

**EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
(YÜKSEK LİSANS TEZİ)**

**SIÇAN KEMİK İLİĞİNDEN VE YAĞ DOKUSUNDAN ELDE
EDİLEN MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN PCL
NANOFİBRÖZ YÜZEYLER ÜZERİNDE TUTUNMA VE
ÇOĞALMA ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ**

Şeyma ÇOĞAN

Tez Danışmanı : Prof. Dr. S. İsmet DELİLOĞLU GÜRHAN

Biyomühendislik Anabilim Dalı

**Bilim Dalı Kodu : 612.01.00
Sunuş Tarihi : 21.12.2012**

Bornova-İZMİR

2012

Şeyma ÇOĞAN tarafından yüksek lisans tezi olarak sunulan “Sıçan Kemik İliğinden ve Yağ Dokusundan Elde Edilen Mezenkimal Kök Hücrelerin PCL Nanofibröz Yüzeyle Üzerinde Tutunma ve Çoğalma Özelliklerinin İncelenmesi” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi'nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 21.12.2012 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı : Prof. Dr. S. İsmet DELİLOĞLU GÜRHAN.....

Raportör Üye: Yrd. Doç. Dr. Aylin ŞENDEMİR ÜRKMEZ.....

Üye: Doç. Dr. Feyzan ÖZDAL KURT

ÖZET**SIÇAN KEMİK İLİĞİNDEN VE YAĞ DOKUSUNDAN ELDE EDİLEN
MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN PCL NANOFİBRÖZ YÜZEYLER
ÜZERİNDE TUTUNMA VE ÇOĞALMA ÖZELLİKLERİNİN
İNCELENMESİ**

ÇOĞAN, Şeyma

Yüksek Lisans Tezi, Biyomühendislik Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. S. İsmet DELİLOĞLU GÜRHAN

Aralık 2012, 102 sayfa

Bu çalışmada, diğer kök hücre tiplerine göre daha kolay elde edilebilen, etik açıdan kullanılması daha uygun olan ve HLA (insan lökosit antijeni) doku uyumu gerektirmeyen, kemik iliğinden ve yağ dokusundan elde edilen mezenkimal kök hücreler (MKH) ile çalışılmıştır. Sentetik bir polimer olan polikaprolakton (PCL) ile dökme yöntemiyle membranlar hazırlanmıştır. Elektroğirme yöntemiyle düzgün dizili (-A) ve rastgele dizili (-R) nanofiberler hazırlanan membranlar üzerinde toplanmıştır. Yüzeylerin karakterizasyonu taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve statik temas açısı inceleme yöntemleri ile gerçekleştirilmiştir. Akış sitometrisi ile karakterizasyonları yapılan MKH' ler hazırlanan PCL yüzeyler üzerinde kültive edilmiştir. PCL yüzeyler üzerinde, MKH' lerin tutunma özellikleri SEM ve immünfloresan boyama ile, çoğalma özellikleri ise MTT testi ile incelenmiştir. Sonuç olarak en az hücre tutunması polistren yüzey üzerinde görülmesine rağmen, PCL yüzeyler üzerinde hücre çoğalmasının polistren yüzeylerdeki kadar iyi olmadığı saptanmıştır. Tüm yüzeyler üzerinde AdMKH' lerin Kİ-MKH' lerine göre daha iyi tutunduğu ve çoğaldığı tespit edilmiştir. Proje sonucunda elde edilen veriler doku mühendisliği alanında, hücre-yüzey etkileşimleri konusunda ileride yapılacak olan çalışmalara yön vermesi açısından oldukça büyük öneme sahiptir.

Anahtar Sözcükler: Mezenkimal kök hücre, polikaprolakton, elektroğirme, tutunma, çoğalma.

ABSTRACT**INVESTIGATION OF ATTACHMENT AND PROLIFERATION
PROPERTIES OF RAT BONE MARROW AND ADIPOSE TISSUE
DERIVED MESENCHYMAL STEM CELLS
ON PCL NANOFIBROUS SURFACES**

ÇOĞAN, Şeyma

MSc in Bioengineering

Supervisor: Prof. Dr. S. İsmet DELİLOĞLU GÜRHAN

December 2012, 102 pages

In this project, mesenchymal stem cells (MSC) derived from bone marrow and adipose tissue which have no requirement of HLA (human leukocyte antigen) tissue typing and can be obtained more easily than other stem cells and also which are ethically more appropriate were used. Polycaprolactone (PCL) membranes were prepared by solvent casting method. Aligned and random nanofibers were collected on PCL membranes by electrospinning. PCL surfaces characterized by scanning electron microscope (SEM) and static contact angle analyzes. Mesenchymal stem cells which were characterized by flow cytometry, were cultured on PCL surfaces. MSC's attachment properties were examined by SEM and immunofluorescence, also proliferation properties were investigated by MTT assay. To conclude, although least cell attachment observed on polystyrene surfaces, cell proliferation on PCL surfaces was not as good as polystyrene. Adipose derived stem cell adhered and proliferated better than bone marrow stem cell. Data obtained at the end of this project, will be guide to the other new works in tissue engineering studies on cell-surface interactions.

Keywords: Mesenchymal stem cell, polycaprolactone, electrospinning, attachment, proliferation.

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım sırasında engin bilgi ve tecrübeleriyle çalışmalarımın yönlendirilmesi ve yürütülmesi için gerekli desteği hiçbir zaman esirgemeyen, her aşamada bana güvenen, hayatım boyunca örnek alacağım çok değerli danışmanım Prof. Dr. S. İsmet DELİLOĞLU GÜRHAN' a, ihtiyacım olan her anda, bilgisi ve deneyimiyle yardımlarını hiç esirgemeyen sevgili hocam Yrd. Doç. Dr. Aylin ŞENDEMİR ÜRKMEZ' e, yüzeyletimin üretimi sırasında bana her türlü olanağı sunan Hacettepe Üniv. Kimya Müh. Bölümü öğretim üyesi Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU' na yardımları ve değerli katkıları için teşekkür ederim.

Yüzeyletirmiyi hazırlamakta bana yardım eden, her türlü tecrübesini benimle paylaşmaktan çekinmeyen Hacettepe Üniv. Biyomühendislik Anabilim Dalı Ar. Gör. Merve ÇAPKIN' a ve tüm laboratuvar çalışanlarına, SEM analizlerindeki katkılarından dolayı Ege Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi, Klinik Bilimleri Bölümü Ar. Gör. B. Tuba TÜRK' e ve Öğr. Üyesi Prof. Dr. Bilge Hakan ŞEN' e, laboratuvar olanaklarını kullanmama izin veren Prof. Dr. Kemal Sami KORKMAZ' a ve Doç. Dr. Oğuz Altungöz' e yardımlarından dolayı teşekkür ederim.

Destek ve yardımlarını hiç esirgemeyen başta SEÇİL ERDEN olmak üzere tüm Ege Üniv. Hayvan Hücre Kültürü ve Doku Müh. Grubu çalışma arkadaşlarıma, iyi ve kötü bütün anılarımı paylaşan, sevgilerini ve desteklerini esirgemeyen, her biri birbirinden değerli lise arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Tüm hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen, attığım her adımda bana güvenen, sevgili anneme ve eşsiz babama, canım kardeşime ve nişanlıma teşekkür ederim.

11 Müh 008 nolu proje ile çalışmamı destekleyen Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü'ne ve 2210-Yurt İçi Yüksek Lisans Burs Programı kapsamında yüksek lisans bursiyeri olduğum TÜBİTAK'a destekleri için teşekkürlerimi sunuyorum.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	v
ABSTRACT	vii
TEŞEKKÜR	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xvi
TABLolar DİZİNİ.....	xxi
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	xxiii
1.GİRİŞ.....	1
2.ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	3
2.1 Doku Mühendisliği	3
2.1.1 Doku mühendisliği tarihi	4
2.1.2 Doku mühendisliği yaklaşımları.....	5
2.1.3 Doku iskeleleri.....	8
2.1.3.1 Doku iskelesi malzemeleri.....	9
2.1.3.2 Doku iskelesi üretim yöntemleri.....	16
2.1.4 Hücreler	22
2.1.5 Hücre-yüzey etkileşimleri.....	24
3. MATERYAL VE METOD	26

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
3.1 Stok Mezenkimal Kök Hücrelerin Çözdürülmesi	28
3.2 Mezenkimal Kök Hücrelerin Pasajlanması	28
3.3 Mezenkimal Kök Hücrelerin Dondurulması	29
3.4 MKH' lerin Büyüme Kinetiğinin ve MTT Kalibrasyon Eğrisinin Çıkarılması	29
3.5 MKH' lerin Karakterizasyonu	31
3.6 Mezenkimal Kök Hücrelerin Farklılaşma Potansiyellerinin İncelenmesi	32
3.6.1 Osteojenik farklılaştırma.....	32
3.6.1.1 Alizarin red s boyama	33
3.6.1.2 <i>Von kossa</i> boyama.....	33
3.7 Oil Red O Boyama	34
3.8 Polikaprolakton (PCL) Membranların Hazırlanması	35
3.9 Polikaprolakton Düzgün Dizili (PCL-A) ve Rastgele Dizili (PCL-R) Nanofiberlerin Hazırlanması.....	35
3.10 Statik Temas Açısı Ölçümü ile Yüzeylerin Karakterizasyonu	38
3.11 Nanofibröz Yüzeylerin Sterilizasyonu ve Hücre Kültivasyonu.....	39
3.12 Nanofibröz Yüzeyler Üzerindeki MKH' lerin İmmünohistokimyasal İşaretlemeşi	39

İÇİNDEKİLER (devam)Sayfa

3.13 Hücreli Yüzeylerin Taramalı Elektron Mikroskopi (SEM) Çalışması.....	41
3.14 Nanofibröz Yüzeyler ile Büyüme Kinetiği Çalışması.....	43
4. BULGULAR.....	44
4.1 Mezenkimal Kök Hücrelerin Morfolojik Görüntüleri	44
4.2 MKH' lerin Büyüme Kinetiği ve MTT Kalibrasyon Eğrisi	44
4.3 MKH' lerin Karakterizasyonu	48
4.4 Mezenkimal Kök Hücrelerin Farklılaşma Potansiyellerinin İncelenmesi	49
4.4.1 Osteojenik farklılaştırma	49
4.4.1.1 Alizarin red s boyama.....	54
4.4.1.2 <i>Von kossa</i> boyama	57
4.5 Oil Red O Boyama.....	60
4.6 Polikaprolakton Yüzeylerin Hazırlanması ve Karakterizasyonu.....	61
4.6.1 PCL-M üretimi.....	61
4.6.2 PCL-A ve PCL-R nanofiberlerin hazırlanması	62
4.6.3 Statik temas açısı ölçümü ile yüzeylerin karakterizasyonu	63
4.7 Nanofibröz Yüzeyler Üzerindeki MKH' lerin İmmünohistokimyasal İşaretlemesi	65

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
4.8 Hücreli Yüzeylerin Taramalı Elektron Mikroskopi (SEM) Çalışması	68
4.9 Nanofibröz Yüzeyler ile Büyüme Kinetiği Çalışması	73
5. TARTIŞMA	78
6. SONUÇLAR	84
7. ÖNERİLER	85
KAYNAKLAR	86
ÖZGEÇMİŞ	99

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 Fra Angelico tarafından resmedilen “Justinian’ ın iyileşmesi”	5
2.2 Doku mühendisliği üçlüsü	6
2.3 PLLA’ nın kimyasal yapısı	13
2.4 Polikaprolakton’un kimyasal yapısı	14
2.5 Biyomateryal veya doku mühendisliği alanlarında PCL kullanılarak yapılan yayın sayısının yıllara göre değişimi	15
2.6 Çeşitli yöntemlerle üretilmiş iskelelere ait SEM görüntüleri	17
2.7 Çeşitli yöntemlerle üretilmiş iskelelere ait SEM görüntüleri	19
2.8 Elektroçirme elemanlarını gösteren şematik diyagram	21
2.9 İntegrin aracılı hücre tutunması	25
2.10 Lamellipodia ve filapodia	25
3.1 Tez projesinde izlenen çalışma yol izi.....	27
3.2 Büyüme kinetiği için MTT test şablonu	30
3.3 Kalibrasyon eğrisi için MTT test şablonu	31
3.4 Yüksek voltaj kaynağı	36
3.5 Pompa	36
3.6 Rastgele dizili nanofiberleri toplama yüzeyi	36

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.7 Düzgün dizili nanofiberleri toplama yüzeyi.....	37
3.8 Elektroğirme sisteminin genel görünüşü, rastgele dizili nanofiberleri toplama yüzeyi	37
3.9 Nemli odacık	40
4.1 Üç günlük AdMKH (P/1) ve Kİ-MKH (P/1) kültürlerinin ters faz ışık mikroskop görüntüleri.....	44
4.2 AdMKH' ler için oluşturulan kalibrasyon eğrisi	45
4.3 Kİ-MKH' ler için oluşturulan kalibrasyon eğrisi.....	46
4.4 AdMKH' ler ve Kİ-MKH' ler için kalibrasyon eğrilerinin karşılaştırılması	47
4.5 AdMKH akış sitometrisi sonuçları	48
4.6 Kİ-MKH akış sitometrisi sonuçları.....	49
4.7 Osteojenik farklılaştırma öncesinde P/2 Kİ-MKH ters faz ışık mikroskobu görüntüleri.....	50
4.8 Osteojenik farklılaştırma ortamındaki P/2 Kİ-MKH' lerin 1. ve 2. hafta ters faz ışık mikroskobu görüntüleri	51
4.9 Osteojenik farklılaştırma ortamındaki P/2 Kİ-MKH' lerin 3. ve 4. hafta ters faz ışık mikroskobu görüntüleri.	52
4.10 Farklı osteojenik farklılaştırma ortamlarındaki P/2 AdMKH' lere ait ters faz ışık mikroskop görüntüleri	53

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.11 Farklı osteojenik farklılaştırma ortamlarındaki P/2 AdMKH' lere ait ters faz ışık mikroskop görüntüleri.....	54
4.12 Kİ-MKH P/2 osteojenik farklılaştırmanın Alizarin Red Boyama ile tespiti	55
4.13 Kİ-MKH P/2 osteojenik farklılaştırma Alizarin Red boyama mikroskopik görüntüleri.....	55
4.14 AdMKH P/2 osteojenik farklılaştırma Alizarin Red S boyama mikroskopik görüntüleri.....	56
4.15 AdMKH P/2 osteojenik farklılaştırma Alizarin Red boyama mikroskopik görüntüleri.....	57
4.16 Kİ-MKH P/2 osteojenik farklılaştırmanın Von Kossa boyama ile tespiti...	58
4.17 Kİ-MKH P/2 osteojenik farklılaştırma Von Kossa Boyama mikroskopik görüntüleri.....	58
4.18 AdMKH P/2 osteojenik farklılaştırma Von Kossa Boyama mikroskopik görüntüleri.....	59
4.19 AdMKH P/2 osteojenik farklılaştırma Von Kossa Boyama mikroskopik görüntüleri.....	60
4.20 AdMKH P2 Oil Red O boyamasına ait mikroskopik görüntüler	61
4.21 PCL membranların SEM görüntüleri.....	61
4.22 PCL-A (a) ve PCL-R (b) nanofiberlerinin ters faz mikroskop görüntüleri .	62
4.23 PCL-A nanofiberlerin SEM görüntüleri	63

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.24 PCL-R nanofiberlerin SEM görüntüleri.....	63
4.25 PCL yüzeylere ait temas açısı ölçüm görüntüleri	65
4.26 AdMKH' lerin kültürün ikinci gününde farklı yüzeyler üzerindeki floresan mikroskop görüntüleri.....	66
4.27 Kİ-MKH' lerin kültürün ikinci gününde farklı yüzeyler üzerindeki floresan mikroskop görüntüleri.....	67
4.28 MKH' lerin kültürün ikinci gününde polistren yüzeyler üzerindeki floresan mikroskop görüntüleri.....	67
4.29 AdMKH' lerin kültürün birinci gününde farklı yüzeyler üzerindeki SEM görüntüleri.....	68
4.30 AdMKH' lerin kültürün ikinci gününde farklı yüzeyler üzerindeki genel görünümüne ait SEM görüntüleri	69
4.31 AdMKH' lerinin kültürün ikinci gününde farklı yüzeyler üzerindeki tutunmalarının ayrıntılı incelenmesi	70
4.32 Kİ-MKH' lerin kültürün birinci gününde farklı yüzeyler üzerindeki SEM görüntüleri.....	71
4.33 Kİ-MKH' lerin kültürün ikinci gününde farklı yüzeyler üzerindeki genel görünümüne ait SEM görüntüleri	72
4.34 Kİ-MKH' lerinin kültürün ikinci gününde farklı yüzeyler üzerindeki tutunmalarının ayrıntılı incelenmesi	73
4.35 AdMKH'lerin nanofibröz yüzeyler ve polistren yüzey üzerindeki başlangıç hücre tutunmaları.	74

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.36 Kİ-MKH'lerin nanofibröz yüzeyler ve polistren yüzey üzerindeki başlangıç hücre tutunmaları	74
4.37 AdMKH ve Kİ-MKH'lerin nanofibröz yüzeyler ve polistren yüzey üzerindeki başlangıç hücre tutunmalarının karşılaştırılması	74
4.38 AdMKH'lerin nanofibröz yüzeyler ve polistren yüzey üzerinde büyüme grafiği.....	76
4.39 Kİ-MKH'lerin Nanofibröz yüzeyler ve polistren yüzey üzerinde büyüme grafiği.....	76
4.40 AdMKH'lerin ve Kİ-MKH'lerin nanofibröz yüzeyler ve polistren yüzey üzerinde büyüme grafiği	77

TABLolar DİZİNİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 Doğal polimerler	11
2.2 Biyobozunur sentetik polimerler.....	12
2.3 Biyobozunur olmayan sentetik polimerler.....	13
2.4 PLLA ve diğer biyomalzemelerin bozunma hızları ve mekanizmaları	14
2.5 Geleneksel iskele üretim yöntemleri.....	18
2.6 SFF fabrikasyon tekniklerinin avantajları ve sınırlamaları.....	19
3.1 Akış sitometrisi için kullanılan antikörlerin listesi	31
3.2 AdMKH' ler için kullanılan osteojenik farklılaştırma ortam kompozisyonları	33
3.3 PCL-A ve PCL-R için seçilen nanofiber üretim koşulları	38
4.1 AdMKH kalibrasyon eğrisinde absorbans değerlerine karşılık gelen hücre sayıları.....	45
4.2 Kİ-MKH kalibrasyon eğrisinde absorbans değerlerine karşılık gelen hücre sayıları.....	46
4.3 AdMKH ve Kİ-MKH' lerin aynı absorbans değerine karşılık gelen hücre sayılarının karşılaştırılması	47
4.4 MKH' lerdeki yüzey belirteçlerinin % pozitif ekspresyonunun akış sitometri sonuçları.....	48
4.5 Nanofiber çapları.....	63

TABLULAR DİZİNİ (devam)

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
4.6 Statik temas açısı ölçüm değerleri	64

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
3B	3 boyutlu
3-DP	Üç boyutlu baskı
A	Düzgün dizili
AdMKH	Adipoz doku türevli mezenkimal kök hücre
ATR	Azaltılmış toplam yansıma
BSA	Sığır serum albümini
CO ₂	Karbondioksit
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DBP	Demineralize kemik partikülü
DCM	Diklorometan
DMEM	Dulbecco'nun modifiye minimum esensiyel besi ortamı
DMF	Dimetilformamid
DMSO	Dimetilsülfoksit
ECM	Ekstrasellüler matriks
ESB	İlk Konsensus Toplantısı
FBS	Fötal sığır serumu
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
FDM	Eriterek birikim modellemesi
GAG	Glikozaminoglikanlar
HA	Hidroksiapatit
HEPES	4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansulfonik asit
HLA	İnsan lökosit antiijeni
HMDS	Heksametildisilazan
Kİ-MKH	Sıçan kemik iliği türevli mezenkimal kök hücre
LG	Düşük glukoz

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
MKH	Mezenkimal kök hücre
MTT	3-(4,5-dimetilthiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum bromid, sarı tetrazolyum tuzu
O ₂	Oksijen
PBS	Fosfat tampon solüsyonu
PCL	Polikaprolakton
PCL-A	Düzgün dizili polikaprolakton
PCL-M	Polikaprolakton membran
PCL-R	Rastgele dizili polikaprolakton
PDO	Polidioksanon
PEO	Polietilenoksit
PFA	Paraformaldehit
PGA	Poli(glikolik asit)
pH	Hidrojenin gücü
PHEMA	Polihidroksietilmetakrilat
PLA	Poli(laktik asit)
PLGA	Poli(laktik-ko-glikolik asit)
PNIPAAm	Poli(N-izopropilakrilamid)
PVA	Polivinilalkol
R	Rastgele dizili
RP	Hızlı prototipleme
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
SFF	Katı serbest form
SLA	Stereolitografi
SLS	Lazerle kalıplama

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
TCA	Trikarboksilik asit
TCP	Trikalsiyum fosfat
TCPS	Polistren
THF	Tetrahidrofuran
UV	Ultraviyole
α -MEM	Alfa modifiye minimum esensiyel besi ortamı

1. GİRİŞ

Birçok dejeneratif hastalığın tedavi yönteminin kısıtlı olması, alternatif tedavilerin gereksinimini ortaya koymuştur. Bu alternatif tedavi yöntemlerinden biri olan hücrel tedavi ise dokuların tamiri ve rejenerasyonu için yeni yaklaşımlar sağlayan doku mühendisliği konularından biridir (Mobarakeh et al., 2010). Doku mühendisliği hasar görmüş, çalışmayan veya doğuştan anomalili organların veya dokuların fonksiyonlarının desteklenmesine, geliştirilmesine, yenilenmesine ve onarımına yönelik biyolojik yapıların oluşturulmasını sağlar (Marga et al., 2007; Sachlos and Czernuszka, 2003). Doku mühendisliği ile biyolojik yapıların oluşturulmasında farklı yaklaşımlar söz konusudur. Bir destek materyali ile birlikte hücrelerin kullanıldığı tedavi yöntemi günümüzde yaygın olarak çalışılan konulardan biridir (Saxena, 2005).

Bu zamana kadar yapılan birçok çalışma, optimize kültür koşulları altında, kök hücrelerin bazı spesifik hücrelere farklılaşması üzerine odaklanmıştır (Cho et al., 2010). Ancak, MKH'lerin spesifik hücrelere farklılaşabilmesi için öncelikle farklılaşma için kullanılan yüzeylere tutunması gerekmektedir. Bu nedenle doku mühendisliği için uygun iskelenin dizaynı ve üretimi doku rejenerasyonun başarısı için kritik öneme sahiptir. Çünkü iskele yüzeyi, hücreler ve iskele arasındaki etkileşim açısından oldukça önemlidir (Mobarakeh et al., 2010).

Elektroegirme, sentetik polimerleri ve doğal proteinleri içeren çeşitli polimerlerden nanofibröz iskele üretim mekanizmasıdır. Elektroegirme ile hazırlanan iskelelerin topolojisi doğal ekstrasellüler matrikse (ECM) yakından benzerdir. Elektroegirme yöntemi ile çeşitli çaplarda (1000 nm ve daha küçük) üretilebilen fiberler geniş yüzey alanı ve yüksek porozite sağlamaktadır (Li et al., 2005). Böylelikle, elektroegirme yöntemi hücre tutunmasını kolaylaştıran, hücre büyümesini destekleyen ve hücre farklılaşmasını düzenleyen biyomimetik matrikslerin üretimine olanak sağlamaktadır. Günümüzde, elektroegirme yöntemi ile yapılan çalışmalarda sentetik biyobozunur polimerler olarak poli(ϵ -kaprolakton) (PCL), poli (laktik asit) (PLA), poli (glikolik asit) (PGA), kopolimer poli (laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) ve polietilen oksit (PEO) kullanılmaktadır (Chung and Park, 2007). Sentetik biyobozunur polimerler

mekanik özelliklerinden ve uygun bozunma hızlarından dolayı doku mühendisliğinde yaygın olarak tercih edilmektedir. Ancak, bu polimerlerin düşük hidrofilitateye sahip olmalarından ve yüzeyinde hücreler tarafından tanınmayı sağlayabilecek bölgeleri buldurulmamasından dolayı söz konusu polimerlere hücrelerin afinitesi düşüktür (Mobarakeh et al., 2010). Sentetik polimerlerin yanı sıra, kollajen, jelatin, laminin ve kitosan gibi doğal polimerler de elektroğirme ile hazırlanan iskelelerde kullanılmaktadır. Ancak bu doğal polimerler yüksek hücre afinitesi göstermesine rağmen düşük mekanik özelliklere sahiptir. Sentetik ve doğal polimerlerin bu dezavantajlarını ortadan kaldırmak için doğal polimerler ile sentetik polimerlerin birleşimi olan hibrit biyopolimerler geliştirilmiştir (Dhandayuthapani et al., 2011). Bu yeni ve çok yönlü hibrit biyomateryaller, sentetik polimerlere ait geniş mekanik karakteristikler, biyobozunurluk, büyük ölçekte tekrar üretilebilme gibi özelliklere sahip olmalarının yanı sıra, doğal polimerlere benzer şekilde biyolojik aktivite göstermektedirler (Cunha et al., 2010).

Polikaprolakton, kemik, deri, sinir, retina gibi hem yumuşak hem de sert dokuların rejenerasyonunda kullanılan, biyouyumluluk, mekanik esneklik, düşük antijenisite, kolay işlenebilme, kararlılık, düşük maliyet (Mobarakeh et al., 2010; Hong and Kim, 2011) ve düşük bozunma hızı (Chen et al., 2007) gibi pek çok avantaja sahip sentetik bir polimerdir.

Bu tez çalışmasında, elektroğirme yöntemi ile hazırlanan PCL yüzeylerdeki fiber diziliminin MKH'lerin morfolojisi, tutunması ve çoğalması üzerine etkilerinin tespit edilmesi amaçlanmaktadır. Böylelikle, araştırmanın sonunda sinir doku mühendisliğinde doku rejenerasyonu amacı ile kullanılacak uygun fiber dizilimine sahip polimer seçiminin yapılabilmesi hedeflenmektedir. Ayrıca, farklı fiber dizilimlerine sahip PCL yüzeyler üzerinde kemik iliğinden ve yağ dokusundan elde edilen MKH'lerin hücresel fonksiyonlarının karşılaştırılması da çalışmanın diğer bir hedefini oluşturmaktadır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1 Doku Mühendisliği

Yaralanmalar, dejeneratif hastalıklar veya doğuştan gelen anomaliler sonucunda oluşan hasarlı doku ve organlar, günümüzde tüm dünyada büyük bir sağlık problemi haline gelmektedir (Chapekar, 2000). Bireylerin yaşam kalitesini düşüren, hatta bazen ölüm ile sonuçlanabilen bu vakalar farmakolojik tedaviler, yapay organlar veya transplantasyon çalışmaları gibi farklı tedavi seçenekleri ile iyileştirilebilmektedir.

Hasta bir kişinin tedavi edilmesinde yaygın olarak başvuru yollarından biri, sağlık alanındaki araştırma-geliştirme bütçesinin de çoğunu oluşturan, ilaç tedavileridir. Bu tür farmakolojik tedavi yöntemleri ancak geri dönüşümü mümkün olan hasarlı dokuların iyileştirilmesini sağlayabilmektedir. Fakat, yapısal bütünlüğü bozulmuş veya fonksiyonunu kaybetmiş dokuların ilaca dayalı tedavileri söz konusu değildir.

İkinci bir seçenek olan transplantasyon çalışmaları, Kızılderililerin başarılı burun transplantasyonu yaptıkları milattan önceki yıllara dayanmaktadır. Günümüzde ise, beyin haricindeki bütün organlar bir insandan diğer bir insana başarılı bir şekilde transplante edilebilmektedir. Fakat transplantasyon çalışmalarında yaklaşık olarak yıllık organ replasman ihtiyacı genel popülasyonun %10' nu oluşturmaktadır. İhtiyaç bu kadar fazla olmasına rağmen, bu ihtiyacı karşılayacak donör sayısı ve bu donörlerden sağlanabilecek organ sayısı ise oldukça sınırlıdır. Ayrıca transplantasyon çalışmalarında transplante edilen organın bağışıklık sistemi tarafından reddedilmesi veya bağışıklık sistemini baskılayıcı bir takım ilaçların yan etki oluşturması gibi problemler de bu yöntemin uygulanabilirliğini kısıtlamaktadır.

Hasarlı organ veya doku tamirindeki üçüncü seçenek ise yapay organların kullanılmasıdır. Yapay organların tedavi amaçlı kullanımını sınırlayan iki, ana sebep söz konusudur. Bu sebeplerden ilki, yerleştirilen yapay organın çeşitli stres faktörleri nedeniyle vücut yanıtını değiştirmesidir. Değişen vücut yanıtları

bireylerde ölümcül sonuçlara yol açabilmektedir. İkinci sebep ise, organların aslında basit gibi görünen görevlerinin sanıldığı kadar basit olmamasıdır (Sarvazyan, 2012).

Hasarlı doku ve organların tedavi edilmesinde kullanılan ve yukarıda sözü edilen yöntemlerin kısıtlı olması alternatif tedavilerin gereksinimini ortaya koymuştur. Bu alternatif tedavi yöntemlerinden biri olan doku mühendisliği ise, dokuların tamirini ve rejenerasyonunu sağlayan yeni bir yaklaşımdır (Mobarakeh et al., 2010). Doku mühendisliği, normal ve patolojik dokuların yapı-fonksiyon ilişkilerinin anlaşılmasını ve doku fonksiyonlarının yenilenmesinde, tamir edilmesinde ve iyileştirilmesinde kullanılan biyolojik yapıların geliştirilmesini sağlayan mühendislik ve temel bilimlerin prensiplerinin uygulamalarını içeren çok disiplinli bir alandır. Doku mühendisliğinin amacı, organ transplantasyonuna ve biyomateryal implantasyonuna dayalı geleneksel tedavi yöntemlerinin sınırlamalarını aşmaktır. Doku mühendisliği, ayrıca, hasta ile birlikte büyüyen, immünolojik olarak tolere edilebilen yapay organ ve dokuları üretme potansiyeline sahiptir. Bu durum ek tedavilere gerek kalmadan, hasarlı organ veya doku için kalıcı bir çözüm sağlamaktadır. Böylece uzun vadede ekonomik bir tedavi sağlanması söz konusu olur (Sachlos and Czernuszka, 2003).

2.1.1 Doku mühendisliği tarihi

Fra Angelico tarafından resmedilen, Saints Damien ve Cosmos kardeşlerin yaralı bir askere homogreft bacak naklini betimleyen “Justinian’ ın iyileşmesi” başlıklı ünlü resim doku mühendisliği konusundaki ilk tarihsel referans olarak kabul edilir (Şekil 2.1) (Vacanti, 2006). Milattan sonra 1438’ li yıllarda resmedilmiş bu tablodan sonra, bu alandaki ilk çalışma 1933 yılında yayımlanmıştır. Yapılan çalışma bağışıklık sisteminin saldırılarına karşı korumak için polimer bir membrana sarılarak bir domuza verilen tümör hücrelerini içermektedir (Polak and Bishop, 2006). Ancak modern anlamda doku mühendisliğinin 1980’ lerde deri replasmanlarının gelişimi ve klinik kullanımı ile başladığı söylenebilir (Polak and Bishop, 2006; Vacanti, 2010). 1990’ larda doku mühendisliği alanında hızla ilerlemeler kaydedilmiş ve vücutta birçok doku için biyolojik yedekleri geliştirilmiştir. Canlı veya cansız hücreler ile oluşturulan

biyoyapay deriler (Apligraf®) ve otolog kültüre kondrositler (Carticel®) gibi doku mühendisliği ürünleri piyasaya sunulmuştur (Chapekar, 2000). Doku mühendisliği teriminin günümüzde uygulandığı şekliyle ilk kullanımına ait kayıtlar da yine aynı yıllarda bulunmaktadır (Vacanti, 2006). Endüstriyel gelişme tarafında düşük maliyetli ve büyük ölçekli proseslerin oluşturulması ve ürün canlılığının korunması gibi problemler söz konusu olmasına rağmen doku mühendisliği büyümeye ve gelişmeye devam etmektedir.



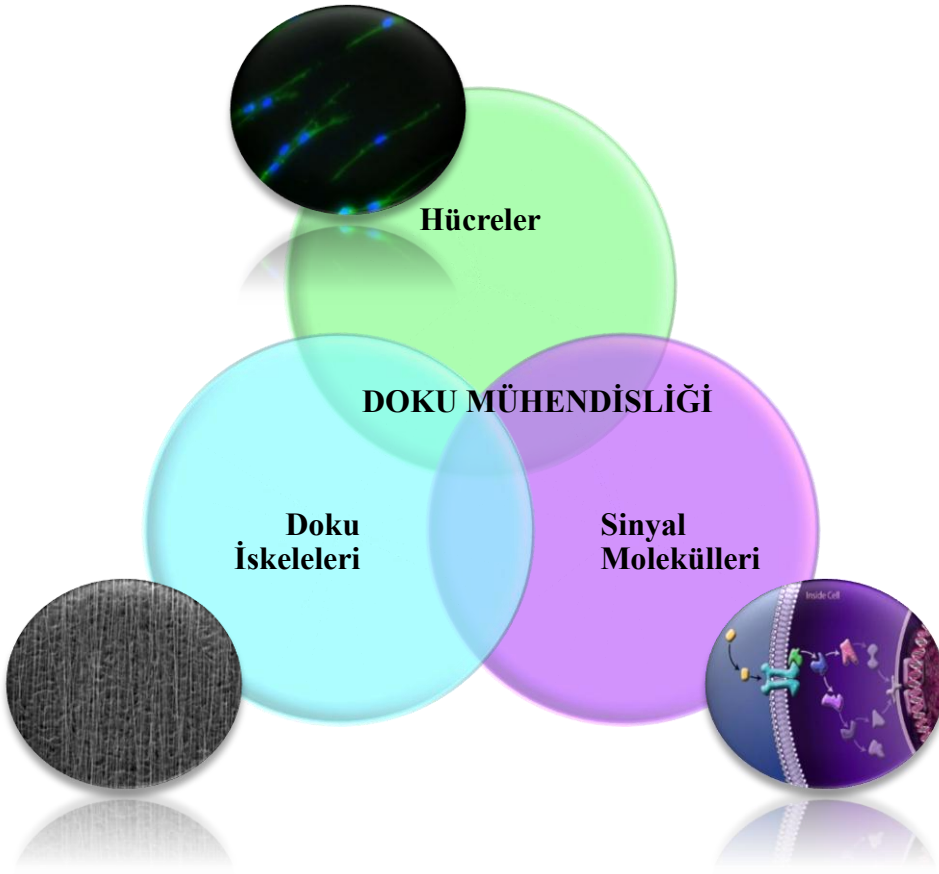
şekil 2. 1 Fra Angelico tarafından resmedilen “Justinian’ ın iyileşmesi”, M.S. 1438 (Museum Syndicate, 2012).

2.1.2 Doku mühendisliği yaklaşımları

Temelde doku mühendisliği doğal dokunun fonksiyonunu taklit eder. Bu nedenle fonksiyonel biyolojik bir yapının geliştirilmesi için spesifik dokunun doğal koşullarının tamamen anlaşılması gereklidir. Biyolojik dokular temel olarak hücreleri, sinyal sistemlerini ve ekstraselüler matriksi (ECM) içerir. Hücreler, dokunun temelini oluştururlar. Ancak, sinyal sistemlerinin ve ECM’ nin yokluğunda görev yapamazlar. Sinyal sistemi, farklılaşma aktive olduğunda ve doku oluşumu ve farklılaşması için sinyaller oluştuğunda transkripsiyonel ürünleri salgılayan genleri içerir. ECM ise, ekstraselüler boşlukta yer alan ađ örgüsü gibi bir yapıdır. Bu yapı hücre tutunmasını ve çoğalmasını destekler (Papenburg, 2009).

Doku mühendisliği yaklaşımlarında, her bir hedef dokunun oluşturulması için farklı teknik ve teknolojiler uygulanmasına rağmen, tüm yaklaşımlar temel

doku mühendisliği prensiplerine dayanmaktadır (Mikos, 2003). Bu doku mühendisliği yaklaşımları da tıpkı doğal dokularda olduğu gibi, hücreler, doku iskeleleri (yapay ECM) ve uyarıcı sinyallerden oluşan üç temel bileşen üzerine kurulmuştur (Şekil 2.2). Bu üç temel bileşenin uygun şekilde tasarlanması ile canlı doku veya organlar üç boyutlu olarak düzenlenebilirler (Sipe, 2002; Polak and Bishop, 2006; Chan and Leong, 2008; Rosa et al., 2012).



Şekil 2. 2 Doku mühendisliği üçlüsü (Khang et al., 2007).

