

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**İZOLE EDİLMİŞ SIÇAN KONDROSİTLERİ VE POLİMERİK  
BİYOMALZEMELERİN KULLANIMIYLA KIKIRDAK  
DOKU MÜHENDİSLİĞİ**

**NURAY EMİN**

**TEMEL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI**

**ANKARA  
2006**

## ÖZET

### Yüksek Lisans Tezi

## İZOLE EDİLMİŞ SIÇAN KONDROSİTLERİ VE POLİMERİK BİYOMALZEMELERİN KULLANIMIYLA KIKIRDAK DOKU MÜHENDİSLİĞİ

Nuray EMİN  
Ankara Üniversitesi  
Biyoteknoloji Enstitüsü

Danışman: Prof. Dr. Y. Murat ELÇİN

Wistar sıçanların artiküler kıkırdağından aseptik koşullarda enzimatik olarak izole edilen kondrositler, üç boyutlu statik ve dinamik kültürler ile paralel deney olarak tek tabaka kültürlerde çoğaltıldı. Üç boyutlu ortamı sağlamak amacıyla kalsiyum alginat hidrojeli kullanıldı ve izole edilmiş hücreler kalsiyum alginat jeli içerisine enkapsüle edildikten sonra biyoreaktör içerisine konularak dinamik kültür şartları ile TGF- $\beta$ 'nın etkisi incelendi. Statik üç-boyutlu ve tek tabaka kültürler ise kontrol olarak yürütüldü.

Kondrositlerin, *in vitro* şartlarda dediferansiye olmadan çoğaltılmalarını sağlamak amacıyla hazırlanan kondrojenik vasat, 20%FCS (fetal sıçır serumu), esansiyel olmayan amino asit çözeltisi, L-glutamin, askorbik asit, ITS<sup>+</sup> (insülin, transferrin, selenoik asit), antibiyotik-antimikotik çözeltisi ve TGF- $\beta$  DMEM'den oluşturuldu. Kondrositlerin TGF- $\beta$  içeren kondrojenik vasatta farklılaşmadan hızla çoğalabildikleri gözlemlendi.

İmmünohistokimya çalışmaları, kondrositlerin üç-boyutlu statik kültürlerde düşük miktarda kollajen tip-1, daha yüksek düzeyde kollajen tip-2 sentezi yapabildiklerini gösterdi. Buna karşın, kontrol tek tabaka kültürlerde kollajen tip-2 sentezinin yanı sıra, daha yüksek düzeyde kollajen tip-1 sentezinin gerçekleştiği gösterildi. Çalışmalar alginat lif içerisine enkapsüle edilen kondrositlerin, TGF- $\beta$  içeren STLV biyoreaktördeki kültür şartları altında kollajen tip-2 ve agrekan boyaması için en iyi sonucu verdiğini ortaya koydu. Kollajen tip-2 için gözlenen kuvvetli antikor boyaması, hiyalin kıkırdak için spesifikliğı ve kültür ortamındaki doğal kıkırdağın rediferansiyasyonunu gösterdi.

**2006, 81 sayfa**

**ANAHTAR KELİMELELER:** Kondrosit, kıkırdak, doku mühendisliğı, alginat, enkapsülasyon, üç-boyutlu kültür, TGF- $\beta$ , biyoreaktör

## **ABSTRACT**

**Master Thesis**

### **ENGINEERING OF CARTILAGE TISSUE BY USING ISOLATED RAT CHONDROCYTES AND POLYMERIC BIOMATERIALS**

**Nuray EMİN**

**Supervisor: Prof. Dr. Y. Murat ELÇİN**

The chondrocytes were aseptically isolated from the articular cartilage of Wistar rats by enzymatic digestion, were proliferated under three-dimensional static and dynamic culture, as well as in parallel control monolayer culture. Calcium alginate fibers were used to simulate the three-dimensional environment. Isolated cells were placed inside the rotating bioreactor after that encapsulated with alginate hydrogel, and effects of dynamic culture conditions and TGF- $\beta$  were investigated. Static three-dimensional and monolayer cultures served as the controls.

For the proliferation of chondrocytes without dedifferentiation in *in vitro* culture conditions, the culture medium consisted of DMEM containing 20% FCS, non-essential amino acids, L-glutamine, ascorbic acid, ITS<sup>+</sup>, antibiotics-antimicrobics solution and TGF- $\beta$  was used. Results demonstrated that the rat chondrocytes had higher proliferation ability without dedifferentiation, in TGF- $\beta$ -containing chondrogenic medium.

Immunohistochemistry studies revealed that while the chondrocytes in static 3D-culture expressed some level of collagen type-I, their collagen type-II expression was more intense in the bioreactor 3D-culture group. On the other hand, the control monolayer cultures did express collagen type-I, but expressed a low level of collagen type-II throughout the culture. Studies indicated that the chondrocytes-encapsulated with calcium alginate in TGF- $\beta$ -containing chondrogenic medium showed much better results, in terms of collagen type-II and aggrecan staining under dynamic culture conditions in the STLV bioreactor. The uniform and strong staining of the matrix with the antibody against collagen type-II confirms specificity to hyaline cartilage and redifferentiation into the native cartilage tissue of the cultured constructs.

**2006, 81 pages**

**KEY WORDS:** Chondrocyte, cartilage, tissue engineering, alginate, encapsulation, three-dimensional culture, TGF- $\beta$ , bioreactor.

## TEŞEKKÜR

Bana tez konusunu veren, tez çalıőmasını yürütmemde bilgileriyle yol gösteren ve gerekli tüm olanakları sağlayan danışman hocam Prof. Dr. Y. Murat ELÇİN'e,

Histokimya ve immünhistokimya çalıőmalarındaki katkılarından dolayı değerli hocam Yrd. Doğ. Dr. A. Eser ELÇİN'e,

Ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen Aileme teőekkürlerimi sunarım.

Nuray EMİN

ANKARA, Ağustos 2006

Bu tez alıőması Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü tarafından desteklenen BT-153 numaralı proje kapsamında yürütülmüştür.

1.4.1.1 Otolog Hücre Nakli .....	6
1.4.1.2 Hücre-Polimer Modeli .....	7
1.4.1.3 Dinamik kültür şartları .....	7
1.4.1.3.1 Spinner flask (döner kap) .....	8
1.4.1.3.2 Mikrotaşıyıcı destekli reaktörler .....	8
1.4.1.3.3 Perfüzyon kültürler .....	8
1.4.1.3.4 Döner duvarlı biyoreaktörler .....	9
1.4.1.3.5 Dinamik kültür şartlarının avantajları .....	11
1.4.1.4 Kıkırdak doku mühendisliğinde kullanılan polimerler .....	11
1.4.1.4.1 Sentetik polimerler .....	13
1.4.1.4.2 Doğal polimerler .....	13
1.4.1.4.3 Hidrojeller .....	14
1.4.1.4.4 Biyomimetik polimerler .....	15
1.4.2 Ortopedik ameliyatlar .....	16
<b>2. KONDRONEZİ ETKİLEYEN FAKTÖRLER .....</b>	<b>18</b>

2.1 Uyarıcı Moleküller .....	18
2.2 Hücre Dışı Matriks Molekülleri .....	19
2.2.1 Yapısal proteinler .....	20
2.2.1.1 Kollajen lifler .....	21
2.2.2 Özelleşmiş proteinler .....	23
2.2.2.1 Fibronektin .....	23
2.2.2.2 Vitronektin .....	24
2.2.2.3 Laminin .....	25
2.2.3 Proteoglikanlar .....	26
2.2.3.1 Agrekan .....	27
2.2.3.2 Kıkırdak orta tabaka proteini (CILP) .....	28
2.2.3.3 Kıkırdak oligomerik matriks proteini (COMP) .....	28
2.3 HDM Moleküllerinin Kıkırdak Dokusu İçin Önemi .....	29
2.4 HDM Moleküllerinin <i>In Vitro</i> Kondrosit Kültürüne Etkisi .....	30
<b>3. MATERYAL ve METOT .....</b>	<b>32</b>

3.1 Kimyasallar ve Reaktifler .....	32
3.2 Sodyum Alginat Çözeltisinin Hazırlanması .....	33
3.3 Kalsiyum Klorür Çözeltisinin Hazırlanması .....	33
3.4 TGF- $\beta$ 'nın Porsiyonlanması .....	33
3.5 Hücre İzolasyonu .....	34
3.6 Hücre Kültürü .....	34
3.6.1 Tek tabakada (iki-boyutta) kültür işlemi .....	35
3.6.2 Alginat liflerin içerisine hücrelerin tutuklanması .....	36
3.6.3 Dinamik kültür işlemi .....	37
3.6.3.1 Biyoreaktörün hazırlanması .....	37
3.6.3.2 RCCS-STLV reaktör sisteminde kültür işlemi .....	38
3.7 İvert Mikroskop ile Hücrelerin İncelenmesi .....	39
3.8 Mitokondriyal Dehidrojenaz Aktivitelerinin Belirlenmesi .....	39
3.9 Histokimya ve İmmünohistokimya .....	40
3.9.1 Örneklerin hazırlanması .....	40

3.9.2 Histokimya .....	40
3.9.2.1 Safranin-O boyaması .....	41
3.9.2.2 Alsiyan Mavisi ile boyama .....	43
3.9.3 İmmünohistokimya .....	43
<b>4. ARAŞTIRMA BULGULARI .....</b>	<b>45</b>
4.1 Enzimatik İzolasyon ve Hücre Sayımı .....	45
4.2 İvert Mikroskop İncelemeleri .....	45
4.2.1 Hücre miktarı .....	46
4.2.2 Hücre morfolojisi .....	47
4.3 Mitokondriyal Dehidrojenaz Aktivitesi (MTT Testi) .....	48
4.3.1 Statik üç-boyutlu kültür .....	48
4.3.2 Dinamik kültür .....	51
4.4 Histokimya .....	53
4.5 İmmünohistokimya Boyamaları .....	56
<b>5. TARTIŞMA ve SONUÇ .....</b>	<b>63</b>



## İÇİNDEKİLER

<b>ÖZET</b> .....	i
<b>ABSTRACT</b> .....	ii
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	iii
<b>SİMGELER DİZİNİ</b> .....	x
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	xii
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b> .....	xvi
<b>1. GİRİŞ</b> .....	1
1.1 Kıkırdak Dokusunun Yapısı .....	2
1.1.1 Kıkırdak hücreleri .....	3
1.1.2 Kıkıradak dokusunun gelişimi .....	3
1.2 Kıkırdak Dokusunun Önemi .....	4
1.3 Kıkırdak Dokusunda Karşılaşılan Rahatsızlıklar .....	5
1.4 Kıkırdak Dokusu Tedavi Yöntemleri .....	5
1.4.1 Doku mühendisliği yaklaşımı ile kıkırdak dokunun üretilmesi .....	6

5.1 Kondrojeneze TGF- $\beta$ 'nın Etkisi .....	65
5.2 Üç-Boyutlu Ortamın Önemi .....	66
5.3 Tek Tabakada (İki-Boyutta) Kültür İşleminin Sonuçları .....	71
5.4 Dinamik Kültür Şartlarının Etkisi .....	72
5.5 Sonuç .....	73
<b>KAYNAKLAR</b> .....	75
<b>ÖZGEÇMİŞ</b> .....	81

## SİMGELER DİZİNİ

HDM	Hücre Dışı Matriks
STLV	Slow Turning Lateral Vessel
RCCS	Rotational Cell Culture System
TGF- $\beta$	Transforming Growth Factor- $\beta$
FGF	Fibroblast Growth Factor
IGF	Insulin like Growth Factor
GAG	Glikoz amino Glikanlar
FCS	Fetal Calf Serum
ITS	İnsulin-Transferrin-Selenoik acid
DMEM	Dubecco's Modified Eagles Medium
PFA	Paraformaldehit
PLGA	Poli(Laktik-ko-glikolik asit)
PLA	Polilaktik asit
PGA	Poliglikolik asit

HA	Hiyalüronik asit
RGD	Arjinin-Glisin-Asparagin
MMP	Matriks Metallo Proteazı
CILP	Cartilage Intermediate Layer Protein
COMP	Cartilage Oligomeric Matrix Protein

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1 Hiyalin kıkırdak dokusu .....	2
Şekil 1.2 a. Mezenkimal hücreler, b. Mezenkimal hücrelerin farklılaşması ile oluşan kondroblastlar, c. Kondroblastlar kendi HDM'lerini sentezlemeye başlayarak birbirlerinden uzaklaşmaya başlar ve olgunlaşarak kondrositleri oluşturur, d. Kondrositler kendi lakünleri içerisinde çoğalarak izogen hücre gruplarını oluşturur (Junqueira <i>et al.</i> 1993). .....	3
Şekil 1.3 RCCS-STLV biyoreaktör sistemi .....	9
Şekil 1.4 RCCS-STLV biyoreaktör sisteminin çalışma prensibi .....	10
Şekil 2.1 Kıkırdak dokusunun yapısı ve HDM bileşimi .....	20
Şekil 2.2 Fibronektinin yapısı .....	23
Şekil 2.3 Lamininin yapısı .....	25
Şekil 3.1 RCCS-STLV biyoreaktör sistemi .....	37
Şekil 4.1 İki boyutlu TGF- $\beta$ içermeyen kültür a. 0. gün ve c. 28. gün. İki boyutlu TGF- $\beta$ içeren kültür b. 0.gün ve d. 28. gün .....	46
Şekil 4.2 İki-boyutlu kültür a. 0. gün ve b. 21. gün .....	47
Şekil 4.3 a. 21. Günde TGF- $\beta$ içermeyen kültür hücreleri ve b. TGF- $\beta$ içeren kültür hücreleri .....	47

Şekil 4.4 TGF- $\beta$ içermeyen statik üç-boyutlu kültürün MTT testi sonucunda 570 nm'deki absorbands değerlerinin kültür süresince değişimi .....	49
Şekil 4.5 Statik olarak yürütülen alginat liflere tutuklanmış kondrosit kültürünün a. 7. ve b. 21. gününde yapılan MTT testi sonucu formazan kristallerinin oluşumu .....	49
Şekil 4.6 TGF- $\beta$ içeren statik üç-boyutlu kültürün MTT testi sonucunda 570 nm'deki absorbands değerlerinin kültür süresince değişimi. ....	50
Şekil 4.7 Statik olarak yürütülen ve TGF- $\beta$ içeren alginat lifi-kondrosit kültürünün a. 7. ve b. 21. gününde yapılan MTT testi sonucu formazan kristallerinin oluşumu .....	50
Şekil 4.8 TGF- $\beta$ içermeyen dinamik üç-boyutlu kültürün MTT testi sonucunda 570 nm'deki absorbands değerlerinin kültür süresince değişimi.....	51
Şekil 4.9 Dinamik olarak yürütülen alginat liflere tutuklanmış-kondrosit kültürünün a. 7. ve b. 21. gününde yapılan MTT testi sonucu formazan kristallerinin oluşumu .....	52
Şekil 4.10 TGF- $\beta$ içeren dinamik üç-boyutlu kültürün MTT testi sonucunda 570 nm'deki absorbands değerlerinin kültür süresince değişimi .....	52
Şekil 4.11 Dinamik olarak yürütülen ve TGF- $\beta$ içeren alginat lif içerisine tutuklanmış kondrosit kültürünün 7. ve 21. gününde yapılan MTT testi sonucu formazan kristallerinin oluşumu .....	53
Şekil 4.12 Kalsiyum alginat liflerde tutuklanmış 28 günlük sıçan artiküler kondrosit kültürlerinin Alsiyan mavisıyla boyanmış mikrograf görüntüleri. a, b: TGF- $\beta$ içermeyen dinamik kültür; c, d: TGF- $\beta$ içeren dinamik kültür .....	54
Şekil 4.13 Kalsiyum alginat liflerde tutuklanmış sıçan artiküler kondrosit kültürlerinin Safranin-O boyanmış mikrograf görüntüleri. a: TGF- $\beta$ (+) statik/14 gün; b: TGF- $\beta$ (+) dinamik/14 gün; c: TGF- $\beta$ (+) statik/21 gün; d: TGF- $\beta$ (+) dinamik/21 gün; e: TGF- $\beta$ (-) statik/28 gün; f: TGF- $\beta$ (-) dinamik/28 gün; g: TGF- $\beta$ (+) statik/28 gün; h: TGF- $\beta$ (+) dinamik/28 gün .....	55

Şekil 4.14 Doğal kıkırdak dokusunun anti-kollajen tip-2 ile boyanması sonucu HDM'deki kollajen tip-2 liflerinin görünümü .....	56
Şekil 4.15 Kalsiyum alginat liflerde tutuklanmış sıçan artiküler kondrosit kültürlerinin Kollajen tip-1 antikoruyla boyanmış mikrograf görüntüleri. a, b: TGF- $\beta$ (-) dinamik/7 gün; c, d: TGF- $\beta$ (-) dinamik/14 gün; e, f: TGF- $\beta$ (-) dinamik/21 gün .....	57
Şekil 4.16 Kalsiyum alginat liflerde tutuklanmış sıçan artiküler kondrosit statik kültürlerinin Kollajen tip-2 antikoruyla boyanmış mikrograf görüntüleri: a: TGF- $\beta$ (-) / 7 gün; b: TGF- $\beta$ (-) / 21 gün; c: TGF- $\beta$ (+) / 7 gün; d: TGF- $\beta$ (+) / 21 gün .....	58
Şekil 4.17 Kalsiyum alginat liflerde tutuklanmış sıçan artiküler kondrosit dinamik kültürlerinin Kollajen tip-2 antikoruyla boyanmış mikrograf görüntüleri: a: TGF- $\beta$ (-) / 7 gün; b: TGF- $\beta$ (-) / 21 gün; c: TGF- $\beta$ (+) / 7 gün; d: TGF- $\beta$ (+) / 21 gün .....	59
Şekil 4.18 Statik ve dinamik kültür şartlarında 28 gün süreyle kültürü yapılan ve kalsiyum alginat liflerde tutuklanmış sıçan artiküler kondrositlerinin kollajen tip-2 antikoruyla boyanmış mikrograf görüntüleri: a: statik / TGF- $\beta$ (+); b: dinamik / TGF- $\beta$ (+) .....	59
Şekil 4.19 Kalsiyum alginat liflerde tutuklanmış sıçan artiküler kondrosit statik kültürlerinin agrekan antikoruyla boyanmış mikrograf görüntüleri: a: TGF- $\beta$ (-) / 7 gün; b: TGF- $\beta$ (-) / 21 gün; c: TGF- $\beta$ (+) / 7 gün; d: TGF- $\beta$ (+) / 21 gün .....	61
Şekil 4.20 Kalsiyum alginat liflerde tutuklanmış sıçan artiküler kondrosit dinamik kültürlerinin agrekan antikoruyla boyanmış mikrograf görüntüleri: a: TGF- $\beta$ (-) / 7 gün; b: TGF- $\beta$ (-) / 21 gün; c: TGF- $\beta$ (+) / 7 gün; d: TGF- $\beta$ (+) / 21 gün .....	62
Şekil 4.21 Kalsiyum alginat liflerde tutuklanmış sıçan artiküler kondrosit kültürlerinin agrekan antikoruyla boyanmış mikrograf görüntüleri: a: TGF- $\beta$ (+) / 28 gün; b: TGF- $\beta$ (+) / 28 gün .....	62
Şekil 5.1 Sodyum alginat .....	68

Şekil 5.2 Kalsiyum alginatın yapısı. Ortamda kalsiyum iyonu gibi iki değerlikli katyonların olması durumunda, alginat jeli yakın zincirler üzerinde bulunan  $\alpha$ -L-guluronik asit monomerleri arasındaki kalsiyum köprüleri üzerinden iyonik olarak çapraz bağlanır (egg box yapısı).....68

Şekil 5.3 Kalsiyum alginatın küre ve lif yapısının şematik görünümü. Koyu gri olarak görünen dış kısımlarda kalsiyum iyonları ile etkileşim daha fazla olduğu için çapraz bağlanmalar daha fazladır. İçi kısımlarda (açık gri bölgeler) çapraz bağlanmalar daha azdır .....69



## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Kollajen tipleri ve bazı özellikleri .....	22
Çizelge 2.2 GAG'ların kompozisyonu, bağ dokusundaki dağılımı ve kollajen lifler ile olan ilişkisi .....	26
Çizelge 3.1 Yürütülen kültür şartları .....	34

## 1. GİRİŞ

Kıkırdak, özelleşmiş bir bağ dokusunun çeşididir. Hiyalin, elastik ve fibröz olmak üzere üç tip kıkırdak dokusu bulunmaktadır. Kıkırdağın ana görevi yumuşak dokuyu desteklemek olup, yapısının düzgün yüzeyli ve esnek olması eklem yüzeylerinin, darbe emici ve kaygan olmasını sağlar ve böylece eklemlerin hareket yeteneğini kolaylaştırır. Ayrıca doğum öncesi ve sonrasında uzun kemiklerin oluşum ve gelişiminde rol almaktadır (Murathanoğlu,1996).

Yaralanmalar ve hastalıklar nedeniyle çeşitli dejeneratif hastalıklar bu doku tipinde sıkça gözlenmektedir. Bu amaçla geliştirilen çeşitli ortopedik ve hücreye dayalı teknikler gerekli olan tedaviyi tam olarak sağlayamamaktadır. Bu nedenle son yıllarda doku mühendisliği yaklaşımıyla üç-boyutlu biyobozunur ve biyoyumlu polimerik yapıların ve dokulardan izole edilen hücrelerin kullanımıyla laboratuvar ortamında kıkırdak dokusunun üretilmesine çalışılmaktadır. Bu amaçla farklı yapıdaki ve özellikteki polimerik malzemeler test edilerek kullanılmakta ve kültür şartları bu uygulamalara göre optimize edilmektedir.

Yapmış olduğumuz bu çalışmada sıçan femora-patellar diz ekleminden izole edilen kondrositlerin *in vitro* olarak çoğaltılmasında ve rejenere kıkırdak dokusunun elde edilmesinde üç-boyutlu hidrojel yapıları polimerik biyomalzemeler ve biyoreaktör sistemi kullanılarak kondrogenез için uygun kültür şartlarının belirlenmesi amaçlanmaktadır.

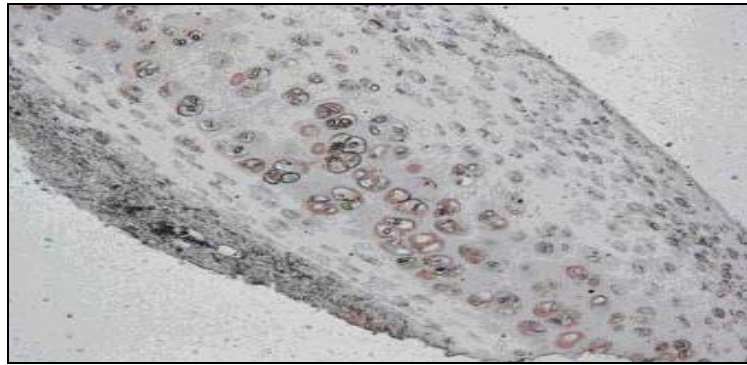
Kıkırdak doku, yaşam süresince sürekli olarak bir takım gerilim ve gerinim kuvvetlerinin etkisi altındadır. Bu nedenle laboratuvar ortamında doku mühendisliği yaklaşımı ile üretilen rejenere kıkırdak doku, doğal kıkırdak doku ile tam bir uyum göstermemektedir. Bu sorunun giderilmesi için çeşitli biyoreaktör sistemleri üzerinde çalışmalar yürütülmektedir. Bu amaçla NASA tarafından geliştirilen ve çalışmalarımızda kullandığımız döner duvarlı hücre kültür kapları hücreler için yüzey gerilimini azaltmakta ve besin difüzyonunu kolaylaştırarak hücrelerin daha fazla metabolik aktivite göstermelerini sağlamaktadır.

## 1.1 Kıkırdak Dokusunun Yapısı

Kıkırdak, çok bol miktardaki hücre dışı matriks içine gömülü olan kıkırdak hücreleri tarafından oluşturulmuştur. Kıkırdak dokusunun oluşum aşamalarına ve gelişim mekanizmasına *kondrogenez* denilmektedir.

Doku içerisinde Hücre Dışı Matriks (HDM) oldukça sıkı bir kıvam göstermektedir (Şekil 1.1). HDM kıkırdak dokusuna, mekanik zorlamalar karşısında kalıcı şekil bozukluklarına yol açılmaması için gereken esnekliği kazandırmaktadır (Vacanti and Vacanti 1997).

Kıkırdak dokusu avasküler yapıya sahiptir. Buna bağlı olarak kan ve lenf kapillerleri ile sinir hücrelerini içermemektedir. Beslenmesi, komşu bağ dokusundaki (perikondrium) kapillerlerden ve eklem kaviteilerinin sinoviyal sıvısından difüzyonla gerçekleşmektedir. Bütün avasküler dokularda olduğu gibi, kıkırdak hücreleri de düşük metabolik aktivite göstermektedir. Kan kapillerlerinin olmayışı nedeniyle kondrositler, düşük oksijen konsantrasyonlarında solunum yapmak zorundadırlar. Bu nedenlerden ötürü kıkırdak dokusunun kendini yenileme ve tamir etme yeteneği çok düşüktür (Reinholz *et al.*2003).



Şekil 1.1 Hiyalin kıkırdak dokusu

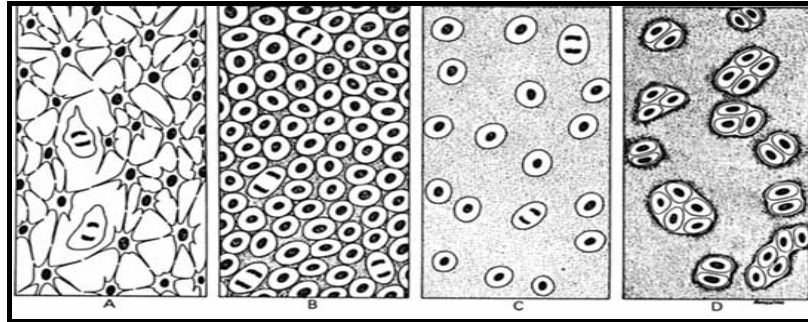
Hiyalin kıkırdak hücreleri, glikozu genellikle anaerobik glikoliz ile metabolize ederek son ürün olarak laktik asidi oluşturmaktadır. Kandaki besin maddeleri perikondriumdan daha derinlerde bulunan kondrositlere, difüzyonla geçmektedir. Bu

nedenle kıkırdığın maksimum kalınlığı sınırlıdır (Angel *et al.* 2003). Besin maddeleri çözücü olarak matrikste serbest suyu kullandığı için matrikste, hemen hemen hiç serbest su molekülü bulunmamaktadır (Junqueira *et al.* 1993).

### 1.1.1 Kıkırdak hücreleri

Kıkırdak dokusunda iki tip hücre bulunmaktadır. Ancak bu hücreler bilim adamları tarafından aynı hücrenin iki farklı evresi olarak kabul görmektedir. Bu hücrelerden *kondroblastlar* genç kıkırdak hücrelerini, *kondrositler* ise olgun kıkırdak hücrelerini temsil etmektedir (Murathanoğlu,1996).

Kıkırdak dokusu, embriyonik evrede mezenkimal hücrelerin kondroblastlara farklılaşması ile oluşmaktadır.



Şekil 1.2 a. Mezenkimal hücreler, b. Mezenkimal hücrelerin farklılaşması ile oluşan kondroblastlar, c. Kondroblastlar kendi HDM'lerini sentezlemeye başlayarak birbirlerinden uzaklaşmaya başlar ve olgunlaşarak kondrositleri oluşturur, d. Kondrositler kendi lakünleri içerisinde çoğalarak izogen hücre gruplarını oluşturur (Junqueira *et al.* 1993).

### 1.1.2 Kıkırdak dokusunun gelişimi

Doğumdan itibaren kıkırdak dokusunun gelişimi *interstisyel* ve *apozisyonel* olmak üzere iki şekilde olmaktadır. Çocukluk döneminde gözlenen *interstisyel* büyüme, mevcut olan

kondrositlerin mitotik bölünmeleri ile gerçekleşmektedir. Çocukluk döneminden sonraki yaşlarda gözlenen *apozisyonel* büyüme ise, perikondriumdaki hücrelerin farklılaşması ile gerçekleşmektedir. Eklem kıkırdağında, apozisyonel hücre ekleyecek bir perikondrium olmadığı için eklem yüzeyindeki, zamanla yıpranan hücreler ve matriks, kıkırdağın iç kısımlarından takviye edilmektedir (Junqueira *et al.* 1993).

Her iki durumda da yeni oluşan kondrositler, kollajen liflerin ve temel maddelerin sentezini gerçekleştirmektedir. Böylece büyüme, basit bir hücre artışından daha kompleks bir şekilde gerçekleşmektedir (Sağlam vd. 2001).

