

**KIKIRDAK DOKU OLUŞUMUNDA YENİ DOKU MÜHENDİSLİĞİ
STRATEJİLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ**

**DEVELOPMENT OF NOVEL TISSUE ENGINEERING STRATEGIES
ON CARTILAGE TISSUE FORMATION**

SEDAT ODABAŞ

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Biyomühendislik Anabilim Dalı İçin Öngördüğü

DOKTORA TEZİ

olarak hazırlanmıştır.

2011

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Bu çalışma jürimiz tarafından **BIYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI** 'nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Başkan

Prof. Dr. Tulin KUTSAL

Üye (Danışman)

Prof. Dr. Erhan BIŞKIN

Üye

Prof. Dr. Petek KORKUSUZ

Üye

Doç. Dr. İbrahim VARGEL

Üye

Prof. Dr. Ayşe Kevser ÖZDEN

ONAY

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından 27/07/2011 tarihinde uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulunca/...../..... tarihinde kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Adil Denizli

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

KIKIRDAK DOKU OLUŞUMUNDA YENİ DOKU MÜHENDİSLİĞİ STRATEJİLEİNİN GELİŞTİRİLMESİ

Sedat Odabaş

ÖZ

Kıkırdak dokusunun travma, tümör uzaklaştırılması veya mikrotia, anotia gibi konjental hasarlar sonucu kaybı baş ve boyun cerrahisinde karşılaşılan en temel sorunlardan bir tanesidir. Hasarlı bölgeye otolog hücre nakli veya hasarlı bölgeye mekanik destek sağlamak amacıyla çeşitli implantların yerleştirilmesi geleneksel tedavi yaklaşımlarıdır fakat yeterli miktarda uygun hücrenin bulunamaması, implant malzemesinden kaynaklanan dezavantajlar, uygulamada birçok sorun yaratmaktadır. Bunun yanında araştırmacılar son yıllarda artan bir ilgi ile doku mühendisliği uygulamalarını çalışmaktadırlar. Doku mühendisliği mühendislik ilkeleri ile biyolojik bilimlerden gelen bilgilerin harmanlanmasıyla baş ve boyun cerrahisinde kullanılabilecek uygun kıkırdak dokusunun geliştirilmesini sağlayabilir. Doku mühendisliğinde geliştirilen doku iskeleleri ile kıkırdak hücrelerinin oluşturduğu biyohibrid yapı uygun kıkırdak dokusunun oluşmasına izin verecektir. Kıkırdak dokusu avasküler olması nedeni ile, yenilenme yeteneği oldukça sınırlıdır. Kıkırdak dokusunun yenilenebilmesi için gerekli büyüme faktörlerinin ortamda bulunması gerekmektedir. Buradaki temel sorun hücreler in-vitro koşullarda üretildiklerinde bu büyüme faktörlerini zamanla üretme özelliklerini yitirirler. Bu yitirilen özelliklerin tekrar kazandırılmasında araştırmacılar gen tedavi yöntemine başvurmaktadır. Yapılan çalışmalar çok büyük oranda çeşitli virüslerin taşıyıcı olarak kullanıldığı virüs temelli genetik transfeksiyon çalışmaları olmuştur. Her ne kadar genetik materyalin konakçı hücreye aktarılmasındaki verim oldukça iyi olsa da halen virüs temelli çalışmalarda yüksek oranda mutasyon, kanser, immünojenite riski bulunmaktadır.

Bu çalışmada kulak kıkırdak modelinde oluşturulan hasarın tedavisinde doku mühendisliği yaklaşımı ile yeni stratejilerin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, biyoyumlu ve biyobozunur 3 boyutlu jelatin/okside dekstran doku iskeleleri hazırlanmıştır. Primer kıkırdak hücreleri izole edilerek, hazırlanan doku iskeleleri ile etkileşimleri konfokal ve taramalı elektron mikroskopisi kullanılarak incelenmiştir. Primer kıkırdak hücreleri BMP-7 ifade eden plazmid ile transfekte edilerek hücelere bu faktörü sentezleme özelliği kazandırılmıştır. In-vitro deneylerin yanı sıra tavşan kulağında oluşturulan 15mmx15mm'lik kıkırdak hasarının iyileşmesi yalnız hasar, yalnız doku iskelesi, doku iskelesi, primer kıkırdak hücreleri ve doku iskelesi ve genetik modifiye (transfekte) primer kıkırdak hücreleri olmak üzere 4 farklı grupta 4 ay boyunca incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar radyolojik, histolojik ve erken gen ekspresyonu düzeyinde ayrıntılı olarak incelenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Primer kıkırdak hücreler, plazmid DNA, transfeksiyon, kemik morfojenik proteinler

Danışman: Prof.Dr. Erhan BİŞKİN, Hacettepe Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Bölümü.

DEVELOPMENT OF NOVEL TISSUE ENGINEERING STRATEGIES FOR CARTILAGE FORMATION

Sedat Odabaş

ABSTRACT

The loss of cartilage tissue in trauma, tumor resection or congenital defects like microtia or anotia, is one of the major problems in head and neck surgery. Autologous cell transplantation and/or using various implants to support the defect mechanically are some traditional therapy methods. However, lack of enough cells and implants' drawbacks also can cause problems in application. Beside these, with the increasing interest in recent years, researches are dealing with tissue engineering approaches. For head and neck surgery, a proper cartilage tissue can be developed by the combination of tissue engineering principles with the biological science basics. Bio-hybrid structure consisted on tissue engineered scaffold and cartilage cells, can allow to develop a proper cartilage tissue. Cartilage regeneration capacity is limited due to its avascular structure. In order to regenerate a tissue, essential growth factors should exist in the microenvironment. The main concern in cartilage tissue engineering is that the cartilage cells lose their ability to synthesize the growth factors in in-vitro. This ability can be brought in by gene therapy. Most of these studies are various viruses based genetic transfection studies. Although the transfection efficiency is comparatively high, there are still some risks in viral studies like mutation, cancer or immunogenicity.

In this study, it is aimed to develop a novel strategy for the cartilage defects repair in auricle cartilage model with tissue engineering approaches. For this purpose, a biodegradable and biocompatible 3D polymeric gelatin/ox-dextran scaffolds were prepared. Primary cartilage cells were isolated and their interaction with the scaffold were analyzed with Confocal Microscopy and SEM. Primary cartilage cells were transfected with BMP-7 plasmid and cells were induced to synthesize BMP-7.

Beside in-vitro studies, a 15mmx15mm cartilage defect healing in rabbit auricle were monitored up to 4 months in 4 groups defect only, scaffold only, scaffold with primary chondrocytes and scaffold with genetically modified primary chondrocytes. Results were evaluated in terms of histology, radiology and early gene expressions.

Key Words: Primary cartilage cells, plasmid DNA, transfection, bone morphogenetic proteins.

Advisor: Prof. Dr. Erhan Piskin, Hacettepe University, Chemical Engineering Department.

TEŞEKKÜR

Sahip olduğu deneyim ve bilgi ile bu çalışmanın ortaya çıkmasında büyük emek gösteren çok değerli Hocam Sayın Prof. Dr. Erhan Bişkin'e,

Tez çalışmalarımın önemli aşamalarında bilfiil yer alarak bana yardım eden Doç. Dr. İbrahim Vargel ve Yrd. Doç. Dr. Tarık Çavuşoğlu'na, Prof. Dr. Petek Korkusuz ve değerli asistanı Dr. Elif Bilgiç'e,

Her zaman yanımda olduklarını bildiğim akıl hocalarım, dostlarım, yol arkadaşlarım Dr. Bora Garipcan, Dr. Halil Murat Aydın ve ortağım Dr. Hasret Tolga Şirin'e,

Sahip olduğu bilgi ve deneyimi benim ile paylaşan; en başından beri tüm çalışmalarımı usanmadan takip eden çok değerli büyüğüm ve aile dostum, sevgili Dr. Çetin Gülovalı'ya,

Bir bölüme birlikte başlayıp birlikte bitirdikten sonra halen benim yardımımı koşan ve çok değerli zamanı benimle paylaşan sevgili arkadaşım Atiye Seda Yar'a ve ifadelenme çalışmaları için bana çalışma ortamı sağlayan çok değerli Prof. Dr. Sevda Menevşe'ye,

Bir hayvan çalışması için her türlü ortamı sağlayan, çalışmalarımıza eşsiz katkılar sunan, yardımlarını esirgemeyen Gazi Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama Araştırma Merkezi değerli doktor, uzman ve çalışanlarına,

Radyolojik incelemelerde bana çok yardım eden başta Prof. Dr. Sedat Işık ve Dr. Gonca Erbaş olmak üzere Gazi Üniversitesi Radyoloji Bölümü çalışanlarına,

Tüm katkı ve katılımlarını esirgemeyen değerli çalışma arkadaşlarım Zeynep, Aybüke, Ilgın, Gökhan Demirel, Memed, İlyas, Gökhan, Nihan, Filiz, Sinan ve Kadriye'ye,

Çalışmalarım sırasındaki katkılarından dolayı Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK)'na,

Tüm hayatım boyunca benim yanımda olup, desteklerini esirgemeyen Çok Değerli Aileme,

Bir ömrü paylaşmak üzere beraber yola çıktığım hayat arkadaşım, en büyük destekçim, Sevgili Eşim Aynur'a,

TEŞEKKÜR EDERİM...

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

Sayfa

ÖZ	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZERGERLER DİZİNİ.....	xiv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ ve ARAŞTIRMANIN AMACI.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Kıkırdak Doku ve Özellikleri	4
2.2. De-differansiyasyon olgusu	8
2.3. Kıkırdak Gelişimi	9
2.4. Kemik Morfojenik Proteinler	10
2.4.1. Kemik Morfojenik Proteinlerin Yapısal Özellikleri	13
2.4.2. BMP-7	14
2.5. Gen Tedavisi	16
2.6. Kriyojeller	22
2.6.1 Kriyojellerin Doku Mühendisliği Uygulamaları ..	24
2.7. Kıkırdak Doku Mühendisliği Çalışmaları	24
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	26
3.1. Jelatin /Okside-Dekstran Doku İskelelerinin Üretimi	27
3.2. BMP-7 Plazmid DNA hazırlanması	27

3.3. Primer Kıkırdak Hücre İzolasyonu	28
3.4. MTT sitotoksisite testi	29
3.5. Hücre proliferasyon testleri ve in-vitro deneyler	30
3.6. Transfeksiyon Çalışmaları	31
3.7. In-vivo hayvan Deneyleri	32
3.8. Radyolojik İnceleme	34
3.9. Histolojik İnceleme	34
3.9.1	36
3.10. Gen İfadelenmesinin İncelenmesi	37
3.10.1. Dokudan RNA izolasyonu	37
3.10.1. cDNA sentezi	38
3.10.3. Gen İfadelenmesinin Real-Time PCR ile belirlenmesi	39
4.SONUÇLAR VE TARTIŞILMASI.....	46
4.1. Doku iskelelerinin hazırlanması ve karakterizasyonu	46
4.2. In-vitro çalışmalar	50
4.2.1. Primer kıkırdak hücre izolasyonu	51
4.2.2. Sitotoksisite çalışmaları	53
4.2.3. Transfeksiyon çalışmaları.....	53
4.3. Doku iskelesi – Hücre etkileşimleri	57
4.4. In-vivo çalışmalar	61
4.5. Radyolojik incelemeler	63
4.6. Gen İfadelenme Çalışmaları	68
4.6.1. Gen İfade Düzeylerinin Kantitatif Değerlendirilmesi	68
4.6.2. Gen İfade Düzeylerinin Karşılaştırılması	73

4.7. Histolojik Çalışmalar	80
5.SONUÇLAR	85
6. KAYNAKLAR	89
EKLER	101
ÖZGEÇMİŞ.....	113

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1 Hyalin kıkırdak dokusu	6
Şekil 2.2 Elastik kıkırdak dokusu (Kulak Kepçesi)	7
Şekil 2.3 Fibröz kıkırdak dokusu	8
Şekil 2.4 Kıkırdakta de-differansiyasyon olgusu: Doğal dokuda kıkırdak morfolojisi B) Kültür kabına ilk ekim C) Kültür kabında fibroblast benzeri çoğalma davranışı.....	9
Şekil 2.5 BMP sinyalizasyon yolağı	14
Şekil 2.6 hBMP-7'e ait kromozom lokasyon haritası	15
Şekil 2.7 BMP-7 Kristal yapı modeli	15
Şekil 2.8. Gen tedavisinde kullanılan başlıca gen aktarım yolları	17
Şekil 2.9 Lipozom yapısı	19
Şekil 2.10 Plazmid DNA yapısı ve hücre içindeki konumu	21
Şekil 2.11 Vektör/plazmid kompleksinin hücre içine girişi ve transkripsiyonu ...	22
Şekil 2.12 Kriyojelasyon mekanizması : 1. çözültideki makromoleküller; 2. çözücü; 3. düşük-moleküler maddeler; 4. donmuş çözücünün polikristalleri; 5. donmamış sıvı mikrofaz; 6. kriyojelin polimerik çerçevesi; 7. makro gözenekler; 8. Çözücü	23
Şekil 3.1 hBMP7 plazmid taslağı	28
Şekil 3.2 Aggrecan mRNA'sının belirlenmesinde kullanılan primerler ve UPL probun cDNA dizisi üzerindeki yerleşimi	39
Şekil 3.3 BMP-7 mRNA'sının belirlenmesinde kullanılan primerler ve UPL probun cDNA dizisi üzerindeki yerleşimi	40
Şekil 3.4 COL Tip I mRNA'sının belirlenmesinde kullanılan primerler ve UPL probun cDNA dizisi üzerindeki yerleşimi	41

