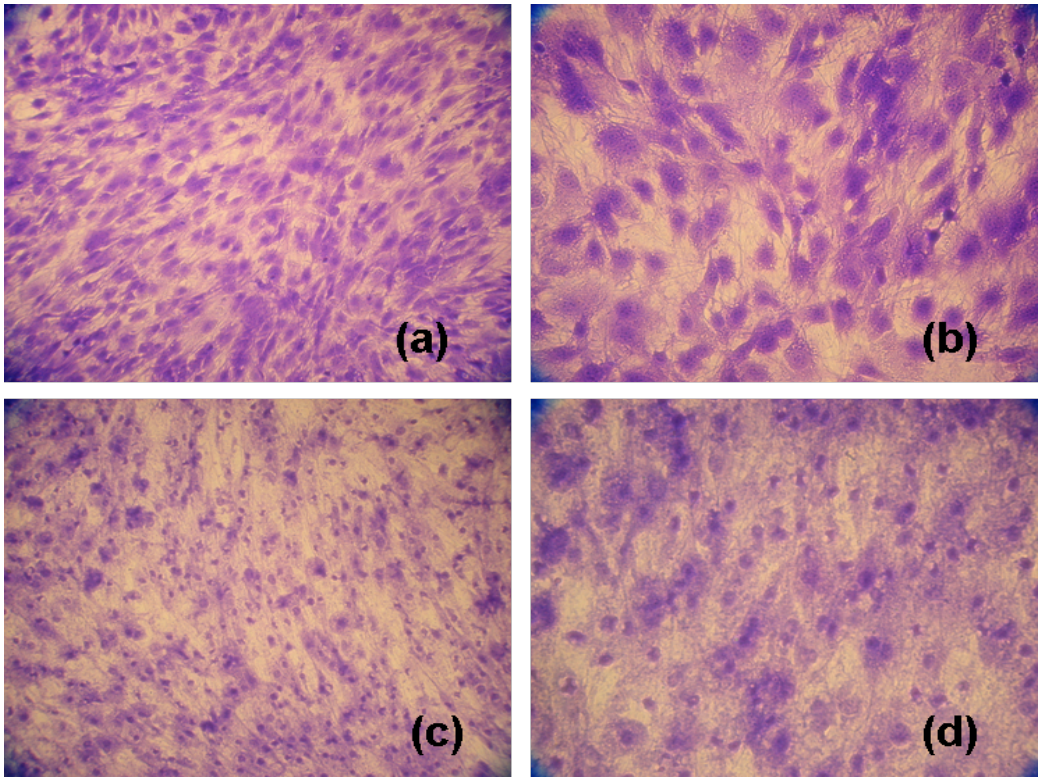
Bulunan bu değer, DSMZ'nin (Deutsche Sammlung von Mikro-organismen und Zellkulturen GmbH) sitesinde verilen ikilenme süresine (2-3 gün) uygundur.



Şekil 4.13. Kristal viyole ile boyanmış MC3T3-E1 hücrelerinin optik mikroskop görüntüleri: (a) 1. gün, 10X; (b) 1. gün, 20X; (c) 1. gün, 40X; (d) 3. gün, 10X; (e) 3. gün, 20X; (f) 3. gün, 40X.

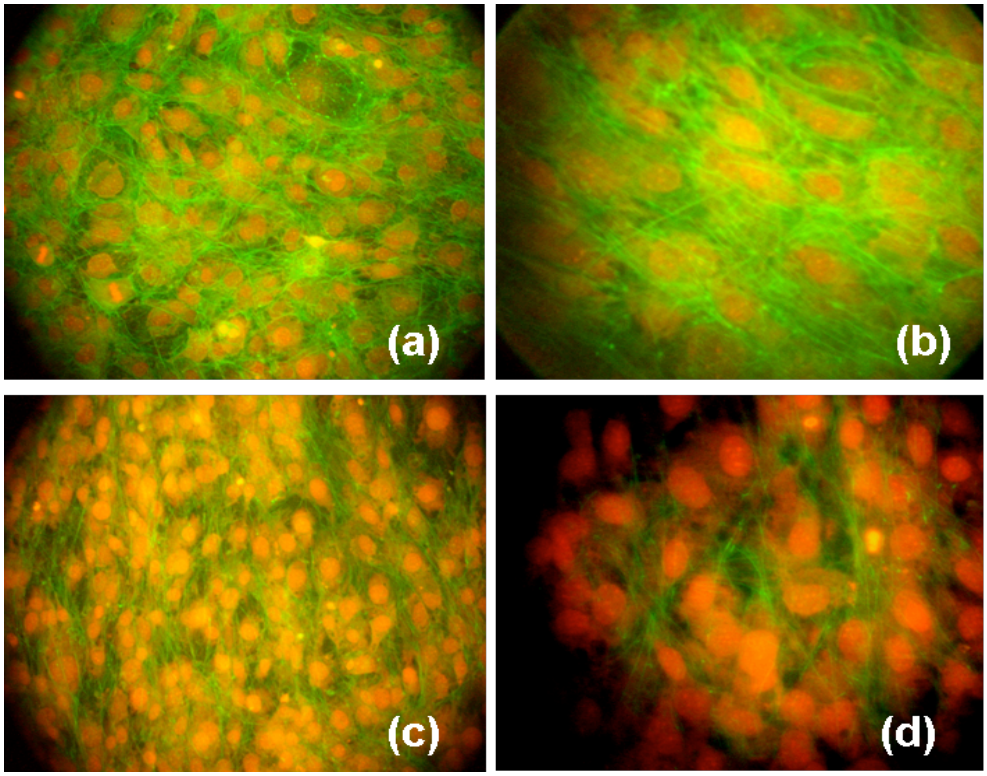
Hücrelerin günlük gözlemleri invert mikroskop kullanarak yapılmıştır. Ayrıca farklı kültür zamanlarında kristal viyole ile boyama yapılmış ve hücre fotoğrafları çekilmiştir (Şekil 4.13. ve 4.14.). Hücre morfolojileri, kültür zamanı uzadıkça iğsi bir görünüm sergilemeye başlamış, özellikle 9. günden sonra tipik fibroblastik morfoloji görülmüştür (Şekil 4.14.).

Ayrıca kültürün son günlerinde hücrelerde çok sayıda apoptotik keselerin oluştuğu ve hücrelerin morfolojilerinin tamamen bozulduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.14.). Üreme grafiklerinden de görülebileceği gibi, hücreler 30. günden sonra ölüm fazına girmişlerdir. Bu nedenle 30. günden sonra morfolojide görülen bu değişimler, hücre üreme grafiği verileriyle uyum içerisindedir.

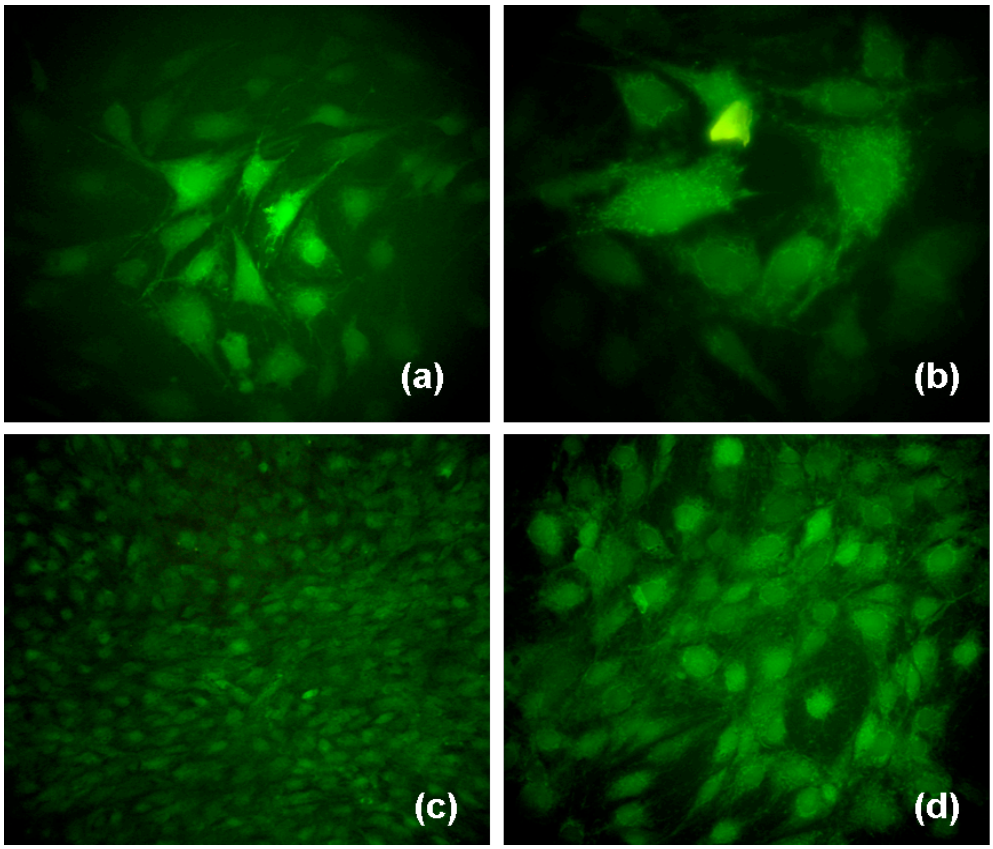


Şekil 4.14. Kristal viyole ile boyanmış MC3T3-E1 hücrelerinin optik mikroskop görüntüleri: (a) 9. gün, 10X; (b) 9. gün, 20X; (c) 30. gün, 10X; (d) 30. gün, 20X.

Alexa Fluor 488 phalloidin ve propidium iodide ile yapılan 2'li boyama sonucunda çekilen floresan mikroskopi fotoğraflarında çekirdek kırmızı, F-aktin ise yeşil olarak görülmektedir (Şekil 4.15.). Kültürün 7. ve 9. günündeki fotoğraflar karşılaştırıldığında, kültür süresi uzadıkça Alexa Fluor sinyalinin azaldığı gözlemlenmiştir. Aktin filamentlerin, hücre yüzey şeklinin oluşumunda görev alan hücre iskeleti yapıları olduğu bilinmektedir. Kristal viyole ile boyanmış hücre fotoğraflarında da görülebileceği gibi kültürün ilk günlerinde hücreler çok daha gelişmiş bir hücre iskelet yapısı göstermişlerdir. Ancak bu yapı ilerleyen günlerde kaybolmuş, hücreler mekik yapısı kazanmışlardır. Hücrelerin canlılık testleri 4. ve 13. günlerde floresan diasetat (FDA) boyası kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.16.). Membran bütünlüğüne dayanan bu boyamada, canlı hücreler yeşile boyanırken ölü hücreler boyanmamaktadır.



Şekil 4.15. MC3T3-E1 hücrelerinin floresan boyanması: (a) 7. gün, 20X; (b) 7. gün, 40X; (c) 9. gün, 20X; (d) 9. gün, 40X.



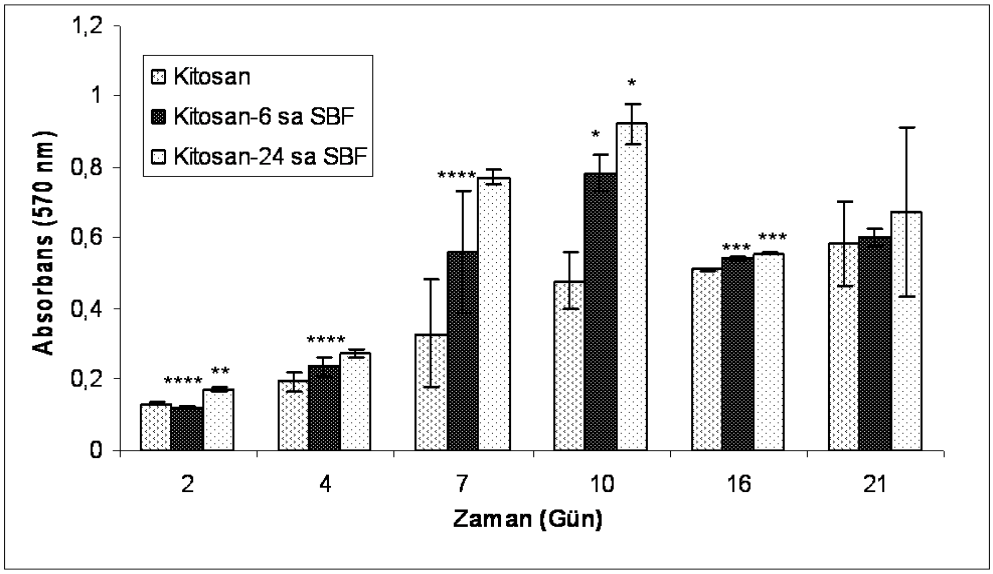
Şekil 4.16. MC3T3-E1 hücrelerinin FDA ile boyanması: (a) 4. gün, 20X; (b) 4. gün 40X; (c) 13. gün, 4X; (d) 13. gün, 20X.

4.2.2. Pre-osteoblast MC3T3-E1 hücreleri ve kitosan doku iskeleleri ile yapılan çalışmalar

Kitosan bazlı doku iskelelerinin üretimi ve karakterizasyon çalışmalarından sonra yapıların kemik hücrelerinin üremesi, morfolojisi ve farklılaşması üzerindeki etkisi hücre kültür deneyleriyle incelenmiştir. Hücrelerin üremesi MTT testi ile değerlendirilirken, doku iskelesi ile etkileşimleri SEM, doku iskelesi içerisinde yayılımları ve morfolojileri CLSM, farklılaşmaları ise osteokalsin, ALP miktarlarının ölçümü ve kalsiyum birikiminin belirlenmesi ile incelenmiştir.

4.2.2.1. MTT analizi

MC3T3-E1 hücrelerinin kitosan doku iskeleleri üzerindeki mitokondriyal redoks aktiviteleri; oksidatif fosforilasyon ve trikarboksilik asit çevriminde önemli rol oynayan kompleks II'de (succinate:ubiquinone oxidoreductase complex) bulunan mitokondriyal süksinat dehidrogenazın MTT'yi suda çözünmeyen, mor formazan kristallerine çevirmesiyle değerlendirilmiştir. Yalnızca canlı hücrelerin mitokondrilerinde gözlenen bu olay sayesinde, hücrelerin üremesi, canlılığı ve çeşitli malzemelerin hücreler üzerindeki etkisine (örneğin sitotoksisite) yönelik bilgi edinilmesi mümkündür. Hücreler 21 gün boyunca incelenmiş ve elde edilen MTT sonuçları 570 nm'de absorbans değerleri olarak verilmiştir (Şekil 4.17. ve 4.18.)

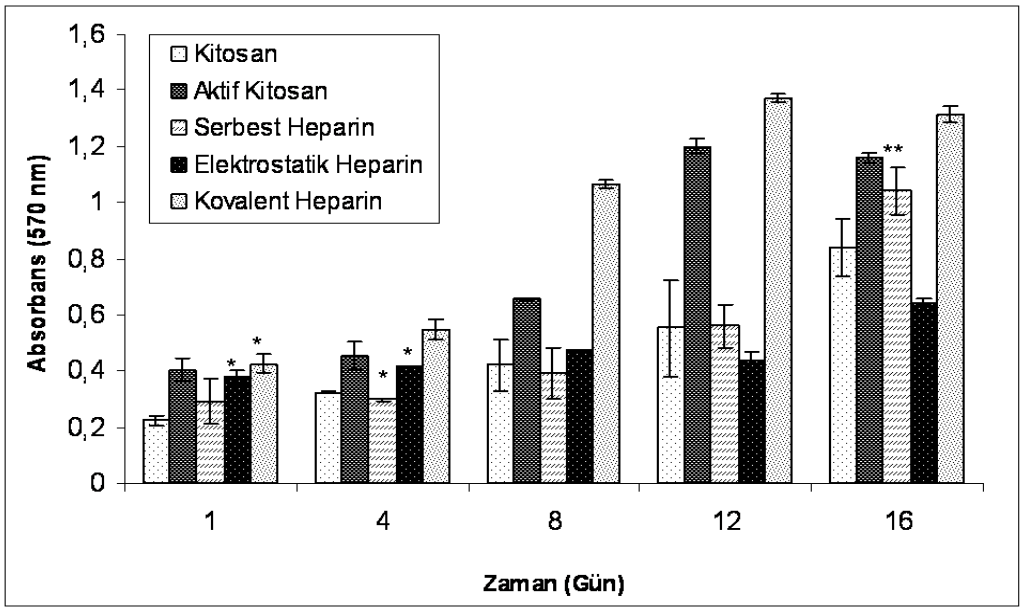


Şekil 4.17. Biyomimetik apatit kaplı kitosan doku iskeleleriyle yapılan çalışmalar sonucu elde edilen MC3T3-E1 üreme (MTT) değerleri (İstatistiksel önem farklılığı,

n=3, kontrol grubu kitosan, *: p<0.0001, * * : p<0.0005, * * * : p<0.005 ve * * * * : p<0.05).

Şekil 4.17.'de görüldüğü gibi, kültürün ilk günlerinde apatit kaplı iskeleler ile herhangi bir muamele görmemiş kitosan doku iskeleleri arasında hücre üremesi açısından önemli bir fark gözlemlenmemiştir. Ancak özellikle kültürün ilk haftasından sonra 24 sa SBF ile muamele edilmiş iskelelerde hücre üremesi önemli bir biçimde artmıştır. Bu fark, 10. günde bir pik noktasına ulaşmış, fakat bu günden sonra kitosan iskeleler üzerindeki hücre sayısı artmaya devam ederken SBF ile muamele edilmiş kitosan iskelelerde değerler düşüş göstermiştir. Bunun nedeni SBF kaplı doku iskelelerin 10. günden sonra hücre üremesi üzerindeki olumsuz etkisi değil; bu günden itibaren kitosan doku iskelelerin parçalanmaya başlamasıdır. Yapıya katılan apatit, iskelelerin biyobozunurluğunu arttırmış, iskeleler parçalanmaya başladığından hücreler kaybedilmiştir. Parçalanmadan kaynaklanan bu değer düşüşü dışında, MTT değerleri 21 gün boyunca sürekli bir artış göstermiştir. Bu artış, hücrenin logaritmik fazda olduğu 4 ile 7 günleri arasında çok daha fazla iken özellikle 10. günden sonra artış hızı önemli ölçüde azalmıştır. Kemiğin inorganik matrisine oldukça benzer yapıda olan kalsiyum fosfat tuzları, doku iskelelerinin osteoindüktif ve ostekondüktif özelliklerini arttırmak amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca, polimer iskelelere emdirilen seramik partiküllerin serum proteinlerinin doku iskelesi içerisinde yayılımını arttırdığı bilinmektedir (Hutmacher *et al.*, 1998). Bazı çalışmalarda ise yüzey pürüzlülüğünün hücre morfolojisi ve proliferasyonunu etkilediği ortaya konmuştur (Linez-Bataillon *et al.*, 2002; Dalby *et al.*, 2002).

Heparin bağlı doku iskeleleri ile yapılan çalışmalar ise kültürün ilk gününden itibaren heparinin hücre üremesi üzerindeki etkisini ortaya koymuştur. İlk gün değerleri incelendiğinde aktif ve heparin bağlı doku iskelelerinin modifiye edilmemiş kitosana göre daha yüksek değerler gösterdiği görülmüştür. Heparinin düşük serum miktarına (% 5) sahip ortamlarda, kültürün başlarında hücre üremesi üzerinde herhangi bir uyarıcı etkisinin olmadığı, ancak kültürün son günlerinde heparin immobilize doku iskelelerinin daha yüksek MTT değerleri gösterdiği daha önce ortaya konmuştur (Türkoğlu Şaşmazel *et al.*, 2007).



Şekil 4.18. Heparin-bağlı kitosan doku iskeleleriyle yapılan çalışmalar sonucu elde edilen MC3T3-E1 üreme (MTT) grafiği (İstatistiksel önem farklılığı, n=3, kontrol grubu kitosan, *: $p<0.0001$ ve * * : $p<0.005$).