İnterstisyel, kıkırdak gelişiminin ilk dönemlerinde, kıkırdak matriksinin içten dışa doğru genişlemesi sırasında ortaya çıkar. Ayrıca uzun kemiklerin epifizyal kıkırdaklarında ve eklem kıkırdağında da görülmektedir. Uzun kemiklerin uzamasını sağlayan epifizyal plaklarda ve endokondral kemik gelişimindeki kıkırdak modelinin ortaya çıkmasında rol oynamaktadır.

Eklem kıkırdağında, apozisyonel hücre ekleyecek bir perikondrium olmadığı için eklem yüzeyindeki, zamanla yıpranan hücreler ve matriks, kıkırdağın iç kısımlarından takviye edilir. Vücudun diğer bölgelerinde bulunan kıkırdaklarda ise, matriks zamanla sertleşince interstisyel büyüme azalır ve kıkırdak bir bant halinde sadece apozisyonel olarak büyür. Apozisyonel büyümede, perikondriumun kondroblastları çoğalarak etraflarını bir matriks ile sardıktan sonra, kondrosit haline dönüşerek mevcut kıkırdağa eklenirler (Junqueira *et al.* 1993).

## **1.2 Kıkırdak Dokusunun Önemi**

Kıkırdak dokusu destek materyali olarak önemli bir göreve sahiptir. Özellikle eklem bölgelerinde bulunan kıkırdak dokusu, eklem rahat hareket etmesini sağlayarak kişiye büyük bir hareket kolaylığı sağlamaktadır. Bu bölgelerdeki kıkırdak dokusunda meydana gelebilecek hasarlar ağrılara neden olarak kişinin hareket yeteneğini büyük ölçüde kısıtlamakta ve yaşam standardını düşürmektedir.

Çok erken yaşlar dışında, tahrip olan kıkırdak güçlkle, çoğu kez de eksik olarak onarılmaktadır. Özellikle ileriki yaşlarda kıkırdak dokusunun yenilenme kapasitesi çok düşmektedir. Zedelenme durumunda önce bağ dokusu oluşmakta, daha sonra bu doku kıkırdak dokusuna dönüşmektedir (Reinholz *et al.* 2003).

Bir perikondriyuma sahip olan kıkırdak dokularında rejenerasyon, perikondriyumun faaliyeti ile gerçekleşmektedir. Kıkırdak hasar gördüğünde, perikondriyumdaki kondroblastlar, hasara uğramış bölgeye doğru ilerleyerek yeni kıkırdak dokusunu meydana getirmektedir (Junqueira *et al.* 1993).

### **1.3 Kıkırdak Dokusunda Karşılaşılan Rahatsızlıklar**

Kıkırdak dokusunda karşılaşılan belli başlı rahatsızlıklar; arterit (eklem iltihabı), kalıtsal anormallikler, travma, artroz (eklem yıpranması, yaşlanması), kalsifikasyon (hücre dışı matriksin mineralizasyonu, kireçlenme), ossifikasyon (kemikleşme), lifsel bozulma, iyi ve kötü huylu tümörlerdir. Ayrıca çeşitli yaralanmalar ve kazalar, kıkırdak dokusunda özellikle de eklem kıkırdağında hasara yol açmaktadır (Angel *et al.* 2003).

### **1.4 Kıkırdak Dokusu Tedavi Yöntemleri**

Estetik ve ortopedik ameliyatlara, doku transplantasyonu ve yapay protez uygulamaları günümüzde tedavi amacıyla uygulanan belli başlı yöntemlerdir. Bu yöntemlerin, avantajlarının yanı sıra birçok dezavantajı da bulunmaktadır (Angel *et al.* 2003). Ameliyatla tedavide, uzun vadede sıklıkla problemler ortaya çıkabilmektedir. Doku nakillerinde, donör doku bulma zorlukları, greftin bağışıklık sistemi tarafından reddedilmesi ve greftin boyutlarından ve tespitinden kaynaklanan teknik zorluklar gibi sorunlar gözlenmektedir. Ayrıca vücudun değişik bölgelerindeki kıkırdak dokularının, aynı mekanik dayanıma sahip olmamasından ötürü, özellikle ototransplantasyonlarda gerekli mekanik dayanımın sağlanmasında güçlüklerle karşılaşmaktadır (Anonim 1999).

### **1.4.1 Doku Mühendisliği Yaklaşımı ile Kıkırdak Dokunun Üretilmesi**

Doku mühendisliği son yıllarda biyoteknolojinin önemli bir alanı olarak hızlı bir gelişme göstermektedir (Elçin, 2003). Biyomalzemelerdeki önemli gelişmeler, yeni hücre kültürü teknikleri ve yeni bulunan ve önemi kanıtlanan büyüme faktörleri, hayati önem taşıyan nakledilebilir doku ve organların üretilebilmesi için yeni olanaklar sağlamaktadır (Vacanti and Vacanti, 1997).

Son yıllarda, doku mühendisliği yaklaşımıyla üretilen kıkırdak dokusu, uygulamada olan tedavilere alternatif olarak geliştirilmektedir. Doku mühendisliği yaklaşımıyla kıkırdak doku üretiminde üzerinde çalışılan iki yöntem bulunmaktadır.

Bunlardan birincisi; vücut dışında çoğaltılan kıkırdak hücrelerinin kullanımı (*hücre transplantasyonu*); ikincisiyse kıkırdak hücrelerinin,üç-boyutlu biyobozunur destek materyalleri üzerinde üretilmesidir (*hücre-polimer modeli*) (Elçin, 2004).

#### **1.4.1.1 Otolog hücre nakli**

Hasarlı dokunun tamiri için kıkırdak hücrelerinin ya da progenitör (öncü) hücrelerin hasarlı bölgeye nakline, kıkırdak hücre nakli adı verilmektedir. Kıkırdak hücrelerinin nakli üzerine yapılan çalışmalar 1968 yılında başlamıştır. Ancak hücrelerin kendi hücre dışı matrikslerini (HDM) oluşturana kadar, hasarlı bölgede tutulmasında karşılaşılan zorluklar nedeniyle başarı oranı %40'ın altında kalmıştır (Anonim 1999).

İlk olarak 1987 yılında İsveç'te uygulanan otolog kondrosit transplantasyonu çalışmaları ise, günümüzde tamamen fonksiyonel olan yeni kıkırdak dokusunun, çeşitli polimer iskeletler ve biyoreaktörler kullanılarak üretilmesi amacına yönelik olarak devam etmektedir.

### 1.4.1.2 Hücre-Polimer Modeli

Hücre naklinde, hücrelerin hasarlı bölgeye istenilen şekilde ve boyutta ulaştırılmaması durumunda, yapılan çalışmanın hiçbir anlamı kalmamaktadır. Bu amaçla, hücre naklinde kullanılmak üzere oldukça yüksek düzeyde gözeneğe sahip destek materyallerinin kullanımını içeren hücre-polimer modeli geliştirilmiştir (Freed *et al.* 1994). Hücre-polimer modelinde kıkırdak dokusundan elde edilen hücreler, sentetik ya da doğal yapıya sahip, biyolojik ortamda bozunan (biyobozunur) polimerik destek malzemeleri üzerine tohumlanmaktadır (Elçin and Elçin, 2006). Bu destek malzemeleri, *in vitro* olarak kültüre edilen kıkırdak hücrelerinin, bağlanıp gelişebilmesi için gerekli olan yüzeyi sağlamaktadır. Ayrıca, kondrositlerin kendi matrikslerini üretene kadar tutunabilecekleri bir çeşit yapay HDM görevi görmektedir (Temenoff and Mikos, 2000).

Kültür işlemi, iki-boyutlu olarak yürütüldüğünde hücrelerin geriye doğru farklılaşarak (dediferansiye) kendi fenotipik özelliklerini kaybettiği gözlenmiştir. Buna karşın üç-boyutlu ortamlarda yani polimer iskeletlerde ve biyoreaktörlerde yürütülen kültürlerde, kondrositlerin dediferansiye olmadıkları ve kendi işlevlerine devam edebildikleri gözlenmiştir (Furukawa *et al.* 2003)

Yaklaşık olarak son 20 yıl içerisinde, doğal kıkırdağa çok yakın özelliklere sahip kıkırdak dokusunun gelişiminde önemli ilerlemeler kaydedilmiştir. Ancak bu teknolojiyi, klinik boyutlara taşımak için üretimi büyük miktarlara çıkartmak ve rutine geçebilecek bir yöntem geliştirmek için çalışmalar devam etmektedir.

### 1.4.1.3 Dinamik kültür şartları

Doku mühendisliğinde kullanılan üç-boyutlu ortamlar ya da sadece hücreler doku kültür kaplarında statik olarak kültüre edilebilecekleri gibi karıştırmalı ve besin ile oksijen difüzyonunun sağlandığı biyoreaktör yapıları kullanılarak dinamik şartlar altında da kültüre edilebilmektedir (Emin *et al.* 2004). Kullanılabilirliği araştırılan belli başlı



reaktör türleri; spinner flask, mikrotarıyıcı-destekli reaktörler, perfüzyon kültür sistemi ve döner-duvarlı biyoreaktörlerdir (Darlig and Athanasiou, 2003).

#### **1.4.1.3.1 Spinner flask (döner kap)**

En basit biyoreaktör modellerinden biridir. Kondrositlerin ekildiği destek materyal, kabın tıpasından sarkan çubuklara tutturulur ve materyallerin tamamını kaplayacak şekilde besi ortamı ilave edilerek manyetik karıştırıcı ile reaktörün karışması sağlanır. Yüksek besin konsantrasyonu sağlamak için besi ortamı birkaç günde bir değiştirilir. Freed ve grubu tarafından yapılan çalışmalar, spinner flasklarda 5 hafta sonunda elde edilen dokuların petri kaplarındakine göre daha kalın ve geniş olduğunu göstermiş bulunuyor.

#### **1.4.1.3.2 Mikrotarıyıcı-destekli reaktörler**

Bu tür reaktörler doku üretimi için değil, büyük-ölçekli kondrosit kültürü elde etmek için kullanılmaktadır. Genellikle kollajen veya dekstran yapısındaki mikro küreler (150-300 µm çapında), sürekli karıştırmalı bir reaktörde, besi ortamı içerisinde asılı durumda tutulur ve kondrositler de reaktöre eklenir. Mikro taşıyıcılara yapışan hücreler burada üreyerek çoğalırlar. Devamlı besi ortamı değiştirilir. Yapılan çalışmalar, hücre üreme hızının petri kaplarındakine göre 2 kattan daha fazla olduğunu göstermiştir. Karıştırmadan kaynaklanan kayma gerilimlerini ortadan kaldırmak için mikro taşıyıcılar, akışkan yatak ya da hava-kaldırmalı reaktörler de kullanılabilir.

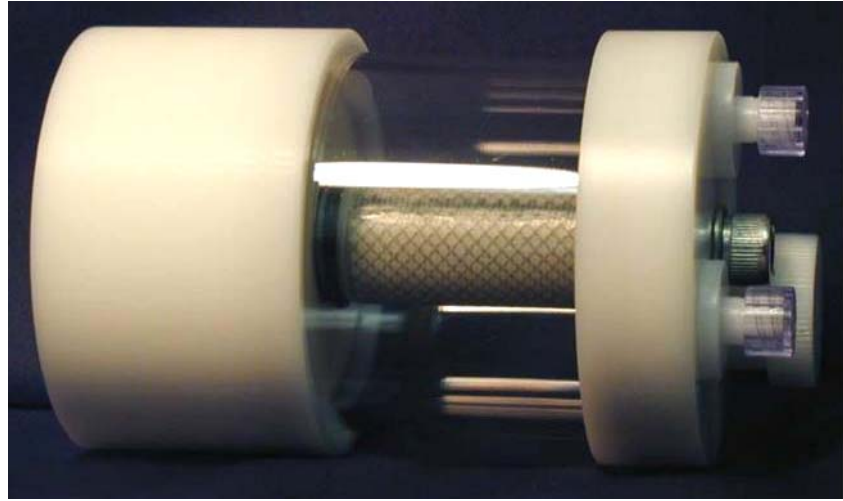
#### **1.4.1.3.3 Perfüzyon kültürler**

Hücreler destek materyallerine ekilerek reaktöre yerleştirilir. Sonra besi ortamı bir peristaltik pompa yardımıyla belli bir akış hızında reaktöre gönderilir ve atık ürünler de bir çıkış kanalından reaktörü terk ederler. Böylelikle karışma hızının istenmeyen etkisi de ortadan kaldırılmış olur.

#### 1.4.1.3.4 Döner-duvarlı biyoreaktörler

Bu biyoreaktörler, mekanik karıştırma olmaksızın mikrotaşıyıcılarla veya destek materyallerle kullanılabilen döner-duvarlı biyoreaktörlerdir (Emin *et al.* 2005). Bu reaktör, NASA tarafından mikrogravite etkilerine benzer olarak tasarlanmıştır (Şekil 1.3). Reaktör eş merkezli iki silindirden oluşur. Sabit duran iç silindir gaz alışverişini sağlayacak bir zara sahiptir. Geçirgen olmayan bir materyalden yapılmış dış silindir ise döner. İki silindir arasındaki boşluğa sürekli olarak besin sıvısı gönderilir. Önceden hücre ekilmiş destek materyaller veya kondrosit-mikrotaşıyıcılar, reaktöre yerleştirilerek doku veya hücre üretimi gerçekleştirilir (Freed *et al.* 1997).

NASA tarafından geliştirilen ve mikrograviteyi sağlayan döner duvarlı biyoreaktör sistemi (RCCS-STLV) tüm biyoreaktör sistemleri içerisinde özellikle dikkat çekmektedir (Freed *et al.* 1997). Bu sistemde karıştırma yapının dönmesi ile sağlanmakta, bu ise karıştırmadan kaynaklanan kayma gerilimini azaltmaktadır (Unsworth and Lelkes, 1998).

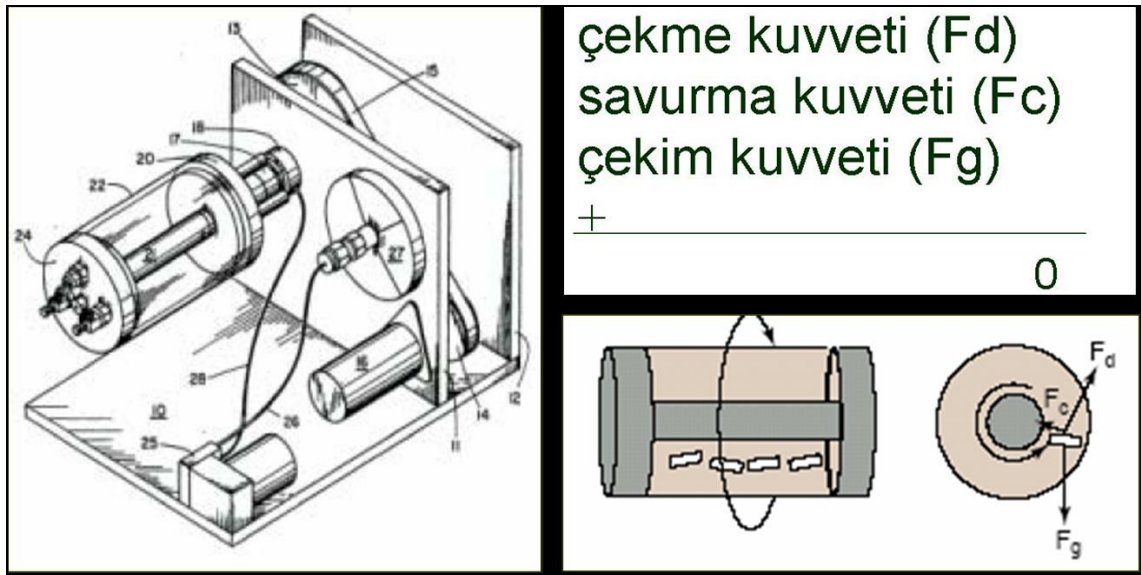


Şekil 1.3 RCCS-STLV biyoreaktör sistemi

RCCS-STLV biyoreaktör sistemi, yapıya etki eden kuvvetlerin bileşkesi sıfır olacak şekilde dizayn edilmiştir ve yerçekimsiz ortamı bu şekilde sağlamaktadır (Şekil 1.4). Bu

biyoreaktör sistemi, yapmış olduğumuz çalışmada dinamik kültür şartlarının sağlanması için kullanılmıştır .

Hücreler ya da polimerik biyomalzemeler reaktör içerisindeki besin sıvısında askıda kalmaktadır. Bu ise bir çeşit üç-boyutlu ortam sağlamakta ve var olan üç-boyutlu ortamı desteklemektedir. Bu koşulun sağlanmasından dolayı HDM sentezinin artması söz konusudur.



Şekil 1.4 RCCS-STLV biyoreaktör sisteminin çalışma prensibi

İstenilen boyutlara sahip doku üretiminde RCCS-STLV biyoreaktörlerinin kullanımıyla, diğer tekniklere göre önemli avantajlar sağlanacağı düşünülmektedir. İleri sürülen bu avantajlar:

1. Kültür ortamında homojen bir karıştırmanın ve hassas kontrolün sağlanması,
2. Besin düzeylerinin ve pH değerinin sabit tutulması,
3. Çoğu biyoreaktör modelinde, karıştırmadan kaynaklanan “kayma geriliminin” engellenebilmesi ve mikro yerçekimli bir ortam sağlanması şeklinde sıralanabilir.

Destek malzemesinin üç-boyutlu olması, dokunun şekillendirilebilmesi ve gelişimi için önemli bir parametredir (Freed, 1998). İki-boyutlu tek tabaka kültürlerde fenotipik özelliklerini kaybeden otolog kondrositlerin üç-boyutlu malzemelere ve kondrojenik vasat ortamına kullanılarak, kendi HDM'lerini oluşturacak şekilde dediferansiye olmaları sağlanabilmektedir (Sittinger *et al.* 1996). Mikrograviteyi sağlayan biyoreaktör sistemi de hücrelerin doku-spesifik olarak gelişmelerini uyarmaktadır (Unsworth and Lelkes, 1998).

#### **1.4.1.3.5 Dinamik kültür şartlarının avantajları**

Dinamik kültür şartlarının dolayısıyla biyoreaktörlerin sağladığı önemli avantajlar vardır (Vunjak-Novakovic *et al.* 1999) Bunlar:

1. Üç boyutlu ortamı destekler
2. Düzgün karıştırma ile gerilimi azaltır
3. Besin difüzyonunu kolaylaştırır
4. Proliferasyonu, rediferansiyasyonu uyarır
5. Matriks sentezini hızlandırır

#### **1.4.1.4 Kıkırdak doku mühendisliğinde kullanılan polimerler**

Hücre-polimer modelinde kullanılan destek materyali olarak pek çok polimer yapısında biyomalzeme test edilmiştir. Bu malzemeler, genel olarak doğal ve sentetik biyobozunur malzemeler olarak ikiye ayrılabilir (Reinholz *et al.* 2003). Doğal biyobozunur malzemeler; kollajen süngerleri ve jelleri, kollajen ve glikozaminoglikan (GAG) bileşikleri ve hiyalüronik asidi (HA) içerirler. Sentetik biyobozunan malzemeler

olarak; poliesterler, polilaktik asit, poliglikolik asit, Vicryl, Dacron ve bazı poliüretanlar sayılabilir (Freed *et al.* 1994).

Polimerik malzemelerin doku mühendisliğinde kullanılabilmesi için bazı özelliklere sahip olması gerekmektedir. Bu özelliklere sahip olmayan polimerlerin doku mühendisliği amacıyla vücut içerisinde kullanılması ciddi sorunlara neden olmaktadır. Bu özellikler en genel şekliyle aşağıda sıralanmıştır (Elçin, 2004).

1. *Biyobozunurluk:* Vücut içerisinde istenilen süre içerisinde doğal olarak parçalanmalı ve bu sayede hücrelere kendi HDM'lerini sentezlemeleri için gerekli olan zaman kazandırılmalıdır. Bu süre polimerin yapısına ve kullanılan hücre türüne göre değişmektedir. İhtiyaç duyulan süre uygun polimer kullanılarak ayarlanabilmektedir.
2. *Biyouyumluluk:* Vücut içerisinde hiçbir şekilde reaksiyona girmemeli; dokular için tamamen inert olmalı ve immünolojik tepkiye yol açmamalıdır. Ayrıca parçalanma ürünleri de vücuda zarar vermemeli, toksik etki göstermemelidir.
3. *Mekanik dayanım:* Mekanik etkiler nedeniyle parçalanıp dağılmamalıdır. Polimerik biyomalzeme doğal süreç içerisinde yavaş yavaş bozunarak kendisini oluşturan monomerlerine yıkılmalıdır.
4. *Uygun yüzey kimyası:* Kondrositler, fonksiyonlarını yerine getirebilmek için bir zemine bağlanmaya gereksinim duyan hücrelerdir. İzolasyonun ardından hücreler polimerik yapıya ekildiklerinde yapıya bağlanmaları gerekmektedir. Bu nedenle polimerin, hücrelerin bağlanması ve aktivite göstermesi için uygun yapıya sahip olması ve bunun için gerekli olan fonksiyonel grupları üzerinde taşıması gerekmektedir.
5. *Yüksek gözeneklilik:* Hücrelerin polimerik biyomalzemenin üzerine yerleşmesi, birbirleri ile etkileşmesi ve besin maddelerinin geçişi için yapının yüksek oranda

gözenekliliğe sahip olması gerekmektedir. Polimerik iskelet ya da sünger yapısı hazırlanırken uygun teknikler kullanılarak gözenek miktarı ve boyutu ayarlanabilmektedir.

Bu özellikleri taşıyan polimerlere biyopolimer denir. Doku mühendisliğinde kullanılan biyopolimerler genel olarak dört başlık altında toplanabilir.

#### **1.4.1.4.1 Sentetik polimerler**

Genellikle alfa-hidroksi asit polimerler sınıfında olan ve parçalanma ürünleri vücut tarafından sindirilerek uzaklaştırılabilen polimerlerdir (Sittinger *et al.* 1996). Bu amaçla en çok, PLGA, PGA, PLA, bazen de Vicryl, Dacron ve diğer bazı poliüretanlar kullanılmakla birlikte en çok üzerinde çalışılanlar ilk üç polimer türüdür ((Freed *et al.* 1994). Sentetik polimerler aşağıdaki özellikleri taşımaktadır (Reinholz *et al.* 2003).

1. Yüksek dayanıklılık
2. Biyobozunurluk ve biyouyumluluk
3. Zararsız parçalanma ürünü
4. Şekillendirme kolaylığı
5. İskelet ve süngerlerde yüksek gözeneklilik oranı
6. Uzun süreli uygulamalarda kullanım avantajı

#### **1.4.1.4.2 Doğal polimerler**

Doğal polimerler vücut ortamında bulunan polimerlerdir. Bu nedenle vücut tarafından reddedilme, toksik etki gösterme gibi sorunlara neden olmazlar. Doğal polimerler

arasında en çok kullanılanlar, kollajen ve jelatin ile kollajen-GAG ve kollajen-hiyalüronik asit kompozitleridir (Grande *et al.* 1997).

Doğal polimerlerin sahip olduğu özellikler arsında aşağıdakiler sayılabilir (Reinholz *et al.* 2003):

1. *Canlı ortamda bulunurlar:* Zehir etkisi olmaz
2. *Yüksek sıcaklıkta bozunma:* Şekillendirme güçlüğü
3. *Kaynağına bağlı olarak bileşimi değişmektedir:* İmmünolojik tepki
4. *Enzim varlığında bozunurlar:* Geçici (kısa süreli) uygulamalarda kullanım kolaylığı

#### **1.4.1.4.3 Hidrojeller**

Yapılarında yüksek oranda su tutabilen çapraz bağlı polimerlere hidrojel denilmektedir. Polimer çözeltisinin katyonik ortamda şelat oluşturacak şekilde polimerleşmesi ile oluşmaktadır (Knill *et al.* 2004). Yüksek oranda anyonik uç içermesi yapıya hidrofilik özellik kazandırmaktadır (Williams *et al.* 2003).

Polimerin ana zincirleri arasında yüksek oranda hidrojen bağları ve Van der Waals etkileşimleri bulunmaktadır ve bu etkiler nedeniyle hidrojeller çözünmezlik özelliği kazanmaktadır (Risbud *et al.* 2001). Hidrojellerin sahip olduğu özellikler kısaca aşağıda özetlenmiştir.

1. Ana zincirler arasında H-bağları/Van der Waals etkileşimleri vardır. Bu durum yapının stabilitesini artırmaktadır.
2. Su içeriği ile doğal dokulara benzerlik gösterir, yumuşaktırlar.

3. Biyolojik reaksiyonlara karşı inerttir.
4. Çevre dokulara sürtünmeleri azdır.
5. Bozunmaya karşı dirençlidir.
6. Kolay şekillendirme özelliğine sahiptir. İstenilen şekle sahip bir kalıp hazırlandıktan sonra polimer çözeltisi kalıp içerisine boşaltılır. Polimerizasyon, başladıktan çok kısa bir süre sonra tamamlanarak kalıbın şeklini almaktadır.
7. Hızlı polimerizasyon ve su absorplama yeteneğine sahiptir.
8. Besin maddeleri için yüksek geçirgenlik özelliğine ve gözenek yapısına sahiptir.
9. Yapıdaki suyun bir kısmı belirli büyüklükteki moleküller için difüzyon yolları sağlamaktadır.
10. Polimerik yapı büyük moleküllere, hücrelere ve bakterilere karşı bariyer görevi görmektedir.

Doku mühendisliğinde yaygın olarak kullanılan hidrojel yapısındaki polimerik biyomalzemeler hücre kültürlerinde tek başına kullanılabilir (Durkut *et al.* 2006). Ayrıca, farklı hidrojellerin birlikte kullanımıyla istenilen özelliklere daha üstün özellikli polimerik sistemlerde kullanılmaktadır (Elçin *et al.* 2003). Kıkırdak doku mühendisliğinde en çok kullanılan hidrojel yapısındaki polimerik malzemeler; alginat, kitosan ve bunların modifiye formlarıdır.

#### **1.4.1.4.4 Biyomimetik polimerler**

Biyomimetik polimerler doğal dokuların taklit yapıları olarak tanımlanmaktadır. HDM'de bulunan bazı sinyal proteinlerinin polimerik biyomalzemeyle etkileştirilmesi



ile hazırlanmaktadır. İlk yapılan çalışmalarda biyomimetik polimer hazırlanırken bu sinyal proteinlerinin tamamı polimer ile etkileştirilmekteydi. Ancak günümüzde, bu sinyal proteinlerinde bulunan ve hücrelerin birbirlerine ya da matriks bileşenlerine bağlanmasında görevli olan, özel bağlanma bölgeleri kullanılarak biyomimetik polimerler hazırlanmaktadır. Bu özel bağlanma dizilerinden en çok RGD (arginin-glisin-asparagin) bağlanma dizisi, biyomimetik polimerin hazırlanmasında kullanılmaktadır (Furukawa *et al.* 2003).

Biyomimetik polimerlerin sahip olduğu bazı özellikler aşağıda sıralanmıştır:

1. Doğal dokuların taklit yapısıdır.
2. HDM'de bulunan bazı sinyal proteinlerin, polimerin yapısına katılmasıyla hazırlanırlar.
3. Hücrelerin bağlanmasını kolaylaştırır.
4. Biyomoleküler tanıma özelliğine sahiptir.
5. Çevre dokular ile iletişim kurabilmektedir.

#### **1.4.2 Ortopedik ameliyatlar**

Sağlıklı kıkırdak dokusunun da bulunduğu küçük defektlerde otolog hücre transplantasyonu yapılabilmektedir. Bu yöntemle tedavi edilemeyecek daha büyük kıkırdak doku hasarlarında ise, halen üzerinde çalışmaların devam ettiği, doku mühendisliği ürünü hücre-polimer modeli yapılar kullanılmaktadır (Freed *et al.* 1993).

Doku mühendisliği yaklaşımı ile kıkırdak hasarlarının tedavisi, travmatik olmayan artrit, ossifikasyon, kalsifikasyon gibi hastalıklar sonucu oluşan hasarlara uygulanamamaktadır. Bunun nedeni doğal dokudaki hücrelerin yapısal farklılığa uğraması ve buna bağlı olarak matriks yapının geri dönüşülmez bir şekilde bozulmasından kaynaklanmaktadır (Reddi, 1994).

Sağlıklı doku miktarının yeterli olmadığı ya da doğal dokunun tamamının bozulduğu kıkırdak dokusu hasarlarında, ortopedik implantların kullanımı daha uygun görülmektedir. Bu tür uygulamalarda bozulan kıkırdak dokusu tamamen çıkartılarak yerine yapay biyolojik implant malzemeler yerleştirilmektedir (Angel *et al.* 2003).

Ameliyatla tedavide, uzun vadede sıklıkla problemler ortaya çıkabilmektedir. Doku nakillerinde, donör doku bulma zorlukları, greftin bağışıklık sistemi tarafından reddedilmesi ve greftin boyutlarından ve tespitinden kaynaklanan teknik zorluklar gibi sorunlar gözlenmektedir. Ayrıca vücudun değişik bölgelerindeki kıkırdak dokularının, aynı mekanik dayanıma sahip olmamasından ötürü, özellikle ototransplantasyonlarda gerekli mekanik dayanımın sağlanmasında güçlüklerle karşılaşmaktadır.