Şekil 3.5 COL Tip II mRNA'sının belirlenmesinde kullanılan primerler ve UPL probun cDNA dizisi üzerindeki yerleşimi	41
Şekil 3.6 GAPDH mRNA'sının belirlenmesinde kullanılan primerler ve UPL probun cDNA dizisi üzerindeki yerleşimi	42
Şekil 4.1 Kriyojenik doku iskelelerinin şişme özellikleri	47
Şekil 4.2. Doku iskelelerinin enzim katkısız biyo-bozunma profilleri	48
Şekil 4.3. Doku iskelelerinin enzim katkılı biyo-bozunma profilleri	48
Şekil 4.4 Okside-Dekstran/Jelatin Doku iskelelerinin SEM mikrografları	50
Şekil 4.5 Primer kıkırdak hücrelerin Işık mikroskopisi görüntüleri.....	52
Şekil 4.6 Primer kıkırdak hücrelerin AO/PI boyamaları	53
Şekil 4.7 C2C12 Miyoblast hücre hatlarında GFP ekspresyonu (60saat)	54
Şekil 4.8 L929 hücre hattında GFP ekspresyonu (60saat)	54
Şekil 4.9 Primer kıkırdak hücrelerinde GFP ekspresyonu (60saat)	55
Şekil 4.10 Doku iskelesine ekilmiş olan primer kıkırdak hücrelerinde zamana bağlı olarak hBMP-7 salımı (n=3)	57
Şekil 4.11 Jelatin /Okside Dekstan doku iskeleleri ile primer kıkırdak hücrelerinin etkileşimi – 10 .gün sonuçları – yüzeysel tabaka (Yeşil – Alexa fluor : Hücre sitoplazması ve doku iskelesi yapıları ; Kırmızı – Propidium iodide : Hücre çekirdekleri)	58
Şekil 4.12 Jelatin /Okside Dekstan doku iskeleleri ile primer kıkırdak hücrelerinin etkileşimi – 10 .gün sonuçları - kesitler (Yeşil – Alexa fluor : Hücre sitoplazması ve doku iskelesi yapıları ; Kırmızı – Propidium iodide : Hücre çekirdekleri)	59

Şekil 4.13 Okside-Dekstan / Jelatin doku iskeleleri ile primer kırkırdak hücrelerinin etkileşimi – 14. Gün sonuçları	60
Şekil 4.14 <i>In-vivo</i> hayvan çalışmaları cerrahi operasyonlar	62
Şekil 4.15 Kontrol grubu (K) aylara göre radyolojik inceleme sonucu	63
Şekil 4.16 Boş Doku iskelesi grubu (S) aylara göre radyolojik inceleme sonucu.....	64
Şekil 4.17 Normal Hücre grubu (N) örneklerin aylara göre radyografik analizi	65
Şekil 4.18 Genetik modifiye / Transfekte Hücre grubu (T) örneklerin aylara göre radyografik analizi	66
Şekil 4.19 GAPDH geninin mRNA düzeyinde ifadesini kantitatif olarak gösteren amplifikasyon eğrileri. GAPDH geninin Real-Time PCR tepkimesine ait Cp değerleri yatay ekseninde yer almaktadır. Dikey ekseninde floresan sinyal izlenmektedir.....	69
Şekil 4.20 Aggrecan geninin mRNA düzeyinde ifadesini kantitatif olarak gösteren amplifikasyon eğrileri. Aggrecan geninin Real-Time PCR tepkimesine ait Cp değerleri yatay ekseninde yer almaktadır. Dikey ekseninde floresan sinyal izlenmektedir.	70
Şekil 4.21 BMP-7 geninin mRNA düzeyinde ifadesini kantitatif olarak gösteren amplifikasyon eğrileri. BMP-7 geninin Real Time PCR tepkimesine ait Cp değerleri yatay ekseninde yer almaktadır. Dikey ekseninde floresan sinyal izlenmektedir....	70
Şekil 4.22 Col TipI geninin mRNA düzeyinde ifadesini kantitatif olarak gösteren amplifikasyon eğrileri. Col TipI geninin Real Time PCR tepkimesine ait Cp değerleri yatay ekseninde yer almaktadır. Dikey ekseninde floresan sinyal izlenmektedir.....	71
Şekil 4.23 Col TipII geninin mRNA düzeyinde ifadesini kantitatif olarak gösteren amplifikasyon eğrileri. Col TipII geninin Real Time PCR tepkimesine ait Cp değerleri yatay ekseninde yer almaktadır. Dikey ekseninde floresan sinyal izlenmektedir	72

Şekil 4.24 Tavşan kıkırdak dokusunda deneysel uygulamadan sonra 3. gündeki Aggrecan, BMP-7, Col TipI ve Col TipII genlerinin mRNA düzeylerindeki değişiklik. Hedef genlerin ifade düzeyleri GAPDH mRNA ifade düzeyi temel alınarak normalize edilmiştir. *; $p < 0.05$. “y eksenini: gen ifadenme değeri”.....74

Şekil 4.25 Tavşan kıkırdak dokusunda deneysel uygulamadan sonra 7. gündeki Aggrecan, BMP-7, Col TipI ve Col TipII genlerinin mRNA düzeylerindeki değişiklik. Hedef genlerin ifade düzeyleri GAPDH mRNA ifade düzeyi temel alınarak normalize edilmiştir. *; $p < 0.05$. “y eksenini: gen ifadenme değeri”.....75

Şekil 4.26 Tavşan kıkırdak dokusunda deneysel uygulamadan sonra 14. gündeki Aggrecan, BMP-7, Col TipI ve Col TipII genlerinin mRNA düzeylerindeki değişiklik. Hedef genlerin ifade düzeyleri GAPDH mRNA ifade düzeyi temel alınarak normalize edilmiştir. *; $p < 0.05$. “y eksenini: gen ifadenme değeri”.....76

Şekil 4.27 Tavşan kıkırdak dokusunda deneysel uygulamadan sonra 30. gündeki Aggrecan, BMP-7, Col TipI ve Col TipII genlerinin mRNA düzeylerindeki değişiklik. Hedef genlerin ifade düzeyleri GAPDH mRNA ifade düzeyi temel alınarak normalize edilmiştir. *; $p < 0.05$. “y eksenini: gen ifadenme değeri”..... 76

Şekil 4.28 Tavşan kıkırdak dokusunda deneysel uygulamadan sonra normal hücreli dokularının 3., 7., 14. ve 30. günler arasındaki Aggrecan, BMP-7, Col TipI ve Col TipII genlerinin mRNA düzeylerindeki değişiklik. Hedef genlerin ifade düzeyleri GAPDH mRNA ifade düzeyi temel alınarak normalize edilmiştir. *; $p < 0.05$. “y eksenini: gen ifadenme değeri”..... 77

Şekil 4.29 Tavşan kıkırdak dokusunda deneysel uygulamadan sonra transfekte hücreli dokularının 3., 7., 14. ve 30. günler arasındaki Aggrecan, BMP-7, Col TipI ve Col TipII genlerinin mRNA düzeylerindeki değişiklik. Hedef genlerin ifade düzeyleri GAPDH mRNA ifade düzeyi temel alınarak normalize edilmiştir. *; p<0.05. “y ekseni: gen ifadenme değerleri” 78

Şekil 4.30: Aylara göre tüm gruplarda kıkırdak rejenarasyonun dokuda histolojik boyama bulguları. (Weigert elastik fibrilleri siyah boyanmaktadır. . EC: Elastik kıkırdak, FC: Fibröz kıkırdak, FCT: Fibröz bağ dokusu, B: Kemik.) 82

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 2.1	İnsanda Kemik Morfojenik proteinler ve Temel Fizyolojik Rollerini ...	12
Çizelge 2.2.	Gen aktarımında kullanılan vektörlerinin avantaj ve dezavantajları	.20
Çizelge 3.1	Kıkırdak hücre proliferasyonu için uygun kültür ortamı	31
Çizelge 3.2	Hayvan deneyleri çalışma çizelgesi	33
Çizelge 3.3	Lohan Histolojik skorlama sistemi	35
Çizelge 3.4	Pineda Histolojik skorlama sistemi	36
Çizelge 3.5	cDNA RT-PCR tepkime karışımı	38
Çizelge 3.6	RT-PCR cDNA Sentezi için Otomatik Isı Döngüsü Programı	38
Çizelge 3.7	Aggrecan, BMP-7, COL Tip I, COL Tip II ve GAPDH Real-time PCR tepkime karışımı	43
Çizelge 3.8	Aggrecan, BMP-7, COL Tip I, COL Tip II ve GAPDH genlerinin ifade düzeylerinin belirlenmesi için kullanılan Real Time PCR tepkime programı	44
Çizelge 4.1	Zamana bağlı kalsifikasyon skorlaması	67
Çizelge 4.2	3., 7., 14, ve 30. günlerdeki Aggrecan, BMP-7, Col Tip I ve Col Tip II gen ifadelenmelerinin Normal gruplar arasındaki istatistiksel analizi	73
Çizelge 4.3	3., 7., 14, ve 30. günlerdeki Aggrecan, BMP-7, Col Tip I ve Col Tip II gen ifadelenmelerinin Transfekte gruplar arasındaki istatistiksel analizi	74

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

BMP	Kemik Morfojenik Protein
TGF	Transforme Edici Büyüme Faktörü
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
ECM	Ekstraselüler Matriks
GFP	Yeşil Floresan Protein
TGF	Transforme Edici Büyüme Faktörü
IGF	İnsülin benzeri büyüme Faktörü
PDGF	Platelet kökenli büyüme faktörü
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
COL I	Kolajen Tip 1 Proteini
COL II	Kolajen Tip 2 Proteini
GAPDH	Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
CP	Eşleşme noktası

1. GİRİŞ VE ARAŞTIRMANIN AMACI

Doku mühendisliği özellikle son yıllarda artan bir ilgi ile, sert ve yumuşak doku kayıplarının onarılmasında, hızlı ve istenen yapıda doku oluşumunu sağlayan bir yaklaşımdır [Langer, Nerem 1995, Sun 2011]. Bu yaklaşımda genellikle hasarlı bölgeye doku iskeleleri ile desteklenmiş sağlıklı hücreler implante edilerek yeni doku oluşumu sağlanır. Doku iskeleleri biyobozunur polimerik yapılar olup, zaman içinde parçalanarak yok olurken yerlerini yeni oluşan dokuya bırakırlar.

Sert doku, kemik ve kıkırdak dokularının kaybı çok yaygın olarak karşılaşılan önemli bir sorundur. Konjental hasarlar, yaralanmalar, travma veya tümör uzaklaştırma nedenleriyle kaybolan kemik ve kıkırdak doku kayıplarının giderilmesinde doku mühendisliği önemli bir tedavi yöntemi olarak ortaya çıkmaktadır.

Plastik ve Rekonstrüktif cerrahi açısından en çok karşılaşılan sorunlardan bir tanesi bir kıkırdak kaybı olgusu olarak adlandırılabilen mikrotia-anotia olgularıdır. Dış kulak; akustik delik (acoustic meatus) ve timpatik membrandan oluşmaktadır. Mikrotia-anotia olguları bu kanal yapısında meydana gelen bir konjental hasardır. Mikrotia ve anotia dış kulak yapısındaki hasarın büyüklüğüne göre sınıflandırılmaktadır [Marx Sınıflandırması –Marx 1926]. En yüksek hasar sınıfı olan 4. Derece mikrotia hastalarında dış kulak ve işitme kanalları tamamen yoktur . [Carey 2006]. Mikrotia ve anotia'nın ortalama olarak dünyada her canlı 10000 doğumda görülme olasılığı bölgelere göre değişmekle birlikte ortalama 2.06'dır (0,79 ile 7,19 arasında) [Luquetti 2011]. Mikrotia tedavisinde en geleneksel yaklaşım kaburga kemikleri ile kulak bölgesine yapılan otolog kıkırdak rekonstrüksiyonudur [Pan 2008]. Bu geleneksel tedavi yöntemi her ne kadar uygulama sıklığı bulsa da hastada kullanılacak kıkırdak bulunamaması, kıkırdak yapısının aktarım bölgesindeki kıkırdak dokusu ile uyum sağlayamaması, otolog aktarımlardaki ikincil operasyon gerekliliği ve bunun getirdiği ek kontaminasyon ve iyileşmede görülen uzama gibi riskler içermektedir. Bu geleneksel yaklaşımın

yanında polietilen plastik implant malzemeleri de kullanılabilir. Her ne kadar kolay şekillendirilebilir olsalar da uygulamanın kişiyi tam anlamıyla tedavi etme amacı yoktur. Estetik kaygıları ortadan kaldırmaktadır. Son yıllarda araştırmacılar doku mühendisliği ilkeleri ile bu soruna bir çözüm yolu bulmaya çalışmaktadırlar. Çeşitli doku iskeleleri ve hücreler kullanarak uygun kulak kıkırdak dokusunun geliştirilmesi çalışmaları yürütmektedirler. [Kusuhara 2009, Kauffmann 2011, Ruszymah 2011]