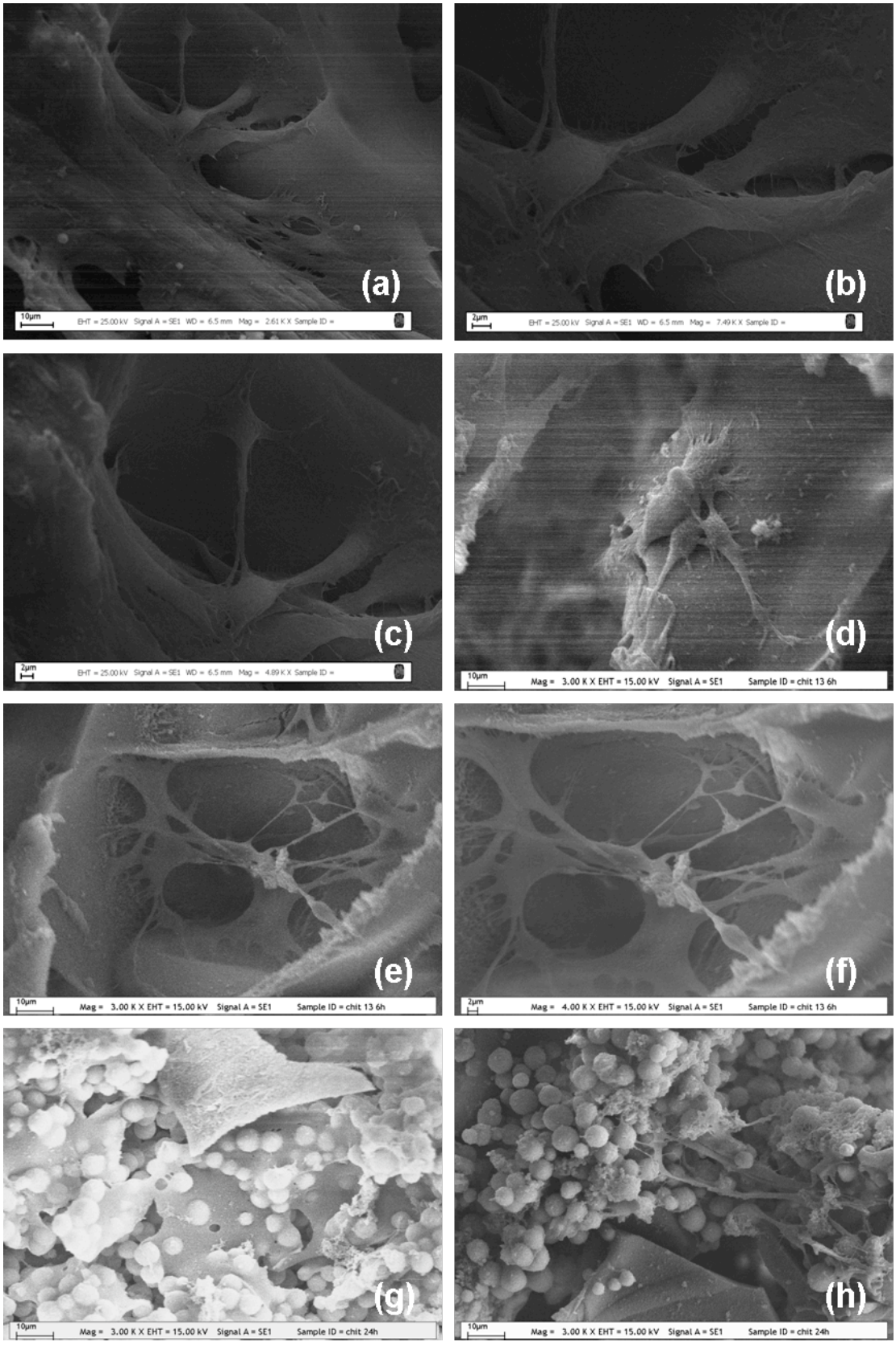
Heparinin bu şekilde etki göstermesindeki temel mekanizma, bazik fibroblast büyüme faktörü gibi önemli biyosinyal moleküllerinin heparine olan ilgisidir. Bu faktörler, heparine bağlanarak hücre üremesini stimüle etmektedir. Ancak çalışmamızda kullanılan serum miktarı % 10'dur. Yapılan çalışmalar, heparinin yalnızca çeşitli sitokin ve büyüme faktörlerini değil, fibronektin gibi hücre yapışmasında büyük önem taşıyan molekülleri de kendisine bağladığını göstermiştir. Hücre kültür çalışmasında, heparinin uyarıcı etkisi bu noktada karşımıza çıkmaktadır. Bilindiği gibi, hücrelerin yüzeylere yapışması fibronektin üzerinden gerçekleşmektedir. Hücre kültür ortamlarında ise fibronektinin en önemli kaynağı serumdur. Kitosan iskelelerin yapısında bulunan heparin, serum içerisindeki fibronektini kendisine bağlamış, bu sayede hücre yapışması arttırılmıştır. Daha önceki bölümlerde belirtildiği gibi, GAG-büyüme faktörü etkileşimlerinin 3 boyutlu doğasının, çözeltideki etkileşimlerden farklı olabileceği düşünülmektedir (Tillman *et al.*, 2006). Bu nedenle heparinin serbest formunun kullanılması sonucu elde edilen değerler heparin bağlı yapılara göre az da olsa fark göstermiştir. Çalışmamızda, 10 USP ünite/ml olacak şekilde serbest heparin içeren kültür ortamları hazırlanmış, bu değer, literatürde yaygın olarak kullanıldığından tercih edilmiştir (Nagy *et al.*, 1995). Aktif kitosan iskelelerde

kültürün başında görülen uyarıcı etki de oldukça önemlidir. Bu iskelelerdeki aktif fonksiyonel gruplar, hücre yapışması ve üremesini uyarmıştır.

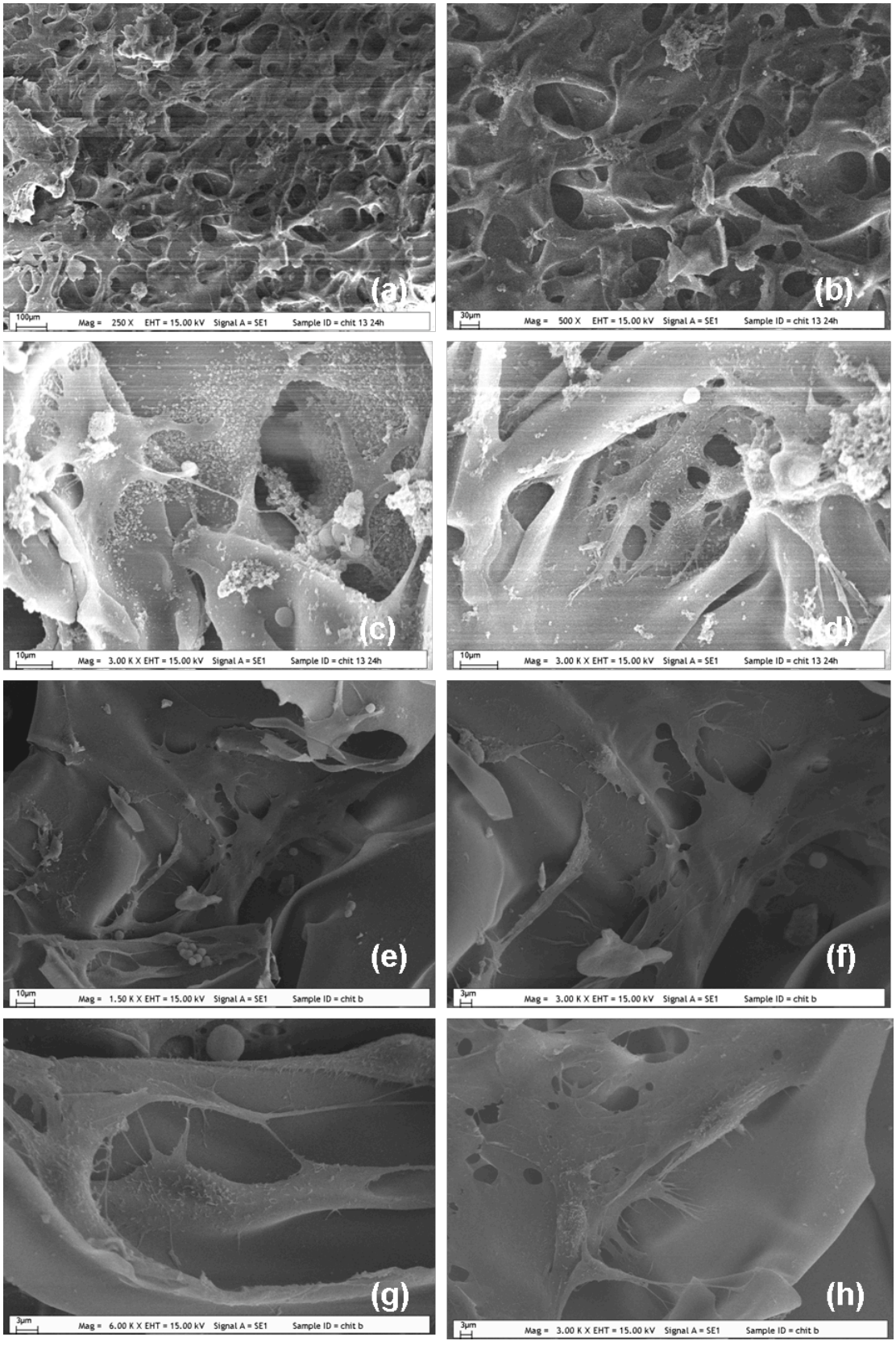
Elektrostatik etkileşimle yapıya bağlanmış heparinin ilk gün hücreler üzerinde gösterdiği uyarıcı etki, kültürün ilerleyen günlerinde ortadan kalkmış, bu yapıdaki hücreler, serbest heparine benzer MTT değerleri ve üreme eğilimi göstermişlerdir. Salım çalışmalarında da belirtildiği gibi, 20 günlük inkübasyon sonunda elektrostatik etkileşimin söz konusu olduğu yapılarda bulunan heparinin % 47'si salınırken, kovalent bağlı iskelelerde salım çok az olduğundan miktarlar uygun bir şekilde ölçülememiş ve salım grafiği çıkarılamamıştır. Elektrostatik etkileşimin, serbest heparine benzer değerler göstermesi ve kovalent bağlı heparinin bu 2 gruba göre oldukça yüksek MTT değerleri vermesi (hücre üremesini teşvik etmesi), kemik hücrelerinde yapıya bağlı heparinin, serbest heparinden çok daha farklı bir mekanizmayla etki gösterdiğini düşündürmüştür. Aktif kitosan ve kovalent heparin immobilize iskelelerde, hücreler özellikle 8. ve 12. günlerde oldukça yüksek MTT değerleri gösterirken (hücreler daha önce logaritmik faza girerken), serbest heparin ve elektrostatik etkileşimin söz konusu olduğu durumda, ancak 12. günden sonra hücre üremesi belirgin bir şekilde artmıştır. Tüm kültür periyodu göz önüne alındığında, özellikle malzemeye kovalent olarak bağlı heparinin hücre üremesi üzerinde uyarıcı bir etkiye sahip olduğu görülmektedir.

4.2.2.2. Taramalı elektron mikroskop (SEM) ile analiz

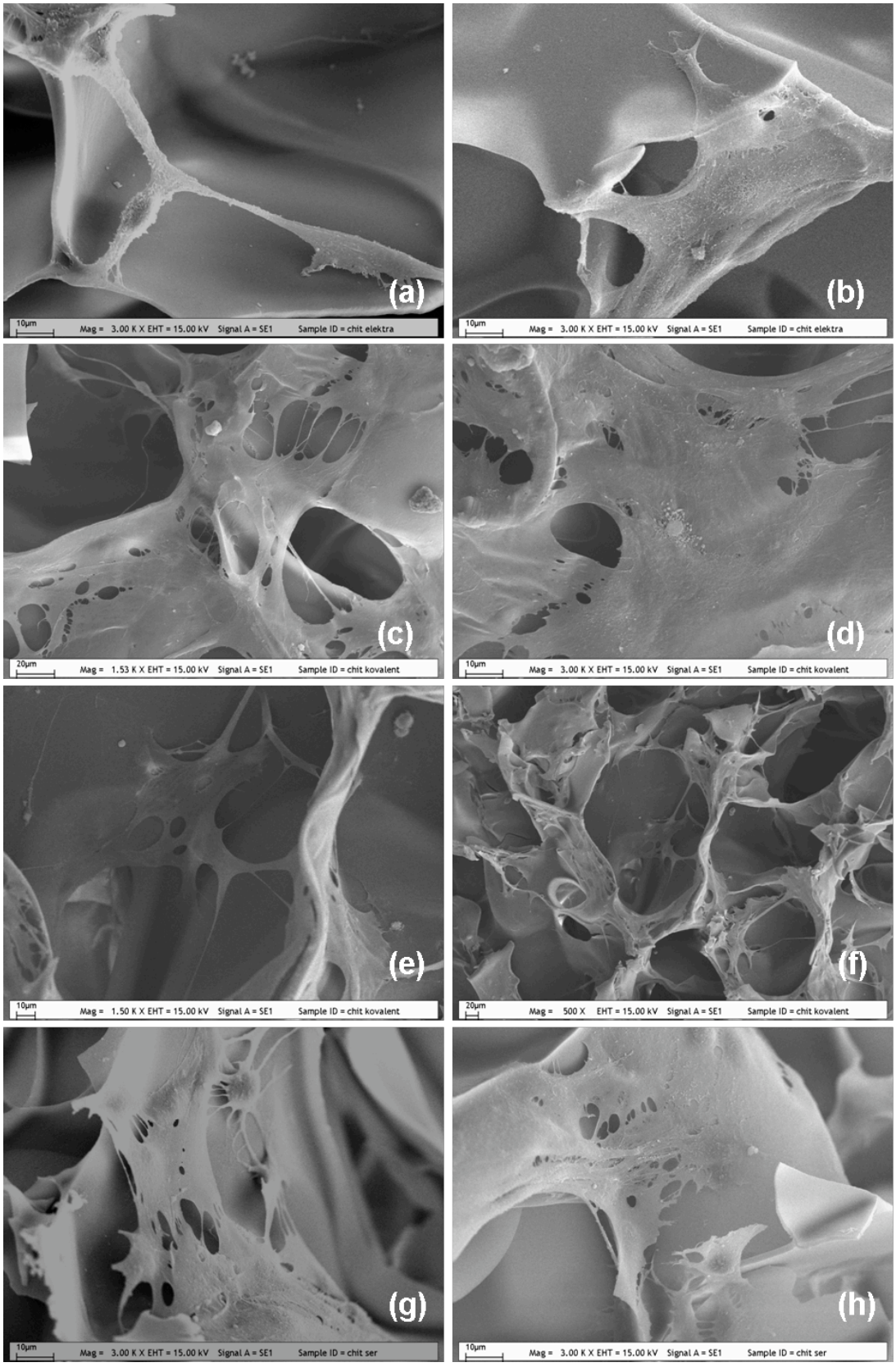
Hücrelerin doku iskelesi ile etkileşimlerinin incelenmesi amacıyla, SBF çalışması için kültürün 7. ve 13. günlerinde, heparin çalışması içinse 4. ve 11. günlerde SEM görüntüleri alınmıştır. 24 sa SBF çalışması için alınan görüntülerde, özellikle kültürün başında, hücrelerin apatit kristalleri arasında hücredışı matris oluşturmaya başladıkları görülmüştür (Şekil 4.19.g). 6 sa SBF ile muamele edilmiş iskelelerde ise hücrelerin apatit kristalleri üzerinden yayıldıkları gözlemlenmiştir (Şekil 4.19.e,f). 24 sa SBF ile muamele edilmiş iskelelerde, 13. günde, yapının tamamen hücre dışı matris ile kaplandığı ve hücrelerin iskelenin iç kısımlarına inerek burada bulunan apatit kristalleri üzerine yapışmaya başladıkları gözlemlenmiştir (Şekil 4.20.c,d). SEM görüntüleri tüm örneklerde hücrelerin iyi bir şekilde iskeleye bağlanarak ECM salgılamaya başladığını göstermiştir.



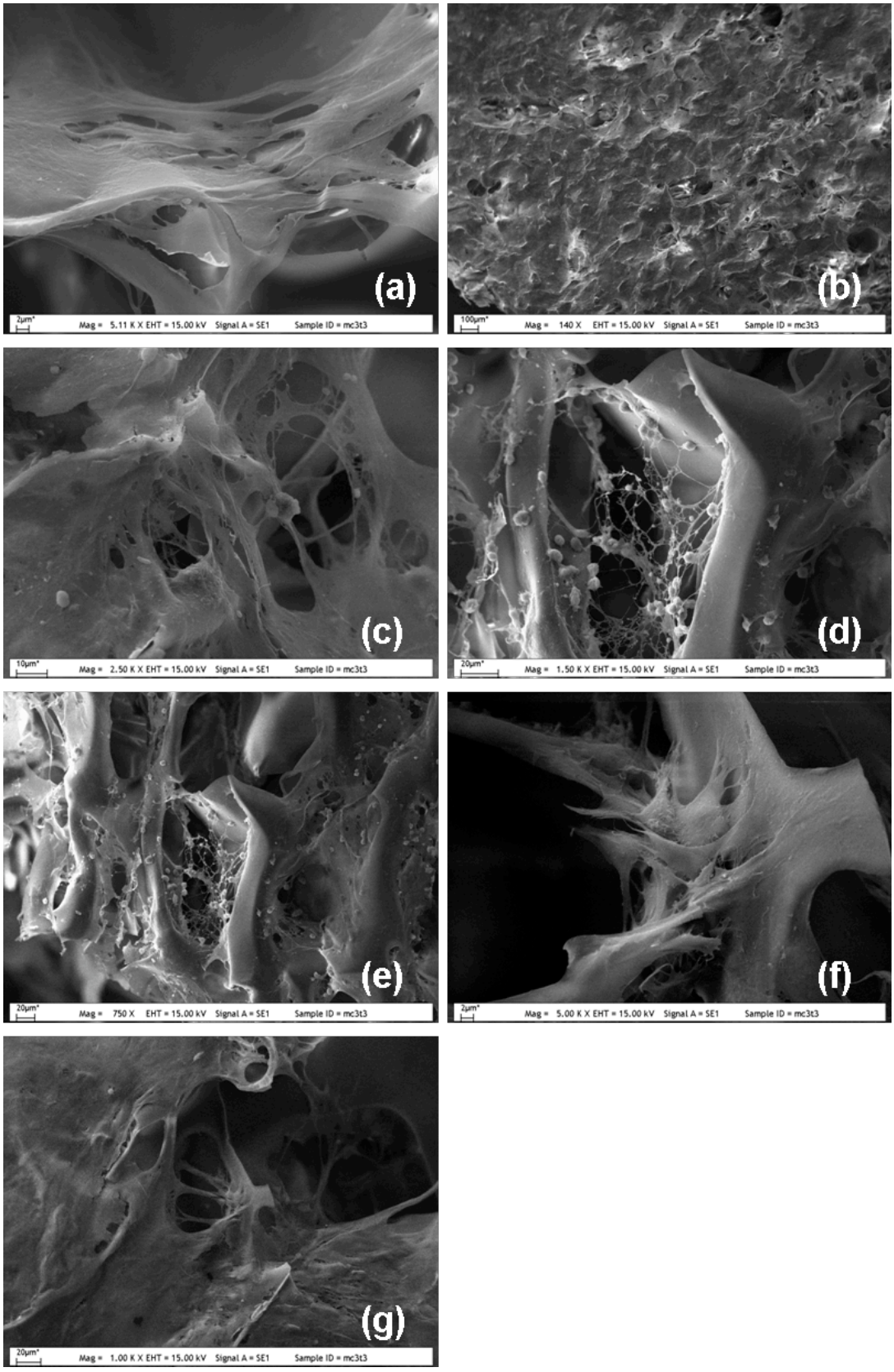
Şekil 4.19. 6 sa SBF ile muamele edilmiş kitosan doku iskeleleri üzerindeki MC3T3-E1 hücrelerinin SEM fotoğrafları: (a) 7. gün, 2.61 KX; (b) 7. gün, 7.49 KX; (c) 7. gün, 4.89 KX; (d) 13. gün, 3.00 KX; (e) 13. gün, 4.00 KX; (f) 13. gün, 3.00 KX; 24 sa SBF ile muamele edilmiş kitosan doku iskeleleri üzerindeki MC3T3-E1 hücrelerinin SEM fotoğrafları: (g) 7. gün, 3.00 KX; (h) 7. gün, 3.00 KX.



Şekil 4.20. 24 sa SBF ile muamele edilmiş kitosan doku iskeleleri üzerindeki MC3T3-E1 hücrelerinin SEM fotoğrafları: (a) 13. gün, 250 X; (b) 13. gün, 500 X; (c) 13. gün, 3.00 KX; (d) 13. gün, 3.00 KX; Muamele görmemiş kitosan doku iskeleleri üzerindeki MC3T3-E1 hücrelerinin SEM fotoğrafları: (e) 13. gün, 1.50 KX; (f) 13. gün, 3.00 KX; (g) 13. gün, 6.00 KX; (h) 13. gün, 3.00 KX.



Şekil 4.21. Kitosan doku iskeleleri üzerindeki MC3T3-E1 hücrelerinin SEM fotoğrafları, 4.gün. Elektrostatik etkileşimle heparin bağlanmış doku iskeleleri: (a) 3.00 KX; (b) 3.00 KX; Kovalent bağlı heparin içeren doku iskeleleri: (c) 1.53 KX; (d) 3.00 KX; (e) 1.50 KX; (f) 500 X; Serbest heparin (10 USP ünitesi/ ml): (g) 3.00 KX; (h) 3.00 KX.