Doku mühendisliği çalışmalarında hücreler, doku iskeleleri ve sinyal molekülleri tek tek kullanılabilirdiği gibi, bu bileşenlerin birlikte kullanıldığı yaklaşımlar da söz konusu olabilir (Papenburg, 2009). Aslında temelde üç doku mühendisliği yaklaşımı söz konusudur (Bryant, 2012):

- i) Kaybolan hücrelerin yerini doldurmak için hasarlı dokunun bulunduğu bölgeye direkt olarak sağlıklı hücrelerin verilmesi,
- ii) Hasarlı doku çevresinde var olan hücrelerin normal fonksiyon göstermelerini sağlamak için uyarıcı moleküllerin verilmesi,
- iii) Hücrelerin büyüyerek üç boyutlu (3B) doku yapılarını oluşturmalarını sağlayacak 3B matriks veya doku iskelesi yerleştirilmesi.

i) Hücrelerle Tedavi: Bu yaklaşımın amacı, doku hasarı sonucu oluşan işlev bozukluğunun, doğrudan o işlevden sorumlu hücrelerin kullanımıyla tedavi edilmesidir. Hücrelerin, canlıdan izolasyonu, *in vitro* besi ortamında üretilerek çoğaltılması ve hasarlı dokuya verilmesi bu yaklaşımının temelini oluşturmaktadır. Ancak, hücrelerin bağışıklık sistemi tarafından reddedilmesi veya nakil sonrasında hücresel işlevinin istenilen şekilde devam edememesi gibi sorunlar mevcuttur (Gürhan vd, 2012).

ii) Uyarıcı Moleküller ile Tedavi: Uyarıcı moleküller olarak büyüme faktörlerinin tek başına kullanıldığı bu yaklaşım, sadece kendi kendini iyileştirme yeteneğine sahip olan doku ile çevrelenmiş, küçük doku hasarlarının tamirinde başarılı olabilmektedir. Bu nedenle büyük defektlerin tamiri için tek başına sinyal moleküllerinin kullanımı uygun bir yaklaşım değildir (Mikos, 2003).

iii) Doku iskeleleri ile Tedavi: Bu doku mühendisliği yaklaşımı, doku rejenerasyonunda hasarlı doku çevresinde var olan hücrelerin veya dokunun büyümesi için bir model görevi gören materyallerin kullanımına dayanmaktadır (Vacanti and Vacanti, 2007). Bu yaklaşımda, hasarlı dokunun bulunduğu bölgeye uygun şekilde üretilen doku iskelesi o bölgeye yerleştirilerek, bölgenin fibröz doku ile doldurulmasını engeller. Aynı zamanda çevrede bulunan o dokuya ait hücrelere de rehberlik ederek dokunun onarılmasına yardımcı olur.

Yukarıda bildirilen üç anahtar faktörün tek başına kullanımının yeterli olmadığı durumlarda, söz konusu faktörlerin hasarlı bölgede tutulmasını sağlayan kombine yaklaşımlar gündeme gelecektir. Bu kombine yaklaşımlardan ilki, hasar görmüş dokuya biyoaktif molekülleri kontrollü bir şekilde sağlamak için biyolojik olarak parçalanabilir destek materyallerin kullanımınıdır. Böylece destek materyal,

doku etrafındaki hücrelerin tutunup, çoğalabileceği geçici, üç boyutlu bir iskele görevi görürken aynı zamanda hasarlı bölgede biyoaktif moleküllerin salımını da yapar (Mikos, 2003).

Alternatif ve belki de daha etkili bir kombinasyon ise hücrelerin biyolojik olarak parçalanabilir, gözenekli doku iskeleleri ile birlikte kullanıldığı doku mühendisliği yaklaşımıdır. Bu yaklaşımda küçük bir doku parçasından izole edilen hücreler laboratuvar ortamında çoğaltılır ve yüzeyine tutunup yeni doku eşdeğerini oluşturabilecekleri üç boyutlu biyobozunur yapı iskeleleri üzerine ekilerek kültüre edildikten sonra hücre-iskele bileşimi hücrelerin çoğalarak ve yeniden organize olarak yeni doku veya organı oluşturacağı bölgeye yerleştirilir. Bundan sonraki süreç zamanla biyobozunur iskelenin kademeli olarak yok olması ve yerini tamamen hücrelerin oluşturduğu biyolojik dokuya bırakmasını içerir. Biyoaktif moleküller de iskele üzerine ekilen hücrelerin uygun şekilde yönlendirilmelerini sağlamak amacıyla iskeleye dahil edilebilir (Mikos, 2003).

2.1.3 Doku iskeleleri

Doku iskeleleri, hücrelerin tutunup, çoğalıp, doku meydana getirebilecekleri üç boyutlu bir çevre sağlamak amacıyla kullanılan geçici yapılardır (Rosa et al., 2012).

Bilindiği gibi birçok memeli hücre tipi yüzeye bağımlıdır. Yani, hücrelerin tutunmaları için bir ortam sağlanamazsa hücreler yaşayamaz. Bu nedenle, doku iskeleleri, doku mühendisliğinde kritik bir öneme sahiptir (Khang et al., 2007). Doku iskelelerinin kullanımı üç boyutlu çevre ve dokunun kendini onarmasını sağlamak için hücrelerin iletişim halinde olabileceği belirli bir yakınlık ve doku mikroçevresi ile ilişkili pek çok bileşenin oluşumunu sağlar (Levenberg and Langer, 2004). Aynı zamanda, doku iskeleleri hücrelerin tutunması, çoğalması, farklılaşması ve migrasyonu için uygun bir yüzey oluşturmaktadır (Khang et al., 2007)

Doku iskelelerindeki esas zorluk hücre adhezyonunu arttıran, hücre büyümesini, çoğalmasını ve farklılaşmasını destekleyen, ECM oluşumunu sağlayan ve uygun bozunma hızına sahip iskeleler tasarlayıp, üretebilmektir (Leong et al., 2008). İyi bir doku iskelesi tasarlayabilmek için pek çok kriter söz konusudur. Bu kriterler aşağıdaki şekilde sıralanabilir (Hutmacher, 2001; Levenberg and Langer, 2004; Khang et al., 2007; Stamatialis et al., 2008):

- Hücrelerin tutunmasını, çoğalmasını ve farklılaşmasını destekler nitelikte olmalıdır,
- Doku oluşumuna yardımcı olmalıdır,
- Hücresel fonksiyonları düzenlemelidir,
- Geniş yüzey alanı/hacim oranına sahip olmalıdır,
- Yüksek poroziteye sahip olmalıdır.
- Hücreler için gerekli olan oksijen (O₂) ve nutrientlerin dağılımını sağlamak için iyi ve yeterli transport özelliklerine sahip olmalıdır,
- Biyouyumlu olmalıdır,
- Biyobozunur olmalıdır,
- Üretimi kolay olmalıdır,
- Şekil verilebilir olmalıdır,
- İşlenebilir olmalıdır,
- Bulunduğu dokuya uygun mekanik özellik göstermelidir,
- Steril edilebilir olmalıdır,
- Stabil boyutlara sahip olmalıdır.

Çok fazla yabancı cisim reaksiyonu oluşturmadan uygun bir biçimde bozunabilen iskelelerin üretimi için uygun biyomalzemelerin tanımlanması, iyi bir doku iskelesi üretiminde ilk ve en önemli basamaktır (Leong et al., 2008).

2.1.3.1 Doku iskelesi malzemeleri

1976 yılında biyomalzemeler için Avrupa Birliği' nin (ESB) ilk konsensus toplantısında, biyomalzeme, “biyolojik sistemler ile etkileşimi amaçlanan medikal aletlerde kullanılan cansız malzeme” olarak tanımlanmıştır. Günümüzde ise, ESB'

nin yaptığı tanıma göre biyomalzeme, “vücudun herhangi bir dokusunu, organını veya fonksiyonunu geliştirmek, tedavi etmek veya değiştirmek için biyolojik sistemler ile etkileşim halinde bulunan malzemedir”. Tanımdaki bu küçük değişiklik biyomalzemelerin nasıl geliştiğinin bir göstergesidir. Biyomalzemeler, tamamen vücut ile etkileşen malzemeler olarak görülürken, zamanla doku rejenerasyonu amacıyla biyolojik prosesleri etkileyen malzemeler olarak değişmiştir (O'Brien, 2011).

Doku mühendisliğinde, iskelelerin üretimi için seramikler, sentetik ve doğal polimerler olmak üzere esas olarak üç grup biyomalzeme kullanılmaktadır. Bu üç ana grubun dışında, bu malzemelerin kompozitlerinden yapılan doku iskeleleri de mevcuttur (Buckley and O'Kelly, 2004; O'Brien, 2011; Rosa et al., 2012).

Doğal polimerler

Doku iskelelerinin üretiminde kullanılan doğal biyomalzemeler kollajen, fibrinojen, hiyalüronik asit, glikozaminoglikanlar (GAG) gibi ECM' de bulunan komponentleri veya selüloz, kitosan, ipek fibroin gibi bitkilerden, böceklerden ve hayvanlardan elde edilen bileşenleri içerir (Tablo 2.1) (Dawson et al., 2008). Doğal polimerler, biyolojik çevrede bulunan makromoleküler maddelere benzerlikleri nedeniyle biyoaktif ve biyouyumlu olma ve doğal dokuya benzer mekanik özelliklere sahip olma gibi pek çok avantaja sahiptirler. Ayrıca bu polimerler, mükemmel hücre tutunması ve büyümesini sağlarlar (Dawson et al., 2008; O'Brien, 2011). Birçok sentetik polimer tarafından sıklıkla tetiklenen toksisite, kronik inflamatuvar reaksiyonlar ve hücreler tarafından tanınma eksikliği gibi problemler doğal polimerler için geçerli değildir (Yannas, 2004). Doğal polimerler, tüm bu avantajlarına rağmen, fiziko-kimyasal özelliklerinin kontrolünün sınırlı olması, bozunma hızlarının ayarlanmasındaki zorluklar, sterilizasyondaki güçlükler, saflaştırma sorunları, zayıf mekanik özellikler gibi dezavantajlara da sahiptirler (Dawson et al., 2008; O'Brien, 2011). Bunlara ek olarak, doğal polimerler ile homojen ve yeniden üretilebilir iskelelerin oluşturulmaları zordur. (O'Brien, 2011).

Tablo 2. 1 Doğal polimerler (Yannas, 2004; Khang et al., 2007).

Doğal Polimerler
Aljinat
Fibrin
Fibrinojen
Glikozaminoglikanlar
Hyaluronik asit
İpek
Jelatin
Keratin
Kitin
Kitosan
Kollajen
Selüloz

Sentetik polimerler

Pahalı olması, üretimleri arasında farklılıklar bulunması, virüsler veya başka patojenler ile çapraz kontaminasyon riski taşımaları, zayıf mekanik özelliklere sahip olmaları gibi sorunlar sebebiyle doku iskelesi olarak doğal polimerlerin kullanımı yetersiz kalmaktadır (Buckley and O'Kelly, 2004; Khang et al., 2007). Bunların aksine sentetik polimerler, kolaylıkla kontrol edilebilir fiziko-kimyasal özellikleri ve kaliteleri, pek çok farklı teknik ile büyük miktarlarda üretilebilmeleri, ayarlanabilir bozunma hızları ile doğal polimerlerin önüne geçmektedirler (Kim and Mooney, 1998; Khang et al., 2007). Ayrıca insan vücudunda istenen herhangi bir yere uygun mekanik ve fiziksel özelliklere (O'Brien, 2011) sahip bir doku iskelesi oluşturmak için, sentetik prosesler boyunca moleküler yapıları ve moleküler ağırlıkları kolaylıkla ayarlanmaktadır (Khang et al., 2007). Ancak bu polimerler düşük hidrofilitateye sahip olmalarından ve yüzeylerinde hücreler tarafından tanınmayı sağlayabilecek bölgeleri buldurmamalarından dolayı söz konusu polimerlere hücrelerin afinitesi düşüktür (Mobarakeh ve ark., 2010).

Sentetik polimerler, cerrahi suture olarak yirmi yıldan daha uzun bir süredir yaygın olarak kullanılmaktadır ve bu polimerlerden bazıları (poli(glikolik asit)

(PGA), poli(laktik asit) (PLA), polikaprolakton (PCL) ve bunların kopolimerleri Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından insan kullanımı için onaylanmıştır (Buckley and O'Kelly, 2004). Bu malzemelerin *in vivo* biyouyumluluğu ve güvenliği belirlenmiştir (Kim and Mooney, 1998; Jiang et al, 2010). Ancak poli(α -hidroksi asit) ailesinden sentetik polimerler sıvı ortama maruz kaldıklarında hacimsel erozyonla bozunmaya başladığında asidik yan ürünler ortaya çıkarır (Kim and Mooney, 1998; Buckley and O'Kelly, 2004). Bu bozunma ürünleri doğal olarak insan vücudunda bulunmasına ve doğal metabolik yollar ile ortadan kaldırılmasına rağmen, mikro çevrenin lokal pH' sını, doğal fizyolojik pH' nın altına düşürebilir. Bu asidik çevre de hücre nekrozisine sebep olabilir (Buckley and O'Kelly, 2004).

Sentetik polimerler genel olarak biyobozunur (Tablo 2.2) ve biyobozunur olmayanlar (Tablo 2.3) olarak iki sınıfa ayrılmaktadır. Bu iki tip sentetik polimerin içinden biyobozunur sentetik polimerler, kronik yabancı cisim reaksiyonlarını en aza indirmeleri ve tamamen doğal bir doku oluşumu sağlamaları nedeniyle doku mühendisliği uygulamalarında tercih edilir (Khang et al., 2007).

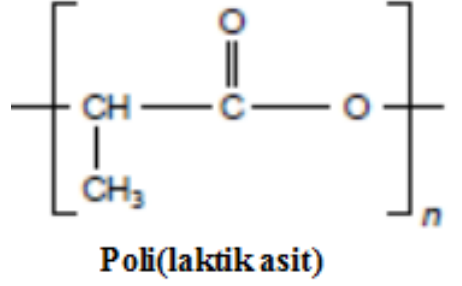
Tablo 2. 2 Biyobozunur sentetik polimerler (Khang et al., 2007).

Biyobozunur Sentetik Polimerler
Poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA)
Poli(glikolik asit) (PGA)
Poli(laktik asit) (PLA)
Poli(propilen fumarat)
Polianhidrid
Polidioksanon (PDO)
Polifosfozen
Polikaprolakton (PCL)
Polisiyanoakrilat
Poliüretanlar

Tablo 2. 3 Biyobozunur olmayan sentetik polimerler (Khang et al., 2007).

Biyobozunur Olmayan Sentetik Polimerler
Polivinilalkol (PVA)
Polihidroksietilmetakrilat (HEMA)
Poli(N-izopropilakrilamid) (PNIPAAm)

Poli (laktik asit): PLA (Şekil 2.3), yarı kristal D (-) (PDLA), L (+) (PLLA) ve amorf rasemik D,L (PDLLA) olarak isimlendirilen farklı izomerik formlarda bulunur (Papenburg, 2009).

**Şekil 2. 3** PLLA'nın kimyasal yapısı (Kim and Mooney, 1998).

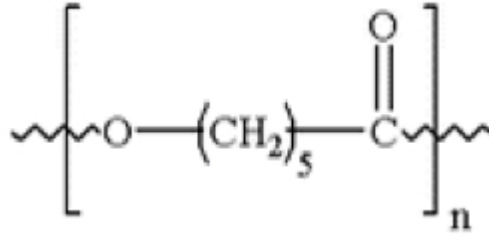
PLA, hacimsel hidroliz ile bozunur (Tablo 2.4) ve laktik asit üretimine yol açar. Kullanılan polimer PLLA olduğunda, bozunma ürünü olarak doğal koşullarda insan vücudunda var olan bir madde olan L (+) laktik asit ortaya çıkar. Bu nedenle genellikle PLLA, PDLA'ya tercih edilir (Papenburg, 2009).

PLLA, FDA onaylı ve çok sayıda klinik uygulamada kullanılan bir polimer olmasına rağmen, bir dizi literatür çalışması PLLA'ya ait inflamatuvar yanıt rapor etmiştir. Bozunma süresince oluşan laktik asit polimerin bulunduğu çevredeki pH'ı düşürebilir. Bu lokal asidite, hücresel fonksiyonları etkiler ve inflamatuvar yanıtı uyarır. Nispeten küçük malzeme hacimleri söz konusu olduğunda, olumsuz biyolojik yanıt şekillenmemektedir. (Papenburg, 2009).

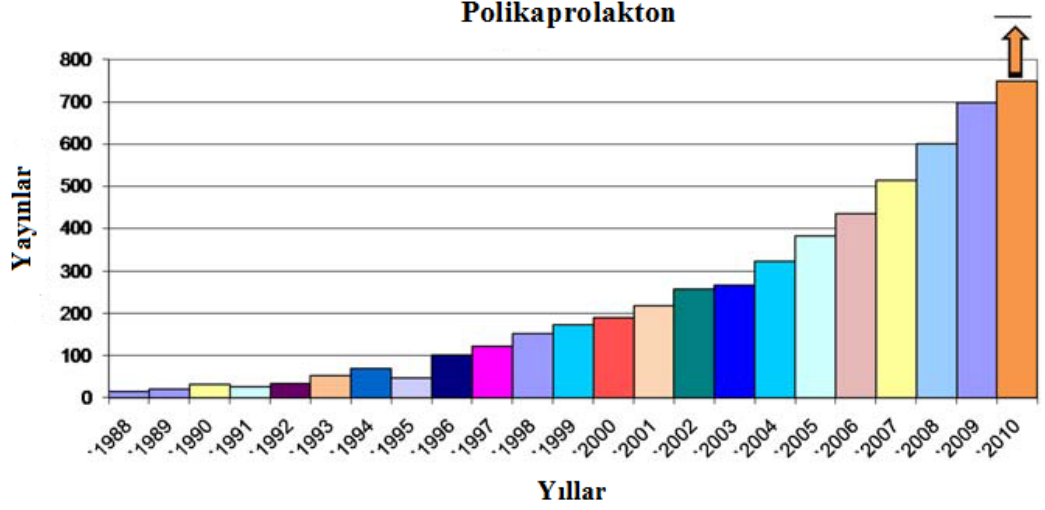
Tablo 2. 4 PLLA ve diğer biyomalzemelerin bozunma hızları ve mekanizmaları (Leong et al., 2008).

Biyomalzemeler	Bozunma Hızı	Bozunma Mekanizması
Kolajen	2-24 hafta (çapraz bağ derecesine göre değişim gösterir)	Enzimatik bozunma
Kitosan	Ağırlıkça yarılanma ömrü 10- 56 gün	Enzimatik bozunma
PLLA	2-12 ay	Hidrolitik mekanizma
PGA	4-6 ay	Hidrolitik mekanizma
PCL	1-2 yıl	Hidrolitik mekanizma
Hidroksiapatit	Zayıf bozunma	Çözünme
Trikalsiyum fosfat	8-24 hafta	Çözünme

Polikaprolakton (PCL): PCL cerrahi implantlarda, doku mühendisliği iskelelerinde ve ilaç taşıma sistemlerinde kullanılan yarı-kristalin, doğrusal alifatik ve sentetik bir polimerdir (Şekil 2.4) (Cottam et al., 2009; Akdemir, 2009). 1930 yılında Carothers grubu tarafından sentezlenmiştir. 1930 yılından sonra, doku mühendisliği adı verilen yeni bir alanın doğması ile birlikte PCL' a olan ilgi yeniden canlanmıştır (Şekil 2.5) (Woodruff and Hutmacher, 2010).



Şekil 2. 4 Polikaprolakton'un kimyasal yapısı (Beşkardeş, 2008).



Şekil 2. 5 Biyomateryal veya doku mühendisliği alanlarında PCL kullanılarak yapılan yayın sayısının yıllara göre değişimi (Woodruff and Hutmacher, 2010)

Bu polimer doku mühendisliğinde genellikle kemik, deri, sinir, retina gibi pek çok dokunun yeniden yapılandırılmasında kullanılmaktadır. Biyoyumlu, biyobozunur, düşük maliyetli ve kolay işlenebilir olması bu polimerin sahip olduğu başlıca avantajlardan bazılarıdır. Fakat sentetik bir polimer olması nedeniyle PCL, hidrofobik yüzeye sahiptir ve fonksiyonel grupları bulunmaz. Bu nedenle de hücre tutunması için iyi bir substrat değildir (Ghasemi-Mobarakeh et al., 2010). PCL, PLA ve PLGA ile kıyaslandığında *in vivo*da uzun degradasyon süresine sahiptir (Tay et al., 2007; Cottam et al., 2009; Pok et al., 2010). Buna rağmen, hidroliz ile bozunabilir ve bozunma ürünleri vücut tarafından absorbe edilerek trikarboksilik asit (TCA) döngüsünde metabolize edilebilir (Tay et al., 2007; Akdemir, 2009). FDA tarafından onaylı bir polimer olan (Woodruff and Hutmacher, 2010) PCL düşük camsı geçiş sıcaklığına (~60 °C) ve erime sıcaklığına (59 °C - 64 °C) sahiptir (Pok et al., 2010; Woodruff and Hutmacher, 2010). Düşük camsı geçiş sıcaklığından dolayı, vücut sıcaklığında yüksek moleküler hareket gösterir (Tay et al., 2007). PCL, diğer polimerler ile uyumlu bir şekilde karışarak kopolimer oluşturabilme yeteneğine sahiptir. Bu özelliği sayesinde, doku mühendisliği çalışmalarında hem tek başına hem de diğer polimerlerle birlikte kullanılabilir (Guarino et al., 2008). Ayrıca PCL, tetrahidrofuran (THF), diklorometan (DCM), dimetilformamid (DMF), kloroform, benzen gibi birçok çözücüde çözünebilmektedir (Sinha et al., 2004). Polimer-

çözücü ilişkisi, istenilen özelliklerde doku iskelesi üretebilmek için oldukça önemlidir. Çünkü yüzey morfolojisi, yüzey enerjisi ve temas açısı gibi hücre-polimer etkileşimine katkıda bulunan birçok özelliğin, kullanılan çözücüye göre değiştiği bilinmektedir (Tang et al., 2004).

Biyoseramikler

İmplant olarak kullanılabilen biyoseramikler amorf veya kristal katı madde oluşturmak için inorganik ham malzemelerin sinterlenmesi veya eritilmesi ile üretilen biyomalzemelerdir. Poröz son ürün doku iskelesi olarak kullanılmaktadır. Seramiklerin bileşenleri; kalsiyum, silika, fosfor, magnezyum, potasyum ve sodyumdur (Khang et al, 2007).

Doku mühendisliğinde kullanılan biyoseramikler nispeten inert, biyoaktif veya yüzey aktif (yarı inert) ve biyobozunur veya inert olmayan olarak sınıflandırılmaktadır. Alümin (alüminyum oksit (Al_2O_3), zirkonyum, silikon nitrit ve karbonlar inert biyoseramikler; yoğun hidroksiapatitler ($9CaO.Ca(OH)_2.3P_2O_5$) gibi cam seramikler yarı inert (biyoaktif) ve kalsiyum fosfatlar, alüminyum kalsiyum fosfatlar, trikalsiyum fosfatlar (TCP) ($3CaO.P_2O_5$) inert olmayan seramiklerdir. Sentetik apatit, kalsiyum fosfat mineralleri, biyoaktif camlar ve demineralize kemik partikülleri (DBP) gibi biyoseramikler sert doku mühendisliğinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Khang et al, 2007).

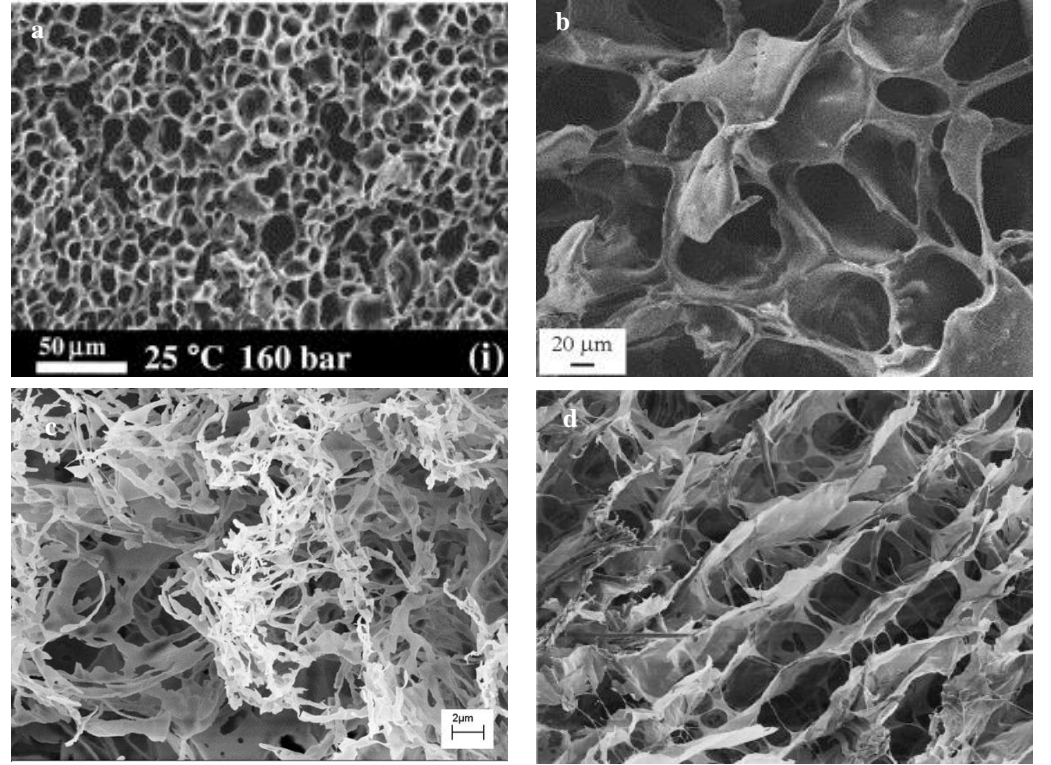
Hidroksiapatit (HA), tri-kalsiyum fosfat (TCP) gibi seramik iskeleler yüksek mekanik katılık (Young modülü), çok düşük elastisite ve sert ancak kırılabilir bir yüzey ile karakterizedirler (O'Brien, 2011).

2.1.3.2 Doku iskelesi üretim yöntemleri

Doku mühendisliği çalışmalarında, uygun doku iskelesinin üretimi hücrelerin tutunması, çoğalması, morfolojisi ve farklılaşması dolayısıyla da hasar gören dokunun rejenerasyonu açısından oldukça büyük bir öneme sahiptir. Üretilecek olan doku iskelesinin uygun gözeneklilik, geometri ve yeterli mekanik dayanım gibi fiziksel özellikleri, iskelede kullanılan materyalin çeşidine bağlı

olduğu kadar iskelenin üretim Őekli ile de yakından alakalıdır. Doku iskeleleri için kullanılan seramik malzemeler sert yapıları sebebiyle sadece ısıl işlem ile Őekillendirilebilmektedir. Fakat doku iskelelerinde sıklıkla kullanılan polimerik malzemelerin çok çeşitli fabrikasyon teknikleri mevcuttur.

Gaz köpüklendirme, çözücü döküm parçacık uzaklaştırma, faz ayrımı, dondurarak kurutma (Şekil 2.6), fiber bağlama, eriyik kalıplama, membran laminasyon gibi geleneksel metotlar ile üretilen doku iskeleleri genellikle homojen ve birbiri ile bağlantılı porlara sahip bir iç mimari elde etme konusunda başarısız olmaktadır (Tablo 2.5) (Buckley and O'Kelly, 2004).

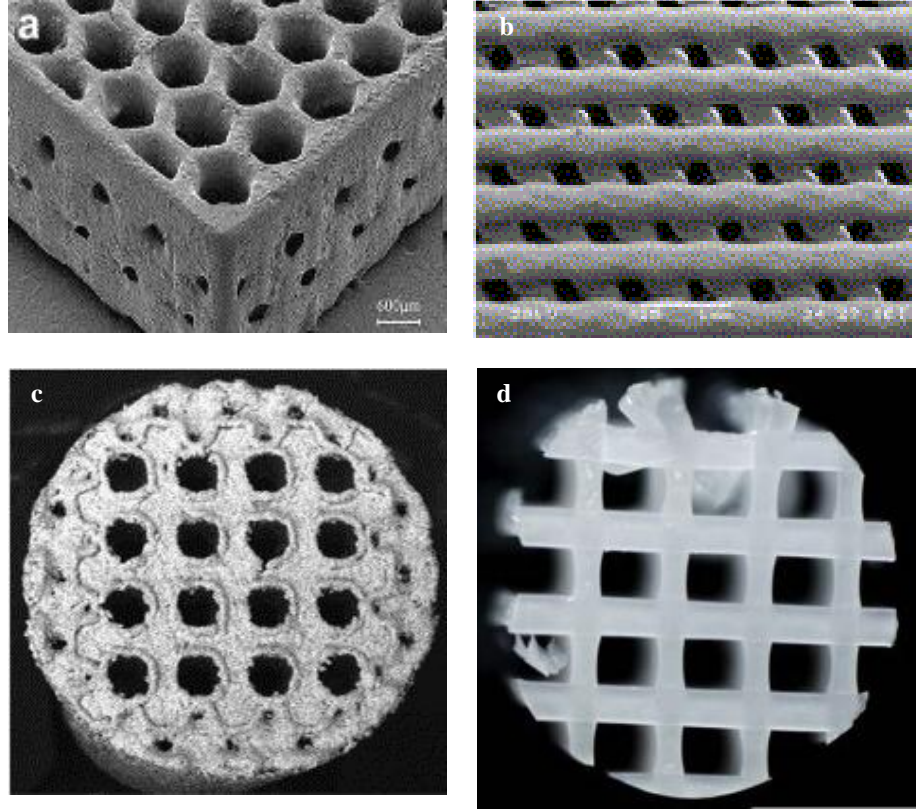


Şekil 2. 6 Çeşitli yöntemlerle üretilmiş iskelelere ait SEM görüntüleri. **a)** Gaz köpüklendirme (Ji et al., 2012), **b)** çözücü döküm parçacık uzaklaştırma (Armenteno et al., 2010) **c)** faz ayrımı (Spadicco et al., 2011) **d)** dondurarak kurutma (Buijtenshuijs et al., 2004).

Tablo 2.5 Geleneksel iskele üretim yöntemleri (Buckley and O’Kelly, 2004).

Teknikler	Avantajları	Dezavantajları
Çözücü döküm parçacık uzaklaştırma	Geniş gözenek boyutu aralığı, gözenek boyutu ve poroziteden bağımsız kontrol, tolere edilebilir kristallik, gözenekli yapı	Membran limiti 3mm, limitli birleştirici, kalıcı porojen, yetersiz iç yapı kontrolü
Fiber bağlama	Yüksek gözeneklilik	Sınırlı polimer çeşitliliği, çözgen kalıntısı, düşük mekanik dayanıklılık
Faz ayrımı	Yüksek poröz yapı, biyoaktif maddelerin geçişine izin verir	İç yapının yetersiz kontrolü, sınırlı gözenek boyutları
Eriyik kalıplama	Kontrol edilebilir porozite ve por çaplar, kontrollü makro yapı	Amorf olmayan yapı oluşumu için yüksek sıcaklıklara ihtiyaç duyması, porojen kalıntıları
Membran laminasyonu	Kontrol edilebilir porozite ve por çaplar, kontrollü makro yapı	Porlar arası sınırlı bağlantı, zayıf mekanik özellikler
Dondurarak kurutma	Yüksek poröz yapı, birbirleri ile etkileşimli gözenekler	Küçük por çapları
Yüksek basınç uygulaması	Organik solvent içermez	Kapalı por yapısı, poröz olmayan dış yüzey

Hızlı prototipleme (RP) veya katı serbest form (SFF) fabrikasyon teknikleri bilgisayar destekli tasarıma dayanmaktadır. SFF teknikleri, bilgisayar destekli tasarım verileriyle fiziksel bir model oluşturulmasını sağlayan tekniklerin genel adıdır. Doku iskelesi için kullanılacak malzeme, bilgisayardan gelen bilgiler doğrultusunda tabakalar halinde oluşturulur. Bu işlem tekrarlanarak tabakalar üst üste getirilir ve tasarlanan üç-boyutlu yapı elde edilir (Gümüşderelioğlu, 2007). SFF teknikleri dört ana gruba ayrılarak incelenebilir. Bunlar: Stereolitografi (SLA), eriterek birikim modellemesi (FDM), üç boyutlu baskı (3-DP), lazerle kalıplama (SLS) (Şekil 2.7) (Hutmacher, 2001). SFF tekniklerinde esas kısıtlayıcı faktörler; toksik bağlayıcılar, zayıf simetri özellikleri ve materyallerdir (Buckley and O’Kelly, 2004). Her bir SFF tekniğinin sahip olduğu avantajlar ve dezavantajlar tablo 2.6’ da verilmiştir.



Şekil 2. 7 Çeşitli yöntemlerle üretilmiş iskelelere ait SEM görüntüleri. a) SLA (Melchels et al., 2010) b) FDM (Leong et al., 2003) c) SLS (Kang et al., 2012) d) 3DP (Seyednejad et al., 2012).

Tablo 2. 6 SFF fabrikasyon tekniklerinin avantajları ve sınırlamaları (Buckley and O’Kelly, 2004).

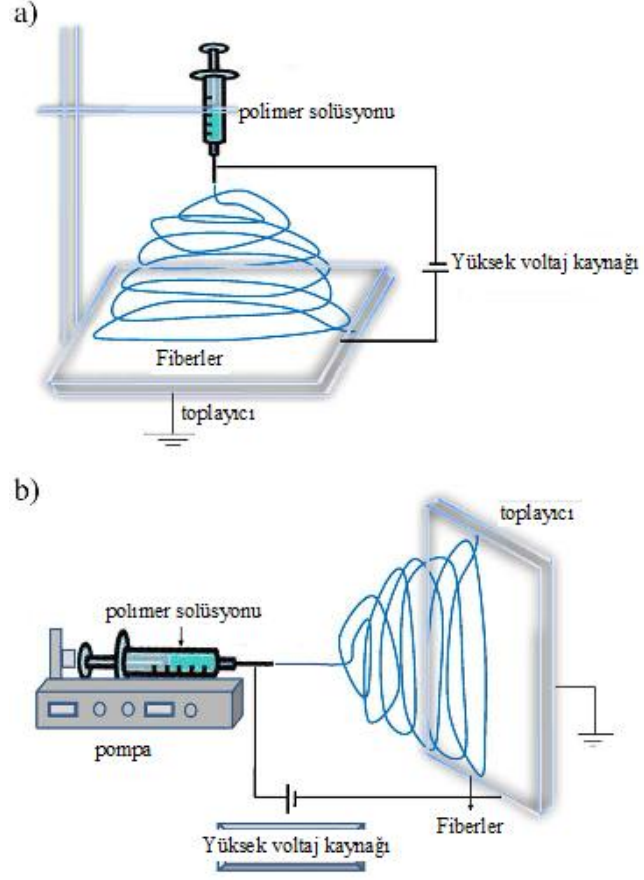
Teknikler	Avantajları	Sınırlamalar
SLA	Destek materyalinin nispeten kolay uzaklaştırılması	Biyobozunur, biyoyumlu polimerik malzeme geliştirilmesi ile sınırlı
SLS	İyi baskı özellikleri, solvent içermez, pek çok malzeme için uygulanabilir olması	Yüksek proses sıcaklıkları, materyali uzaklaştırma güçlüğü
FDM	İyi baskı özellikleri, solvent içermez	Düzensiz yapılar için destek materyaline ihtiyaç duyar, XY ve Z düzlemleri arasında anizotropi
3-DP	Daha fazla malzeme seçimi, ham madde üzerinde düşük ısıtma etkisi	Toksik organik solvent kullanımı, düşük mekanik dayanıklılık, materyali uzaklaştırma güçlüğü

Makro/mikro ve SFF fabrikasyon tekniklerinin sahip olduğu dezavantajlar ve ECM' yi daha iyi taklit edebilecek, gerçekçi bir üç boyutlu çevre oluşturma gereksinimi nedeniyle nano fabrikasyon teknikleri geliştirilmiştir. Nano fabrikasyon teknikleri ile 1-1000 nm arasında çap ve yüksek yüzey alanına sahip fiberler elde edilebilmektedir. Ayrıca bu teknikler ile yüksek gözeneklilik, değişebilen gözenek boyutu, yüksek yüzey/hacim oranına sahip iskeleler üretilmektedir. Nanofabrikasyon teknikleri “yukarıdan-aşağıya yaklaşımı” ve “aşağıdan-yukarıya yaklaşımı” olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Elektroğirme, nanobaskılama litografisi, kazıma/ aşındırma ve elektron demet litografisi gibi yöntemler “yukarıdan-aşağıya yaklaşımını” oluştururken, peptitlerin kendiliğinden düzenlenmesi yöntemi ise “aşağıdan-yukarıya yaklaşımını” oluşturmaktadır (Gümüşderelioğlu, 2007).

Elektrostatik kuvvetler kullanarak fiber oluşturma işlemine “elektroğirme” denir (Sill and Recum, 2008). Elektroğirme yöntemi çok eski bir yöntemdir. Yöntemin temeli 1897 yılında Rayleigh' in bir damlacığın yüzey gerilimini aşabilmek için gerekli olan elektrik yük miktarını belirlemesine dayanır. Rayleigh' den sonra 1934 yılında Formhals ilk elektroğirme düzeneğinin patentini almıştır. 1969 yılında Taylor' ın “Taylor konisini” keşfi de elektroğirme yönteminin daha iyi anlaşılmasını sağlamıştır (Bhardwaj and Kundu, 2010).