Kıkırdak dokusu diğer birçok dokunun aksine yenilenmesi oldukça zor olan, damarlanmanın olmadığı bu nedenle damar yolu ile değil difüzyonla madde aktarımını ve beslenmesini sağlayan, sinirsel bağlantısı oldukça az olan bir destek dokusudur. Doku mühendisliği ile geliştirilecek kıkırdak dokusu uygulanacak bölgedeki doğal kıkırdak yapısına benzer yapıda olmalıdır. Kıkırdak dokusunun gelişmesi için ayrıca dokuya özgü birçok doku matriks proteinleri ve büyüme faktörleri de gerekmektedir. Hem primer hem de hücre hattı kullanılarak *in vitro* ve *in vivo* ortamda kıkırdak yapı oluşumunu inceleyen birçok çalışma bulunmaktadır [Hyun 2000, Yamaoka 2011, Sa-Lima 2011]. *In vitro* koşullarda en çok karşılaşılan sorun kıkırdak hücrelerinin tek tabakalı kültür ortamlarında *in vivo'daki* fenotipik özelliklerini büyük birçoğunu kaybetmesi sonucu görülen “de-differentiation” olgusudur [Hiraki 1985]. Sonuçta hücreler doğal kıkırdak yapısının oluşmasını sağlayan dokuya özgü matriks proteinlerini sentezleyememekte ve doğal kıkırdak yapısı oluşmamaktadır. Araştırmacılar bu sorunu aşmak amacıyla kıkırdak hücrelerini, çeşitli yöntemler ile hazırlanan doku destek malzemeleri üzerinde 3 boyutlu şekilde üretme yoluna gitmişlerdir. Bu destek malzemeleri çeşitli büyüme faktörleri ile desteklenmiştir. Böylece doğal kıkırdak yapısına daha yakın kıkırdak dokusu eldesi mümkün olmaktadır [Stokes 2001]. Burada temel sorun doku destek malzemelerinin hazırlanması her ne kadar göreceli olarak ucuz ve kolay da olsa üzerine ekilen hücrelerin büyümesini ve farklılaşmasını sağlayacak büyüme faktörlerinin eldesi zor ve oldukça pahalıdır. Bir diğer sorun ise bu faktörlerin etkilerinin kısa süreli olmasıdır. Etkinin devamı için ilgili büyüme faktörlerinin kültür ortamına sürekli olarak eklenmesi gerekmektedir. Bunun en temel sonucu tedavi maliyetlerindeki artıştır.

Gen aktarımının bu sorunun çözümünde önemli rol oynayacağı düşünülmektedir. Gen Tedavi mevcut bir proteini kodlayan ilgili gen parçasının fiziksel, kimyasal, viral yollar ile hücreye aktarılması esasına dayanmaktadır. Kıkırdak dokusunun gelişmesini sağlayan büyüme faktörlerinin sentezinden sorumlu gen parçalarının kıkırdak hücrelerine aktarılması ile bu hücreler *in vitro* ortam koşullarında ilgili büyüme faktörlerini sentezleyebilir duruma gelebilir. Böylelikle “de-differentiation” olgusunun önüne geçilmiş olur ve *in vitro* koşullarda uygun kıkırdak yapısının oluşumu sağlanabilir. Bu amaçla viral ve non-viral taşıyıcılar kullanılarak yapılmış çalışmalar mevcuttur [Stokes 2001, Ulrich 2005]. Her ne kadar virüsler ilgili gen parçalarının hücreye transfeksiyonunda oldukça başarılı da olsalar, hücrelere özgün olmamaları, uzun dönemli mutajenite ve kanser oluşturmaları, immunojenite riskleri bulunmaktadır. Sonuçta doku hasarının tamiri için geliştirilen bir yöntem hasta için daha büyük sorunlara neden olabilmektedir.

Sunulan çalışma kapsamında mikrotia ve anotia konjental kıkırdak hasarlarının gen tedavisi, doku iskeleleri ve primer kıkırdak hücrelerinin bir arada kullanıldığı yeni bir doku mühendisliği yaklaşımı ile tedavisi amaçlanmıştır. Çalışma kapsamında doku iskelesi üretiminde kullanılacak biyobozunur polimerler ve bunlardan doku iskelesi oluşturma için uygulanacak yöntemler ile ilgili grubumuzun önceki deneyimlerinden yararlanılarak Okside-dekstran/Jelatin doku iskeleleri hazırlanmıştır ve yapı karakterize edilmiştir. Önceki çalışmalardan farklı olarak bu tez kapsamında ilk kez büyümeyi indükleyen BMP7 üretimini sağlayan plazmid DNA kullanılmıştır. *In-vitro* hücre kültürü deneylerinde çeşitli hücre hatları ile birlikte primer kondrositler bu bilgiyi taşıyan plazmid DNA ile transfekte edilmişlerdir. Elde edilen bilgiler ışığında *In-vivo* hayvan modellerinde doku iskelelerinin biyo-uyumlulukları hem yalnız başlarına ve hücreler ile (hem normal hem de genetik modifiye formları) birlikte kullanıldıklarında kıkırdak doku rejenerasyon kabiliyetleri histolojik, radyolojik ve erken dönem gen ekspresyonları düzeyinde incelenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Kıkırdak Doku ve Özellikleri

Kıkırdak dokusu, destek dokusu ailesinin bir üyesidir. ECM yapısı proteoglikan, glikozaminoglikan, makromoleküller ve kolajen ,elastin gibi proteinlerde oldukça zengin bir dokudur. Kıkırdak dokusu ECM özelliklerine göre histolojik olarak temelde 3 alt tipe sınıflandırılmaktadır. Matriks yapısı bolca glikozaminoglikan içeren hiyalin kıkırdak; ECM yapısı bolca fiber içeren elastik kıkırdak ve matriks yapısı kolajen Tip I'ce zengin fibröz kıkırdak [Hall 2005]. Memelilerde hiyalin kıkırdak enkonral kemik bölgelerinde ve larinks kıkırdağının bir kısmında, elastik kıkırdak kulak, epiglotis, larinksin bir kısmı ve omurga disklerinde, fibröz kıkırdak ise kemiğe bağlanan tendon ve ligament bölgelerinde bulunmaktadır. Bu basit fakat evrensel sınıflandırmada histolojik açıdan doku bölgesine bağlı olarak küçük değişiklikler gözlenebilir.

Kıkırdak dokusu vücutta bulunduğu bölgeler göre esneklik ve dayanıklılık sağladığı gibi uzun kemik bölgelerinde ve eklem noktalarında olduğu gibi yumuşak dokulara destek görevi de bulunmaktadır.

Gelişim biyolojisi açısından incelendiğinde embriyonik dönemde vücuttaki birçok kıkırdak bölgesi mezoderm kökenlidir fakat bazı kraniyofasial kıkırdak dokuları nöral krest-ektomezenkimal kökenlidir [Hall 2005].

Kıkırdak dokusu kondrosit adı verilen kıkırdak hücreleri ve bu hücreleri çevreleyen ECM'den meydana gelmektedir. Kondrositler ECM içerisinde lakün adı verilen boşluklarda tek tek veya grup halinde bulunabilirler. Bu oluşan yapılara kondron adı verilmektedir [Akay 2006]. Şekil olarak ovoid yapıda ya da yuvarlaktırlar. Histolojik preparasyona karşı duyarlıdırlar. Genç kondrositlerdeki açık ve bol mitokondrili sitoplazma yaşlanmaya bağlı olarak yağlanır ve protein sentez aktivitesi düşer [Hall 2005-Akay 2006].

Kıkırdak dokuda kondrosit hücreleri dışında, perikondrium çevresinde, dar, iğ şekilli kondrojenik hücreler bulunur. Bu hücreler dokuda mezenkimal hücrelerden farklılaşmışlardır. Kondrojenik hücreler mikroçevre etkisi altında kondroblastlara ve osteoprojenitör hücrelere farklılaşabilirler. Kondroblastlar yoğun protein sentezi gerçekleştiren hücrelerdir bu nedenle bol miktarda salgı vezikülleri içerirler.

Kıkırdak dokusu damarsız (avasküler) bir dokudur. Kondrositlerden salgılanan anti-angiogenez faktörleri kıkırdak dokusunda damarlaşmayı engellemektedir. Damarsız bir doku olması nedeni ile dokunun beslenmesi difüzyon yolu ile olmaktadır. Kıkırdak matriks kondrositler ve çevreleyen ECM yapısı ile bir jel olarak betimlenebilir. Kıkırdak ECM yapısında bulunan Aggrecan proteini oldukça negatif yüklüdür bu hali ile çok miktarda su tutar ve kıkırdak matriks yapısının jelleşmesinde önemli rol oynar. Bu jel yapısının %60-80'i sudan oluşmaktadır. Bu jel yapısı aynı zamanda kıkırdağa mekanik olarak dayanım sağlamaktadır. Bu jel yapısı içerisinde kondrosit aktivitesi diğer dokular ile karşılaştırıldığında düşüktür. Oksijen ve besin ihtiyaçları düşüktür. Bunun en önemli nedeni kıkırdak dokusunun damarsız bir doku olmasıdır. Kıkırdağın etrafı perikondrium adı verilen bağ dokusundan oluşan bir zar yapısı ile kaplanmıştır. Bu zar yapısı kıkırdak dokusunu vasküler destek sağlamaktadır. Ayrıca sinir ve lenfatik kanallarda perikondrium içerisinde yer almaktadır [Akay 2006].

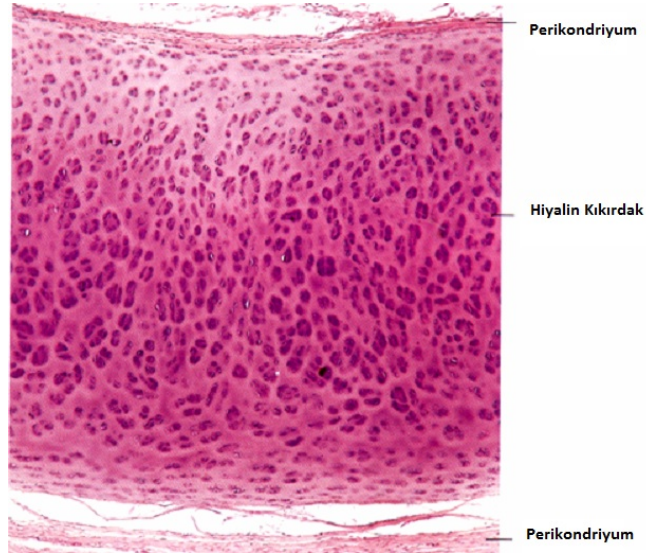
Vücutta bulunan kıkırdak yapıları ayrıntılı olarak incelenirse;

Hiyalin kıkırdak:

Vücutta en yaygın bulunan kıkırdak tipidir. Burun, larinks, Kostaların sternuma bağlandığı ventral yüz, trakeal ve bronşial halkalarda ve hareketli eklem yüzeylerinde bulunur. Ayrıca embriyonik gelişim dönemlerinde, bir çok uzun kemiğin şablonunu oluşturur. Erişkin dönemde ise epifizial plak hiyalin kıkırdaktan oluşur. Hiyalin kıkırdak matriks yapısı; tip II kolajen, proteoglikan, glikoprotein ve ekstrasellüler sıvıdan ibarettir. Matriksin kuru ağırlığının % 40 'ı kolajendir. Buna ilave olarak proteoglikan, glikoprotein ve ekstrasellüler sıvı bulunur.

Hiyalin kıkırdak matriksi temel olarak tip II kolajen içerir. Fakat Tip IX, X, XI ve diğer küçük kolajenler de az miktarda bulunur. Tip II kolajen büyük bantlar

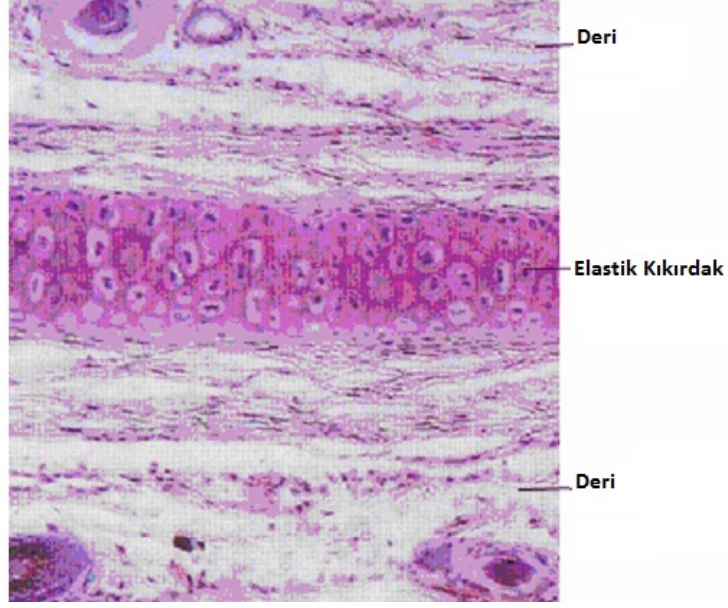
oluşturmaz, buna karşın liflerin kalınlığı lakünelardan uzaklaştıkça artar [10,12]. Temel histolojik yapısı Şekil 2.1 'de gösterilmiştir.