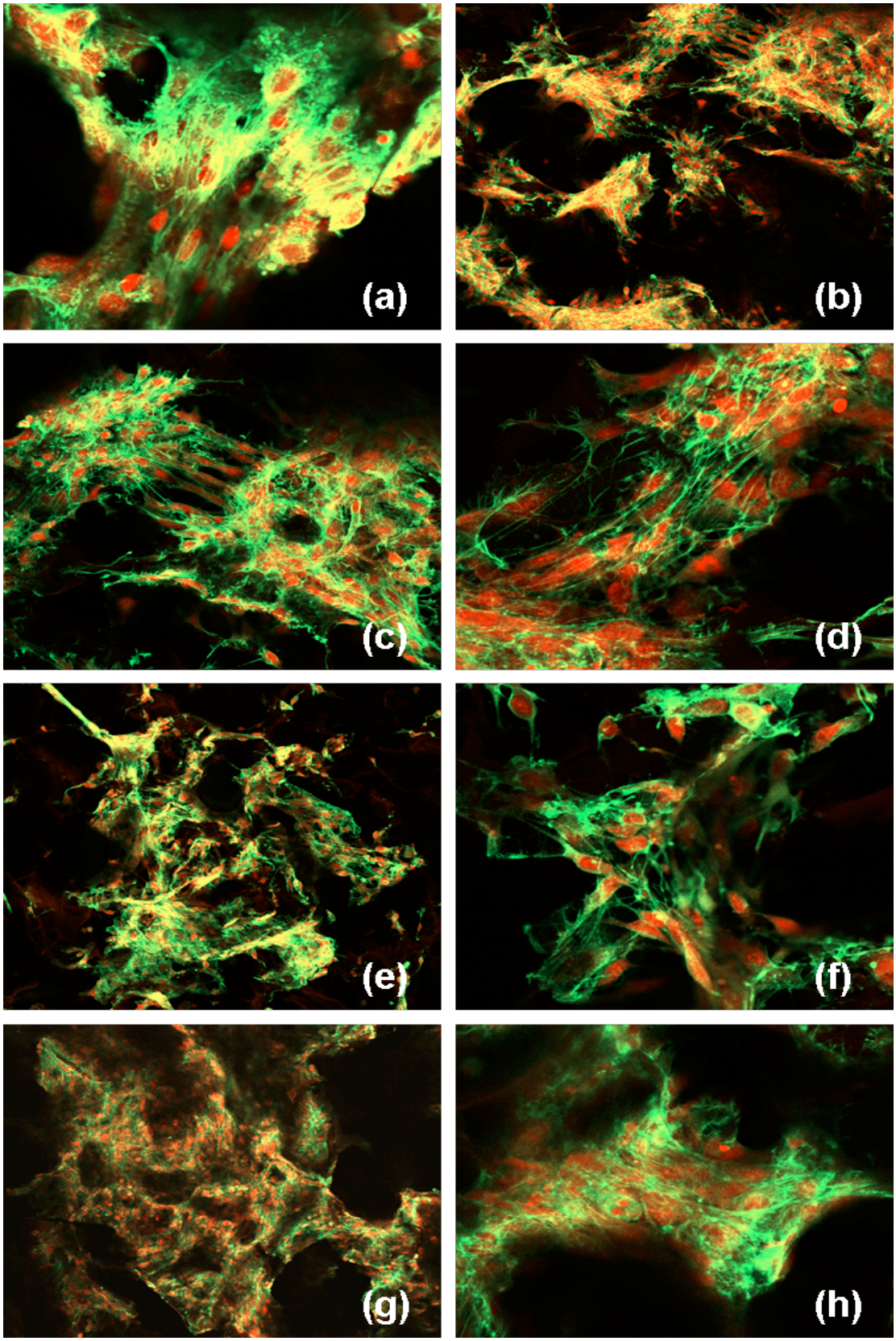
Şekil 4.22. Kitosan doku iskeleleri üzerindeki MC3T3-E1 hücrelerinin SEM fotoğrafları, 11.gün. Elektrostatik etkileşimle heparin bağlanmış doku iskeleleri: (a) 5.11 KX; Kovalent bağlı heparin içeren doku iskeleleri: (b) 140 X; (c) 2.50 KX; Aktif kitosan: (d) 1.50 KX; (e) 750 X; Serbest heparin (10 USP ünitesi/ ml): (f) 5.00 KX; (g) 1.00 KX.

Heparin immobilize edilmiş doku iskelelerinden çekilen SEM görüntülerinde, henüz kültürün 4. gününde heparinin kovalent olarak bağlandığı doku iskelelerindeki hücrelerin çok iyi bir şekilde yapıştıkları ve ECM oluşturmaya başladıkları gözlemlenmiştir (Şekil 4.21.c, d). Kültürün 11. gününde, bu yapılar, tıpkı 13. günde 24 sa SBF ile muamele edilmiş iskelelerdeki gibi tamamen hücreler ve ECM ile kaplanmıştır. Serbest heparin örneklerinde de benzer şekilde yoğun ECM oluşumu gözlemlenmiş, özellikle aktif kitosan iskelelerde görülen iplikçikler dikkat çekmiştir (Şekil 4.22.d, e).

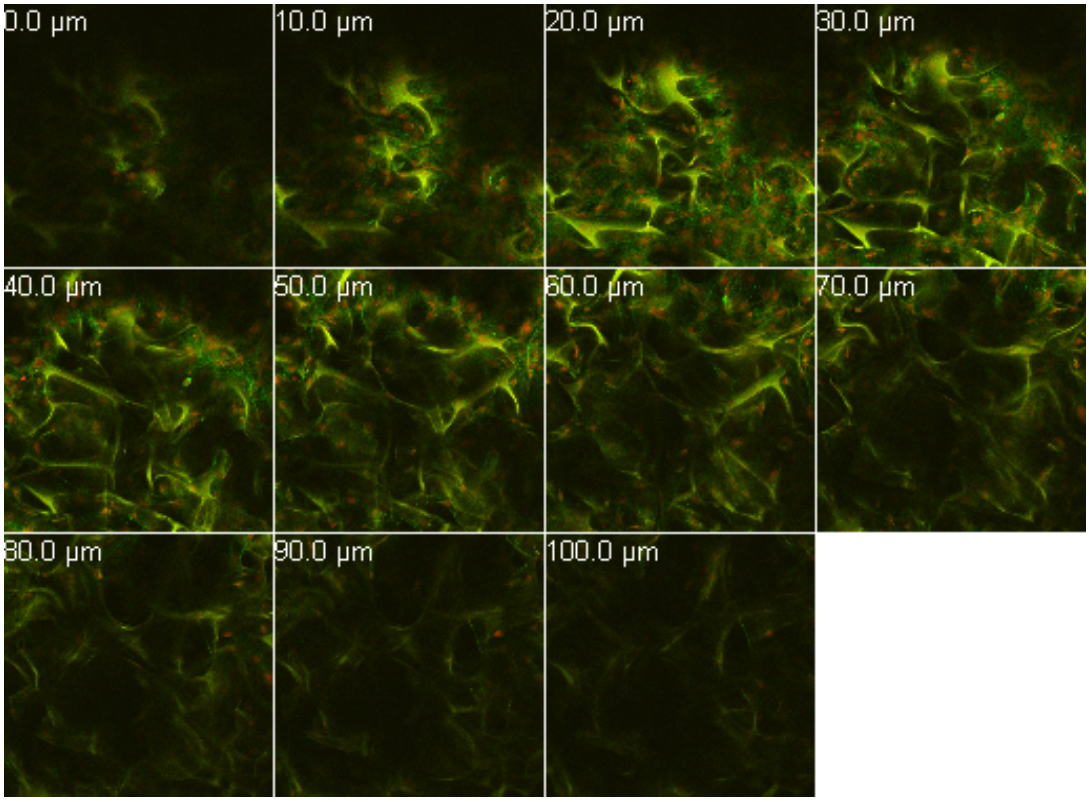
4.2.2.3. Konfokal lazer taramalı mikroskop (CLSM) ile analiz

Doku iskelelerinin farklı katmanlarındaki hücrelerin yoğunluğu ve morfolojileri konfokal lazer taramalı mikroskobu ile görüntülenmiştir. SBF çalışması için 4. ve 8. günlerde, heparin çalışması içinse 8. günde konfokal çekimi gerçekleştirilmiştir. Konfokal resimleri, 24 sa SBF ile muamele edilmiş kitosan iskelelerde diğer iskelelere kıyasla hücre yoğunluğunun çok daha fazla olduğunu göstermiştir (Şekil 4.23.). Özellikle kültürün 8. gününde hücre yoğunluğundan dolayı hücreler arası etkileşimleri gösteren fotoğraflar çekilememiş, bunun yerine doku iskelesi bir bütün olarak görüntülenmiştir (Şekil 4.23.g). Söz konusu günde, 6 sa SBF ile muamele edilmiş doku iskelelerinde ise hücrelerin birbirleriyle olan etkileşimleri ve F-aktin yapıları çok net bir şekilde incelenebilmiştir. Tüm iskelelerde, hücreler doku iskelesi içerisine göç etmişlerdir.

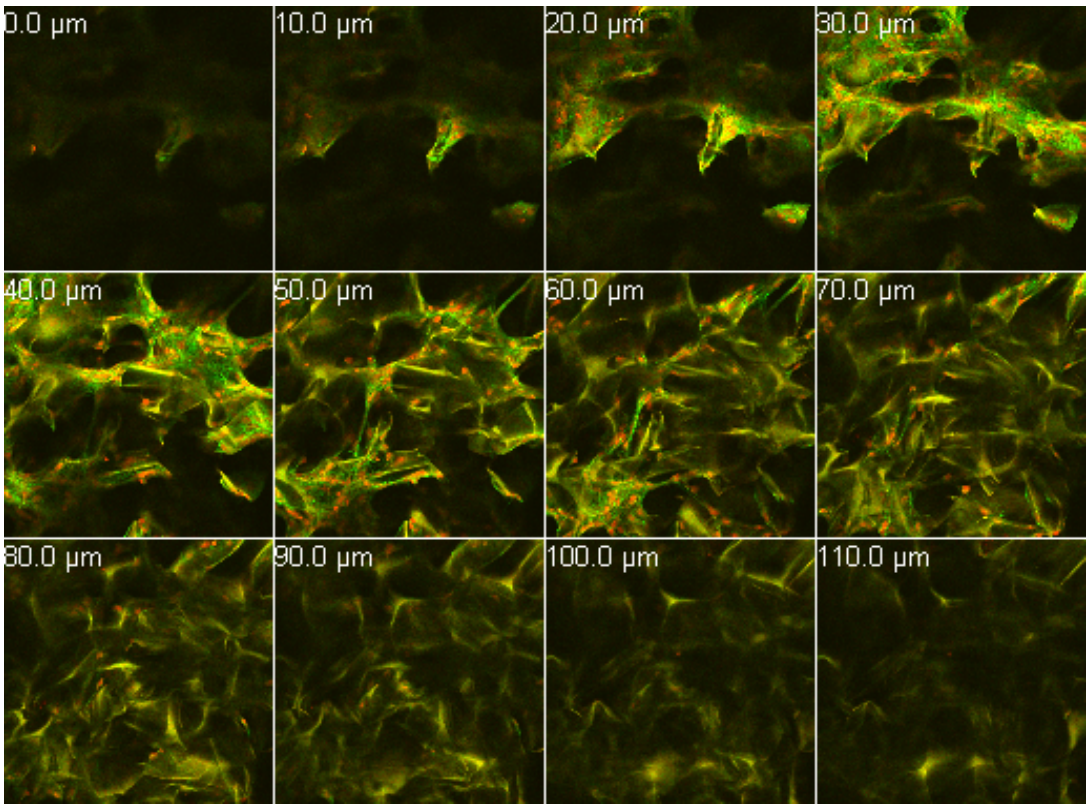
Heparin çalışması için çekilen konfokal mikroskopi fotoğrafları, osteoblastların iskelenin içerisine göç ettiğini ve yüzeyden 100 mikron kadar derinlikte dahi hücrelerin bulunduğunu göstermiştir (Şekil 4.24. ve 4.25.). Ayrıca, konfokal çekimleri sonucunda heparinin kovalent olarak bağlandığı doku iskelelerinde hücre yoğunluğunun diğer tüm iskelelerden daha fazla olduğu görülmüştür. Konfokal mikroskobu ile yapılan bu analiz sonucu elde edilen tüm tabakalar Zeiss LSM Image Browser programı kullanılarak üst üste konulmuş, bu sayede hücrelerin iskeledeki konumunu, birbirleriyle olan etkileşimlerini ve hücre yoğunluklarını gösteren fotoğraflar elde edilmiştir (Şekil 4.26.). Fotoğraflardan da görülebileceği gibi, modifiye edilmemiş kitosan doku iskeleleri ile karşılaştırıldığında, heparin immobilize yapılardaki hücre yoğunluğu oldukça fazladır.



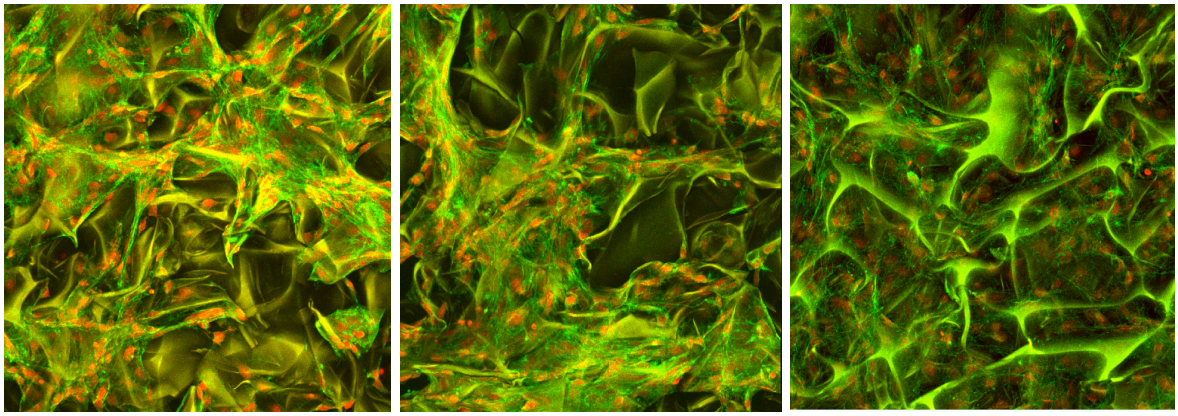
Şekil 4.23. SBF kaplı doku iskelelerinde MC3T3-E1 hücrelerini gösteren konfokal mikroskop fotoğrafları: Muamele görmemiş kitosan iskele: (a) 20X, 8.gün; 6 sa SBF ile muamele edilmiş iskele: (b) 10X, 8. gün; (c) 20X, 8. gün; (d) 40X, 8. gün; 24 sa SBF ile muamele edilmiş iskele: (e) 10 X, 4.gün; (f) 20 X, 4.gün; (g) 10X, 8. gün (h) 40X, 8.gün.



Şekil 4.24. Kovalent bağlı heparin içeren kitosan iskelelerde farklı derinliklerdeki MC3T3-E1 hücre yoğunlukları.



Şekil 4.25. Modifiye edilmemiş kitosan iskelelerde farklı derinliklerdeki MC3T3-E1 hücre yoğunlukları.

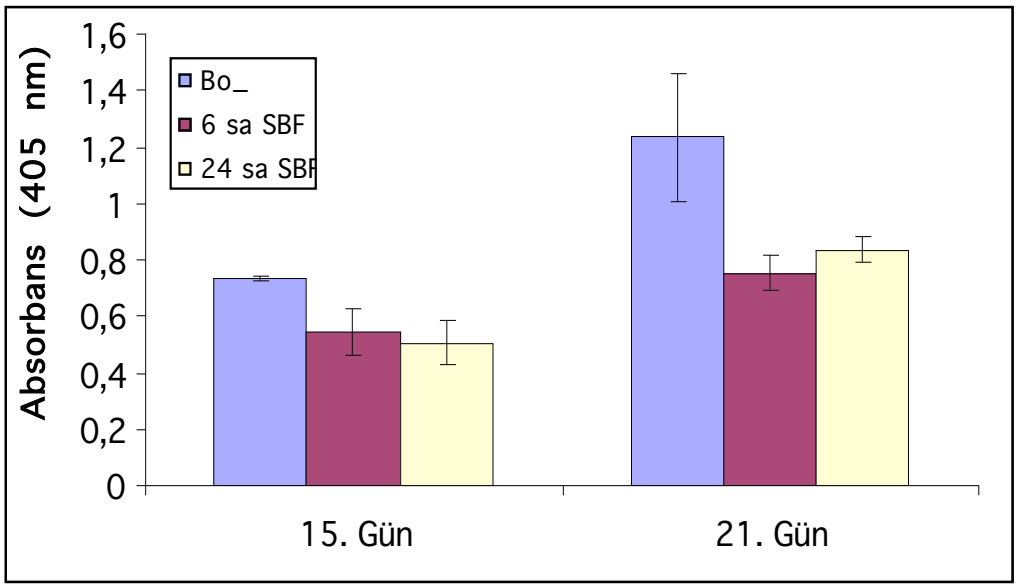


Şekil 4.26. Tüm katmanların üst üste konulması sonucu elde edilen ve hücrelerin 3 boyutlu iskele içerisindeki dağılımını gösteren konfokal mikroskop görüntüleri: modifiye edilmemiş kitosan (solda), serbest heparin içeren yapılar (ortada), heparin bağlı kitosan (kovalent etkileşim) (sağda).

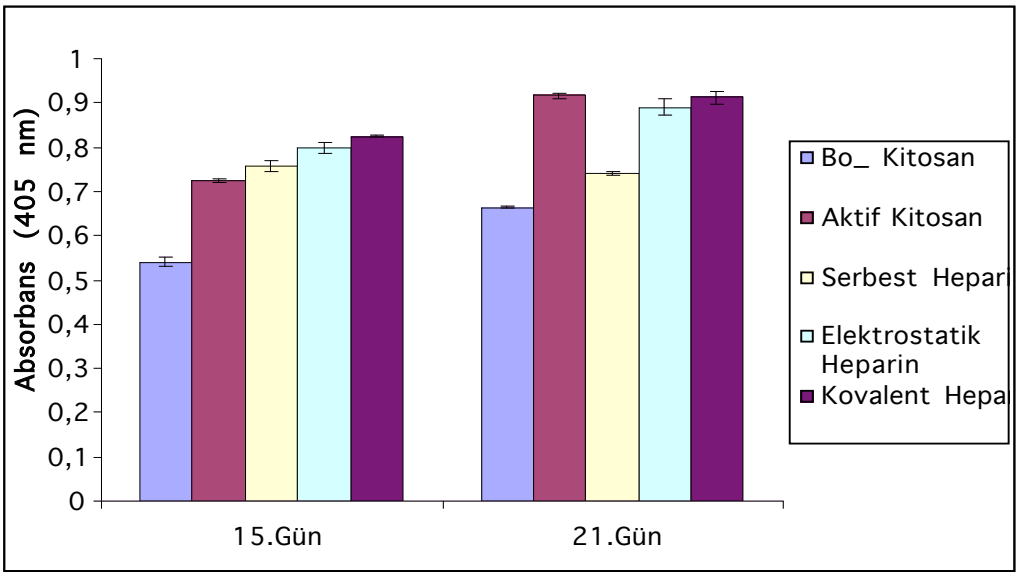
4.2.2.4. Hücre farklılaşmasının test edilmesi

Doku mühendisliği çalışmalarında kullanılan doku iskelelerinin yalnızca hücre üremesini sağlaması yeterli değildir. Söz konusu yapılar, hücrelerin 3 boyutlu çevrelerinde gösterdikleri morfolojinin korunmasını sağlaması ve hücre üremesini teşvik etmesi gibi özelliklere sahip olmanın yanı sıra, hücrelerin işlevlerini devam ettirmelerini de sağlamalıdır. Çalışmamızda, hücreler, özellikle kemik hücrelerinde protein sentezi boyunca salgılanan bir enzim olan alkalen fosfataz ve kemik mineralizasyonu için gerekli bir non-kollajen protein olan osteokalsin üretimi açısından değerlendirilmiştir. Ayrıca, SBF çalışmasında *in vitro* mineralizasyon, von Kossa boyaması kullanılarak değerlendirilmiştir. Bilindiği gibi ALP, erken osteoblastik farklılaşma aşamasının değerlendirilmesinde kullanılırken, *in vitro* mineralizasyon ve osteokalsin üretimi ise geç osteoblastik farklılaşmanın belirlenmesinde kullanılmaktadır. Yüksek pH'da monofosfat esterlerini hidroliz eden bir ektoenzim olan ALP, osteoblastların mineralize kemik matrise gömülerek osteosit haline gelmesiyle kaybolmaktadır (Kierszenbaum, 2006). ALP testi sonucu oluşan sarı p-nitrofenol ürününün absorbansı 405 nm'de ölçülmüş ve elde edilen değerler Şekil 4.27. ve 4.28.'de verilmiştir. Kültürün 10. gününden itibaren apatit kaplı iskelelerin parçalanmaya başlaması ve bu nedenle iskelelerin bir kısmının kaybedilmesi nedeniyle gerek 15., gerekse 21. günlerde apatit kaplı iskelelerin ALP absorbans değerleri, beklenen değerlerin altında çıkmıştır. Ancak tüm iskelelerin ALP absorbans değerlerinin 21. günde 15. güne göre daha yüksek olduğu görülmüştür. Yapılan istatistiksel değerlendirme sonucunda, gerek 15.

günde gerekse 21. günde 6 sa SBF ve 24 sa SBF muamelesi sonucu elde edilen kitosan iskeleler için verilen değerler arasında anlamlı bir fark olmadığı belirlenmiştir.