Yüksek voltaj kaynağı, toplayıcı, pompa ve polimer solüsyonu elektroğirme işlemi için gerekli temel ekipmanlardır (Şekil 2.8) (Lannutti et al., 2007). Polimer ve toplayıcı arasına uygulanan yüksek elektrik potansiyeli kritik değere ulaştığında metal iğne ucunda oluşan polimerik damlacık yüzeye doğru zorlanır (Bachley and Wen, 2009). İğne ucunda oluşan bu jet, toplayıcıya doğru hareket etmeye başlar. Voltajın kritik değere ulaşmasından hemen önce, yani elektriksel itme kuvvetleri yüzey gerilimini yenmeden önce, damlacık ucunda “Taylor konisi” adı verilen konik bir şekil oluşur. Elektrik alan biraz daha arttırıldığında çözeltinin yüzey gerilimi, uygulanan elektrostatik kuvvete karşı gelemmez ve koni şeklini almış damlacıktan toplayıcıya doğru ilerler. Bu esnada kullanılan çözücü buharlaşır. Böylelikle toplayıcı üzerine sadece polimerden oluşan nanofiberler toplanır (Pham et al., 2006; Cunha et al., 2010). Bu yöntem ile

yüksek yüzey alanı, yüksek gözeneklilik, küçük por çapları gibi ECM' yi daha iyi taklit edebilen iskeleler üretmek mümkündür (Yang et al., 2008).



Şekil 2. 8 Elektroğirme elemanlarını gösteren şematik diyagram. a) dikey yerleşim b) yatay yerleşim (Bhardwaj and Kundu, 2010)

Elektroğirme yöntemi aşağıda bildirilen pek çok değişkenden etkilenmektedir (Bhardwaj and Kundu, 2010):

1. Polimer Çözeltisi Değişkenleri

- Polimer molekül ağırlığı
- Polimerin derişimi
- Çözelti viskozitesi
- Yüzey gerilimi
- Çözeltinin iletkenliği
- Çözücü dielektrik sabiti

2. Süreç Değişkenleri

- Uygulanan voltaj
- Çözelti akış hızı
- Kullanılan enjektör çapı
- Toplayıcı ve tip arasındaki uzaklık

3. Dış Etkenler

- Nem
- Sıcaklık
- Atmosfer koşulları

2.1.4 Hücreler

Hücreler, çoğalma, farklılaşma, hücre-hücre sinyalleri, biyomolekül üretimi ve ECM oluşumu ile ilişkili doku rejenerasyonu ve tamirinde anahtar rol oynayan unsurlardan biridir (Chapekar, 2000). İnsan vücudu 260 farklı fenotipe sahip yaklaşık 100 trilyon hücreden oluşmaktadır. Bu nedenle doku mühendisliği için kullanılan hücrelerin uygunluğu kritik öneme sahiptir (Sipe, 2002). Doku mühendisliğinde kullanılan hücreler kaynaklarına göre üçe ayrılmaktadır (Sipe, 2002; Hoerstrup and Vacanti,2004):

a) Otolog hücreler: Hastanın kendisinden elde edilen ve reddedilme olasılığının en az olduğu hücre kaynağıdır. Ancak sınırlı sayıda elde edilmesi ve hastada yeni bir hasar oluşturması nedeniyle kullanımı sınırlıdır.

b) Allojenik hücreler: Aynı türe ait farklı bireylerden elde edilen hücrelerdir. Bu hücreler ihtiyaçtan önce alınıp saklama avantajına sahiptir. Ancak, hastanın bağışıklık sistemi tarafından reddedilme ve hastalık taşıma riski bulunmaktadır.

c) Ksenojenik hücreler: Farklı türdeki canlılardan elde edilen hücrelerdir. Tıpkı allojenik hücrelerde olduğu gibi, immünolojik cevap oluşturma ve hastalık bulaştırma riski söz konudur.

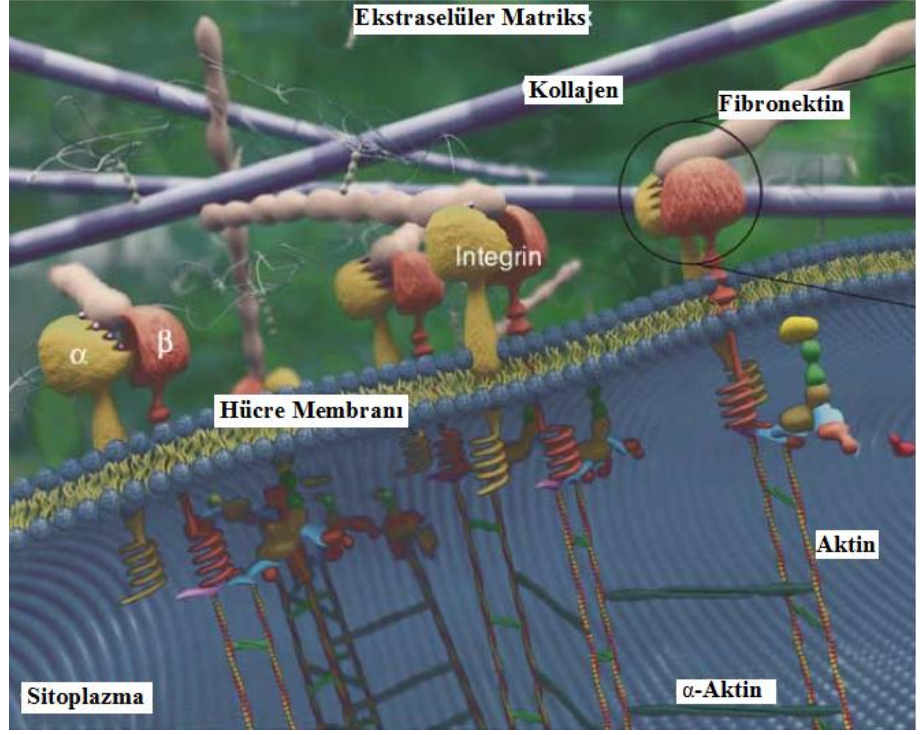
Doku mühendisliğinde kullanılan hücreleri farklılaşmış ve farklılaşmamış hücreler olarak ikiye ayırmak mümkündür. Doku mühendisliği yaklaşımlarında fazla sayıda hücreye ihtiyaç duyulmasına rağmen tamamen farklılaşmış hücrelerin çoğalma yetenekleri oldukça sınırlıdır. Ayrıca farklılaşmış yetişkin hücreler *in*

vitro koşullar altında sahip olduğu fenotipi değiştirmeye veya dediferansiye olmaya eğilimlidir. Farklılaşmış hücrelerin bu kısıtlamaları nedeniyle araştırmacılar kök hücreleri kullanmayı tercih etmeye başlamışlardır (Yang et al., 2008). Kök hücre alanındaki son gelişmeler doku mühendisliğinin gelişimini önemli ölçüde etkilemiştir (Chapekar, 2000). Kök hücreler basitçe, çeşitli hücrelere farklılaşma potansiyeli olan hücre öncülleri olarak tanımlanabilir. Bu hücreler embriyo, göbek kordon kanı ve yetişkin dokular gibi çok çeşitli kaynaklardan elde edilebilmektedir (Dawson et al., 2008). Embriyonik kök hücreler (EKH), ektoderm, mezoderm ve endoderm tabakalarından köken alan birçok hücre çeşidine farklılaşma potansiyeline sahip olmalarının yanı sıra, aynı zamanda yüksek telomeraz aktiviteleri sebebiyle de sınırsız olarak bölünebilmektedirler. Embriyonik kök hücreler (EKH) bu avantajlarının yanı sıra, hem etik problemlere sebep olmaları hem de karsinojenik potansiyele sahip olmaları nedeniyle önemli bir risk faktörü oluşturmaktadırlar. Bu nedenle, EKH'lerin klinik uygulamaları yakın zaman için mümkün değildir (Tuan et al., 2002; Zhang et al., 2010). Kök hücrelerin bir kısmı ise yukarıda da belirtildiği gibi yetişkin dokularda bulunmaktadır. Yetişkin kök hücreler organların içerisinde saklı bulunan ve ihtiyaç duyulduğunda vücut hücrelerinin yenilenmesini sağlayan hücrelerdir (National Academy of Sciences, Engineering and Medicine, 2012). Kemik iliği ve yağ dokusu kök hücreleri bu hücrelere örnek olarak verilebilir. Kemik iliği kök hücreleri (Kİ-MKH) esas olarak kas, kemik, kıkırdak, yağ ve tendon gibi mezodermal orjine sahip hücrelere farklılaşma yeteneği olan multipotent kök hücrelerdir (Prabhakaran et al., 2010). Ayrıca bu mezenkimal kök hücreler, astrositler, kalp kası, endotelial hücreler, nöronlar ve periferik sinir sisteminin miyelinli hücreleri gibi mezenkimal orjine sahip olmayan hücrelere de farklılaşabilmektedirler. Yağ türevli kök hücreler (AdMKH) ise *in vitro* adipojenik, kondrojenik, miyojenik ve osteojenik hücrelere farklılaşma yeteneğine sahiptirler. Ayrıca *in vitro* uygun koşullar altında Kİ-MKH'ler gibi nöral hücrelere de farklılaşabilmektedirler (Fang et al., 2010). Kemik iliği ve yağ dokusundan elde edilen mezenkimal kök hücrelerin izolasyonunun kolay olması, etik ve teknik açıdan problemlere sebep olmamaları ve HLA (*human leucocyte antigen*) doku uyumu gerektirmemeleri bu hücrelerin doku mühendisliği çalışmalarında tercih edilmelerindeki başlıca nedenleri oluşturmaktadır.

2.1.5 Hücre- yüzey etkileşimleri

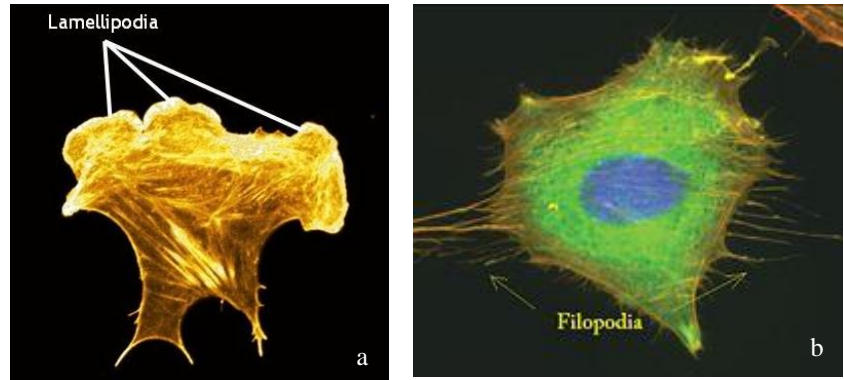
Dokulardan elde edilen pek çok hücre canlılıklarını sürdürebilmek ve çoğalabilmek için katı bir yüzeye tutunmaya ihtiyaç duyar. Bu nedenle, bir yüzey ile karşı karşıya gelen bir hücre arasında meydana ilk olay oldukça ilgi çekicidir. Doku mühendisliğinde, hücrelerin yüzeye tutunması kritik öneme sahiptir. Çünkü hücre tutunması; hücre yayılması, göçü, farklılaşması ve ölümü gibi diğer hücresel davranışlara öncülük eder (Saltzman and Kyriakides, 2007; Chen et al, 2012).

Hücre tutunması hem ligand- reseptör bağları gibi spesifik hem de van der Waals, elektrostatik ve sterik etkileşimler gibi spesifik olmayan bağlar ile ilişkilidir. Etkileşim halinde bulunulan yüzeyin ve ortamın fiziko-kimyasal özelliklerine bağlı olan non-spesifik kuvvetler her zaman olmasına rağmen, spesifik etkileşimler sadece fonksiyonel grupları veya ligand moleküllerini tanıyan ve etkileşen reseptör molekülleri hücre membranı üzerinde eksprese olduğunda ortaya çıkmaktadır (Decuzzi and Ferrari, 2009). İnert bir substrat biyolojik bir çevre ile etkileşime geçtiği zaman, fibronektin, vitronektin, laminin, fibrinojen, BSA, transferrin gibi birçok protein farklı seviyelerde yüzeye adsorbe olarak spesifik hücre tutunması için ligand moleküllerini sağlar (Saltzman and Kyriakides, 2007; Decuzzi and Ferrari, 2009; Biggs et al., 2010). Hücre tutunması, hücre- yüzey reseptörlerinin önemli bir sınıfı olan integrinler tarafından gerçekleştirilir. Integrinler ECM proteinlerine ve hücre içerisindeki sitoskelet proteinleri ile etkileşim halinde olan kısa sitoplazmik domainlere bağlanan heterodimerik transmembran glikoproteinlerdir. Integrin reseptörleri ECM üzerindeki Arg-Gly-Asp (RGD) gibi kısa aminoasit sekanslarına bağlanır (Şekil 2.9) (Tsuchiya et al., 2001).



Şekil 2. 9 İntegrin aracılı hücre tutunması (Meckel, 2012).

Hücreler ECM' nin fiziksel özelliklerini gösterirler. ECM' den ve/veya malzeme yüzeyinden gelen uzaysal, kimyasal ve topografik bilgiler hücrelerin polarize “lamellipodia” ve “filapodia” (Şekil 2.10) olarak adlandırılan ince, saç benzeri çıkıntıları oluşturmalarına sebep olur. İlk hücre bağlantısı ve filapodia oluşumunu lamellipodia, membran aktivitesi ve hücre yayılması takip eder (Biggs et al., 2010).



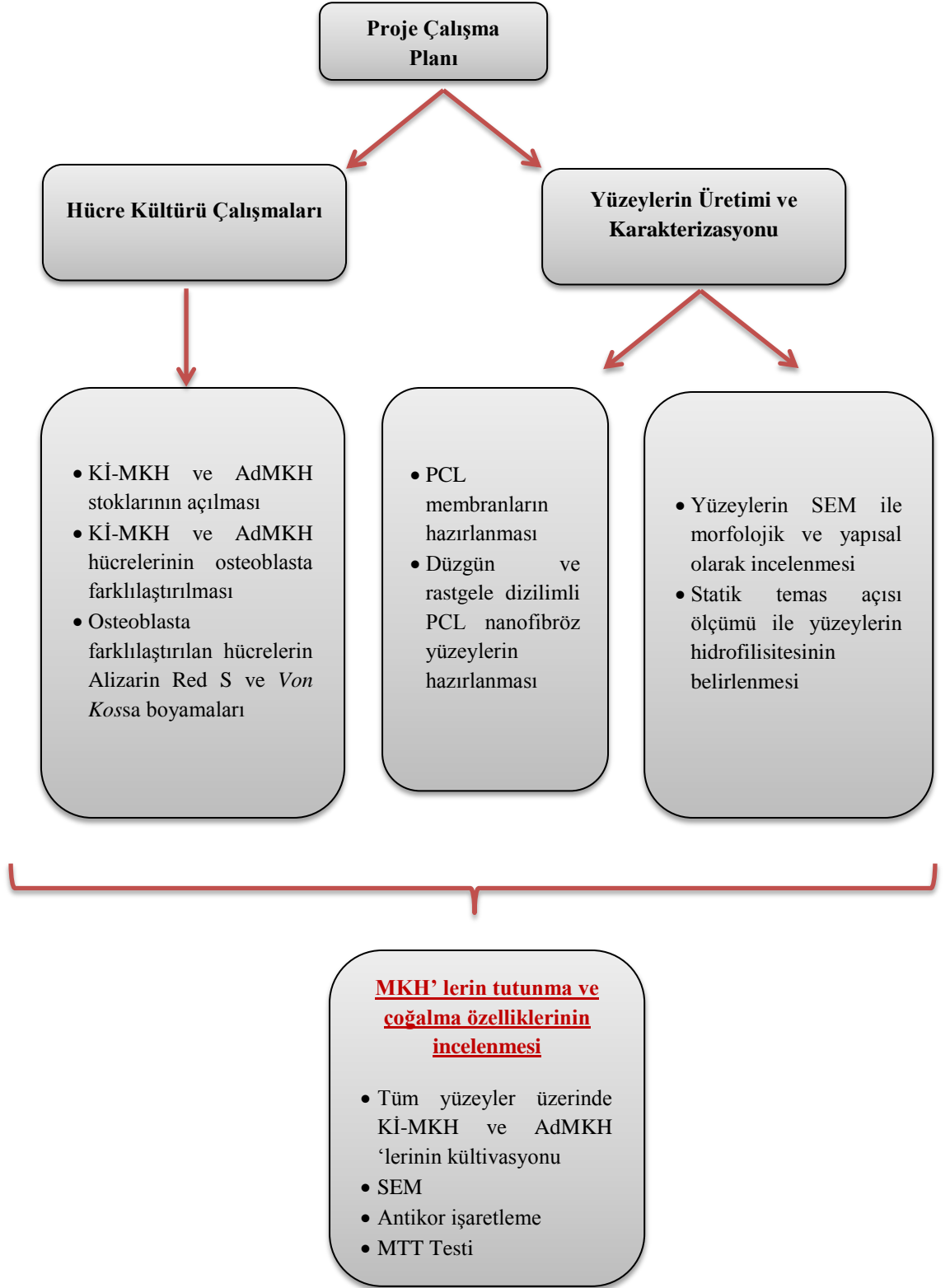
Şekil 2. 10 a) Lamellipodia (Mogilner, 2012), b) filapodia (Sergeeva et al., 2009).

3. MATERYAL ve METOT

Bu tez çalışmasında özetle;

- (1) Polikaprolakton membran (PCL-M), düzgün dizili (PCL-A) ve rastgele dizili (PCL-R) nanofibröz yüzeyler üretildi.
- (2) Üretilen yüzeylerin karakterizasyonları yapıldı.
- (3) Sıçan kemik iliğinden (Kİ-MKH) ve adipoz dokusundan (AdMKH) daha önce izole edilip stoklanmış olan mezenkimal kök hücreler üretilen farklı yüzeyler üzerinde kültüre alındı.
- (4) Yüzeyler üzerindeki MKH' lerin üreme ve tutunma özellikleri belirlendi (Şekil 3.1).

Tez çalışmasının nanofibröz yüzeylerin üretimini ve karakterizasyonunu içeren bölümü Hacettepe Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Kimya Mühendisliği Bölümü' nde, diğer çalışmalar ise Ege Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü, Hayvan Hücre Kültürü ve Doku Mühendisliği Grubu Laboratuvarı' nda gerçekleştirildi.



Şekil 3. 1 Tez projesinde izlenen çalışma yol izi

3.1 Stok Mezenkimal Kök Hücrelerin Çözdürülmesi

1. -196°C (Air Liquide DMC-Cryopal TP 60-60 L)' de stoklanmış olan kriyo tüp çıkartıldı.
2. 37°C' deki su banyosunda bekletildi.
3. Tüp içeriği %10 FBS (Fötal sığır serumu, S0115, Biochrom AG, Almanya), % 0.1 gentamisin (50 mg/ml) (SV30080, HyClone, USA) ve % 1 HEPES (1M) (L1613, Biochrom AG, Almanya) içeren α -MEM (SV30265.01, HyClone, USA) besi ortamı ile bir santrifüj tüpüne (Grenier Bio-One, Almanya) toplandı.
4. Toplanan hücreler 800 rpm' de 4°C' de 5 dakika santrifüjlendi (5810 R, Eppendorf, Almanya).
5. Süpernatant döküldü.
6. Hücre pelleti hafifçe tüpün dibine vurularak yüzeyden kaldırıldı ve besi ortamı ile süspanse edildi.
7. Süspanse haldeki hücreler uygun ölçüdeki flaska (Grenier Bio-One, Almanya) alındı.
8. Uygun etiketleme yapıldıktan sonra flask 37°C' de %5 CO₂ içeren inkübatörde (HERA Cell, Heraeus, Almanya) inkübasyona bırakıldı.

3.2 Mezenkimal Kök Hücrelerin Pasajlanması

1. Hücrelerin üzerinde bulunan kullanılmış besi ortamı çekildi.
2. Hücrelerin yüzeyi 37°C'deki Ca⁺², Mg⁺², içermeyen PBS (L1825, Biochrom AG, Almanya) ile yıkandı.
3. Hücrelerin üzerine tripsin (% 0,05)-EDTA solüsyonu (SH30236.01, HyClone, USA) eklendi, yüzeye yayıldı ve 4-5 dakika 37°C' deki inkübatörde bekletildi.
4. Mikroskop ile tüm hücrelerin yüzeyden kalktığı gözleendiğinde %10 FBS içeren besi ortamı ile hücreler bir santrifüj tüpüne toplandı.
5. Hücreler 800 rpm 4°C 5 dakika santrifüjlendi.
6. Santrifügasyon sonrası, süpernatant döküldü.

7. Santrifüj tüpünün dibindeki hücreler hafifçe vurarak yüzeyden kaldırıldı ve vasat ile süspanse edildi.
8. Hücre süspansiyonu 1:3 oranında yeni bir flaska alındı ve üzerine taze besi ortamı koyularak kültüre devam edildi.

3.3 Mezenkimal Kök Hücrelerin Dondurulması

1. Hücrelerin üzerinde bulunan kullanılmış ortam çekildi.
2. Hücrelerin yüzeyi 37°C'deki Ca^{+2} , Mg^{+2} , içermeyen PBS ile yıkandı.
3. PBS ile yıkama yapıldıktan sonra hücrelerin üzerine tripsin (% 0,05)-EDTA solüsyonu eklendi, yüzeye yayıldı ve 4-5 dakika 37°C' deki inkübatörde bekletildi.
4. Mikroskop ile tüm hücrelerin yüzeyden kalktığı gözlemlendiğinde serumlu vasat ile hücreler bir santrifüj tüpüne toplandı.
5. Hücreler 800 rpm 4°C 5 dakika santrifüjlendi.
6. Süpernatant döküldü.
7. Santrifüj tüpünün dibindeki hücreler hafifçe vurarak yüzeyden kaldırıldı ve dondurma ortamı (%90 FBS + %10 dimetilsülfoksit (DMSO) (1.1-33-30215, CryoSure-DMSO, Wak-Chemie Mesdical GmbH, Almanya) ile homojenize edildikten sonra dondurma tüpüne (kriyo tüp) (123278, Greiner Bio-one, Almanya) aktarıldı.
8. Kriyo tüp -86°C' de köpük kutu içerisine kaldırıldı.
9. -86°C derin dondurucuda bir gece bekletilen kriyo tüp, -196°C' deki sıvı azot içeren tanka kaldırıldı.

3.4 MKH' lerin Büyüme Kinetiğinin ve MTT Kalibrasyon Eğrisinin Çıkarılması

- 1- Hücreler 96-gözlü pleytlere farklı konsantrasyonlarda (2500, 5000, 7500 ve 10000 hücre/cm²) (Şekil 3.2) ekildikten sonra düzenli olarak 10 gün boyunca her gün MTT (3-(4,5-dimetilthiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum bromid, sarı tetrazolyum tuzu, M5655, Sigma, USA) ile canlılık testi yapıldı.

- 2- Kalibrasyon eğrisi için de yine 96- gözlü pleyte 500- 20000 hücre/cm² aralığında 10 farklı seyreltmede, 6 tekrarlı olacak şekilde hücre ekimi yapıldı. Kültür kabı yüzeyine hücre tutunmasını takiben (4 saat sonra) MTT testi uygulandı (Şekil 3.3).
- 3- MTT için, pleytteki kullanılmış besi ortamı çekildi.
- 4- Hücrelerin üzerine %10 MTT (5 mg/ml konsantrasyonda) içeren besi ortamı eklendi.
- 5- Hücreler karanlıkta 37 °C'de, %5 CO₂'li inkübatörde 3 saat süre ile inkübe edildi.
- 6- 3 saat inkübasyonun sonunda MTT içeren ortam çekildi.
- 7- Hücrelerin üzerine DMSO (8.02912.2500, Merck, Almanya) eklenerek oluşan formazan kristallerinin çözülmesi sağlandı.
- 8- Hücreler 10 dakika boyunca 300 rpm' de çalkalayıcıda çalkalanarak kristallerin iyice çözünmesi sağlandı.
- 9- UV Spektrofotometrede (MDS Molecular Devices, Versa Max, USA) 570-690 nm dalga boyunda okutularak absorbans değerleri kaydedildi.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
1	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B
2	B	2500 hücre/cm ²		5000 hücre/cm ²		7500 hücre/cm ²		10000 hücre/cm ²		B	B
3	B									B	B
4	B									B	B
5	B									B	B
6	B									B	B
7	B									B	B
8	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B

Şekil 3. 2 Büyüme kinetiği için MTT test şablonu. B: Boş gözleri, pembe renkli gözler: 2500 hücre/cm², mavi renkli gözler: 5000 hücre/cm², mor renkli gözler: 7500 hücre/cm², yeşil renkli gözler: 10000 hücre/cm² ekim yoğunluğunu göstermektedir.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
1	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B
2	B	500	1500	2500	3500	5000	7500	10000	12500	15000	20000	B
3	B											B
4	B											B
5	B											B
6	B											B
7	B											B
8	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B

Şekil 3. 3 Kalibrasyon eğrisi için MTT test şablonu. B: boş gözleri, B2-B7 sütunu: 500 hücre/cm², C2-C7: 1500 hücre/cm², D2-D7: 2500 hücre/cm², E2-E7: 3500 hücre/cm², F2-F7: 5000 hücre/cm², G2-G7: 7500 hücre/cm², H2-H7: 10000 hücre/cm², I2-I7: 12500 hücre/cm², J2-J7: 15000 hücre/cm², K2-K7: 20000 hücre/cm² ekim yoğunluğunu göstermektedir.

3.5 MKH' lerin Karakterizasyonu

1. Akış sitometri analizleri farklılaşmamış 3. ve 5. pasajdaki AdMKH' ler ve Kİ-MKH' ler ile gerçekleştirildi.
2. MKH' ler yüzeyden kaldırılarak toplandı ve hücre konsantrasyonu 1×10^6 hücre/ml olacak şekilde kendi besi ortamlarında süspansiyon edildi.
3. Akış sitometrisi (FACSCalibur, Becton Dickinson, San Jose, CA) ile karakterizasyon gerçekleştirildi.
4. Veriler CellQuest software (BD Biosciences, USA) ile analiz edildi.
5. İleri ve yan dağılım profillerinde debris ve ölü hücreler göz ardı edildi.

Tablo 3. 1 Akış sitometrisi için kullanılan antikorların listesi

Akış sitometrisi için kullanılan antikorlar
CD29 (Integrin beta 1 zinciri; BD, USA)
CD45 (Protein tyrosine fosfataz, reseptör tipi; BD, USA)
CD54 (ICAM-1; Intersellüler adhezyon molekülü 1; BD, USA)
CD90 (Thy-1/Thy-1.1; BD, USA)
CD106 (vasküler hücre adezyon molekülü; VCAM-1; BD, USA)
CD11b (hematopoetik hücre belirteci, Abcam, ab78457)

MHC Class I (büyük doku uyumluluk kompleksi sınıf I antijen reseptörü; BD, USA)
MHC Class II (büyük doku uyumluluk kompleksi, MHC sınıf II, hücre yüzey reseptörü; BD, USA)

3.6 Mezenkimal Kök Hücrelerin Farklılaşma Potansiyellerinin İncelenmesi

3.6.1 Osteojenik farklılaştırma

Sıçan kemik iliğinden ve adipoz dokusundan elde edilmiş olan kök hücrelerin multipotent özellikte olup olmadıklarını belirlemek amacı ile osteojenik farklılaştırma protokolü uygulandı.

1. Kültür kabı yüzeyini %80 kaplayan mezenkimal kök hücreler (MKH) tripsinizasyon ile yüzeyden kaldırıldı.
2. MKH' ler, α -MEM + %10 FBS + %0.02 gentamisin (50 mg/ml) içerikli kültür ortamıyla 3000 hücre/cm² konsantrasyonda 6-gözlü pleytlere (657160, Greiner Bio-one, Almanya) ekildi.
3. 48 saat sonra hücreler farklılaştırma ortamına alındı.
4. Haftada 3 kez ortam değişimi yapıldı.
5. Bu şekilde kültür 4 hafta devam ettirildi.
6. 28 gün boyunca osteojenik farklılaştırma ortamı ile muamele edilen AdMKH ve Kİ-MKH hücrelerine osteojenik farklılaşmanın tespiti için Alizarin red S ve *Von Kossa* boyama protokolleri uygulandı.

Kİ-MKH' leri için kullanılan osteojenik farklılaştırma ortamının kompozisyonu aşağıdaki gibidir:

- DMEM-LG (FG0415, BioChrom AG, Almanya)
- %10 FBS (S0115, Biochrom AG, Almanya)
- %0.02 gentamisin (50 mg/ml) (SV30080, HyClone, USA)
- 100 nM deksametazon (D2915, Sigma-Aldrich, USA)
- 10 mM β - gliserofosfat (G9891, Sigma-Aldrich USA)

- 200 μ M askorbik asit (A8960, Sigma-Aldrich, USA)

Tablo 3. 2 AdMKH' ler için kullanılan osteojenik farklılaştırma ortam kompozisyonları

Besi yeri Numarası	Askorbik Asit (Sigma, A8960)	β -Gliserofosfat (Sigma, G9891)	Dekzametazon (Sigma, D2915)	Kültür Ortamı
1	200 μ M	10 mM	100 nM	DMEM, % 10 FBS, %0.1 gentamisin
2	50 μ M	10 mM	100 nM	DMEM, % 10 FBS, %0.1 gentamisin
3	300 μ M	10 mM	100 nM	DMEM, % 10 FBS, %0.1 gentamisin
4	50 μ g/ml	10 μ M	10 nM	α -MEM, % 15 FBS, %0.1 gentamisin
5	50 μ g/ml	10 mM	10 nM	α -MEM, % 10 FBS, %0.1 gentamisin

3.6.1.1 Alizarin red S boyama

1. Kullanılmış besi ortamı uzaklaştırıldı.
2. Ca^{+2} , Mg^{+2} içermeyen soğuk (+4°C) PBS ile iki kez yıkama yapıldı.
3. Soğuk (+4°C) % 4 paraformaldehit (PFA) (19943, Affymetrix/USB, USA) ile 30 dakika, 300 rpm' de çalkalanarak (Heidolph Titramax, Almanya) fiksasyon yapıldı.
4. Ca^{+2} , Mg^{+2} içermeyen soğuk (+4°C) PBS ile tekrar iki kez yıkama yapıldı.
5. Alizarin Red sol (%2) (A5533, Sigma, USA) ile 2-3 dakika inkübe edildi. (Alizarin Red solüsyonu distile su içerisinde hazırlandı ve pH'ı 4.1- 4.3 aralığına ayarlandı.)
6. İnkübasyon sonrasında distile su ile üç defa yıkama yapıldı.
7. Örnekler ters faz ışık mikroskopunda incelendi.

3.6.1.2 Von kossa boyama

1. Kullanılmış besi ortamı uzaklaştırıldı.
2. Ca^{+2} , Mg^{+2} içermeyen soğuk (+4°C) PBS ile iki kez yıkama yapıldı.
3. Soğuk (+4°C) PFA solüsyonu (%4) ile 30 dakika, 300 rpm' de çalkalanarak fiksasyon yapıldı.
4. Ca^{+2} , Mg^{+2} içermeyen soğuk (+4 °C) PBS ile tekrar iki kez yıkama yapıldı.

5. Gümüş nitrat sol. (%5) (A3944,0025, AppliChem, Almanya) ile karanlıkta 30 dakika inkübe edildi. (Gümüş nitrat çözeltisi %5 olacak şekilde distile su içerisinde hazırlandı.)
6. Ca^{+2} , Mg^{+2} içermeyen PBS ile tekrar üç defa yıkama yapıldı.
7. Kuyucukların kurumasını engellemek için az miktarda PBS eklenerek 1 saat boyunca UV altında, kapağı açık bir şekilde bekletildi.
8. Distile su ile üç kez yıkama yapıldı.
9. Distile su içerisinde %5 sodyum thiosülfat (KIM-STS/01CP/051003, Kimetsan, Türkiye) çözeltisi hazırlandı.
10. Kuyucuklara %5 sodyum thiosülfat çözeltisi eklenerek 2-5 dakika inkübe edildi.
Sodyum thiosülfat ile inkübasyonun amacı arka planın giderilmesi, kalsiyum depozitlerinin daha belirgin hale getirilmesidir.
11. Distile su ile üç kez yıkama yapıldı.
12. Örnekler ters faz ışık mikroskobunda incelendi.

3.7 Oil Red O Boyama

Sıçan yağ dokusundan izole edilen AdMKH'lerin yağ hücreleri ile kontamine olup olmadığının ve hücrelerin kültürde uzun süre beklemesi sonucu yağ hücrelerine farklılaşp farklılaşmadığının incelenmesi için Oil Red O boyama yapıldı.

1. Kullanılmış besi ortamı tamamen uzaklaştırıldı.
2. Kültür yüzeyi PBS ile bir defa yıkandı.
3. Kültür yüzeyine %10 formalin eklendi ve 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi.
4. Kültür, %10' luk formalin ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra taze formalin ile 1 saat oda sıcaklığında tekrar inkübe edildi.
5. Bir saat inkübasyonun sonunda formalin ortamdan uzaklaştırıldı.
6. %60 isopropanol çözeltisi (PX1830, Merck, Almanya) ile yıkama yapıldı.
7. Kültür yüzeyi tamamen kuruyana kadar oda sıcaklığında bekletildi.
8. Oil red O (O0625, Sigma, USA) boya çözeltisi (%21) eklendi ve 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.

9. 10 dakika sonunda distile su ile 4 kez yıkandı.
10. Örnekler ters faz ışık mikroskopunda incelendi.

8.8 Polikaprolakton (PCL) Membranların Hazırlanması

PCL membranların hazırlanması için tetrahidrofuran (THF., 87368, Sigma, USA) içerisinde hazırlanan PCL (440744, Sigma, USA) çözeltisi (%10 w/v) (M_w : 70000-90000) kullanıldı.

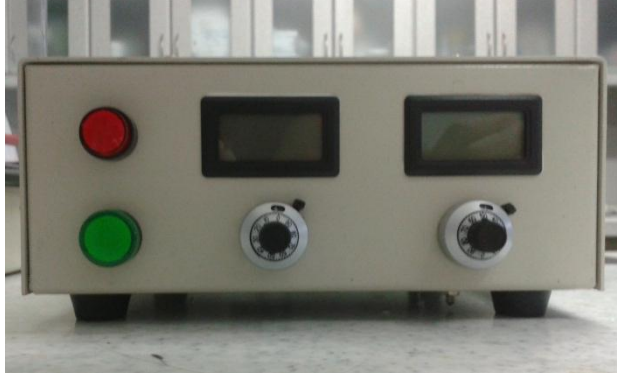
1. THF içerisinde %10 PCL karışımı bir gece boyunca manyetik karıştırıcıda karıştırılarak çözelti hazırlandı.
2. Hazırlanan çözelti daha önce ön denemeler ile belirlenen membran kalınlığına uygun olacak şekilde (30-50 μ m), 9,7 cm çapa sahip cam petrilere 5,5 ml PCL çözeltisi kabarcık oluşturmamaya dikkat edilerek döküldü.
3. Dökme işlemi tamamlandıktan sonra çözeltinin yüzeyde homojen olarak dağılması sağlandı.
4. Membranlar, üzerleri delikli bir alüminyum folyo ile kapatıldıktan sonra çeker ocak içerisinde 1-2 gün kurumaya bırakıldı.
5. Kuruyan membranlar bir bisturi yardımıyla, membrana zarar vermeden, cam ile membran arasına hava girmesi sağlanarak petri yüzeyinden kaldırıldı.
6. Hazırlanan membranlar elektroğirme ile üretilen nanofiberlerin toplanması için kullanıldı.

3.9 Polikaprolakton Düzgün Dizili (PCL-A) ve Rastgele Dizili (PCL-R) Nanofiberlerin Hazırlanması

PCL-A ve PCL-R nanofibröz yüzeyler elektroğirme yöntemiyle hazırlandı. Elektroğirme için kullanılan düzenek temelde üç ana elemana sahiptir. Bu elemanlar şu şekilde sıralanabilir:

- Yüksek voltaj kaynağı (GAMA High Voltage Research Ormand Beach, Florida) (Şekil 3.4)

- Pompa (New Fra Pump System Inst. Syringe Pump Com.) (Şekil 3.5)
- Rastgele dizili nanofiber toplama yüzeyi (Şekil 3.6 ve Şekil 3.8)
- Düzgün dizili nanofiber toplama yüzeyi (Şekil 3.7)



Şekil 3. 4 Yüksek voltaj kaynağı.



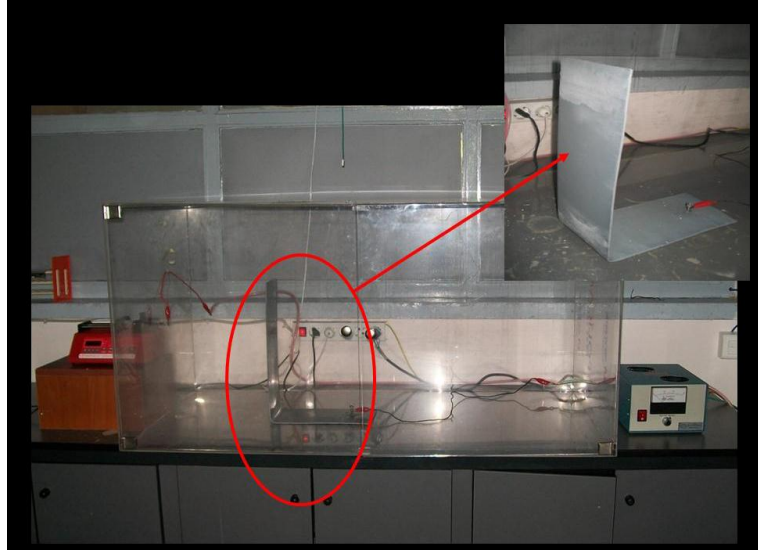
Şekil 3. 5 Pompa.