Şekil 2.1 Hyalin kıkırdak dokusu

Elastik kıkırdak:

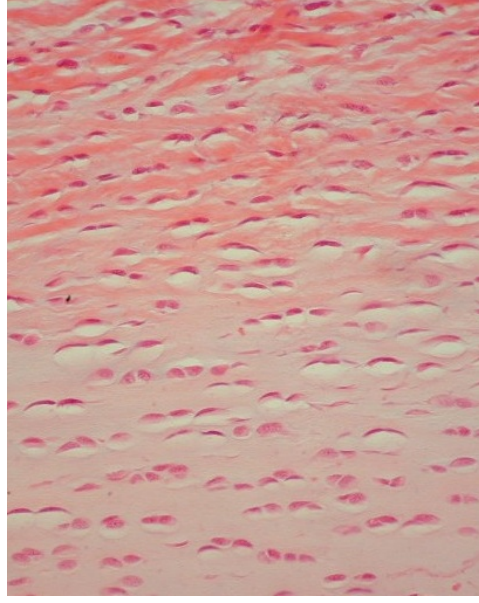
Hyalin kıkırdağa benzer yapıdadır fakat matriks içeriği farklılıklar göstermektedir. Matriks ve perikondrium yapıları elastik lifler içermektedir. Vücutta, kulak kepçesi (pinna), östaki borusu, epiglottis, larinksin bir kısmında bulunmaktadır. Matriks kalsifikasyonu göstermez. Temel histolojik yapısı Şekil 2.2 'de gösterilmiştir.



Şekil 2.2 Elastik kıkırdak dokusu (Kulak Kepçesi)

Fibröz kıkırdak:

Fibröz kıkırdak yapı olarak perikondrium içermez ve ECM yapısında bol miktarda tip I kolajene sahiptir. Fibröz kıkırdak intervertebral disklerde, simphysis pubis, bazı artiküler disklerde ve tendonların kemik uçlarında bulunmaktadır. Geçiş formu olarak adlandırılabilir Fibröz kıkırdak'ta bulunan kondrositler genellikle fibroblastlardan köken alırlar. Temel histolojik yapısı Şekil 2.3 'de gösterilmiştir.



Şekil 2.3 Fibröz kıkırdak dokusu

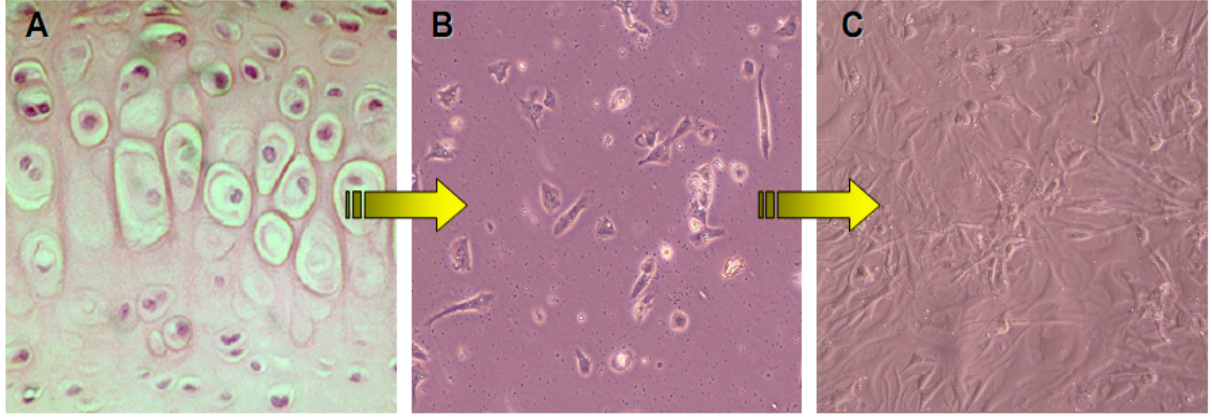
İntervertebral diskler.

Her intervertebral disk iki vertebra arasında bulunur. Bunları bir arada tutar. Disk annulus fibrozus ve nukleus pulpozus olmak üzere iki bölümden oluşur. İntervertebral diskler spinal kolonun hareketi esnasında komşu vertebraların aşınmasını engelleyen hareketli yastıkçıklar olarak görev yapar.

2.2. De-differansiyasyon olgusu

Kıkırdak hücreleri ortam değişimlerine oldukça duyarlıdır. Özellikle mikro-çevrelerinde anlık değişim gen ifadesi düzeyinde kendini gösterir. Vücut içerisinde 3 boyutlu ortamda bulunan kıkırdak hücreleri kültür kaplarında çoğaltılmaya başlandığında, kıkırdak hücrelerinin ilk karşılaştığı etki 2 boyutluluktur. İlk andan itibaren yüzeye tutunmak için integrinler aracılığı ile gerekli fokal yapıları oluştururlar. Aynı anda iç sinyaller ile gen ifadenme düzeylerini değiştirerek de-differansiyasyon döngüsüne girerler. Bu olgu temelde hücrelerin belirli gen ifadeleri kaybederek kıkırdak morfolojisinden fibroblast öncüllerine dönüşümü

olarak açıklanabilir. Bu olgu hücrelerin tek tabakalı kültür kapları yerine doku iskelesi kullanılması ile aşılmaktadır. Şekil 2.4 'de bir de-differansiyasyon olgusu verilmiştir.



Şekil 2.4 Kıkırdakta de-differansiyasyon olgusu: A) Doğal dokuda kıkırdak morfolojisi B) Kültür kabına ilk ekim C) Kültür kabında fibroblast benzeri çoğalma davranışı

2.3 Kıkırdak gelişimi:

Hiyalin kıkırdak yapısının gelişimine bakacak olursak [10,12]; kıkırdağın gelişeceği bölgelerde mezenkimal hücreler, uzantılarını kaybeder, yuvarlaklaşarak yoğunlaşırlar. Böylece yoğun hücrelerden meydana gelen bir kondrifikasyon (kıkırdaklaşma) merkezi ortaya çıkar. Bu hücreler daha sonra kondroblastlara farklılaşırlar. Kondroblastlar hemen bir matriks sentezlerler. Bu süreç ilerlerken kondroblastlar kendine ait küçük kompartmanlar olan laküna içine hapsolürler, bundan sonra artık kondrosit olarak isimlendirilirler. Bu hücreler halen bölünme yeteneğini sürdürdüklerinden, bir laküna içinde 2-4 veya daha fazla hücre grubu oluştururlar, Bu grup izogen grup olarak tanımlanır ve bir tek ana hücrenin 1-2 veya daha fazla bölünmesi ile oluşmuştur. İzogen gruplar matriks ürettikçe lakünalar da bir birlerinden uzaklaşır, kıkırdak içinden büyümeye başlar. Bu içsel (İnterstisyel) tipte büyümez.

Gelişmekte olan kıkırdağın periferindeki mezenkimal hücreler ise ilk olarak fibroblastlara farklılaşır. Fibroblastlar sıkı kolajen öz bir bağ dokusu olan perikondriyumı şekillendirir. Perikondriyum kıkırdağın varlığını ve büyümesini sürdürmesinde sorumludur. Perikondriyum iki tabakalıdır. Dışta fibröz olan tabaka Tip I kolajen, az fibroblast ve kan damarlarından oluşur. İç tabaka ise çoğunlukla kondrojenik hücrelerden oluşur. Kondrojenik hücreler bölünerek kondroblastlara farklılaşır. Bu hücreler matriks sentezleyerek kıkırdağın periferine ilaveler yaparlar. Bu büyüme tipi ise appozisyonal büyüme olarak tanımlanır.

İnterstisyel büyüme yalnızca hiyalin kıkırdağın oluşumu sırasında, perikondriyum olmayan eklem kıkırdağı ve epifizial plaklarda (kemik boyuna büyümesi) meydana gelir [Hall 2005, Akay 2006-Kaloğlu].

2.4 Kemik Morfojenik Proteinler

Kemik morfojenik proteinler (BMP), Transforming büyüme faktörü (TGF) – β büyük ailesinin bir üyesi olarak hücrede birçok kritik prosesin kontrolünde (önleme ya da uyarma şeklinde) görev alan büyüme faktörleridir. Kemik ve kıkırdak gelişimi üzerinde düzenleyici etkilere sahiptirler. Özellikle bu düzenleyici etkileri kök hücrelerde, progenitör hücrelerde ve hücrelerin çoğalmasını indükleyen biyolojik reaksiyonların aktivasyonunda görülmektedir [Reddi 2009]. Kemik morfojenik protein kodlanmasından ve sinyalizasyonundan bu güne kadar 20 kadar genin sorumlu olduğu ortaya çıkarılmıştır [Reddi 2009].

Kemik ve kıkırdak gelişimi ve iyileşme süreçleri; çok uzun yıllardır araştırmacıların ilgisini çekmektedir. Yapılan çalışmalar ile hasarlı kemiklerin iyileşmesini etkileyen parametreler belirlenmeye çalışılmıştır [Wozney 1988]. Kemik Morfojenik Protein kavramı ilk kez 1965'de Urist tarafından ortaya atılmıştır. Urist ve arkadaşları yaptıkları çalışmada kemik yenilenmesinden aktif bir protein-matriks topluluğunun sorumlu olduğunu ortaya koymuştur [Urist 1965]. İlerleyen yıllarda bu proteinler ayrıntılı olarak tanımlanmıştır.

Daha sonra 80'li ve 90'lı yıllarda rekombinant DNA teknolojisinin ortaya çıkması ve gelişmesi ile bu proteinlerin rekombinant olarak üretilme çalışmaları gerçekleştirilmiştir [Wozney 1998, Bessa 2008]. Bu rekombinant BMP'ler ile literatürde çok çeşitli çalışmalar mevcuttur. Özellikle bu çalışmalar dişçilik uygulamaları, omurga cerrahisi ve kırık iyileşmesi konularında toplanmıştır [Nakashima 2003, Seeherman 2005].

2002 yılı Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanan 2 farklı BMP ürünü medikal marketlerde yerini almıştır. Bu ürünler omurga füzyonu ve uzun kemiklerde kaynamama olgusunda kullanılmak üzere rekombinant insan kemik morfojenik proteini 2 (rhBMP-2) ve rekombinant insan kemik morfojenik proteini-7 (rhBMP-7)'dir [McKay 2007, White 2007].

Çizelge 2.1 'de insanda tanımlanan kemik morfojenik proteinler ve belirlenen temel fizyolojik rolleri verilmiştir. Çizelge'dan da görülebildiği gibi BMP-1 BMP ailesi içinde değildir [Kessler 1996]. BMP-1 aslında hatalı bir tanımlama olarak; Embriyonik gelişimde pro-kolajen proteinaz aktivitesi içeren bir proteindir. BMP'ler genel olarak kemik ve kırık gelişiminde rol oynasalar da Çizelge 2.1'den de görülebildiği gibi diğer farklı çok çeşitli fizyolojik olayda da rol oynadığı literatürdeki çok çeşitli çalışmalar ile ortaya konulmuştur [Bessa 2008, Chen 2004, Knight 2006, Reddi 2003, Zhao 1996, Tsumaki 2005, Shimasaki 2004, Callis 2005, Simic 2005, White 2001].

Çizelge 2.1 İnsanda Kemik Morfojenik proteinler ve Temel Fizyolojik Roller

BMP	Adlandırma	Temel Fizyolojik Rolü
BMP-2	BMP-2a	Kemik ve kıkırdak morfogenezini ve kalp oluşumu
BMP-3	Osteogenin	Kemik morfogenezinin düzenlenmesinde negatif rol oynar.
BMP-3b	GDF-10	Kemik morfogenezinin düzenlenmesinde negatif rol oynar.
BMP-4	BMP-2b	Kemik ve kıkırdak morfogenezini ve böbrek oluşumu
BMP-5	-	Kemik morfogenezini ve ekstremiteler oluşumu
BMP-6	Vrg1, Dvr6	Kemik ve kıkırdak morfogenezinde hipertrofi
BMP-7	OP-1	Kıkırdak ve kemik morfogenezini ve böbrek formasyonu
BMP-8	OP-2	Kemik morfogenezini/ spermatogenez
BMP-8b	OP-3	Spermatogenez
BMP-9	GDF-2	Kemik morfogenezini ve kolinerjik nöronların oluşumu
BMP-10	-	Kalp morfogenezini
BMP-11	GDF-11	Aksiyal iskelet, Göz , Böbrek ve pankreas gelişimi
BMP-12	CDMP-3 , GDF-7	Tendon, Ligament ve duyu nöronlarının gelişimi
BMP-13	CDMP-2 , GDF-6	Kıkırdak gelişimi ve hipertrofi
BMP-14	CDMP-1 , GDF-5	Kondrogenez ve anjiyogenez
BMP-15	GDF-9b	Yumurta fizyolojisi
BMP-16	-	Embriyonik gelişim
BMP-17	-	Embriyonik gelişim
BMP-18	-	Embriyonik gelişim

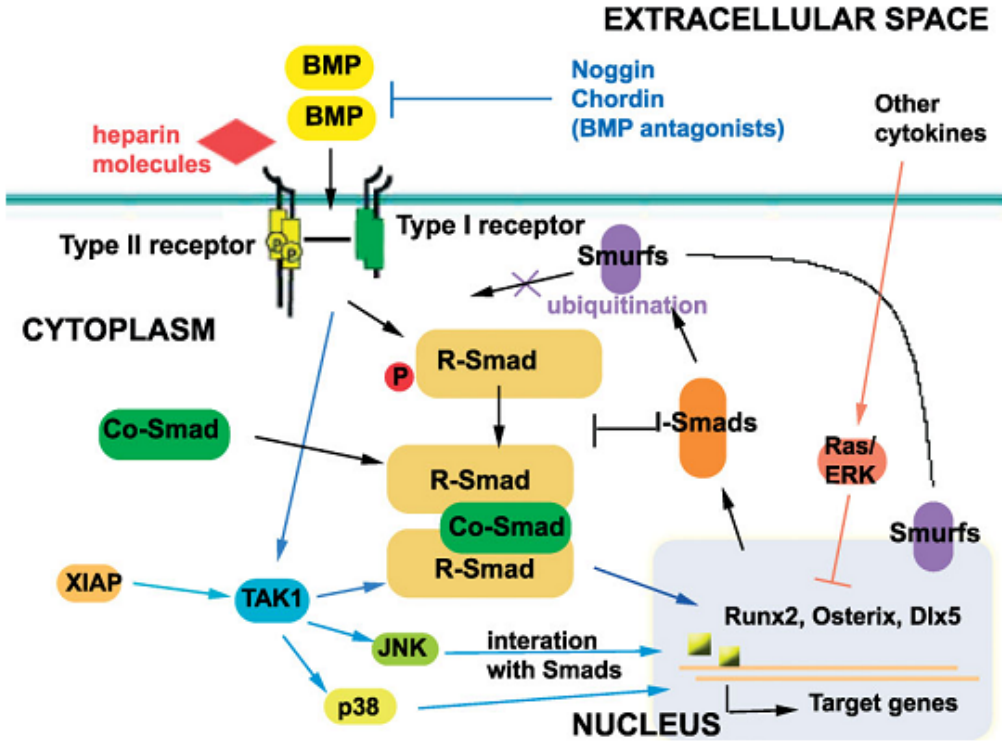
2.4.1 Kemik morfojenik proteinlerin yapısal özellikleri

BMP-1 hariç tüm kemik morfojenik proteinler TGF- β süper ailesinin bir üyesidir. Yapı homo ve heterodimer yapılarının disulfid bağları ile birbirine bağlanmasından oluşmuştur. Bu homo-dimer ve hetero-dimer yapıları biyolojik olarak aktif konformasyonda bulunurlar. Kemik morfojenik proteinlerdeki aktif dimer formasyonu moleküller arası bir bağ ve 6 adet molekül içi disulfid bağları ile bir araya gelen yedi sistein molekülü ile oluşur [Bessa 2008, Israel 1996].