Şekil 4.27. SBF kaplı doku iskeleleri üzerindeki MC3T3-E1 hücreleri için bulunan ALP absorbans değerleri.

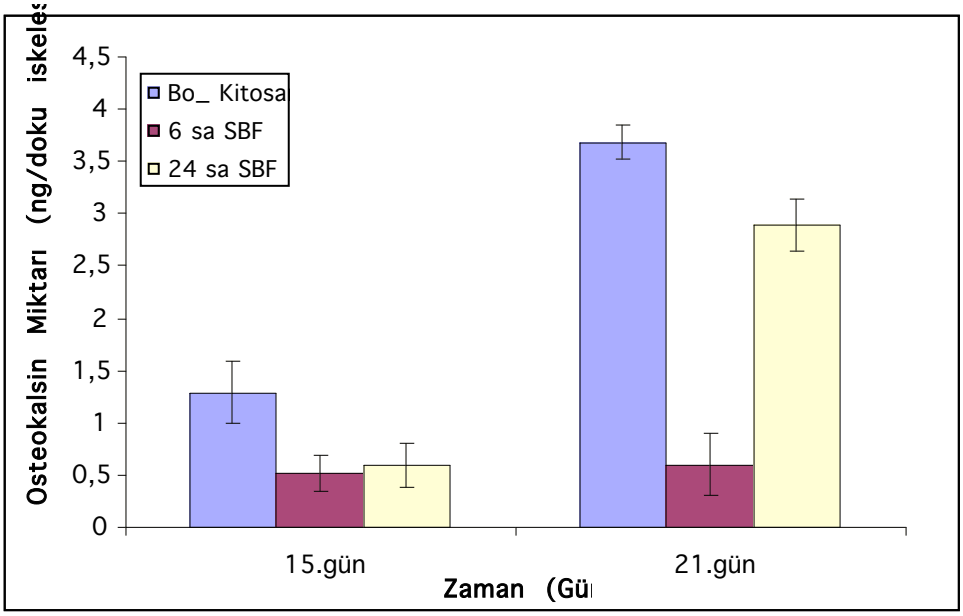


Şekil 4.28. Heparin immobilize edilmiş kitosan doku iskeleleri üzerindeki MC3T3-E1 hücreleri için bulunan ALP absorbans değerleri.

Heparinin kemik hücreleri üzerindeki etkisinin belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmalarda ise özellikle 15. günde, modifiye edilmemiş kitosan doku iskelesi hariç diğer tüm iskelelerdeki değerlerin hemen hemen aynı olduğu

gözlemlenmiştir. Yapılan istatistiksel değerlendirme, 15. ve 21. günlerde kitosanın kontrol olarak seçilmesi durumunda tüm iskeleler için p değerinin <0.0005 olduğunu göstermiştir. Ortamda serbest heparinin bulunduğu durum haricindeki tüm koşullarda, ALP absorbans değerlerinin 21. günde 15. güne göre daha yüksek olduğu görülmüştür. Kitosan-heparin arasındaki elektrostatik etkileşimden faydalanarak hazırlanan doku iskelelerinin MTT değerleri, kovalent bağlama ile hazırlanan iskelelere göre daha düşükken ALP aborbans değerleri birbirine oldukça yakın çıkmıştır.

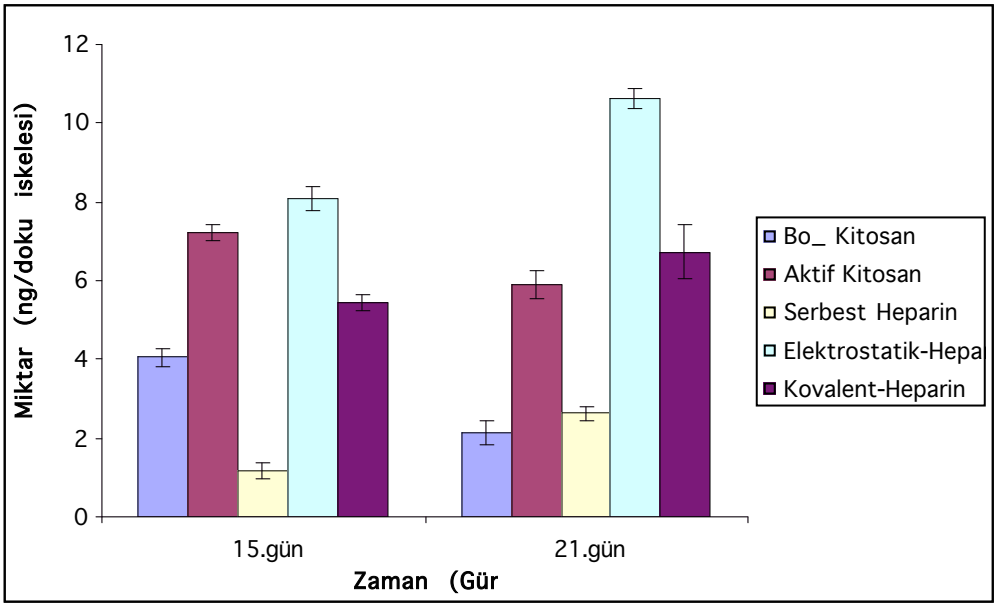
EISA kiti kullanılarak gerçekleştirilen osteokalsin çalışmasında ise 24 sa SBF muamelesinin 6 sa SBF muamelesine göre hücreler tarafından salgılanan osteokalsin miktarını çok daha fazla arttırdığı gözlemlenmiştir. Osteokalsin testinde de yine en yüksek değerler kitosan iskelerden elde edilmiştir. Modifiye edilmemiş kitosan iskelelerde ve 24 sa SBF ile kaplanmış yapılarda osteokalsin değerleri kültür zamanı uzadıkça artarken 6 sa SBF ile etkileşime sokularak hazırlanmış doku iskelelerinde bu değer hemen hemen sabit kalmıştır (Şekil 4.29.).



Şekil 4.29. SBF kaplı doku iskeleleri üzerindeki MC3T3-E1 hücreleri için bulunan osteokalsin miktarları.

Heparin çalışmasında ise 21. günde heparinli örnekler haricindeki doku iskelelerinde osteokalsin değerleri düşmüştür. Elektrostatik etkileşim esasına

dayanan doku iskelelerinin osteokalsin üretimi açısından da oldukça uygun malzemeler olduğu gözlemlenmiştir. Serbest heparin içeren doku iskeleleri ise osteokalsin üretimi açısından oldukça düşük değerlerde kalmıştır (Şekil 4.30.).



Şekil 4.30. Heparin immobilize edilmiş kitosan doku iskeleleri üzerindeki MC3T3-E1 hücreleri için bulunan osteokalsin miktarları.

Doku iskelesi içerisindeki hücrelerin hücre dışı matrislerinde biriken kalsiyumun belirlenmesi amacıyla SBF çalışmasında örnekler Von Kossa ile boyanmıştır. 21. günde gerçekleştirilen bu çalışmada, hücre içermeyen kitosan iskeleler de kontrol amacıyla test edilmiştir. Hücresiz doku iskeleleri karşılaştırıldığında, boş (modifiye edilmemiş) kitosan iskelesinde herhangi bir boyanma görülmezken 6 sa SBF kaplı ve 24 sa SBF kaplı iskeleler yoğun bir şekilde boyanmışlardır. Söz konusu malzemeler, içerdikleri apatit nedeniyle bu şekilde boyanmıştır. Hücre içeren yapılarda ise tüm örneklerde Von Kossa boyaması gerçekleşmiştir. Hücre içeren ve içermeyen apatit kaplı kitosan iskeleler karşılaştırıldığında ise hücre içeren yapıların çok daha fazla boyandığı görülmüştür (Şekil 4.31.).

MC3T3-E1 hücreleriyle yapılan tüm çalışmalar özetlenecek olursa, kültürün ilk 10 gününde, kaplama içermeyen iskelelerle karşılaştırıldığında, apatit kaplı doku iskelelerin hücre üremesini uyardığı ortaya konmuştur. Ancak apatit kaplama, yapıların biyobozunurluk özelliklerini değiştirmiş, malzemelerde kopmalar ve parçalanmalar görülmeye başlanmıştır. Ancak unutulmamalıdır ki; doku

iskelesinde meydana gelen bu değişimler *in vitro* kaynaklı olup; iskelenin kemik doku mühendisliği alanında kullanımının mümkün oldmadığı anlamına gelmemelidir. Kültürün 10. gününden sonra elde edilen MTT ve farklılaşma değerleri beklenenden düşük olsa da özellikle 24 sa SBF muamelesi görmüş yapılarda, hücre farklılaşma değerlerinin (ALP ve osteokalsin miktarları) kültür süresi uzadıkça arttığı gözlemlenmiştir.



Şekil 4.31. Von Kossa boyaması sonuçları.

Heparin bağlı yüzeylerde ise hücrenin gerek üremesi gerekse farklılaşması uyarılmıştır. Aktif kitosan olarak adlandırdığımız iskelelerde de benzer şekilde bir uyarım görülmüştür. Birçok büyüme faktörü, sitokin ve yapışmada görevli molekülün heparine yüksek ilgi gösterdiği bilinmektedir. Heparinin, hücre kültürünün başlarında çeşitli yapışma faktörlerini kendisine bağlayarak, kültürün ilerleyen dönemlerinde ise büyüme faktörleri, sitokinler ve farklılaşmada görevli kemik morfojenik proteinlerine etki ederek osteoblast hücrelerinin bağlanmasını, üremesini ve farklılaşmasını teşvik ettiği düşünülmüştür. Aktif kitosan ise içerdiği fonksiyonel gruplar nedeniyle hücreler üzerinde olumlu bir etki göstermiştir. Kitosanın yüzeyindeki pozitif yükler ile hücre membranlarındaki negatif yükler arasındaki güçlü etkileşimin, hücrelerin metabolik aktivitelerini arttırdığı

bilinmektedir (Ma *et al.*, 2001). Serbest heparinin ise üreme açısından elektrostatik etkileşimle yapıya bağlanan heparine benzer bir davranış gösterdiği; ancak hücre farklılaşmasını yapıdan sürekli ve kontrollü bir şekilde salınan heparin kadar fazla uyarmadığı görülmüştür. Literatürde, kitosanın osteokondüktif potansiyelini gösteren birçok çalışma bulunmaktadır (Seol *et al.*, 2004; Fakhry *et al.*, 2004). Tüm bu nedenlerden dolayı, kitosan doku iskelelerinin osteojenik farklılaşmayı sağlaması beklenen bir durumdur.

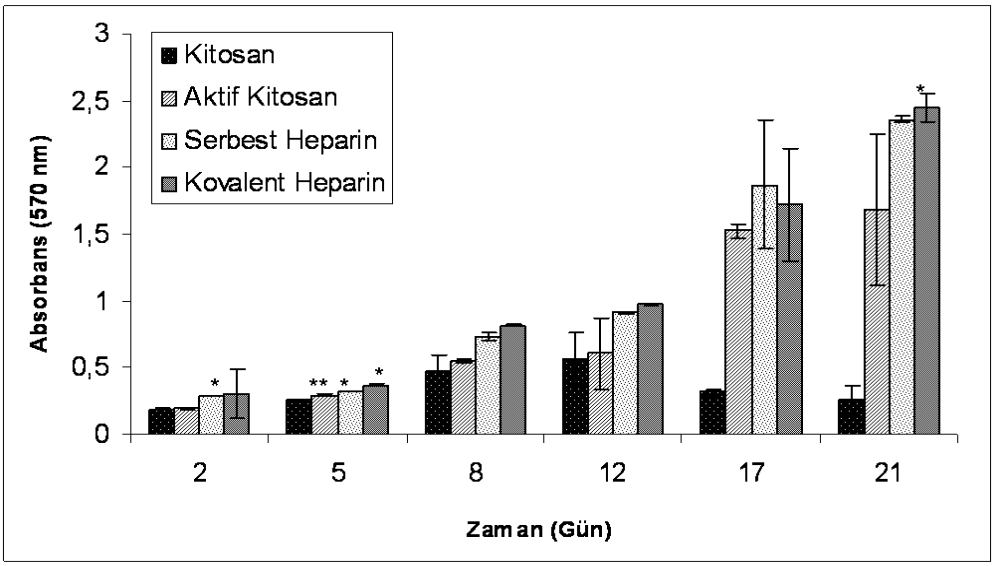
4.2.3. Kondrojenik ATDC5 hücreleri ve kitosan doku iskeleleri ile yapılan çalışmalar

Heparin immobilize doku iskelelerinin, kemik hücreleri yanında kıkırdak hücrelerinin üreme davranışları, morfolojileri ve aktiviteleri üzerindeki etkileri de incelenmiştir. Bu amaçla, ATDC5 fare embriyonel karsinoma hücre hattı kullanılmış ve üreme MTT testiyle, farklılaşma ise salgılanan glikozaminoglikan miktarıyla değerlendirilmiştir. Ayrıca iskelelerdeki hücrelerin yerleşimi, farklı tabakalar arasındaki hücre yoğunluğu ve hücre iskeleti organizasyonu konfokal mikroskop çekimleri ile ortaya konmuştur. Hücrelerin birbirleriyle ve malzemeyle olan etkileşimleri SEM kullanılarak görüntülenmiştir. ATDC5 hücrelerinin karakterizasyon çalışmaları, daha önce Araş. Gör. Seda Tığlı tarafından gerçekleştirildiğinden hücrelerin tekrar karakterizasyonu yapılmamıştır. ATDC5 hücrelerinin karakterizasyonu sonucu elde edilen veriler Ek-3'te sunulmuştur.

4.2.3.1. MTT Testi

21 günlük kültür süresi boyunca alınan MTT değerleri Şekil 4.32.'de verilmiştir. Söz konusu değerler göz önüne alındığında, heparinin kıkırdak hücrelerinde, kemik hücrelerinden farklı olarak kültürün 12. gününden sonra üreme üzerinde uyarıcı bir etki gösterdiği görülmüştür. Bu durum, heparinin kıkırdak üzerindeki etkisinin büyüme faktörleri ve sitokinlerle olan ilgisiyle bağlantılı olabileceğini düşündürmüştür. Heparin içeren tüm gruplarda 12. günden sonra bir artış gözlenirken modifiye edilmemiş kitosanlarda değerler düşmeye başlamıştır. Bu durum, heparinin hücre üremesinin devamında etkili olduğunu göstermektedir. Aktif kitosan iskeleler kemik hücrelerinde olduğu gibi kıkırdak hücreleri üzerinde de

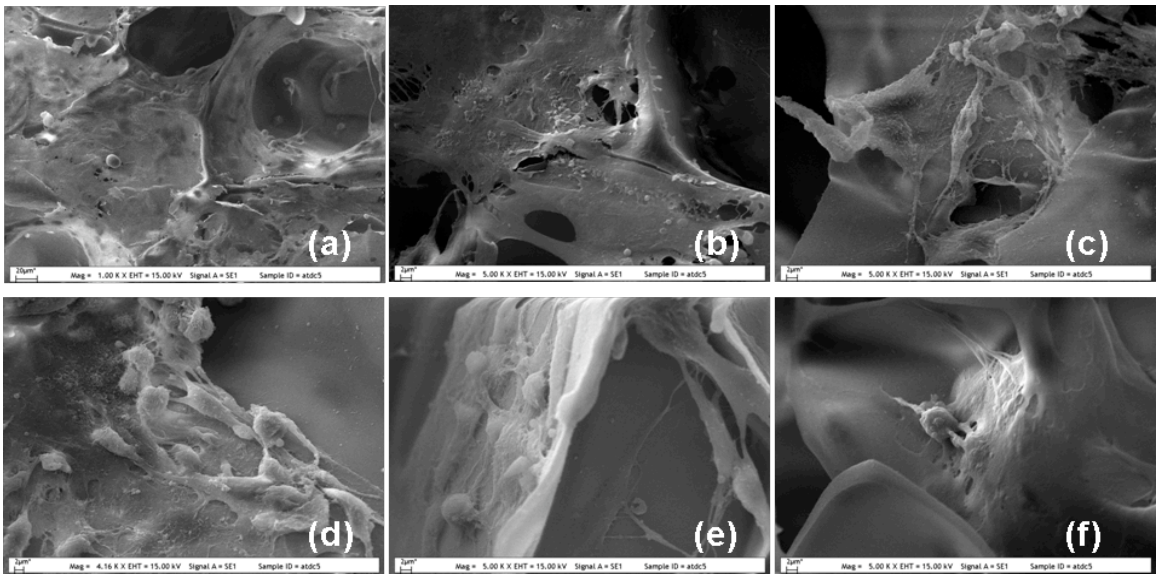
uyarıcı bir etki göstermiş; ancak bu uyarı, heparin içeren gruplara kıyasla daha düşük olmuştur.



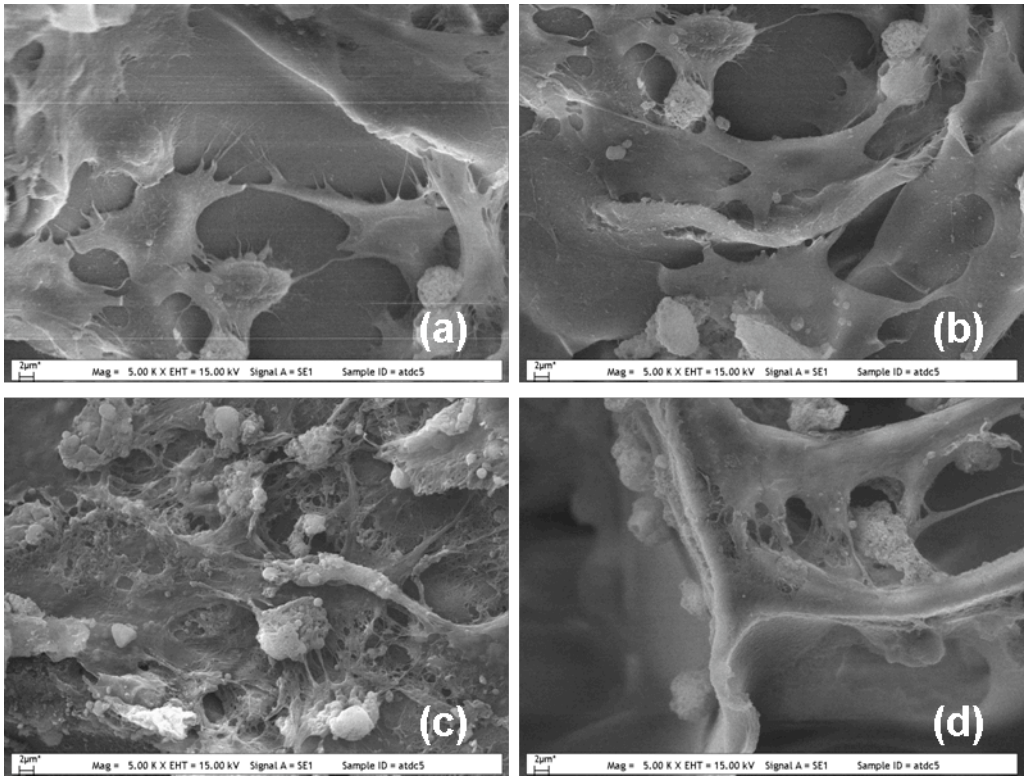
Şekil 4.32. Farklı kitosan doku iskelelerinde ATDC5 hücreleri üreme testi (MTT) sonuçları (İstatistiksel önem farklılığı, n=3, kontrol grubu kitosan, *: $p<0.0001$ ve * * : $p<0.0005$).

4.2.3.2. Taramalı elektron mikroskop (SEM) ile analiz

Doku iskelesi üzerindeki hücrelerin morfolojileri, yayılımları, hücre-hücre ve hücre-malzeme etkileşimleri Şekil 4.33. ve 4.34.'de gösterilmiştir.



Şekil 4.33. ATDC5 hücrelerinin SEM görüntüleri (5. gün): (a) aktif kitosan, 1.00 KX; (b) aktif kitosan, 5.00 KX; (c) kovalent heparin, 5.00 KX; (d) kovalent heparin, 4.16 KX; (e) serbest heparin, 5.00 KX; (f) modifiye edilmemiş kitosan, 5.00 KX.