Kıkırdak doku tamirinde özellikle son yıllarda geliştirilen metal ve plastik eklem protezleri, eklem ağrılarını hafifletmek ve fonksiyonlarını yerine getirmek açısından büyük başarı sağlamıştır. Buna karşın, yapay olan bu protezlerde, zamanla aşınma ve enfeksiyon gözlenmekte ve fiziksel açıdan aktif kişilerde yeterli dayanım sağlanamamaktadır. Ayrıca implantasyon sırasında bu protezlerin dokuya tutunması da sorun teşkil etmektedir.

## 2. KONDROGENEZİ ETKİLEYEN FAKTÖRLER

### 2.1 Uyarıcı Moleküller

Organizmada, kondrositlerin fonksiyonu düzgün bir hormonal dengeye dayanmaktadır. Bu dengede meydana gelebilecek bir bozulma ve matriks sentezindeki anabolizma-katabolizma reaksiyonlarındaki dengesizlikler kıkırdak dokuda hasara neden olmaktadır. Kıkırdak dokusunun gelişimine ve fonksiyonlarına etki eden bazı sitokinler ve büyüme faktörleri aşağıda açıklanmıştır (Murathanoğlu, 1996).

*Somatotropin* : Kıkırdak büyümesi genel olarak hipofizden salgılanan büyüme hormonu somatotropine bağlıdır. Bu hormon, doğrudan doğruya kondrositleri etkilemez ancak karaciğerdeki somatomedin-C sentezini uyarır. Somatomedin-C (IGF-1) ise doğrudan kondrositleri etkileyerek büyümelerini kolaylaştırmaktadır (Junqueira *et al.* 1993).

*C vitamini* : Matriks üretimine özellikle kollajen üretimine uyarıcı etkisi vardır. Kollajenin yapısında bulunan hidroksilizin ve hidroksiprolin amino asitleri organizmada bu şekilde bulunmaz. Bu amino asitlerin hidroksilasyonu, sentezlenen kollajen peptidi minimum uzunluğa ulaştığında ve halen ribozomlara bağlı iken peptidil prolinhidroksilaz ve lizinhidroksilaz enzimleri tarafından gerçekleştirilir. Askorbik asit (C vitamini) ise bu enzimlerin kofaktörü olarak görev almaktadır.

*Trioksin ve Testosteron*: Sülfatlanmış GAG sentezini hızlandırır.

*D vitamini*: Kondrositlerin olgunlaşmasını ve matriks sentezini uyarır. Ancak kalsifikasyonu ve vasküler invazyonu da uyararak “hipertropik fenotipi” de destekler.

*Kortizon, Hidrokortizon, Estradiol*: Sülfatlanmış GAG sentezini geciktirir.

*FGF-2*: Kondrositlerin çoğalmasını uyarır. Hücrelerin hipertropik fenotipe farklılaşmasında kuvvetli bir baskılayıcı faktördür (Barbero *et al.* 2004).

*TGF-β* : TGF-β süper ailesi çok sayıda büyüme faktörü içermektedir. Bunların içinden TGF-β<sub>1</sub> ve TGF-β<sub>2</sub> kondrositlerin olgunlaşmasını ve çoğalmasını uymaktadır. Ayrıca vasküler invazyonu ve tümör oluşumunu önleyerek dokuyu korumaktadır.

TGF-β matriks moleküllerinin ekspresyonunu düzenler, fibronektin, proteoglikan, kollajen ve tenaskin üretimini uyarır. TGF-β'nın önemli bir etkisi de matriks moleküllerini degrade eden proteazlara karşı bunların inhibitörlerinin üretimini uyarmasıdır. Böylece proteazların matriks moleküllerini degrade ederek yapının stabilitesini ve bütünlüğünü bozmasına karşı dokuyu korumaktadır (Angel *et al.* 2003).

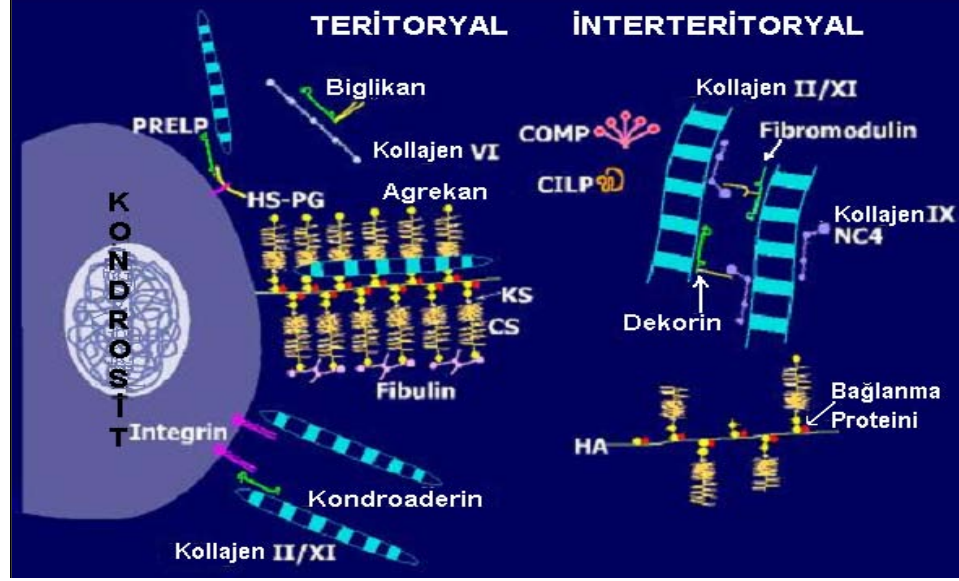
Yapısında kapiler içermeyen kıkırdak dokusu içerisinde bu uyarıcı moleküllerin bağlanarak fonksiyonlarını yapabilmesi ve matriks içerisinde depolanabilmesi için özel bağlanma bölgeleri bulunmaktadır.

## **2.2 Hücre Dışı Matriks Molekülleri**

HDM kıkırdak dokusunun önemli bir kısmını oluşturur Hücrelere besin ve gerekli maddelerin difüzyonla taşınması matriks aracılığı ile olmaktadır. Ayrıca dokunun yüksek baskı ve gerilimler ile osmotik basınca karşı korunmasında önemli bir göreve sahiptir.

HDM yüksek derecede su tutma kapasitesine sahiptir. Hücrelerin ihtiyaç duyduğu besin maddeleri ile kimyasallar matriks suyu içerisinde çözünerek taşınmaktadır. Bu nedenle matriks yapısındaki serbest su miktarı çok düşüktür (Angel *et al.* 2003). Ayrıca matriks içerisinde bulunan ve polianyon olarak davranan moleküller su moleküllerini tutarak doku için güvenli bir osmotik çevre oluşturmaktadır.

HDM'nin yapısı genel olarak iki kısımda incelenebilir (Şekil 2.1). Bunlardan teritoryal matriks, hücrenin çevresinde bulunur ve küçük proteoglikanlar bakımından zengindir. İnterteritoryal matriks ise protein lifler ile büyük GAG'lar bakımından zengindir ve matrikse baskılara ve gerilmeye karşı üstün dayanım kazandırır (Angel *et al.* 2003).



Şekil 2.1 Kıkırdak dokusunun yapısı ve HDM bileşimi

HDM molekülleri genel olarak üç başlık altında toplanabilir. Ancak bu sınıflandırma kesin sınırlarla birbirinden ayrılamamaktadır (Murathanoğlu, 1996). Bunlar:

1. Yapısal proteinler: Kollajen, elastin
2. Özelleşmiş proteinler: Fibrilin, laminin, elastin, fibronektin, vitronektin
3. Proteoglikanlar: Glikozaminoglikanlar (GAG)

### 2.2.1 Yapısal proteinler

Yapısal proteinler dallanmış glikoproteinlerdir. Bir kor proteinine karbonhidratların bağlanması ile oluşmuş yapılardır. Yapıda protein özellik baskındır. Hücreler arası ilişkilerde görev almaktadır. Ayrıca hücrenin diğer hücelere, HDM moleküllerine ve alt tabakalara yapışmasında ve bağlanmasında büyük önem taşımaktadır. HDM’de, bazal laminada ve bağ dokusunda yerleşik olarak bulunurlar. En önemli yapısal proteinler; kollajen, fibronektin, laminin ve vitronektindir.

### 2.2.1.1 Kollajen lifler

HDM'nin önemli bir bileşenidir ve insan vücudunda en bol bulunan proteindir, kuru ağırlığın yaklaşık olarak %30'unu oluşturmaktadır. Omurgalılarda bulunan kollajen bir proteinler grubu olup, kimyasal kompozisyonlarının farklılıkları, morfolojik özellikleri, dağılımları, fonksiyonları ve patolojileri ile fark edilen birkaç hücre tipi tarafından üretilirler.

Kollajen proteininin ana yapısını glisin (%35,5), prolin (%12) ve hidroksiprolin (%10) amino asitleri oluşturmaktadır. Yapıda ayrıca daha az miktarda olmakla birlikte lizin ve hidroksilizin amino asitleri de dikkati çekmektedir. Hidroksiprolin ve hidroksilizin amino asitleri kollajene has bir şekilde bu yapıda bulunurlar. Bu amino asitler prolin ve lizin amino asitlerinin protein molekülü sentezlenirken peptidil prolin hidroksilaz ve lizin hidroksilaz enzimlerinin etkisiyle hidroksillenmesi sonucu oluşurlar. Bir dokuda bulunan kollajen miktarı yapısındaki hidroksiprolin miktarının tespit edilmesiyle belirlenebilmektedir (Junqueira *et al.* 1993).

Kollajen lifleri çok sert ve dayanıklıdır. Bu özellikleri nedeniyle dokuya büyük bir dayanım ve esneklik kazandırmaktadır. Kollajen moleküllerinin dönüşüm süreleri çok uzundur ve kendilerini yenilemesi çok yavaştır. Soğuğa ve sıcaklığa dayanıklı olmasına karşın pepsin ve özellikle kollajenaz enzimleri tarafından kolaylıkla sindirilirler.

Kollajen lifleri alfa zincir yapılarının çok sıkı paketlenmesi sonucu oluşmaktadır. Öncelikli olarak alfa zincirleri sentezlenerek üç tanesi bir araya gelir ve prokollajen molekülünü oluşturur. *Prokollajen molekülü*, alfa zincirlerinin uçları dağınık şekilde sarmal yapı oluşturmasıyla oluşmaktadır. Dağınık uçların prokollajen peptidaz enzimiyle kesilmesi ile kollajen molekülü oluşmaktadır. Kollajen moleküllerinin 15-20 tanesinin çapraz bağlarla bir araya gelmesi ile *kollajen fibrilleri*; kollajen fibrillerin bir araya gelerek bağlanmaları ile de *kollajen fiberleri* oluşmaktadır (Sağlam vd. 2001).

Kollajen liflerinin paketlenmiş yapısı açıldığında yapının en alt biriminin alfa-zincir peptitleri olduğu görülmektedir. Kollajenin yapısında bulunan amino asitlerin farklı şekilde ve oranda dizilmesiyle farklı alfa-zincirleri; farklı alfa-zincirlerinin bir araya gelerek paketlenmesiyle de farklı kollajen lifleri oluşmaktadır (Çizelge 2.1). Kollajen liflerinin bilinen 25 farklı türü vardır. Ancak bunlardan 5-6 tanesi özellikle önem taşımakta ve üzerinde çalışılmaktadır. Bazı kollajen türlerinin ise tam yapısı ve görevi kesin olarak belirlenememiştir.

Çizelge 2.1 Kollajen tipleri ve bazı özellikleri

<b>Tip</b>	<b><math>\alpha</math>-Zincir Düzeni</b>	<b>Yapısı</b>	<b>Lokalizasyonu</b>
<b>I</b>	[ $\alpha$ 1(I)] <sub>2</sub> [ $\alpha$ (I)]	300 nm, 67 nm sarılı fibriller	Deri, tendon, kemik, vb.
<b>II</b>	[ $\alpha$ 1(II)] <sub>3</sub>	300nm, küçük 67nm fibriller	<u>Kıkırdak</u>
<b>III</b>	[ $\alpha$ 1(III)] <sub>3</sub>	300nm, küçük 67nm fibriller	Deri ve kasta yoğun bulunur
<b>IV</b>	[ $\alpha$ 1(IV)] <sub>2</sub> [ $\alpha$ 2(IV)]	390nm C-term globüler bölge, non-fibriler	Tüm bazal lamina
<b>V</b>	[ $\alpha$ 1(V)][ $\alpha$ 2(V)][ $\alpha$ 3(V)]	390nm N-term globüler bölge, küçük fiberler	Tip-I kollajen ile ilişkili
<b>VI</b>	[ $\alpha$ 1(VI)][ $\alpha$ 2(VI)][ $\alpha$ 3(VI)]	150nm, N-C term. globular bölgeler, mikrofibriller	Tip-I kollajen ile ilişkili
<b>VII</b>	[ $\alpha$ 1(VII)] <sub>3</sub>	450nm, dimer	Epitel
<b>VIII</b>	[ $\alpha$ 1(VIII)] <sub>3</sub>	??	Bazı endotel hücreler
<b>IX</b>	[ $\alpha$ 1(IX)][ $\alpha$ 2(IX)][ $\alpha$ 3(IX)]	200nm, N-term. globüler bölge	<u>Kıkırdak</u> , tip-II kollajen ile ilişkili
<b>X</b>	[ $\alpha$ 1(X)] <sub>3</sub>	150nm, C-term. Globüler bölge	<u>Hipertropik ve mineralize kıkırdak</u>
<b>XI</b>	[ $\alpha$ 1(XI)][ $\alpha$ 2(XI)][ $\alpha$ 3(XI)]	300nm, küçük fiberler	<u>Kıkırdak</u>

## 2.2.2 Özelleşmiş proteinler

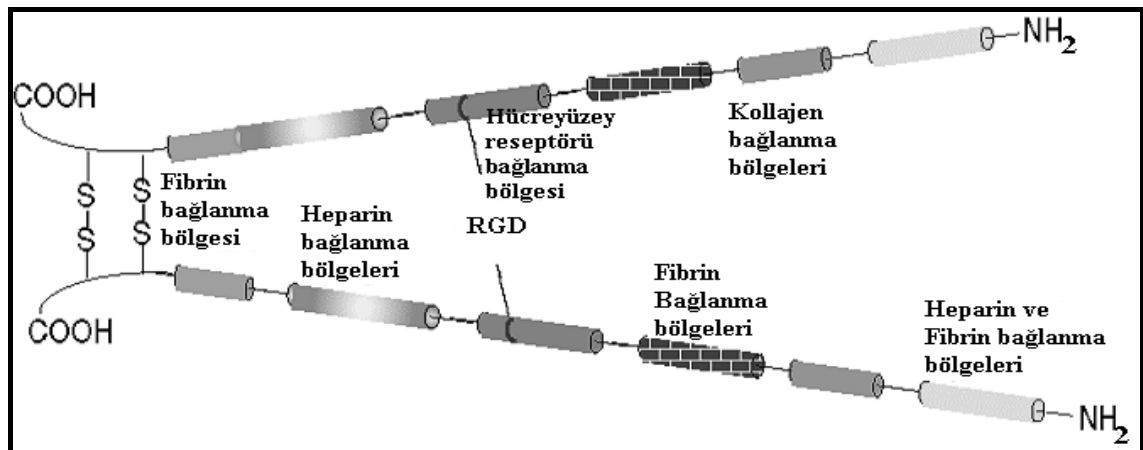
Belirli bir amaç doğrultusunda fonksiyon gösteren glikoproteinler vardır. Bunlara doku içerisindeki spesifik görevlerini yerine getirerek hücreler ile alt tabakalar ve diğer HDM molekülleri arasındaki bağlantıyı kurarak dokunun metabolik bütünlüğünü korurlar.

Bunlardan fibronektin, vitronektin, laminin kondrositler ile HDM molekülleri arasındaki iletişimi sağlayan önemli glikoprotein yapılarıdır.

### 2.2.2.1 Fibronektin

Bazı glikoproteinler, bağ dokularında izole edilmiştir ve bunlar, komşu hücreler arasındaki ilişkilerde önemli rol oynamakla kalmayıp aynı zamanda hücrelerin alt tabakalara yapışmasında da önemli roller üstlenirler.

Fibronektin, fibroblastlar ve bazı epitel hücreler tarafından sentezlenen bir glikoproteindir. Molekül kütlesi 222.000-240.000 Da arasında olup hücreler ve bazı HDM molekülleri için bağlanma molekülleri içermektedir. Bu ilişkiler normal hücre göçü ve birleşmesine yardımcı olmaktadır.



Şekil 2.2 Fibronektinin yapısı



Fibronektin tek bir gen tarafından üretilmektedir ve bu genin delesyonu embriyonik evrede ölüme sonuçlanmaktadır. Tek bir gen tarafından eksprese edilmesine karşın farklı ekson bölgeleri nedeniyle üç farklı türü oluşmaktadır. Fibronektin yüksek oranda oligometrik çapraz bağ içeren dimerik bir moleküldür. Genel olarak iki ayrı formda üretilmektedir. Bunlar:

*Çözünür fibronektin:* Karaciğerden sentezlenerek kan akımına verilmektedir.

*Çözünmez fibronektin:* Hücre yüzeyinde toplanmakta yada HDM'de birikmektedir. Bazı hücre yüzeylerinde ise fibriler yapıda bulunmaktadır

#### **2.2.2.2 Vitronektin**

Vitronektin multifonksiyonel bir glikoproteindir. Hücrelerin bağlanma ve yapışma fonksiyonlarına aracılık etmektedir. Bir plazma bileşeni olarak fibronektin kadar iyi bir şekilde görevini yerine getirmektedir. HDM içerisinde kollajen ve fibronektin kadar yaygın bir dağılım göstermemekle birlikte genellikle fibronektin ile kolokelize olarak bulunmaktadır. Yaygın olarak insan dermal elastik fiberlerinin çevresinde bulunur.

Vitronektin molekülünde de hücrelere bağlanmak için kullanılan RGD (arjinin-glisin-asparagin) hücre bağlanma dizisi bulunmaktadır. Bu RGD bağlanma dizisi aracılığıyla hücreye bağlanırken yapısında bulunan diğer bağlanma bölgeleri ile başka moleküllere bağlanabilmektedir. Ayrıca hücrelerin *in vitro* olarak seruma yapışmasını sağlamaktadır.

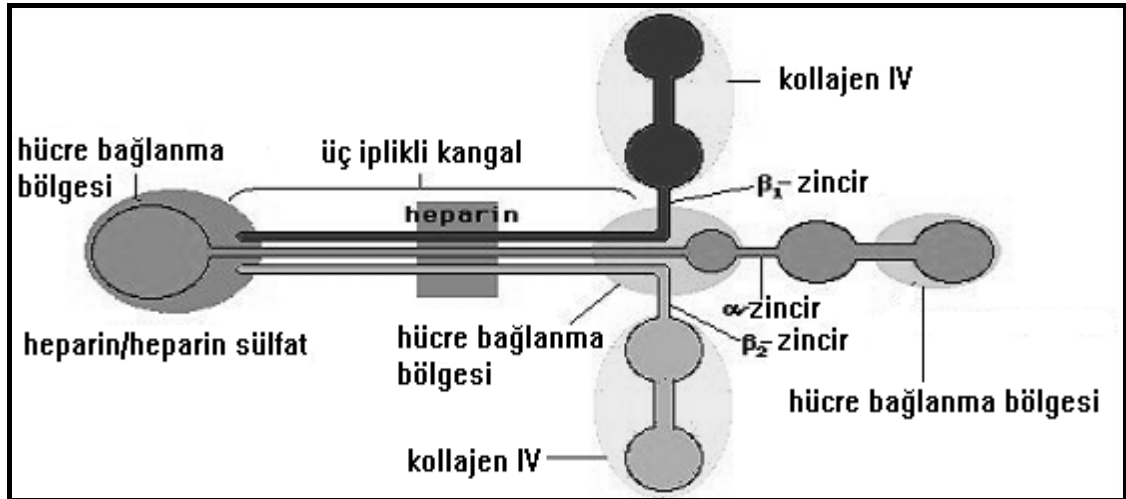
Çok fonksiyonlu yapıya sahip olan vitronektin aynı zamanda ürokinaz plazminojen reseptörü olarak iş görmektedir. Ürokinaz plazminojenin vitronektine bağlanmasıyla plazminojen plazmine dönüşmektedir. Plazmin ise ortamdaki fibrini degrade etmektedir. Degrade olan fibrin ise matriks metallo proteaz (MMP) öncülerini uyararak MMP'leri aktif hale getirir. MMP'ler ise matriks moleküllerini degrade ederek matriks yapısının ve stabilitesinin bozulmasına neden olarak kıkırdak dokusunda hasara yol açmaktadır.

### 2.2.2.3 Laminin

Hücre-adesiv multigen ailesinden heterotrimerik bir glikoproteindir. Fibronektin ve vitronektine benzer şekilde hücrelerin bağlanma ve yapışma fonksiyonlarında görev almaktadır. Genel olarak bazal laminada bulunmaktadır.

Kanser hücrelerinin diğer dokulara nüfuz etmelerindeki (metastaz) artan yeteneklerinde fibronektin ile laminin işbirliği kabul edilmektedir.

Tümör hücreleri metastaz süresince bazal laminadan geçmek için laminin reseptörlerini kullanmaktadır. Bu yayılma yolu takip edilerek tümör hücrelerinin belirlenmesi ve açıklanabilmesi mümkün olmaktadır.



Şekil 2.3 Lamininin yapısı

Laminin ekspresyonu gelişmenin düzenlenmesinde ortaya çıkar ve yaklaşık olarak kollajen-tip-4 ile eşit miktarda üretilir. Laminin üzerinde hücre bağlanma bölgeleri ile heparin/heparin sülfat ve kollajen 4 için spesifik bağlanma bölgeleri bulunmaktadır.

Bazı *in vitro* hücre kültürlerinde laminin, polistiren kültür kaplarına kaplanarak hücre bağlanma, çoğalma ve farklılaşma uyarılabilmektedir.

### 2.2.3 Proteoglikanlar

Glikozaminoglikanlar (GAG), genellikle bir üronik asit ve bir heksoz amin tarafından oluşturulan karakteristik tekrarlayan disakkarit birimlerinden meydana gelmiş olan doğrusal polisakkaritlerdir (Knudson and Knudson, 2001). GAG çeşitleri ve bileşimleri ile vücut içerisindeki dağılımı Çizelge 2.2’de verilmiştir.

Çizelge 2.2 GAG’ların kompozisyonu, bağ dokusundaki dağılımı ve kollajen lifler ile olan ilişkisi

GAG	Tekrarlayan Disakkaritler		Dağılım	Kollajen ile Elektrostatik İlişki
	Hekzaüronik asit	Heksozamin		
Hyaluronik asit	D-glukuronik asit	D-glikozamin	sinovyal sıvı, <i>kıkırdak</i>	
Kondroitin-4-sülfat	D-glukuronik asit	D-galaktozamin	<i>Kıkırdak</i> , kemik, deri, kornea	Esas olarak kollajen tip 2
Kondroitin-6-sülfat	D-glukronik asit	D-galaktozamin	<i>Kıkırdak</i> , göbek bağı, deri,	Yüksek oranda kollajen tip 2
Dermatan sülfat	D-glukuronik asit / L-idüronik asit	D-galaktozamin	Deri, tendon, aort	Yüksek oranda kollajen tip 1
Heparan sülfat	D-glukuronik asit /L-idüronik asit	D-galaktozamin	Aort, akciğer, bazal lamina, karaciğer	Orta derecede Kol- tip 3 ve 4
Keratan sülfat (kornea)	D-galaktoz	D-galaktozamin	kornea	
Keratan sülfat (iskelet)	D-galaktoz	D-glukozamin	<i>Kıkırdak</i>	

Hyaluronik asit dışındaki diğer GAG polimer zincirlerinin bir kor proteinine bağlanmasıyla *proteoglikan* molekülü oluşmaktadır. Proteoglikan molekülü, telden yapı, sapı protein özünü, kolları ise GAG'ları andıran ve bir test tüpü fırçası olarak şematize edilebilen üç boyutlu bir yapıdır.

Proteoglikanlarda karbonhidrat kısım hakimdir ve molekül kütesinin %80-90'ını oluşturmaktadır. Proteoglikanların sentezi kaba endoplazmik-retikulumda protein vasatına ait kısmın sentezi ile başlamakta; aynı zamanda sülfatasyonun da meydana geldiği golgi kompleksinde tamamlanmaktadır.

Kıkırdak içinde proteoglikan molekülleri daha büyük moleküller halinde proteoglikan agregatlarını meydana getiren bir hiyalüronik asit zincirine bağlı olarak gösterilmektedir. Proteoglikan agregatları, bir proteoglikan molekülü olan agrekanın bağlanma proteini ile bir hiyalüronik asit molekülüne bağlanması ve bu yapının da kollajen lifler ile etkileşime girmesi sonucu oluşmuştur (Angel *et al.* 2003).

Proteoglikan moleküllerinin çoğunluğunun karbonhidrat kısmının içinde hidroksil, karboksil ve sülfat grupları yüksek orada bulunduğundan dolayı yapı son derece hidrofildir ve polianyon davranışı gösterir. Bu özelliklerinden dolayı proteoglikanlar çok sayıda katyonla elektrostatik bağlar ile bağlanabilirler (Sağlam vd. 2001).

Proteoglikan agregatları son derece sulu yapılar olup molekülün etrafını kalın bir çözelti suyu tabakası çevrelemektedir. Kuru hacimlerinin yaklaşık olarak 50 katı kadar suyu absorplayarak yapı içinde tutabilirler. Bu şekilde dokuya son derece güvenli bir osmotik çevre sağlamaktadırlar (Angel *et al.* 2003).

### **2.2.3.1 Agrekan**

Agrekan büyük bir proteoglikan molekülüdür. Genel olarak proteoglikan agregatlarının yapısında bulunan proteoglikan molekülüdür. Negatif yüklü polisakkarit uç içeriği

yapıya yüksek derecede su tutma yeteneği kazandırmakta ve bu şekilde doku için güvenli bir osmotik çevre oluşturmaktadır (Handley *et al.* 2002).

Agrekan monomerleri yapısında iki dağınık bölge içermektedir. Bunlar büyük hacmi kaplayan GAG birimleri ve 3 tane globüler alan içeren bölgedir (Knudson *et al.* 2001)

### **2.2.3.2 Kıkırdak orta tabaka proteini (CILP)**

92 kD'luk tek bir polipeptit zincirinden oluşmuş glikoprotein yapısındaki bir moleküldür. N-terminalinde molekül kütlelerinin yaklaşık olarak %10'u kadar bir oligosakkarit molekülü içermektedir. Kondrosit tarafından sentezlenmektedir. Matriks içerisindeki dağılımı interteritoryal matriksten teritoryal matrikse doğrudur. Nükleotid Pirofosfohidrolaz (NTPPHase) homologudur ve proteaz öncü moleküldür. Bu nedenle dokuda fazla miktarda bulunması matriksin degrade olmasına neden olmaktadır

### **2.2.3.3 Kıkırdak oligomerik matris proteini (COMP)**

Trombospondin gen ailesinin bir üyesidir. TSP-5 olarak da isimlendirilmesi önerilmektedir. COMP beş özdeş alt polipeptit ünitesinin kangal yapı oluşturacak şekilde N-terminallerini kapatarak birleşmesiyle oluşmuştur. C-terminalleri ise globüler yapıdadır. Bu yapı disülfid bağları ile stabil hale getirilmiştir. Her COMP alt ünitesi, yaşlılarda ve gençlerde farklılık gösteren 2 tane N-bağlı oligosakkarit molekülü içermektedir.

Kıkırdakta çok bol miktarda bulunmaktadır. Ayrıca tendonların gerilmiş ve sıkıştırılmış bölgelerinde, sinovyal sıvı ile sinovyal kapsülde bulunmaktadır. Sinovyal sıvıda sinovyal kapsülden elli kat daha fazla miktarda bulunmaktadır. Bu, beslenmesi için bir perikondriyum olmayan ve beslenmesini sinovyal sıvıdan difüzyonla gerçekleştiren artiküler kıkırdak için önem taşımaktadır.

Yapılan *in vitro* hücre kültürü çalışmalarında proliferatif bölgelerde yoğunlaştığı gözlenmiştir. Hücre büyümesinin ve matriks gelişimin bir göstergesidir.

Matriks gelişiminde özellikle kollajen liflerinin sentezinde önemli rol oynamaktadır. Mikrofibrillerdeki kollajen moleküllerinin organizasyonu için gerekli olduğu belirlenmiştir.

COMP molekülünün matriks içerisindeki miktarında bir azalma olması durumunda erken osteoartrit gözlenmektedir. Ayrıca COMP molekülünü eksprese eden gende meydana gelebilecek bir mutasyon çeşitli kalıtsal hastalıklara neden olmaktadır.