BMP gibi tüm TGF- β süper ailesi üyeleri hücre yüzeyindeki serin-treonin kinaz reseptörlerine bağlanırlar. Bu bağlanma neticesinde hücrede hücre içi metabolik aktiviteler ve çok çeşitli metabolik yolların aktive olması sağlanarak hücre çoğalması ve farklılaşması tetiklenmiş olur. BMP'lerin sinyalizasyon yolağı Şekil 2.5'te verilmiştir.

Hücre yüzeyinde TGF- β süper ailesi için Tip I; Tip II ; Tip III olmak üzere 3 çeşit reseptör bulunmaktadır. Bunlardan sadece Tip I ve Tip II, kemik morfojenik proteinlerin bağlanmasında ve aktivasyonunda ve sinyalizasyonda etkilidir [Heldin 1997, Shi 2003].

Bir sinyal hücrede sitosol içesinde dönüştürüldüğü anda doğrudan nukleus içerisine aktarılır. Smad ailesinin üyeleri doğrudan tip I reseptörüne bağlanır ve onu fosforile eder. Aktif haldeki bir Smad üyesi reseptör kompleksinden ayrılarak diğer Smad üyeleri ile oligomerize olur ve nukleus içlerine göç eder. Smad ailesi bu göçten sonra genomdaki özel bölgelere bağlanarak gen aktivitesini düzenler..

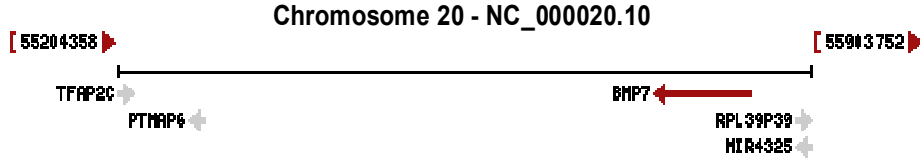


Şekil 2.5 BMP sinyalizasyon yolağı

BMP reseptörleri Smad1, Smad5 veya Smad8'i fosforile ederler. TGF- β ailesinin diğer üyeleri ise BMP'lerden farklı olarak Smad2 veya Smad3'ü fosforile ederler. BMP sinyal aktarımı düzenlenmesinde sadece Smad ailesi sorumlu değildir. Hay ve ark. Yaptıkları çalışmalarda protein kinaz C'nin BMP2'nin indüklediği osteoblastlardaki apoptoz olayında temel rol oynadığını bulmuşlardır [Hay 2001].

2.4.2 BMP-7

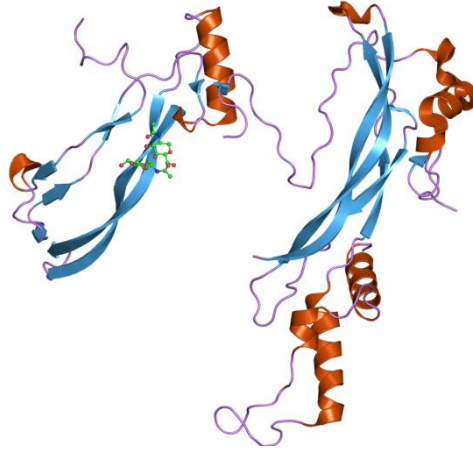
BMP-7 (osteojenik protein / OP-1) 49kD'luk bir propeptit yapısıdır. İlgili sentez geni insanda 20.kromozom üzerinde bulunur. Kromozom lokasyon haritası Şekil 2.6'da verilmiştir.



Chromosome : 20 Location 20q13

Şekil 2.6 hBMP-7'e ait kromozom lokasyon haritası

Ana yapıda 7 sistein bulunur ki, bu yapılardan BMP-7lerin disülfid bağları yaparak dimer formasyonu alması sağlanır. BMP-7'ye ait kristal yapı modeli Şekil 2.7'de verilmiştir. BMP-7, N terminalindeki farklılık ile diğer TGF-b ailesi üyelerinden ayrılır. BMP-7 diğer BMP'lerde olduğu gibi Smad1, Smad5 veya Smad8 sinyal yolağı üzerinden düzenlenir.[McDonald 1993, Schuefler 1999].



Şekil 2.7 BMP-7 Kristal yapı modeli

BMP-7 gelişim sırasında sinir ağlarının, kan damarlarının iskelet kas yapısının düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır. En büyük rolü kıkırdak ve perikondrium oluşumunda kendisini göstermektedir [Lyons 1995]. Yapılan çalışmalar BMP-7'nin aynı zamanda böbrek, uzuv ve göz gelişiminde olan etkileri de ortaya konmuştur [Luo 1995, Dudley 1995]. Vücutta BMP7 kıkırdaktan fetal gelişimde sentezlenmeye başlar ve erişkin dönemde de devam eder. Normal bir kıkırdak dokusundaki ortalama salgılanma dozu , gram kuru dokuda 50ng'dır.

BMP-7'nin osteojenik regülasyondaki etkileri çok iyi bilinmektedir. Bu bağlamda BMP-7 (OP-1) kemik hasarlarında kullanılabilir ilk ticari ürün olarak piyasaya sürülmüştür (Stryker , ABD)

Bunun yanında son yıllardaki çalışmalarla BMP-7'nin kemik/iskelet gelişimi yanında kırıldak gelişimi üzerinde de etkili olduğu bulunmuştur. Yapılan çalışmalarda kırıldak hücrelerinde BMP-7 yolağı baskılandığında hücrede Aggrecan ve proteoglikan sentezinin dramatik olarak düştüğü gözlemlenmiştir [Oshin 2007]. Ayrıca BMP-7'nin kırıldak hücrelerinde kolajen tip II , kolajen tip VI, aggrecan, fibronektin, hyaluronan sentezini indüklediği açıklanmıştır [Fan 2004, Flechtenmacher 1996, Nishida 2000].

Bu çalışmaların yanında Cho ve ark, yaptıkları çalışmada oluşan bir kırıldak hasarından 1 gün sonra hasar bölgesinde BMP-2 aktivitesinin arttığını, hasar bölgesinde BMP-14 aktivitesinin 7 gün sonunda tepe noktaya ulaştığı ve BMP 3 , BMP-4 ve BMP-7 nin kırıldak hasarının tamiri için aktivitelerinin 14.gün sonunda bile yüksek düzeyde bulduklarını göstermişlerdir [Cho 2002]

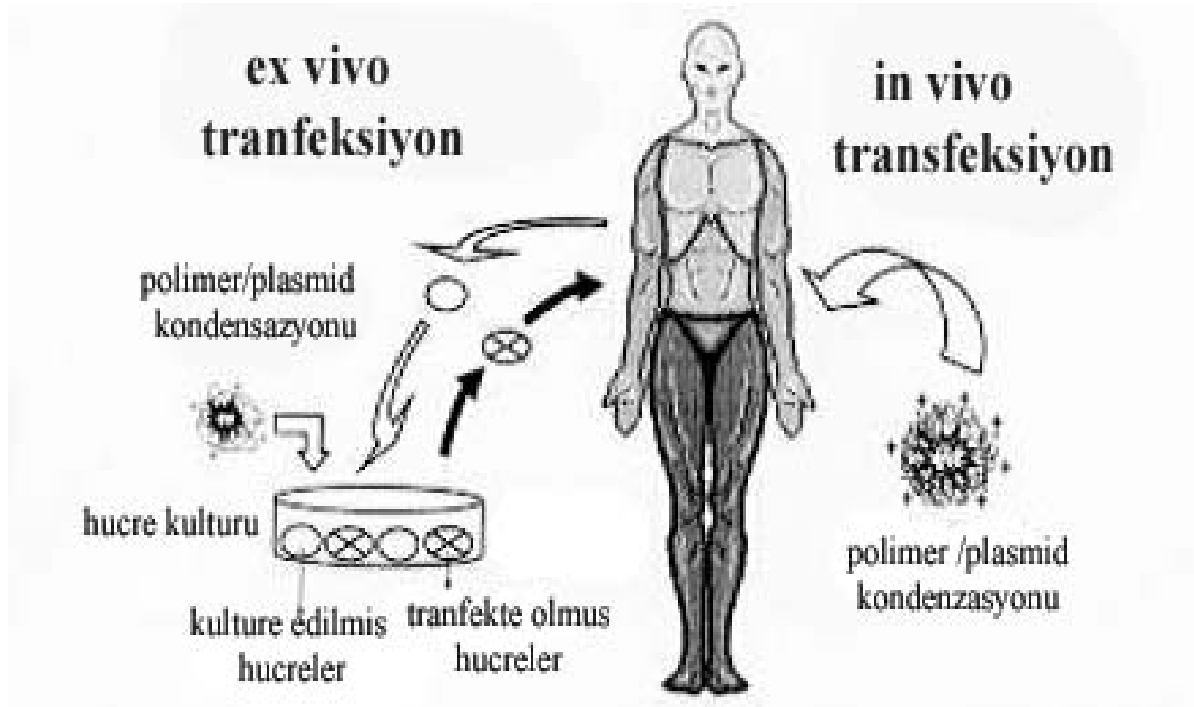
2.5. Gen Tedavisi

Gen tedavisi belirli hastalıkların tedavisi amacıyla genetik bir materyalin düzgün bir şekilde hastaya aktarılması ve ilgili genin aktivitesi ile tedaviyi kapsamaktadır. Özellikle son yıllarda kanser ve AIDS gibi yaygın olarak rastlanan hastalıkların ve daha az yaygın olsa da tedavisi zor immun bozuklukların tedavisinde önemli gelişmeler kaydedilmiştir [Latchman 1994, Blaese 1995, Morille 2008, Mitsuyasu 2011].

Gen tedavisi ile hastalıkların tedavi edilmesinde çeşitli yaklaşımlar vardır: Bu yaklaşımlar; (i) kalıtsal hastalıklarda bozuk olan genin yerine sağlam genin aktarılması istenilen proteinin sentezinin sağlanması (ii) tümör hücrelerine hücreyi öldürecek genin aktarılması, (iii) istenmeyen genin çalışmasını durdurmak için anti-sense oligonükleotid göndererek genin ekspresyonunun durdurulması ; İmmun

cevap oluşturmak amacıyla hücelere ilgili genlerin aktarılması gibi özetlenebilir [Anderson 1998, Niidome 2002, George 2003].

Gen tedavisinde istenilen geni hedef hücelere aktarmakta iki temel strateji kullanılmaktadır. Bu stratejiler şekil 2.8'de şematize edilmiştir. Birinci stratejide hastaya verilmek istenen genler bir ilaç gibi hastaya (kan dolaşımına) enjekte edilir. Ancak, burada genin hastanın immün sisteminden korunması ve istenilen hedef hücreye ulaşarak hücreye girmesi beklenir. Yapılan çalışmada da kullanılmış olan ikinci yaklaşımda ise hastadan alınan hücreler istenilen gen ile in-vitro ortamda transfekte edilir, hücrelerin sayısı hücre kültür ortamlarında artırılır ve hücreler hastaya geri implante edilir. Bu amaçla bir taşıyıcı sisteme gereksinim vardır.