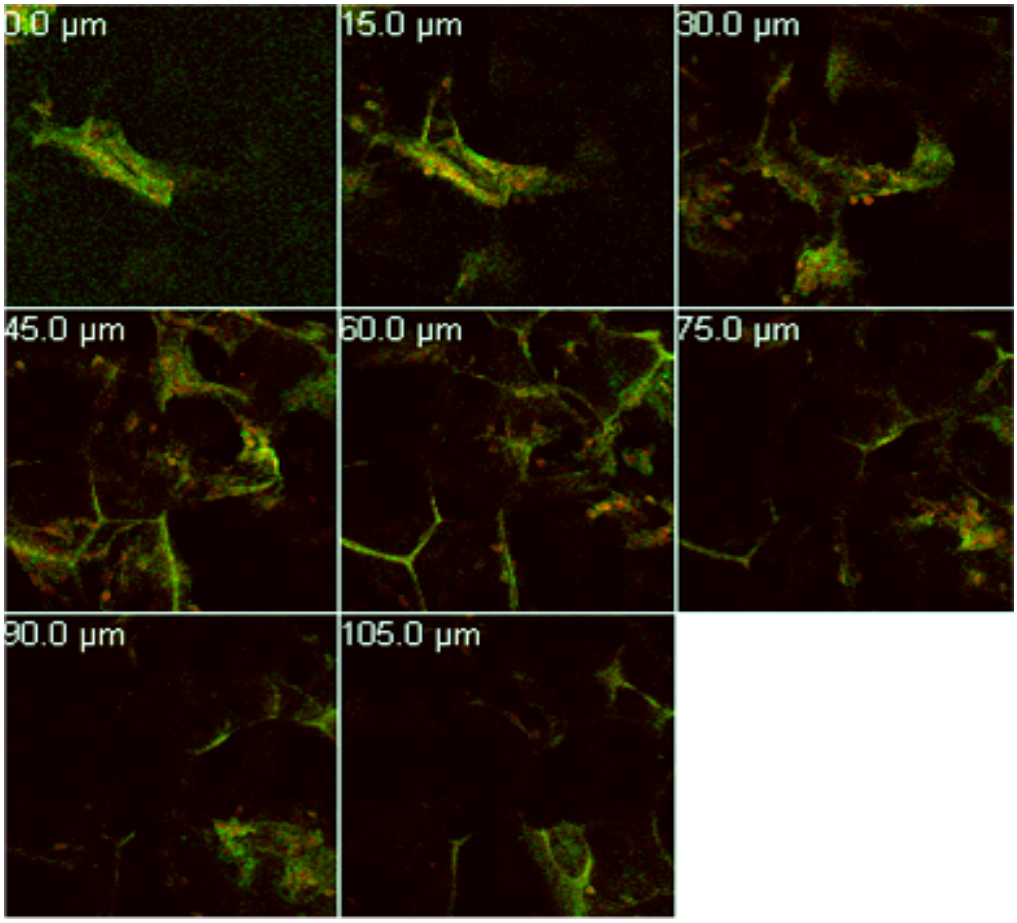
Şekil 4.34. ATDC5 hücrelerinin SEM görüntüleri (13. gün): (a) aktif kitosan, 1.00 KX; (b) aktif kitosan, 5.00 KX; (c) serbest heparin, 5.00 KX; (d) modifiye edilmemiş kitosan, 5.00 KX.

SEM fotoğrafları, tüm iskelelerin ECM oluşumunu teşvik ettiğini ortaya koymuştur. Hücrelerin *in vitro*'da özel işlevlerini devam ettirebilmeleri hücrenin dokudaki 3 boyutlu çevresinin uygun bir şekilde taklidi ve dokudaki morfolojinin sürdürülebilmesi ile mümkündür. Kıkırdak hücreleri, üç boyutlu çevrelerinde küresel bir form göstermektedir. Bu nedenle, doku mühendisliği çalışmalarında da hücrelerin küresel morfoloji göstermesi beklenmektedir. Çalışmamızda, farklı iskeleler üzerinde, birbirinden farklı hücre morfolojileri gözlenmiştir. Kültürün 5. gününde, aktif kitosan iskeleleri üzerindeki hücrelerin yeni salgılanmış ECM'ye sıkı bir şekilde bağlandıkları ve belli bölgelerde küresellikten kayarak oval bir yapı gösterdikleri görülmüştür. Heparin içeren iskelelerde hücreler genel olarak küresel formlarını korumuşlar ve ECM salgılamaya başlamışlardır. Serbest heparin içeren gruplarda da yine heparin bağlı iskelelerdekine benzer morfoloji görülmüştür. Modifiye edilmemiş kitosan yapılar üzerinde küresel formdaki kondrositlere rastlanmıştır. Kültürün 13. gününde, aktif kitosan iskeleler üzerindeki hücrelerin

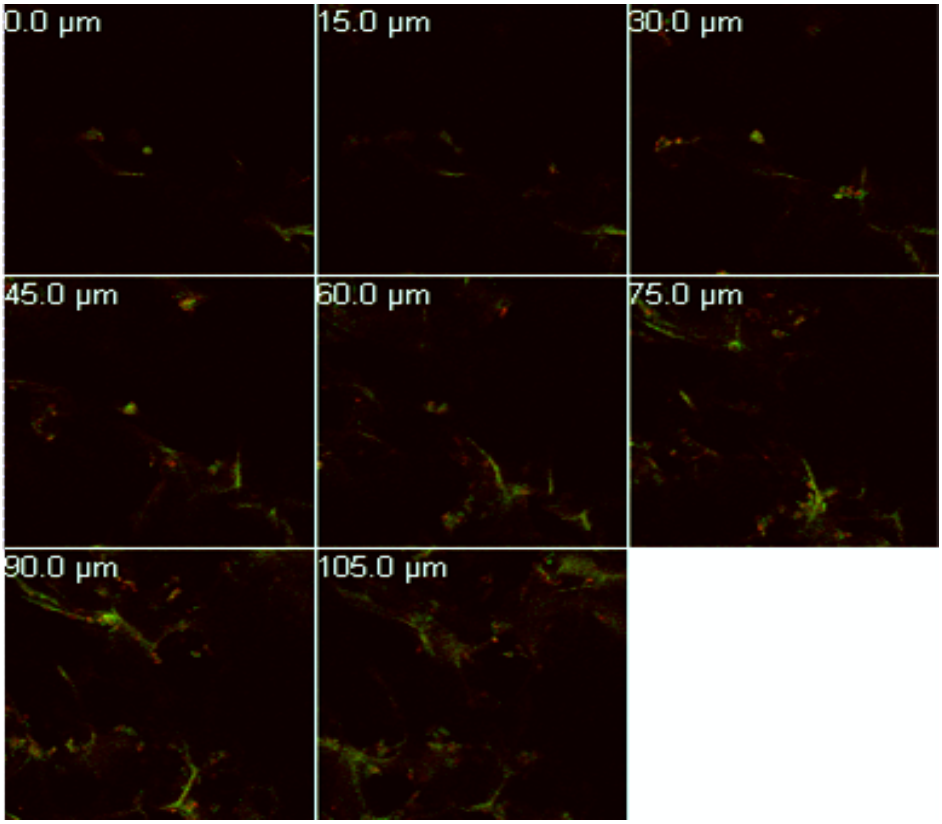
çok az bir yayılma gösterdiği, buna karşın heparin içeren gruplarda ve herhangi bir muamele görmemiş kitosanda çok daha fazla küresel yapıda hücrenin bulunduğu görülmüştür.

4.2.3.3. Konfokal lazer taramalı mikroskop (CLSM) ile analiz

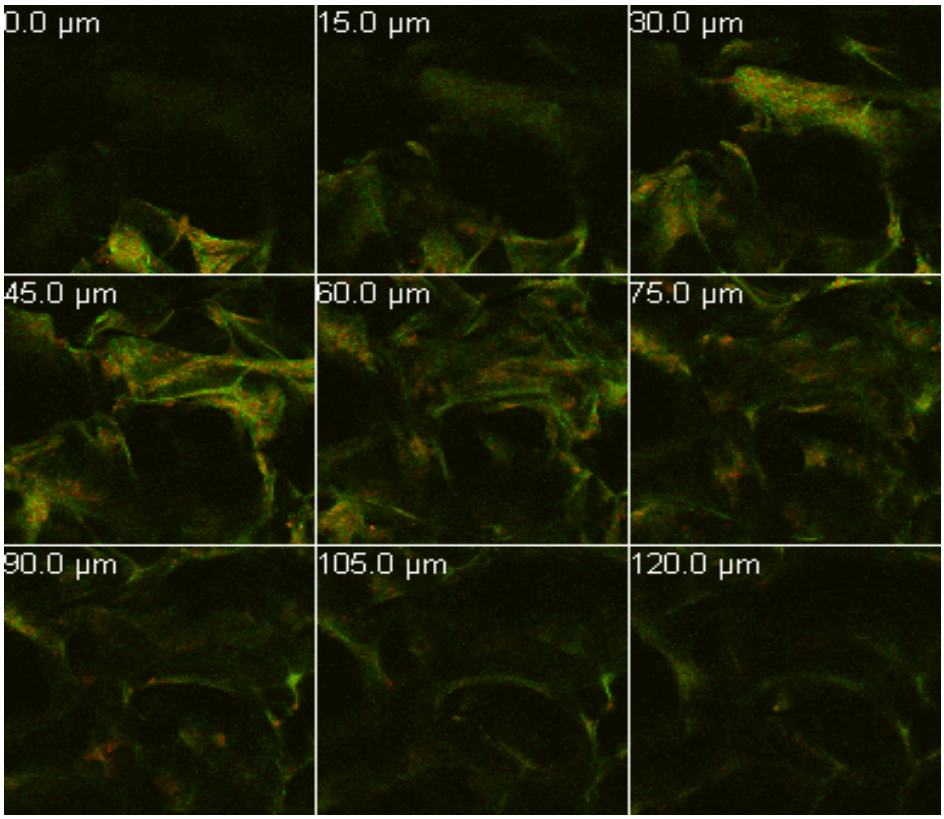
Hücrelerin iskelet organizasyonu ve doku iskelesi içerisindeki yayılımları konfokal mikroskobu kullanılarak incelenmiştir. CLSM fotoğraflarının tümü 20X büyütmede çekilmiştir. Kondrositler çok hareketli hücreler olmamalarına rağmen, doku iskelesinin içeri kısımlarına göç etmişlerdir (Şekil 4.35.-4.38.). Heparin varlığında, iskeleler üzerindeki hücre sayısının belirgin şekilde fazla olduğu gözlemlenmiştir. Yine heparin bağlı doku iskelesi içerisinde küresel morfolojiye sahip hücrelerden oluşan oldukça fazla sayıda agregat yapısı görülmüştür (Şekil 4.39.d, okla gösterilen yapılar).



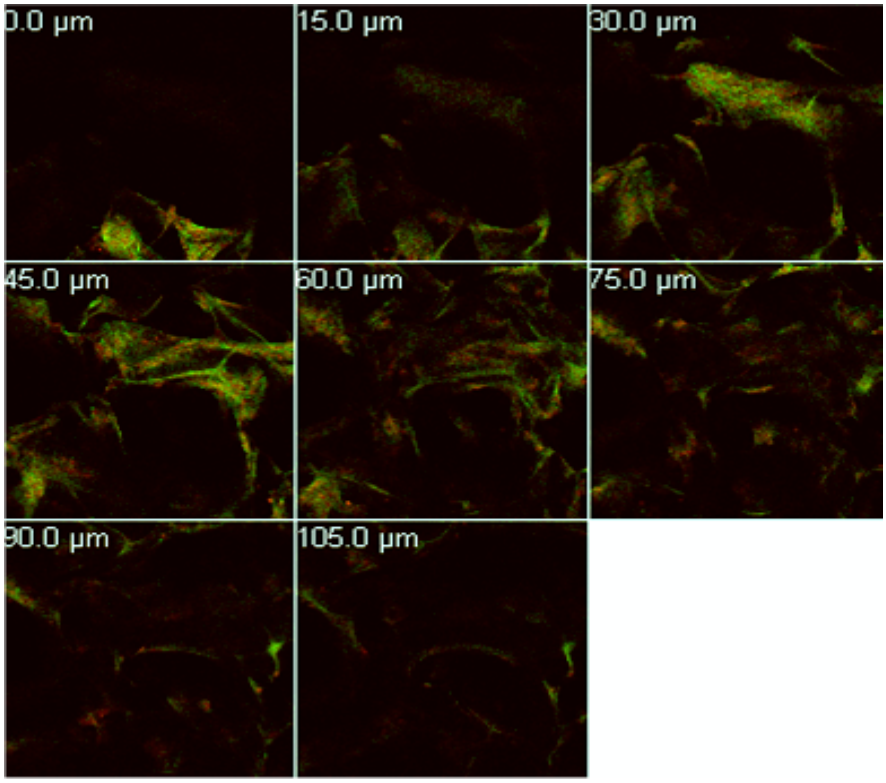
Şekil 4.35. Boş (modifiye edilmemiş) kitosan iskelelerde farklı derinliklerdeki ATDC5 hücre yoğunlukları.



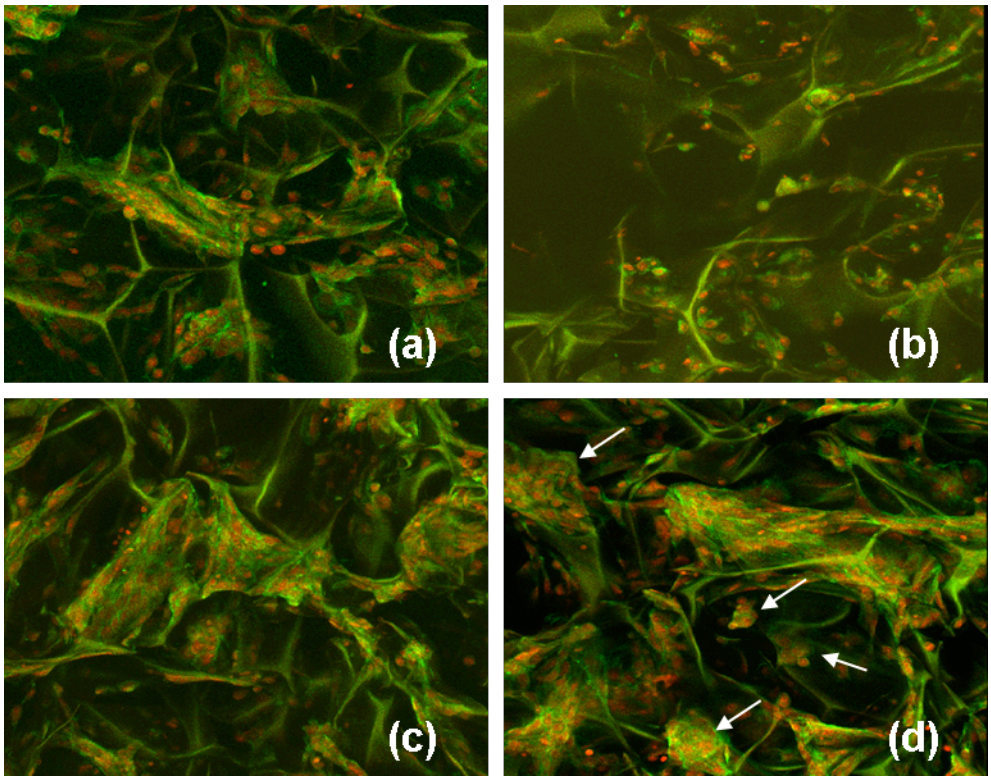
Şekil 4.36. Aktif kitosan iskelelerde farklı derinliklerdeki ATDC5 hücre yoğunlukları.



Şekil 4.37. Serbest heparin içeren grupta farklı derinliklerdeki ATDC5 hücre yoğunlukları.



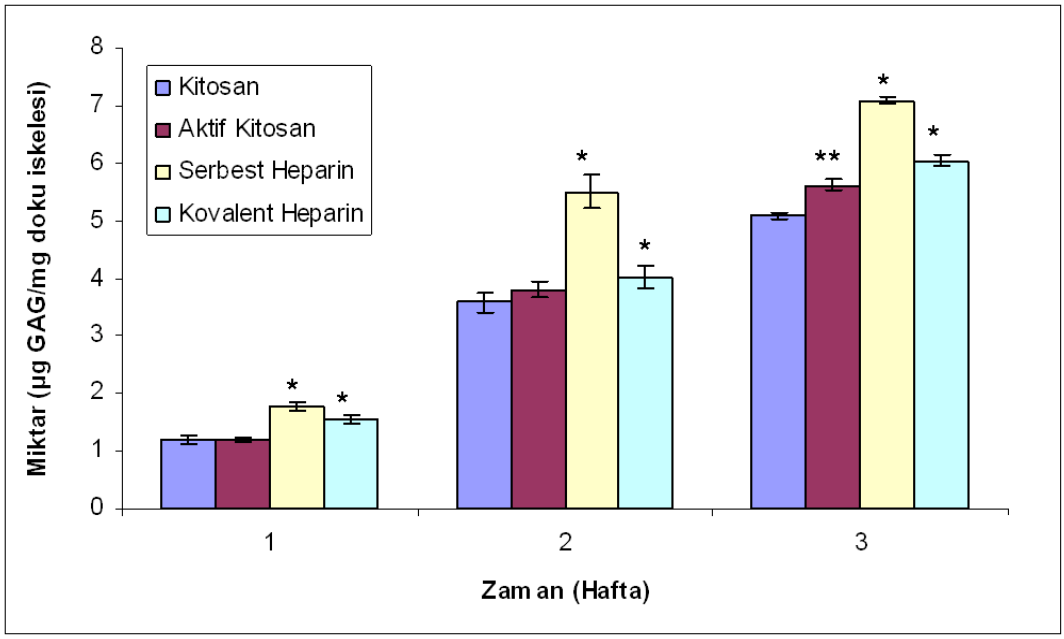
Şekil 4.38. Kovalent bağlı heparin içeren kitosan iskelelerde farklı derinliklerdeki ATDC5 hücre yoğunlukları.



Şekil 4.39. Tüm katmanların üst üste konulması sonucu elde edilen ve ATDC5 hücrelerinin 3 boyutlu iskele içerisindeki dağılımını gösteren konfokal mikroskop görüntüleri: (a) boş (modifiye edilmemiş) kitosan, (b) aktif kitosan, (c) serbest heparin içeren yapılar, (d) heparin bağlı kitosan (kovalent etkileşim).

4.2.3.4. Biyokimyasal analiz

Glikozaminoglikan (GAG) içeriği, dimetilmetilen mavisi (Goldberg and Kolibas, 1990) kullanılarak belirlenmiştir. Dimetilmetilen mavisi, Toluidine mavisine benzer şekilde, glikozaminoglikanlarla metakromatik etkileşime girmekte ve bu etkileşim sonucu renk maviden mora dönmektedir. GAG için kalibasyon grafiğinin çiziminde Goldberg ve Kolibas tarafından verilen absorbans değerleri kullanılmıştır. Sonuçta elde edilen değerler Şekil 4.40.'da verilmiştir.

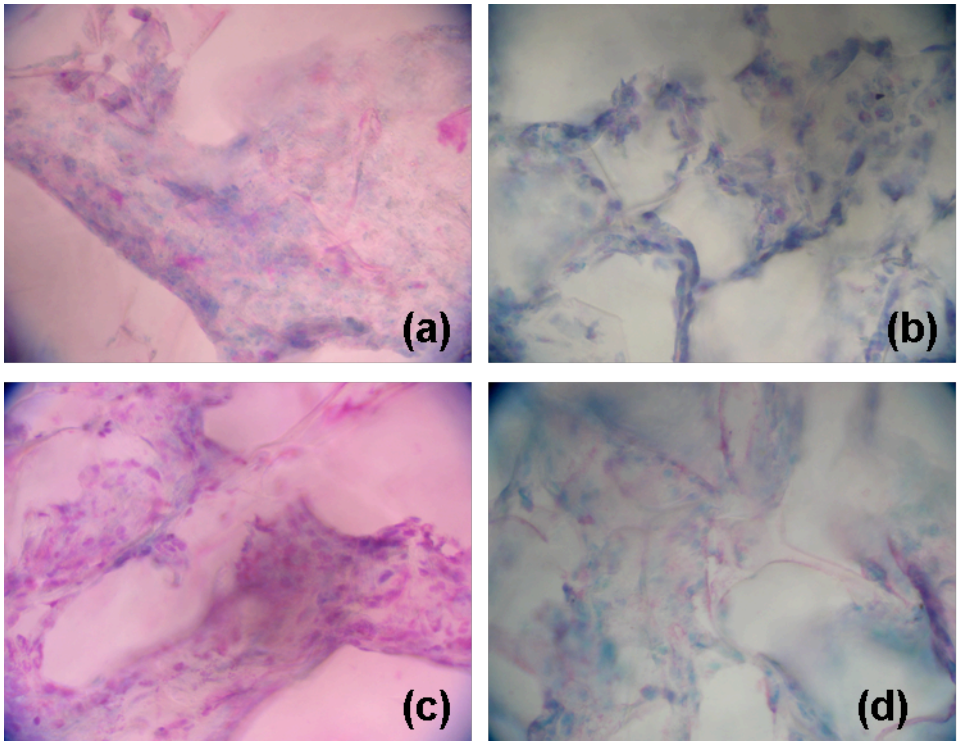


Şekil 4.40. GAG test sonuçları (İstatistiksel önem farklılığı, n=3, kontrol grubu kitosan, *: $p<0.0001$ ve * * : $p=0.0031$).