### **2.3 HDM Moleküllerinin Kıkırdak Dokusu İçin Önemi**

HDM bileşenleri birbirleriyle çok düzenli ve hassas bir etkileşim halindedir. Bu etkileşim dokuya iyi bir dayanım kazandırmakta ve dokunun gelişimi ile fonksiyonlarını düzgün yapabilmesi için uygun ortamı sağlamaktadır.

Dokuyu oluşturan hücrelerin ve HDM bileşenlerinin anabolik ve katabolik reaksiyonları çok hassas bir dengeye dayanmaktadır. Bu mekanizma düzgün bir hormonal denge tarafından kontrol edilmektedir. Hormonal dengenin bozulması dokunun stabilitesinin bozulmasına ve sonucunda çeşitli sorunların ortaya çıkmasına neden olmaktadır.

Kapiler dolaşım sistemi olmayan kıkırdak dokusunda beslenme ve gerekli olan düzenleyici moleküller perikondriumdan ya da sinovyal sıvıdan difüzyonla sağlanmaktadır. Bu nedenle gerekli olan düzenleyici moleküller gerekli olan her an difüzyonla yeterince hızlı bir şekilde temin edilemeyebilir. Bu nedenle çeşitli matriks molekülleri üzerinde gerekli olan düzenleyici moleküller ve kimyasallar için bağlanma bölgeleri bulunmaktadır. Bu bağlanma bölgeleri bu maddeler için hem depo görevi hem de aktivite gösterebilmeleri için bir araç olarak işlev görmektedir.

Kıkırdak hastalıkları genellikle iki nedenden ortaya çıkmaktadır. Birincisi, dokudaki anabolizma ve katabolizma arasındaki dengenin bozulması matriks içerisindeki proteoglikanlar ile kollajen liflerin dejenere olmasına, dolayısıyla doku uyumunun bozulmasına neden olmaktadır. Bunun sonucunda da çeşitli dejeneratif hastalıklar ile tümör oluşumu ortaya çıkmaktadır. İkincisi, çeşitli yaralanmalar ve kazalar sonucu kıkırdak dokusunun hasar görmesidir. Oluşan hasar darbenin şiddetiyle doğru orantılı olarak değişiklik göstermektedir.

#### **2.4 HDM Moleküllerinin *In Vitro* Kondrosit Kültürüne Etkisi**

Son yıllarda, doku mühendisliği yaklaşımıyla üretilen kıkırdak dokusu, kullanımda olan tedavi yöntemlerine alternatif olarak geliştirilmektedir. Doku mühendisliği yaklaşımıyla kıkırdak doku üretimine yönelik üzerinde çalışılan iki yöntem bulunmaktadır. Bunlardan birincisi; vücut dışında çoğaltılan kıkırdak hücrelerinin kullanımı (hücre transplantasyonu); ikincisiyse kıkırdak hücrelerinin, üç-boyutlu biyobozunur destek materyalleri üzerinde üretilmesidir (hücre-polimer modeli).

Hücre naklinde, hücrelerin hasarlı bölgeye istenilen şekilde ve boyutta ulaştırılamaması durumunda, yapılan çalışmanın hiçbir anlamı kalmamaktadır. Bu amaçla, hücre naklinde kullanılmak üzere yüksek oranda gözeneğe sahip destek materyallerinin kullanımını içeren hücre-polimer modeli geliştirilmiştir (Dunkelman *et al.* 1995). Hücre-polimer modelinde kıkırdak dokusundan elde edilen hücreler, sentetik ya da doğal yapıya sahip, biyolojik ortamda bozunan (biyobozunur) polimerik destek malzemeleri üzerine yerleştirilmektedir. Bu destek malzemeleri, *in vitro* olarak kültüre edilen kıkırdak hücrelerinin, bağlanıp gelişebilmesi için gerekli olan yüzeyi sağlamaktadır. Ayrıca kondrositlerin kendi matrikslerini üretene kadar tutunabilecekleri bir çeşit yapay hücre-dışı matriks (HDM) görevi üstlenmektedir (Nehrer *et al.* 1997).

Kültür işlemi, iki-boyutlu olarak yürütüldüğünde hücrelerin dediferansiye olarak kendi fenotipik özelliklerini kaybettiği gözlenmiştir. Buna karşın üç-boyutlu ortamlarda yani polimer iskeletlerde ve biyoreaktörlerde yürütülen kültürlerde, kondrositlerin dediferansiye olmadıkları ve kendi işlevlerine devam edebildikleri gözlenmiştir (Freed, 1998). Destek malzemesinin üç-boyutlu olması, dokunun şekillendirilebilmesi ve

gelişimi için önemli bir parametredir (Ming *et al.* 2002). İki-boyutlu tek tabaka kültürlerde fenotipik özelliklerini kaybeden otolog kondrositler, üç-boyutlu malzemeler üzerinde kondrojenik vasat ortamına alındığında, kendi HDM'lerini oluşturarak yeni kıkırdak dokusu oluşturabilmektedir (Rotter *et al.* 1998).

*In vitro* kıkırdak hücre kültürlerinin başarılı olabilmesi için bazı şartların sağlanması gerekmektedir. Kıkırdak hücreleri gelişmeleri ve fonksiyon gösterebilmeleri için bir zemine yapışma ihtiyacı duyan bağlanma bağımlı hücrelerdir. İzole edilmiş kondrositlerin *in vitro* kültür ortamına bağlanabilmesi için dışarıdan bazı müdahaleler yapılabilmesine karşın bu aşamada yine bazı matriks molekülleri bu işlem için yardımcı olmaktadır.

Bu tür matriks moleküllerinden fibronektin, laminin, vitronektin, tip-1 ve tip-4 kollajen polistiren doku kültür kaplarına yapışarak hücre eklenmesini, büyümeyi ve farklılaşmayı iletir. Ayrıca vitronektin *in vitro* olarak seruma yapışabilme yeteneğini; serum da doku kültür kabı ile polimerik biyomalzemelere yapışabilme yeteneğine sahiptir. Bu kombinasyon sayesinde hücrelerin zemine yapışarak gelişimini iletilebilmesi için ilk ve en önemli adım atılmış olmaktadır.

İzole edilmiş kondrositler, kültür ortamına alındıklarında hemen kendi hücre dışı matrikslerini üretmeye başlamaktadır. HDM moleküllerinden bazılarının üretimi ilk bir saat içerisinde tamamlanmaktadır. Bunlardan kollajen liflerinin üretiminin ise ilk dört saatte tamamlandığı gözlenmiştir. Bu şekilde hücreler ilk aşamada buldukları ortama uyum sağlayabilecekleri molekülleri öncelikli olarak üretmekte; ilerleyen zamanda ise kendi organoid yapılarını üretmeye devam etmektedir.



### 3. MATERYAL ve METOT

#### 3.1 Kimyasallar ve Reaktifler

Bu çalışmanın kültür aşamalarında, hücre kültürü saflığında, diğer bazı aşamalarda ise, yerine göre mikroskopi saflığında, analitik saflıkta (ya da daha yüksek saflık düzeyindeki) kimyasallar ve reaktifler kullanılmıştır.

Hidrojel hazırlamak için sodyum alginat tuzu kullanılmıştır (Sigma, St. Louis, ABD).

Sodyum alginat tuzunu şelatlaştırmak için kalsiyum klorür kullanılmıştır (Merck, Almanya).

Hücreler, kollajenaz (*Hep-Plus*, Serva, Almanya) ve hyaluronidaz (Sigma, ABD) enzimleri kullanılarak izole edilmiştir.

Hücrelerin *in vitro* kültüründe kullanılmak üzere hazırlanan kültür vasatında; DMEM (Sigma, ABD), askorbik asit (Sigma, ABD) L-glutamin (Sigma, ABD), esansiyel olmayan amino asit çözeltisi (Gibco, ABD), fetal sığır serumu (FBS) (Sigma, ABD), TGF- $\beta$  (Pepro Tech, ABD), ITS<sup>+</sup> (İnsülin-Transferrin-Selenik asit kombinasyonu) (Gibco, ABD), penisilin/streptomisin/amfoterisin (Sigma, ABD) kullanılmıştır.

Hücrelerin tesbit edilmesinde, %4'lük paraformaldehit (Sigma, ABD) çözeltisi kullanılmıştır. İmmünohistokimya için monoklonal-antikor-kollajen-tip-I (Sigma, ABD), poliklonal-antikor-kollajen-tip-II (Santa Cruz, ABD) ve monoklonal antikor-agrekan (Abcam, ABD) antikorları kullanılmıştır.

Histokimya boyamaları için ise Safranin-O, Alsiyan mavisi, hematoksilin-eosin (Sigma, ABD) boyaları kullanılmıştır.

### **3.2 Sodyum Alginat Çözeltisinin Hazırlanması**

Yaptığımız çalışmada 3-boyutlu ortamı sağlamak amacıyla alginik asit polimerinin lif formu kullanılmıştır. Hazırlanan alginat hidrojeli, alginik asit polimerinin iki değerlikli katyonlarla yapmış olduğu şelat kompleksleridir. Sodyum alginat çözeltisi %4'lük ve %2'lik olarak hazırlanmıştır. %4'lük alginat çözeltisini hazırlamak için 4 gr sodyum alginat, %2'lik alginat çözeltisini hazırlamak için 2 gr sodyum alginat ve 0,89 gr sodyum klorür tartılarak bir erlen içerisinde konulmuştur. Üzerine 100 ml bidestile su eklenerek manyetik karıştırıcı ile karıştırılarak sodyum alginatın çözünmesi sağlanmıştır. Hazırlanan alginat çözeltisi +4°C'ta saklanmıştır. Hazırlanan çözelti kullanılmadan önce 2 saat süreyle UV ışık altında bekletilerek steril edilmiştir.

### **3.3 Kalsiyum Klorür Çözeltisinin Hazırlanması**

Alginat çözeltisini şelatlaştırmak için 0,40 M'lık kalsiyum klorür çözeltisi kullanılmıştır. Kalsiyum klorür çözeltisi, 58,8 g  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ve 8,9 g NaCl'nin 1 litre bidestile suda çözünmesi ile hazırlanmıştır. Hazırlanan çözelti kapaklı şişelere porsiyonlanmış ve otoklavda steril edildikten sonra kullanılmıştır.

### **3.4 TGF- $\beta$ 'ın Porsiyonlanması**

Yapılan literatür araştırmalarında kullanılan TGF- $\beta$  miktarının 2-10 ng/ml arasında olduğu tespit edilmiştir. Bu nedenle çalışmalara başlamadan önce, tek tabaka kültürlerde 2-4-5-7,5-10 ng/ml'lik dozlarda TGF- $\beta$  kullanılarak yapılan deneyler sonucunda 5 ng/ml TGF- $\beta$  kullanımının yapacağımız çalışmalar için uygun olacağı belirlenmiştir.

Peptotech firmasından temin edilen TGF- $\beta$  firmanın belirlemiş olduğu standart prosedüre göre PBS (Phosphate Buffered Salin) kullanılarak porsiyonlanmıştır. Porsiyonlama işlemi sırasında spesifik olmayan adezyonu önlemek için %0,1'lik BSA (Bovin Serum Albumin) kullanılmıştır.

Sürekli olarak stok çözeltinin çözülüp dondurulması TGF- $\beta$ 'ın aktivite kaybetmesine neden olacağından, her vasat değişimi için kullanılacak olan 5 ng/ml TGF- $\beta$  miktarı hesaplanarak tek kullanımlık porsiyonlar hazırlanmıştır.

### **3.5 Hücre İzolasyonu**

Hücre kaynağı olarak genç Wistar sıçanları kullanılmıştır. Hayvan deneyleri, evrensel kabul gören kurallara uygun olarak, deneklerin acı ve sıkıntıları en düşük düzeyde tutularak gerçekleştirilmiştir. Kıkırdak dokusu 3-4 haftalık sıçanların femoral-patellar eklem uçlarından alınmıştır. Operasyon sonrası alınan doku örnekleri, laminar akışlı steril hava kabini içerisinde konularak işlemlere burada devam edilmiştir.

Alınan kıkırdak dokusu PBS çözeltileri ile bir dizi yıkama işleminden geçirildikten sonra, steril bir bistüri yardımıyla küçük parçalara ayrılmıştır. Hazırlanan doku parçaları 3 mg/mL kollajenaz ve 0,3 mg/mL hiyalüronidaz içeren DMEM içerisinde alınarak bir aksiyal çalkalayıcıya bağlanmıştır. Daha sonra bu sindirim kabı, %90 nem, 37°C ve %5 CO<sub>2</sub> şartlarına sahip olan bir inkübatör içerisinde konularak yaklaşık olarak 6-7 saat süresince enzimatik sindirimin tamamlanması beklenmiştir. Enzimatik sindirim sonucunda ~5.000 hücre elde edilmiştir.

### **3.6 Hücre Kültürü**

Enzimatik izolasyon için gerekli olan sürenin bitmesinin ardından hücre süspansiyonu 1000 devir/dakika'da 10 dakika santrifüjlenmiştir. Santrifüj işlemi bittikten sonra enzim çözeltinin üst kısmı alınmış ve üzerine DMEM eklenerek 1000 devir/dakika'da 10 dakika santrifüjlenerek hücreler yıkanmıştır. Bu işlem üç kez tekrarlanarak enzim çözeltisi hücrelerden uzaklaştırılmıştır.

Son yıkama işleminin ardından yaklaşık olarak 4 mL'lik bir hücre süspansiyonu hazırlanmıştır. Hazırlanan bu hücre süspansiyonu üç farklı kültür ortamında ve iki farklı kültür sıvı içerisinde olmak üzere altı farklı kültür işlemine tabi tutulmuştur. Bu şekilde,

kültür şartlarının ve kültür için kullanılan büyüme faktörünün kondrojeniz üzerine olan etkisi incelenmeye çalışılmıştır.

Kültür işlemleri Çizelge 3.1’de verilen sistematige uygun olarak yürütülmüştür.

Çizelge 3.1 Yürütülen kültür şartları

<b>KÜLTÜR SIVISI</b>	<b>STATİK KÜLTÜR*</b>		<b>DİNAMİK KÜLTÜR</b>
<b>TGF-β<sub>1</sub> (+)</b>	2B- (Coverslip)	3B-(Alginat Lif)	Alginat Lif
<b>TGF-β<sub>1</sub> (-)</b>	2B- (Coverslip)	3B-( Alginat Lif)	Alginat Lif

\*(2B: 2-boyutlu; 3B: 3-boyutlu)

### 3.6.1 Tek tabakada (iki boyutta) kültür işlemi

İki boyutlu kültür işlemi için 13 mm çapındaki coverslip’ler (*Thermanox*, Nunc, ABD) kullanılmıştır. Coversliplerin bir yüzeyi poli(L-lizin) ile kaplı olduğu için hücrelerin zemine yapışması kolaylaşmıştır. Laminar akışlı steril hava kabini içerisinde, 24-kuyucuklu bir kültür kabının ilk ve son sütunundaki dörder sırasına steril coverslip’ler dikkatlice yerleştirilmiştir. Bu coverslip’lerin üzerine hazırlanan hücre süspansiyonundan 200 µL damlatılmış ve yaklaşık olarak 15 dakika hücrelerin zemine tutunması için beklenilmiştir. Bu süre sonunda kuyucukların içerisine hazırlanan kültür sıvısından (vasattan) 2 mL ilave edilmiştir.

Son sütunda bulunan dört coverslip üzerine ayrıca 5 ng/mL olacak şekilde TGF-β eklenmiştir. 28 gün süren kültür işleminde gün aşırı vasat değişimi yapılmıştır. Örnekler (coverslip’ler), 7 günlük periyotlarla %4’lük paraformaldehit kullanılarak immünohistokimya için fikse edilmiştir.

### 3.6.2 Alginat liflerin içerisine hücrelerin tutuklanması

Kültür işlemi öncesinde steril edilen %4'lük alginat çözeltisinden 2,5 ml alınarak bir insülin enjektörüne konulmuş ve 2,5 ml hücre süspansiyonu enjektörün pompası çıkartılarak alginat üzerine ilave edilmiştir. Enjektörün pompası kapatılarak alginatla hücre süspansiyonunun homojen bir şekilde karışması sağlanmıştır. Bu şekilde alginat yarı yarıya seyreltilmiş yani %2'lik hale getirilmiştir.

Alginik asit (sodyum tuzu) çözeltisini şelatlaştırmak için hazırlanmış olan steril kalsiyum klorür çözeltisinden 50 ml steril bir beher içerisine konulmuştur. İçerisine steril bir magnet atılarak bir magnetik karıştırıcı üzerine yerleştirilmiştir. Kalsiyum klorür çözeltisi magnetik karıştırıcıda karışırken, enjektör içerisinde hazırlanan alginat-hücre karışımı hızlı bir şekilde çözeltinin üzerine gönderilmiştir. Oluşan liflerin tamamen şelatlaşması için 5 dakika çözelti içerisinde karıştırılmıştır.

Hazırlanan lif-hücre yapısı steril bir petri içerisine alındıktan sonra, küçük porsiyonlara ayrılıp, sonra tekrar sodyum alginat çözeltisine daldırılır ve sonra kalsiyum klorür çözeltisinin içerisine bırakılarak polimerleşmesi sağlanır. Bu şekilde içerisinde hücrelerin hapsedildiği lifler alginat ile enkapsüle edilmiş olmaktadır. Bu şekilde 16 tane hücre-lif örneği hazırlanmaktadır.

Hazırlanan örneklerden sekiz tanesi 24-kuyucuklu petrinin ilk ve son sütunundaki dörder sıraya ayrı ayrı yerleştirilmiştir. Kuyucukların her birine hazırlanan vasattan 2 mL ilave edilerek petri kabı karbondioksit inkübatörüne yerleştirilmiştir. Örnekler üzerindeki kalsiyum klorürün fazlasını uzaklaştırmak için 30 dakika sonra petri çıkartılarak vasat değişimi yapılmıştır. Bu işlem iki kere tekrar edilmiştir. Son yapılan vasat işleminde, son sütunda bulunan dört örnek üzerine 5 ng/mL olacak şekilde TGF- $\beta$  eklenmiştir. 28 gün süren kültür işleminde gün aşırı vasat değişimi yapılmıştır.

İmmünohistokimya için örnekler, 7 günlük periyotlar ile %4'lük paraformaldehit (PFA) kullanılarak fikse edilmiştir.

Fiksasyon işlemlerinden önce iskelet-hücre numunesinden yaklaşık 3 mm'lik örnekler alınmış ve MTT [3-(4,5-dimetildiyazol-2-il)-2,5 difenil tetrazolyum bromür] testi uygulanarak hücrelerin mitokondriyal aktivitelerine bakılmıştır.

### 3.6.3 Dinamik kültür işlemi

#### 3.6.3.1 Biyoreaktörün hazırlanması

RCCS, doku mühendisliği uygulamalarında kullanılan bir hücre kültürü biyoreaktör sistemidir. Döndürücü tabla (RCCS) üzerinde STLV (Slow Turning Lateral Vessel; Synthecon) hücrelerinin yerleştirileceği 4 adet bölme bulunmaktadır. Bu tabla bir güç kaynağına bağlıdır ve dönme hızı bu güç kaynağından ayarlanmaktadır. STLV'nin orta kısmında oksijenatör membran ve merkez bulunmaktadır. Hücre kültürünün çeşidine göre STLV üzerine oksijen kaynağı bağlanarak içeriye sürekli bir oksijen girişi sağlanmaktadır. Kondrositler düşük oksijen geriliminde solunum yaptığı için, kondrosit hücre kültüründe sürekli bir oksijen girişine gerek duyulmamaktadır.



Şekil 3.1 RCCS-STLV biyoreaktör sistemi

Yaptığımız her bir seri çalışma için 2 adet STLV biyoreaktör hücresi kullanılmıştır. Bunlar kültür işleminden önce steril edilerek kullanıma hazır hale getirilmiştir. Sterilizasyon için STLV'ler önce yumuşak bir deterjan ile yıkanmış ve ardından bir gece boyunca akan saf suyun altında bekletilmiştir. Ertesi gün reaktör hücresi %70'lik etil alkol içerisine konularak 24 saat bekletilmiştir. Bu süre sonunda STLV ve aparatları ayrı ayrı alüminyum folyolara sarılarak otoklavda 105-110°C arasında 30 dakika bekletilmiş ve bu şekilde sterilizasyon tamamlanmıştır.

Kültür işlemi yapılmadan önce STLV ve aparatları laminar akışlı steril hava kabini içinde açılarak kullanıma hazır hale getirilmiştir.

RCCS, kültür işlemlerine başlamadan önce alkol ile temizlenerek karbondioksit inkübatörüne yerleştirilmiştir.

### **3.6.3.2 RCCS-STLV reaktör sisteminde kültür işlemi**

Kültür işlemi öncesinde hazırlanan alginik asit çözeltisi 3-boyutlu ortamı sağlaması amacıyla kullanılmıştır. Her STLV içerisine hazırlanan örneklerden dörder tane konulmuştur. STLV'ler, hacimsel olarak %50 düzeyine kadar vasat ilavesi ile doldurulduktan sonra girişleri kapatılmış ve inkübatör içerisine yerleştirilmiş olan RCCS üzerindeki yerlerine takılarak cihaz çalıştırılmıştır.

Örnekler üzerindeki kalsiyum klorürün fazlasını uzaklaştırmak için 30 dakika sonra biyoreaktörler çıkartılarak vasat değişimi yapılmıştır. Bu işlem iki kere tekrar edilmiştir. Son yapılan vasat işleminde, STLV'lerden birine 5 ng/mL olacak şekilde TGF- $\beta$  eklenmiştir. 28 gün süren kültür işlemi sırasında vasat değişimi gün aşırı yapılmıştır.

İmmünohistokimya için örnekler, 7 günlük periyotlar ile %4'lük PFA kullanılarak fikse edilmiştir.

Fiksasyon işlemleri sırasında lif-hücre numunesinden 3 mm'lik örnekler alınmış ve MTT testi uygulanarak hücrelerin mitokondriyal aktivitelerine bakılmıştır.

### **3.7 İvert Mikroskop ile Hücrelerin İncelenmesi**

Kondrosit hücre kültürünün takibi ve görüntülenmesi işleminde Nikon TS100 marka (Tokyo, Japonya) bir invert mikroskop kullanılmıştır.

Doğal dokudan izole edilen hücrelerin kültüre alınma işlemi tamamlandıktan sonra hücrelerin yapışması için 2 saat beklenmiştir. Bu süre sonunda hücreler invert mikroskop ile incelenerek görünüşleri, adhezyon durumları ve sayıları kontrol edilmiştir.

Kültür işlemi bitene kadar hücre kültürleri, günlük olarak invert mikroskop ile takip edilerek gözetim altında tutulmuş ve gelişmeler not edilmiştir. Hücrelerin mikroskopik olarak takip edilmesinde, 7 günlük periyotlar ile fotoğraf çekimi yapılmıştır.

### **3.8 Mitokondriyal Dehidrojenaz Aktivitelerinin Belirlenmesi**

İzolasyon sonrasında ve çeşitli hücre kültürü serilerinde kültürleri sürdürülen hücrelerin mitokondriyal dehidrojenaz aktiviteleri, MTT [3-(4,5-dimetildiyazol-2-il)-2,5 difenil tetrazolyum bromür]'ye dayalı ticari bir kit (Sigma, ABD) kullanılarak ölçülmüştür. MTT testi ile proliferen olan hücrelerin mitokondriyal aktiviteleri ve canlılıkları takip edilmiştir (Mosmann, 1983).

Bu test için 96-kuyucuklu petri kabı kullanılmıştır. Petrinin kuyucuklarına temiz, taze hazırlanmış vasat konularak üzerine %10 konsantrasyonu sağlayacak şekilde MTT kiti ilave edilmiştir. Kuyucukların her birine örnekler konularak 4 saat süresince karbondioksit inkübatöründe bekletilmiştir. Ancak, kuyucuklardan birine örnek konulmayarak içerisindeki vasat kör olarak kullanılmıştır.



İnkübasyonun sonunda formazan kristallerinin oluşumu invert mikroskopunda incelenmiştir. Sonrasında ise koyu mavi formazan kristalleri MTT çözücüsü ile çözülerek renk şiddeti 570 nm’de UV-spektrofotometresinde ölçülmüştür.

### **3.9 Histokimya ve İmmünohistokimya**

Farklı deney serileri ve deney aşamalarından elde edilen örnekler üzerinde histokimyasal (hematoksilin-eosin, Safranin-O, Alsiyan mavisi) ve immünohistokimyasal incelemeler yapılmıştır.

İmmünohistokimyasal (kollajen tip-I, tip-II ve agrekan) boyamalarda farklılıklara bağlı olarak, oluşması beklenen kıkırdak dokusunun özellikleri hakkında bilgi edinilmeye çalışılmıştır.

#### **3.9.1 Örneklerin hazırlanması**

%4’lük PFA ile fikse edilen örnekler iki saat boyunca fiksatifte bekletilmiştir. Daha sonra örnekler üzerinden fiksatifi ve kalıntıları uzaklaştırmak için su ile 3x10 dakika yıkama işlemi yapılmıştır. Yıkama işleminin ardından örnekler, %50, %70, %80 ve %95’ lik etanol serilerinden 2x10 dakika olacak şekilde geçirilerek bulundukları sudan arındırılmıştır.

Dehidratasyonun ardından, alginatın ksilende bozulması nedeniyle, örnekler direkt olarak parafin içerisine gömülerek bloklara alınmış ve soğuduktan sonra kesitleri alınarak boyamaya hazır hale getirilmiştir.

#### **3.9.2 Histokimya**

Histokimya çalışması, kıkırdak dokusunun oluşumu sırasında HDM’nin ana bileşimini oluşturan kollajen lifler ve agrekan molekülleri ile hücrelerin belirlenmesi için yapılmıştır. Bu amaçla standart Histokimya tekniği kullanılmıştır.

Matriks bileşimdeki glikozaminoglikanlar (GAG) Alsiyan mavisi; kollajen lifler Safranin-O ve hücreler de hematoksilin-eosin ile boyanarak tespit edilmiştir.

İki-boyutlu kültür işlemi için kullanılan coverslipler, steril bir makas yardımıyla dört parçaya kesilerek Histokimya ve immünohistokimya için parçalara ayrılmıştır.

Alginat liflere parafine gömme tekniği uygulanarak Histokimyal boyamalara hazır hale getirilmiştir.

Alınan deparafinize edilmiş numune kesitlerinin ve coversliplerin üzerlerine adı geçen boya çözeltileri standart boyama metodları ile uygulanmıştır. Daha sonra boyanın fazlası su ile yıkanarak örneklerin kuruması beklenmiş ve ardından ışık mikroskobu ile boyamalar kontrol edilmiştir.

### **3.9.2.1 Safranin-O boyaması**

Sıçan femora-patellar diz ekleminden izole edilen hücreler alginat liflerin içerisine tutuklanarak kültüre alındıklarında kendi HDM'lerini üretmeye başlamaktadır. Yeni HDM oluşturulurken kollajen molekülleri hücre içerisinde sentezlenmeye başlamakta ve daha sonra hücre dışına çıkartılmaktadır. İlerleyen günlerde üretilen kollajen lifler hücreler arası bölgede (intertiritorial matrikste) lokalize olmaktadır (Murathanoğlu,1996). Safranin-o ile yapılan Histokimya boyamaları aşağıdaki prosedüre göre yapılmıştır.

Demir hematoksilin (Weigert's) çalışma çözeltisi:

Çözelti A: 1 gr hematoksilin 100 ml %95'lik etil alkolde hazırlanmıştır.

Çözelti B: 4 ml %29'luk ferik klorit ( $FeCl_3$ ), 95 ml saf su ve 1 ml derişik HCl karıştırılarak hazırlanmıştır.

Eşit hacimlerde A ve B çözeltileri alınıp karıştırılarak Weigert's çözeltisi hazırlanmıştır. Kullanma süresi iki haftadır.

%0,01 Fast Green çözeltisi: 0,1 gr Fast Green 1000 ml saf suda çözülerek fast green çözeltisi hazırlanmıştır.

%1'lik Asetik asit çözeltisi: 1,0 ml glasiyal asetik asit alınmış ve 99 ml saf su ile karıştırılarak hazırlanmıştır.

%0,1 Safranin-O çözeltisi: 0,1 gr safranin-o 100 ml saf suda çözülerek hazırlanmıştır.

1. Numune kesitleri üzerinden parafin uzaklaştırılarak (deparafinizasyon) hidrate edilmiştir.
2. Weigert's demir hematoksilin çalışma çözeltisi ile 7 dk boyanmıştır.
3. Akan musluk suyu altında 10 dk yıkanmıştır.
4. Fast green çözeltisi ile 3 dk boyanmıştır.
5. Hızlıca %1'lik asetik asit çözeltisi ile 10-15 sn yıkanmıştır.
6. %0,1 safranin-o çözeltisi ile 5 dk boyanmıştır.
7. %95 etil alkol, mutlak (absolut) etil alkol ve ksilen ile (her biriyle 2 dk olmak üzere) suyu uzaklaştırılarak temizlenmiştir. Kalsiyum alginat ksilende çözündüğü için kullanılmamıştır

Hücre çekirdekleri siyah, sitoplazma gri-yeşil ve kıkırdak hücre granülleri (kollajen molekülleri) turuncudan kırmızıya değişen renklerde boyanmıştır.