Şekil 2.8. Gen tedavisinde kullanılan başlıca gen aktarım yolları

90'ların ortasından günümüze kadar çeşitli hastalıkların tedavisinde viral ve viral olmayan vektörler kullanılarak çok çeşitli klinik ve araştırma çalışmaları gerçekleştirilmiştir [Niidome 2002, George 2003, Xu 2011]. Grubumuz bünyesinde

de çok çeşitli gen tedavi uygulamalı çalışmaları yapılmıştır [Türk 2004, Güven 2008, Laçın 2011]. İlk uygulamalarda virüsler taşıyıcı olarak kullanılmıştır. Fakat virüslerin dezavantajlarından dolayı non viral sistemler kullanılmaya başlanmıştır. Bu yöntemler kısaca lipofilik-lizozom sistemler [Tarahovsky 2009]; çıplak DNA aktarılması [Schratzberger 2002] , magnetofeksiyon [Planc 2009], gen tabancası [Uchida 2009] ve katyonik polimerler [Chung 2010] ve diğer yöntemler [Lemmon 2011, Xu 2011].

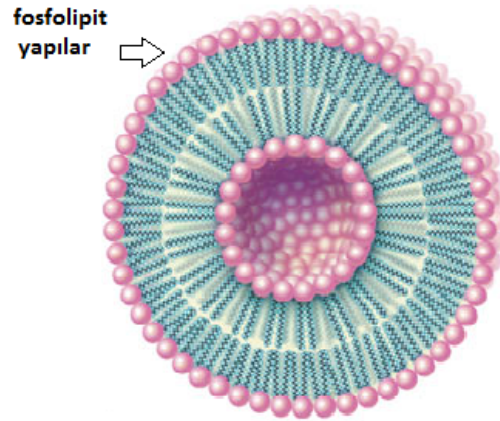
Yukarıda belirtilen çalışmalarda dikkate alındığında gen tedavisinde kullanılan taşıyıcıları iki temel grupta toplamak mümkündür: (i) viral sistemler ve (ii) nonviral sistemler. Viral sistemlerde virüsler taşıyıcı olarak kullanıldığı sistemlerdir. Gen tedavisi ile yapılan ilk çalışmalar genelde viral vektör temellidir [Dickson 1995]. Virüsler hücrelere kolaylıkla girmektedir. Eğer seçilen genler virüsler içine yerleştirilirse, hücre içine giren virüslerle istenilen genlerin hücre içine sokulması, başka bir ifadeyle hedef hücrenin transfeksiyonu başarıyla gerçekleştirilebilir. Virüsleri taşıyıcı vektörler olarak kullanılmasında önemli sorunlar vardır. Virüs hedef hücrede çoğalır ise hem girdiği hücrenin ölümüne neden olabilir hem de burada çoğalarak diğer hücreleri de enfekte edebilir. İkinci sorun, virüslerin sınırlı miktarda genetik materyal taşıma kabiliyetinde olmalarıdır. Bir virüsten ancak belli sayıda gen çıkartılarak, eklenecek gen için sınırlı bir yer sağlanabilir. Ancak, insanda çok az sayıda genin bu boyut sınırlarına girdiği not edilmelidir. Virüsler immün cevaba neden olur, dolayısıyla bağışıklık sorunu nedeniyle tekrarlanan dozlarda virüs yüklemesi yapma olanağı yoktur. Virüsün vücutta aktive olma riski her zaman söz konusudur. Viral taşıyıcıların önemli bir sınırlayıcı özelliği de spesifik olmamaları, hedef hücre dışında kontrolsüz bir şekilde hemen hemen tüm hücrelere girebilme kabiliyetleridir [Deminie 1995, Warnock 2011]. Gen aktarımında kullanılan vektörlerin avantaj ve dezavantajları Çizelge 2. 2' te verilmiştir.

Non-viral taşıyıcı vektörleri 5 grupta toplamak mümkündür: (i) lipozomlar ; (Şekil 2.9), (ii) katyonik lipitler, ve (iii) polikasyonlar (iv) nano partikül ve mikro küreler (v) uyarı-cevap polimerler. Bunlardan ilk ikisi yaygın olarak uygulanmıştır ve bunlarla ilgili ayrıntılı bilgi ilgili literatürde bulunabilir. İlk non-viral gen tedavi klinik uygulaması 1992'de Nabel ve arkadaşları tarafından yapılmıştır.

Günümüzde, gen terapisinde, polikasyonlar ve uyarı-cevap polimerler gittikçe artan bir sıklıkla kullanılmaya başlanmıştır [İbsirlioğlu 2003, Wong, Ganta 2008, Tarahovsky 2009, Alberts 2010, Chung 2011 , Evans 2011].

DNA fizyolojik koşullarda sahip olduğu fosfat grupları nedeniyle negatif yüklü olan uzun, çift zincirli bir polinükleotidtir ve histon proteinleri ile birlikte hücre çekirdeğinde bir kompleks olarak bulunur. Çıplak plazmid DNA veya oligonükleotidler kendi başına biyolojik membranları (endotelyum ,hücre zarı ve çekirdek zarı) geçmeleri oldukça zordur ve yabancı çıplak DNA sitoplazma içerisinde nükleazlar ile kısa sürede parçalanmaktadır.

Gen tedavisi yaklaşımında hücre içerisine genetik bilgi aktarımı genetik materyalin hücre DNA'sına entegrasyonu şeklinde olmayabilir. En temel ve uygulanabilir yöntemlerden bir tanesi, ilgili genetik materyalin bir plazmid ile hücreye aktarılmasıdır.



Şekil 2.9 Lipozom yapısı

Plazmidler, bakteri hücreleri içinde doğal olarak bulunan, kendi kendine replike olabilen, bakteri kromozomunun dışında, çift zincirli DNA molekülleridir [Klug 2000, Alberts 2011]. Hücreye bazı nitelikler kazandırma ve bunları genetik olarak kontrol altında tutabilme gibi özelliklere sahip oldukları bilinmektedir. Bakterilerin, plazmidler tarafından kodlandığı bilinen birtakım

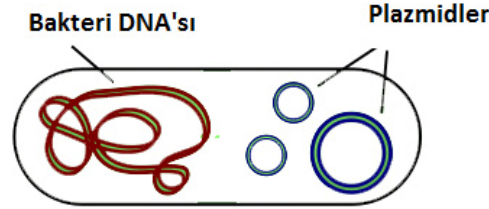
fenotipik özellikleri arasında, antibiyotiklere, ağır metal iyonlarına, ultraviyole ışınlarına gösterdikleri direnç, çeşitli enzim ve toksinler oluşturma, konakçı hücreye yapışma, koloni oluşturma, üreaz oluşturma, çeşitli karbonhidratların fermentasyonu sayılabilir.

Çizelge 2.2. Gen aktarımında kullanılan vektörlerinin avantaj ve dezavantajları

Avantajları	Dezavantajları
	Virüsler
1. Bir çok hücreyi transfekte edebilir	1. Gen taşıma kapasitesi düşük(7,8 kb)
2. Girdiği hücrenin DNA'sına stabil integrasyon sağlar	2. Yalnız bölünebilen hücrelere girebilir
3. In-vitro ortamda yüksek transfeksiyon transfeksiyon	3. In-vivo ortamda düşük
4. Biyolojisi iyi biliniyor	4. Saflaştırması zor
	5. İntegrasyon bölgesi spesifik değil
	6. Transfeksiyon işlemi zor
	7. İmmün reaksiyon oluşturabilir
	Direk injeksiyon
1. Uygulaması kolay	1. Gen epizomal bölgede kalabilir
2. Aşılamada kullanılabilir	2. Çok düşük transfeksiyon
3. Limitsiz gen taşıma kapasitesi	3. Sadece kas dokusu transfeksiyonu
	Fiziksel Yöntemler
1. Yüksek gen transfeksiyonu	1. Sadece invitro uygulanabilir
2. Uygulanması kolay	2. Çok sayıda hücre ölümü olması
3. Gen aktarma kapasitesi yüksek	
	Katyonik Polimer ve Liposomlar
1. Gen taşıma kapasitesi yüksek	1. Düşük Gen ekspresyonu
2. Hazırlanışı ve uygulaması kolay	2. Toksik olabilir
3. İmmunojenik değil	3. Gen ekspresyonu süresi kısa
4. İstenilen özelliklerde üretilebilir	4. Gen epizomal bölgede kalabilir
5. Maliyeti düşük	5. Kan proteinleri ile etkileşebilir

Plazmid DNA (Şekil 2.10) hücre içerisinde çok çeşitli formlarda bulunabilir. Bunlar arasında süper-sarmal form ve halkasal form sayılabilir.

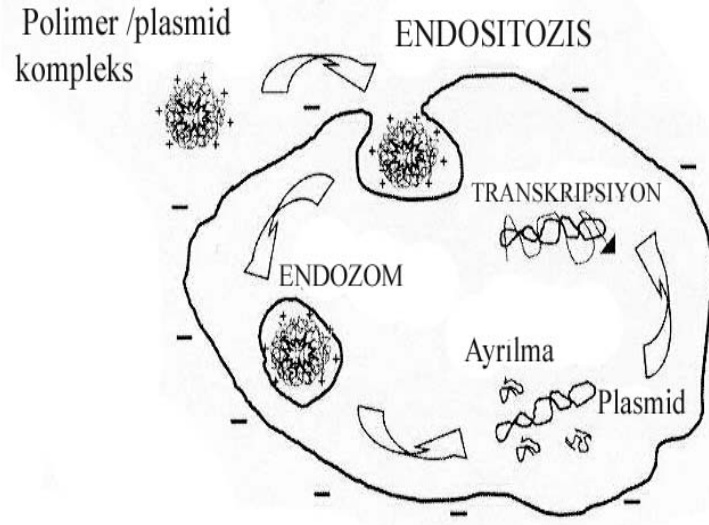
Plazmid DNA'lar kullanılarak hücrelerin farklı özellikler kazanmasına yönelik son yıllarda oldukça önemli çalışmalar yapılmıştır. Özellikle bu kazandırılması düşünülen ve çalışılan özelliklerin başına hücrelerin belirli büyüme hormonları, faktörleri ve düzenleyicileri sentezleyebilir duruma gelmesi sayılabilir. Temelde yapılan, klonlama işlemi ile DNA'nın mRNA üzerinden istenilen proteini sentezi işlemine dayanmaktadır [Klug 2000, Alberts 2011] .



Şekil 2.10 Plazmid DNA yapısı ve hücre içindeki konumu

Plazmid DNA'lar üzerinde araştırma ve ticari çalışmalar devam etmektedir ve ilerleyen yıllarda plazmid DNA aşılı viral, bakteriyel ya da parazitik hastalıklarda önleyici aşı olarak; ya da kanserin bazı endikasyonlarında uygulama alanı bulabilecektir [FDA 1996]

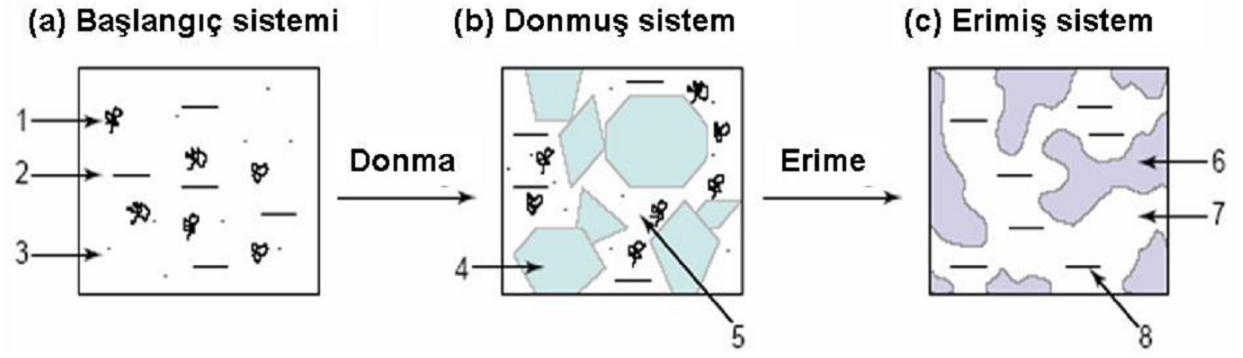
Her ne kadar plazmid DNA'ların kullanımı kolay, aktarma için kullanılacak non-viral taşıyıcılar kolay ulaşılabilir, sentezlenebilir ve uygulanabilir olsa da plazmid DNA'nın (ya da bir genetik materyalin) bu taşıyıcılar kullanılarak hücre içerisine girmesi ile ilgili tümüyle uygun bir yaklaşım oluşturulamamıştır. En iyi yaklaşım endositoz yaklaşımıdır ve Şekil 2.11'de verilmiştir. Buna göre plazmid/polimer kompleksi hücre içerisine endositoz yolu ile girer ve endozom içerisinde sitoplazmada konumlanır. Daha sonra bu endozom yapısı litik enzimler ile parçalanır açığa çıkan plazmid/polimer kompleksinde pozitif yüklü polimerik partiküller ya da lipofilik partiküller plazmidten ayrılır ve plazmid DNA sitoplazma içerisinde kararlı hale gelir.



Şekil 2.11 Vektör/plazmid kompleksinin hücre içine girişi ve transkripsiyonu

2.6 Kriyojeller

Kriyojeller, gerekli jelleşme mekanizması ortamın belirli bir sıcaklık ile dondurulması ile oluşturulan monomerik ya da polimerik başlatıcıların kullanıldığı jel matrislerdir [Lozinsky 2003]. Kriyojellerde sulu matris yapısında gözeneklilik suyun buz halini alması ve daha sonra ortamdaki uzaklaşması ile buz kristallerinin yerini mikro ve makro gözeneklerin alması ile meydana gelir. Bu birbiri ile bağlantılı mikro ve makro gözenekler difüzyonun ve kütle transferinin etkin bir biçimde gerçekleştirilmesine izin verir. Kriyojellerin diğer bir özelliği ise mekanik ve kimyasal olarak kararlı olmalarıdır. Şekil 2.12 'de kriyojelasyon mekanizması ile ilgili temel oluşum prosesi verilmiştir.