Glikozaminoglikanların kondrogenezisi arttırdığı bilinmektedir. Bu nedenle en yüksek GAG miktarlarına, heparin içeren örneklerde rastlanmıştır. Özellikle serbest halde bulunan heparinin, kıkırdak hücrelerinin farklılaşmasını önemli ölçüde arttırdığı GAG testi sonucunda belirlenmiştir. Kitosan iskeleler ile aktif kitosan yapılar için elde edilen değerlerde çok büyük bir fark olmadığı, GAG içeriğinin tüm doku iskelelerinde kültür süresi uzadıkça arttığı gözlenmiştir.

GAG testine ek olarak, iskelelerin bir kısmı dimetilmetilen mavisi ile boyanmış ve doku iskeleleri üzerindeki hücreler invert mikroskop kullanılarak incelenmiştir. Yapılan inceleme sonucunda, GAG miktar tayinine uygun şekilde, serbest heparin örneklerinde hücrelerin çok daha iyi bir şekilde boyandığı gözlenmiştir. Kitosan,

aktif kitosan ve heparin bağlı kitosan iskelelerde ise birbirine oldukça benzer görünümler tespit edilmiştir.



Şekil 4.41. Dimetimetilen mavisi ile boyanan doku iskelelerindeki hücrelerin görünümü (10X büyütme): (a) modifiye edilmemiş iskele, (b) aktif kitosan, (c) serbest heparin, (d) kovalent heparin.

ATDC5 hücreleriyle yapılan tüm çalışmalar özetlenecek olursa, heparinin özellikle kültürün 12. gününden sonra hücre üremesini uyardığı ortaya konmuştur. Modifiye edilmemiş iskelelerde ise hücre sayıları, 12. günden sonra düşüş göstermiştir. Kitosan, serbest heparin ve kovalent heparin gruplarında hücreler küresel morfoloji gösterirken SEM sonuçları, aktif iskelelerde hücrelerin çok az da olsa küresel formdan sapma gösterdiğini ortaya koymuştur. Tüm doku iskelelerinin farklılaşmayı desteklediği; ancak serbest heparinin diğer gruplara göre çok daha yüksek GAG değerleri verdiği görülmüştür. Bu sonuçlara bakılarak, heparinin kıkırdak hücrelerinin farklılaşmasını çeşitli büyüme faktörlerini kendisine bağlayarak desteklediği düşünülmüştür. Ayrıca, ortamda sürekli heparinin bulunması, daha çok sitokinin ve büyüme faktörünün bağlanmasını teşvik ederek farklılaşmayı arttırmıştır. Kovalent bağlı kitosan iskelelerde salım oldukça az olduğundan daha düşük GAG miktarları elde edilmiştir.

5. GENEL SONUÇLAR

Sunulan tez çalışması kapsamında, kitosan bazlı doku iskeleleri dondurarak-kurutma yöntemi ile hazırlanmış, apatit ile kaplanmış ya da heparin ile modifiye edilmiştir. Doku iskelelerinin karakterizasyonları yapılmış ve bu malzemeler üzerinde kültüre edilen hücrelerin davranışları çeşitli analiz yöntemleri kullanılarak incelenmiştir. Çalışma boyunca elde edilen sonuçlar aşağıda özetlenmiştir.

- Deasetilasyon derecesi >% 85 olan kitosanın % 2'lik çözeltileri hazırlanarak dondurarak-kurutma yöntemiyle yaklaşık 100 μm gözenek boyutuna ve % 81.8+1.7 gözeneklilige sahip doku iskeleleri elde edilmiştir.
- Liyofilize doku iskeleleri, % 96'lık etanolle 1 gece, % 70 etanolle 1 saat muamele sonucu stabilize edilmiştir.
- Hazırlanan iskeleler, 10X SBF çözeltisinde 6 sa ve 24 sa bekletilmiş, bu sayede malzeme yüzeyinde yaklaşık 2-3 μm boyutunda biyomimetik apatit kristalleri oluşmuştur.
- Heparinin yüzeylere bağlanmasında hem elektrostatik hem de kovalent bağlama yöntemi kullanılmıştır. Kovalent bağlama yönteminde, EDAC ve NHS aktivasyon ajanları kullanılarak heparin yüzeyindeki karboksilik asit grupları aktif hale getirilmiştir. İskeleye bağlanan heparin miktarları, elektrostatik heparin bağlı iskeleler için 3.8+0.8 iken kovalent heparin immobilize yapılar için 4.7+0.4 mg/g'dır.
- Apatit ile kaplı iskelelerin karakterizasyonu, SEM, XRD analizi ve mekanik testlerle yapılmıştır. Ayrıca kullanılan SBF çözeltisi ile muamele sonucu yüzeyde oluşan apatit yapılarının, istenilen morfolojide olup olmadığının belirlenmesi amacıyla her çalışmadan sonra mikroskopik gözlemleri yapılmıştır. Salım çalışmaları, 37°C'de, PBS içerisinde gerçekleştirilmiş, sonuçta elektrostatik etkileşimle bağlanan heparinin yaklaşık % 47'sinin, 20 günlük inkübasyon süresi sonunda salındığı belirlenmiştir.
- Heparin bağlı iskelelerin karakterizasyonu, Toluidine mavisi testi, elementel analiz, salım çalışmaları ve mekanik testlerle gerçekleştirilmiştir.
- Kitosan iskelelerin, kemik ve kıkırdak doku mühendisliği alanındaki kullanımının incelenmesi amacıyla hücre kültür testleri yapılmıştır. Bu

amaçla pre-osteoblastik MC3T3-E1 hücreleri ve ATDC5 hücreleri kullanılmıştır.

- Kullanılan kemik hücrelerinin karakterizasyon çalışmaları, MTT, hücre sayımı, kristal viyole boyaması ve floresan boyama yöntemlerinin kullanımıyla gerçekleştirilmiştir.
- Karakterizasyon çalışmaları sonunda MC3T3-E1 hücreleri için özgül üreme hızı, 0.019 h^{-1}, ikilenme süresi ise 36 saat olarak bulunmuştur.
- Apatit ile kaplı kitosan iskelelerde MC3T3-E1 hücreleri kullanılarak gerçekleştirilen çalışmalarda hücre üremesi MTT, hücre morfolojileri ve dağılımları ise SEM ve CSLM ile belirlenmiştir. Hücrelerin farklılaşması, ALP aktivite ölçümü, osteokalsin testi ve von Kossa boyaması ile değerlendirilmiştir.
- Heparin bağlı iskelelerde çalışmalar, hem MC3T3-E1 kemik, hem de ATDC5 kıkırdak hücreleri için gerçekleştirilmiştir. MC3T3-E1 hücreleri kullanılarak gerçekleştirilen çalışmalarda hücre üremesi MTT; hücre morfolojileri ve dağılımları SEM ve CSLM ile değerlendirilmiştir. Farklılaşma ise ALP aktivite ölçümü ve osteokalsin testi ile belirlenmiştir. ATDC5 hücrelerinde üreme ve morfolojilerin belirlenmesi amacıyla aynı yöntemler kullanılmış, farklılaşma ise GAG miktarları ölçülerek değerlendirilmiştir.
- MC3T3-E1 hücreleriyle yapılan çalışmalarda, kültürün ilk 10 gününde, kaplama içermeyen iskelelerle karşılaştırıldığında, apatit kaplı doku iskelelerin hücre üremesini uyardığı ortaya konmuştur. Ancak apatit kaplama, yapıların biyobozunurluk özelliklerini değiştirmiş, bu nedenle malzemelerde kopmalar ve parçalanmalar görülmeye başlanmıştır. Bu nedenle kültürün 10. gününden sonra elde edilen MTT ve farklılaşma değerleri beklenenden düşük olsa da özellikle 24 sa SBF muamelesi görmüş yapılarda, hücre farklılaşma değerlerinin (ALP ve osteokalsin miktarları) kültür süresi uzadıkça arttığı gözlemlenmiştir.
- Heparin bağlı yüzeylerde ise MC3T3-E1 hücrelerinin gerek üremesi, gerekse farklılaşması uyarılmıştır. Serbest heparinin ise üreme açısından elektrostatik etkileşimle yapıya bağlanan heparine benzer bir davranış gösterdiği; ancak hücre farklılaşmasını yapıdan sürekli ve kontrollü bir şekilde salınan heparin kadar fazla uyarmadığı görülmüştür.

- Kovalent heparin bağlı kitosan iskelelerde hücre üremesi ilk günden itibaren uyarılırken, elektrostatik etkileşimle heparinin bağlandığı yapılarda MTT değerleri oldukça düşük kalmıştır. Ancak elektrostatik etkileşimle yapıya bağlanan heparinin hücre farklılaşmasını uyardığı, özellikle osteokalsin sonuçları göz önünde bulundurulduğunda, bu iskelelerdeki hücrelerin geç osteoblastik farklılaşmaya girdikleri ve kemik dokusunun yavaş yavaş şekillenmeye başladığı ortaya konmuştur.
- ATDC5 hücreleriyle yapılan çalışmalarda, heparinin özellikle kültürün 12. gününden sonra hücre üremesini uyardığı ortaya konmuştur. Modifiye edilmemiş iskelelerde ise hücre sayıları, 12. günden sonra düşüş göstermiştir. Kitosan, serbest heparin ve kovalent bağlı heparin gruplarında hücreler küresel morfoloji gösterirken aktif iskelerde, hücrelerin çok az da olsa küresel formdan sapma gösterdiğini ortaya koymuştur. Tüm doku iskelelerinin farklılaşmayı desteklediği; ancak serbest heparinin diğer gruplara göre çok daha yüksek GAG değerleri verdiği görülmüştür.

Sonuç olarak, MC3T3-E1 hücreleri ile gerçekleştirilen çalışmalar, apatit kaplı doku iskelelerinin, kaplama içermeyen iskelelerle karşılaştırıldığında, hücre üremesini uyardığını göstermiştir. Heparin bağlı iskelelerde, pre-osteoblast MC3T3-E1 hücrelerinin gerek üremesi, gerekse farklılaşması uyarılmıştır. Yapıya kovalent olarak bağlanan heparin, çeşitli yapışma faktörlerine etki ederek hücre yapışmasını, dolayısıyla hücre üremesini arttırmış, elektrostatik etkileşimlerle bağlı olan heparin ise hücre farklılaşmasını uyarmıştır. ATDC5 hücreleriyle yapılan çalışmalarda, doku iskelesine bağlı heparinin özellikle kültürün 2. haftasından sonra hücre üremesini arttırdığı ortaya konmuştur. Bu durum, heparinin kondrojenik hücreler üzerindeki etkisinin büyüme faktörleri ile yakından ilişkili olduğunu ortaya koymuştur. Ortamda sürekli serbest halde heparinin bulunması ise, daha çok sitokin ve bağlanma faktörünün heparin tarafından tutulmasını sağlayarak farklılaşmayı teşvik etmiştir. Bu sonuçlar göz önüne alındığında, çeşitli yöntemlerle modifiye edilmiş kitosan doku iskelelerinin kemik ve kıkırdak doku mühendisliği için uygun malzemeler olabileceği ortaya konulmuştur.

KAYNAKLAR DİZİNİ

Aiedeh, K., Gianasi, E., Orienti, I., Zecchi, V., 1997, Chitosan microcapsules as controlled release systems for insulin, The Journal of Microencapsulation, 14, 567-576.

Akay, T., 2006, Genel Histoloji, Palme Yayıncılık, ISBN 975-7477-92-3, Ankara, 262s.

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J.D., 1994, In: Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD (eds), Molecular biology of the cell, Garland, New York, pp 971-995.

Arpornmaeklong, P., Suwatwirote, N., Pripatnanont, P., Oungbho K., 2007, Growth and differentiation of mouse osteoblasts on chitosan-collagen sponges, International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, 36, 328-337.

Asahina, I., Seto, I., Oda, M., Marukawa, E., Imranul, A.M., Enomoto, S., 1999, Bone Engineering, 1st edition, Em squared, Toronto, p. 526.

Bao, X., Nishimura, S., Mikami, T., Yamada, S., Itoh, N., Sugakahara, K., 2004, Chondroitin sulfate/dermatan sulfate hybrid chains from embryonic pig brain, which contain a higher proportion of l-iduronic acid than those from adult pig brain, exhibit neuritogenic and growth factor binding activities. Journal of Biological Chemistry, 279, 9765-9776.

Barrere, F., C.A. van Blitterswijk, K. de Groot, P. Layrolle, 2002a, Influence of ionic strength and carbonate on the Ca-P coating formation from SBFX5 solution. Biomaterials 23: 1921-1930.

Barrere, F., C.A. van Blitterswijk, K. de Groot, P. Layrolle, 2002b, Nucleation of biomimetic Ca-P coatings on Ti6Al4V from a SBFX5 solution: influence of magnesium. Biomaterials 23: 2211-2220.

Bastos, I.N., Platt, G.M., Andrade, M.C., Soares, G.D., 2008, Theoretical study of tris and bistris effects on simulated body fluids, Journal of Molecular Liquids, Vol.139, 1-3, 121-130.

Bayçu, C. 1995, Kemik dokusu. Histoloji. Bayram, N. (ed.), T.C. Anadolu Üniversitesi Açıköğretim Fakültesi Yayınları, Eskişehir. s. 124-144.

Benoit, D.S.W., Anseth, K.S., 2005, Heparin functionalized PEG gels that modulate protein adsorption for hMSC adhesion and differentiation, Acta Biomaterialia, 1, 461-470.

Bernfield, M., Kokenyesi, R., Kato M., Hinkes, M. T., Spring, J., Gallo, R. L., Lose, E. J., 1992, Biology of the syndecans: a family of transmembrane heparan sulphate proteglycans, Annual Review of Cell Biology, 8, 365 -393.

Bhattarai, N., Edmondson, D., Veiseh, O., Matsen, F.A., Zhang, M., 2005, Electrospun chitosan-based nanofibers and their cellular compatibility, Biomaterials, 26, 6176-6184.

Bos, G.W., Scharenborg, N.M., Poot, A.A., Engbers, G.H.M., Beugeling, T., van Aken, W.G., Feijen, J., 1999, Proliferation of endothelial cells on surface-immobilized albumin-heparin conjugate loaded with basic fibroblast growth factor, Journal of Biomedical Materials Research, 44 (3), 330-340.

Burkatovskaya, M., Tegos, G.P., Swietlik, E., Demidova, T.N., Castano, A.P., Hamblin, M.R., 2006, Use of chitosan bandage to prevent fatal infections developing from highly contaminated wounds in mice, Biomaterials, 27, 4157-4164.

Canalis, E., 2000, Skeletal growth factors, Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Williams.

Cancedda, R., B. Dozin, P. Giannoni, R. Quarto, 2003, Tissue engineering and cell theraphy of cartilage and bone. Matrix Biol 22: 81-91.

Chen, W.Y., Abatangelo, G., 1999, Function of hyaluronan in wound repair, Wound Repair and Regeneration, 2, 79–89.

Cheng, M.Y., Deng, J.G., Yang, F., Gong, Y.D., Zhao, N.M., Zhang, X.F., 2003, Study on physical properties and nerve cell affinity of composite films from chitosan and gelatin solutions, Biomaterials, 24, 17, 2871-2880.

Cindhuchao, N., Quinn, D.A., Garg, H.G., Hales, C.A., 2003, Heparin inhibits SMC growth in the presence of human and fetal bovine serum, Biochemical and Biophysical Research Communications, 302, 84-88.

Clemens, J.A., J.G. Wolke, C.P. Klein, K. de Groot, 1999, Fatigue behavior of calcium phosphate coatings with different stability under dry and wet conditions. J Biomed Mater Res 48(5): 741–748.

Cornell, C.N., Lane, J.M., 1992, Newest factors in fracture healing. Clin Orthop 277: 297-311.

Cui, K., Zhu, Y., Wang, X.H., Feng, Q.L., Cui, F.Z., 2004, A porous scaffold from bone-like powder loaded in a collagen–chitosan matrix, Journal of Bioactive and Compatible Polymers, 19, 17-31.

Dalby, M.J., Riehle, M.O., Johnstone, H.J., Affrossman, S., Curtis A.S., 2002, Polymer-demixed nanotopography: control of fibroblast spreading and proliferation, Tissue Engineering, 8(6), 1099-1108.

Day, R., Forbes, A., 1999, Heparin, cell adhesion, and pathogenesis of inflammatory bowel disease, Lancet; 354, 62–65.

Deepa, S. S., Yamada, S., Zako, M., Goldberger, O., Sugahara, K., 2004, Chondroitin sulphate chains on syndecan-1 and syndecan-4 from normal murine mammary gland epithelial cells are structurally and functionally distinct and cooperate with heparin sulphate chains to bind growth factors. A novel function to control binding of midkine, pleiotrophin, and basic fibroblast growth factor. Journal of Biological Chemistry, 279, 37368-37376.

Denizli, A., 1999, Heparin-immobilized poly(2-hydroxyethylmethacrylate)-based microspheres, Journal of Applied Polymer Science 74, 655-662.

Edelman, E.R., Nugent, M.A., Smith, L.T., Karnovsky, M.J., 1992, Basic fibroblast growth-factor enhances the coupling of intimal hyperplasia and proliferation of vasa vasorum in injured rat arteries, The Journal of Clinical Investigation, 89 (2), 465–473.

Elder, S.H., Nettles, D.L., Bumgardner, J.L., 2003, Synthesis and characterization of chitosan scaffolds for cartilage-tissue engineering. Biopolymer Methods in Tissue Engineering (Methods in Molecular Biology). Hollander, A.P., Hatton, P. (eds.), Humana Press Inc., U.S. pp. 41-48.

Fakhry, A., Schneider, G.B., Zaharias, R., Şenel, S., 2004, Chitosan supports the initial attachment and spreading of osteoblasts preferentially over fibroblasts, Biomaterials, 25, 2075-2079.

Foster, A., Matthew, H.W.T., 1998, Growth of vascular cells on bioactive polysaccharide surface, Proc-NOBCCHE, 25, 127-129.

Freed, L.E., Vunjak-Novakovic, G., 1998, Culture of organized cell communities, Advanced Drug Delivery Reviews, 33, 15-30.

Freyman, T.M., Yannas, I.V., Gibson, L.J., 2001, Cellular materials as porous scaffolds for tissue engineering, Progress in Materials Science, 46, 273-282.

Garg, H.G., Hales, C.A., Yu, L., Butler, M., Islam, T., Xie, J., Linhardt, R.J., 2006, Increase in the growth inhibition of bovine pulmonary artery smooth muscle cells by an O-hexanoyl low-molecular-weight heparin derivative, Carbohydrate Research, 341, 2607-2612.

Gazdag, A., J. Lane, D. Glaser, R..Forster, 1995, Alternatives to autogenous bone graft: efficacy and indications. J Am Acad Orthop Surg 3: 1-8.

Gibson, L.J., M.F. Ashby, 1997, Cellular Solids: Structure and Properties. Cambridge University Press, Cambridge.

Goldberg, R.L., Kolibas, L.M., 1990, An improved method for determining proteoglycans synthesized by chondrocytes in culture, Connective Tissue Research, 24, 265-275.

Gönen Karakeçili, A., Demirtaş, T.T., Satriano, C., Gümüşderelioğlu, M., Marletta, G., 2007, Evaluation of L929 fibroblast attachment and proliferation on Arg-Gly-Asp-Ser (RGDS)-immobilized chitosan in serum-containing/serum-free cultures, Journal of Bioscience and Bioengineering, 104(1), 69-77.

Gu, Y.W., Khor, K.A., Cheang, P., 2003, *In vitro* studies of plasma-sprayed hydroxyapatite/Ti-6Al-4V composite coatings in simulated body fluid (SBF): Biomaterials, 24, 1603-1611.

Guo, W., Ruckenstein, E., 2003, Crosslinked glass fiber affinity membrane chromatography and its application to fibronectin separation, Journal of Chromatography B, 795, 61–72.

Gümüşderelioğlu, M., 2008, Kıkırdak Doku rejenerasyonunda doku iskelesi destekli biyoreaktör performansının incelenmesi, TÜBİTAK Proje Raporu, Proje No: 105M097. 107s.

Henrikson, R.C., Kaye G.I., Mazurkiewicz, 1997, NMS Histology, Lippincott Williams & Wilkins, 3rd edition, ISBN 978-0683062250, USA, 425p.

Hermanson, G.T., 1996, Bioconjugate Techniques, Academic Press, ISBN 0-12-342336-8, 785p.