Şekil 3. 6 Rastgele dizili nanofiberleri toplama yüzeyi.



Şekil 3. 7 Düzgün dizili nanofiberleri toplama yüzeyi.



Şekil 3. 8 Elektroğirme sisteminin genel görünüşü, rastgele dizili nanofiberleri toplama yüzeyi.

PCL nanofiberlerin üretimi için 1:1 oranında diklorometan (DCM, 24233, Riedel-de Haen, Almanya): dimetilformamid (DMF, 1.03034.2500, Merck, Almanya) içerisinde çözülmüş % 12 (w/v) PCL çözeltisi kullanıldı.

1. Hazırlanan karışım 1 gece boyunca manyetik karıştırıcıda karıştırılarak çözelti hazırlandı.

2. Düzgün ve rastgele dizili PCL nanofiberlerin üretimi için uygun koşulların belirlenmesi için cam lameller (Deckglaser, Germany) üzerine toplanan nanofiberlerin önce ışık mikroskobu ile incelemeleri yapıldı.
3. Işık mikroskobu görüntülerinde boncuk içermeyen, homojen fiber çapına sahip nanofiberleri içeren üretim koşulları belirlendi.
4. Belirlenen koşullar doğrultusunda taramalı elektron mikroskopunda (SEM) incelemeler yapıldı.
5. SEM incelemeleri sonucunda boncuk içermeyen, düzgün, homojen ve uygun yoğunlukta nanofiberleri içeren koşullar belirlendi.
6. Seçilen nanofiber üretim koşulları tablo 3.3' de verilmiştir.

Tablo 3. 3 PCL-A ve PCL-R için seçilen nanofiber üretim koşulları

Uzaklık	Voltaj	Akış hızı	Dönüş hızı	Toplama süresi
35 cm	22,5 kV	3 ml/h	2450 rpm	3 dakika
35 cm	22,5 kV	12 ml/h	-	1,5 dakika

Hazırlanan nanofiberlerin çapları SEM incelemeleri sonucunda alınan fotoğraflar kullanılarak ve *Image J* programı (Neuhauser, 2009) ile hesaplandı.

3.10 Statik Temas Açısı Ölçümü ile Yüzeylerin Karakterizasyonu

1. Materyallerin hidrofilik özelliklerinin belirlenmesi için Sessile Drop yöntemi (Srinivasan et al., 2012) uygulanarak KRÜSS DSA 100 Temas Açısı Ölçüm Cihazı kullanıldı.
2. Sessile drop yöntemi ile nanofibröz yüzeylerin temas açıları ölçüldü.
3. Nanofiberler toplama yüzeyinde tam olarak homojen dağılmadığı için farklı 3 bölgeden ölçüm yapıldı.

Statik temas açısı ölçüm sonuçları dikkate alındığında hidrofilik materyaller düşük temas açısı verirken hidrofobik materyallerin ise yüksek temas açısı verdiği görülmüştür. 70° ve üzeri açı değeri veren örnekler hidrofobik olarak kabul edilmektedir.

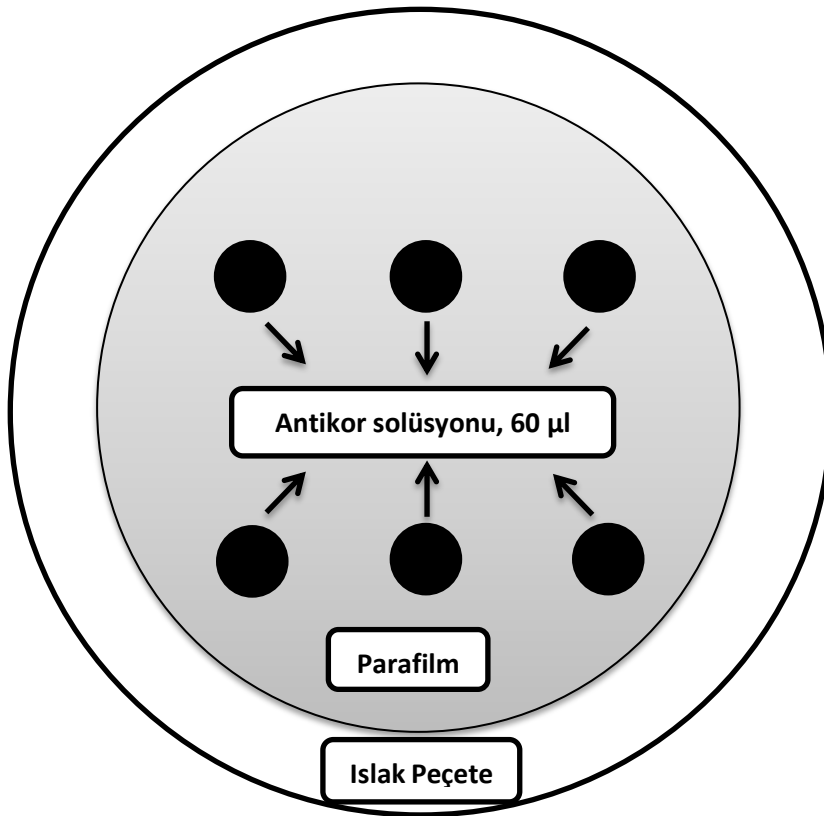
3.11 Nanofibröz Yüzeylerin Sterilizasyonu ve Hücre Kültivasyonu

1. Materyaller ile 48 gözlü pleytler (677180, Greiner Bio-one, Almanya) kullanılarak çalışıldı.
2. PCL-A, PCL-R, PCL-M yüzeyler çalışılacak yüzeye tam uyacak şekilde delme aleti ile tek bir hareketle kesildi.
3. Tüm malzemeler sterilizasyon için gece boyunca %70 etanol içerisinde bekletildi. Bu aşamadan sonra tüm basamaklar laminar akışlı kabin içerisinde gerçekleştirildi.
4. Yüzeylerin %70 etanol ile inkübasyonu sonrasında yüzeyler, daha önceden içlerine paslanmaz çelik tel yerleştirilmiş ve 121 °C' de 45 dakika boyunca otoklavlanarak sterillenmiş petripler içindeki teller üzerine yerleştirilerek 1 saat kurumaya bırakıldı.
5. Kuruyan yüzeyler 48 gözlü pleyt içerisine uygun şekilde yerleştirildi.
6. Pleyt içerisindeki yüzeylerin üzerine daha önceden 121 °C' de 45 dakika boyunca otoklavlanarak sterillenmiş cam halkalar yerleştirildi.
7. Yüzeyler uygun şekilde yerleştirildikten sonra üzerlerine hücre kültür ortamı eklenerek 1 gece 37 °C' de, %5 CO₂' li inkübatörde yüzey şartlandırılması yapıldı.
8. Şartlandırma sonrası yüzeyler üzerindeki ortam çekildi ve 5000 hücre/cm² konsantrasyonda hücre, yavaş bir şekilde materyal yüzeyine bırakıldı.
9. Hücreler, 37 °C' de, %5 CO₂' li inkübatörde kültivasyona bırakıldı.

3.12 Nanofibröz Yüzeyler Üzerindeki MKH' lerin İmmünohistokimyasal İşaretlemesi

1. Hücrelerin üzerindeki kullanılmış besi ortamı çekildi ve hücreler Ca⁺², Mg⁺² içeren PBS (L1815, BioChrom AG, Almanya) ile iki kez yıkandı.
2. +4 °C' de bulunan soğuk PFA çözeltisi (%4) yüzeyler üzerine eklendi ve 300 rpm' deki çalkalayıcıda çalkalanarak, oda sıcaklığında, 15 dakika fiksasyon yapıldı.
3. Fiksasyon basamağının ardından PFA çekildi ve yüzeyler tekrar Ca⁺², Mg⁺² içeren PBS ile iki kez yıkandı.

4. Yüzeyley üzerine 50 mM NH₄Cl (A9434, Sigma, USA) solüsyonu eklendi ve 300 rpm' deki çalkalayıcıda, oda sıcaklığında, 7 dakika inkübe edildi. Bu basamak ile paraformaldehitten gelen aldehitler uzaklaştırıldı.
5. Yüzeyley PBS-Triton X-100 (% 0.2) (A1388,0500, AppliChem, Almanya) ile iki kez 5' er dakika, 300 rpm' deki çalkalayıcıda çalkalanarak, oda sıcaklığında yıkandı. Bu basamak permeabilizasyon basamağı olarak adlandırılır.
6. Yüzeyley Ca²⁺, Mg²⁺ içermeyen PBS ile bir kez yıkandı.
7. Nemli odacık hazırlandı (ıslak peçete, parafilm, petri). Parafilm ıslak peçete üzerine düzgün bir şekilde yayıldı. Boyamanın ilerleyen aşamalarında, hücreleri ve antikorları karıştırmamak için parafilm üzerine, planlanan boyama şablonuna uygun şekilde numaralandırma yapıldı (Şekil 3.9).



Şekil 3. 9 Nemli odacık. Antikor ile boyama sırasında yüzeyin kurumasını engellemek için tasarlanan nemli alan.

8. Kullanılacak olan antikor solüsyonu hazırlandı. Hazırlanan antikor solüsyonu için aşağıdaki oranlar kullanıldı:
- 1:1000 DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol, D1306, Invitrogen, USA)
 - 1:100 Alexa fluor 488 Phalloidin (A12379, Invitrogen, USA)
 - %1 BSA (A9647, Sigma, USA) içeren Ca^{+2} , Mg^{+2} içermeyen PBS
9. Parafilm üzerine her bir yüzey için antikor solüsyonundan 60 µl damlatıldı ve üzerlerine, ince bir pens yardımı ile PBS içerisinden alınan yüzeyler, önce peçete üzerinde süzdürülerek hücreli taraf antikorla yüzleşecek şekilde yerleştirildi.
10. Yüzeyler hazırlanan nemli odacık içerisinde, karanlıkta ve oda sıcaklığında 40 dakika inkübe edildi.
11. Antikor solüsyonu ile inkübasyondan sonra, 48 gözlü pleytin her gözüne Ca^{+2} , Mg^{+2} içermeyen PBS eklendi. Yüzeyler nemli odacık içerisinden, ince uçlu pens yardımı ile dikkatlice alındı ve önce peçete üzerinde süzdürülerek, hücreli yüzey üste gelecek şekilde, içerisinde PBS bulunan pleyte yerleştirildi.
12. Pleyte yerleştirilen yüzeyler Ca^{+2} , Mg^{+2} içermeyen PBS ile 3 kez 10' ar dakika 300 rpm' deki çalkalayıcıda çalkalanarak, oda sıcaklığında yıkandı.
13. Üzerine 10 µl Mowiol 4-88 (475904, Calbiochem, Merck, Almanya) damlatılan lamlar üzerine yüzeyler, hücreli yüz Mowiol ile yüzleşecek şekilde kapatıldı.
14. Preparatlar bir gece boyunca oda sıcaklığında kurumaları için bekletildi. Preparatlar kurduktan sonra 4°C'ye kaldırıldı.
15. Örnekler floresan mikroskopta incelendi.

3.13 Hücreli Yüzeylerin Taramalı Elektron Mikroskopi (SEM) Çalışması

Uygulamalar 1. basamaktan 4. basamağa kadar +4°C'de (buz üstünde), 5. basamaktan 11. basamağa kadar ise oda sıcaklığında yapıldı.

1. Örnekler 30 saniye serum fizyolojik ile yıkandı.
2. Serum fizyolojik ile yıkanan örnekler 30 dakika tampon A' da [0.1 M sodyumkakodilat (C-0250, Sigma, USA) içerisinde hazırlanan glutraldehit (%5) (8.20603.1000, Merck, Almanya) çözeltisinde] bekletildi.
3. Başka bir solüsyon ile yıkama yapılmadan örnekler tampon B'ye [1 M sodyumkakodilat içerisinde hazırlanan sukroz (%7) (1.07651.1000, Merck, Almanya) çözeltisinde] alınarak 30 dakika bekletildi.
4. Başka bir solüsyon ile yıkama yapılmadan tampon C' ye [1 M sodyumkakodilat içinde % 2 ozmiyum tetroksit (19100, Electron Microscopy Sciences,)] alınarak 30 dakika bekletildi.
5. Tampon C aşamasından sonra örnekler 5 dakika distile suda yıkandı ve bu basamak 2 kez tekrarlandı.
6. Örnekler distile su ile yıkamadan sonra artan derecelerdeki alkol serilerinde 5'er dakika bekletilerek susuzlaştırıldı. Sırasıyla etanol (1.00983.2500, Merck, Almanya) serileri; %35, %50, %70, %85, %95, %100, %100 etanol şeklinde hazırlandı.
7. Alkol serileri tamamlanınca örnekler heksametildisilazan (HMDS, 8.4324.250, Merck, Almanya) solüsyonunda 5 dakika bekletildi.
8. Üzerlerinden HMDS çekildikten sonra, örnekler kurumaları için oda sıcaklığında 30 dakika tutuldu.
9. Kuruma tamamlandıktan sonra SEM incelemesine kadar desikatör içerisinde bekletildi.
10. SEM inceleme öncesi, örnekler pirinç taşıyıcılar üzerine yerleştirildi ve 200 Å kalınlığında altın ile kaplanarak taramalı elektron mikroskobunda incelendi.

Hücreli yüzeylere ait SEM incelemeleri E.Ü Diş Hekimliği Fakültesi'nde ve İYTE Malzeme Araştırma Merkezi'nde gerçekleştirildi.

3.14 Nanofibröz Yüzeyler ile Büyüme Kinetiği Çalışması

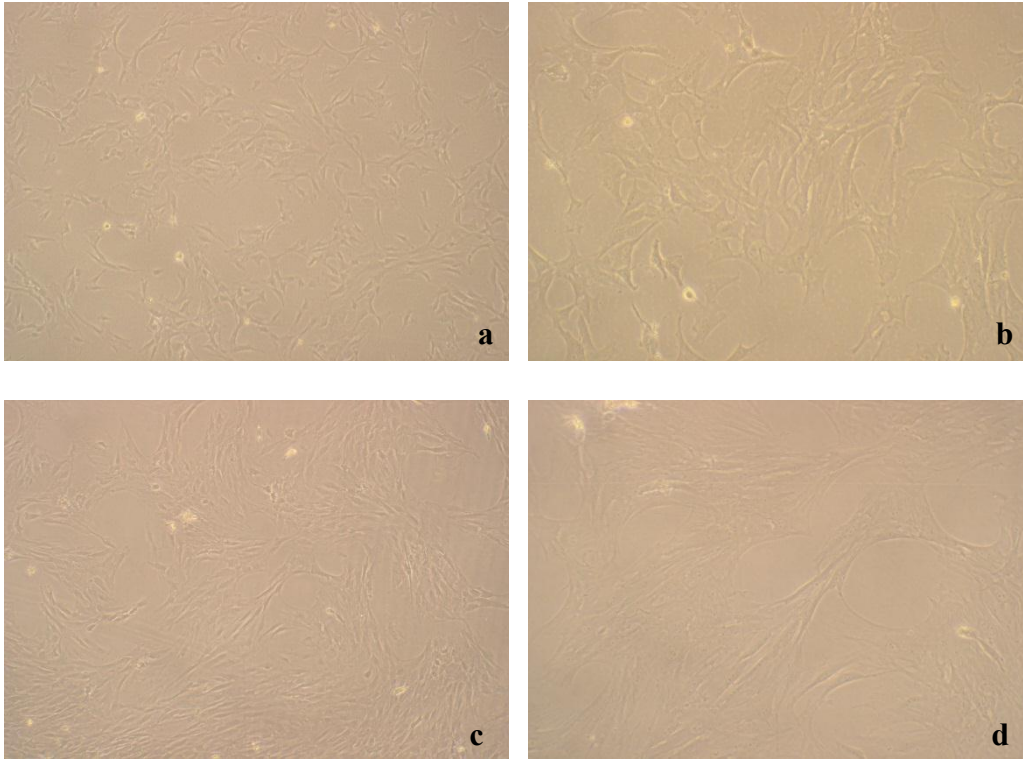
Nanofibröz yüzeyler üzerinde büyüme kinetiği çalışması iki tekrarlı olacak şekilde çalışıldı.

1. Kültür kabı yüzeyini %80 kaplayan kemik iliği ve yağ dokusu mezenkimal kök hücreleri (Kİ-MKH ve AdMKH) tripsinizasyon ile yüzeyden kaldırıldı.
2. Hücreler, α -MEM + %10 FBS + %0.1 gentamisin (50 mg/ml) içerikli kültür vasatıyla 5000 hücre/cm² konsantrasyonda 48-gözlü pleytlere PCL yüzeyler ve polistren yüzey üzerine ekildi ve yüzeyler üzerine cam halkalar yerleştirilerek yüzeylerin yüzmesi engellendi.
3. Hücreler 48-gözlü pleytlere ekildikten sonra düzenli olarak her gün MTT testi yapıldı.
4. MTT testi için, pleytteki kullanılmış besi ortamı çekildi.
5. Hücrelerin üzerine %10 MTT (5 mg/ml konsantrasyonda) çözeltisi içeren besi ortamı eklendi.
6. Hücreler karanlıkta 37 °C'de, %5 CO₂'li inkübatörde 3 saat süre ile inkübe edildi.
7. MTT içeren ortam çekildi.
8. Hücrelerin üzerine DMSO eklenerek oluşan formazan kristallerinin çözülmesi sağlandı.
9. Hücreler 10 dakika boyunca 300 rpm' de çalkalayıcıda çalkalanarak kristallerin iyice çözünmesi sağlandı.
10. Formazan kristalleri çözüldükten sonra tüm ortamlar teker teker çekilerek 2 ml' lik santrifüj tüplerinde toplandı.
11. Örnekler 10.000 rpm' de 5 dakika santrifüj edilerek membranlardan gelebilecek herhangi bir bulanıklık önlenmiş oldu.
12. Santrifügasyon sonrası süpernetanttan 100 μ l alınarak 6 tekrarlı olacak şekilde 96-gözlü pleytlere koyuldu.
13. UV spektrofotometrede 570-690 nm dalga boyunda okutulmuş absorpsiyon değerleri kaydedildi.

4. BULGULAR

4.1 Mezenkimal Kök Hücrelerin Morfolojik Görüntüleri

Stoktan çözdürülen AdMKH' lerin ve Kİ-MKH' lerin hücre morfolojilerinde ve canlılıklarında her hangi bir sorun olmadığı gözlemlendi. Birinci pasaj seviyesindeki ADMKH' ler ve Kİ-MKH' ler karşılaştırıldığında, AdMKH' lerin Kİ-MKH' lere göre daha iğsi yapıda oldukları tespit edildi. Pasaj seviyesi ilerledikçe hücrelerin yüzey ile olan temasının arttığı ve hücrelerin yüzeye oldukça yayılmaya başladığı tespit edildi (Şekil 4.1).



Şekil 4. 1 Üç günlük AdMKH (P/1) ve Kİ-MKH (P/1) kültürlerinin ters faz ışık mikroskop görüntüleri **a.** AdMKH 4X **b.** AdMKH 10X **c.** Kİ-MKH 4X **d.** Kİ-MKH 10X (Olympus CK40, Japonya).

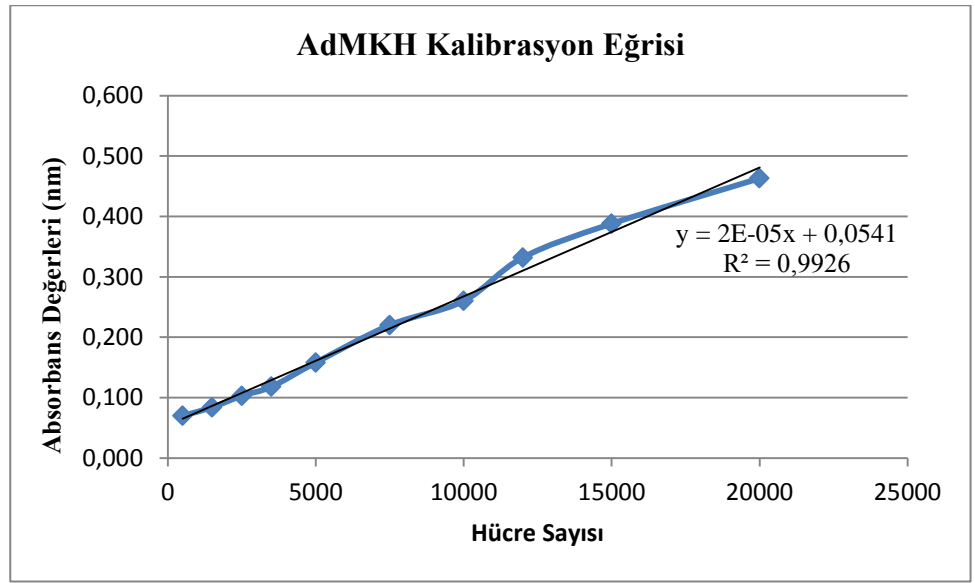
4.2 MKH' lerin Büyüme Kinetiği ve MTT Kalibrasyon Eğrisi

AdMKH' ler için oluşturulan kalibrasyon eğrisi şekil 4.2' de, Kİ-MKH' ler için oluşturulan kalibrasyon eğrisi ise şekil 4.3' te verilmiştir. Kalibrasyonda elde

edilen absorbanlara karşılık gelen hücre sayıları tablo 4.1 ve tablo 4.2' de gösterilmiştir.

AdMKH' ler için oluşturulan kalibrasyon eğrisi grafiğinden aşağıdaki eğri denklemini elde edilmiştir:

$$y = 2E-05x + 0,541$$



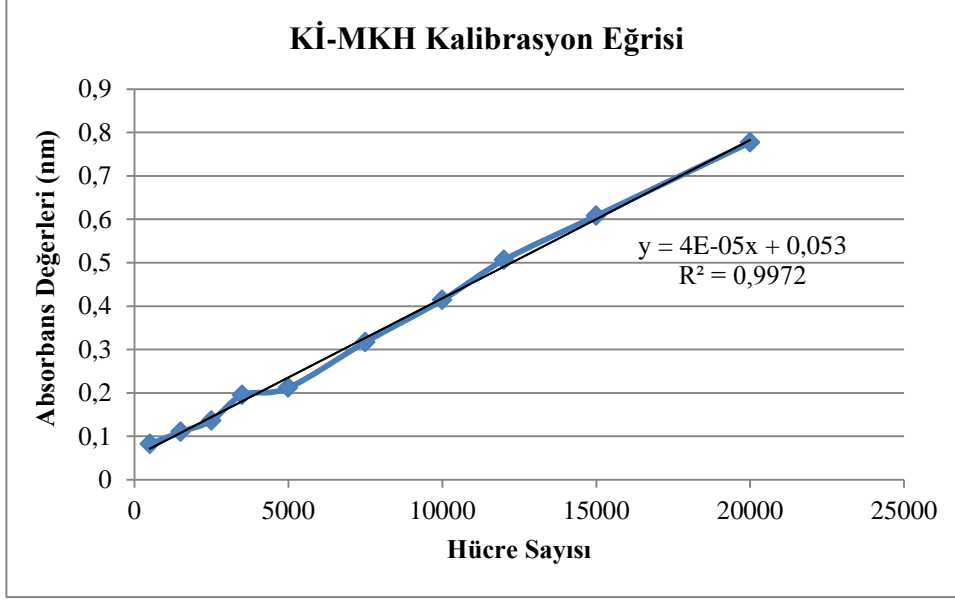
Şekil 4. 2 AdMKH' ler için oluşturulan kalibrasyon eğrisi

Tablo 4. 1 AdMKH Kalibrasyon eğrisinde absorbans değerlerine karşılık gelen hücre sayıları

AdMKH Absorbans Değerleri	Hücre Sayısı
0,07	795
0,084	1495
0,103	2445
0,118	3195
0,158	5195
0,22	8295
0,26	10295
0,332	13895
0,388	16695
0,463	20445

Kİ-MKH' ler için oluşturulan kalibrasyon eğrisi grafiğinden aşağıdaki eğri denklemini elde edilmiştir:

$$y = 4E-05x + 0,053$$



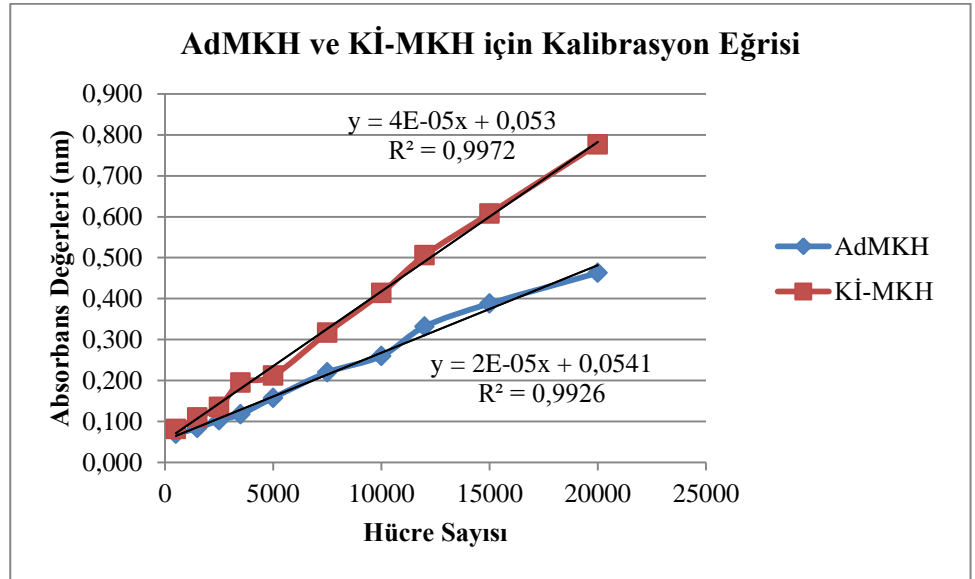
Şekil 4. 3 Kİ-MKH' ler için oluşturulan kalibrasyon eğrisi

Tablo 4. 2 Kİ-MKH kalibrasyon eğrisinde absorbans değerlerine karşılık gelen hücre sayıları

Kİ-MKH Absorbans Değerleri	Hücre Sayısı
0,082	725
0,110	1425
0,136	2075
0,195	3550
0,212	3975
0,317	6600
0,414	9025
0,506	11325
0,608	13875
0,777	18100

Aynı absorbans değerine karşılık gelen AdMKH ve Kİ-MKH sayıları tablo 4.3' te verilmiştir. Bu tablo incelendiğinde aynı absorbans değerinde AdMKH'

lere ait hücre sayısının Kİ-MKH' ye ait hücre sayısına göre daha fazla, yaklaşık iki kat olduğu görüldü.



Şekil 4. 4 AdMKH' ler ve Kİ-MKH' ler için kalibrasyon eğrilerinin karşılaştırılması

Tablo 4. 3 AdMKH ve Kİ-MKH' lerin aynı absorbans değerine karşılık gelen hücre sayılarının karşılaştırılması

AdMKH Hücre Sayısı	Absorbans Değerleri	Kİ-MKH Hücre Sayısı
795	0,07	425
1495	0,084	775
2445	0,103	1250
3195	0,118	1625
5195	0,158	2625
8295	0,22	4175
10295	0,26	5175
13895	0,332	6975
16695	0,388	8375
20445	0,463	10250

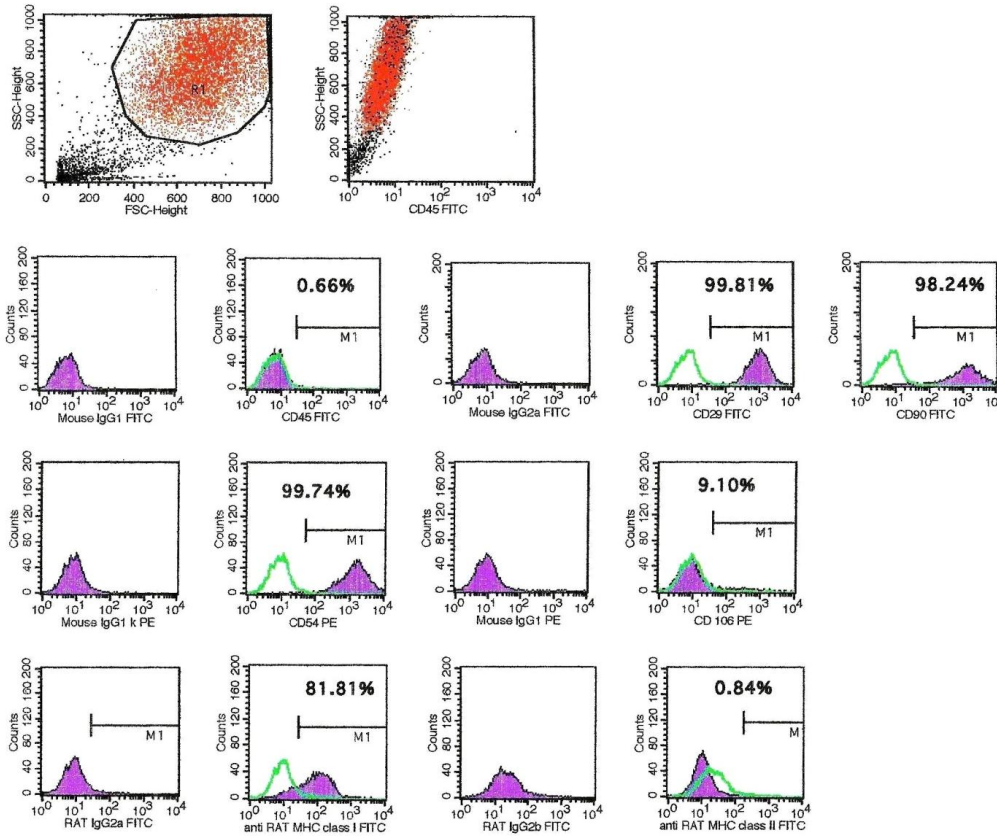
4.3 MKH' lerin Karakterizasyonu

AdMKH' ler ve Kİ-MKH' ler CD29, CD90, CD54, CD45, CD11b, CD106, MHC sınıf I ve II belirteçleri açısından akış sitometrisi ile incelendi (Tablo 4.4).

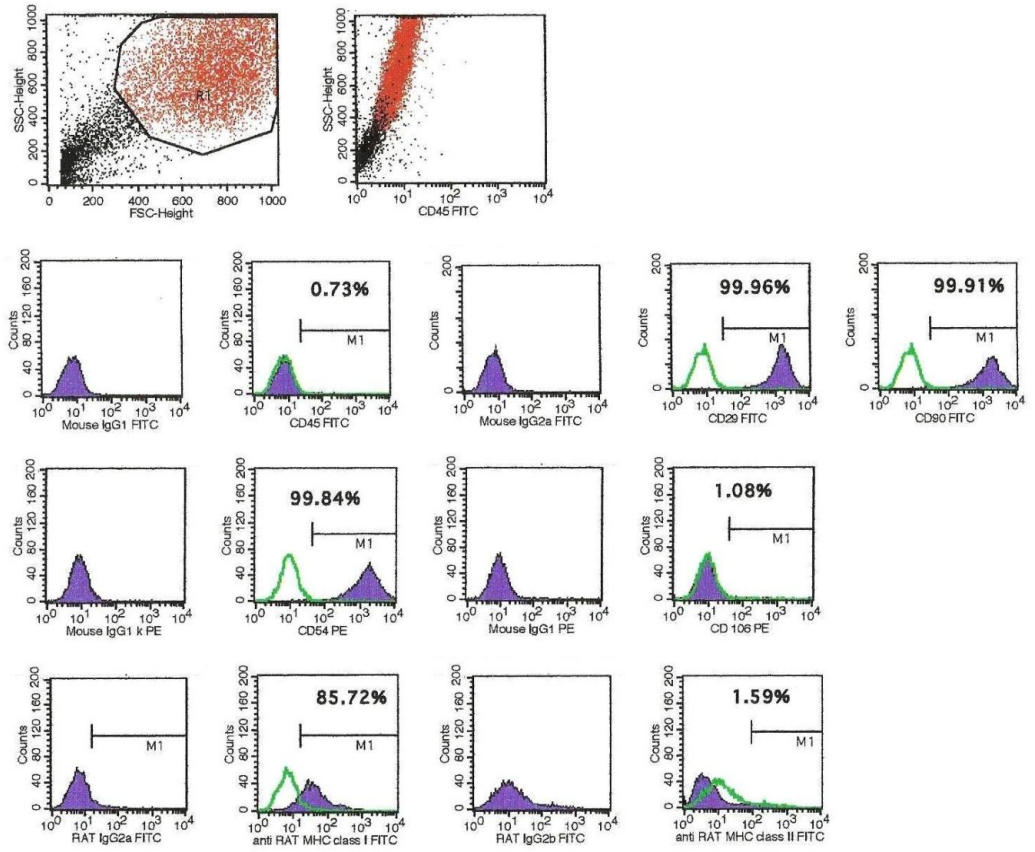
Tablo 4. 4 MKH' lerdeki yüzey belirteçlerinin % pozitif ekspresyonunun akış sitometri sonuçları

Antikor Hücre	CD29	CD90	CD54	CD45	CD11b	CD106	MHC Sınıf I	MHC Sınıf II
	AdMKH	99.81	98.24	99.74	0.66	0.77	9.10	81.81
Kİ-MKH	99.96	99.91	99.84	0.73	0.77	1.08	85.72	1.59

Akış sitometri sonuçları incelendiğinde her iki hücre türü için de CD29, CD90, CD54 ve MHC I antikorları için pozitif olduğu görüldü. CD45, CD11b ve MHC II antikorları için ise pozitiflik oranının % 2' nin altında olduğu belirlendi. Bu durum izole edilip, stoklanan MKH' lerin hematopoietik veya endotelial hücreler ile kontamine olmadığını gösterdi.



Şekil 4. 5 AdMKH akış sitometri sonuçları.

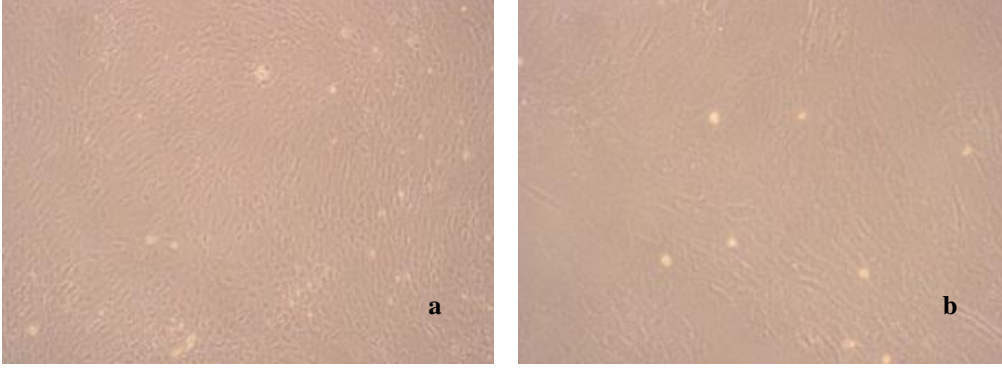


Şekil 4. 6 Kİ-MKH akış sitometri sonuçları.