Şekil 2.12 Kriyojelasyon mekanizması : 1. çözültideki makromoleküller; 2. çözücü; 3. düşük-moleküler maddeler; 4. donmuş çözücünün polikristalleri; 5. donmamış sıvı mikrofaz; 6. kriyojelin polimerik çerçevesi; 7. makro gözenekler; 8. Çözücü

Kriyojelic yapı matriksleri ile literatürde birçok biyolojik uygulama rapor edilmiştir. Bu uygulamalardan bazıları; hücre ve DNA saflaştırma sistemleri [Ardivisyon 2003]; kromatografik sistemler [Galaev 1999]; immobilizasyon sistemleri [Tripathi 2011], hücre-matriks etkileşimleri [Bolgen 2008]

Literatürde çok çeşitli malzemelerden kriyojel yapımına rastlanmaktadır. Bu malzemeler arasında agaroz, dekstran gibi doğal biyopolimerler veya poliakrilamid, polilaktik asit gibi sentetik polimerler sayılabilir. Kriyojeller tipik olarak, birbiri ile bağlantılı makro gözeneklerden (veya süper makro gözenekler) oluşurlar. Bu birbiri ile bağlantılı makro gözenekler difüzyonun etkin bir biçimde gerçekleşmesine, nano veya mikro boyuttaki partiküllerin kütle transferine katkıda bulunur. Kriyojellerin bu eşsiz özellikleri, ozmotik, kimyasal ve mekanik kararlılıkları ile de bir araya gelerek onları biyolojik uygulamalar için iyi birer aday haline getirir. Kriyojeller şimdiye kadar, biyolojik partikül ve kromatografik uygulamalarda [Ardivisyon 2003] veya biyopolimerlerik sistemlerde [Galaev 1999] veya hücre immobilizasyonunda [Tripathi 2011] kullanılmışlardır. Önemli bir diğer uygulama da kriyojel bazlı adsorbanların virüslerin immünosorpsiyonunda kullanılmasıdır. Ayrıca, kriyojellerin makro gözenekli yapıları, hem su bazlı ortamda hem de organik çözücülerde çalışan biyokatalizörlerin immobilizasyonu için de bir avantajdır [Galaev 1999].

2.6.1 Kriyojellerin doku mühendisliği uygulamaları

Kriyojeller yukarıda belirtilen özellikleri ile doku mühendisliği uygulamalarında uygun matris yapısını oluşturmaya adaydır. Özellikle mikro ve makro gözeneklerin birbiri ile bağlantılı olması, gözenek boyutunun ayarlanabilmesi, temel yapı taşlarının, doğal/sentetik, immunojenik ve/veya karsinojenik etkilerinin bulunmaması, biyobozunur özellikte olabilmeleri ve kolay üretimleri, uygun bir matris adayı için olmazsa olmaz özellikler arasındadır.

Kriyojellerin doku mühendisliği uygulamaları çok çeşitlidir. Bölgen ve ark. 'ları kranial kemik defeklerinde Hema Laktat kriyojellerin iyileşmeye olan etkileri incelemiştir [Bolgen 2008]. Fasina ve ark. Jelatin kriyojellerin kemik stroma hücreleri ile olan etkileşimini incelemiştir. [Fassina 2010]. Vrana ve ark. PVA/Jelatin kriyojel doku iskelelerinin biyomekanik özellikleri ve sahip oldukları bu özellikler ile damar doku mühendisliği için kullanım alanları üzerine çalışmışlardır [Vrana 2010].

Kriyojellasyon tekniği ile hazırlanan kriyojel doku iskelelerinin sahip oldukları yapısal ve biyo-mekanik özellikleri ile her geçen gün doku mühendisliğinde yeni uygulama alanları bulmaktadır. Özellikle bu kriyojelik doku iskelelerinin biyolojik modifikasyonla daha gelişmiş ve daha işlevsel bir yapıda kullanımının önü açıktır.

2.7 Kıkırdak doku mühendisliği çalışmaları

Spor yaralanmaları, klinik ihtiyaçlar ve mevcut metotlardaki kısıtlamalar ve uygulamadaki zorluklar nedeni ile özellikle son yıllarda alternatif tedavi uygulamalarına yoğun bir ilgi ortaya çıkmıştır. Mevcut uygulanan tedavi yöntemlerinin yanında, travma, tümör çıkarımı, kazalar ve konjental hasarlar nedeni ile ortaya çıkan kıkırdak kayıplarının tedavisinde yeni kıkırdak doku mühendisliği uygulamaları kullanılabilir [Chang 2005]. Rotter ve ark. yaptıkları çalışmalarda baş boyun cerrahisi için uygun kıkırdak doku mühendisliği perspektiflerini ortaya koymuşlardır [Rotter 2008]. Frenkel ve ark. 'ları kıkırdak doku mühendisliği uygulamaları için uygun doku iskelesi kriterlerini doğal ve sentetik temelli olmak üzere ortaya koymuşlardır [Frenkel 2004]. Farhadi ve ark. yüz ve bölgeleri için yapılacak doku yenileme operasyonlarında kullanılacak hücre

tipleri, kaynakları, kullanılacak doku iskelesi kriterleri ve uygulama yöntemlerini araştırmışlardır [Farhadi 2006]. Haisch ve ark. yaptıkları çalışma ile insan burun septumundan elde ettikleri kıkırdak hücrelerini biyobozunur PGLA-PLLA polimer doku iskeleleri üzerine *in-vitro* koşullarda yerleştirdikten sonra nüde fareler üzerinde 12 haftalık hayvan deneyi gerçekleştirmişler ve uygun kıkırdak yapısının oluşumu açısından uygun yapı, model ve fabrikasyon kriterlerini analiz etmişlerdir [Haisch 2002]. Rozin ve ark. yayınladıkları özette kulak kıkırdak gelişimi ve mevcut hasarları konusunda güncel tedavi yöntemleri üzerinde durup hasta modelleri üzerinden kıkırdak hasar tedavilerini tartışmışlardır [Rozin 2005]. Bu çalışmaların dışında tez konusunu da yakından ilgilendiren diğer bir konu doku mühendisliği uygulamalarında doku mikro-çevresi ile uyumlu, büyüme faktörlerinin ve/veya stimule edici proteinlerin kullanımınıdır. Bu özellik taşıyan faktörler ya doğrudan büyüme ortamlarında hücre ile buluşurlar ya da tez kapsamındaki çalışmada olduğu gibi hücrenin bu faktörleri sentezlemesi sağlanır. Schmidt ve ark. yaptığı çalışmada insülin benzeri büyüme faktörü (IGF) ve platelet kökenli büyüme faktörü (PDGF) etkisi altında *in vivo* hayvan modellerinde kıkırdak iyileşmesi tamiri etkisini araştırmışlardır [Schmidt 2006]. Isogai ve ark. doku iskelesi üzerine implante edilmiş kondrositlerde β -fibroblast büyüme faktörünün (FGF- β) yavaş salımını kulak kıkırdağı gelişimi üzerindeki etkileri araştırılmıştır [Isogai 2005].

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Sunulan tez çalışmasının ilk bölümünde Okside-dekstran/Jelatin esaslı doku iskelelerinin hazırlanması gerçekleştirilmiştir. Bu sentez için grubumuzda bulunan Uzman. Biyolog. İlyas İnci'nin çalışmaları temel alınmıştır. Bu amaçla Okside Dekstran oranları farklı kompozisyonda iki doku iskelesi ön çalışmalar için seçilmiştir.

Sentezlenen Okside-Dekstran/Jelatin doku iskeleleri taramalı elektron mikroskopisi, mekanik kuvvet, şişme özellikleri, FTIR yöntemleri kullanılarak karakterize edilmiştir. Aynı zamanda doku iskeleleri enzimli ve enzimsiz ortamlardaki biyo-degradasyon profili çıkarılmıştır.

Çalışmanın ikinci aşamasında Avusturya Viyana Ludwig Boltzman Enstitüsü ile ortak çalışmalar sonucu memeli hayvan hücrelerinde BMP7 üretimini sağlayan plazmid modelleme çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Aynı zamanda plazmidin memeli hücre içerisine aktarımında kullanılacak olan vektör seçimi ve bu seçim sonucunda çeşitli hücre hatlarında ve primer izole hücrelerde model plazmid kullanılarak transfeksiyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Çalışmanın üçüncü aşamasında hayvan deneyleri aşamasında kullanılacak olan primer kondrosit hücrelerinin izolasyonu ve *in-vitro* hücre çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın ilerleyen aşamalarında izole edilen hücrelerin doku iskelesi üzerinde *in-vitro* koşullarda davranışları konfokal ve taramalı elektron mikroskopisi görüntülemiş ve Akridin Oranj ve Propidium İodide boyamaları ve MTT analizleri yapılmıştır.

Çalışmanın dördüncü aşamasında Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu G.Ü.ET-10.059 kod numaralı onayı ile tavşan kulak modeli üzerinde hayvan deneyi çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın sonuçları radyografik ve histolojik olarak incelenmiştir.

Çalışmanın son aşamasında uygulanan modelde, erken dönem gen ekspresyon profilleri incelenmiştir.

Bu çalışmalar ile ilgili deneysel yöntemler aşağıda ayrıntılı olarak ayrı bölümler halinde sunulmuştur.

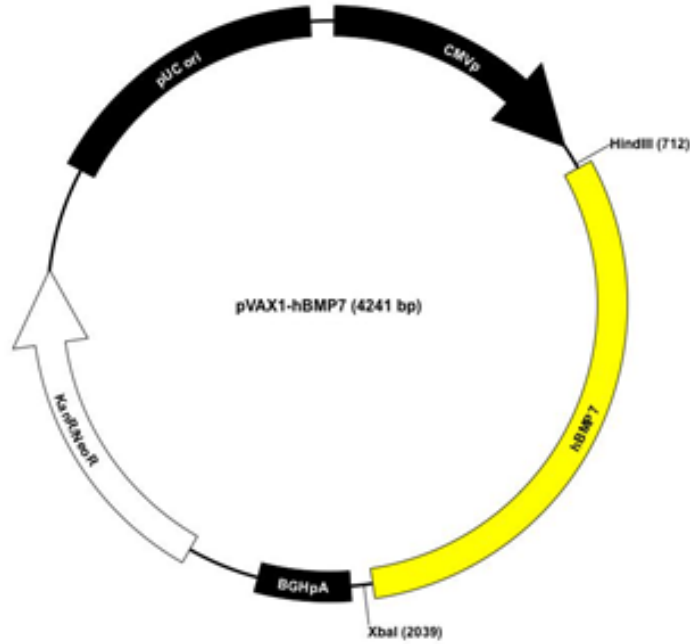
3.1. Okside-Dekstran/Jelatin Doku İskelelerinin Üretimi

Tez çalışmaları kapsamında grubumuzdaki daha önceki çalışmalar temel alınarak Okside-dekstran/Jelatin doku iskeleleri üretilmiştir. Hazırlama prosedürü basitçe şöyledir: 5 g dekstran (MA: 40000, Applichem, Almanya) 50 ml distile su içinde çözülmüş ve daha sonra bu çözeltiliye 6,6 g oksidasyon ajanı, sodyum periyodat (MA: 213.9 g/mol, MERCK, Almanya) eklenmiştir. Karışım ışıktan korunacak şekilde 1 saat oda sıcaklığında karıştırılmış, daha sonra diyaliz membranlarına transfer edilmiş ve suya karşı 4°C'de diyaliz edilmiştir. Su fazı aralıklarla değiştirilmiş ve diyaliz 3 gün boyunca devam ettirilmiştir. Reaksiyon karışımı 24 saat -18°C'de bekletilmiş, daha sonra suyu uzaklaştırmak için 2 gün liyofilize edilerek tamamen kurutulmuş ve kriyojel üretimine hazır hale getirilmiştir. Jelatin (45%, SigmaAldrich, Almanya) stok çözeltisinden 0.44 g jelatin alınıp, 4 ml distile suda çözülmüştür. Bu çözeltiliye, çapraz bağlayıcı, 1 ml Okside-Dex (0.16 g/4ml) çözeltisi eklenmiştir. Bir diğer farklı konsantrasyondaki kriyojel için ise 0.44 g jelatin (45%), 4.25 ml distile suda çözülmüş ve 0.75 ml Okside-dekstran (0.16 g/ml) çözeltisi eklenmiştir. Daha sonra karışımlar cam tüplere konmuş ve kriyostatta -12°C'de 1 saat tutularak çapraz bağlı kriyojellerin oluşumu sağlanmıştır. Temelde 2 farklı konsantrasyonda (normal okside-dekstran ve yüksek konsantrasyonda okside-dekstran içerikli) kriyojenik doku iskeleleri hazırlanmıştır.

Hazırlanan kriyojenik doku iskelelerinin şişme özellikleri ile sulu ortamda (enzim katkılı ve enzim katkısız) zamana bağlı biyo-bozunma profilleri incelenmiştir. Aynı zamanda hazırlanan doku iskelelerinin gözenek yapısı taramalı elektron mikroskopisi (SEM) kullanarak incelenmiştir.