Holy, C.E., Shoichet, M.S., Davies, J.E., 2000, Engineering three-dimensional bone tissue in vitro using biodegradable scaffolds: investigating initial cell-seeding density and culture period, Journal of Biomedical Materials Research, 51, 376-382.

Hutmacher, D., Kirsch, A., Ackermann, K.L., Huerzeler M.B., 1998, Matrix and carrier materials for bone growth factors: state of the art and future perspectives, Biological matrices and tissue reconstruction, Heidelberg, Germany, Springer, 197-206.

Hutmacher, D.W., 2000, Scaffolds in Tissue Engineering Bone and Cartilage, Biomaterials 21, 2529–2543.

Hutmacher, D.W., A. Kirsch, K.L. Ackermann, M.B., 2001, Huerzeler A tissue engineered cell occlusive device for hard tissue regeneration: a preliminary report. Int J Periodontics Restorative Dent 21(1): 49-59.

Ishihara, M., Sato, M., Hattori, H., Saito, Y., Yura, H., Ono, K., 2001, Heparin-carrying polystyrene (HCPS)-bound collagen substratum to immobilize heparin-binding growth factors and to enhance cellular growth, Journal of Biomedical Materials Research, 56 (4), 536–544.

Jalota, S., Bhaduri, S.B., Taş, A.C., 2007, Osteoblast proliferation on neat and apatite-like calcium phosphate-coated titanium foam scaffolds. Materials Science and Engineering C, 27, 432-440.

Jayasuriya, A.C., Shah, C., Ebraheim, N.A., Jayatissa, A.H., 2008, Acceleration of biomimetic mineralization to apply in bone regeneration, Biomedical Materials, 015003, 6pp.

Jin, Y., Ling, P.X., He, Y.L., Zhang, T.M., 2007, Effects of chitosan and heparin on early extension of burns, Burns, 33, 1027-1031.

Junqueira, L.C., Carneiro J., 2005, Basic Histology Text & Atlas, McGraw-Hill Medical; 11th edition, ISBN 978-0071440912, USA, 502p.

Kenig, M., Porekar, V.G., Fonda I., Menart, V., 2008, Identification of the heparin-binding domain of TNF-alpha and its use for efficient TNF-alpha purification by heparin–sepharose affinity chromatography, Journal of Chromatography B, 867, 119–125.

Khor, E., Lim, L.Y., 2003, Implantable applications of chitin and chitosan, Biomaterials, 24, 2339–2349.

Kierszenbaum, A.L., 2006, Histoloji ve Hücre Biyolojisi, (çev.ed: Ramazan Demir), Palme Yayıncılık, ISBN 9944-341-02-9, Ankara, 618s.

Kim, B.S., Baez, C.E., Atala, A., 2000a, Biomaterials for tissue engineering, World Journal of Urology, 18, 2-9.

Kim, B.S., Money, D.J., 1998, Development of biocompatible synthetic extracellular matrices for tissue engineering, Trends in Biotechnology, 16, 224-230.

Kim, S., Bell, K., Mousa, S. A., Varner, J. A., 2000b, Regulation of angiogenesis *in vivo* by ligation of integrin α5β1 with the central cell-binding domain of fibronectin, American Journal of Pathology, 156, 1345-1362.

Klagsbrun, M., Baird, A., 1991, A dual receptor system is required for basic fibroblast growth factor activity, Cell, 67, 229-231.

Koda, J.E., Rapraeger, A., Bernfield, M., 1985, Heparan sulfate proteoglycans from mouse mammary epithelial cells. Cell surface proteoglycan as a receptor for interstitial collagen, Journal of Biological Chemistry, 260, 8157-8162.

Kokubo, T., Takadama, H., 2006, How useful is SBF in predicting i*n vivo* bone activity? Biomaterials, 27, 2907-2915.

Kokubo, T., Hanakawa, M., Kawashita, M., Minoda, M., Beppu, T., Miyamoto, T., Nakamura, T., 2004, Apatite formation on non-woven fabric of carboxymethylated chitin in SBF, Biomaterials, 25, 4485-4488.

Kong, L., Gao, Y., Lu, G., Gong, Y., Zhao, N., Zhang X., 2006, A study on the bioactivity of chitosan/nano-hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering, European Polymer Journal, 42, 3171-3179.

Kreke, M.R, Badami A.S., Brady, J.B., Akers, R.M., Goldstein, A.S., 2005, Modulation of protein adsorption and cell adhesion by poly(allylamine hydrochloride) heparin films, Biomaterials, 26, 2975–2981.

Kuboki, Y., Jin, Q., Takita, H., 2001, Geometry of carriers controlling phenotypic expression in BMP-induced osteogenesis and chondrogenesis. The Journal of Bone and Joint Surgery, 83-A, 105–115.

Kuo, S.M., Chang, S.J., Lin, L.C., Cheni, C.J., 2003, Evaluating chitosan/β-tricalcium phosphate/poly(methylmethacrylate) cement composites as bone-repairing materials, Journal of Applied Polymer Science, 89, 14, 3897-3904.

Lahiji, A., Sohrabi, A., Hungerford, D.S., Frondoza, C.G., 2000, Chitosan supports the expression of extracellular matrix proteins in human osteoblasts and chondrocytes, Journal of Biomedical Materials Research, 51, 586-595.

Laurencin, C.T., Ambrosio, A.M., Borden, M.D., Cooper, Jr. J.A., 1999, Tissue engineering: orthopedic applications, Annual Review of Biomedical Engineering, 1, 19–46.

LeBaron, R.G., Hook, A., Esko, J.D., Gay, S., Hook, M., 1989, Binding of heparan sulfate to type V collagen. A mechanism of cell- substrate adhesion, Journal of Biological Chemistry, 264, 7950-7956.

Lee, H.H., Yu, H.S., Jang, J.H., Kim, H.W., 2008, Bioactivity improvement of poly(ε-caprolactone) membrane with the addition of nanofibrous bioactive glass, Acta Biomaterialia, 4, 622–629.

Lee, J.E., Kim, S.E., Kwon, I.C., Ahn, H.J., Cho, H., Lee, S.H., Kim, H.J., Seong, S.C., Lee, M.C., 2004, Effects of a chitosan scaffold containing TGF-b1 encapsulated chitosan microspheres on i*n vitro* chondrocyte culture, Artificial Organs, 28, 9, 829–839.

Li, J., Gong, Y.D., Zhao, N.M., Zhang, X.F., 2005a, Preparation of N-butyl chitosan and study of its physical and biological properties. Journal of Applied Polymer Science, 98, 3, 1016-1024.

Li, J., Yun, H., Gong, Y., Zhao, N., Zhang, X., 2006, Investigation of MC3T3-E1 cell behavior on the surface of GRGDS-coupled chitosan, Biomacromolecules, 7, 1112-1123.

Li, K., Qu, X., Wang, Y., Tang, Y., Qin, D., Wang, Y., Feng, M., 2005b, Improved performance of primary rat hepatocytes on blended natural polymers, Wiley InterScience: 268-274.

Li, K., Wang, Y., Miao, Z., Xu, D., Tang, Y., Feng, M., 2004, Chitosan/gelatin composite microcarrier for hepatocyte culture, Biotechnology Letters, 26, 879-883.

Li, Z., Zhang, M., 2005c, Chitosan–alginate as scaffolding material for cartilage tissue engineering, Journal of Biomedical Materials Research Part A, 75, 2, 485–493.

Lindahl, U., Hook, M., 1978, Glycosaminoglycans and their binding to biological macromolecules, Annual Review of Biochemistry, 47, 385–417.

Linez-Bataillon, P., Monchau, F., Bigerelle, M., Hildebrand H.F., 2002, In vitro MC3T3 osteoblast adhesion with respect to surface roughness of Ti6Al4V substrates, Biomolecular Engineering, 19(2-6), 133-141.

Liu, H., Yao, F., Zhou, Y., Yao, K., 2005, Porous poly (DL-lactic acid) modified chitosan–gelatin scaffolds for tissue engineering, Journal of Biomaterials Applications, 19, 303-322.

Liu, H., Yin, Y., Yao, K., 2006, Construction of chitosan-gelatin-hyaluronic acid artificial skin *in vitro*, Journal of Biomaterials Applications, 0885328206065241v1.

Lloyd, A.W., 2002, Interfacial bioengineering to enhance surface biocompatibility. Medical Device Technology, 13, 18–21.

Lööf J., Svahn F., Jarmar T., Engqvist H, Pameijer C.H., 2008, A comparative study of the bioactivity of three materials for dental applications, Dental Materials, 24, 653–659.

Lu, G., Zhu, L., Kong, L., Zhang, L., Gong, Y., Zhao, N., Zhang, X., 2006, Porous chitosan microcarriers for large scale cultivation of cells for tissue engineering: fabrication and evaluation, Tsinghua Science and Technology, 11, 4, 427- 432.

Ma, J., Wang, H., He, B., Chen, J., 2001, A preliminary *in vitro* study on the fabrication and tissue engineering applications of a novel chitosan bilayer

material as a scaffold of human neofetal dermal fibroblasts, Biomaterials, 22, 331-336.
Madihally, S.V., Flake, A.W., Matthew, H.W.T., 1999, Maintenance of CD34 expression during proliferation of CD34+ cord blood cells on glycosaminoglycan surfaces, Stem Cells, 17, 295-305.
Madihally, S.V., Matthew, H.W.T., 1999, Porous chitosan scaffolds for tissue engineering, Biomaterials, 20, 1133-1142.
Malafaya, P.B., Pedro, A.J., Peterbauer, A., Gabriel, C., Redl, H., Reis, R.L., 2005, Chitosan particles agglomerated scaffolds for cartilage and osteochondral tissue engineering approaches with adipose tissue derived stem cells, Journal of Materials Science: Materials in Medicine ,16, 1077-1085.
Mao, H.Q., Roy, K., Troung-Le, V.L., Janes, K.A., Lin, K.Y., Yan, W., August, J. T., Leong, K.W., 2001, Chitosan-DNA nanoparticles as gene carriers: Synthesis, characterization and transfection efficiency, Journal of Controlled Release, 70, 399-421.
Mao, J.S., Zhao, L.G., Yin, Y.J., Yao, K.D., 2003, Structure and properties of bilayer chitosan-gelatin scaffolds, Biomaterials, 24, 1067–1074.
Maviş, B., Demirtaş, T.T., Gerçek, I., Gümüşderelioğlu, M., Gündüz, G., Çolak, Ü., 2007, Bonelike apatitic calcium phosphate sandwiched between electrospun polycaprolactone nanofiber mats: synthesis, characterization and osteoblastic activity. European Ceramic Society, Berlin.
Merten, O.W., *et al.*, in M.J.T. Carrondo, B. Griffiths, anc J.L.P. Moreira, eds., Animal Cell Technology: From Vaccine to Genetic Medicine, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 1997, pp. 343-348.
Mi, F.L., Shyu, S.S., Wu, Y.B., Lee, S.T., Shyong, J.Y., Huang, R.N., 2001, Fabrication and characterization of a sponge-like asymmetric chitosan membrane as a wound dressing, Biomaterials, 22, 165-173.
Mi, F.L., Tan, Y.C., Liang, H.F., Sung, H.W., 2002, *In vivo* biocompatibility and degradability of a novel injectable-chitosan-based implant, Biomaterials, 23, 1, 181-191.
Molteni, M., Modrowski, D., Hott, M., Marie, P. J., 1999, Alterations of matrix- and cell-associated proteoglycans inhibit osteogenesis and growth response to fibroblast growth factor-2 in cultured rat mandibular condyle and calvaria, Cell Tissue Research, 295, 523-536.
Mori, H., Kanemura, Y., Onaya, J., Hara, M., Miyake, J., Yamasaki, M., Kariya, Y., 2005, Effects of heparin and its 6-O-and 2-O-desulfated derivatives with low anticoagulant activity on proliferation of human neural stem/progenitor cells, Journal of Bioscience and Bioengineering, 100 (1), 54-61.
Nagy, Z., Kolev, K., Csonka, E., Pek, M., Machovich, R., Kontos, H.A., 1995, contraction of human brain endothelial cells induced by thrombogenic and fibrinolytic factors: an in vitro cell culture model, Stroke, 26, 265-270.
Nair, L.S., Laurencin, C.T., 2007, Biodegradable polymers as biomaterials, Progress in Polymer Science, doi:10.1016/j.progpolymsci.2007.05.017.
Nikitovic, D., Assouti, M., Sifaki, M., Katonis, P., Krasagakis, K., Karamanos, N.K., Tzanakakis, G.N., 2008, Chondroitin sulfate and heparan sulfate-containing proteoglycans are both partners and targets of basic fibroblast growth factor-mediated proliferation in human metastatic melanoma cell lines, The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 40, 72-83.

Nojiri, C., Noishiki, Y., Koyanagi, H., 1987, Aorta-coronary bypass grafting with heparinised vascular grafts in dogs, The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery, 93, 867-877.

Nordtveit, R. J., Varum, K. M., Smidstrod, O., 1996, Degradation of partially N-acetylated chitosans with hen egg white and human lysozyme, Carbohydrate Polymer, 29, 163–167.

Obradovic, B., Martin, I., Padera, R.F., Treppo, S., Freed, L.E., Vunjak-Novakovic, G., 2001, Integration of engineered cartilage, Journal of Orthopaedic Research, 19, 1089-1097.

Oliveira, G.B., Carvalho Jr., L.B., Silva, M.P.C., 2003, Properties of carbodiimide treated heparin, Biomaterials, 24, 4777-4783.

Onat, T., Emerk, K., Sözmen, E.Y., eds., 2002, İnsan Biyokimyası, Palme Yayıncılık, Ankara, 711s.

Oungbho, K., 1997, Biodegradable sponges from hydrocolloids as sustained release drug carrier systems (Dissertation), Faculty of Mathematics-Natural Sciences, Christian- Albrechts-University, Kiel, Germany.

Peng, C.K., Yu, S.H., Mi, F.L., Shyu, S.S., 2006a, Polysaccharide-based artificial extracellular matrix: preparation and characterization of three-dimensional, macroporous chitosan and chondroitin sulfate composite scaffolds, Journal of Applied Polymer Science, 99, 2091–2100.

Peng, L., Cheng, X.R., Wang, J.W., Xu, D.X., Wang, G., 2006b, Preparation and evaluation of porous chitosan/collagen scaffolds for periodontal tissue engineering, Journal of Bioactive and Compatible Polymers, 21, 207-220.

Petite, H., Viateau, V., Bensaid, W., Meunier, A., de Pollak, C., Bourguignon, M., Oudina, K., Sedel, L., Guillemin, G., 2000, Tissue-engineered bone regeneration, Nature Biotechnology, 18, 959-963.

Rathke, T.D., Hudson, S.M., Review of chitin and chitosan as fiber and film formers, 1994, Reviews in Macromolecular Chemistry & Physics, C34, 375-437.

Renbutsu, E., Hirose, M., Omura, Y., Nakatsubo, F., Okamura, Y., Okamoto, Y., Saimoto, H., Shigemasa, Y., Minami, S., 2005, Preparation and biocompatibility of novel UV-curable chitosan derivatives, Biomacromolecules, 6, 5, 2385-2388.

Resende, C.X., Dille, J., Platt, G.M., Bastos, I.N., Soares, G.A., 2008, Characterization of coating produced on titanium surface by a designed solution containing calcium and phosphate ions,Materials Chemistry and Physics, 109, 429–435.

Rezwan, K., Q.Z. Chen, J.J. Blaker, A.R. Boccaccini, 2006, Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. Biomaterials 27(18): 3413–3431.

Rigo, E.C.S., Boschi, A.O., Yoshimoto, M., Allegrini, S., Konig, B., Carbonari, M.J., 2004, Evaluation *in vitro* and *in vivo* of biomimetic hydroxyapatite coated on titanium dental implants, Materials Science and Engineering: C, Vol. 24, 5, 647-651

Rose, F.R.A.J., Oreffo, R.O.C., 2002, Bone Tissue Engineering: Hope vs hype, Biochemical and Biophysical Research Communications, 292, 1-7.

Salgado, A. J., Coutinho, O. P., Reis, R. L., 2004, Bone tissue engineering: state of art and future trends, Macromolecular Bioscience, 4, 743-765.

San Antonio, J.D., Lander A.D., Wright T.C., Karnovsky M.J., 1992, Heparin inhibits the attachment and growth of Balb/c-3T3 fibroblasts on collagenous substrata, Journal of Cellular Physiology, 150, 8-16.

Sargeant, T.D., Rao, M.S., Koh, C.Y., Stupp, S.I., 2008, Covalent functionalization of NiTi surfaces with bioactive peptide amphiphile nanofibers, Biomaterials, 29, 1085-1098.

Seol, Y.J., Lee, J.Y., Park, Y.J., Lee, Y.M ., Ku, Y., Rhyu, I.C., Lee, S.J., Han, S.B., Chung, C.P., 2004, Chitosan sponges as tissue engineering scaffolds for bone formation, Biotechnology Letters, 26, 1037-1041.

Sharma, B. and Elisseeff, J. H., 2004, Engineering structually organized cartilage and bone tissues, Annals of Biomedical Engineering, 32, 148-159.

Shen, F., Cui, Y.L., Yang, L.F., Yao, K.D., Dong, X.H., Jia, W.Y., Shi, H.D., 2000, A Study on the fabrication of porous chitosan/gelatin network scaffold for tissue engineering, Polymer International, 49, 1596-1599.

Shi, C., Zhu, Y., Ran, X., Wang, M., Su, Y., Cheng, T., 2006, Therapeutic potential of chitosan and its derivatives in regenerative medicine, Journal of Surgical Research,133,185–192.

Shikinami, Y., Okuno, M., 1998, Bioresorbable devices made of forged composites of hydroxyapatite (HA) particles and poly-L-lactide (PLLA): part I. Basic characteristics, Biomaterials, 20, 859-877.

Shor, L., Güçeri, S., Wen, X., Gandhi, M., Sun, W., 2007, Fabrication of three-dimensional polycaprolactone/hydroxyapatite tissue scaffolds and osteoblast-scaffold interactions in vitro, Biomaterials, 28, 5291-5297.

Sikavitsas, V.I., Temenoff, J.S., Mikos, A.G., 2001, Biomaterials and bone mechanotransduction, Biomaterials, 22, 2581-2593.

Simon, G.C., Khatri, C.A., Wight, S.A., Wang, F.W., 2002, Preliminary report on the biocompatibility of a moldable, resorbable, composite bone graft consisting of calcium phosphate cement and poly(lactide-co-glycolide) microspheres, Journal of Orthopaedic Research, 20, 473-482.

Smith, S. M. L., West, L. A., Govindraj, P., Zhang, X. D., Ornitz, M., Hassel, J. R., 2007, Heparan and chondroitin sulfate on growth plate perlecan mediate binding and delivery of FGF-2 to FGF receptors, Matrix Biology, 3, 175-184.

Solomon, E.P., 2002, İnsan Anatomisi ve Fizyolojisine Giriş (çev: L. Bikem Sözen), Birol Basın Yayın Dağıtım ve Ticaret LTD. ŞTİ., İstanbul, 274s.

Spier, R.E., editor, 2000, Encyclopedia of Cell Technology, ISBN 0-471-16123-3, Wiley, New York, 1249 p.

Spitzer, R., Perka, C., Lindenhayn, K., Zippel, H., 2002, Matrix engineering for osteogenic differentiation of rabbit periosteal cells using α-tricalcium phosphate particles in a three-dimensional fibrin culture, Journal of Biomedical Materials Research Part A, 59, 690-696.

Stone, C.A., Wright, H., Clarke, T., Powell, R., Devaraj, V.S., 2000, Healing at skin graft donor sites dressed with chitosan, British Journal of Plastic Surger, 53, 601–606.

Subramanian, A., Lin, H.Y., 2005, Crosslinked chitosan: its physical properties and the effects of matrix stiffness on chondrocyte cell morphology and proliferation, Journal of Biomedical Materials Research, 75A, 742-753.

Suh, J.K.F., Matthew, H.W.T., 2000, Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: a review, Biomaterials, 21, 2589-2598.

Şenköylü, A., Şimşek, A., Şahin, F.I., Menevşe, S., Özoğul, C., Denkbaş, E.B., Pişkin, E., 2001, Interaction of cultured chondrocytes with chitosan scaffold, Journal of Bioactive and Compatible Polymers, 16, 136-144.

Tabata, Y., Ikada, Y., 1999, Vascularization effect of basic fibroblast growth factor released from gelatin hydrogels with different biodegradabilities, Biomaterials, 20 (22), 2169–2175.

Taş, A.C., Bhaduri, S.B., 2004, Rapid coating of Ti6Al4V at room temperature with a calcium phosphate solution similar to 10X simulated body fluid, Journal of Materials Research, 19(9), 2742-2749.

Temenoff, J.S., Lu, L., Mikos, A.G., Bone Engineering,1st edition, Em squared, Toronto 1999, p. 454.