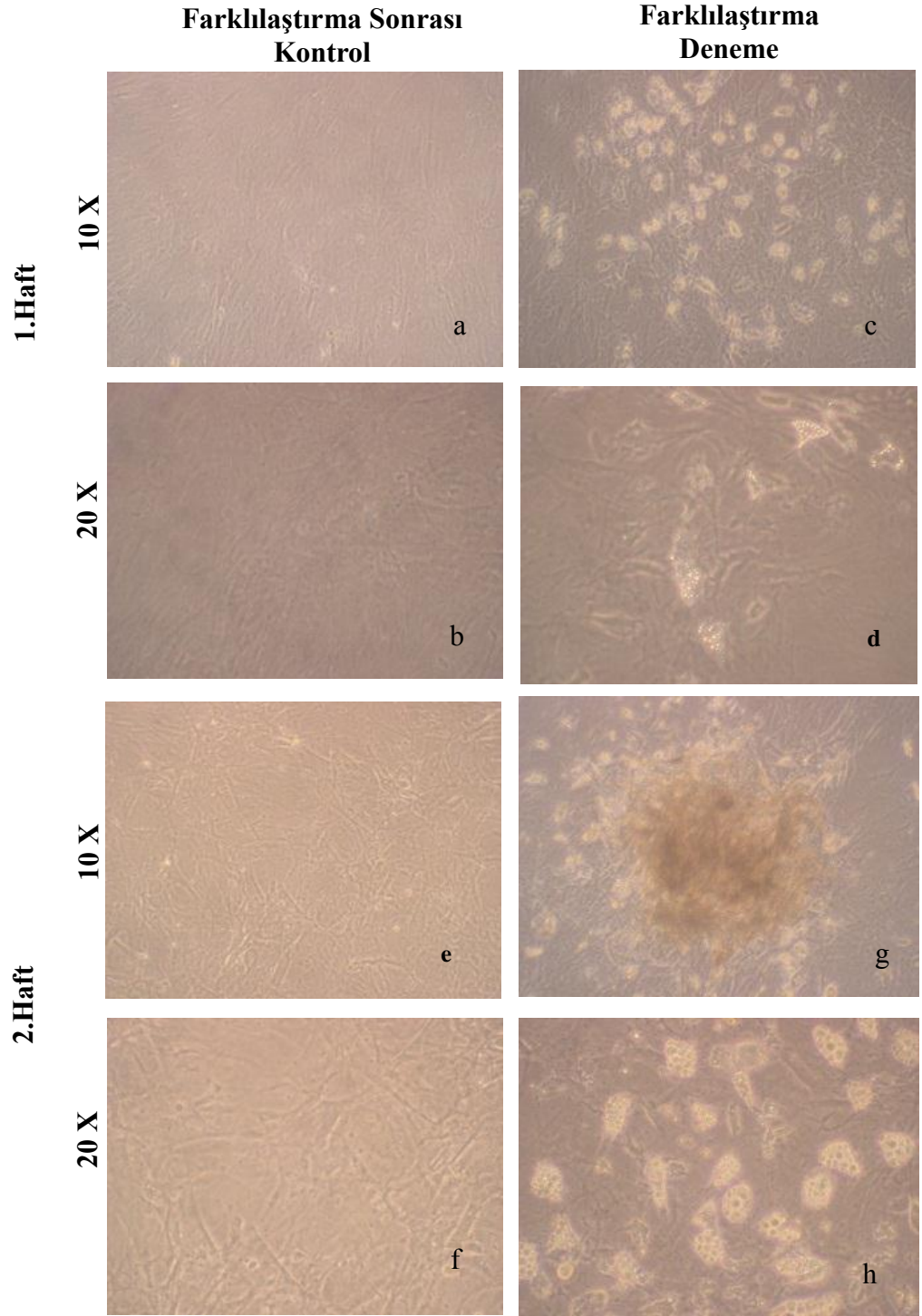
4.4 Mezenkimal Kök Hücrelerin Farklılaşma Potansiyellerinin İncelenmesi

4.4.1 Osteojenik farklılaştırma

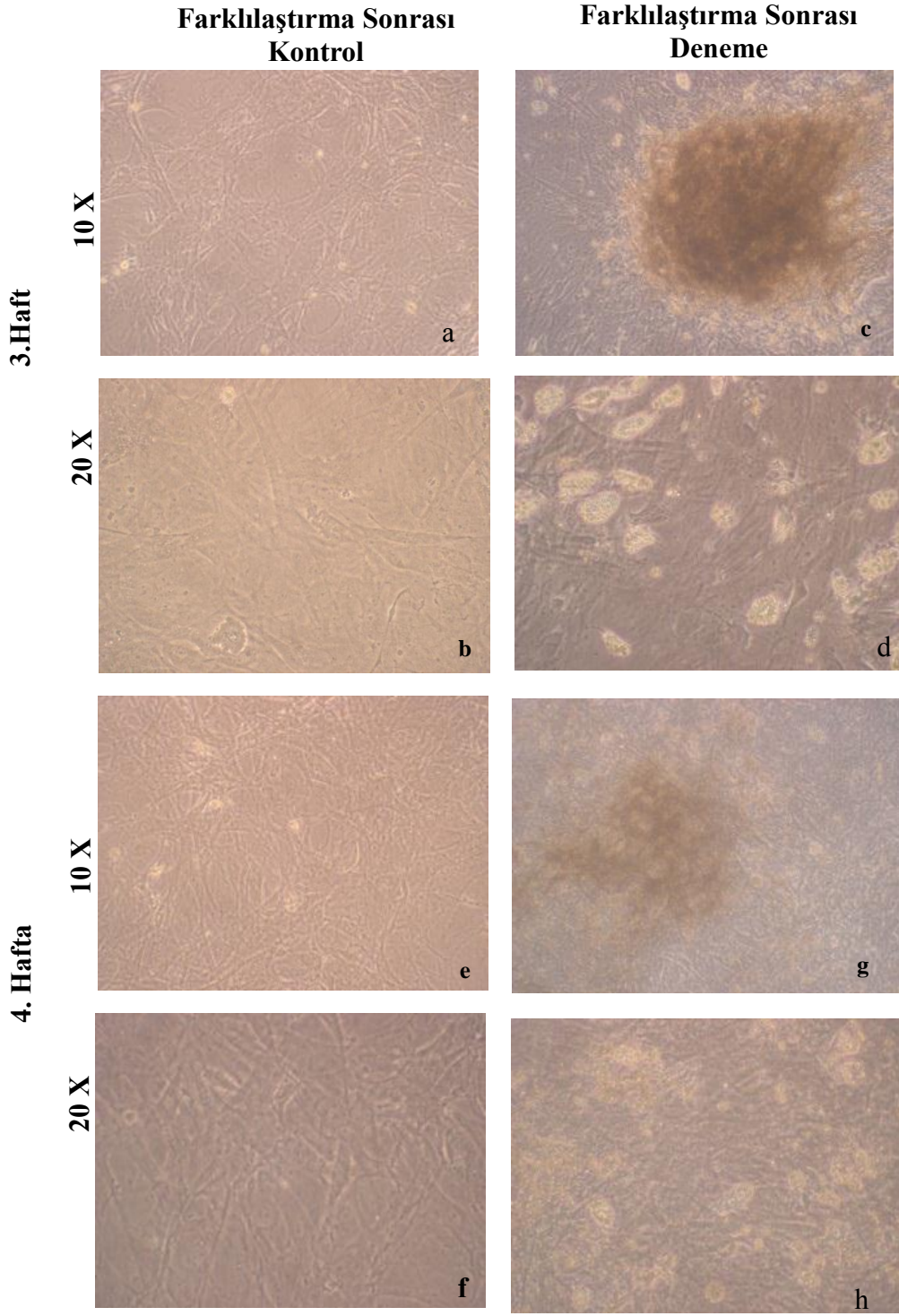
4 haftalık osteojenik farklılaştırma ortamına maruz bırakılan Kİ-MKH kültürü düzenli olarak mikroskop altında takip edildi. Yapılan incelemeler sonucunda, osteojenik besi ortamına maruz kalan Kİ-MKH'lerin bir hafta sonunda morfolojilerinin değişmeye ve hücrelerin içerisinde minerilizasyon ile bağlantılı depozitlerin görülmeye başladığı tespit edildi. İlerleyen haftalarda da oluşan depozitlerin yoğunlaştığı görüldü (Şekil 4.7, 4.8 ve 4.9).



Şekil 4. 7 Osteojenik farklılaştırma öncesinde P/2 Kİ-MKH ters faz ışık mikroskobu görüntüleri.
a) 4X, b) 10X.

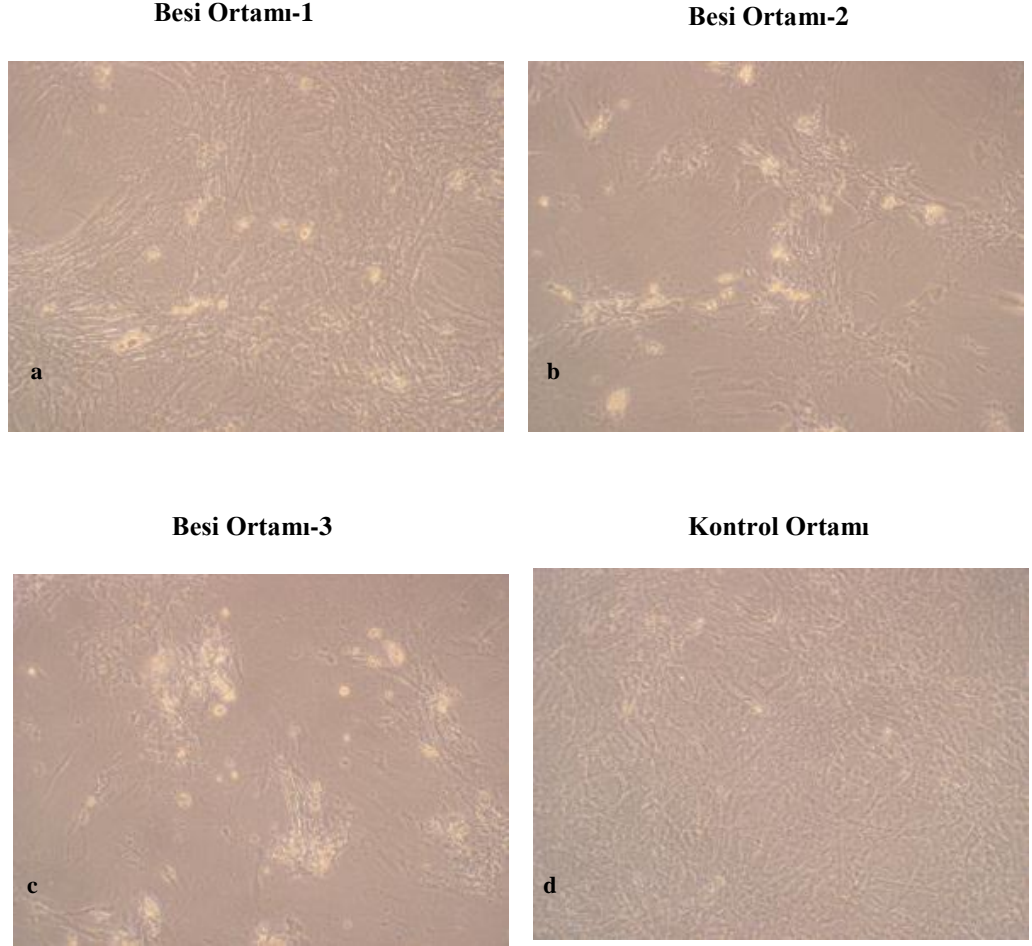


Şekil 4. 8 Osteojenik farklılaştırma ortamındaki P/2 KI-MKH' lerin 1. ve 2. hafta ters faz ışık mikroskobu görüntüleri.

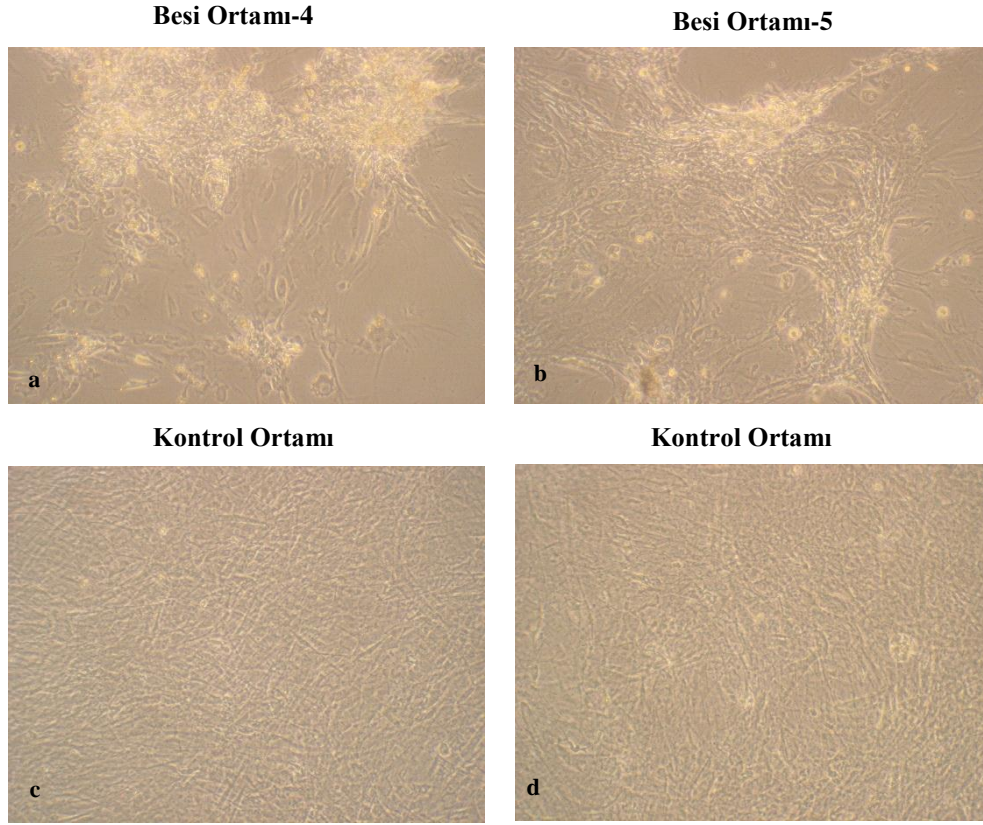


Şekil 4. 9 Osteojenik farklılaştırma ortamındaki P/2 Kİ-MKH' lerin 3. ve 4. hafta ters faz ışık mikroskobu görüntüleri.

Farklı formülasyonlara sahip osteojenik farklılaştırma ortamlarına maruz bırakılan AdMKH'lerin 4 hafta sonunda kültürde yer yer farklı morfolojiler sergiledikleri ve az sayıda da olsa mineralizasyon depozitlerine benzer depozitler içerdikleri tespit edildi (Şekil 4.10 ve 4.11).



Şekil 4. 10 Farklı osteojenik farklılaştırma ortamlarındaki P/2 AdMKH' lere ait ters faz ışık mikroskop görüntüleri (10X).



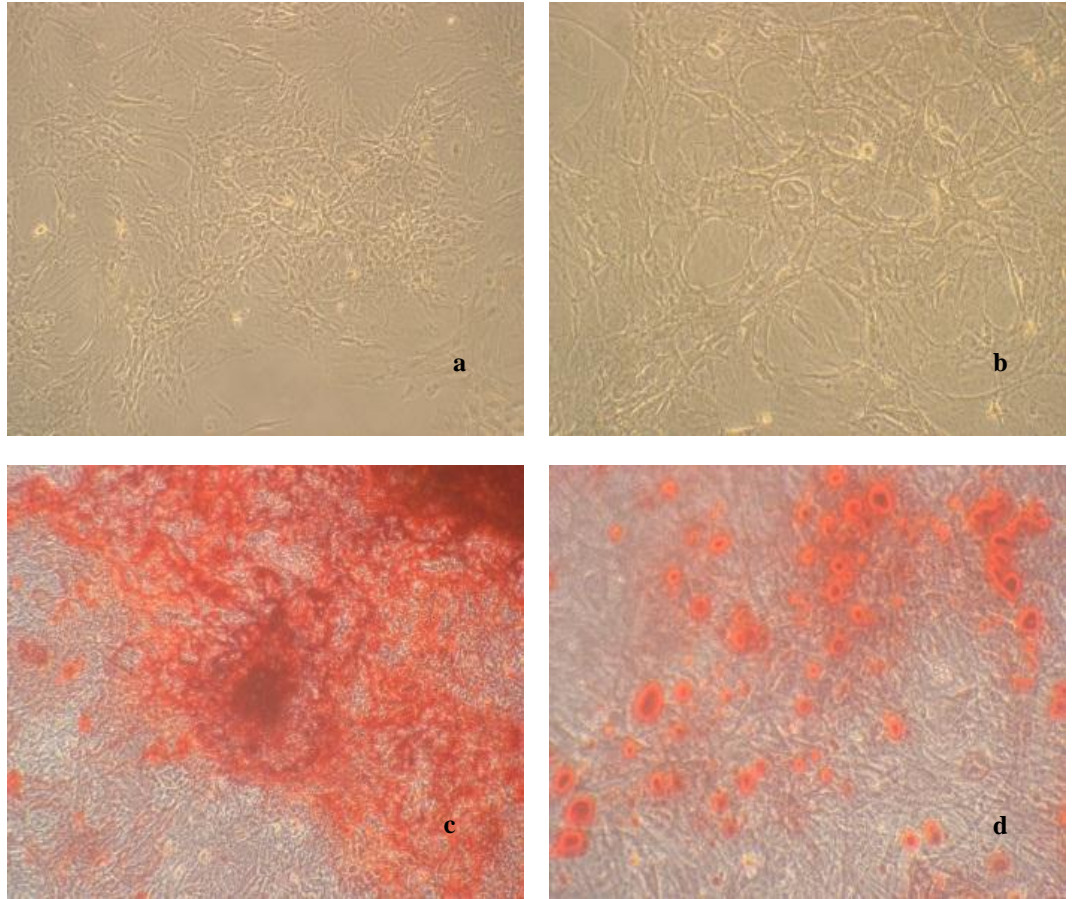
Şekil 4. 11 Farklı osteojenik farklılaştırma ortamlarındaki P/2 AdMKH' lere ait ters faz ışık mikroskop görüntüleri (10X).

4.4.1.1 Alizarin red S boyama

4 hafta sonunda AdMKH ve Kİ-MKH kültürleri minerilizasyon tespiti için Alizarin red S ve *Von Kossa* ile boyandı. Alizarin red S ile boyanan Kİ-MKH kültürü incelendiğinde kontrol grubunda her hangi bir boyamaya rastlanmazken, osteojenik ortam ile muamele edilen deney gruplarının Alizarin red ile kırmızı boyandığı görüldü (Şekil 4.12). Bu durum kontrol gruplarında her hangi bir minerilizasyonun olmadığını fakat deney gruplarında ise, kontrolün aksine, kalsiyum depozitlerinin bulunduğunu gösterdi (Şekil 4.13).

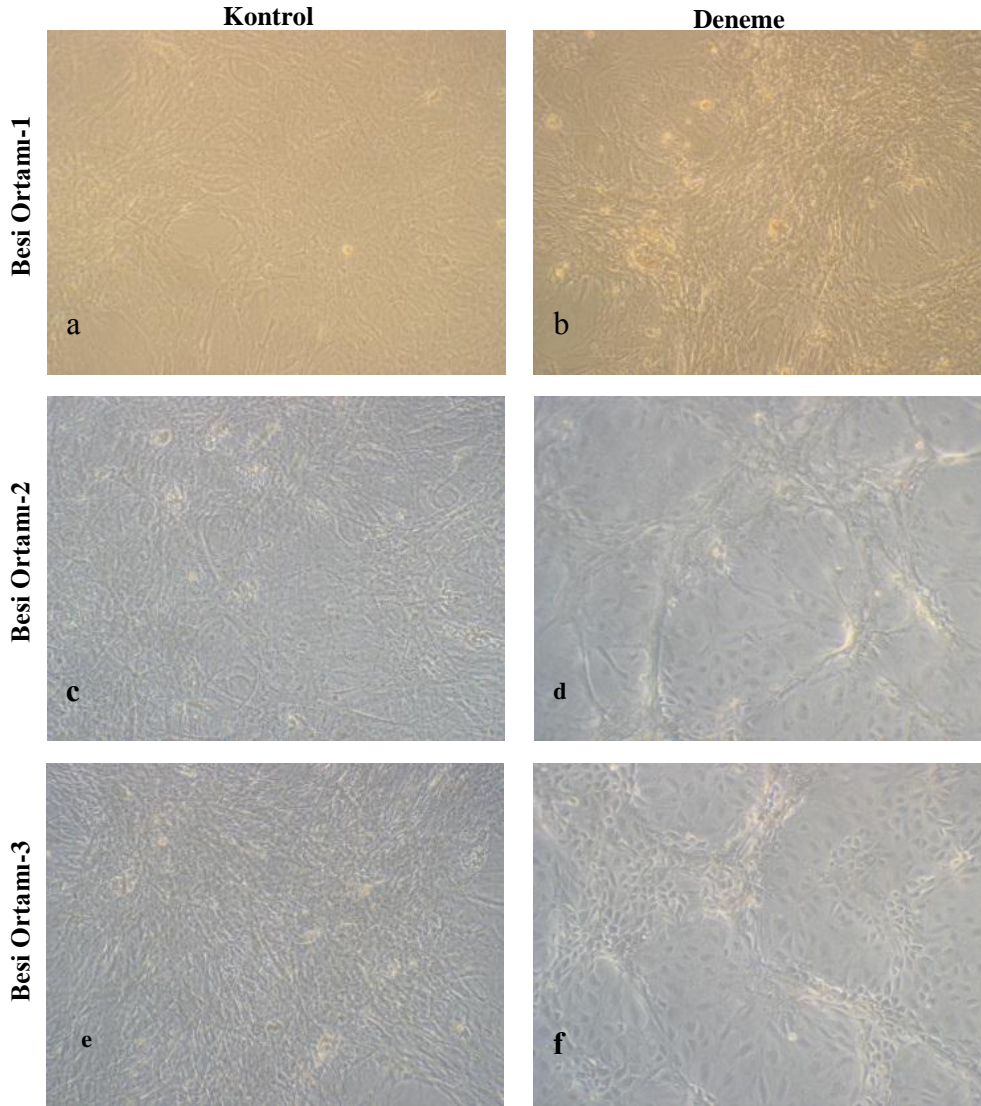


Şekil 4. 12 KI-MKH P/2 osteojenik farklılaşımının Alizarin Red Boyama ile tespiti.

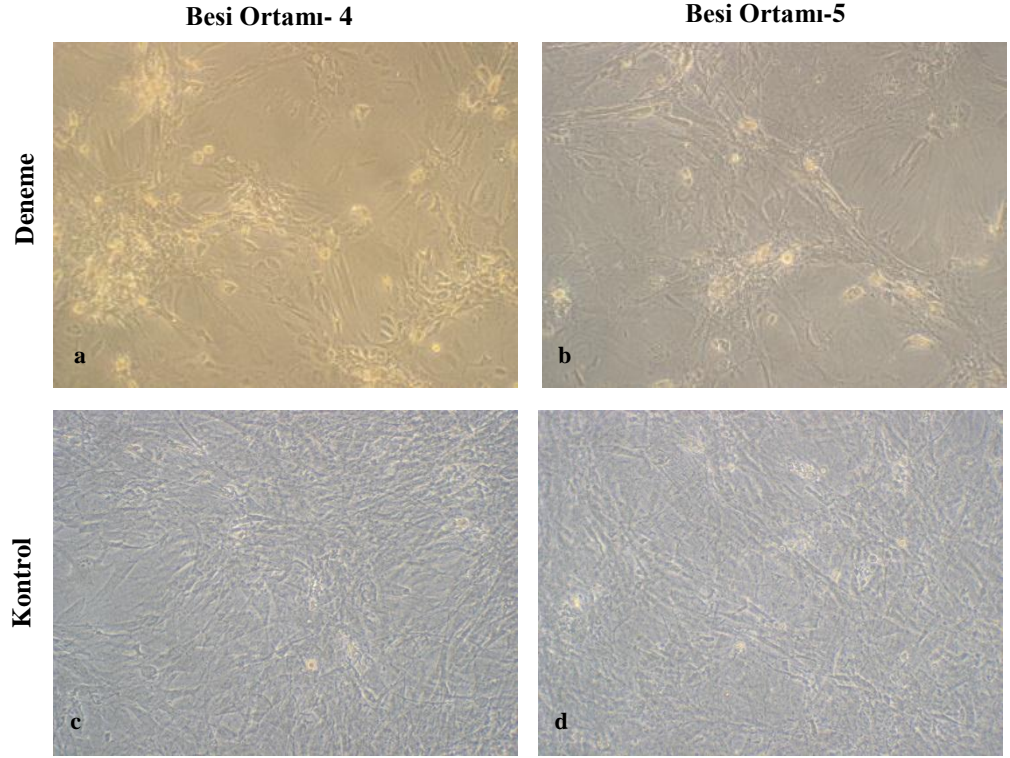


Şekil 4. 13 KI-MKH P/2 osteojenik farklılaşımına Alizarin Red boyama mikroskopik görüntüleri
a. Kontrol 4X b. Kontrol 10X c. Deneme 4X d. Deneme 10X.

Alizarin red ile boyanan AdMKH kültürü incelendiğinde hem kontrol gruplarında hem de beş farklı osteojenik ortam ile muamele edilen deney gruplarında hücre morfolojisinde değişiklikler olmasına rağmen her hangi bir boyamanın, dolayısıyla kalsiyum minerilizasyonunun olmadığı görüldü (Şekil 4.14 ve 4.15).



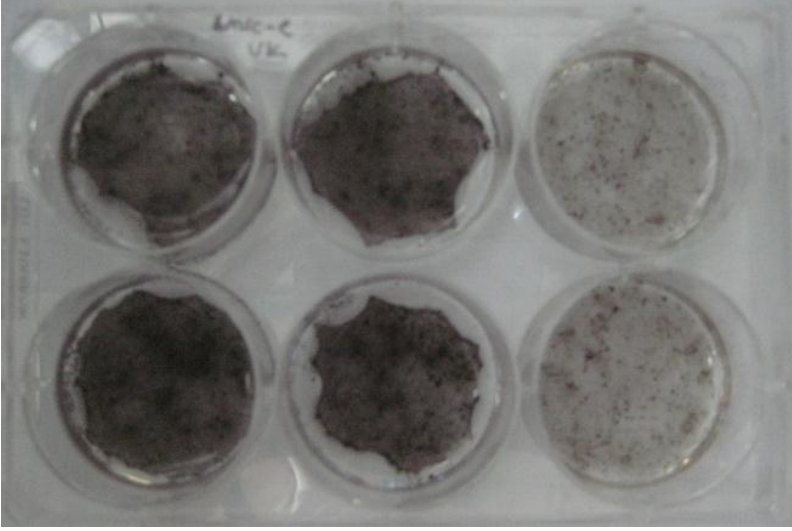
Şekil 4. 14 AdMKH P/2 osteojenik farklılaştırma Alizarin Red S boyama mikroskopik görüntüleri (10X).



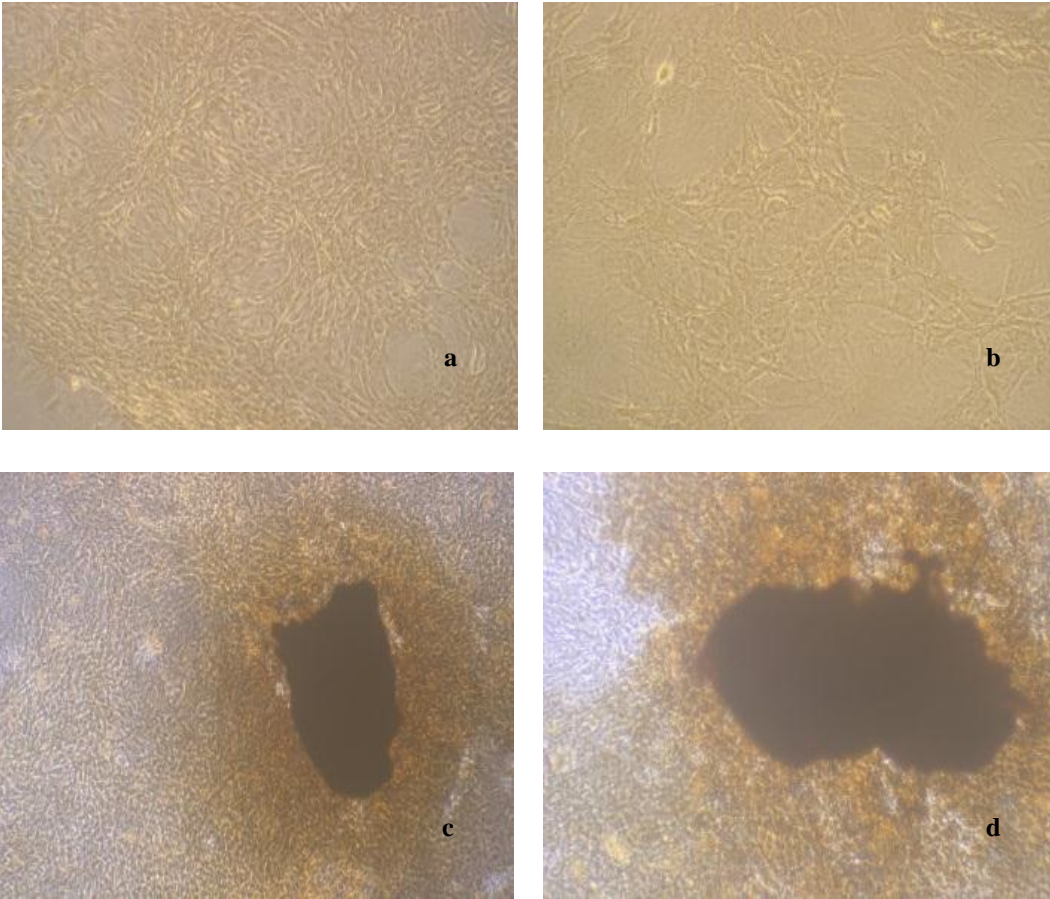
Şekil 4. 15 AdMKH P/2 osteojenik farklılaştırma Alizarin Red boyama mikroskopik görüntüleri (10X).

4.4.1.2 Von kossa boyama

Kalsiyum- fosfat depozitlerini boyayan *Von Kossa* ile yapılan boyama sonucunda Kİ-MKH' lerin deney grupları siyaha boyanırken, kontrol gruplarında bir boyanma görülmedi (Şekil 4.16 ve 4.17).

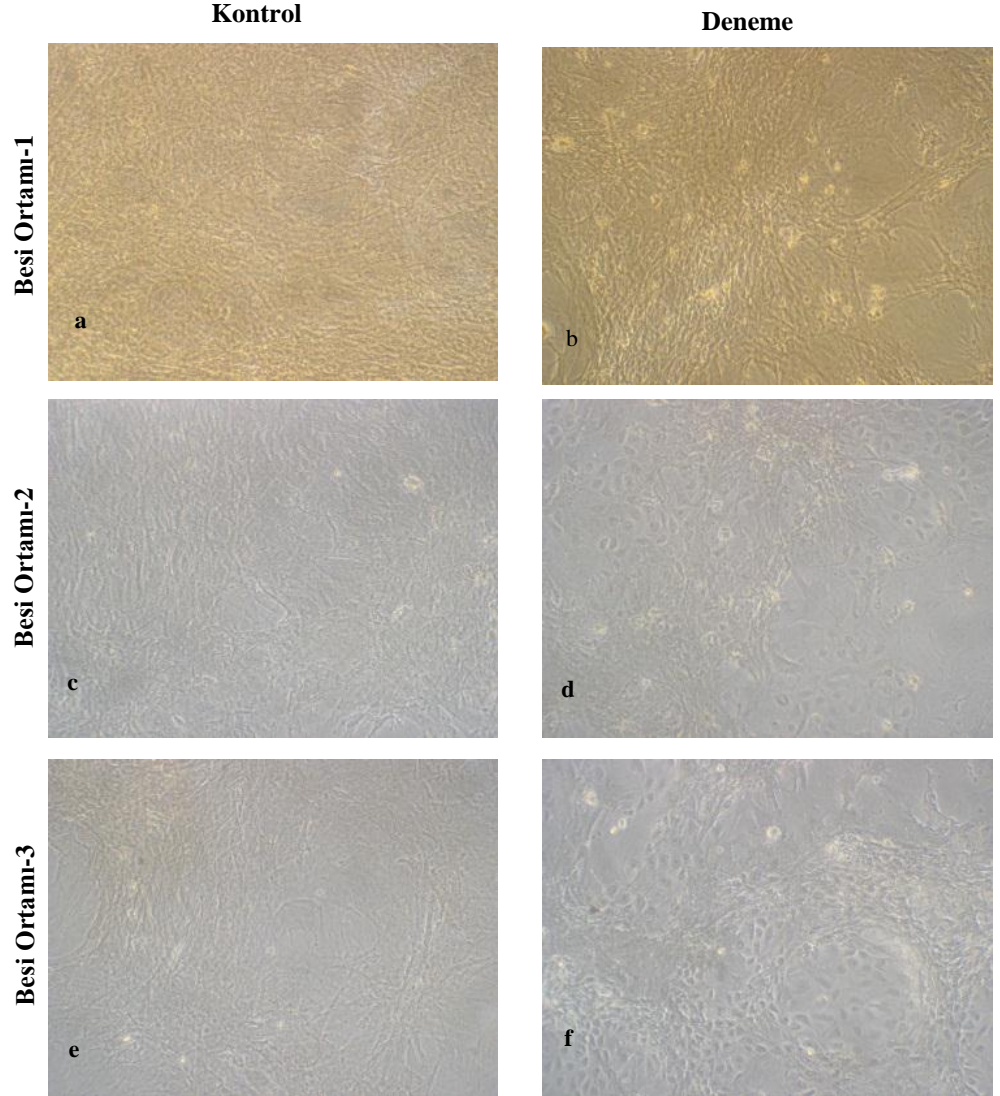


Şekil 4. 16 KI-MKH P/2 osteojenik farklılaştırmanın *Von Kossa* boyama ile tespiti.

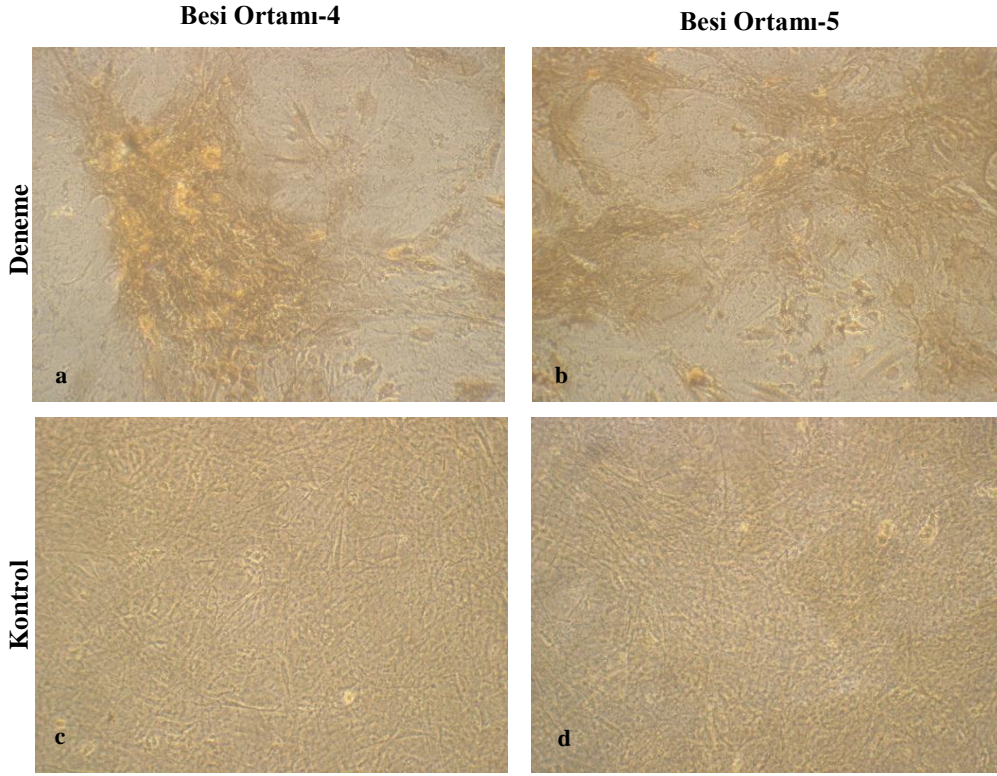


Şekil 4. 17 KI-MKH P/2 osteojenik farklılaştırma *Von Kossa* Boyama mikroskopik görüntüleri
a. Kontrol 4X **b.** Kontrol 10X **c.** Deneme 4X **d.** Deneme 10X.

AdMKH' leri Von Kossa boyaması sonunda hem kontrol hem de deney gruplarında her hangi bir kalsiyum- fosfat depozitine rastlanmadı (Şekil 4.18 ve 4.19).



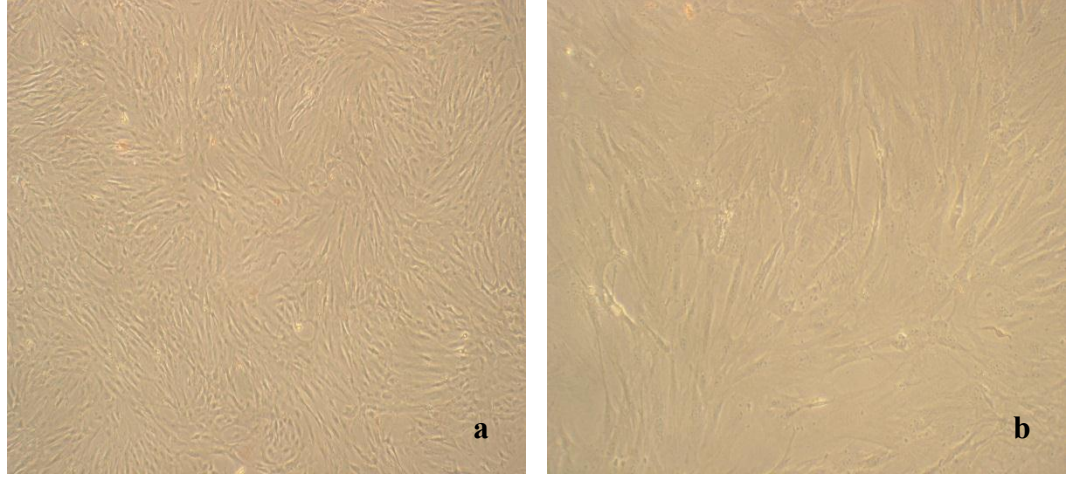
Şekil 4. 18 AdMKH P/2 osteojenik farklılaştırma *Von Kossa* Boyama mikroskopik görüntüleri (10X).