### 3.9.2.2 Alsiyan mavisi ile boyama

Proteoglikan molekülleri hücre içerisinde sentezlendikten sonra hücre dışına çıkartılarak HDM'nin yapısına katılmakta ve HDM içerisinde genel olarak kondrositlerin çevresinde (teritoryal matrikste) lokalize olmaktadır. Alsiyan mavisi boyama yöntemi aşağıda verilmiştir.

1. Parafine kesitlerin üzerinde parafin uzaklaştırılarak saf su ile hidrate edilmiştir.
2. Ph 1,0'daki %1'lik alsiyan mavisi çözeltisi ile 30 sn %70 güçle mikrodalgada boyanmıştır.
3. 0,1 N HCl ile 5 sn yıkanmıştır.
4. %95 etil alkol ile yıkanarak dehidrate edilmiştir.

HDM içerisindeki proteoglikan molekülleri mavi olarak boyanmıştır.

### 3.9.3 İmmünohistokimya

İmmünohistokimya kıkırdak dokusunun oluşumu sırasında kondrositler tarafından salgılanan HDM bileşenlerinden kollajen tip-1, kollajen tip-2 ve agrekan molekülleri için yapılmıştır. Kollajen tipinin belirlenmesi bize, oluşan kıkırdak dokusunun özelliklerini, dolayısı ile kültür işleminin bir ölçüde başarısını göstermiştir. İmmünohistokimya için parafine-gömme standart avidin-biyotin kompleks peroksidaz tekniği kullanılmıştır.

Parafine gömülmüş olan örnekler yaklaşık 4-5 µm kalınlığında kesilerek su ile yıkanmıştır. Ardından 60°C'da 30 dk bekletilmiştir. Ardından 30 dk süresince 70°C'ta sitrat tamponu ile işleme tabi tutularak deparafinize edilmiştir. Çalışmada, primer

antikorları belirlemek amacıyla HRP kit sistemi (AEC, ABD) kullanılmıştır. İmmünohistokimya boyamaları için aşağıdaki adımlar takip edilmiştir.

1. Örnekler, 10-15 dk hidrojen peroksit blok çözeltisi ile muamele edilmiştir.
2. Su ile yıkanmıştır.
3. %1'lik FBS içeren PBS ile 1/100 oranında seyreltilmiş primer antikor ile etkileştirilerek oda sıcaklığında 1 saat bekletilmiştir.
4. Su ile yıkanmıştır.
5. Biotinlenmiş keçi-anti-fare sekonder antikor ile 10 dk inkübe edilmiştir.
6. Su ile yıkanmıştır.
7. Streptavidin-Peroksidaz (HRP) ile 10 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
8. Su ile yıkanmıştır.
9. 5-10 dk AEC kromojen-AEC substrat karışımı ile inkübe edilmiştir.
10. Su ile yıkanmıştır.
11. İstenirse hücre boyaması yapılabilir.

## **4. ARAŞTIRMA BULGULARI**

### **4.1 Enzimatik İzolasyon ve Hücre Sayımı**

Doğal dokudan hücrelerin ayrılması için öncelikli olarak sıkı bir aę Şeklinde örülmüŐ olan HDM yapısının degrade edilmesi gerekmektedir. Bunu gerçekleŐtirmek için, yapılan ön denemelerde önce sadece 2 mg/mL kollajenaz enzimi kullanılmıştır. Ancak izolasyon sonrası yapılan mikroskopik incelemede hücrelerin ancak %50-60'ının matriksten ayrıldığı gözlenmiştir.

Sonraki denemelerde enzimatik sindirimi en uygun hale getirmek için 3 mg/mL kollajenaz enzimine ek olarak hiyalüronidaz enzimi de 0,3 mg/mL olacak Şekilde kullanılmıştır. Sonuçta hücrelerin matriksten ayrılma oranının yaklaşık %85-95 olduğu gözlenmiş ve ~5000 hücre elde edilmiştir.

Enzimatik izolasyon sonrasında elde edilen hücre süspansiyonundan 100 L alınarak yapılan tripan mavisi ile canlılık testi sonucunda hücrelerin >%90 düzeyinde canlılığını koruduğu gözlenmiştir.

### **4.2 İnvirt Mikroskop İncelemeleri**

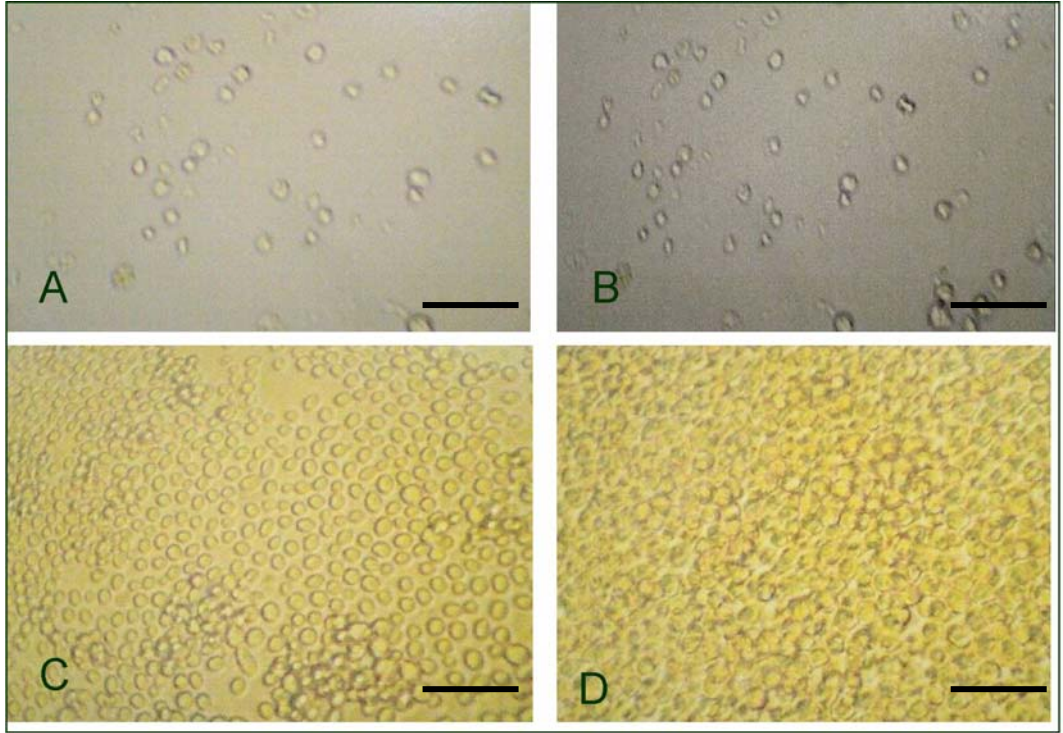
Her kültür ortamına hücre ekimi yapıldıktan sonra kültürler, düzenli olarak invert mikroskop altında takip edilmiştir. Bu takip sırasında en iyi gözlemler iki-boyutlu kültürlerde yapılırken, hidrojellerde tutuklanmış hücrelerin gözlemlenmesinde teknik zorluklarla karŐılaŐılmıŐtır.

Dinamik kültürü sürdürülen örnekler fiksasyon sırasında, 7 günlük periyodik aralıklar ile gözlenmiştir. Ancak biyoreaktör kullanımını sırasında yapılan vasat değişimi sırasında alınan eski vasat, steril bir petri kabına alınarak kontaminasyon olup olmadığı incelenmiştir.

#### 4.2.1 Hücre miktarı

TGF-  $\beta$  içermeyen vasatlarda, sıfırıncı günden itibaren yapılan gözlemlerde özellikle iki-boyutlu kültürlerdeki hücre sayısı artışının dikkate değer şekilde üçüncü günden itibaren başladığı ve kültürlerin 15. gününe kadar bu artışın düzenli olarak devam ettiği gözlenmiştir. 15. günden sonra hücre sayısında önemli bir artış gözlenmemiştir.

Hücre sayısı, kondrojenik vasata ilave olarak TGF- $\beta$  kullanımıyla önemli ölçüde değişmiştir. TGF- $\beta$  içeren kondrojenik vasat ortamındaki hücreler, TGF- $\beta$  içermeyen kondrojenik vasat ortamındaki hücrelerden daha hızlı bir şekilde çoğalmışlardır (Şekil 4.1).



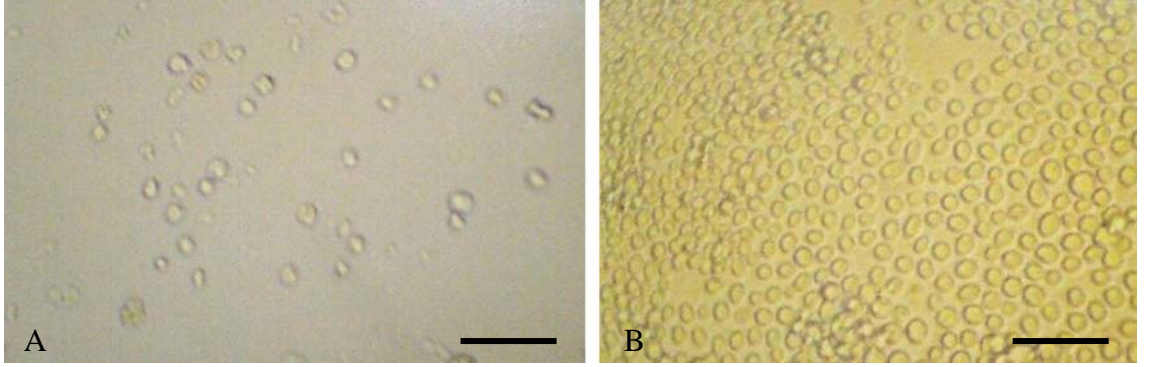
Şekil 4.1 İki boyutlu TGF- $\beta$  içermeyen kültür a. 0. gün ve c. 28. gün. İki boyutlu TGF- $\beta$  içeren kültür b. 0.gün ve d. 28. gün. Ölçü çubukları 100  $\mu$ m.

TGF- $\beta$  içeren kültürlerdeki hücrelerin, TGF-  $\beta$  içermeyen kültürlerde gözlenenine benzer şekilde, 3. günden itibaren hızla çoğalmaya başladıkları, ancak farklı olarak hücre

sayısındaki artışın 21. güne kadar sürdüğü belirlenmiştir. Bu etki MTT testi ile de gösterilmiştir.

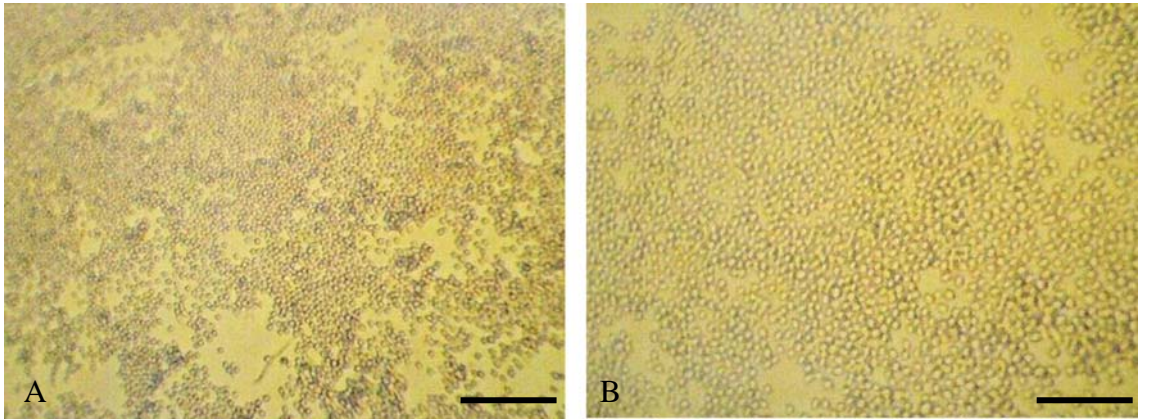
#### 4.2.2 Hücre morfolojisi

Kıvırdak hücreleri karakteristik yuvarlak bir morfolojiye sahip olup, doku gelişmeye başladıkça etrafları bir matriksle çevrilerek lakün yapısını oluşturur. İki-boyutlu kültürlerdeki hücrelerin zaman içerisinde daha yassılaşıp oval yapı aldığı ve yuvarlak görünümünden uzaklaştıkları görülmüştür (Şekil 4.2).



Şekil 4.2 İki-boyutlu kültür a. 0. gün ve b. 21. gün (X20). Ölçü çubukları 100 µm.

TGF- $\beta$  içeren kültürdeki hücrelerin TGF- $\beta$  içermeyen kültürdeki hücrelerden daha büyük olduğu da tespit edilmiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3 a. 21. Günde TGF- $\beta$  içermeyen kültür hücreleri ve b. TGF- $\beta$  içeren kültür hücreleri (X10). Ölçü çubukları 200 µm.



### 4.3 Mitokondriyal dehidrojenaz aktivitesi (MTT testi)

MTT, 1983 yılında memeli hücrelerinin hayatta kalmalarını ve proliferasyonlarını belirlemek için kantitatif kolorimetrik bir ölçüm olarak Mossman tarafından önerilmiştir ve günümüzde hücrelerin mitokondriyal dehidrojenaz aktivitelerini belirlemek sıklıkla kullanılan bir yöntem haline gelmiştir (Mossman, 1983).

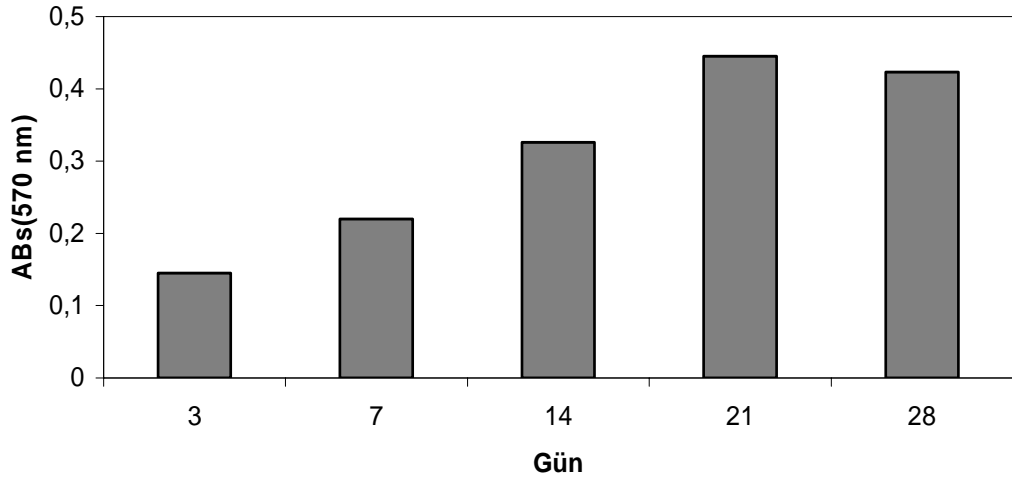
Bu testin temelini, proliferasyon yapan hücrelerin durağan fazdaki hücrelerden daha yüksek mitokondriyal dehidrojenaz aktivitesi göstermesi oluşturur. Ayrıca reaksiyon mitokondriisi bozulmamış, yaşayan ve yeterli oksijeni bulunan hücrelerde gerçekleşir. Bundan dolayı bu test hücrelerin farklı metabolik oranlarını ölçmek için uygundur (Höper, 1997).

Hücrelerin canlılığının fazla olması, mitokondriyal aktivitenin artmasına neden olacağından, hücre canlılığını takip etmek içinde kullanılan bir yöntemdir. Ayrıca *in vitro* araştırmalarda, örnek içersindeki artan hücre sayısını belirlemek için uygulanabilir.

MTT testi iki ve üç-boyutlu kültürlerle uygulanmıştır. Spektrofotometrik ölçümlerde mitokondriyal aktivite, 28. günün sonunda yaklaşık olarak %100 civarında artış göstermiştir. Üç-boyutlu kültürlerle uygulanan MTT testlerindeki tüm kültürlerdeki mitokondriyal aktivitelerinin lineere yakın bir artış göstermiştir. Üç farklı ölçümün ortalama değeri alınarak günlere göre grafiğe geçirilmiştir.

#### 4.3.1 Statik üç-boyutlu kültür

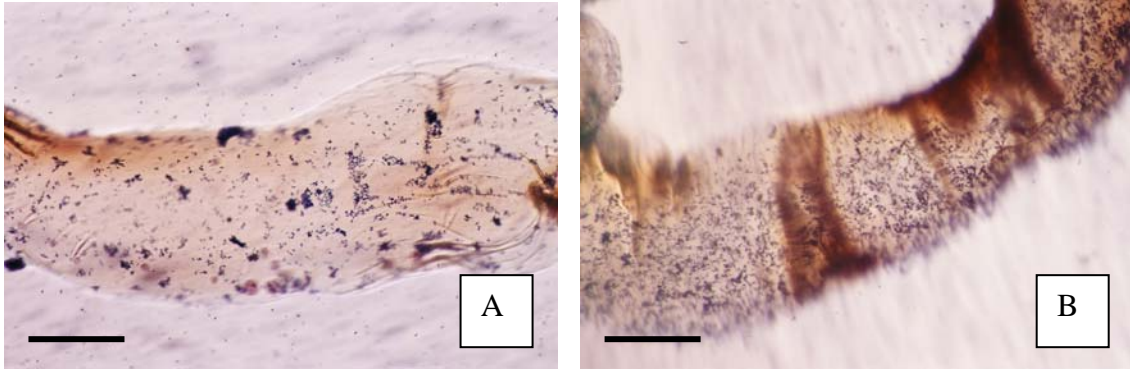
TGF- $\beta$  içermeyen statik üç-boyutlu kültürde MTT sonucu oluşan formazan kristallerinin çözülerek UV-spektrofotometresinde absorbans değerleri ölçülmüştür. Bu ölçümlerin sonucunda elde edilen grafik Şekil 4.4'te gösterilmektedir. Grafiğe göre kondrositlerin mitokondriyal aktivitesi haftalara göre artış göstermiş ancak maksimum aktivite 21. günde ölçülmüştür.



Şekil 4.4 TGF- $\beta$  içermeyen statik üç-boyutlu kültürün MTT testi sonucunda 570 nm'deki absorbans değerlerinin kültür süresince değişimi.

MTT reaktifinin etkisiyle oluşan formazan kristalleri alginat lifin içerisinde ve hemen yüzeyinde yoğun bir şekilde gözlenmiştir (Şekil 4.5).

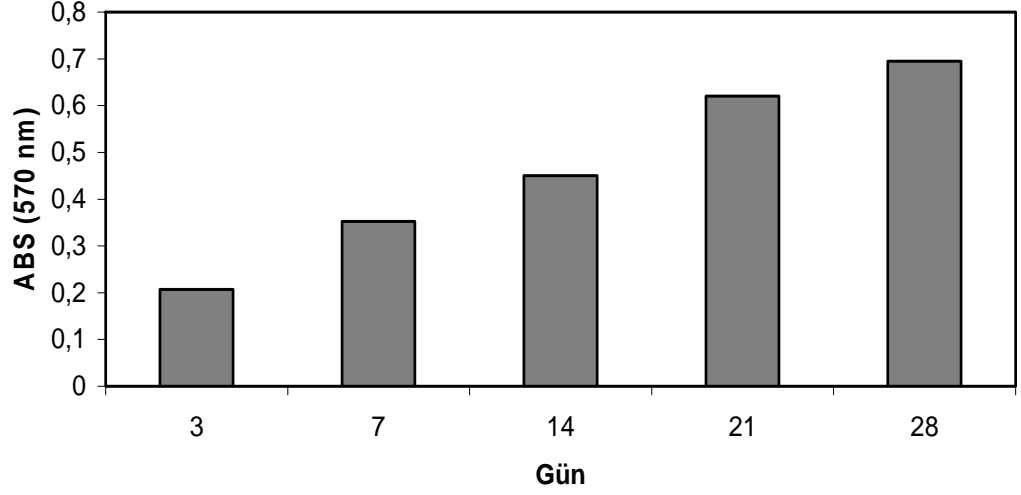
TGF- $\beta$  içermeyen statik kültürde, formazan kristallerinin küçük boyutlarda olduğu gözlenmiştir.



Şekil 4.5 Statik olarak yürütülen alginat liflere tutuklanmış kondrosit kültürünün a. 7. ve b. 21. gününde yapılan MTT testi sonucu formazan kristallerinin oluşumu. Ölçü çubukları 500  $\mu$ .

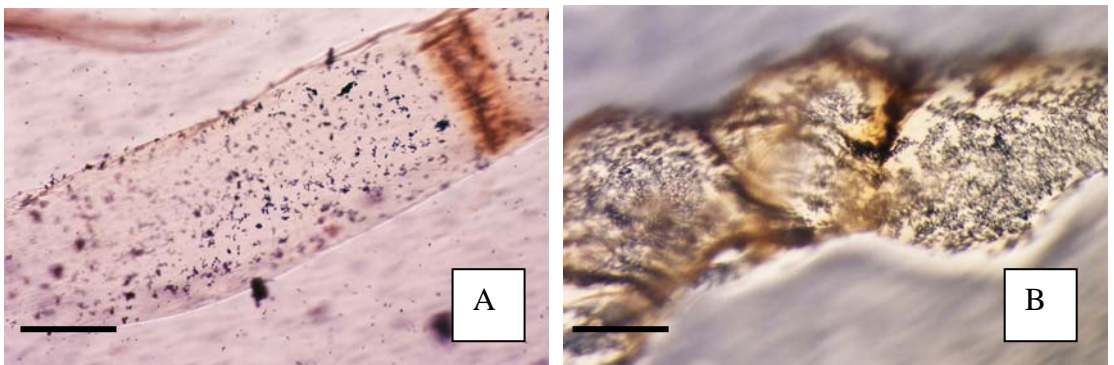
TGF- $\beta$  içeren statik üç-boyutlu kültürdeki alginat lif-kondrosit örneklerine uygulanan MTT testi sonucu oluşan formazan kristallerinin çözülerek UV-spektrofotometresinde absorbans değerleri ölçülmüştür. Bu ölçümlerin sonuçları Şekil 4.6'daki grafikte gösterilmektedir.

Elde edilen grafiğe göre kondrositlerin mitokondriyal aktivitesinde lineere yakın bir artış gözlenmiş ve maksimum mitokondriyal aktivite 28. günde ölçülmüştür.



Şekil 4.6 TGF- $\beta$  içeren statik üç-boyutlu kültürün MTT testi sonucunda 570 nm'deki absorbans değerlerinin kültür süresince değişimi.

MTT reaktifi ile oluşan formazan kristallerinde 21. gün civarında büyük artış gözlenmiştir ve kristallerin polimerin iç kısımlarında yoğun bir şekilde olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.7).

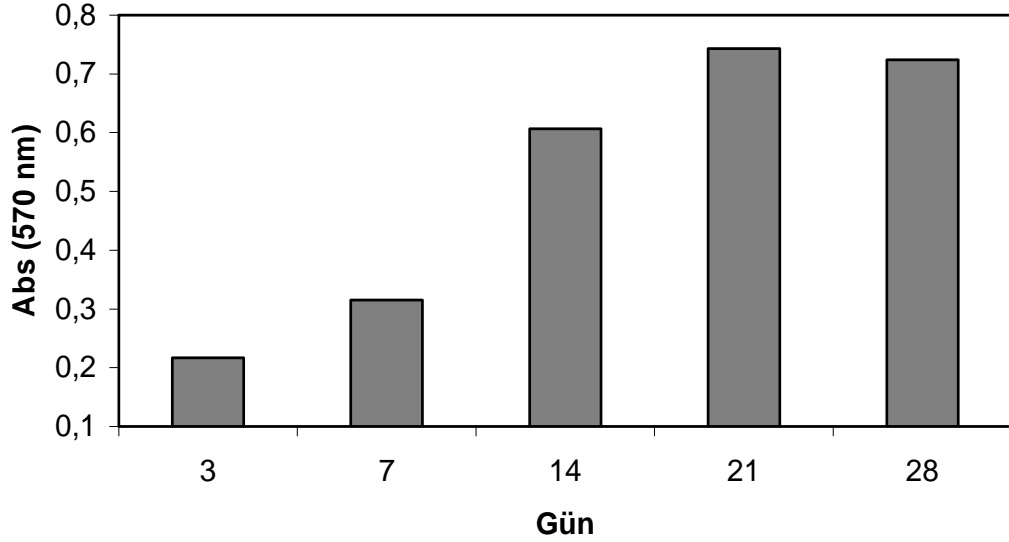


Şekil 4.7 Statik olarak yürütülen ve TGF- $\beta$  içeren alginat lifi-kondrosit kültürünün a. 7. ve b. 21. gününde yapılan MTT testi sonucu formazan kristallerinin oluşumu. Ölçü çubukları 500  $\mu$ m.

### 4.3.2 Dinamik kültür

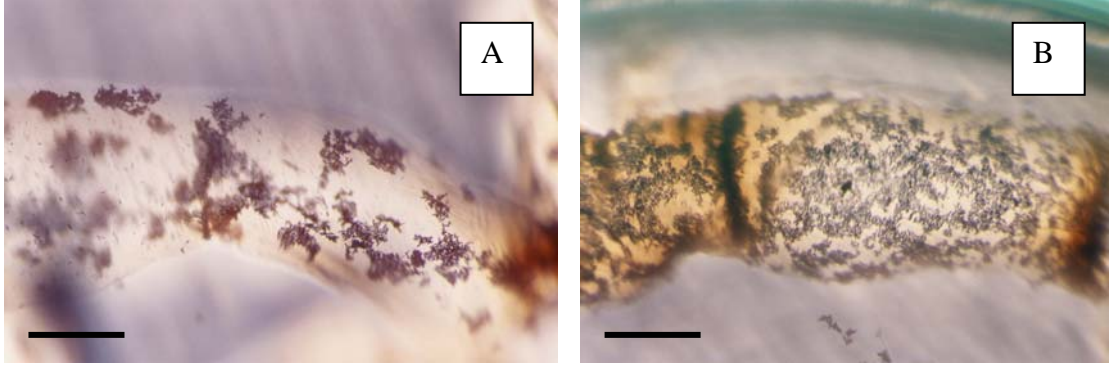
TGF- $\beta$  içermeyen dinamik üç-boyutlu kültürde MTT sonucu oluşan formazan kristallerinin çözülerek UV-spektrofotometresinde absorban değerleri ölçülmüştür. Bu ölçümlerin sonuçları Şekil 4.8'deki grafikte gösterilmektedir.

Ölçülen sonuçlara göre çizilen grafiğe göre alginat lif içerisine tutuklanan lif içerisindeki kondrosit kültüründe mitokondriyal aktive 14. günde önemli artış göstermiş ve en yüksek aktivite değeri 21. günde ölçülmüştür.



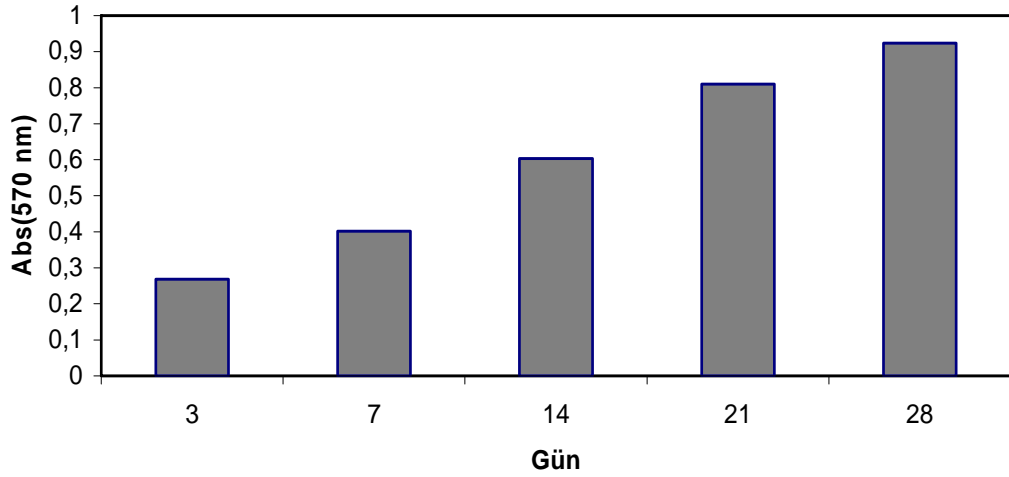
Şekil 4.8 TGF- $\beta$  içermeyen dinamik üç-boyutlu kültürün MTT testi sonucunda 570 nm'deki absorban değerlerinin kültür süresince değişimi.

MTT reaktifinin etkisiyle oluşan formazan kristalleri, alginat lifinin içerisinde ve dış kısımlarında yoğun bir şekilde gözlenmiştir (şekil 4.9).