Tığlı, R.S., Gümüşderelioğlu, M., 2008, Evaluation of RGD- or EGF-immobilized scaffolds for chondrogenic activity, International Journal of Biological Macromolecules, 43(2), 121-128.

Tığlı, R.S., Karakeçili, A., Gümüşderelioğlu, M., 2007, In vitro characterization of chitosan scaffolds: influence of composition and deacetylation degree. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 18(9), 1665-1674.

Tillman, J., Ullm, A., Madihally, S.V., 2007, Three-dimensional cell colonization in a sulfate rich environment, Biomaterials, 27, 5618-5626.

Tsuruga, E., Takita, H., Itoh, H., Wakisaka, Y., Kuboki, Y., 1997, Pore size of porous hydroxyapatite as the cell-substratum controls BMP-induced osteogenesis. The Journal of Biochemistry (Tokyo), 121, 317–324.

Tuzlakoglu, K., Alves, C.M., Mano, J.F., Reis, R.L., 2004, Production and characterization of chitosan fibers and 3-D fiber mesh scaffolds for tissue engineering applications, Macromolecular Bioscience, 4, 811–819.

Türkoğlu Şaşmazel, H., Aday, S., Gümüşderelioğlu, M., 2007, Insulin and heparin co-immobilized 3D polyester fabrics fort he cultivation of fibroblasts in low-serum media, International Journal of Biological Macromolecules, 41, 338-345.

Underwood, P.A., Mitchell, S.M., Whitelock, J.M., 1998, Heparin fails to inhibit the proliferation of human vascular smooth muscle cells in the presence of human serum, Journal of Vascular Research, 35, 449–460.

van Tienen, T.G., Heijkants, R.G., Buma, P., de Groot, J.H., Pennings, A.J., Veth, R.P., 2002, Tissue ingrowth and degradation of two biodegradable porous polymers with different porosities and pore sizes, Biomaterials, 23, 1731–1738.

Viji, R.I., Sameer Kumar, V.B., Kiran, M.S., Sudhakaran, P.R., 2008, Angiogenic response of endothelial cells to heparin-binding domain of fibronectin, The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 40, 215-226.

Walter, M., Herren, C., Gension, T.J., Steffens, G.C.M., Hermanns-Sachweh, B., Jahnen-Dechent, W., Rüger, M., Erli, H.J., 2008, Biomimetic modification of the TiO_2/glass composite Ecopore with heparinized collagen and the osteoinductive factor BMP-2, Acta Biomaterialia, 4, 997-1004.

Wang, J.W., Hon, M.H., 2003a, Sugar-mediated chitosan/poly(ethylene glycol)-beta-dicalcium pyrophospate composite: mechanical and microstructural properties, Journal of Biomedical Materials Research, 64A, 262–272.

Wang, M., 2006, Composite scaffolds for bone tissue engineering, American Journal of Biochemistry and Biotechnology, 2(2), 80-84.

Wang, X.H., Li, D.P., Wang, W.J., Feng, Q.L., Cui, F.Z., Xu, Y.X., Song, X.H., Werf, M., 2003b, Crosslinked collagen/chitosan matrix for artificial livers, Biomaterials, 24, 3213-3220.

Wang, X.H., Li, D.P., Wang, W.J., Feng, Q.L., Cui, F.Z., Xu, Y.X., Song, X.H., 2003c, Covalent immobilization of chitosan and heparin on PLGA surface, International Journal of Biological Macromolecules, 33, 95-100.

Wei, D., Zhou, Y., Jia, D., Wang, Y., 2008, Biomimetic apatite deposited on microarc oxidized anatase-based ceramic coating, Ceramics International, 34, 1139–1144.

Whang, K., Healy, K. E., Elenz, D. R., Nam, E. K., Tsai, D. C., Thomas, C. H., Nuber, G. W., Glorieux, F. H., Travers, R., Sprague, S. M., 1999, Engineering bone regeneration with bioabsorbable scaffolds with novel microarchitecture, Tissue Engineering, 5, 35-51.

Williams, D.F., 1999, Bone Engineering, 1st edition, Em squared, Toronto, p. 577.

Wise, D.L., 2000, Biomaterials and Bioengineering Handbook. Marcel Dekker Inc., pp: 366-368.

Wissink, M.J.B., Beernink, R., Pieper, J.S., Poot, A.A., Engbers, G.H.M., Beugeling, T., van Aken, W.G., Feijen, J., 2001, Immobilization of heparin to EDC/NHS-crosslinked collagen. Characterization and in vitro evaluation, Biomaterials, 22, 151-163.

Xu, H.H.K., Simon Jr, C.G., 2005, Fast setting calcium phosphate-chitosan scaffold: mechanical properties and biocompatibility, Biomaterials, 26, 1337-1348.

Yan, J., Li, X., Liu, L., Wang, F., Zhu, T.W., Zhang, Q., 2006, Potential use of collagen-chitosan-hyaluronan tri-copolymer scaffold for cartilage tissue engineering, Artificial Cells, Blood Substitutes and Biotechnology, 34, 27-39.

Yang, L., Butcher, M., Simon, R.R., Osip, S.L., Shaughnessy, S.G., 2005, The effect of heparin on osteoblast differentiation and activity in primary cultures of bovine aortic smooth muscle cells, Atherosclerosis, 179, 79-86.

Yaszemski, M.J., Oldham, J. B., Lu, L., Currier, B. L., 1994, Bone Engineering, 1st edition, Em squared, Toronto, p. 541.

Yayon A., Klagsbrun M., Esko J., Leder P., Ornitz D., 1991, Cell surface, heparin-like molecules are required for binding basic fibroblast growth factor to its high affinity receptor. Cell, 64, 841–848 .

Yi, H., Wu, L.Q., Bentley, W.E., Ghodssi, R., Rubloff, G.W., Culver, J.N., Payne, G.F., 2005, Biofabrication with chitosan, Biomacromolecules, 6, 6, 2881-2894.

Yin, Y., Ye, F., Cui, J., Zhang, F., Li, X., Yao, K., 2003, Preparation and characterization of macroporous chitosan-gelatin/beta-tricalcium phosphate composite scaffolds for bone tissue engineering, Journal of Biomedical Materials Research, 67A, 844–855.

Yu, X., Bichtelen, A., Wang, X., Yan, Y., Lin, F., Xiong, Z., Wu, R.O., Zhang, R., Lu, Q., 2005, Collagen/chitosan/heparin complex with improved biocompatibility for hepatic tissue engineering, Journal of Bioactive and Compatible Polymers, 20, 15-28.

Yuan, Y., Zhang, P., Yang, Y., Wang, X., Gu, X., 2004, The interaction of Schwann cells with chitosan membranes and fibers *in vitro*, Biomaterials, 25, 4273-4278.

Zeltinger, J., Sherwood, J.K., Graham, D.A., Mueller, R., Griffith, L.G., 2001, Effect of pore size and void fraction on cellular adhesion, proliferation, and matrix deposition, Tissue Engineering, 7, 557–572.

Zhang, Y., Zhang M., 2001a, Microstructural and mechanical characterization of chitosan scaffolds reinforced by calcium phosphates. J Non-cris Sol 282: 159-164.

Zhang, Y., Zhang, M., 2001b, Synthesis and characterization of macroporous chitosan/calcium phosphate composite scaffolds for tissue engineering, Journal of Biomedical Materials Research, 55, 3, 304-312.

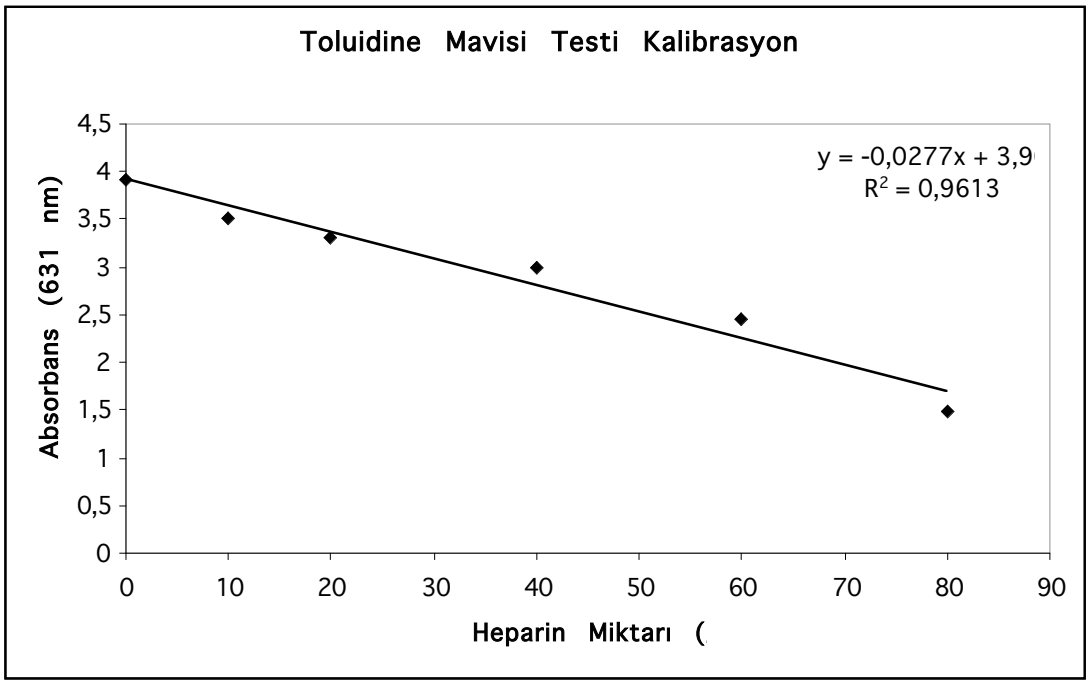
Zhang, Y.F., Cheng, X.R., Chen, Y., Shi, B., Chen, X.H., Xu, D.X., Ke, J., 2007, Three-dimensional nanohydroxyapatite/chitosan scaffolds as potential tissue engineered periodontal tissue, Journal of Biomaterials Applications, 21 (4), 333-349.

Zhu, A., Zhang, M., Wu, J., Shen, J., 2002, Covalent immobilization of chitosan/heparin complex with a photosensitive hetero-bifunctional crosslinking reagent on PLA surface, Biomaterials, 23, 4657-4665.

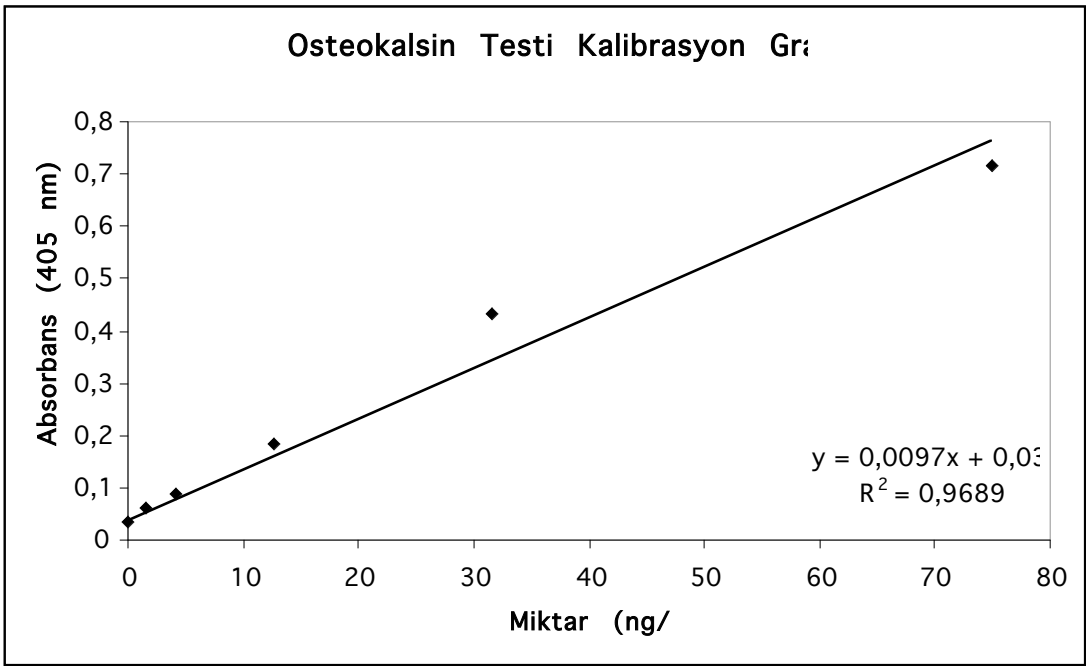
EK-1

KALİBRASYON GRAFİKLERİ

Toluidine Mavisi Testi Kalibrasyon Grafiği



Osteokalsin Testi Kalibrasyon Grafiği



EK-2

HEMOSİTOMETRE İLE HÜCRE SAYIMI VE CANLILIK ÖLÇÜMÜ PROSEDÜRÜ

Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

%0.4 (w/v) Tripan Mavisi Solüsyonu

0.4 g tripan mavisi alınır ve fizyolojik tuzlu su ile 100 ml'ye tamamlanır. Tripan mavisi tamamen çözündükten sonra sırasıyla süzgeç kağıdı, 0.45 µm ve 0.22 µm filtrelerden geçirilir ve küçük hacimlerdeki steril şişelere paylaştırılır.

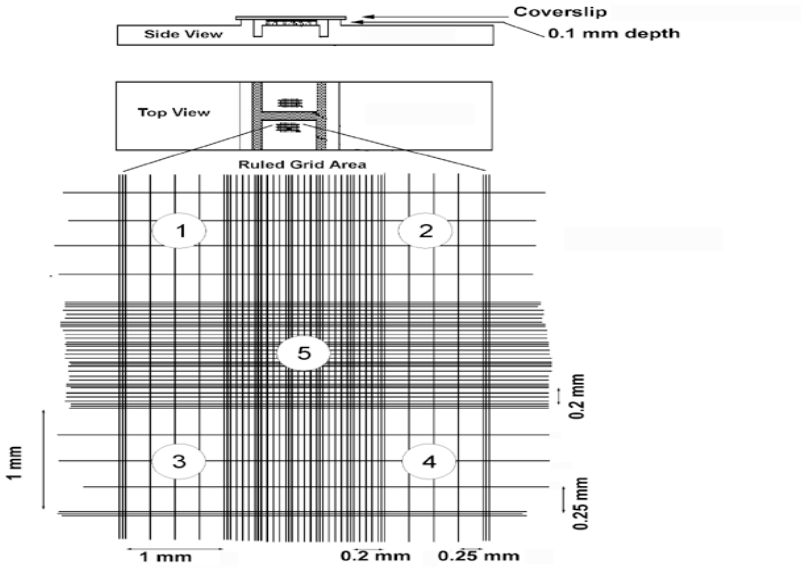
Fizyolojik Tuzlu Su

8.5 g NaCl alınarak bidistile su ile 1 L'ye tamamlanır.

Yöntem

1. Ependorf tüpüne 0.9 ml tripan mavisi solüsyonu (%0.4'lük) konulur.
2. Sayımı yapılacak olan hücre süspansiyonundan 0.1 ml alınarak tüpteki boya solüsyonu içerisine ilave edilir (Böylece hücreler 1:10 oranında seyreltilmiş olur.).
3. Süspansiyon köpük oluşturmayacak şekilde dikkatlice homojenize edilir.
4. Hemositometre lamı ve lameli alkol ile temizlenir ve lamel lam üzerine yerleştirilir.
5. 0.05 ml (50 µl) kadar boyanmış hücre süspansiyonu alınır ve hemositometrenin lamı ile lameli arasına yavaşça akıtılır.
6. Işık mikroskobu yardımıyla, 10X objektif kullanılarak hemositometrenin tüm karelerindeki canlı hücreler (boya almayan, parlak sarı renkte görülen hücreler) sayılır. Sayım sırasında en sağdaki üçlü çizgiden başlayarak küçük karelerin içindeki tüm hücreler, sağ çizgi üzerindekiler ve en üst çizgi üzerindekiler sayılarak yukarıya, daha sonra yandaki küçük kareden aynı prensiple aşağıya doğru inilir ve alt çizgidekiler de sayıldıktan sonra yandaki

küçük karelere geçilir. Böylece tüm alan sayılıncaya kadar devam edilir.



Neubauer Lamının Görüntüsü (Sayım sırasında 1,2,3 ve 4 numarayla gösterilen büyük karelerdeki hücrelerin tamamı sayılacaktır.).

7. Ölü hücreler (boyanmış hücreler) de aynı şekilde sayıldıktan sonra mililitredeki canlı hücre sayısı ve canlılık oranı aşağıdaki formüller yardımıyla hesaplanır:

Hücre yoğunluğunun belirlenmesi

$$\frac{\text{Sayılan hücre miktarı} \times \text{Seyreltme oranı} \times 10^4}{4} = \text{Canlı ya da ölü hücre yoğunluğu (hücre/ml)}$$

Canlılık oranının belirlenmesi

$$\frac{\text{Sayılan canlı hücre miktarı}}{\text{Sayılan toplam hücre miktarı}} \times 100 = \text{Canlılık oranı (\%)}$$

8. Hücre yoğunluğu sayılamayacak kadar fazla ise PBS ile belli oranda seyreltme gerçekleştirilir ve bu seyreltme faktörü üzerinden hesaplama yapılır.

EK-3

ATDC5 KARAKTERİZASYON ÇALIŞMALARI

Kitosan doku iskelelerindeki ATDC5 hücrelerinin MTT analizi, 13 günlük kültür süresince farklı kültür zamanlarında, 3.3.2.1.'de verilen yönteme uygun şekilde gerçekleştirilmiştir. Seçilen zaman aralıklarında, kültür ortamı uzaklaştırılmıştır ve örnekler 600 µl daha önceden ılık hale getirilmiş PBS (pH 7.4) ile yıkanmıştır. Her bir örneğe 60 µl MTT çözeltisi (2.5 mg/ml, PBS içinde) içeren 600 µl kültür ortamı eklenmiştir ve 37ºC'de 3 saat boyunca inkübasyon gerçekleşmiştir. İnkübasyon periyodundan sonra, her bir gözden ortam uzaklaştırılmış ve doku iskeleleri başka bir 24 gözlü kültür kabına aktarılmıştır. Formazan kristallerini çözmek için her bir göze 400 µl 0.04 M HCl içeren izopropanol çözeltisi eklenmiştir. Elde edilen, kristal viyole rengindeki çözelti alınıp 13000 rpm'de 2 dakika boyunca santrifüjlenmiştir. Optik yoğunluk, 200 µl süpernatant alınarak, 690 nm referans olmak üzere 570 nm'de microplate reader (Asys UVM 340, Avusturya) ile spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. MTT testi kontrol olarak hücre içermeyen doku iskelelerine de uygulanmıştır ve elde edilen değer ölçüm değerlerinden çıkarılmıştır. Üstel hücre büyümesi kabulü yapılmıştır ve özgül üreme hızı (µ) aşağıda verilen eşitlikle elde edilmiştir:

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

MTT analizi sonucunda, kitosan iskeleleri üzerindeki ATDC5 hücreleri için özgül üreme hızı **0.014 sa^{-1}**, 24. saat sonunda özgül üreme hızı, **0.037 sa^{-1}** ve ikilenme süresi **47.9 sa** olarak bulunmuştur.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı……..: Sezin ADAY
Doğum Yeri……: Mardin
Doğum Yılı……..: 1983
Medeni Durumu…….: Bekar

Eğitim ve Akademik Durumu

2004 - **Lisans** Eskişehir Anadolu Üniversitesi, Açıköğretim Fakültesi, İktisat Fakültesi, İktisat Bölümü, Eskişehir

2001 - 2006 **Lisans** Ege Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü, İzmir (Bölüm Birincisi)

1997-2001 **Lise** Karşıyaka Gazi Lisesi (Y.D.A.), İzmir (Okul Birincisi)

Yabancı Dil

İngilizce (ileri), Almanca (başlangıç)

İş Deneyimi

- Ege Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü
  Hayvan Hücre Kültürü Laboratuvarı (Şubat 2006-Temmuz 2006) (Tez Çalışması)
- T.C. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Şap Enstitüsü
  Virus Kültürü ve Aşı Hazırlama Laboratuvarı, Üretim Kontrol Laboratuvarı, Süspanse Hücre Üretim Laboratuvarı, Vasat Hazırlama Laboratuvarı, Tip Tayini ve Seroloji Laboratuvarı, Hücre Bankası Bölümleri (Haziran 2005-Temmuz 2005) (Zorunlu Staj)
- T.C. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Bornova Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü
  Aşı Kontrol ve Viroloji Laboratuvarları (7-18 Şubat 2005)
- Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Bölümü
  Moleküler Genetik ve Sitogenetik Laboratuvarları (Eylül 2004-Ekim 2004)
- Ege Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü
  Moleküler Genetik Laboratuvarı (Ağustos 2004-Eylül 2004)
- Ege Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü
  Bitki Doku Kültürleri Laboratuvarı (Mayıs 2003-Mayıs 2004)