Şekil 4. 19 AdMKH P/2 osteojenik farklılaştırma *Von Kossa* Boyama mikroskopik görüntüleri (10X).

4.5 Oil Red O Boyama

Oil red O, yağda çözünebilen bir boyadır. Bu nedenle AdMKH kültüründe adiposit kontaminasyonu olmadığını göstermek amacı ile kullanıldı. Boyama sonucunda kültürde herhangi bir boyanmaya rastlanmadı (Şekil 4.20). Bu da kültürün adiposit hücreleri ile kontamine olmadığını ve ilerleyen pasaj sayısına rağmen hücrelerin adipoz hücrelere farklılaşmadığını gösterdi.

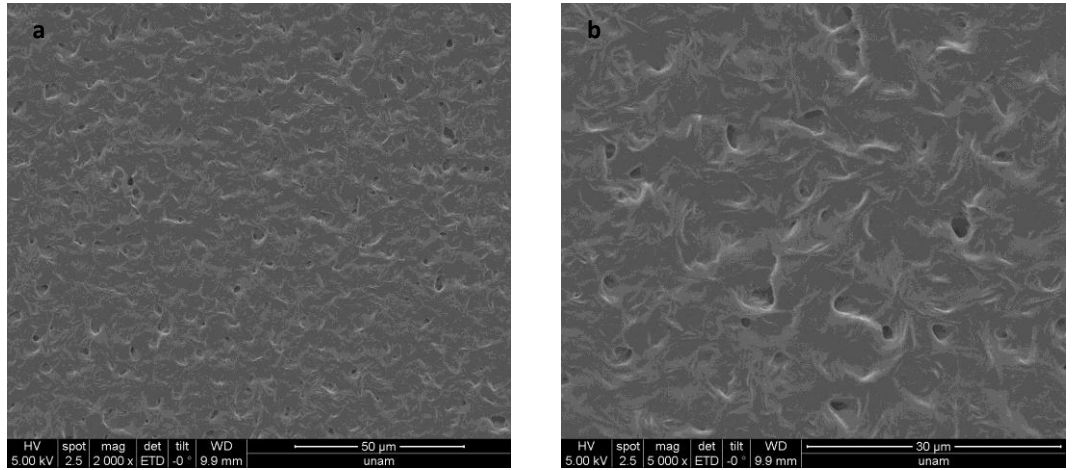


Şekil 4. 20 AdMKH P2 Oil Red O boyamasına ait mikroskopik görüntüler a) 4X b) 10X.

4.6 Polikaprolakton Yüzeylerin Hazırlanması ve Karakterizasyonu

4.6.1 PCL-M Üretimi

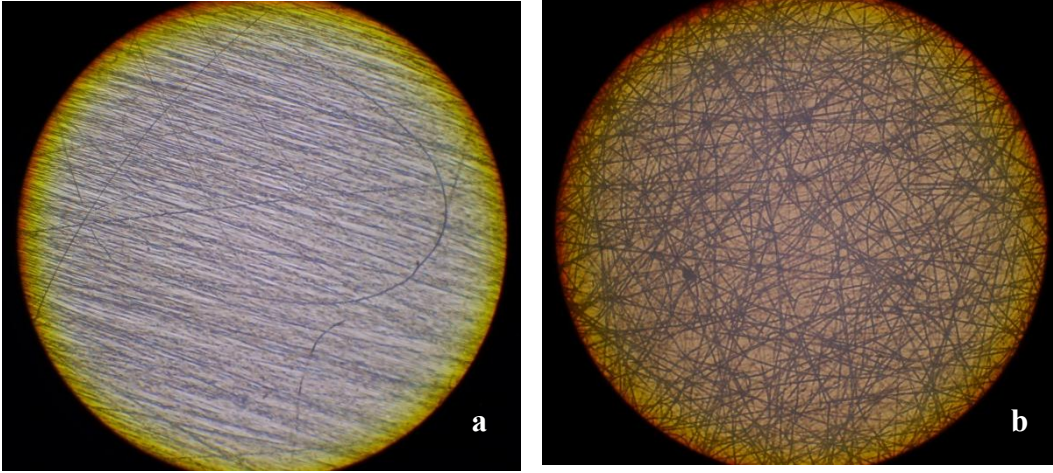
Kültürde kullanım kolaylığı nedeniyle PCL nanofiberleri toplamak için PCL-M' lar üretildi (Şekil 4.21).



Şekil 4. 21 PCL membranların SEM görüntüleri (Zeiss-Evo 50).

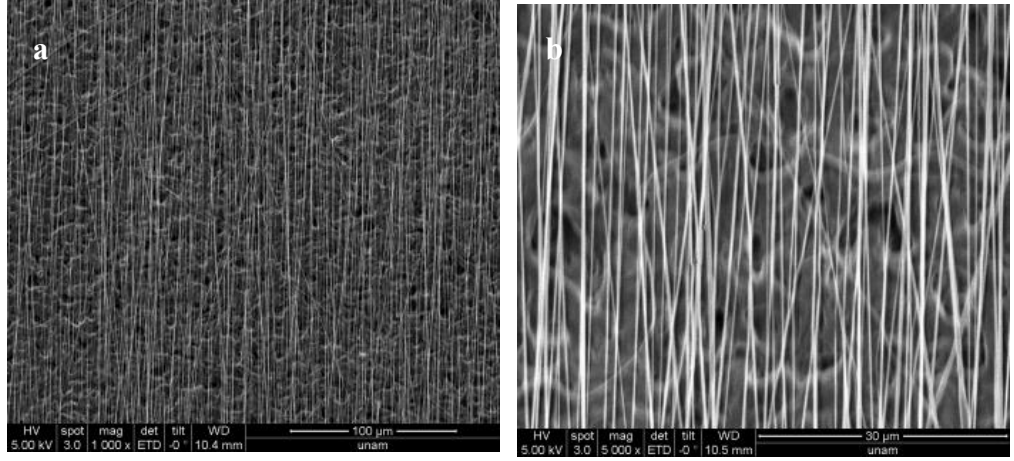
4.6.2 PCL-A ve PCL-R Nanofiberlerin Hazırlanması

PCL-A ve PCL-R nanofiberler membranlar üzerine toplanmadan önce boncuk içermeyen, nispeten homojen fiber dağılımına ve uygun fiber yoğunluğuna sahip elektroğirme koşullarının belirlenebilmesi için cam lameller üzerine toplandı ve ışık mikroskobu ile incelendi (Şekil 4.22).

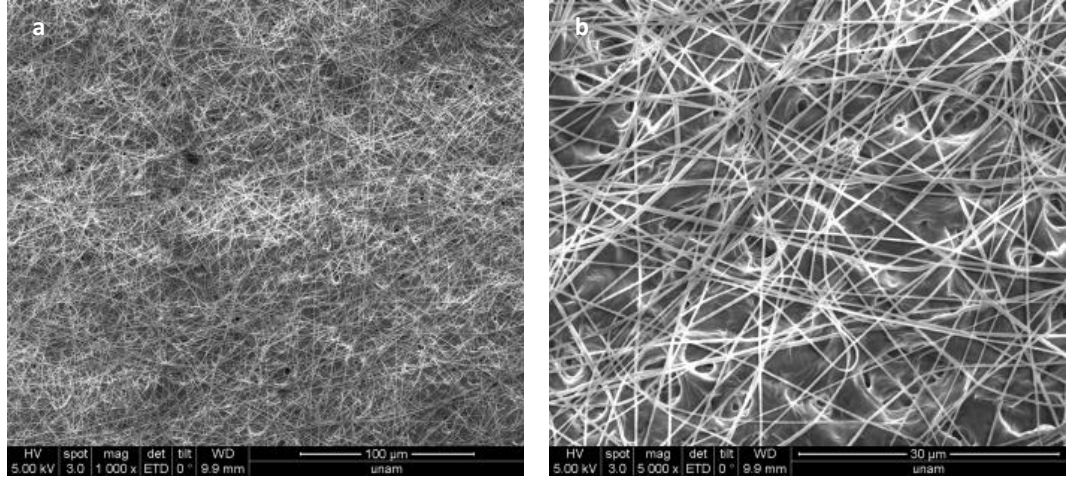


Şekil 4. 22 PCL-A (a) ve PCL-R (b) nanofiberlerinin ters faz mikroskop görüntüleri (40X) (Olympus IX71, Japan).

Işık mikroskobu ile yapılan ön incelemenin ardından nanofiberler membranlar üzerine toplandı. Hazırlanan PCL-A ve PCL-R nanofibröz yüzeyler SEM ile incelendi. SEM görüntüleri incelendiğinde, görüntülerin ışık mikroskobundaki görüntüler ile paralellik gösterdiği saptandı. Optimize edilen koşullar altında üretilen nanofibröz yüzeylerde herhangi bir boncuk oluşumuna rastlanmadı. Fiberlerin yeterince homojen dağıldığı ve her bir fiberin de neredeyse birbirine eş çaplarda olduğu görüldü (Şekil 4.23 ve 4.24). Ayrıca düzgün dizili fiberlerin de uygun şekilde yönlendiği tespit edildi (Şekil 4.23).



Şekil 4. 23 PCL-A nanofiberlerin SEM görüntüleri (Zeiss-Evo 50).



Şekil 4. 24 PCL-R nanofiberlerin SEM görüntüleri (Zeiss-Evo 50).

Tablo 4. 5 Nanofiber çapları

Nanofiberler	Ortalama çap (nm)
PCL-A	368 ± 130
PCL-R	316 ± 106

4.6.3 Statik Temas Açısı Ölçümü ile Yüzeylerin Karakterizasyonu

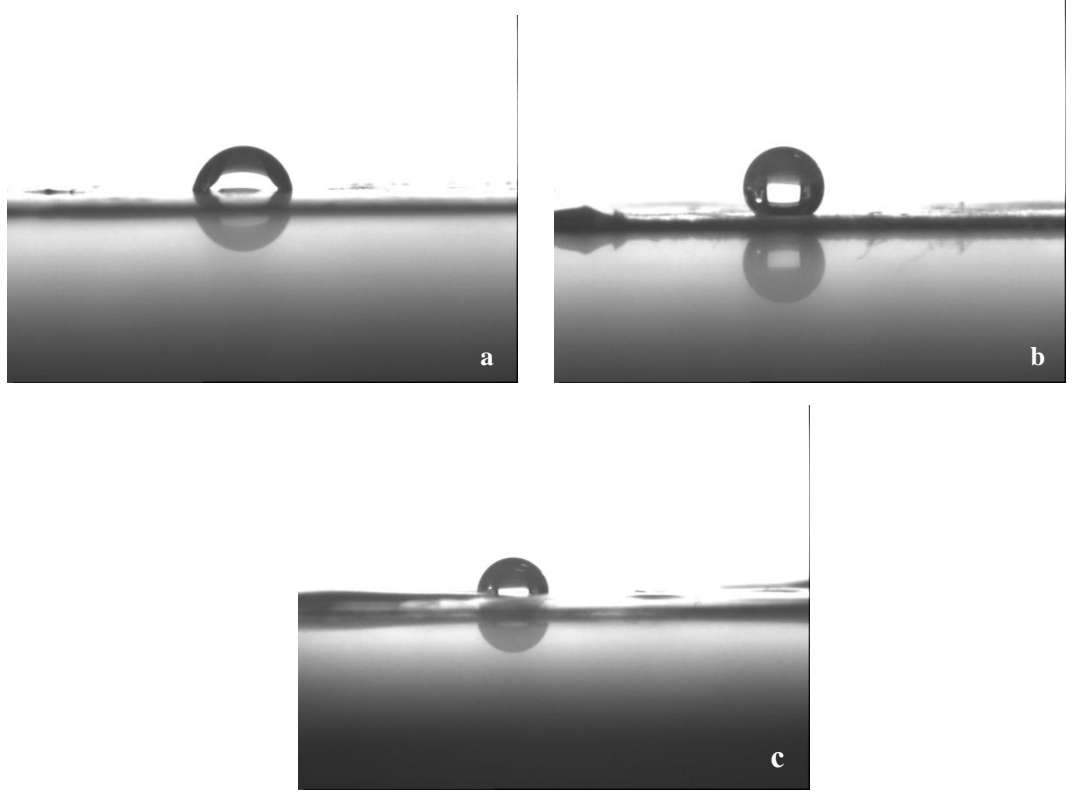
Üretilen her üç yüzeyin statik temas açıları *Sessile drop* yöntemi ile ölçüldü. Ölçümler sonucunda PCL-M yüzeylerin temas açısı ortalama 95,8° bulunurken, PCL-A yüzeyleri 107,4°, PCL-R yüzeylerin ise 132,6° olarak bulundu (Şekil 4.25

ve Tablo 4.6). 70° ve üzeri açı değeri veren örneklerin hidrofobik olarak kabul edildiği göz önünde bulundurulduğunda tüm yüzeylerin oldukça hidrofobik olduğu görüldü. Ancak hidrofobisite sıralaması yapıldığında $PCL-M < PCL-A < PCL-R$ şeklinde bir sonuca ulaşıldı.

Tüm ölçümler 30. saniyede yapılmıştır.

Tablo 4. 6 Statik temas açısı ölçüm değerleri

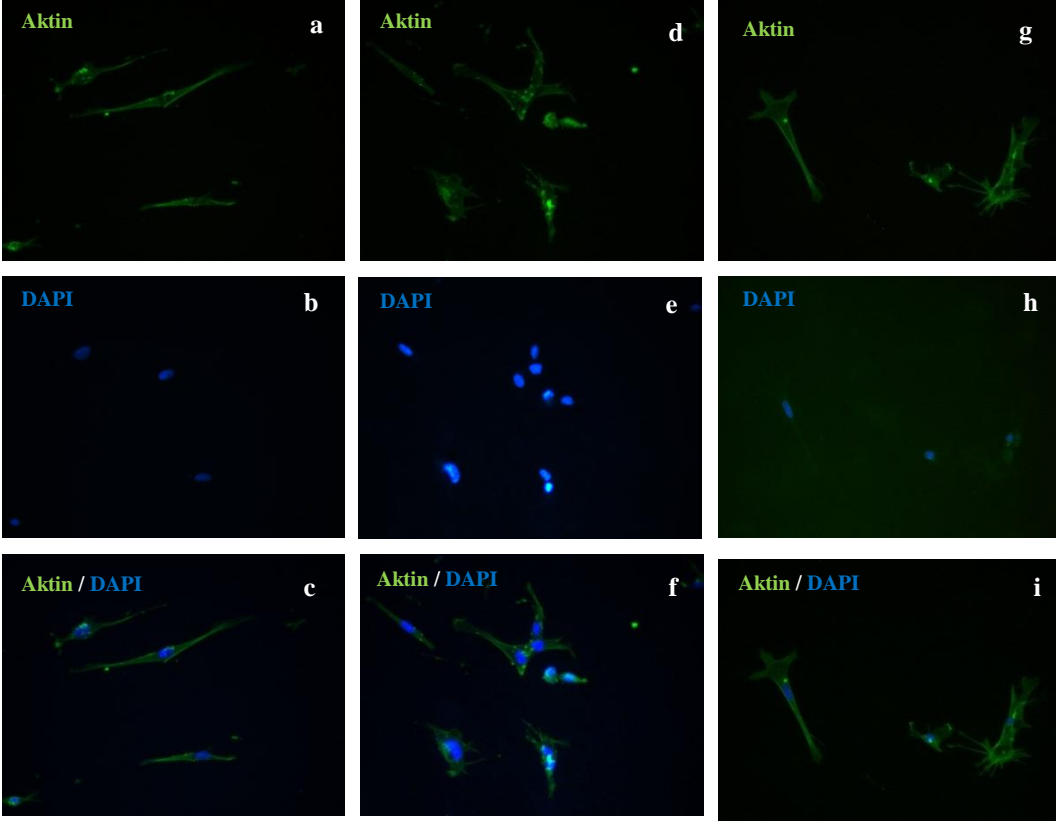
Ölçüm sayısı	Aligned	Random	Membran
1	$114,8^\circ$	$134,7^\circ$	$97,2^\circ$
2	$114,1^\circ$	$130,0^\circ$	$88,7^\circ$
3	$116,3^\circ$	$135,7^\circ$	$99,6^\circ$
4	$123,1^\circ$	$134,1^\circ$	98°
5	$111,1^\circ$	$130,9^\circ$	$94,2^\circ$
6	$92,20^\circ$	$130,3^\circ$	$97,2^\circ$
7	$86,80^\circ$	-	$95,8^\circ$
8	$100,90^\circ$	-	-
Ortalama	$107,4^\circ$	$132,6^\circ$	$95,8^\circ$



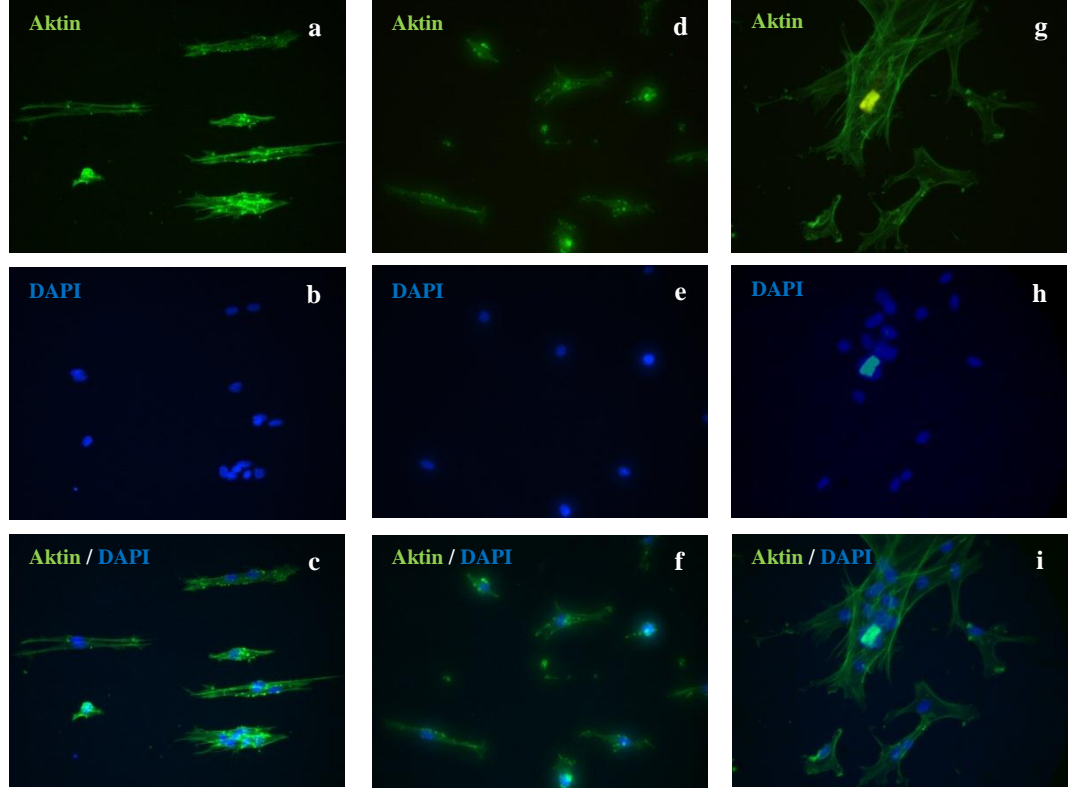
Şekil 4. 25 PCL yüzeylere ait temas açısı ölçüm görüntüleri a) PCL-A b) PCL-R ve c) PCL-M.

4.7 Nanofibröz Yüzeyler Üzerindeki MKH' lerin İmmünohistokimyasal İşaretlemesi

Üretilen PCL yüzeyler ışığı geçirmediği için, bu yüzeyler üzerinde hücrelerin tutuma özelliklerini ve morfolojilerini ışık mikroskobu ile incelemek mümkün olmadı. Bu nedenle tüm hücrelerin hücre iskeletini oluşturan bir filament olan aktin filamentleri floresan boyama ile incelendi. Yapılan floresan boyama sonucunda PCL-A yüzeyler üzerinde hücrelerin fiber yönlenmesini takip ederek, fiber yönünde uzadığı görüldü. PCL-R yüzeylerde ise hücrelerin takip edebileceği belirli bir yönde fiber olmadığı için hücrelerin belirli bir morfoloji sergilemediği tespit edildi. PCL-M yüzeyler üzerinde hücre morfolojisi incelendiğinde, hücrelerin genellikle bir yerden başka bir yere filapodlar uzatarak tutunduğu, polistren yüzeylerdeki gibi yüzeye tamamen tutunarak yayılmadığı görüldü (Şekil 4.26 ve 4.27). AdMKH' lerin ve Kİ-MKH' lerin yüzeyler üzerindeki morfolojileri karşılaştırıldığında Kİ-MKH' lerin AdMKH' lere göre yüzeylere daha fazla yayıldığı, AdMKH' lerin ise daha fibroblastik yapıda olduğu belirlendi.

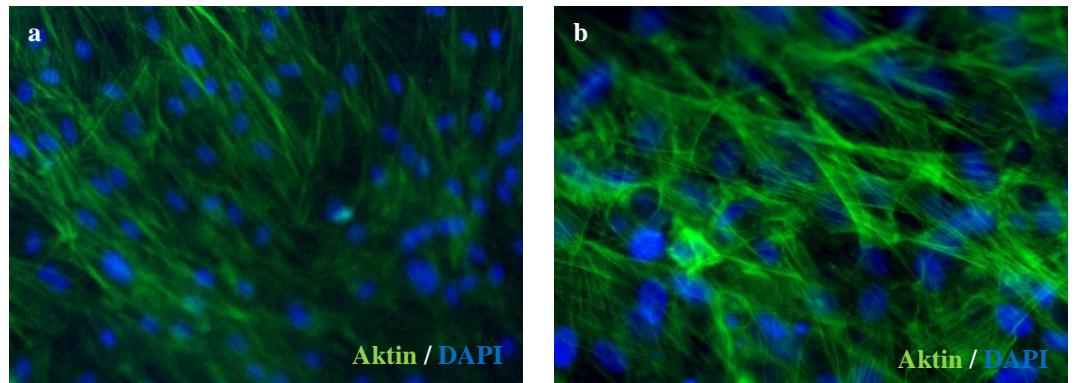


Şekil 4. 26 AdMKH' lerin kültürün ikinci gününde farklı yüzeyler üzerindeki floresan mikroskop görüntüleri a,b ve c) PCL-A, d,e ve f) PCL-R, g,h ve i) PCL-M 40X (Leica, Almanya).



Şekil 4. 27 Kİ-MKH' lerin kültürün ikinci gününde farklı yüzeyler üzerindeki floresan mikroskop görüntüleri a,b ve c) PCL-A, d,e ve f) PCL-R, g,h ve i) PCL-M 40X (Leica, Almanya).

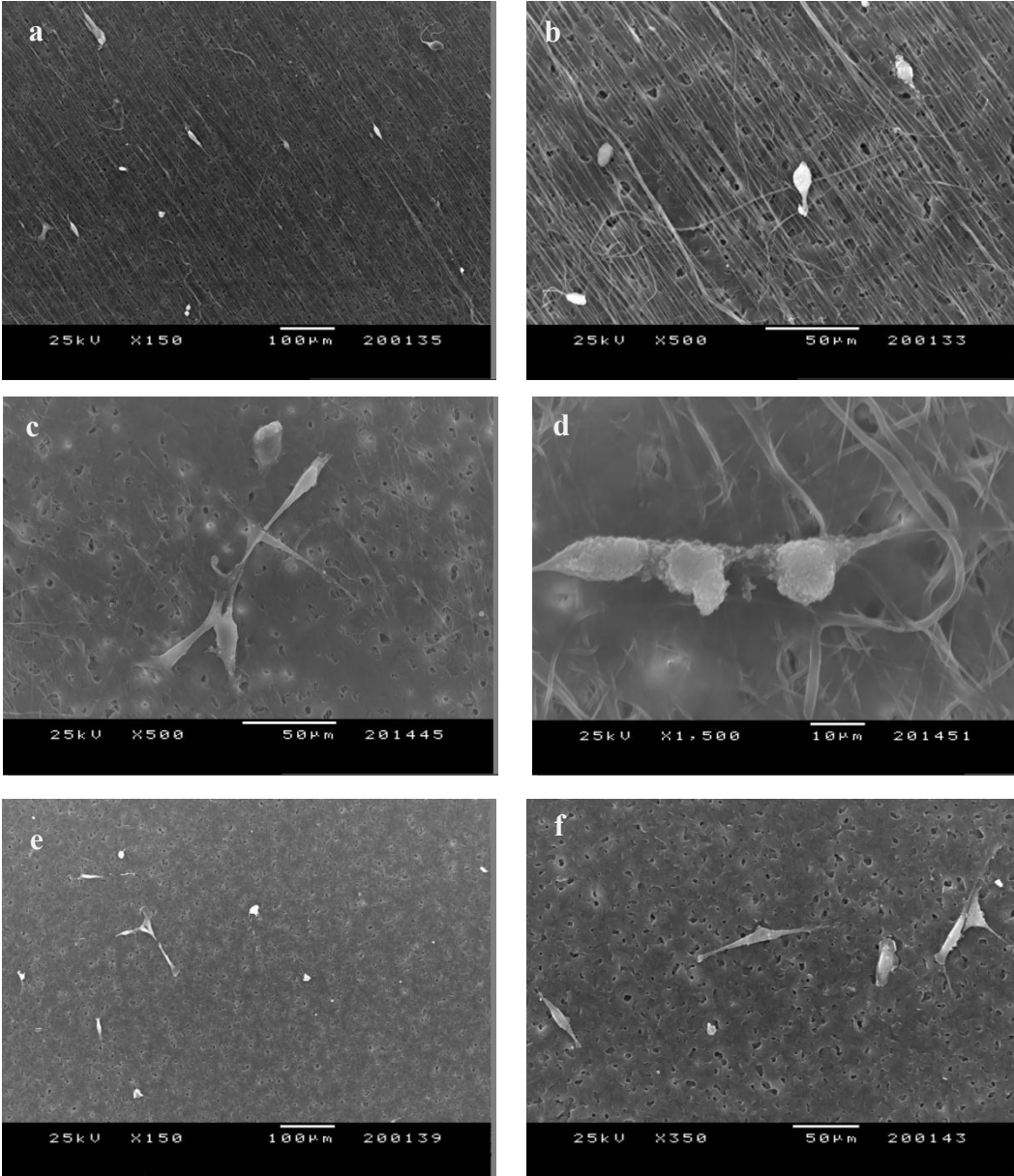
AdMKH' lerin ve Kİ-MKH' lerin kontrol olarak kullanılan polistren yüzeyler üzerindeki morfolojileri incelendiğinde hücrelerin sınırlarının ayırt edilemediği görüldü (Şekil 4.28).



Şekil 4. 28 MKH' lerin kültürün ikinci gününde polistren yüzeyler üzerindeki floresan mikroskop görüntüleri a) AdMKH 20X, b) Kİ-MKH 40X (Nikon Eclipse E600 epifloresan mikroskop, Japonya).

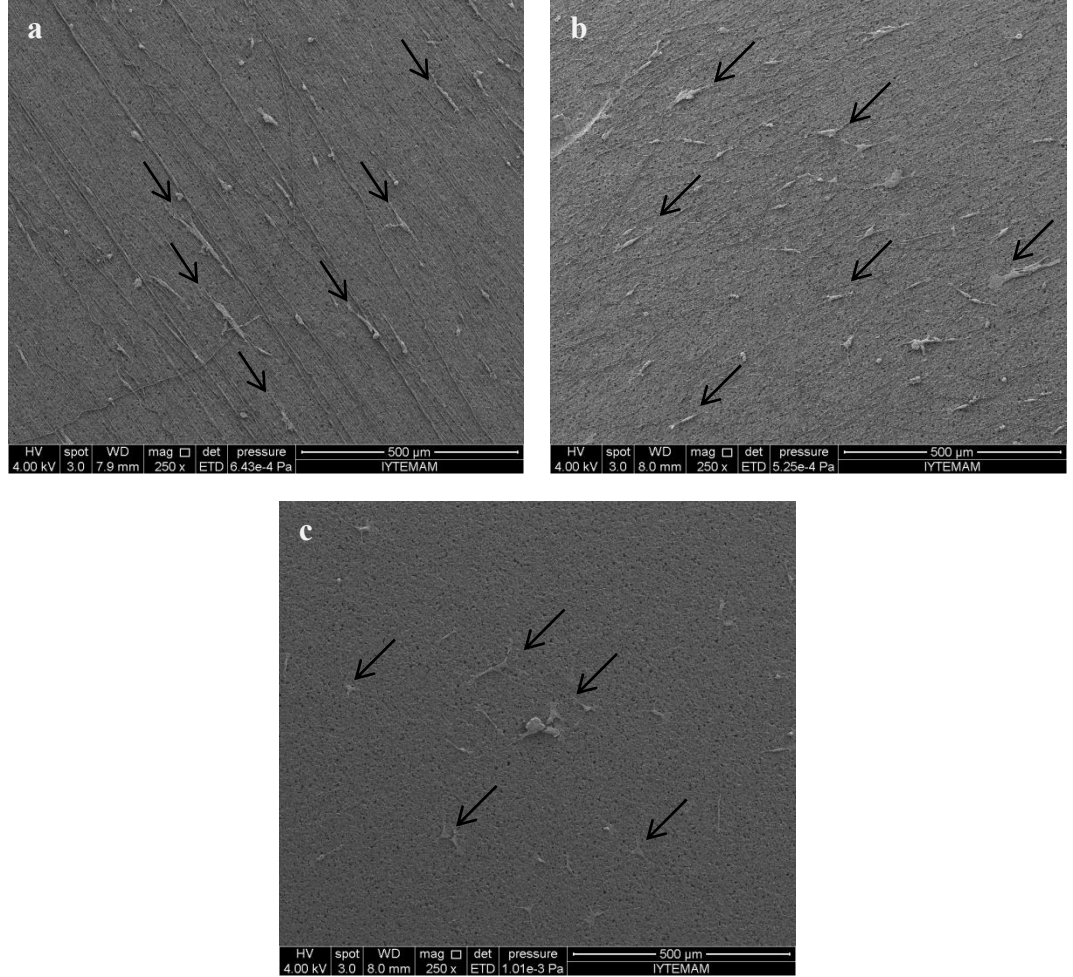
4.8 Hücreli Yüzeylerin Taramalı Elektron Mikroskopi (SEM) Çalışması

Hücrelerin yüzeyler üzerindeki tutunma özelliklerinin ve morfolojilerinin detaylı olarak incelenebilmesi için SEM yapıldı. Genel olarak hem AdMKH'lerin hem de KI-MKH'lerin PCL yüzeyler üzerindeki 24. saatlerinde yüzeye tutunduğu, ancak henüz tam olarak yayılmadıkları görüldü (Şekil 4.29 ve 4.32).



Şekil 4. 29 AdMKH'lerin kültürün birinci gününde farklı yüzeyler üzerindeki SEM görüntüleri a-b) PCL-A, c-d) PCL-R ve e-f) PCL-M.

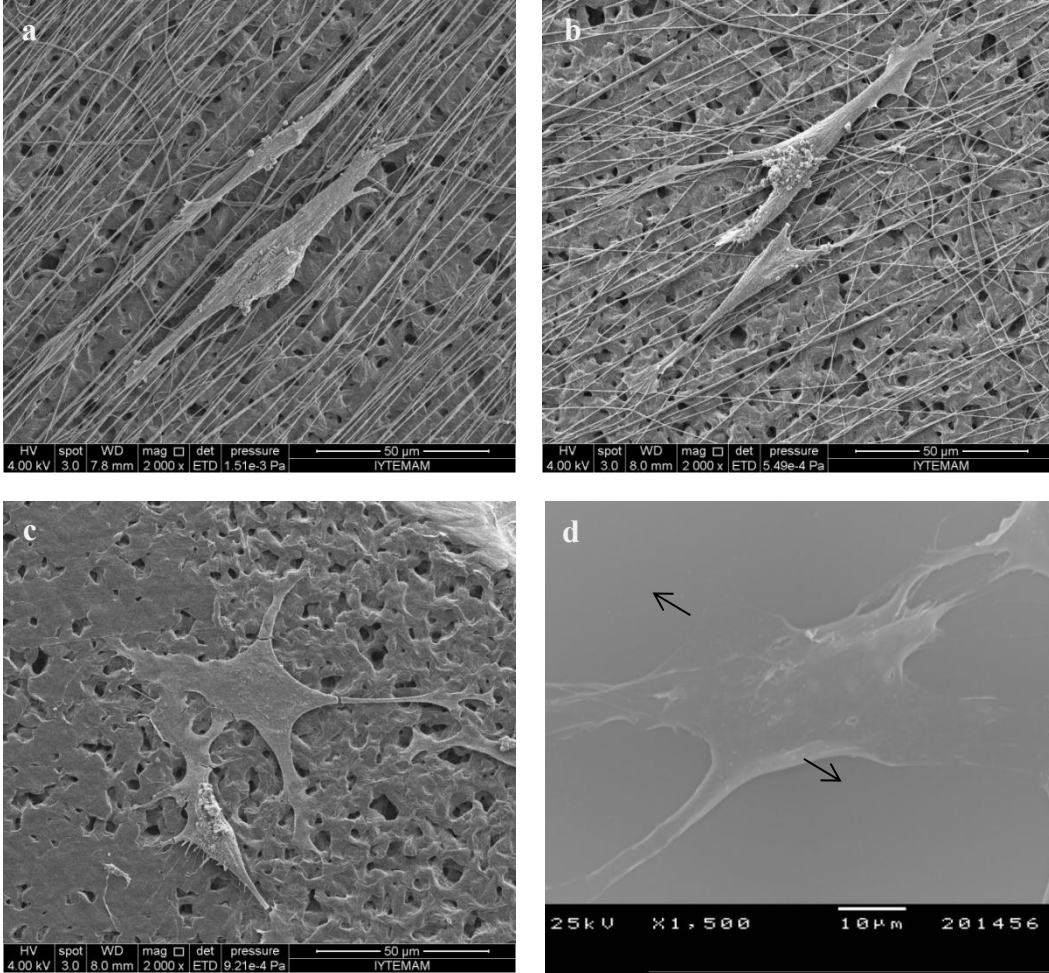
AdMKH'lerin ve KI-MKH'lerin PCL yüzeylerdeki 48.saatleri incelendiğinde hücrelerin büyük bir çoğunluğunun yüzeye yayıldığı belirlendi (Şekil 4.30 ve 4.33).



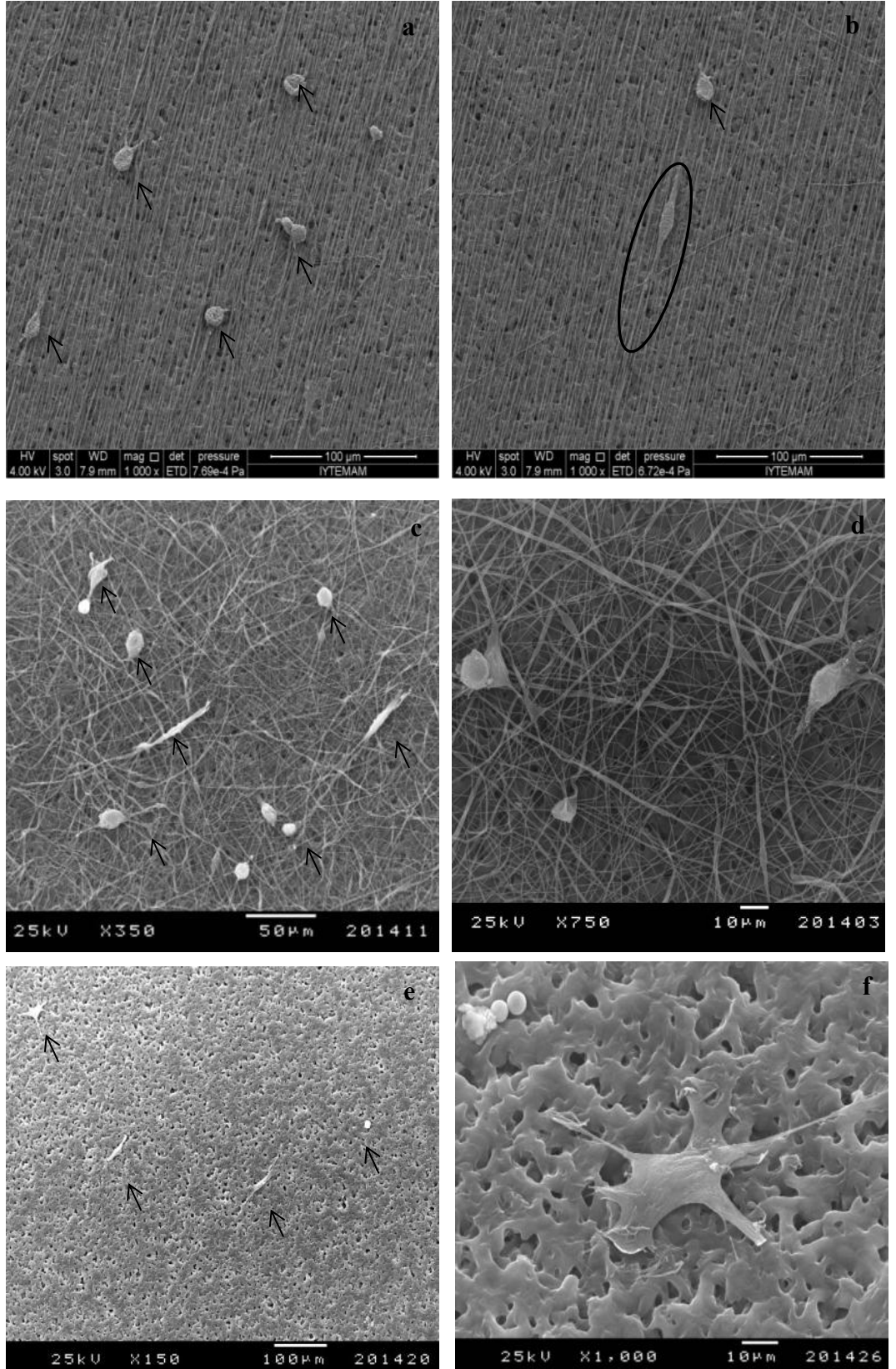
Şekil 4. 30 AdMKH'lerin kültürün ikinci gününde farklı yüzeyler üzerindeki genel görünümüne ait SEM görüntüleri a) PCL-A, b) PCL-R ve c) PCL-M. Ok işaretleri yüzeye tutunan hücreleri göstermektedir.