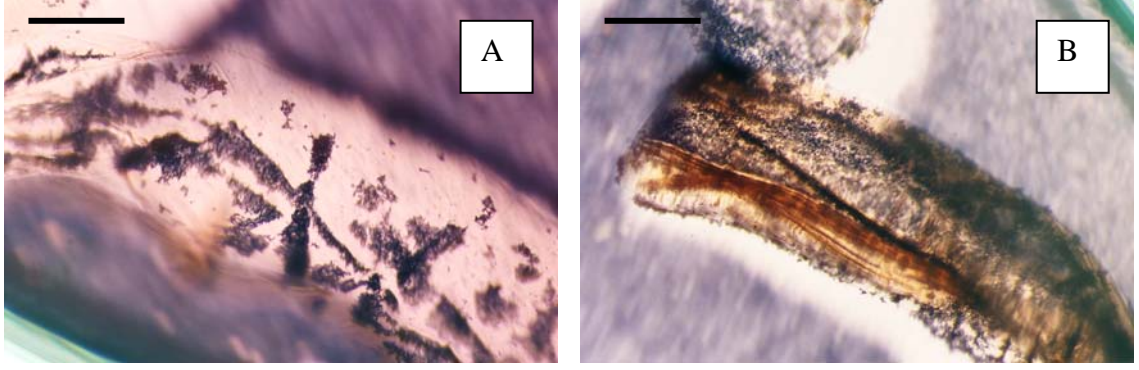
Şekil 4.9 Dinamik olarak yürütülen alginat liflere tutuklanmış-kondrosit kültürünün a. 7. ve b. 21. gününde yapılan MTT testi sonucu formazan kristallerinin oluşumu. Ölçü çubukları 500  $\mu\text{m}$ .

TGF- $\beta$  içeren dinamik üç-boyutlu kültürdeki alginat lifi içerisine tutuklanmış kondrosit örneklerine uygulanan MTT testi sonucu oluşan formazan kristallerinin çözülerek uv-spektrofotometresinde absorbans değerleri ölçülmüştür. Bu ölçümlerin sonuçları Şekil 4.10'daki grafikte gösterilmektedir. Grafiğe göre mitokondriyal aktivite düzenli bir artış göstermiş ve en yüksek mitokondriyal aktivite 28. günde gözlenmiştir.



Şekil 4.10 TGF- $\beta$  içeren dinamik üç-boyutlu kültürün MTT testi sonucunda 570 nm'deki absorbans değerlerinin kültür süresince değişimi.

MTT reaktifi ile oluşan formazan kristallerinde 14. günde büyük artış gözlenmiştir ve kristallerin polimerin üst kısımlarındaki gözenekleri büyük ölçüde doldurmasının yanı sıra polimerin iç kısımlarına doğru ilerlediği belirlenmiştir (Şekil 4.11).



Şekil 4.11 Dinamik olarak yürütülen ve TGF- $\beta$  içeren alginat lif içerisinde tutuklanmış kondrosit kültürünün 7. ve 21. gününde yapılan MTT testi sonucu formazan kristallerinin oluşumu. Ölçü çubukları  $\mu\text{m}$ .

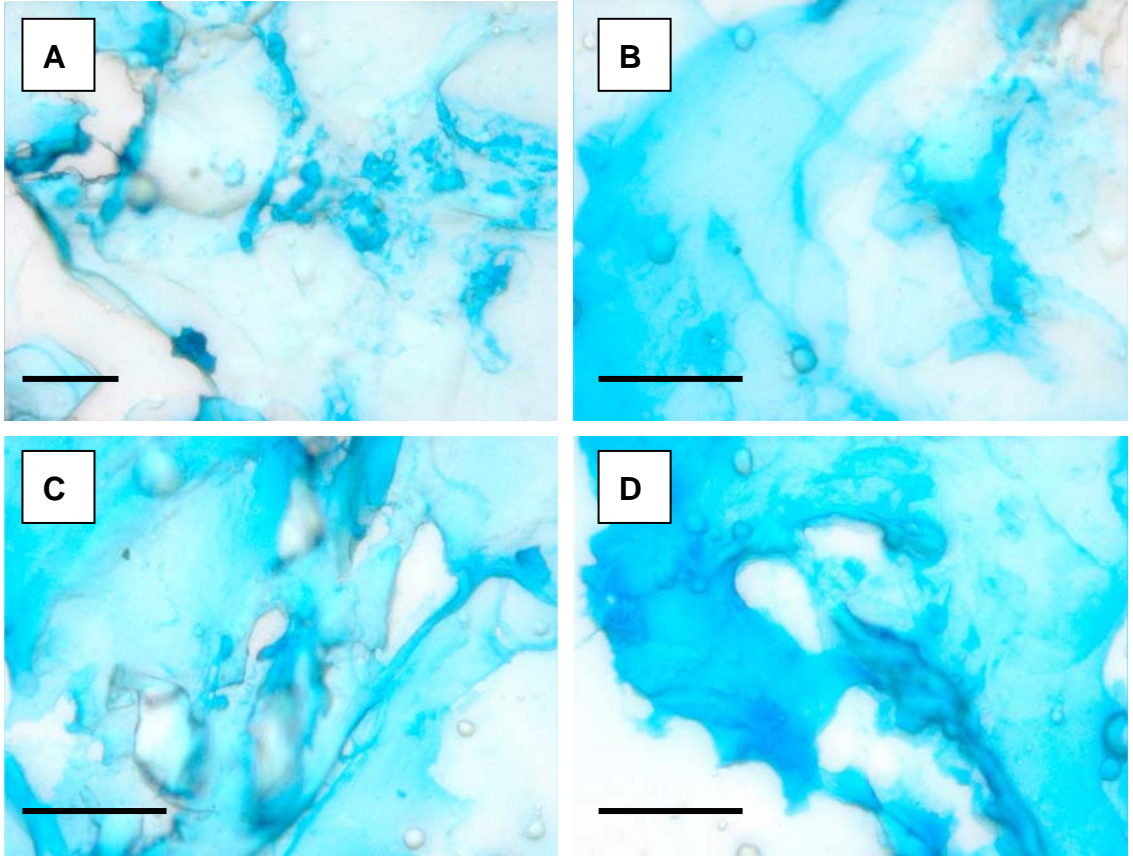
#### 4.4 Histokimya

Glikozaminoglikanlar Alsiyan mavisi, kollajen lifler Safranin-O ile boyanarak tespit edilmiştir. Histokimya boyamalarına ait resimler Şekil 4.12-13'deki gibi gözlenmiştir.

TGF- $\beta$  içeren kültürün 28. gününe ait resimlerde boyamaların, özellikle hücrelerin yakın çevresindeki bölgede (teritoryal matrikste) yoğunlaştığı Şekil 4.12-C'de ve 4.12-D'de görülmüştür. Hücrelerarası bölgede de boya yoğunluğu görülmekle birlikte, bu yoğunluk hücre çevresindeki kadar şiddetli bir yoğunluk gözlenmemiştir.

TGF- $\beta$  içermeyen kültürün 28. gününe ait örneklerinin alsiyan mavisi ile boyanması sonucu elde edilen resim Şekil 4.12-A'da ve 4.12-B'de gösterilmiştir. Bu resimde görüldüğü üzere boyamalar TGF- $\beta$  içeren kültüre göre daha az yoğunluk göstermiştir.

Kalsiyum alginat liflerinin yapısı asidik ortamda ve fosfat tamponunda bozunmaktadır. Histokimya boyamalarından alsiyan mavisi ve safranin-o boyamalarında, boya çözeltileri hazırlanırken düşük konsantrasyonlarda asidik çözeltiler kullanılmıştır. Oluşan zayıf asidik boya çözeltilerinden dolayı kalsiyum alginat liflerinde kısmi bozunma gözlenmiştir.

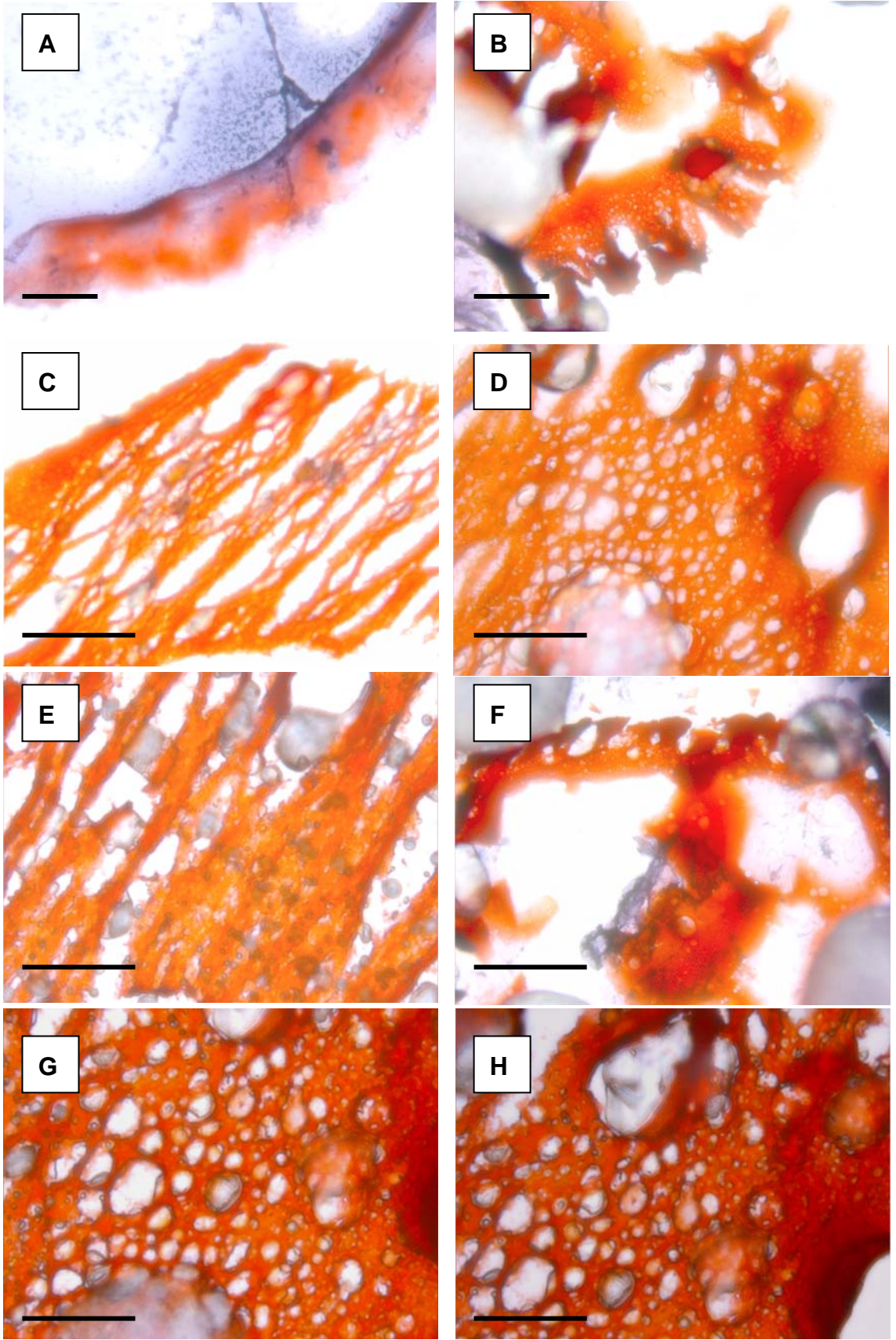


Şekil 4.12 Kalsiyum alginat liflerde tutuklanmış 28 günlük sıçan artiküler kondrosit kültürlerinin Alsiyan mavisiyle boyanmış mikrograf görüntüleri. a, b: TGF- $\beta$  içermeyen dinamik kültür; c, d: TGF- $\beta$  içeren dinamik kültür. Ölçü çubukları: 100  $\mu$ m.

TGF- $\beta$  içermeyen 28. gününde alınan statik ve dinamik kültür örneklerinin safranin-o boyaması sonucunda Şekil 4.13-E’de ve Şekil 4.13-F’de gösterilmiştir. TGF- $\beta$  içermeyen üç-boyutlu dinamik kültür örneklerinin safranin-o ile yapılan histokimya boyamalarında yoğun bir boyanma gözlenmiştir. Bu boyamanın TGF- $\beta$  içermeyen statik kültüre kıyasla çok daha fazla olduğu görülmüştür.

TGF- $\beta$  içeren üç-boyutlu kültürdeki safranin-o boyamalarının TGF- $\beta$  içermeyen kültüre oranla çok daha fazla yoğunlukta olduğu Şekil 4.13’de görülmektedir.

Safranin-o ile yapılan Histokimya boyamalarında statik ve dinamik örnekler arasında fazla bir fark olmadığı gözlenmiştir.



Şekil 4.13 Kalsiyum alginat liflerde tutuklanmış sıçan artiküler kondrosit kültürlerinin Safranin-O boyanmış mikrograf görüntüleri. a: TGF- $\beta$  (+) statik/14 gün; b: TGF- $\beta$  (+) dinamik/14 gün; c: TGF- $\beta$  (+) statik/21 gün; d: TGF- $\beta$  (+) dinamik/21 gün; e: TGF- $\beta$  (-) statik/28 gün; f: TGF- $\beta$  (-) dinamik/28 gün; g: TGF- $\beta$  (+) statik/28 gün; h: TGF- $\beta$  (+) dinamik/28 gün. Ölçü çubukları: 100  $\mu$ m.





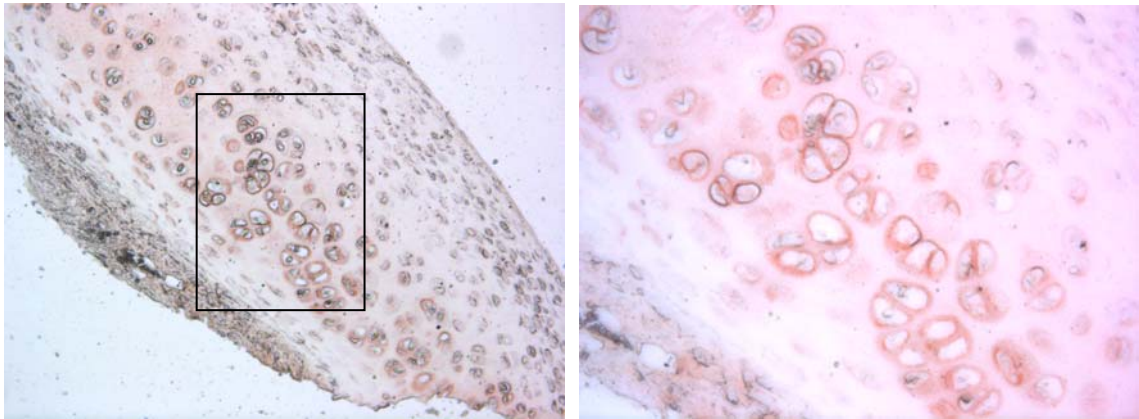
Safranin-o ile yapılan histokimya boyamalarında statik ve dinamik kültürler arasındaki fark çok belirgin olmamakla birlikte sonuç olarak en yoğun boyanmalar TGF- $\beta$  içeren dinamik kültürde tespit edilmiştir.

Safranin-o boyamaları matrikstekki toplam kollajen miktarını göstermektedir. TGF- $\beta$  içeren dinamik kültürde boyama yoğunluğu, hücreler arası bölgede (interterritoryal matrikste) ve hücre çevresinde (territoryal matrikste) çok yoğun olarak görülmektedir. Bu ise kollajen üretimin yüksek oranda gerçekleştirildiğini göstermektedir.

#### 4.5 İmmünohistokimya Boyamaları

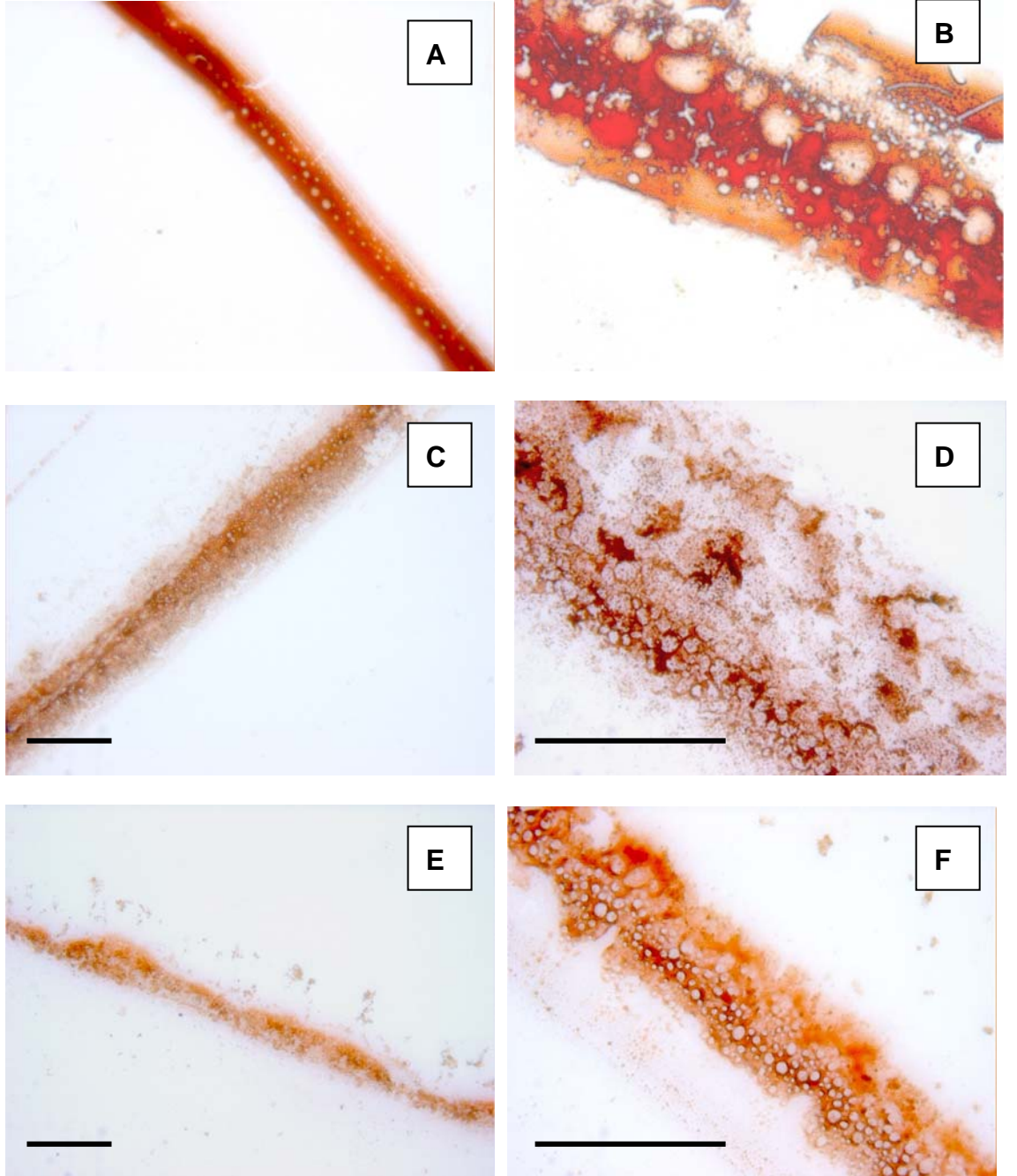
İmmünohistokimya, HDM'de bulunan yapısal proteinlerden kollajen tip-1 ve tip-2 ile GAG'lardan önemli bir matriks bileşeni olan agrekan için yapılmıştır.

Kontrol olarak sıçan femora-patellar eklem kıkırdağı alınmıştır ve kollajen tip-2 lifleri için antikor kullanılarak immünohistokimya boyaması yapılmıştır. Doğal kıkırdağa ait kollajen tip-2 immünohistokimya boyamaları Şekil 4.14'de verilmiştir.



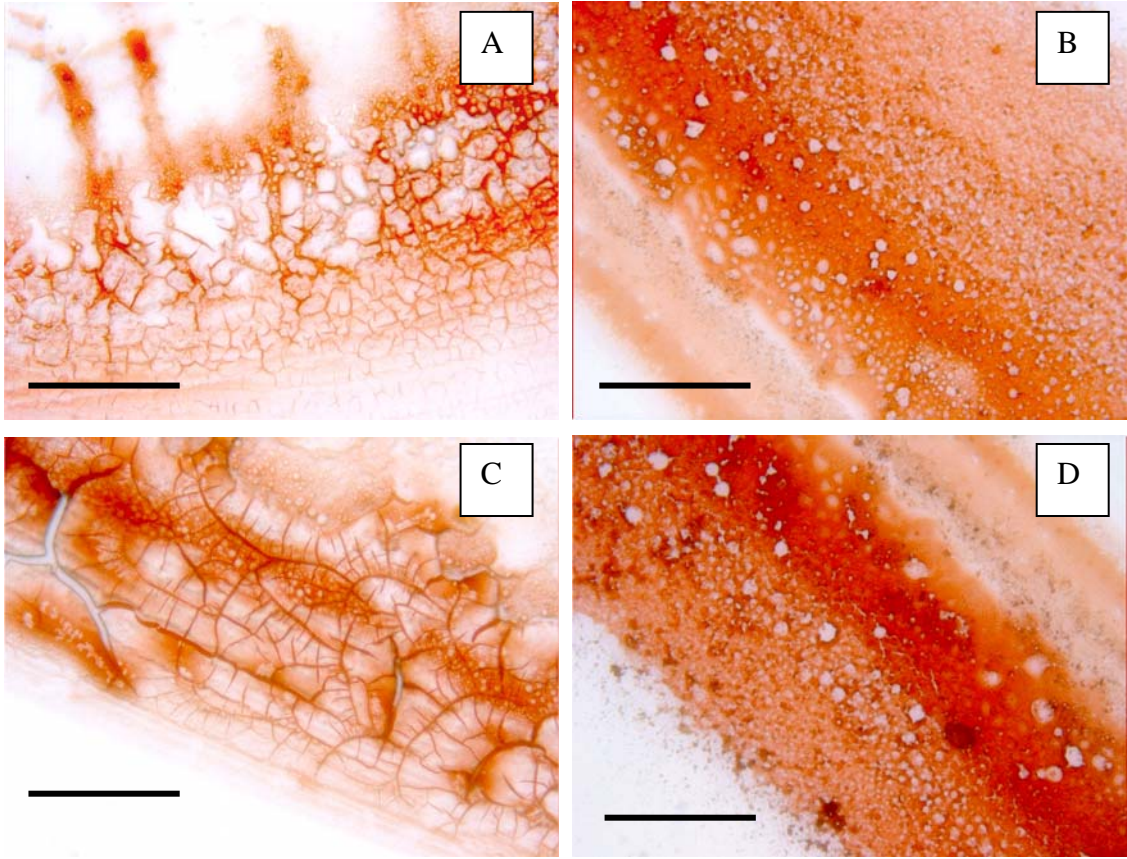
Şekil 4.14 Doğal kıkırdak dokusunun anti-kollajen tip-2 ile boyanması sonucu HDM'deki kollajen tip-2 liflerinin görünümü.

Üç-boyutlu statik kültürdeki anti-kollajen-tip-1 ve tip-2 antikor boyamaları Şekil 4.19’da verilmiştir. Kollajen tip-1 boyamasının zayıf olduğu, buna karşın kollajen tip-2 boyanmasının daha yoğun olduğu görülmektedir.



Şekil 4.15 Kalsiyum alginat liflerde tutuklanmış sıçan artiküler kondrosit kültürlerinin Kollajen tip-1 antikoruyla boyanmış mikrograf görüntüleri. a, b: TGF- $\beta$  (-) dinamik/7 gün; c, d: TGF- $\beta$  (-) dinamik/14 gün; e, f: TGF- $\beta$  (-) dinamik/21 gün. Ölçü çubukları: 200  $\mu$ m.

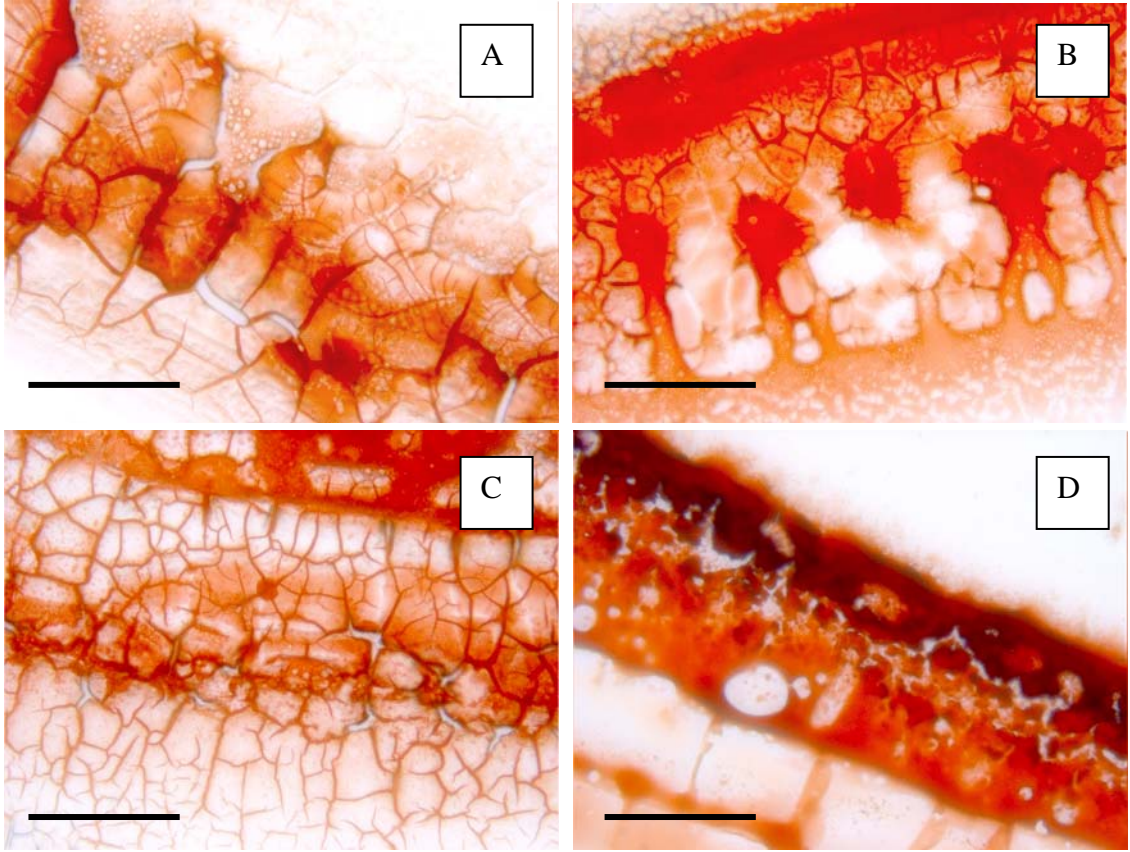
Dinamik kültür örneklerinde kollajen tip-1 boyamasının statik kültüre göre fazla değişiklik göstermediği, kollajen tip-2 boyamasının ise daha yoğun olarak gerçekleştiği görülmektedir.



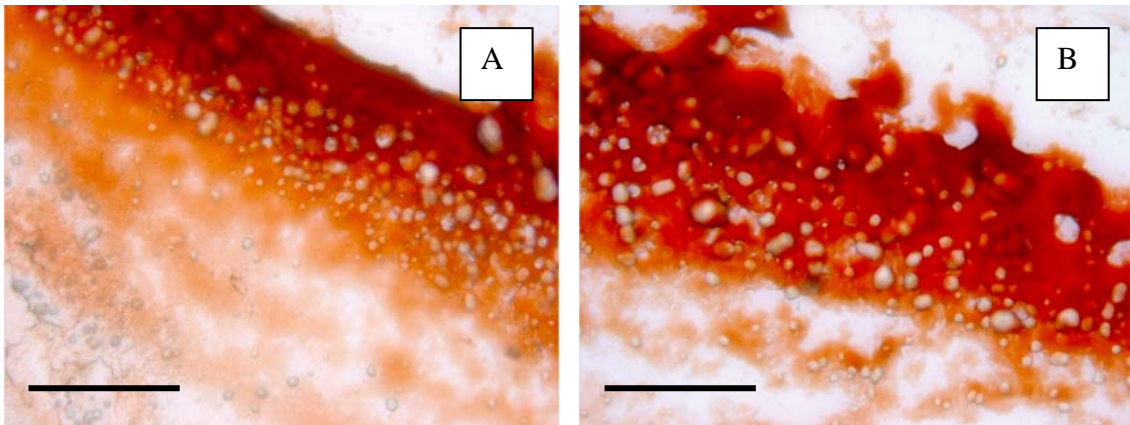
Şekil 4.16 Kalsiyum alginat liflerde tutuklanmış sıçan artiküler kondrosit statik kültürlerinin Kollajen tip-2 antikoruyla boyanmış mikrograf görüntüleri: a: TGF- $\beta$  (-) / 7 gün; b: TGF- $\beta$  (-) / 21 gün; c: TGF- $\beta$  (+) / 7 gün; d: TGF- $\beta$  (+) / 21 gün; Ölçü çubukları: 200  $\mu$ m.

İmmünohistokimya boyamalarına göre 28. günde elde edilen fotoğraflarda statik ve dinamik kültürler arasında çok belirgin bir fark olmadığı gözlenmiştir.

Statik ve dinamik kültür şartlarının her ikisinde de vasat ortamında TGF- $\beta$  içeren kültürler ile vasat ortamında TGF- $\beta$  içermeyen kültürlerle uygulanan immünohistokimya testleri arasında belirgin bir fark oluşmuştur. TGF- $\beta$  içeren vasat ortamında gelişen hücrelerin kollajen ve agrekan üretiminin daha fazla olduğu gözlenmiştir.



Şekil 4.17 Kalsiyum alginat liflerde tutuklanmış sıçan artiküler kondrosit dinamik kültürlerinin Kollajen tip-2 antikoruyla boyanmış mikroskop görüntüleri: a: TGF- $\beta$  (-) / 7 gün; b: TGF- $\beta$  (-) / 21 gün; c: TGF- $\beta$  (+) / 7 gün; d: TGF- $\beta$  (+) / 21 gün; Ölçü çubukları: 200  $\mu$ m.



Şekil 4.18 Statik ve dinamik kültür şartlarında 28 gün süreyle kültürü yapılan ve kalsiyum alginat liflerde tutuklanmış sıçan artiküler kondrositlerinin kollajen tip-2 antikoruyla boyanmış mikroskop görüntüleri: a: statik / TGF- $\beta$  (+); b: dinamik / TGF- $\beta$  (+). Ölçü çubukları: 200  $\mu$ m.

Statik üç-boyutlu kültürün 21. gününde kollajen tip-1ve tip-2 boyanmalarında artış gözlenmiştir. Bu artış, özellikle kollajen tip-2 için belirgin bir şekilde görülmüştür.

TGF- $\beta$  içeren dinamik kültür örneklerinin kollajen tip-2 boyamaları sonucu Şekil 4.17'de verilmiştir. Şekilde görüldüğü üzere en yoğun boyamalar kollajen tip-2 için TGF- $\beta$  içeren dinamik kültürde elde edilmiştir.

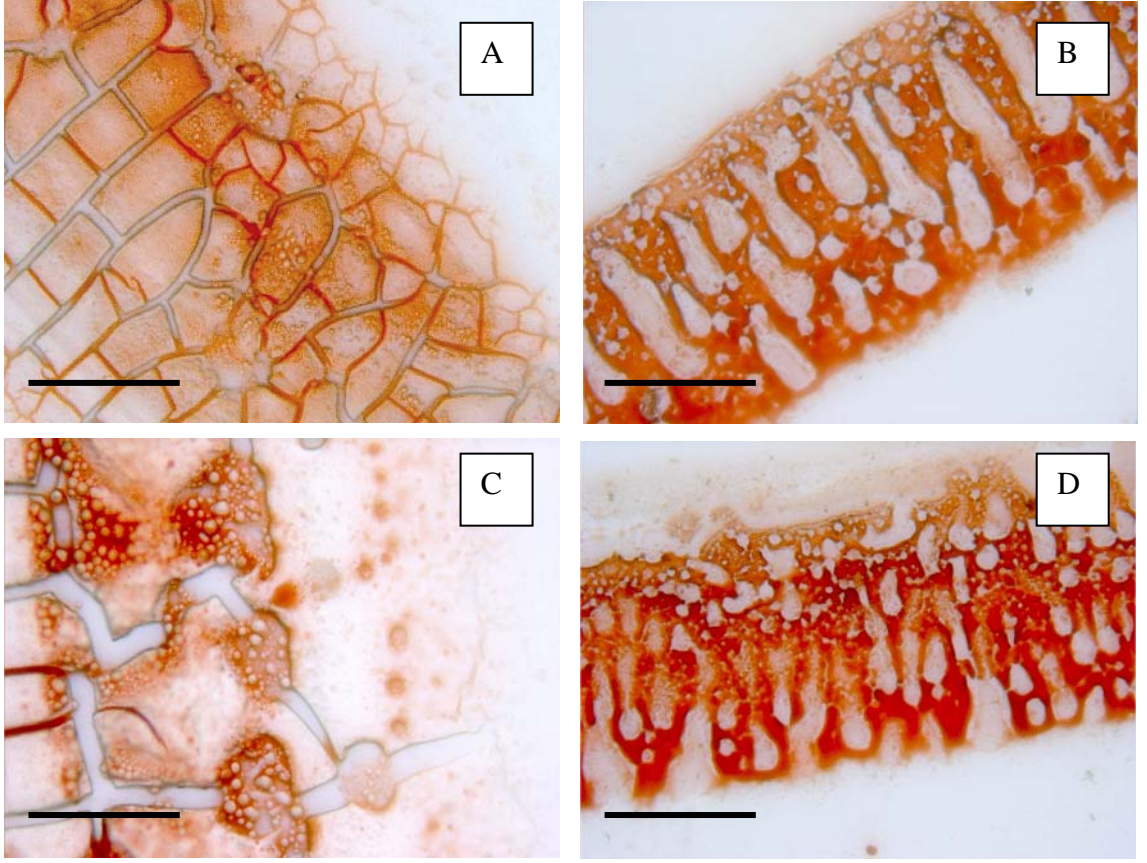
TGF- $\beta$  içeren statik ve dinamik kültür örneklerinin kollajen tip-2 antikoruna ile yapılan immünohistokimya boyamalarının sonucunda statik ve dinamik kültür örnekleri arasında önemli bir fark olmadığı gözlenmiştir.

Sıçan artiküler kıkırdağından izole edilen kondrositlerin kalsiyum alginat lif içerisine tutuklanması ile yürütülen kültür çalışmalarında kondrogenin TGF- $\beta$  içeren dinamik kültürde daha fazla ilerlediği kollajen tip-2 antikor boyamasıyla gösterilmiştir.

Anti-agrekan boyamalarına ait resimler Şekil 4.19, 4.20 ve 4.21'de verilmiştir. Oluşan GAG agregatlarının boyutları ve boyanma yoğunluğu resimlerde açıkça görülmektedir.

Kondrositler doğal yapılarında uzaklaştırıldıklarında hücre dışı matriksi oluşturmak üzere çeşitli yapısal molekülleri sentezlemeye başlar. HDM'yi oluşturan en önemli moleküllerden olan proteoglikanlar, hücre içerisinde sentezlendikten sonra hücre dışına çıkartılır ve genel olarak hücrenin hemen çevresinde yani teritoryal matriksde lokalize olur. Bu nedenle proteoglikan molekülleri teritoryal matrikste daha fazla miktarda bulunur.

Önemli bir proteoglikan molekülü olan agrekanda genel olarak hücrenin çevresinde yüksek oranda bulunmaktadır. Bu nedenle üretilme miktarına da bağlı olarak hücre çevresinde agregatlar oluşturmaktadır. Bu çalışmada, oluşan agregatların boyutlarının takip edilen kültür şartlarına göre değişiklik gösterdiği immünohistokimya fotoğraflarında görülmüştür.

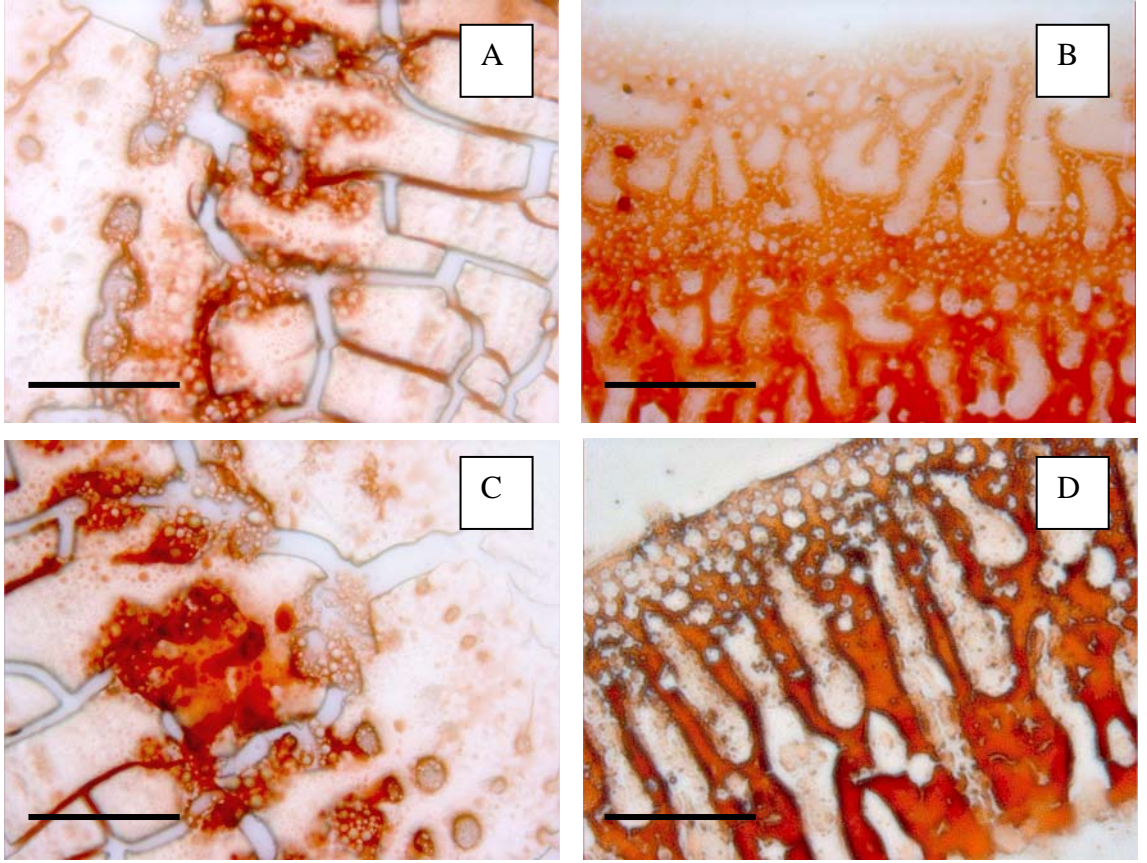


Şekil 4.19 Kalsiyum alginat liflerde tutuklanmış sıçan artiküler kondrosit statik kültürlerinin agrekan antikoruyla boyanmış mikrograf görüntüleri: a: TGF- $\beta$  (-) / 7 gün; b: TGF- $\beta$  (-) / 21 gün; c: TGF- $\beta$  (+) / 7 gün; d: TGF- $\beta$  (+) / 21 gün; Ölçü çubukları: 200  $\mu$ m.

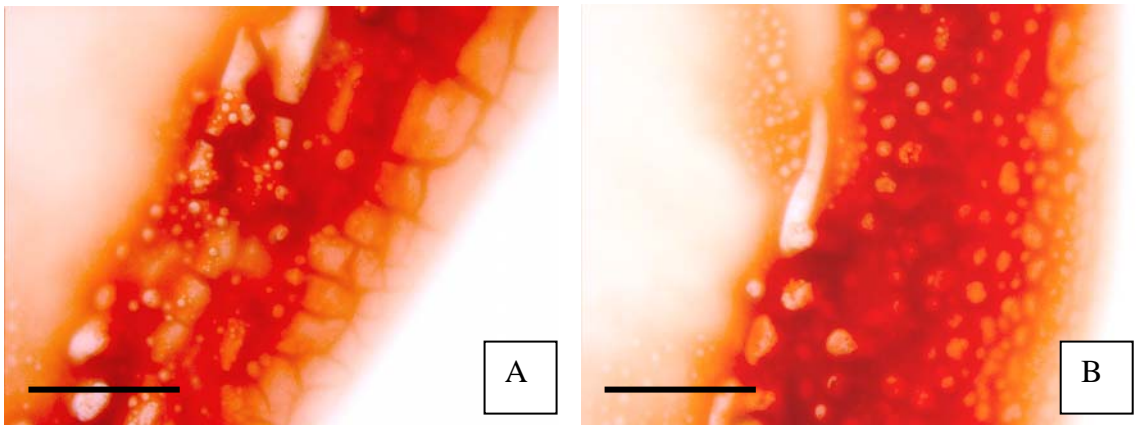
Agrekan için yapılan antikor boyamalarının sonuçları kollajen-2 için yapılan antikor boyamaları ile benzerlik göstermektedir.

Vasat ortamında TGF- $\beta$  içermeyen kültür örnekleri ile vasat ortamında TGF- $\beta$  içeren kültür örnekleri arasındaki fark antikor boyamaları ile ayırt edilmiştir. TGF- $\beta$  içeren kültür ortamındaki örnek kesitlerinin antikor boyamaları TGF- $\beta$  içermeyen kültür örneklerine göre daha fazla oranda olmuştur, dolayısıyla TGF- $\beta$  içeren vasat ortamında gelişen hücrelerin agrekan üretimi daha fazla olmuştur.

Statik kültür şartlarında gelişen doku organoidlerinin ve dinamik kültür şartları altında gelişen doku organoidlerinin boyama yoğunlukları arasındaki fark çok belirgin olarak gözlenmemiştir.



Şekil 4.20 Kalsiyum alginat liflerde tutuklanmış sıçan artiküler kondrosit dinamik kültürlerinin agrekan antikoruyla boyanmış mikrograf görüntüleri: a: TGF- $\beta$  (-) / 7 gün; b: TGF- $\beta$  (-) / 21 gün; c: TGF- $\beta$  (+) / 7 gün; d: TGF- $\beta$  (+) / 21 gün; Ölçü çubukları: 200  $\mu$ m.



Şekil 4.21 Kalsiyum alginat liflerde tutuklanmış sıçan artiküler kondrosit kültürlerinin agrekan antikoruyla boyanmış mikrograf görüntüleri: a: Statik / TGF- $\beta$  (+) / 28 gün; b: Dinamik / TGF- $\beta$  (+) / 28 gün; Ölçü çubukları: 100  $\mu$ m.



## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Sıçan femora-patellar diz ekleminden izole edilen kondrositlerin *in vitro* olarak çoğaltılmasında ve rejenere kıkırdak dokusunun elde edilmesinde üç-boyutlu hidrojel yapılı polimerik biyomalzemeler ve biyoreaktör sistemi kullanılarak kondrogenез için uygun kültür şartlarının belirlenmesi, bu çalışmanın amacını oluşturmaktadır.

Doku mühendisliği yaklaşımı ile hücre-polimer modeli kullanılarak kıkırdak dokusunun elde edilmesinde doğal dokudan izole edilmiş hücreler, sentetik ya da doğal yapıya sahip, biyolojik ortamda bozunan (biyobozunur) ve dokular ile uyumlu olan (biyouyumlu) polimerik destek malzemeleri üzerine yerleştirilmektedir. Bu destek malzemeleri *in vitro* olarak kültüre edilen kıkırdak hücrelerinin, bağlanıp gelişebilmesi için gerekli olan yüzeyi sağlamaktadır. Ayrıca kondrositlerin kendi matrikslerini üretene kadar tutunabilecekleri bir çeşit yapay HDM görevini üstlenmektedir.

Destek malzemesinin üç-boyutlu olması, dokunun şekillendirilebilmesi ve gelişimi için önemli bir parametredir. Kültür işlemi, iki-boyutlu olarak yürütüldüğünde hücrelerin dediferansiye olarak kendi fenotipik özelliklerini kaybettikleri gözlenmiştir. Buna karşın üç-boyutlu ortamlarda yani polimerik destek materyalleri üzerinde ve biyoreaktörlerde yürütülen kültürlerde, kondrositlerin dediferansiye olmadıkları ve kendi işlevlerine devam edebildikleri belirlenmiştir (Temenoff and Mikos, 2000; Demartean et al. 2003). Ayrıca, iki-boyutlu tek tabaka kültürlerde fenotipik özelliklerini kaybeden izole kondrositler, üç-boyutlu malzemelere yerleştirilerek ve kondrojenik vasat ortamına alınarak, kendi HDM'lerini oluşturacak şekilde dediferansiye olmaları sağlanabilmektedir.

Kıkırdak doku mühendisliği üzerine yapılan çalışmalardan bazıları kondrosit elde etme yöntemleri, bazıları kullanılacak biyomalzeme ve kültür tekniği üzerine; bazıları ise kıkırdağı tanımak, uygulanacak tekniği ve sonrasında yapılacak olan teşhis testlerinin üzerine oturtulabileceği, protein veya biyolojik materyali belirlemek amacıyla yönelik olarak yürütülmüştür.

Sıçan femoral-patellar diz ekleminde izole edilen kondrositlerin üç-boyutlu biyobozunur destek materyalleri üzerinde çoğaltılması üzerine yapmış olduğumuz deneylerde; kondrogenез için uygun bir polimerik destek materyal tasarımının ve kültür şartlarının belirlenmesine yönelik olarak kültür koşullarının karşılaştırması yapılmıştır. Bu çalışmaların sonuçlarının doku mühendisliği ve biyomalzeme alanında yapılması düşünülen diğer bilimsel çalışmalar için faydalı olacağını düşünmekteyiz.

Artiküler kıkırdak, birincil olarak tip-2 kollajen molekülleri, proteoglikanlar ve sudan oluşmuş yoğun bir HDM ile çevrili özelleşmiş hücrelerden (kondrositlerden) meydana gelmiştir. Geçmiş yıllarda yapılan çalışmalarda kondrositlerin, iki-boyutlu kültürlerde çoğaltıldıkları zaman kendi fenotipik özelliklerini kaybetmeye başladıkları gözlenmiştir (Furukawa *et al.* 2003). Bunu önlemek için de kondrositlerin kendi doğal ortamlarına benzer ortamlar geliştirilmeye ve bu amaçla da polimerik destek materyalleri kullanılmaya başlanmıştır. Yapay HDM görevini üstlenen üç-boyutlu yapılarda kültüre edilen hücrelerin, fenotipik özelliklerini koruyarak kıkırdaklaşmaya başladıkları gözlenmiştir (Rotter *et al.* 1998). Kıkırdak doku mühendisliği üzerine yürütülen çalışmalarda zamanla üç-boyutlu statik kültürlerden dinamik kültürlere geçiş olmuştur. Elde edilen sonuçlar dinamik kültür şartlarının kondrogenезi ilerlettiğini göstermektedir (Unsworth and Lelkes, 1998). Yapmış olduğumuz çalışmada da bu durum açıkça görülmektedir.

Başarılı bir kıkırdak doku mühendisliği için 3 parametre önem taşımaktadır. Bunlar; düzenleyici sinyaller, hücreler ve HDM'dir. Geçmiş çalışmalar büyüme ve farklılaşma faktörlerinin hücreler ve moleküler biyolojisi hakkında bilgi vermektedir (Reddi, 1994). Bu sinyallerden BMPs (bone morphogenetic proteins), PDGF (platelet derived growth factors), TGF- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ ) ve IGF-I (insulin-like growth factor), kıkırdak ve kemikteki iskelet kök hücrelerinin gelişmesini başlatmak ve ilerletmek için gerekli olan sinyallerin optimal kombinasyonunun oluşumunu sağlamaktadır (Williams *et al.* 2003). Bu büyüme faktörlerinden özellikle TGF- $\beta$  ailesinin bir üyesi olan TGF- $\beta_1$ , kondrogenезi ilerletmek için büyük bir potansiyele sahiptir (Angel *et al.* 2003).

Kıkırdak hücreleri düşük proliferasyon ve rejenerasyon yeteneğine sahiptir. Bu nedenle enzimatik izolasyonun ardından *in vitro* kültüre alındıklarında dediferansiye olmadan çoğalabilmeleri için gelişimlerinin desteklenmesi gerekmektedir. Bu amaçla üç-boyutlu biyomalzemelerin yanı sıra, bazı büyüme faktörleri ve kimyasalların kültürlerde kullanımı gerekmektedir.

### 5.1 Kondrojenze TGF- $\beta$ 'nın Etkisi

TGF- $\beta_1$ 'in kıkırdak hücrelerinin (progenitör hücrelerin ve kondrositlerin) gelişimi ve proliferasyonu için yüksek seçiciliğe sahip olduğu bilinmektedir. Adı geçen diğer büyüme faktörleri kondrojenze için tek başına yeterli etkiye sahip olmamakla birlikte kondrojenze olumsuz yönde sonuçlandırabilmektedir (Handerson and Goltzman, 2000).

TGF- $\beta$ , HDM moleküllerine bağlanabilmek için spesifik formlara sahiptir; PDGF de bu grubun üyesi sayılabilir ancak bu faktör, yaralanma durumunda ortaya çıkmaktadır. TGF- $\beta_1$  ve TGF- $\beta_2$  kondrositlerin maturasyonunu ve proliferasyonunu uyarmalarının yanı sıra hipertrofiyi önlemektedirler (Böhme et al.1995). Özellikle TGF- $\beta_1$  kondrositler için yüksek spesifiteye sahiptir ve kondrojenze olumsuz bir yöne çekebilecek etkiye sahip değildir. Bu nedenle *in vitro* kondrojenze için tercih edilmektedir.

TGF- $\beta$ , matriks moleküllerinin ekspresyonunu regüle eder; önemli olarak HDM moleküllerini degrade eden proteazları inhibe ederek matriks yapısının bozulmasını önler (Uria et al. 1998). TGF- $\beta$ , nötrofiller, fibroblastlar ve makrofajlar için kuvvetli bir kemoatraktanttır. Proteoglikan, fibronektin, kollajen, tenaskin üretimini uyarır ve genel olarak proteaz inhibitörlerinin üretimini uyarak proteaz üretimini inhibe eder.

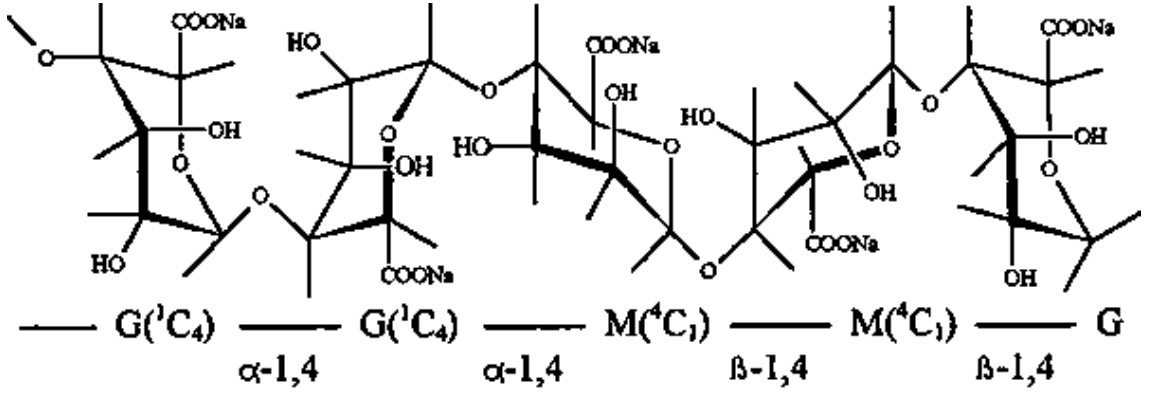
Bu nedenle çalışmamızda özellikle TGF- $\beta_1$ 'in etkisi incelenmiştir. Yapılan literatür araştırmalarında TGF- $\beta_1$ 'in 2-10 ng/mL aralığında kullanıldığı belirlenmiştir ve denemelerimiz sonucunda TGF- $\beta_1$ 'in 5 ng/mL oranında kullanılmasının kültür işlemleri için uygun olacağı sonucuna vardık.

Kültür sırasında önemli olan sadece bir doku organoidinin oluşması olmayıp, bu organoidin aynı zamanda oluşması istenilen dokuyla aynı yapıya sahip olmasıdır. Bu amaçla, izole edilen kondrositlerin kendi fenotipik özelliklerini korumaları sağlanmalıdır. Şöyle ki; tek-tabaka kültürlerde hiyalin kıkırdak hücrelerinin dediferansiye olarak morfolojilerinin ve sentezledikleri proteinlerin miktarlarının değiştiği; aynı zamanda bu hücrelerin 3-boyutlu ortama alındıklarında doğal özelliklerini tekrar kazandığı bilinmektedir (Rotter *et al.* 1998; Furukawa *et al.* 2003; Marijnissen *et al.* 2000).

Bu çalışmada hücrelerin fenotipik özelliklerini koruyarak gelişmesi için öncelikli olarak, üç-boyutlu ortamı sağlayacak polimerik biyomalzemeler üzerine tohumlayarak ya da bu malzemelerin içerisine hapsedilerek, hücreler için yapay bir hücre-dışı matriksin (HDM) temin edilmesi amaçlanmıştır. Bu şekilde hücrelere kendi hücre-dışı matrikslerini (HDM) sentezleyene kadar tutunup, fonksiyonlarını yerine getirebilecekleri bir ortam kazandırılması beklenmektedir. Bağlanma bağımlılığı bulunan bu hücrelere sentetik bir HDM analogu sağlandıktan sonra, gelişimlerini sürdürebilmeleri için uygun kondrojenik vasat şartlarının temini de gerekmektedir. Kondrositlerin düşük yenilenme, tamir ve proliferasyon yeteneğine sahip olmaları ve doğal kıkırdak dokusundaki HDM miktarının oldukça fazla olması, kültür ortamının özel maddelerce desteklenmesini gerektirmektedir.

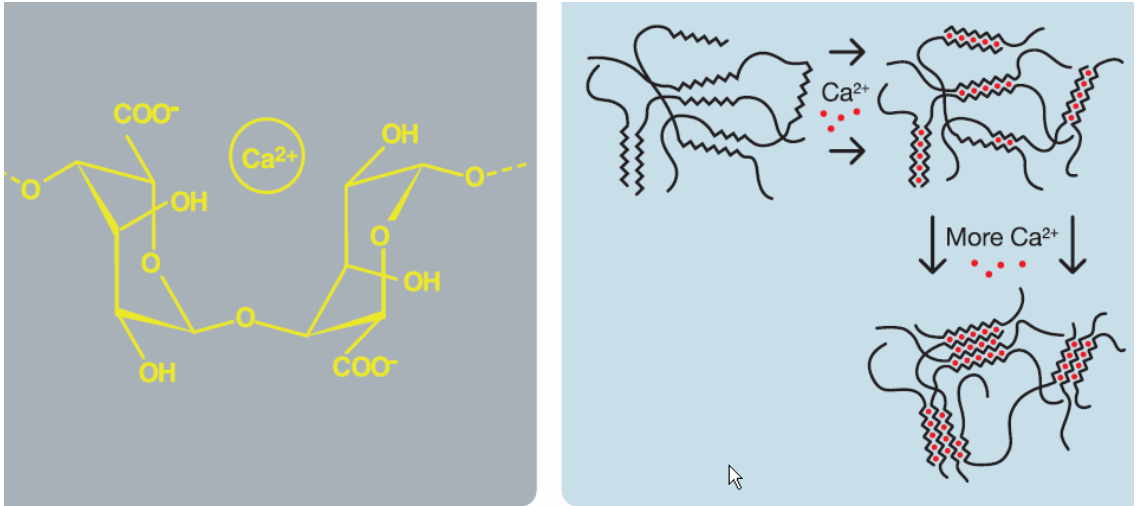
Polimerik destek materyali olarak kullandığımız sodyum alginat/alginate asit, üronik asit dizilerinden oluşmuş lineer bir blok kopolimerdir. Yapıyı oluşturan üronik asit monomerleri,  $\beta$ -D-mannuronik asit ve  $\alpha$ -L-guluronik asitin  $\alpha(1\rightarrow4)$  şeklinde bağlanarak alginate asiti oluşturmaktadır (Şekil 5.1). Polimer zincirleri açıldığında zincirler düzenli olarak sıralanmamıştır ve her bir üronik asitin uzun zincirlerini içerir (Knill *et al.* 2004).

Alginate asitin sodyum tuzu şeklinde bulunan polimer iyonik bir yapıya sahiptir. İyon içermeyen bidestile su ile hazırlanan sodyum alginat çözeltisinin vizkozitesi yüksektir. Ortama iki değerlikli iyonların eklenmesiyle polimer iplikçikleri arasında çapraz bağlar oluşur ve sodyum alginatın vizkos çözeltisi jel yapısını alır. Bu amaçla genellikle kalsiyum iyonları kullanılmaktadır (Peretz, 2004).



Şekil 5.1 Sodyum alginat

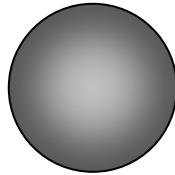
Kalsiyum iyonları, sodyum alginat çözeltisi ile etkileştirildiğinde sodyum iyonlarıyla yer değiştirerek polimer zincirlerini iyonik olarak birbirlerine çapraz bağlar, oluşan bu yapıya “egg box” yapısı denir. Kalsiyum iyonları derişimi ne kadar yüksek olursa çapraz bağlanma oranı ve jelin mekanik dayanımı o kadar yüksek olur. Alginat lifleri, kalsiyum tuzu çözeltisi ya da asidik çözelti içerisine enjeksiyon ile hazırlanmaktadır.