AdMKH'lerin PCL yüzeyler üzerindeki morfolojilerinin kontrol olarak kullanılan polistren yüzeyler üzerindeki morfolojilere göre oldukça farklı olduğu görüldü. Polistren yüzeyler üzerinde AdMKH'lerin tamamen yayılarak yüzeyi kaplama eğiliminde oldukları tespit edildi. Ayrıca hücreler arası sınırların belirgin olmadığı gözlemlendi. PCL-A yüzeyler üzerindeki AdMKH'lerin fiber yönlenmesini takip ettiği ve çoğu yerde fiberler yerine membrana tutunmayı tercih ettikleri gözlemlendi. PCL-R yüzeyler üzerinde ise AdMKH'ler belirli bir fiber dizilimi olmadığı için farklı yönlerden gelen fiberler üzerine tutunarak daha

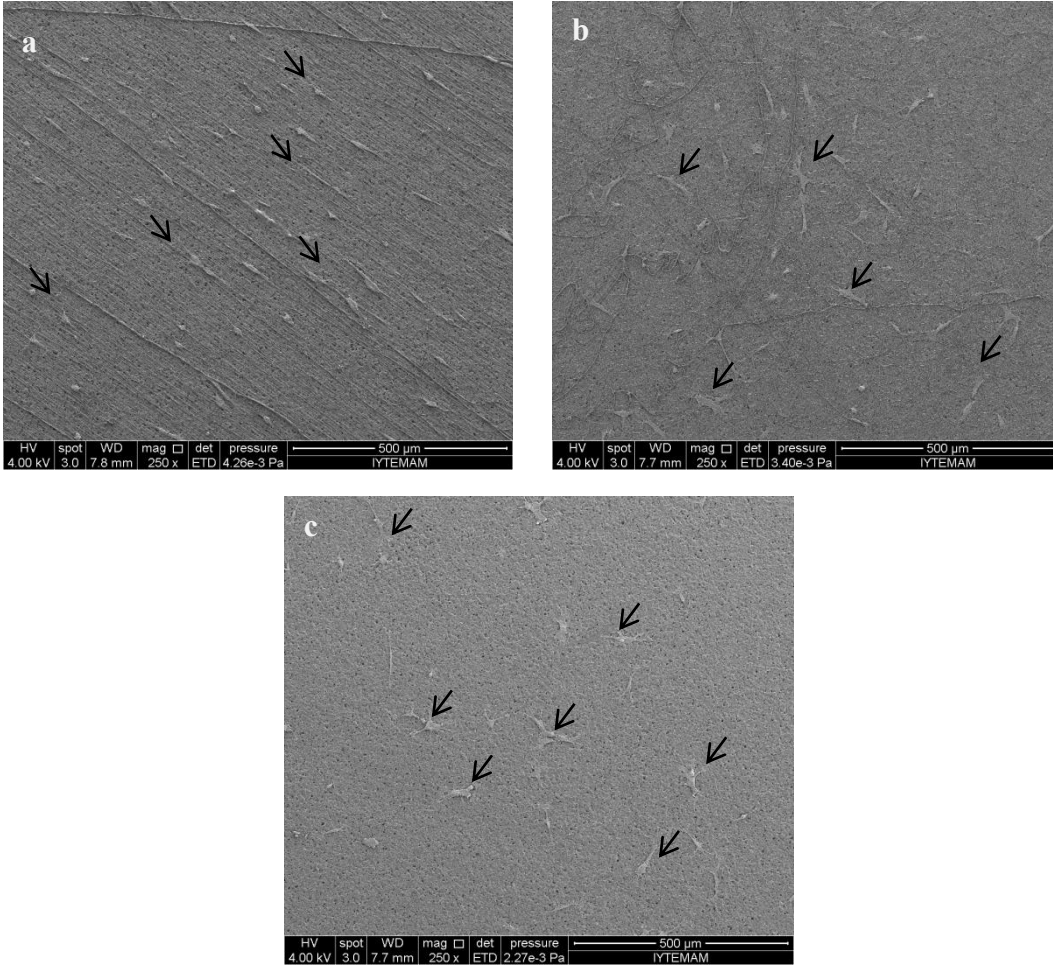
dağınık bir morfoloji sergiledikleri belirlendi. AdMKH' ler PCL-M yüzeyler üzerinde polistren yüzeylerdeki morfolojilerine benzer bir morfoloji sergiliyorlarmış gibi görünmelerine rağmen öyle olmadığı görüldü. PCL-M yüzeylerde hücrelerin tamamen bütün hücre yüzeyi ile tutunmadığı, farklı yönlere doğru lamelipodlar uzatarak tutundukları tespit edildi (Şekil 4. 31).



Şekil 4. 31 AdMKH' lerinin kültürün ikinci gününde farklı yüzeyler üzerindeki tutunmalarının ayrıntılı incelenmesi a) PCL-A, b) PCL-R, c) PCL-M ve d) polistren yüzey. Ok işaretleri hücrelerin bulunmadığı, boş polistren yüzeyleri göstermektedir.

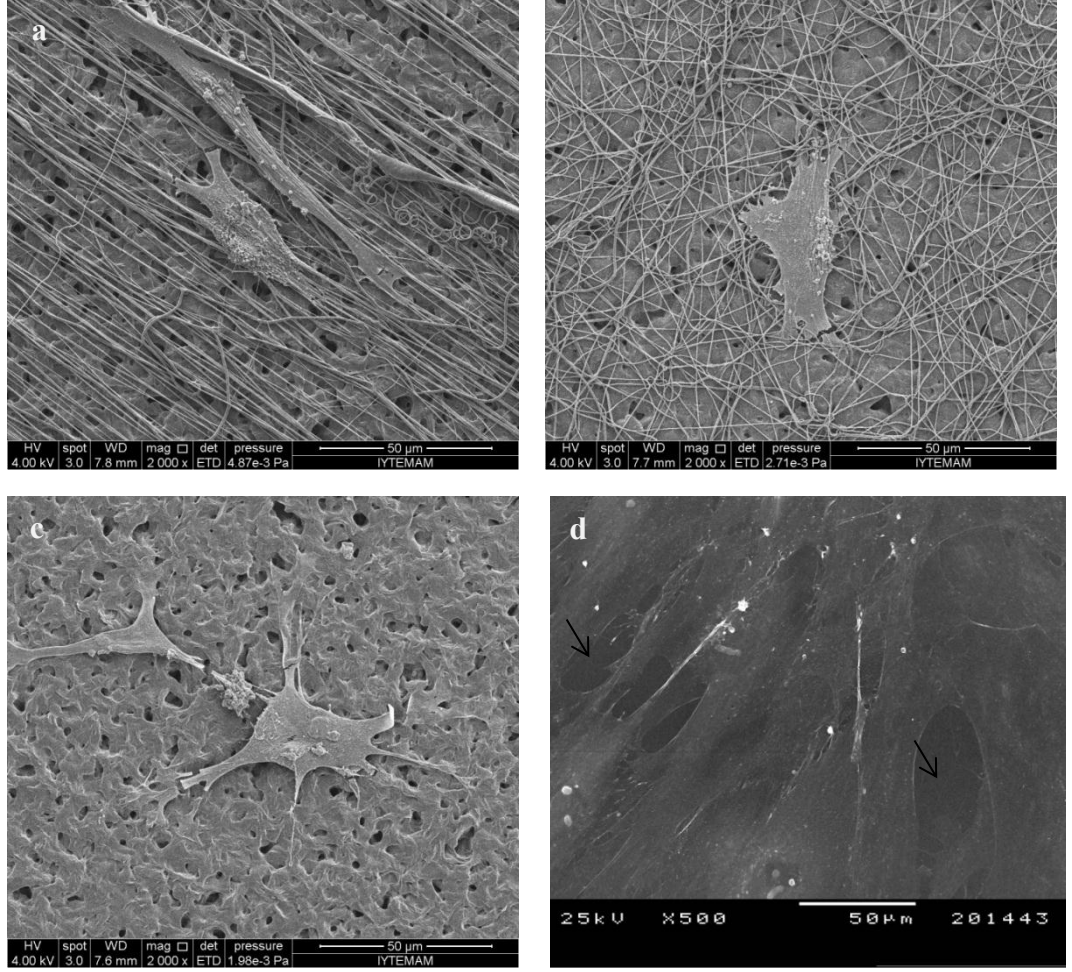


Şekil 4. 32 KI-MKH' lerin kültürün birinci gününde farklı yüzeyler üzerindeki SEM görüntüleri a-b) PCL-A, c-d) PCL-R ve e-f) PCL-M. Ok işaretleri yüzeye tutunan hücreleri göstermektedir.



Şekil 4. 33 Kİ-MKH' lerin kültürün ikinci gününde farklı yüzeyler üzerindeki genel görünümlerine ait SEM görüntüleri a) PCL-A, b) PCL-R ve c) PCL-M. Ok işaretleri yüzeye tutunan hücreleri göstermektedir.

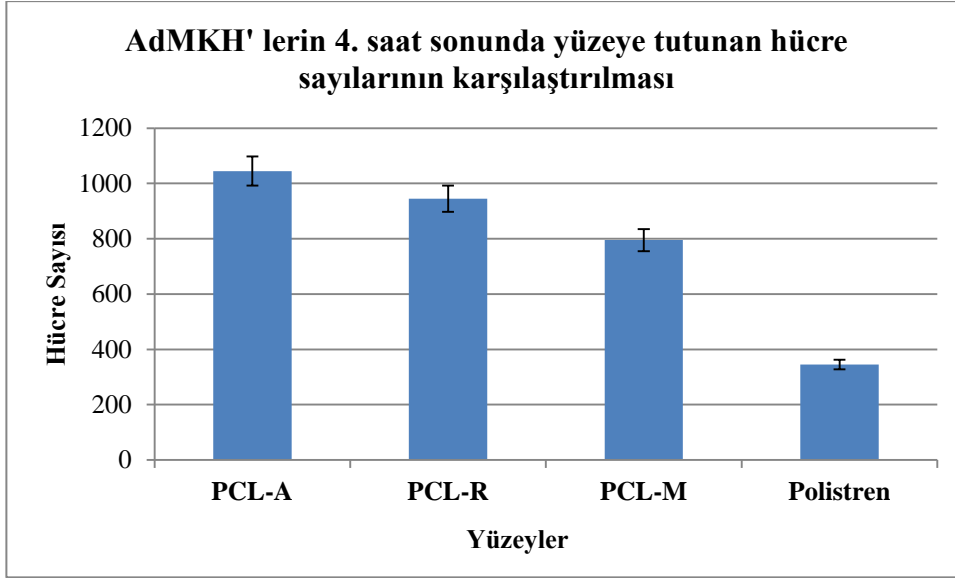
Kİ-MKH' lerin polistren yüzeylerde tıpkı AdMKH' lere olduğu gibi yüzeye yapışırçasına tutundukları tespit edildi. Hücrelerin bu yüzeyde sınırlarının ayırt edilmesinin mümkün olmadığı görüldü. Kİ-MKH' lerinin AdMKH hücrelerinin PCL yüzeyler üzerinde sergiledikleri morfolojiye çok benzer morfolojiler sergiledikleri gözlemlendi. Ancak Kİ-MKH' lerinin AdMKH' lerine göre daha yüzeyler üzerinde daha iyi yayıldıkları görüldü (Şekil 4.34).



Şekil 4. 34 Kİ-MKH' lerinin kültürün ikinci gününde farklı yüzeyler üzerindeki tutunmalarının ayrıntılı incelenmesi a) PCL-A, b) PCL-R, c) PCL-M ve d) polistren yüzey. Ok işaretleri hücrelerin bulunmadığı, boş polistren yüzeyleri göstermektedir.

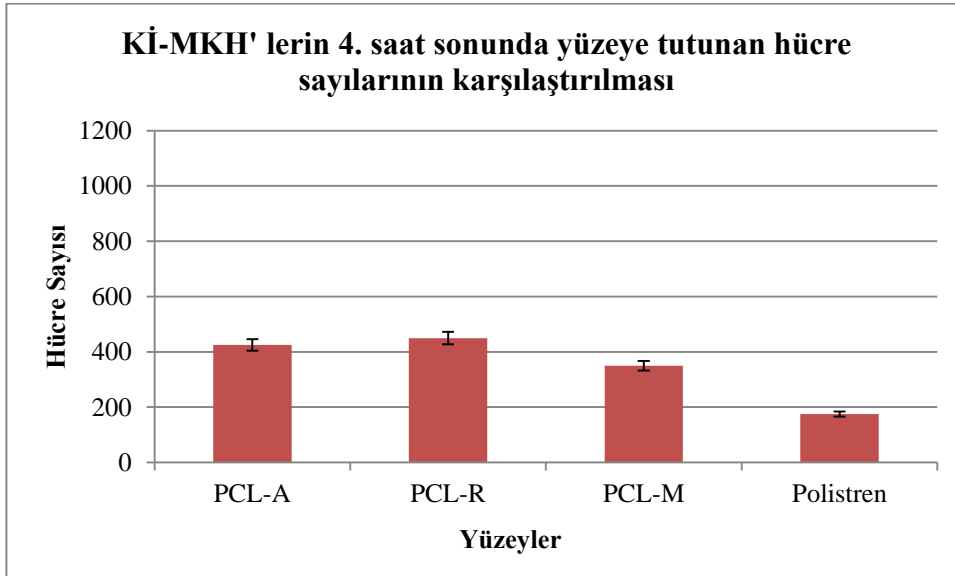
4.9 Nanofibröz Yüzeyler ile Büyüme Kinetiği Çalışması

AdMKH' lerine ve Kİ-MKH' lerine ait 4 saat sonunda elde edilen başlangıç hücre tutunmaları değerlendirildiğinde en az tutunmanın polistren yüzeylerde olduğu görüldü (Şekil 4.35 ve 4.36). AdMKH' lerin ilk tutunma değerleri incelendiğinde PCL-A yüzeylerdeki tutunmanın en fazla olduğu ve bu değerlerin sırasıyla PCL-R, PCL-M ve polistren yüzeye doğru gittikçe azaldığı tespit edildi (Şekil 4.34).

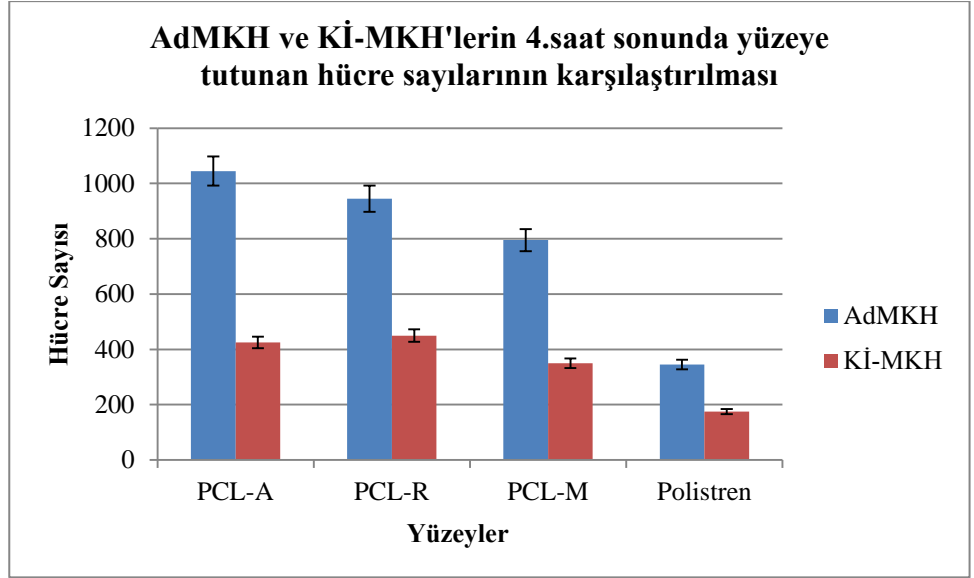


Şekil 4. 35 AdMKH'lerin nanofibröz yüzeyler ve polistren yüzey üzerindeki başlangıç hücre tutunmaları.

Kİ-MKH'lerin ilk tutunma değerlerine bakıldığında PCL-R yüzeylerdeki tutunmanın PCL-A yüzeylerdekine göre az bir farkla daha fazla olduğu belirlendi. PCL-R yüzeylerden sonra tutunan hücre sayısının PCL-A, PCL-M ve polistren yüzeylerde giderek azaldığı görüldü (Şekil 4.36).

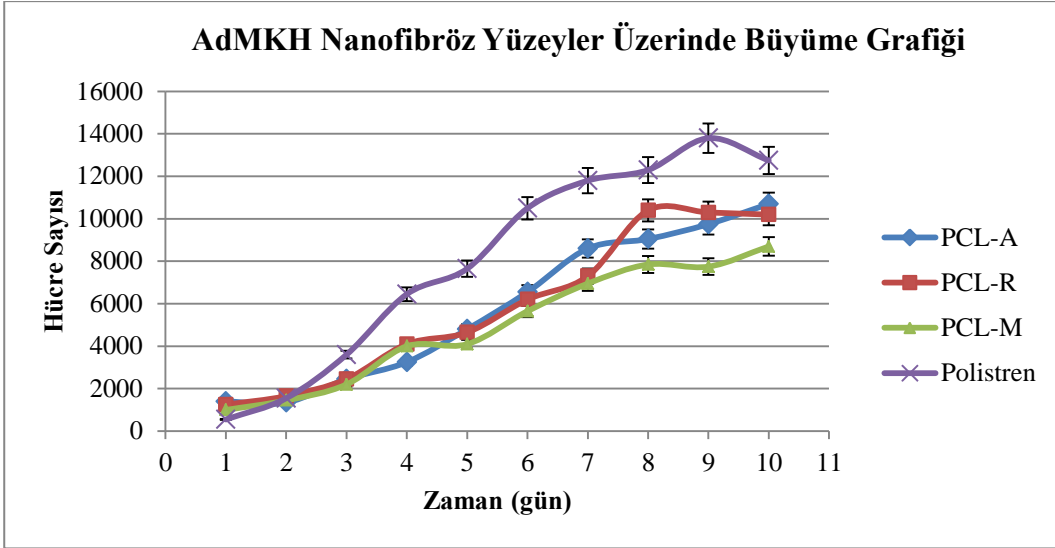


Şekil 4. 36 Kİ-MKH'lerin nanofibröz yüzeyler ve polistren yüzey üzerindeki başlangıç hücre tutunmaları.

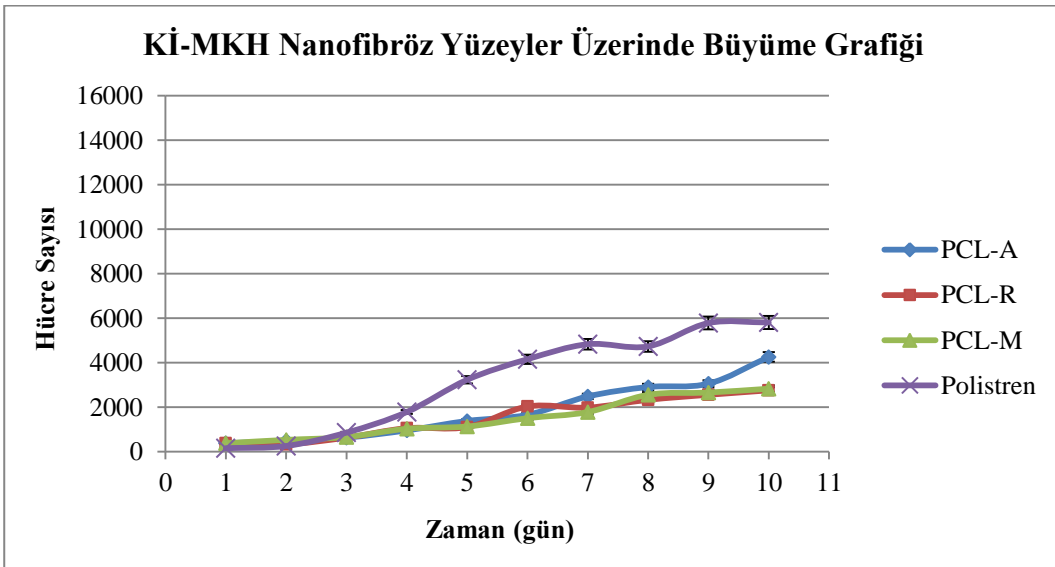


Şekil 4. 37 AdMKH ve Kİ-MKH'lerin nanofibröz yüzeyler ve polistren yüzey üzerindeki başlangıç hücre tutunmalarının karşılaştırılması.

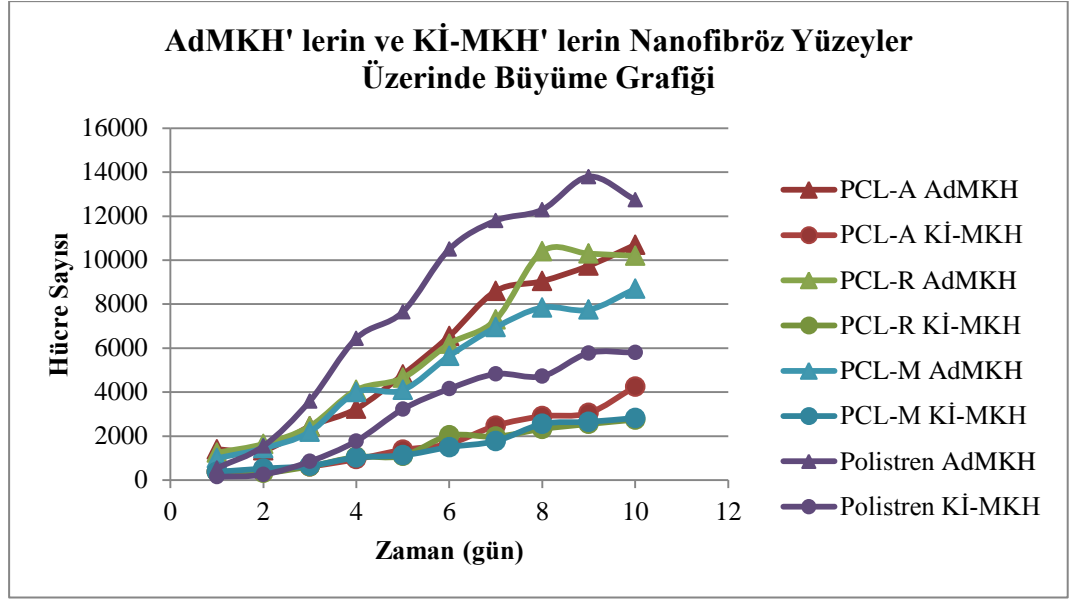
Her iki hücre türünün de kontrol olarak kullanılan polistren yüzeyler üzerinde daha fazla üreme gösterdiği tespit edildi. En az üremenin ise PCL-M yüzeylerde olduğu görüldü. Ayrıca AdMKH' ler tüm yüzeylerde Kİ-MKH' lere göre daha fazla üreme gösterdi. Her iki hücre için de üreme özellikleri kıyaslandığında polistren yüzeyden sonra en fazla üremenin görüldüğü yüzey PCL-A yüzeylerdi (Şekil 4.38 ve 4.39).



Şekil 4. 38 AdMKH' lerin nanofibröz yüzeyler ve polistren yüzey üzerinde büyüme grafiği



Şekil 4. 39 Kİ-MKH' lerin Nanofibröz yüzeyler ve polistren yüzey üzerinde büyüme grafiği.



Şekil 4. 40 AdMKH' lerin ve Kİ-MKH' lerin nanofibröz yüzeyler ve polistren yüzey üzerinde büyüme grafiği.

5. TARTIŞMA

Doku mühendisliği, içinde hücrelerin büyüüp çoğalabileceği üç boyutlu doku iskelelerinin üretimini içermektedir. Doku iskelelerinin üretilmesindeki amaç ise fizyolojik fonksiyonları devam ettirebilmek için vücudun adapte olabileceği yeni dokular oluşturmaktır. Bu şekilde iskelelerin üretimini başarmak için biyolojik dokuyu taklit eden geometriler önemlidir. Elektroeğrilmış iskelelerin fonksiyonel karmaşıklığı diğer tekniklere göre önemli avantajlar sağlamaktadır. Ancak *in vivo* kullanımının rutin hale gelmesinden önce bazı değişiklikler yapılması gerekmektedir (Lanutti et al., 2007).

Birçok sentetik polimerin yüzey özellikleri hücre tutunmasını sağlaması açısından yeterince uygun değildir. Doku mühendisliğindeki en büyük zorluk, doku oluşum sürecinin yönlendirebilecek istenilen yüzey kimyası, hücre tutunması, çoğalması ve farklılaşması için uygun biyobozunur iskeleyi tasarlamak ve üretmektir (Prabhakaran et al., 2008). Bu nedenle bu tez çalışmasında da pek çok araştırmacı tarafından tercih edilen PCL iskelelerin AdMKH' ler ve Kİ-MKH' ler için yeterince uygun olup olmadığı araştırıldı.

Bu çalışmada yüzeye bağımlı hücrelerin farklı yüzeyler üzerinde değişik hücresel tepkiler vermesi fikrinden yola çıkılarak, farklı PCL yüzeyler üzerinde Kİ-MKH' lerin ve AdMKH' lerin tutunma ve çoğalma özellikleri incelendi. Bu amaç doğrultusunda öncelikle daha önce izole edilerek stoklanan Kİ-MKH' lerin ve AdMKH' lerin kalibrasyon eğrisi oluşturuldu.

Her bir organa veya dokuya ait hücre farklı metabolik profile sahiptir. Hücrelerin metabolik profilleri buldukları koşullara, fizyolojik veya patolojik çevrelerine bağlıdır (Fernandez-Vizarra et al, 2011). Bu nedendir ki farklı hücre çeşitleri farklı mitokondriyal aktivitelere sahiptir. Çalışmada kullanılan MTT testi, canlı hücrelerde mitokondrinin MTT boyasının tetrazolyum halkasını parçalaması ilkesine dayanmaktadır. Reaksiyon canlı hücrelerdeki mitokondriyal dehidrogenaz enziminin aktivitesine bağlıdır (Slywester, 2011). Bu sebeple çalışmada kullanılan AdMKH' lerin ve Kİ-MKH' lerin mitokondriyal aktivitelerinin farklılık göstermesi beklenmiştir. Elde edilen sonuçlar Kİ-MKH' lerin mitokondriyal

aktivitesinin AdMKH' lere kıyasla daha fazla olduğunu göstererek literatür ile uyuşmaktadır.

Bir sonraki aşamada her iki hücrenin de MKH olduğunu ispatlamak için karakterizasyon çalışması yapıldı. Bunun için CD29, CD90, CD54, CD45, CD11b, CD106, MHC I ve MHC II antikorlarına bakıldı. MKH' lerin CD11b, CD34, CD14, CD11 ve CD45 gibi hematopoietik veya endotelyal yüzey belirteçlerini eksprese etmemesi gerekir (Ryan et al., 2005). Yapılan karakterizasyon çalışmasıyla, CD11b (monosit ve makrofaj belirteci) ve CD45 (pan-lökosit belirteci) antikorları ile, kültürde hematopoietik hücrelerin olmadığı belirlendi. Ayrıca MKH' ler için tipik olan CD29 (integrin β 1), CD90 (Thy-1), CD54 (ICAM-1) (Ryan et al., 2005; Dominici et al., 2006; Karaöz et al., 2009), belirteçleri ile de kültürün karakterizasyonu gerçekleştirildi. Literatüre göre pozitif ekspresyonu beklenen belirteçlerin (CD29, CD90, CD54, MHC I) MKH popülasyonunun %95' inden fazlasında eksprese olması gerekirken, ekspresyonu beklenmeyen belirteçlerin (CD11b, CD45 ve MHC II) de popülasyonun %2' sinden daha azında eksprese olması gerekmektedir (Dominici et al., 2006). Bu bilgilere bakılarak sonuçlar değerlendirildiğinde, karakterizasyonu yapılan AdMKH' lerin ve Kİ-MKH' lerin hematopoietik hücreler ile kontamine olmadığı ve MKH' lere spesifik yüzey belirteçlerini istenilen oranlarda eksprese ettiği belirlendi.

MKH' ler tarafından MHC antijenlerinin hücre yüzeyinde ekspresyonu tartışmalı bir durumdur. Çelişkili bulgular olmasına rağmen birçok çalışma MKH' lerin MHC I bakımından pozitif, MHC II bakımından negatif olduğunu göstermektedir. MHC I ekspresyonu MKH' lerin NK hücre mekanizmasından korunması açısından önemlidir. MKH' lerde MHC II ekspresyonunun olmaması da bu hücrelerin hipoinmünojenik olmasını sağlar. Böylelikle MKH' ler T hücreleri tarafından tanınmaktan kaçabilirler. MKH' ler de ayrıca T hücrelerinin uyarılması için gerekli olan CD40, CD40L, CD80 ve CD86 gibi kostimülator moleküllerin ekspresyonu da görülmez (Ryan et al., 2005). Yapılan karakterizasyon çalışmasıyla her iki hücre için de MHC I ekspresyonu pozitif görülürken, MHC II ekspresyonunun olmadığı görüldü.

AdMKH' ler kolay ve fazla miktarda elde edilebilmeleri sebebiyle klinik çalışmalar için önemli bir potansiyele sahiptir. Ancak bu kök hücre kaynağının farklılaşma potansiyelini kemik iliği gibi diğer kaynaklardan elde edilen kök hücreler ile karşılaştırıldığında bu hücrelerin klinik uygulamalar için uygun olup olmadığı araştırılmaktadır. Yapılan çalışmalar AdMKH' lerin hücresel karakteristiklerinin ve farklılaşma potansiyellerinin Kİ-MKH' lerinden farklı olduğunu göstermiştir (Im et al., 2005; Jones and Yang; 2011). Im ve arkadaşlarının (2005) yaptığı osteojenik farklılaştırma çalışmasında AdMKH' ler ile Kİ-MKH' leri arasında matriks mineralizasyonu açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olduğu ve AdMKH' lerinin uygun koşullar altında osteoblastlara farklılaşmasının daha az olduğu görülmüştür. Niemeyer ve arkadaşlarının (2010) gerçekleştirdiği *in vivo* çalışmada da AdMKH' lerin osteogenezis açısından Kİ-MKH' lerinden daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Hatta AdMKH' lerin kullanılmasının herhangi bir avantaj oluşturmadığı belirtilmiştir. Yapılan bu çalışmada da AdMKH' lerin ve Kİ-MKH' lerin farklılaşma potansiyelleri incelendiğinde, iki hücrenin birbiri ile benzer bir farklılaşma eğiliminde olmadığı açıkça görüldü. Aynı koşullar altında Kİ-MKH kültüründe osteojenik farklılaşma ile ilişkili mineralizasyon tespit edilirken, AdMKH kültüründe 28 günün sonunda herhangi bir mineralizasyon varlığı saptanmadı. AdMKH' ler için farklı osteojenik farklılaştırma protokolleri uygulanmasına rağmen başarılı sonuçlar elde edilemedi. Bu durum AdMKH' lerin osteojenik farklılaşması için gerekli olan optimum besi ortamının ve optimum sürenin belirlenememesi ve bu hücrelerin Kİ-MKH' lerden farklı hücresel karakteristikleri ile ilişkilendirildi.

Çalışma boyunca kullanılan yüzeyler tek tür PCL çözeltisi kullanılarak hazırlandı. Çözeltilerden boncuk içermeyen ve istenilen fiber dizilimine sahip yüzeyler elde etmek için elektroçirme koşulları optimize edilmeye çalışıldı. Optimize edilen koşullar altında -A ve -R dizilime sahip nanofibröz yüzeyler elde edildi. Farklı nanofiber dizilimleri için optimize edilen koşulların farklı olması sebebiyle üretilen nanofiberlerin çaplarının birebir aynı olmadığı görüldü. Ayrıca üretimler sırasında çözelti akışında meydana gelen kararsızlıklar nedeniyle üretilen yüzeylerde farklı yönden gelen veya dalgalanma yapan fiberlere rastlandı. PCL-A ve PCL-R yüzeylerde, bir örnek içerisinde nanofiberlerin homojen ve

istenilen yoğunlukta olduğu görülürken bu durumun örnekler arasında farklılıklar gösterdiği saptandı. Farklı zamanlarda hazırlanan çözeltilerin ve yine farklı zamanlarda yapılan elektroğirme işlemindeki manipülasyon farklılıklarının ve değişen ortam koşullarının bu duruma sebep olduğu düşünüldü. Çünkü elektroğirme yöntemi nem, sıcaklık, atmosfer koşulları, polimer çözeltisinin derişimi ve viskozitesi gibi pek çok parametreden etkilenebilen bir iskele üretim yöntemidir (Bhardwaj and Kundu, 2010).

Yüzeylerin hidrofilitésinin bir göstergesi olan statik temas açısı ölçümü, yüzey karakterizasyonu için sıklıkla kullanılan yöntemlerden biridir. Bu yöntemde, yüzeylerin hidrofilitési arttıkça temas açısı değeri azalmaktadır. Prabhakaran ve arkadaşlarının (2009) yapmış olduğu çalışmada elde ettikleri PCL-R yüzeylerin statik temas açısı değeri 127° dir. Çapkın ve arkadaşları (2012) da PCL-R yüzeylerin temas açısı değerini $130,6^{\circ}$, PCL-A yüzeylerinkini ise $78,7^{\circ}$ olarak bulmuşlardır. Tan ve Teoh (2007) ürettiklerin PCL-M' ların temas açısını $82,5^{\circ}$ olarak tespit ederken, Zhu ve arkadaşları (2002) da benzer şekilde PCL-M için $81,2^{\circ}$ 'lik bir temas açısı değeri saptamışlardır. Bu çalışmada elde edilen statik temas açısı değerlerinin (PCL-M $95,8^{\circ}$, PCL-A $107,4^{\circ}$, PCL-R $132,6^{\circ}$) literatür ile belirli oranda benzerlik gösterdiği açıkça görülmektedir. Ancak kullanılan polimerin moleküler ağırlığı (70.000- 90.000) ve nanofiber yoğunluğu gibi değişen parametreler sebebiyle değerlerde farklılıklar olduğu düşünülmektedir.

Çalışılan iki farklı kökenli kök hücrenin kullanılan yüzeylerdeki oryantasyonlarının SEM görüntüleri ile incelenmesi sonucu, bu hücrelerin nanofiberlerin dizilimine bağlı olarak farklı yönlenme özellikleri sergiledikleri saptandı. Düzgün dizili olan fiberlerin hücrelerin uzaması ve bipolar morfoloji kazanması yönünde etkisi olduğu görüldü. Rastgele dizili fiberlerde ise hücrelerin farklı fiber yönleri boyunca yayılma eğiliminde olduğu tespit edildi. Böylelikle PCL-R yüzeyler üzerinde hücrelerin multipolar morfolojiyle sonuçlanan çoklu fokal tutunma eğiliminde olduğu tespit edildi. AdMKH' lerin ve Kİ-MKH' lerin PCL yüzeyler üzerindeki morfolojileri karşılaştırıldığında, AdMKH' lerin Kİ-MKH' lerine göre daha iğsi yapıda oldukları belirlendi. Fare C17.2 kök hücrelerinin ve düzgün ve rastgele dizili PCL nanofibröz iskelelerin kullanıldığı

bir çalışmada da, bu çalışmaya benzer bir şekilde, düzgün dizili PCL nanofiberlerin “temasa dayalı yönlenme” mekanizması tarafından hücrelere kontrol edilebilir bir oryantasyon sağladığı belirtilmiştir (Ghasemi-Mobarakeh et al., 2008). Benzer bulgular PCL yüzeyler üzerinde farklı hücreler ile çalışan diğer araştırmacılar (Chew et al., 2008; Yao et al., 2009; Cooper et al., 2011) tarafından da desteklenmiştir.

Çalışmanın F-aktin filamentlerinin incelenmesini içeren immünohistokimyasal işaretleme basamağında da hücrelerin morfolojilerinin SEM görüntülerine benzer şekilde olduğu belirlendi. Hücrelerin aktin iskeleti yeşil floresan Alexa Fluor®488 Phalloidin ile görüntülendi. F-aktin sitoiskeleti hücre şeklinin belirlenmesi ve mekanik kuvvetlerin oluşumu için önemlidir. Hücre tutunması, göçü ve bölünmesi gibi fizyolojik davranışlar sırasında bu iskelet değişmektedir. Ayrıca F-aktin ağı pek çok canlı hücrede farklılık gösterdiği belirlenmiştir (Stricker et al., 2010).

Hücreler ile biyomalzemelerin etkileşimi, başarılı ve uzun süreli bir implantasyon için anahtar öneme sahiptir. Hücre-biyomalzeme etkileşimindeki ana parametreler hücre tutunması ve yayılmasıdır. Hücre tutunması hücre çoğalması, göçü ve farklılaşmasını doğrudan etkileyen temel süreçtir. Tutunma doku bütünlüğünün korunmasını, yara iyileşmesini, immün yanıtı, kanser metastazını ve biyomalzeme-doku bütünleşmesini etkilemektedir. Özellikle yüzey enerjisi, pürüzlülük ve kimyasal kompozisyon gibi parametreler bu hücre-yüzey ilişkilerini önemli derecede etkilemektedir. Hücreler substratlar üzerine tutunup, büyüdüklerinde ECM sinyallerini algılar, yorumlar ve yanıtlarlar. Yüzey kimyası hücre yanıtını açıkça etkilemesine rağmen buna ait mekanizma henüz tam olarak anlaşılamamıştır (Dowling et al., 2010).

Bu çalışmada farklı yüzeyler üzerinde, 4. saat sonundaki hücre tutunması verileri incelendiğinde, her iki hücre türü için de en az tutunmanın polistren yüzeyde olduğu görüldü. En az hücre tutunmasına sahip ikinci yüzeyin ise PCL-M olduğu belirlendi. AdMKH’ lerde en fazla tutunma PCL-A yüzeylerde saptanırken Kİ-MKH’ lerin de PCL-R yüzeydeki tutunmanın % 5.9’ luk bir oranla PCL-A’ ya göre daha fazla olduğu tespit edildi. Genel olarak AdMKH’ lerin tüm yüzeyler

üzerindeki hücre tutunmasının Kİ-MKH'lerine göre daha iyi olduğu görüldü. Her iki hücre için de en iyi üreme polistren yüzeyde gerçekleşti. Bu durum PCL yüzeylerin hidrofobikliği ile ilişkilendirildi.

Yüzeyin hidrofiliği/hidrofobikliği yüzey kimyasına ait önemli parametrelerden biridir. Genel olarak iskelelerin hidrofilik/hidrofobik olma özellikleri öncelikli olarak büyük ölçüde hücre tutunmasını ve göçünü etkilemektedir. Daha önceki çalışmalar incelendiğinde hidrofobik yüzeylerde hücre tutunmasının daha düşük oranda olduğu görülmektedir. Oksijenlenmiş gaz plazma ile muamele edilen polistren (TCPS) yüzey hücre tutunmasını desteklemek için serumlu besi ortamından gelen iz ECM proteinlerinin yeterli miktarını absorblayan, daha hidrofilik bir yüzey kimyası sağlar. Bu nedenle hücrelerin büyük bir kısmının PCL nanofibröz iskeleler ile karşılaştırıldığında TCPS yüzeyde çoğalması hiç de şaşırtıcı değildir (Ghasemi-Mobarakeh et al., 2008). Prabhakaran ve arkadaşları (2008) da 10 gün boyunca inceledikleri Schwan hücrelerinin PCL yüzeye göre TCPS yüzeyde hücre çoğalmasının daha fazla olduğunu göstermiştir. Ancak PCL yüzeyler içerisinde daha az hidrofobik olan PCL-M yüzeylerdeki hücre çoğalmasının PCL-A'ya ve PCL-R'ye göre daha az olması ilginçtir. Bu durum, nanofiberlerin hücrelerin tutunmasını ve çoğalmasını kolaylaştırması ile açıklanabilir.

AdMKH'lerin PCL yüzeyler arasında en çok PCL-A nanofibröz yüzeyler üzerinde çoğalması da literatür ile karşılaştırıldığında farklı bir durum değildir. Hackett ve arkadaşları (2010) nöral kök hücreler ile yaptıkları çalışmada fiber yönelmesinin hücre tutunması, çoğalması ve farklılaşması üzerine olan etkilerini incelemişler ve düzgün dizili fiberlerin hücre tutunması (%94) ve çoğalması (%71) açısından rastgele dizili fiberlere göre daha iyi sonuçlar verdiğini belirtmişlerdir.

6. SONUÇLAR

Çalışmada, AdMKH' lerin ve Kİ-MKH' lerin tutunma ve çoğalma özellikleri PCL-A, PCL-R ve PCL-M yüzeyler üzerinde incelendi ve bu özellikler kontrol olarak kullanılan polistren yüzeyler ile karşılaştırıldı.

PCL nanofibröz yüzeyler üzerinde, fiber dizilimine bağlı olarak hücrelerin oryantasyonunun değiştiği görüldü. PCL-A yüzeylerin hücrelerin bipolar morfolojiye sahip olmasını sağladığı belirlendi. Bu yüzeylerin özellikle sinir doku mühendisliği çalışmalarında hücrelerin nörona farklılaştırılmasını kolaylaştıracağı ve bu nedenle tercih edilebileceği gösterildi. Yüzeyler üzerinde nanofiberlerin bulunmasının hücre tutunmasını ve çoğalmasını olumlu yönde etkilediği saptandı. Düz bir yüzey yerine, hücrelerin daha kolay tutunmasını, çoğalmasını sağlayacak nanofiber içeren yüzeyler ile çalışmanın daha iyi olacağı gösterildi.

Her iki hücre çeşidi için PCL yüzeylerin hücre çoğalmasını polistren yüzeyler kadar iyi desteklemediği görüldü. Böylelikle yapılacak diğer doku mühendisliği çalışmalarında PCL polimeri için bazı modifikasyonlar yapılması gerektiği belirlendi.

AdMKH' lerin tüm yüzeyler üzerinde hem tutunma hem de çoğalma açısından daha iyi olduğu saptandı. Bu nedenle AdMKH' lerin Kİ-MKH' lerine kıyasla çalışmalarda tercih edilebilir olduğu gösterildi. Ancak farklılaşma potansiyeli açısından değerlendirildiğinde Kİ-MKH' lerinin AdMKH' lere göre nispeten daha kolay farklılaştığı da gözlemlendi. Farklılaştırma çalışmalarında Kİ-MKH' lerinin tercih edilmesinin daha doğru olabileceği düşünüldü.

7. ÖNERİLER

AdMKH' ler ve Kİ-MKH' lerin polistren yüzeyler üzerindeki tutunma ve çoğalma özelliklerinin PCL yüzeylerdekiyle karşılaştırılmasını içeren bu çalışmanın sonucunda, yalnızca PCL' nin kullanıldığı yüzeylerin çeşitli hücre davranışları için yeterli olmadığı görüldü. Dolayısıyla bundan sonraki çalışmalarda PCL' nin biyolojik performansını arttırmak ve bu polimeri daha iyi bir substrat haline getirebilmek için, PCL' un çeşitli doğal polimerler ile kombinasyonu yapılabilir. Ayrıca plazma uygulaması ile de yüzeyler modifiye edilebilir.

Bu çalışmada nanofiberlerin varlığının hücrelerin tutunması ve çoğalması üzerinde olumlu bir etkisi olduğu görüldü. Buna bağlı olarak değişen fiber çaplarında hücrelerin farklı hücresel davranışlar sergilemesi gerektiği düşünülmektedir. Bu nedenle fiber çapının hücrelerin tutunması, çoğalması ve farklılaşması üzerine olan etkileri incelenebilir. Ayrıca AdMKH' ler ve Kİ-MKH' ler için uygun fiber çapının tespit edilebileceği bir çalışma yapılabilir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Akdemir, Z. S.**, 2009, Doku Mühendisliğinde Kullanılacak Yeni Polimerik Biyomalzemelerin Geliştirilmesi, Marmara Üniversitesi, Kimya Anabilim Dalı, Organik Kimya Programı, Doktora Tezi.
- Armentano, I., Dottori, M., Fortunati, E., Mattioli, S. and Kenny, J.M.**, 2010, Biodegradable polymer matrix nanocomposites for tissue engineering: A review, *Polymer Degradation and Stability*, 95: 2126-2146.
- Beachley, V. and Wen, X.**, 2009, Effect of electrospinning parameters on the nanofiber diameter and length, *Materials Science and Engineering C*, 29: 663–668.
- Beşkardeş, I.**, 2008, Biyoseramik ve Biyosinyal Moleküllerle Desteklenmiş Poli(Kaprolakton) Doku İskeleleri: Sentez, Karakterizasyon Ve Kemik Doku Mühendisliği Uygulamaları, Hacettepe Üniversitesi, Kimya Mühendisliği, Yüksek lisans tezi.
- Bhardwaj, N. and Kundu, S. C.**, 2010, Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique, *Biotechnology Advances*, 28: 325–347.
- Bryant, S. J.**, Tissue Engineering,
<http://www.uweb.engr.washington.edu/research/tutorials/tissueengineering.html>
Erişim tarihi: 04.04.2012.
- Biggs, M. J. P., Richards, R. G. and Dalby, M.J.**, 2010, Nanotopographical modification: a regulator of cellular function through focal adhesions, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 6: 619–633.
- Buckley, C.T. and O’Kelly, K.U.**, 2004, Regular Scaffold Fabrication Techniques for Investigations in Tissue Engineering, 147-166, P.J. Prendergast and P.E. McHugh (Eds.), Topics in Bio-Mechanical Engineering.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Buijtenhuijs, P., Buttafoco, L., Poot, A. A., Daamen, W. F., Kuppevelt, T. H., Dijkstra, P. J., Vos, R. A. I., Sterk, L. M., Geelkerken, B. R. H., Feijen, J. and Vermes, I.,** 2004, Tissue engineering of blood vessels: characterization of smooth-muscle cells for culturing on collagen-and-elastinbased scaffolds, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 39: 141–149.
- Chan, B. P. and Leong, K. W.,** 2008, Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations, *Eur Spine J*, 17: 467–479.
- Chapekar M. S.,** 2000, Tissue engineering: Challenges and opportunities, *Appl Biomater.*, 53: 617–620.
- Chen, F., Lee, C.N. and Teoh, S.H ,** 2007, Nanofibrous modification on ultra-thin poly(ϵ -caprolactone) membrane via electrospinning, materials. *Science and Engineering*, 27: 325-332.
- Chen, W., Villa-Diaz, L. G., Sun, Y., Weng, S., Kim, J. K., Lam, R. H. W., Han, L., Fan, R., Krebsbach, P. H. and Fu, J.,** 2012, Nanotopography Influences Adhesion, Spreading, and Self Renewal of Human Embryonic Stem Cells,. *American Chemical Society NANO*, 6: 5 ' 4094–4103.
- Chew, S. Y., Mic, R., Hokec, A. and Leong, K. W.,** 2008, The effect of the alignment of electrospun fibrous scaffolds on Schwann cell maturation, *Biomaterials*, 29: 653–661.
- Chung, H. J. and Park, T. G.,** 2007, Surface engineered and drug releasing pre-fabricated scaffolds for tissue engineering, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59: 249–262.
- Coopera, A., Bhattaraia, N. and Zhang, M.,** 2011, Fabrication and cellular compatibility of aligned chitosan-PCL fibers for nerve tissue regeneration, *Carbohydrate Polymers*, 85(1):149-156.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Cottam, E., Hukins, D. W. L., Lee, K., Hewitt, C. and Jenkins, M. J.,** 2009, Effect of sterilisation by gamma irradiation on the ability of polycaprolactone (PCL) to act as a scaffold material, *Medical Engineering & Physics*, 31: 221–226.
- Cunha, C., Panseri, S. and Antonini, S.,** 2011, Emerging nanotechnology approaches in tissue engineering for peripheral nerve regeneration, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 7(1):50-9.
- Çapkın, M., Çakmak, S., Özdal-Kurt, F., Gümüşderelioğlu, M., Şen, H. B., Türk, T. and Deliloğlu-Gürhan, S. İ.,** 2012, Random/aligned electrospun PCL/PCL-collagen nanofibrous membranes: comparison of neural differentiation of rat AdMSCs and BMSCs, *Biomed. Mater.*, 7: 045013.
- Dawson, E., Mapili, G., Erickson, K., Taqvi, S. and Roy, K.,** 2008, Biomaterials for stem cell differentiation, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60: 215-228.
- Decuzzi, P. and Ferrari, M.,** 2010, Modulating cellular adhesion through nanotopography, *Biomaterials*, 31: 173–179.
- Deliloğlu Gürhan, S. İ., Özen, M. Ö., Sözer, P. ve Lüleci, İ.,** Kök Hücreler ve Doku Mühendisliği, *Sağlıkta Birikim*, 1(5): 143-168.
- Dhandayuthapani, B., Yoshida, Y., Maekawa, T. and Kumar, D. S.,** 2006, Polymeric Scaffolds in Tissue Engineering Application: A Review, *International Journal of Polymer Science*, Article ID 290602, doi:10.1155/2011/290602.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Dominici, M., Blanc, K. L., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F. C., Krause, D. S., Deans, R. J., Keating, A., Prockop, D. J. and Horwitz, E. M.,** 2006, Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells: The International Society for Cellular Therapy position statement, *Cytotherapy*, 8:4 315- 317.
- Dowling, D. P., Miller, I. S., Ardhaoui, M. and Gallagher, W. M.,** 2011, Effect of surface wettability and topography on the adhesion of osteosarcoma cells on plasma modified polystyrene, , *J Biomater Appl.*, 26: 327-347.
- Fang, Z., Yang, Q., Xiong, W., Li, G., Xiao, J., Guo, F., Li, F. and Chen, A.,** 2010, Neurogenic differentiation of murine adipose derived stem cells transfected with EGFP *in vitro*, *J Huazhong Univ Sci Technol (Med Sci)*, 30(1): 75-80.
- Fernández-Vizarra, E., Enríquez, J. A., Pérez-Martos, A., Montoya, J. and Fernández-Silva, P,** 2011, Tissue-specific differences in mitochondrial activity and biogenesis, *Mitochondrion*, 11: 207–213.
- Ghasemi-Mobarakeh, L., Prabhakaran, M. P., Morshed, M., Nasr-Esfahani, M., H. and Ramakrishna, S.,** 2010, Bio-functionalized PCL nanofibrous scaffolds for nerve tissue engineering, *Materials Science and Engineering C*, 30: 1129–1136.
- Ghasemi-Mobarakeh, L., Prabhakaran, M. P., Morshed, M., Nasr-Esfahani, M. H. and Ramakrishna, S.,** 2008, Electrospun poly(3-caprolactone)/gelatin nanofibrous scaffolds for nerve tissue engineering, *Biomaterials*, 29: 4532–4539.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Guarino, V., Causa, F., Taddei, P., Foggia, M., Ciapetti, G., Martini, D., Fagnano, C., Baldini, N. and Ambrosio, L.,** 2008, Polylactic acid fibre-reinforced polycaprolactone scaffolds for bone tissue engineering, *Biomaterials*, 29, 3662–3670.
- Gümüşderelioğlu M., Maviş B., Karakeçili A., Kahraman A. S., Çakmak S., Tığlı S., Demirtaş T. T. ve Aday S.,** 2007, "Doku Mühendisliğinde Nanoteknoloji," Bilim ve Teknik – Yeni Ufuklar, TÜBİTAK Yayınları, Ankara.
- Hackett, J. M., Dang, T. T., Tsai, E. C. and Cao, X.,** 2010, Electrospun biocomposite polycaprolactone/collagen tubes as scaffolds for neural stem cell differentiation, *Materials*, 3: 3714-3728.
- Hoerstrup, S. P. and Vacanti, J. P.,** 2004, Overview of Tissue Engineering, 712-728, Ratner, B. D., Hoffman, A. S., Schoen, F. J., Lemons, J. E. (Eds), Elsevier Academic Press, USA, 851p.
- Hong, S. and Kim, G.H.,** 2011, Fabrication of electrospun polycaprolactone biocomposites reinforced with chitosan for the proliferation of mesenchymal stem cells, *Carbohydrate Polymers*, 83: 940–946.
- Hutmacher, D. W.,** 2001, Scaffold design and fabrication technologies for engineering tissues- state of the art and future perspectives, *J. Biomater. Sci. Polymer Edn*, 12: 107–124.
- Im, G., Shin, Y-W. and Lee, K-B.,** 2005, Do adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have the same osteogenic and chondrogenic potential as bone marrow-derived cells?, *OsteoArthritis and Cartilage*, 13: 845-853.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Ji, C., Annabi, N., Hosseinkhani, M., Sivaloganathan, S. and Dehghani, F.,** 2012, Fabrication of poly-DL-lactide/polyethylene glycol scaffolds using the gas foaming technique, *Acta Biomaterialia*, 8: 570–578.
- Jiang, X., Him, S. H., Mao, H. and Chew, S. Y.,** 2010, Current applications and future perspectives of artificial nerve conduits, *Experimental Neurology*, 223: 86–101.
- Jones, E. and Yang, X.,** 2011, Mesenchymal stem cells and bone regeneration: Current status, *Injury, Int. J. Care Injured*, 42: 562–568.
- Kang, H., Long, J., Goldner, G. U., Goldstein, S. and Hollister, S.,** 2012, A paradigm for the development and evaluation of novel implant topologies for bone fixation: Implant design and fabrication, *Journal of Biomechanics*, 45: 2241–2247.
- Karaöz, E., Aksoy, A., Ayhan, S., Sarıboyacı, A. E., Kaymaz, F. and Kasap, M.,** 2009, Characterization of mesenchymal stem cells from rat bone marrow: ultrastructural properties, differentiation potential and immunophenotypic markers, *Histochem Cell Biol*, 132:533-546.
- Khang, G., Kim, M. S. and Lee, H. B.,** 2007, Introduction, 1-12, A Manual for Biomaterials/Scaffold Fabrication Technology, World Scientific Publishing, 288p.
- Kim, B. S. and Mooney, D. J.,** May 1998, Development of Biocompatible Synthetic Extracellular Matrices for Tissue Engineering, *TIBTECH*, 16: 224-230.
- Lannutti, J., Reneker, D., Ma, T., Tomasko, D. and Farson, D.,** 2007, Electrospinning for tissue engineering scaffolds, *Materials Science and Engineering C*, 27: 504–509.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Leong, K. F., Cheah, C.M. and Chua, C.K.**, 2003, Solid freeform fabrication of three-dimensional scaffolds for engineering replacement tissues and organs, *Biomaterials*, 24: 2363–2378.
- Leong, K. F., Chua, C. K., Sudarmadji, N. and Yeong, W.Y.**, 2008, Engineering functionally graded tissue engineering scaffolds, *Journal of The Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 1(2): 140–152.
- Levenberg, S. and Langer, R.**, 2004, Advances in tissue engineering, *Current Topics in Developmental Biology*, 61: 113-134.
- Li, M., , Mondrino, M.J., Gandhi, M.R., Ko, F.K., Weiss, A.S. and Lelkes, P.I.**, 2005, Electrospun protein fibers as matrices for tissue engineering, *Biomaterials*, 26: 5999–6008.
- Marga, F., Neagu, A., Kosztin, I. and Forgacs, G.**, 2007, Developmental biology and tissue engineering, *Birth Defects Research*, 81:320–328.
- Marlettaa, G., Ciapettib, G., Satrianoa, C., Perutb, F., Salernob, M. and Baldini, N.**, 2007, Improved osteogenic differentiation of human marrow stromal cells cultured on ion-induced chemically structured poly-ε-caprolactone, *Biomaterials*, 28: 1132–1140.
- Meckel, T.**, http://www.bio.tu-darmstadt.de/ag/fachgebiete/membrane_dynamics/meckel_1.en.jsp, Erişim tarihi: 15.12.2012.
- Melchels, F. W., Feijen, J. and Grijpma, D.**, 2010, A review on stereolithography and its applications in biomedical engineering, *Biomaterials*, 31: 6121-6130.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Mikos, A. G. and Mummery, C. L.**, 2003, Tissue Engineering, 7-27, Dave Thomas (Ed), NWO| Huygens Lectures, Netherlands Organisation for Scientific Research (NWO), Netherlands, 40p.
- Museum Syndicate**, San Marco Altarpiece: Healing of Deacon Justinian, <http://www.museumsyndicate.com/item.php?item=23753>, Erişim tarihi: 04.04.2012.
- Mogilner, A.**, 2012, <http://www.mechanobio.info/Home/Dynamic-Structures-in-Mechanosensing/lamellipodia>, Erişim tarihi: 13.12.2012.
- National Academy of Sciences, Engineering and Medicine**, 2012, Understanding stem cells: an overview of science and issues from the national academies, http://dels-old.nas.edu/dels/rpt_briefs/Understanding_Stem_Cells.pdf, Erişim tarihi: 26.11.2012.
- Neuhauser, C.**, 2009, A Brief Introduction to Using ImageJ, http://bioquest.org/NumbersCount/utk_2009/projectfiles/A%20Brief%20Introduction%20to%20Using%20ImageJ.pdf, Erişim tarihi: 04.12.2012.
- Niemeyer, P., Fecher, K., Milz, S., Richter, W., Suedkamp, N. P., Mehlhorn, A. T., Pearce, S. and Kasten, P.**, 2010, Comparison of mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue for bone regeneration in a critical size defect of the sheep tibia and the influence of platelet-rich plasma, *Biomaterials*, 31: 3572–3579.
- O'Brien, F. J.**, 2011, Biomaterials and scaffolds for tissue engineering, - Review article. *Materials Today*, 14(3), 88-95.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Papenburg, B. J.**, 2009, Design Strategies for Tissue Engineering Scaffolds, PhD Thesis, University of Twente, Institute for Biomedical Technology (BMTi), 198p (unpublished).
- Pham, Q. P., Sharma, U. and Mikos, A. G.**, 2006, Electrospinning of polymeric nanofibers for tissue engineering applications: A Review, *Tissue Engineering*, 12 (5): 1197-1213.
- Pok, S. W., Wallace, K. N. and Madihally, S. V.**, 2010, In vitro characterization of polycaprolactone matrices generated in aqueous media, *Acta Biomaterialia*, 6: 1061–1068.
- Polak, J. M. and Bishop, A. E.**, 2006, Stem cells and tissue engineering: past, present, and future, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1068: 352–366.
- Prabhakaran, M. P., Venugopal, J. R. and Ramakrishna, S.**, 2009, Mesenchymal stem cell differentiation to neuronal cells on electrospun nanofibrous substrates for nerve tissue engineering, *Biomaterials*, 30: 4996–5003.
- Prabhakaran, M. P., Venugopal, J., Chan, C. K. and Ramakrishna, S.**, 2008, Surface modified electrospun nanofibrous scaffolds for nerve tissue engineering, *Nanotechnology*, 19(45): 455102.
- Rosa, V., Bona, A. D., Cavalcanti, B. N. and Nör, J. E.**, 2012, Tissue engineering: From research to dental clinics, *Dental Materials*, 28(4): 341–348.
- Ryan, J. M., Barry, F. P., Murphy, J. M. and Mahon, B. P.**, 2005, Mesenchymal stem cells avoid allogeneic rejection, *Journal of Inflammation*, 2:8-8.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Sachlos E. and Czernuszka J.T.**, 2003, Making tissue engineering scaffolds work. Review on the application of solid free form fabrication technology to the production of tissue engineering scaffolds, *European Cells and Materials*, 5: 29-40.
- Saltzman, W. M. and Kyriakides, T. R.**, 2007, Cell Interactions with Polymers, 279-296, Robert Lanza, Robert Langer and Vacanti Joseph (Eds), Principles of Tissue Engineering, Third Edition, Elsevier Academic Press, USA, 1307p.
- Sarvazyan, N.**, 2012, Creation of living tissue: an engineering feat, 1-8, Cell and Tissue Engineering, Bojana Obradović (Ed.), Planeta print, Belgrade, 275p.
- Saxena, A. K.**, 2005, Tissue engineering: Present concepts and strategies, *Journal of Indian Assoc. Pediatr Surg.*, 10:1.
- Sergeeva, E., Giles, K., and Voet, J.**, 2009, [http://www.proteopedia.org/wiki/index.php/Group:SMART:Tangible Models of Cdc42 Interacting With Intersectin](http://www.proteopedia.org/wiki/index.php/Group:SMART:Tangible_Models_of_Cdc42_Interacting_With_Intersectin), Erişim tarihi: 13.12.2012.
- Seyednejad, H., Gawlitta, D., Kuiper, R. V., Bruin, A., Nostrum, C. F. Vermonden, T., Dhert, W. J. A. and Hennink, W. E.**, 2012, In vivo biocompatibility and biodegradation of 3D-printed porous scaffolds based on a hydroxyl-functionalized poly(ϵ -caprolactone), *Biomaterials*, 33: 4309-4318.
- Sill, T. J. and Recum, H. A.**, 2008, Electrospinning: Applications in drug delivery and tissue engineering, *Biomaterials*, 29: 1989-2006.
- Sinha, V.R., Bansal, K., Kaushik, R., Kumria, R. and Trehan, A.**, 2004, Polycaprolactone microspheres and nanospheres: an overview, *International Journal of Pharmaceutics*, 278: 1-23.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Sipe, J. D.**, 2002, Tissue engineering and reparative mMedicine, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 961: 1–9.
- Spadiccio, C., Rainer, A., Chachques, J., Covino, E., Herreros, J. and Genovese, J. A.**, 2011, Stem cells cardiac differentiation in 3D systems, *Frontiers in Bioscience*, S3, 901-918.
- Srinivasan, S., McKinley, G. H. and Cohen, R. E.**, Assessing the Accuracy of Contact Angle Measurements for Sessile Drops on Liquid-Repellent Surfaces, <http://web.mit.edu/nmf/publications/GHM169.pdf>, Erişim tarihi: 04.12.2012.
- Stamatialis, D. F., Papenburg, B., J., Giron'es, M., Saiful, S., Bettahalli, S. N. M., Schmitmeier, S. and Wessling, M.**, 2008, Medical applications of membranes: Drug delivery, artificial organs and tissue engineering, *Journal of Membrane Science*, 308: 1–34.
- Stricker, J., Falzone, T. and Gardel, M. L.**, 2010, Mechanics of the F-actin cytoskeleton, *Biomechanics*, 43: 9–14.
- Sylvester, P. W.**, 2011, Optimization of the tetrazolium dye (MTT) colorimetric assay for cellular growth and viability, *Methods Mol Biol.*, 716:157-68.
- Tan, P. S. and Teoh, S. H.**, 2007, Effect of stiffness of polycaprolactone (PCL) membrane on cell proliferation, *Materials Science and Engineering C*, 27: 304-308.
- Tang, Z.G., Black, R.A., Curran, J.M., Hunt, J.A., Rhodes, N.P. and Williams, D.F.**, 2004, Surface properties and biocompatibility of solvent-cast poly[ε-caprolactone] films, *Biomaterials*, 25, 4741–4748.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Tay, B. Y., Zhang, S. X., Myint, M. H., Ng, F. L., Chandrasekaran, M. and Tan, L. K. A.,** 2007, Processing of polycaprolactone porous structure for scaffold development, *Journal of Materials Processing Technology*, 182: 117–121.
- Tsuchiya, K., Chen, G., Ushida, T., Matsuno, T. and Tateishi, T.,** 2001, Effects of cell adhesion molecules on adhesion of chondrocytes, ligament cells and mesenchymal stem cells, *Materials Science and Engineering C*, 17: 79–82.
- Tuan, R. S., Boland G. and Tuli, R.,** 2002, Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering, *Arthritis Research and Therapy*, 5(1): 32-45.
- Vacanti, C. A.,** 2006, The history of tissue engineering, *J. Cell. Mol. Med.*, 10: 569-576.
- Vacanti, J. and Vacanti, C. A.,** 2007, The History and Scope of Tissue Engineering, 3-6, Robert Lanza, Robert Langer and Vacanti Joseph (Eds), *Principles of Tissue Engineering*, Third Edition, Elsevier Academic Press, USA, 1307p.
- Vacanti, J.,** 2010, Tissue engineering and regenerative medicine: from first principles to state of the art, *Journal of Pediatric Surgery*, 45: 291–294.
- Woodruff, M. A. and Hutmacher, D. W.,** 2010, The return of a forgotten polymer-polycaprolactone in the 21st century, *Progress in Polymer Science*, 35: 1217–1256.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Yang, F., Neeley, W. L., Moore, M. J., Karp, J. M., Shukla, S. and Langer, R.,** 2008, Tissue Engineering: The Therapeutic Strategy of the Twenty-First Century, 20-52, Laurencin, C. T. and Nair, L. S. (Eds.), Nanotechnology and Tissue Engineering The Scaffold, CRC Press Taylor & Francis Group, 388p.
- Yannas, I. V.,** 2004, Natural Materials, 127-137, Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine, Second Edition, Ratner, B. D., Hoffman, A. S., Schoen, F. J., Lemons, J. E. (Eds), Elsevier Academic Press, USA, 851p.
- Zhang, X., Wu, M., Zhang, W., Shen, J. and Liu, H.,** Differentiation of human adipose-derived stem cells induced by recombinantly expressed fibroblast growth factor 10 in vitro and in vivo, *In Vitro Cell.Dev.Biol.-Animal*, 46: 60–71.
- Zhu, Y., Gao, C., Liu, X. and Shen, J.,** 2002, Surface modification of polycaprolactone membrane via aminolysis and biomacromolecule immobilization for promoting cytocompatibility of human endothelial cells, *Biomacromolecules*, 3: 1312-1319.

ŞEYMA ÇOĞAN

Biyomühendis

Adres: Ege Üniversitesi
Biyomühendislik Bölümü
EBİLTEM Binası 35100
Bornova/İZMİR

Telefon: 0 (554) 707 12 22
0 (236) 231 95 39

e-posta adresi:
symcgn@hotmail.com

KİŞİSEL BİLGİLER

Doğum Tarihi: 21.09.1988

Doğum Yeri: İzmir

Uyruk: T.C.

Medeni Durum: Bekar

EĞİTİM

- 2010-...** Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Biyomühendislik Bölümü
İzmir-TÜRKİYE
Yüksek Lisans
Genel not ortalaması: 90.76/100
Tez konusu: Sıçan Kemik İliğinden ve Yağ Dokusundan Elde Edilen Mezenkimal Kök Hücrelerin PCL Nanofibröz Yüzeyler Üzerinde Tutunma ve Çoğalma Özelliklerinin İncelenmesi
Tez danışmanı: Prof. Dr. İsmet Deliloğlu Gürhan
- 2006-2010** Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Biyomühendislik Bölümü
İzmir-TÜRKİYE
Genel not ortalaması: 3.39/4
Bitirme Tezi: Doğal Ürünlerden Elde Edilen Saponin Bileşiklerinin Adjuvant Olarak Kullanımı
Tez danışmanı: Prof. Dr. İsmet Deliloğlu Gürhan
- 2002-2006** Fatih Anadolu Lisesi
Manisa-TÜRKİYE
Genel not ortalaması: 5.00/5.00

DENEYİMLER

Staj:

ONKİM Kök Hücre Teknolojileri Tic. San. A.Ş, Maslak/İstanbul, 15 Temmuz 2009- 15 Ağustos 2009.

AKADEMİK AKTİVİTELER:

i) Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan Bildiriler:

- SENSES, Y. M., ERDEN, S., YESİL, P., **COĞAN, S.**, OLCUM, M., GAMA, F. M. P., DELİLOĞLU GURHAN, S. I., SENDEMİR URKMEZ, A., The Future Prospects of Bacterial Cellulose in Tissue Engineering Applications “*In vitro* and *in vivo* biocompatibility tests”, Third East Mediterranean ICLAS Symposium & XV. ICLAS General Assembly, 13-15 Haziran 2011, İstanbul-Türkiye, s. 72, Poster Bildiri, Özet.
- **Şeyma ÇOĞAN**, Merve ÇAPKIN, İsmet DELİLOĞLU GÜRHAN, Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU’ Investigation of Attachment and Proliferation Properties of Rat Bone Marrow and Adipose Tissue Derived Mesenchymal Stem Cells on PCL Nanofibrous Surfaces, 18th International Biomedical Science & Technology Symposium, 10-13 Eylül 2012, Tokat- Türkiye, s.55, Poster Bildiri, Özet.
- Ülkü Selcen DEMİR, **Şeyma ÇOĞAN**, Tanseli NESİL, Mehmet Özgün ÖZEN, Aylın ŞENDEMİR ÜRKMEZ, Neuronal Differentiation of Mesenchymal Stem Cells on Fibrous Surfaces by Co-Culture Technique, 18th International Biomedical Science & Technology Symposium, 10-13 Eylül 2012, Tokat- Türkiye, s.60, Poster Bildiri, Özet.

ii) Kongre, Konferans, Sempozyum ve Seminerler

Katılımcı:

- “Biyoremediasyon Temel Esasları ve Uygulamaları” Eğitim Semineri, 10-11 Aralık 2007.
- “1. Moleküler Biyoloji ve Genetik” Öğrenci Kongresi, 27-30 Ağustos 2008.
- “Küresel Isınmaya Karşı Çevre Bilinci ve Alternatif Enerji Kaynakları” Sempozyumu, 1 Nisan 2008.
- IV. Ulusal Biyomühendislik Kongresi, 15-18 Ekim 2008.
- “Kaizen” Eğitimi, 7 Mart 2009.

- “Kök Hücre” Sempozyumu, 16 Mart 2009.
- “Biyogirişimcilik Günü” Sempozyumu, 5 Mart 2010.
- “Aşı” Sempozyumu, 26 Nisan 2010.
- “Vth Uluslararası Biyomühendislik Kongresi”, 16-19 Haziran 2010.
- “2. Laboratuvar Hayvanları Bilimi Sempozyumu”, 1-2 Ekim 2010.
- “Doku Mühendisliği Sempozyumu”, 11 Nisan 2011.
- “Organization for PhD Education in Biomedicine and Health Sciences (ORPHEUS)”, 27-30 Nisan 2011.
- “3rd East Mediterranean ICLAS Symposium & XV. ICLAS General Assembly, 13-15 Haziran 2011.
- “Ege VIth Biennial International Neuroscience Graduate Summer School”, 27 Haziran- 2 Temmuz 2011.
- “17. Uluslararası Biyomedikal Bilim ve Teknoloji Sempozyumu”, BİOMED 2011, 23-25 Kasım 2011.
- “18. Uluslararası Biyomedikal Bilim ve Teknoloji Sempozyumu”, BİOMED 2012, 10-13 Eylül 2011.
- “Laminar Flow & CO₂ İnkübatörleri Semineri”, İncekaralar A.Ş., 20 Eylül 2012.

Eğitmen:

- “Temel Hücre Kültürü ve Alternatif Yöntemler Kursu”, 14-17 Haziran 2011.

Düzenleme Kurulu:

- “Yapay Doku ve Organ Sempozyumu: Artan Organ İhtiyacına Güncel Yaklaşımlar” Sempozyumu Düzenleme Komitesi Eş Başkanı, 27 Ekim 2009.
- “Temel Hücre Kültürü ve Alternatif Yöntemler Kursu”, 14-17 Haziran 2011.

Kursiyer:

- Temel Hücre Kültürleri Kursu, 21-22 Eylül 2010.
- Primer Hücre Kültürü Kursu, 23-25 Eylül 2010.
- Deney Hayvanı Kullanım Kursu, 80 saat, Ege Üniversitesi, İzmir, 14-25 Mart 2011.
- “Temel Hücre Kültürü ve Alternatif Yöntemler Kursu”, 14-17 Haziran 2011.

- “Ege VIth Biennial International Neuroscience Graduate Summer School”, 27 Haziran- 2 Temmuz 2011.

KAZANDIĞI BURSLAR

- TÜBİTAK, 2228 Son Sınıf Lisans Öğrencileri İçin Yurt İçi Lisansüstü (Yüksek Lisans/Doktora) Bursu, 2010.

AKTİVİTELER ve ÖZEL YETENEKLER

Üyelikler:

Ege Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Topluluğu Üyeliği, 2006-2010.
Kimya Mühendisleri Odası Öğrenci Üyeliği, 2006-2010.
Hücre Ölümü ve Araştırma Derneği Assosiyasyon Üyeliği, 2011-...

Laboratuvar Deneyimi

Hücre Kültürü ve Doku Mühendisliği:

Hücre ve doku kültürü, , mikroskop incelemesi, laboratuvar hayvanı (sıçan ve fare) organ disseksiyonu, kriyo kesit hazırlanması, immünohistokimyasal boyama, immünofloresan boyama, immünohistokimya, sitotoksikite & genotoksikite testleri, MTT, taramalı elektron mikroskopu.

Elektrodepozisyon yöntemi ile yüzey hazırlanması.

Bilgisayar Deneyimi ve Analitik Yetenekler

Windows XP/Vista/7, Microsoft Office (Word/Excel/Powerpoint), MATLAB (Temel düzeyde)

Yabancı Dil

İngilizce (İyi seviyede) ve Almanca (Temel seviyede).

Sürücü Belgesi

B tipi sürücü belgesi

HOBİLER

Sinema, müzik, kitap, tenis, kara kalem resim.