Şekil 5.2 Kalsiyum alginatın yapısı. Ortamda kalsiyum iyonu gibi iki değerlikli kationların olması durumunda, alginat jeli yakın zincirler üzerinde bulunan  $\alpha$ -L-guluronik asit monomerleri arasındaki kalsiyum köprüleri üzerinden iyonik olarak çapraz bağlanır (egg box yapısı)

Yapılan çalışmalarda hücreler, küre şekli verilen hidrojel yapılar içerisine enkapsüle edilmektedir. Bu çalışmalarda hücrelerin yeni dokuyu oluşturma yönünde ilerledikleri buna karşın sayılarının fazla artmadığı görülmektedir. Yürüttüğümüz çalışmada alginat jeline lif formu verilerek hücreler enkapsüle edilmiştir. Kültür sırasında yapılan MTT testleri ve immünohistokimya boyamaları, lif içerisinde yeni kıkırdak dokusu oluşturan hücrelerin aynı zamanda proliferasyonunu da göstermektedir. Proliferasyonun gerçekleşmesinde lif formunun olumlu etkisinin olduğu görülmektedir. Bu durum lineer bir blok kopolimer olan alginatın yine lineer olan lif formunda şekillendirilmesi, hücrelerin kendi lakünlerini oluştururken daha serbest bir ortam bulmasını sağlamıştır. Bu şekilde hücreler kendi lakünlerini oluşturarak çoğalabilmekte ve diğer hücrelerle etkileşime girmektedir.

Doğal kıkırdak dokusunu oluşturan kollajen lifler, hiyaluronik asit molekülleri ve proteoglikanlar genel olarak lineer yapıda olup, doku içerisinde yoğun olarak bulunmaktadır. Alginat jelinin lif formunda olması HDM bileşenleri ile yapısal olarak benzerlik göstermektedir ve buna bağlı olarak elde ettiğimiz sonuçlarda, hücrelerin lifin yapısı ve şekli ile paralel olarak lif içerisinde doğrusal bir şekilde kendi HDM'lerini ürettiğini göstermektedir.



Küre



Lif

Şekil 5.3 Kalsiyum alginatın küre ve lif yapısının şematik görünümü. Koyu gri olarak görünen dış kısımlarda kalsiyum iyonları ile etkileşim daha fazla olduğu için çapraz bağlanmalar daha fazladır. İçi kısımlarda (açık gri bölgeler) çapraz bağlanmalar daha azdır

Lif yapısı küre yapısına göre hücreler için daha serbest ve yumuşak bir ortam oluşturmaktadır (Rendevski and Andonovski, 2003). Bu durum, hücrelerin HDM

TGF- $\beta_1$  içeren vasat ortamında gelişen hücreler daha büyük boyutlara sahiptir ve HDM oluşumları diğer kültürlerle göre daha fazla olmaktadır. Hiyalin kıkırdak için önemli belirleyicilerden olan kollajen tip-2 ve agrekan moleküllerinin miktarının yine bu kültür ortamlarında daha fazla olduğu belirlenmiştir. Bu durum, hücrenin TGF- $\beta_1$ 'in etkisiyle daha fazla gelişmiş olması; buna bağlı olarak da mitokondriyal aktivitenin artması şeklinde açıklanabilir.

Bu çalışmada, alginat lifler içerisine enkapsüle edilen kondrositlerin yeni kıkırdak dokusunu oluşturmalarında TGF- $\beta_1$ 'in etkisi net bir şekilde görülmektedir. İmmünohistokimya boyamaları TGF- $\beta_1$  içeren, hem statik hem de dinamik kültür şartlarında gelişen örneklerde çok yoğun bir şekilde görülmektedir.

TGF- $\beta_1$  içermeyen kültürlerde statik ve dinamik kültür şartları arasındaki fark, Histokimya ve immünohistokimya testleri ile açık bir şekilde gözlenirken, TGF- $\beta_1$  içeren kültürlerde bu iki kültür koşulları arasında çok açık bir fark gözlenmemiştir.

Aynı şekilde hem üç boyutlu hem de TGF- $\beta_1$  içeren kültür ortamında bulunan hücrelerdeki agrekan ve kollajen üretiminin, tek tabaka kültüre göre çok daha fazla olduğu gözlenmiştir.

Hücrelerin olgunlaşmaya başlaması ve çoğalmaları, matriks sentezini hızlandırıcı etkiye sahiptir. Çünkü sınırlı yüzeye sahip kültür ortamında hücrelerin sayısının artması, matriks sentezi için daha çok kaynak sağlamaktadır. Elde ettiğimiz sonuçlar, TGF- $\beta$ 'nın matriks gelişimine ve kıkırdak dokusunun gelişimine olan olumlu etkisini göstermektedir. Bu sonuçlar ışığında TGF- $\beta$  içeren kültür vasatının, uygulanan farklı kültür şartlarında kondrojenizi ilerlettiğini görmekteyiz.

## 5.2 Üç-Boyutlu Ortamın Önemi

Hiyalin kıkırdaktan izole edilen kondrositleri kullanılarak yapılan *in vitro* hücre kültürünün başarısı büyük ölçüde kültür ortamının şartlarına ve besin sıvısına bağlıdır.

bileşenlerini sentezleyerek hücre dışına çıkardığında, bu maddelerin hidrojel yapı içerisinde daha kolay ilerlemesini ve hücrelerin birbirleri ile daha kolay etkileşmesini sağlamaktadır.

Küreler ile yapılan kültürlerde hücreler belirli sayılarda ayrılarak farklı küreler içerisinde tutuklanmakta ve hücreler başka bir küre içerisindeki hücrelerle etkileşime girememektedir. Bu durumda, her bir küre içerisinde ayrı ayrı olarak HDM sentezlenmekte ve her bir kürede ayrı birer organoid parçası oluşmaktadır. Sonuç olarak birleşik bir dokunun oluşması özellikle kısa süreli kültürlerde mümkün olmamaktadır.

Alginat lifi kullanarak yürüttüğümüz çalışmada bir kültür kabındaki hücrelerin tamamı aynı yapı (lif) içerisinde tutulmaktadır. Dolayısıyla hücrelerin tamamı, mikrokürelerde enkapsüle edilen kondrosit kültürlerine oranla daha hızlı bir şekilde birbirleri ile etkileşime girebilmektedir. Bu şekilde, kültür kabındaki tüm hücreler HDM'nin oluşturulmasına katkı sağlamaktadırlar. Sonuç olarak dört haftalık kültür işlemi sonunda makroskopik olarak da gözlenebilen tüm bir organoid oluşabilmektedir.

Enkapsülasyon sonrası hidrojeller, üç-boyutlu kapalı bir ortam oluşturmaktadırlar. Yapıda yüksek oranda su tutulabilmektedir. Bu nedenle, kültür ortamına alındıklarında ilk aşamada yapıdaki suyun yerini kültür sıvısı almakta ve dolayısıyla difüzyonla beslenen kondrositlerin kullanacakları besin maddeleri sürekli olarak bu mikroçevreden temin edilebilmektedir. Bu durum, hücrelerin vasat ortamından daha iyi bir şekilde yararlanabilmelerini sağlamaktadır. Bu durum, statik ve dinamik kültür koşulları arasında belirgin bir farkın ortaya çıkmasını engellemektedir. Buna karşın, TGF- $\beta$  kullanıldığında kültürlerin gelişimi arasındaki fark belirgin bir şekilde ortaya çıkmaktadır.

Kondrogenizde çoğunlukla polimerik destek materyali olarak polimerik iskeleler kullanılmaktadır. En çok kullanılan biyopolimerik destek materyali olan PLGA iskeleler yüksek gözenekliliğe ve özellikle dinamik kültür şartlarına dayanabilmelerini sağlayan mekanik dayanıma sahiptir. Ayrıca *in vivo* çalışmalarda kullanım avantajı sağlayan biyobozunurluk ve biyoyumluluk özelliğine de sahiptir (Freed *et al.* 1994).



PLGA iskelelerin yüksek gözenekliliğe sahip olmaları, yapının yüzey alanını genişleterek hücrelerin adhezyonu için daha geniş bir alan sağlamaktadır. Gözeneklerin birbirleri ile iletişim halinde olması da, hücre etkileşimini ve besin maddelerinin geçişini kolaylaştırmaktadır.

Hidrojel yapılarda besin sıvısı kültürün ilk dakikalarından itibaren yapı içerisine girmekte ve bu şekilde hücreler besin sıvı içerisindeki maddelerle sürekli olarak etkileşmektedir. PLGA iskeleler, bu çalışmada da kullanılan alginat hidrojellerinden farklı olarak açık yapılardır ve PLGA iskeleler üzerinde oluşturulan üç-boyutlu kültürlerde, besin sıvısının iskelenin iç kısımlarına kadar ulaşması daha uzun zaman almaktadır. Çünkü iskele yapı içerisinde hem besin moleküllerinin hücrelere ulaşmak için kat edeceği mesafe artmakta, hem de bağlanan hücrelerin makro gözenekleri kısmen de olsa kapatmasına dayalı olarak kısmi difüzyon kısıtlaması oluşmaktadır.

Difüzyonla beslenen kondrositlerin besin sıvısı ile sürekli ve etkin olarak interaksyonu iskele kullanılan kültürlerde istenilenden daha yavaş gerçekleşmektedir. Ancak dinamik kültür şartlarında kültür işlemine devam edildiğinde etkileşimin arttığı ve statik kültür şartlarına göre olumlu yönde belirgin bir fark olduğu gözlenmektedir (Emin, Elçin and Elçin, 2005).

### **5.3 Tek Tabakada (2-Boyutta) Kültür İşleminin Sonuçları**

Doğal ortamlarında HDM içerisine gömülü olarak üç-boyutlu bir ortamda bulunan kondrositler tek tabaka kültüre alındıklarında yeni ortama uyum göstermeye çalışarak dediferansiye olmaktadır. Bu geriye doğru farklılaşma neticesinde izole edilen hiyalin kıkırdak hücreleri fenotipik ve morfolojik özelliklerini zamanla kaybetmeye başlamaktadırlar (Rotter *et al.* 1998; Furukawa *et al.* 2003 ).

İnvert mikroskop ile yapılan gözlemlerde hücrelerin morfolojilerinin küresel-yuvarlak yapıdan giderek oval ve yassı hale değiştiğini göstermektedir. Histokimyasal testler ise doğal hiyalin kıkırdak dokusundaki protein bileşiminin yaklaşık %70-80'ini oluşturan

kollajen tip-2 üretimini azaldığını ve kollajen tip-1 üretimini ise arttığını göstermektedir. Bu durum kültüre alınan hücrelerin giderek hiyalin kıkırdak hücresi özelliğinden uzaklaşmaya başladıklarını, dolayısıyla dediferansiye olarak çoğaldıklarını göstermektedir (Marijnissen *et al.* 2000).

*In vitro* koşullarda kıkırdak dokusu elde etmek için hücrelerin istenilen yönde farklılaşması gerekmektedir. Aksi durumda istenilen doku tipi elde edilemeyeceğinden kültür işlemi olumsuz sonuçlanmış sayılmaktadır. Bu nedenle iki boyutlu kültür tekniğinin tek başına kullanılmasıyla izole kondrositlerden *in vitro* kıkırdak dokusunun elde edilmesinde istenilen sonuçlara ulaşılamamaktadır.

#### **5.4 Dinamik Kültür Şartlarının Etkisi**

Kıkırdak dokusu organizmada yaygın olarak bulunmakta ve genel olarak hareketli eklemlerde destek materyali olarak görev yapmaktadır. Bu nedenle faaliyet gösterirken bazı gerilim kuvvetlerinin etkisine maruz kalmaktadır.

Kondrogeniz işlemlerinde *in vitro* olarak bu gerilim kuvvetleri statik kültür ortamlarında sağlanamamaktadır. Bu nedenle elde edilen doku tam olarak doğal dokuyla özdeşlik gösterememektedir. Doğal dokuya benzer olarak, gerekli olan gerilimi ve mekanik etkiyi dinamik kültür şartlarında bulmak mümkün olmaktadır.

Bu çalışmada kullanılan RCCS-STLV biyoreaktör sistemi mikro yerçekimini destekleyen NASA tarafından geliştirilmiş bir biyoreaktör sistemidir. Bu sistem yerçekimini minimize ederek hücre kültürleri için mikroyerçekimli bir çevre sağlamaktadır (Dedolph and Dipert, 1971; Wolf and Schwartz, 1991; Gao et al. 1997).

Sürekli dönme hareketinin sağlandığı biyoreaktör sisteminde kültür vasatının alginat liflerinin iç kısımlarına girişini ve hücrelere gerekli olan besinlerin difüzyonunu kolaylaştırmaktadır. Statik kültür sistemlerinde ise devam eden bir hareket sisteminin olmamasından dolayı vasatın, liflerin iç kısımlarına girmesi nispeten daha yavaş

olmaktadır. Ancak yapının hidrojel olması, bu negatif etkiyi azaltmakta ve açık sistemler olan iskele yapılarındaki kadar belirgin bir şekilde ortaya çıkmamaktadır. Yapılan histokimyasal ve immünohistokimyasal boyamalar bu durumu açıkça göstermektedir.

RCCS-STLV biyoreaktör sisteminin sağladığı dönerek karıştırma, hücrelere etkiyen yüzey ve diğer reaktör tiplerinde gözlenen karıştırma gerilimini azaltmaktadır (Freed et al. 1997). Bu etkilerden minimum ölçülerde etkilenen hücreler daha yüksek hücresel aktivite göstererek yeni kıkırdak dokusunun gelişimini ilerletmektedir.

## 5.5 Sonuç

Yapılan gözlemler ve uygulan testler sonucunda yürütülen kültür işlemlerinin karşılaştırılması yapılmıştır. Öncelikli olarak invert mikroskop ile yapılan gözlemler, üç boyutlu ortamda hücrelerin morfolojilerini koruyarak çoğaldıklarını göstermektedir. MTT boyamaları, dinamik kültür ortamında yürütülen kültürdeki hücre-hidrojel modelinin, statik kültürdekine göre nispeten daha yüksek metabolik aktiviteye sahip olduğunu göstermektedir.

Histokimyasal ve immünohistokimyasal boyamalar sonucunda en az kollajen ve agrekan üretiminin tek tabaka kültürde olduğu belirlenmiştir. Ayrıca bu kültür ortamında salgılanan kollajen tip-2 miktarının azalarak kollajen tip-1 miktarının arttığı ve küçük agrekan agregatlarının oluştuğu tespit edilmiştir.

Üç-boyutlu kültürlerde kollajen ve agrekan moleküllerinin çok daha yüksek oranda üretildiği ve kıkırdaklaşmanın daha fazla ilerlediği gözlenmiştir. Ancak statik ve TGF- $\beta$  içermeyen kültürlerde kıkırdaklaşmanın, biyoreaktörde yürütülen kültürlerdekine göre daha az olduğu ve ortama TGF- $\beta$  ilave edilmesi durumunda statik ve dinamik kültürlerin her ikisinde de kondrogenezin daha hızlı ilerlediği gözlenmiştir. Hidrojel yapıların kullanıldığı kapalı polimerik sistemlerin kullanıldığı statik ve dinamik kültürlerde benzer sonuçlar elde edilmiştir. Buna karşın PLGA iskeleleri gibi açık

polimerik yapıların kullanıldığı statik ve dinamik kültürler arasında önemli farklılıklar olduğu tespit edilmiştir. Bu durum dinamik kültür şartlarının statik kültür şartlarına göre hücreler üzerindeki olumlu etkisinden ve polimerik materyalin yapısından kaynaklanmaktadır.

Vasat ortamına TGF- $\beta$  eklenmesi durumunda, oluşturulmuş olan her üç kültür ortamı için de kıkırdaklaşmanın arttığı ve TGF- $\beta$ 'nın kondrogeneze bütün şartlarda direkt olarak etkideği açıkça görülmektedir.

Bu sonuçlar göz önüne alındığında alginat lifler içerisine kondrositlerin tutuklanmasıyla hazırlanan kültürlerde *in vitro* kıkırdak dokusu geliştirmek için en uygun ortamın, üç boyutlu hidrojel liflerin ve TGF- $\beta$  içeren vasat ortamı ile dinamik kültür şartlarının bir arada kullanıldığı kültür sisteminin olduğu sonucuna ulaşılmaktadır.

## KAYNAKLAR

- Angel, M., Razzano, P. and Grande, D. 2003. Defining The Challenge : The basic science of articular cartilage repair and response to injury. Lippincott Williams & Wilkins, Inc. 11 (3), 168-181.
- Barbero, A., Grogan, S., Schafer D., Heberer, M., Mainil-Varnet, P. and Martin, I. 2004. Age related changes in human articular chondrocyte yield, proliferation and post-expansion chondrogenic capacity. *Osteoarthritis and Cartilage*, 12, 476-484.
- Böhme, K., Winterhalter, K.K., & Brückner, P. 1995. Terminal differentiation of chondrocytes in culture is a spontaneous process and is arrested by transforming growth factor- $\beta_2$  and basic fibroblast growth factor. *Exp. Cell Res.*, 216, 191-8.
- Darlig, E.M., and Athanasiou K.A. 2003. Articular cartilage bioreactor and bioprocesses. *Tissue Engineering*, 9 (1): 9-26.
- Dedolph, R. R. and M. H. Dipert. 1971. The physiological basis of gravity stimulus nullification by clinostat rotation. *Plant Physiology*, 47: 756-764.
- Demarteau, O., Wendt, D., Braccini, A., Jakob, M., Schafer, D., Heberer, M. and Martin I. 2003. Dynamic compression of cartilage constructs engineered from expanded human articular chondrocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 310: 580-588
- Dixit, V. and Elçin, Y.M. 2003. Liver tissue engineering: successes and limitations. *Tissue Engineering, Stem Cells and Gene Therapies (AEMB Series: 534)*, Ed. Elçin YM, NY and London, Kluwer Academic-Plenum Publishers, 57-67
- Dunkelman, N.S., Zimmer, M.P., LeBaron, R.G., Pavelec, R., Kwan, M. and Purchio, A.F. 1995. Cartilage production by rabbit articular chondrocytes on polyglycolic acid scaffolds in closed bioreactor system. *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 46, 299-305.

- Durkut, S., Elçin, A.E., Elçin, Y.M. 2006. Biodegradation of chitosan-tripolyphosphate beads: *in vitro* and *in vivo* studies. *Artif Cells Blood Subs Immobil Biotech*, 34(2): 263-276.
- Elçin, A.E., Elçin, Y.M. 2006. Localized angiogenesis induced by human vascular endothelial growth factor-activated PLGA sponge. *Tissue Engineering*, 12(4): 959-968.
- Elçin, Y.M. 2003. Editor, *Tissue Engineering, Stem Cells and Gene Therapies, Advances in Experimental Medicine and Biology Series: 534*, NY and London, Kluwer Academic-Plenum Publishers, 350 pages, ISBN 0-306-47788-2.
- Elçin, Y.M. 2004. Stem cells and tissue engineering. *Biomaterials: From Molecules to Engineered Tissue (AEMB Series)*, Eds. Hasirci N and Hasirci V., NY and London, Kluwer Academic-Plenum Publishers, pp. 301-316, ISBN 0-306-48583-4.
- Elçin, Y.M., Dixit V., Gitnick, G. 2001. Extensive *in vivo* angiogenesis from the controlled release of human vascular endothelial cell growth factor: Implications for tissue engineering and wound healing, *Artif Organs*, 25(7): 558-565.
- Elçin, Y.M., Elçin, A.E., Bretzel R.G., Linn, T. 2003. Pancreatic islet culture and transplantation using chitosan and PLGA scaffolds. *Tissue Engineering, Stem Cells and Gene Therapies (AEMB Series: 534)*, Ed. Elçin YM, NY and London, Kluwer Academic-Plenum Publishers, 255-264.
- Elçin, Y.M., Elçin, A.E., Pappas, G.D. 2003. Functional and morphological characteristics of bovine adrenal chromaffin cells on macroporous poly (DL-lactide-co-glycolide) scaffolds. *Tissue Engineering*, 9(5): 1047-1056.
- Emin, N., Elçin, A.E. and Elçin, Y.M. 2004. Engineering of cartilage tissue by using isolated rat chondrocytes seeded on a macroporous polymeric scaffold in a NASA-STLV bioreactor. *BIOMED XI, Ankara, Turkey, Sept. 2005, Abs. Book Pp. 81.*
- Emin, N., Elçin, A.E. and Elçin, Y.M. 2005. Effect of TGF- $\beta$  and microgravity on the redifferentiation of isolated rat chondrocytes seeded on porous scaffold. *BIOMED XII, İzmir, Turkey, Sept. 2005, Abs. Book Pp. 86-87.*

- Freed, L. 1998. Chondrogenesis in a cell-polymer bioreactor system. *Exp Cell Res* 240: 58-65.
- Freed, L.E. and Vunjak-Novakovic, G. 1997. Tissue culture bioreactors: chondrogenesis as a model system. *Principles of Tissue Engineering*, 151-165.
- Freed, L.E., Langer, R., Martin, I., Pellis, N.R. and Vunjak-Novakovic, G. 1997. Tissue Engineering of Cartilage In Space. *The National Academy Of Science*, 94, 13885-13890.
- Freed, L.E., Marquis, J.C., Vunjak-Novakovic, G. and Langer, R. 1994. Kinetics of chondrocyte growth in cell polymer implants. *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 43, pg. 597-604.
- Freed, L.E., Marquis, J.C., Vunjak-Novakovic, G., Emmanuel, J. and Langer, R. 1994. Composition of cell-polymer cartilage implants. *Biotechnology and Bioengineering*, 43, 605-614.
- Freed, L.E., Vunjak-Novakovic, G. and Langer, R. 1993. Cultivation of cell-polymer cartilage implants in bioreactors. *J Cell Biochem* 51: 257-64.
- Furukawa, K.S., Suenaga, H, Toita, K., Numata, A., Tanaka, J., Ushida, T., Sakai, Y. and Tateishi, T. 2003. Rapid and large-scale formation of chondrocyte aggregates by rotational culture. *Cell Transplantation*, 12, 475-479.
- Gao, H., P. S. Ayyaswamy and P. Ducheyne. 1997. Dynamics of a microcarrier particle in the simulated microgravity environment of a rotating-wall vessel. *Microgravity Science and Technology*, 10(3): 154-165.
- Grande, D.A., Halberstadt, C., Naughton, G., Schwartz, R. and Manji R. 1997. Evaluation of matrix scaffolds for tissue engineering of articular cartilage grafts. *J Biomed Mat Res*, 24: 211-220.
- Handerson, J.E. and Goltzman D. 2000. Editors, *The Osteoporosis Primer*, Cambridge University Press, 20 pages, ISBN 0 521 64446 1.
- Handley, C.J., Winter, G.M., Ilic, M.Z., Ross, J.M., Poole, C.A. and Robinson, H. 2002. Distribution of newly synthesized aggrecan in explant cultures of bovine cartilage with retinoic acid. *Matrix Biology*, 21, 579-592.

- Höper, J. 1997. Spectrophotometric *in vivo* determination of local mitochondrial metabolism by use of a tetrazolium salt. *Physiol. Meas.* 18: 61–66.
- Junqueira, C.L., Carneiro, J. and Kelley, R.O. 1993. *Temel Histoloji*, 7. Baskı. a Lange Medical Book. Barış Kitabevi. 158-169. İstanbul.
- Knill, C.J., Kennedy, J.F., Mistry, J., Miraftab, M., Smart, G., Grocock, M.R., Williams, H.J. 2004. Alginate fibres modified with unhydrolysed and hydrolysed chitosans for wound dressings. *Carbohydrate Polymers*, 55, 65–76.
- Knudson, C.B. and Knudson, W. 2001. Cartilage proteoglycans. *Cell and Developmental Biology*, 12, 69-78.
- Marijnissen, W J.C.M., van Osch, G. J.V.M., Aigner, J., Verwoerd-Verhoef, H.L. and Verhaar, J.A.N. 2000. Tissue-engineered cartilage using serially passaged articular chondrocytes. Chondrocytes in alginate, combined *in vivo* with a synthetic (E210) or biologic biodegradable carrier (DBM). *Biomaterials* 21: 571–580
- Ming, P., Luis, A.S., Seidel, J., Li, Z., Vunjak-Novakovic, G., Caplan, A.I. and Freed, L.E. 2002. Bioreactors mediate the effectiveness of tissue engineering scaffolds. *FASEB J*, 16: 1691-1694.
- Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays *J. Immunol. Methods*, 65, 55–63.
- Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65: 55-63.
- Murathanoğlu, O. 1996. *Histoloji*. İstanbul Üniversitesi Yayinevi. 75-82. İstanbul
- Nehrer, S., Breinan, H.A., Ramappa, A., Young, G., Shortkroff, S., Louie, L.K., Sledge, C.B., Yannas, I.V. and Spector, M. 1997. Matrix collagen type and pore size influence behaviour of seeded canine chondrocytes. *Biomaterials*, vol. 18 no. 11, pg 769-776.



- Peretz, S. 2004. Interaction of alginate with metal ions, cationic surfactants and cationic dyes. *Rom. Journ. Phys.*, Vol. 49, Nos. 9–10, P. 857–865.
- Reddi, A.H. 1994. Symbiosis of Biotechnology and Biomaterials: Applications in tissue engineering of bone and cartilage. *Journal of Cellular Biochemistry* 56:192-195.
- Reinholz, G.G., Lu, L., Saris, D.B.F., Yaszemski M.J. and O’Driscoll S.W. 2003. Animal model for cartilage reconstruction. *Biomaterials*, 1-11.
- Rendevski, S.J. and Andonovski, A.N. 2003. Microgel structures of calcium alginate in aqueous solutions. *Proceeding supplement of BPU–5, SP06–103, August 25-29, 2003, Vrnjacka Banja, SMN. Pg.2329-2333.*
- Risbud, M., Ringe, J., Bhone, R. and Sittenger, M. 2001. In vitro expression of cartilage-specific markers by chondrocytes on a biocompatible hydrogel: implications for engineering cartilage tissue. *Cell Transplantation*, 10, 755-763.
- Rotter, N., Aigner, J., Naumann, A., Planck, H., Hammer, C., Burmester, G. and Sittenger M. 1998. Cartilage Reconstruction in Head And Neck Surgery : Comparison of Resorbable Polymer Scaffolds for Tissue Engineering of Human Septal Cartilage. *J Biomed Mater Res.*, 42 (3) 347-56.
- Sağlam, M., Aştı, R. ve Özer, A. 2001. Genel Histoloji. Yorum Matbaacılık. Ankara.
- Sittenger, M., Bujia, J., Rotter, N., Reitzel, D., Minuth, W.W. and Burmester, G.R. 1996. Tissue engineering and autologous transplant formation: practical approaches and new cell culture techniques. *Biomaterials*, 17, 237-242.
- Sittenger, M., Reitze, D., Dauner, M., Hierlemann, H., Hammer, C., Kastenbauer, E. and Planck H. 1996. Resorbable polyesters in cartilage engineering: Affinity and biocompatibility of polymer fiber structures to chondrocytes. *Journal of Biomedical Materials Research* vol. 33, 57-63.
- Temenoff, J.S. and Mikos, A.G. 2000. Tissue engineering for regeneration of articular cartilage. *Biomaterials* 21: 431-440.
- The Promise of Tissue Engineering, Special Report, *Scientific American*, 59-89, February 1999.

- Unsworth, B.R. and Lelkes, P.I. 1998. Growing Tissues In Microgravity. *Nature Medicine*, 4, 901-907.
- Uria, J.A., Jimenez, M.G., Balbin, M., Freije J.M.P. and Lopez-Otin C. 1998. Differential effects of transforming growth factor- $\beta$  on the expression of collagenase-1 and collagenase-3 in human fibroblasts. *J. Biol. Chem.*, 273, 9769-77.
- Vacanti, C.A. and Vacanti, J.P. *Principles of Tissue Engineering*, Edit by Lanza R., Langer R., Chick W. 1997. Landes Company, 619-630.
- Vunjak-Novakovic, G., Martin, I., Obradovic, B., Treppo, S., Grodzinsky, A.J., Langer, R. and Freed, L.E. 1999 Bioreactor cultivation conditions modulate the composition and mechanical properties of tissue-engineered cartilage, *J Orthop Res* 17:130-138.
- Williams, C.G., Kim, T.A., Taboas, A., Malik, A., Manson, P. and Elisseeff, J. 2003. *In vitro* chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in a photopolymerizing hydrogel. *Tissue Engineering*, 9 (4). 679-88. (ISI Citation: 19)
- Wolf, D. A. and R. P. Schwartz. 1991. Analysis of gravity-induced particle motion and fluid perfusion flow in the NASA-designed rotating zero-head-space tissue culture vessel. NASA Technical Paper, 3143.

## ÖZGEÇMİŞ

Ankara'da 1979 yılında doğdu. İlk ve orta öğrenimini Amasya'da, lise öğrenimini ise Ankara'da tamamladı. 1998 yılında girdiği Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü'nden 2003 yılında mezun oldu. 2003 yılında Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Temel Biyoteknoloji Anabilim Dalında başladığı yüksek lisans öğrenimini 2006 yılında tamamlayarak Bilim Uzmanı unvanı ile mezun oldu.