3.2. BMP-7 Plazmid DNA hazırlanması

Tez çalışmaları kapsamında kullanılacak olan, memeli hayvan hücrelerinde BMP-7 proteinin ekspresyonunu sağlayacak olan plazmid DNA'nın hazırlanma çalışmaları Avusturya Viyana'da bulunan Ludwig Boltzman Enstitüsü'nde Prof. Dr. Heinz Redl ve grubu ile ortak olarak Redl grubunun çalışmaları temel alınarak yürütülmüştür. Çalışmada Şekil 3.1'de verilen plazmid taslağı kullanılmıştır. Çalışma ile ilgili genel şematik prosedür Ek:A'da verilmiştir.



Şekil 3.1 hBMP7 plazmid taslağı

3.3. Primer Kıkırdak Hücre İzolasyonu

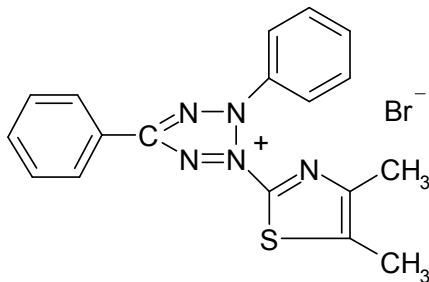
Tez kapsamındaki çalışmalarda kullanılmak üzere model olarak seçilen New Zealand Tavşanından primer kıkırdak izolasyonu işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla 1 adet tavşan kullanılmıştır (Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik

Kurulu G.Ü.ET-10.059 kod numaralı onay ile) . Tavşana 2ml Ketamin ve 5ml Rompun kullanılarak ötanazi uygulanmıştır. Daha sonra kulağın proksimal bölgesinden disekte edilerek, üst deri uzaklaştırılmıştır. Perikondrium kaldırılarak, kıkırdak yapısı tam olarak ortaya çıkarılmıştır. Elde edilen kulak kıkırdağı %20 Fetal sığır Serumu, %2 Antibiyotik içeren DMEM/F12 taşıma besiyeri ile laboratuvara getirilmiştir.

Elde edilen kıkırdak daha sonra laminar hava kabini altında bistürü ile 1-2mm küçük parçalara ayrılmış ve 1 gün boyunca 3mg/ml Trypsin ve 3mg/ml Kolajen az içeren solüsyonda 37°C'de bekletilmiştir. Daha sonra hücre süspansiyonu üst kısmı alınarak 1200 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Üstte kalan kısım %10 Fetal Sığır Serumu %0,5 Antibiyotik %0,02 Insulin %0,02 Essential Aminoasit solüsyonu içeren DMEM/F12 besiyeri içerisinde 37°C %5 CO₂ ortamında inkübe edilmişlerdir. Besi ortamı 2 gün aralıklar ile değiştirilmiştir. Hücreler kültür kabı yüzeyini %70 kapladığında Trypsin-Edta kullanılarak pasajlanmışlardır. *In-vivo* hayvan deneylerinde 3.Pasaj primer kıkırdak hücreleri kullanılmıştır.

3.4. MTT sitotoksisite testi

Primer izole kıkırdak hücreler ile grubumuz bünyesinde sentez çalışmaları gerçekleştirilen okside-dekstran/jelatin doku iskelesi arasındaki in-vitro çalışmalara geçmeden önce doku iskelesinin muhtemel sitotoksik etkilerini araştırmak için MTT testi uygulanmıştır. MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2yl]-2,5-difeniltetrazolium) (Sigma, ABD) 'den temin edilmiştir.



MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2yl]-2,5-difeniltetrazolium bromüd)

MTT testi 96 kuyucuklu plaklarda gerçekleştirilmiştir. Bu plakların satırında 12 kuyucuk, sütununda ise 8 kuyucuk bulunur. İlk sütuna yalnız hücre ekilmiş ve hiçbir aktif madde ile etkileştirilmemiştir. Bu sütun pozitif kontrol olarak kullanılmış ve en yüksek absorbands bu sütunda elde edilmiştir.

Çalışmada 2 farklı yöntem kullanılarak dolaylı ve doğrudan sitotoksosite değerleri tespit edilmiştir. 96 kuyucuklu plaklara 1×10^4 hücre/kuyucuk olacak şekilde primer kondrosit hücreleri ekilmiştir. Hücreler ile etkileştirilecek doku iskelesi 1 gün boyunca %10 Fetal Sığır Serumu %0,5 Antibiyotik %0,02 Insulin %0,02 Essential aminoasit solüsyonu içeren DMEM/F12 besiyeri içerisinde 37°C %5 CO_2 ortamında inkübe edilmiştir. Daha sonra bu besi ortamı hücreler ile birlikte 24 saat inkübe edilmiştir. Doğrudan sitotoksosite testi için eşit alanda kesilen doku iskeleleri ile hücreler doğrudan kuyucuklarda 24 saat boyunca etkileştirilmiştir. Bu süre sonunda doğrudan ve dolaylı sitotoksisiteleri belirlenmiştir.

3.5. Hücre proliferasyon testleri ve in-vitro deneyler

In-vivo deneylere geçmeden önce hücre-doku iskelesi ilişkisini incelemek amacıyla hücreler in-vitro koşullarda doku iskeleleri ile etkileştirilmiştir. Kullanılan doku iskelesi işlem öncesi %70 etanol kullanılarak steril edilmiştir. Daha sonra 3 saat boyunca hücre kültür ortamı içerisinde bekletilmiştir. Primer kıkırdak hücreleri 5×10^5 / ml olacak şekilde 100 mikrolitre kültür ortamı içerisinde konsantre edilmiştir. Bu konsantre ortam, doku iskelesi üzerine pipetlenerek yayılmıştır. Doku iskelesi üzerine 400 mikrolitre kültür ortamı eklenmiştir. 3 saat içerisinde 37°C %5 CO_2 'de inkübasyondan sonra doku iskelesi üzerine 1,5ml kültür ortamı eklenmiştir. Kültür ortamı 2-3 günde bir tazesi ile değiştirilmiştir. Kültür ortamı içeriği çizelge 3.1 'de verilmiştir.

Hücrelerin doku iskelesi ve kültür kabındaki davranışları ışık mikroskobisi, Acrdine orange/Propidium iodide boyaması , konfokal mikroskopi ve taramalı elektron mikroskobisi kullanılarak incelenmiştir. İnceleme ile ilgili prosedürler Ek-B ve Ek-C'de verilmiştir.

Çizelge 3.1 Kıkırdak hücre proliferasyonu için uygun kültür ortamı:

	<i>500ml kültür ortamı için</i>
DMEM F12/Ham's	435 ml
Fetal Sığır Serumumu	50 ml
Penisilin/Streptomisin/Gentamisin	5ml
L-Glutamin	5ml
İnsulin	1ml

3.6 Transfeksiyon çalışmaları

Tez çalışmaları kapsamında hücrelerin genetik modifikasyonu öncesi çeşitli model plazmid ve hücreler kullanılarak transfeksiyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda non-viral polimerik taşıyıcı olarak Viyana grubunun tavsiyesi ile Turbofect (Fermantas / ABD) adlı lipofilik taşıyıcı satın alınmıştır. Bu taşıyıcı ile C2C12 miyoblast hücre hatları, 3T3 Fibroblast hücre hatları ve izole primer kondrositler üzerinde GFP model plazmidi kullanılarak transfeksiyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Transfeksiyon için hücreler transfeksiyon öncesi 24 kuyucuklu plaklara 25×10^3 hücre / ml olarak şekilde ekilir ve 1 gün boyunca %10 Fetal Sığır Serumumu %0,5 Antibiyotik içeren DMEM/F12 besiyeri içerisinde 37°C %5 CO_2 ortamında inkübe edilmiştir. Hücreler daha sonra Fermantas firmasının Turbofect için verdiği prosedür izlenerek GFP plazmidi ile transfekte edilmiştir. İzlenen prosedür Ek-D'de verilmiştir.

Model plazmid ile yapılan transfeksiyon çalışmalarının yanında in-vitro BMP-7 salımı ve in-vivo hayvan deneyleri için hücreler BMP-7 eksprese eden plazmid ile de aynı prosedür izlenerek transfekte edilmişlerdir. Bu transfeksiyon sonucu çalışmaların ilerleyen aşamalarında kullanılacak genetik modifiye hücreler elde edilmiştir.

Model transfeksiyon çalışmalarının yanında, hücreler yukarıda anlatılan şekilde doku iskelesi ile etkileştirilmiştir. Bu çalışmada primer kondrosit hücreler inokülasyon ncesi BMP-7 plazmidi ile transfekte edilmişlerdir. Doku iskelesinden erken dönem BMP-7 salım çalışması gerçekleştirilmiştir. Belirlenen zamanlarda, doku iskelesi ile etkileşimde olan primer kondrosit hücrelerinden salınan BMP-7 miktarları, “BMP-7 Eliza Kiti (Raybiotech /ABD) kullanılarak ölçülmüştür.

3.7 *In-vivo* hayvan deneyleri

Tez çalışmasında aynı standartlarda 2-2,5 kg ağırlığında 3-4 aylık toplam 57 adet erkek New Zealand White ırklı tavşan kullanılmıştır. (48 adet kulak modeli, 9 adet Gen ekspresyonu analizi için). Denekler rastgele olarak 4 gruba ayrılmıştır. Anesteziden 6 saat önce hayvanlar beslenmeden kesilmişlerdir. Hayvanlara 3 ml Ketamin 1ml Rompun (Xylazin) intra-müsküler olarak verilmiştir. Anestezi altında hayvanların her bir kulağında kıkırdağın 1/3 proksimal bölgesinde normal yollardan iyileşme olmayacak şekilde, 15mm çaplı yuvarlak bir hasar oluşturulmuştur. Bu hasar sonucu kıkırdak dokusunun kendisini yenileme özellikleri 6 farklı grupta incelenmiştir. 1. Grup kontrol / defekt grubudur. 2. grupta biyouyumlu doku iskelesi tek başına kullanılmıştır ve hayvanda hasarlı bölgeye hücresiz olarak yerleştirilmiştir. 3.grupta hayvandan elde edilen primer kondrosit hücreleri kullanılmıştır. Hasar boyutuna uygun şekilde sentezlenen biyo-uyumlu doku iskelesi hücre destek malzemesi olarak kullanılmıştır.. Doku iskelesi hasar bölgesine yerleştirildikten sonra, hasar bölgesi kapatılmıştır. Daha sonra 1×10^6 hücre / 500 mikrolitre steril salın zltisi anestezi altındaki hayvanda hasar bölgesine inoküle edilmiştir. 4. grupta aynı yöntem uygulanmıştır fakat bu grupta kullanılan hücreler işlemden 1 gün önce, BMP7 plazmidi ile transfekte edilmişlerdir. Ayrıntılı alışma izelge 3.2’de verilmiştir.

Çizelge 3.2 Hayvan deneyleri çalışma çizelgesi

	1.kulak	2.kulak
Gruplar	Grup 1	Grup 2
	Grup 1	Grup 2
	Grup 1	Grup 2
	Grup 1	Grup 2
	Grup 1	Grup 2
	Grup 1	Grup 2
	1.kulak	2.kulak
Gruplar	Grup 3	Grup 4
	Grup 3	Grup 4
	Grup 3	Grup 4
	Grup 3	Grup 4
	Grup 3	Grup 4
	Grup 3	Grup 4
1 ay toplam 12 hayvan , 4 ay her ay örnek alınarak toplam incelenecek hayvan sayısı = 48		

GRUPLAR:

No :1 = Kontrol / Defekt Grubu (K)

1.ay 6 hayvan incelenmiştir

2.ay 6 hayvan incelenmiştir

3.ay 6 hayvan incelenmiştir

4. ay 6 hayvan incelenmiştir

No:2 = Doku iskelesi Grubu (S)

1.ay 6 hayvan incelenmiştir

2.ay 6 hayvan incelenmiştir

3.ay 6 hayvan incelenmiştir.

4. ay 6 hayvan incelenmiştir

No : 3 = Doku iskelesi ve kıkırdak hücrelerinin birlikte implantasyonu (N)

1.ay 6 hayvan incelenmiştir.

2.ay 6 hayvan incelenmiştir.

3.ay 6 hayvan incelenmiştir.

4. ay 6 hayvan incelenmiştir.

No : 4 = Doku iskelesi ve genetik modifiye kıkırdak hücrelerinin birlikte implantasyonu (T)

- 1.ay 6 hayvan incelenmiştir.
- 2.ay 6 hayvan incelenmiştir.
- 3.ay 6 hayvan incelenmiştir.
4. ay 6 hayvan incelenmiştir.

3.8 Radyolojik inceleme

Hayvan deneyleri ile her ay sonunca elde edilen örneklerde olası kalsifikasyon bulgularının saptanabilmesi ve histolojik çalışmalar öncesi dokuda gelişim hakkında bilgi edinilmesi amacıyla örnekler radyolojik incelemeye tabi tutulmuşlardır. Örneklerin, Gazi Üniversitesi Radyoloji Anabilim Dalı'nda bulunan Hologic (ABD) marka mamografi cihazı kullanılarak 20-24kV ; 28-36 mAs değerlerinde radyolojik örnekleri alınmıştır. Alınan bu radyograflar kullanılarak histolojik çalışmalara da temel oluşturacak zamana bağlı kalsifikasyon değerleri belirlenmiştir.

3.9 Histolojik inceleme

Alınan örneklerin histolojik değerlendirmesi Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında yapılmıştır. Örnekler % 10'luk nötral tamponlu formalin çözeltisinde oda sıcaklığında tespit edildikten sonra radyolojik incelemede kalsifiye olan örnekler De Castro çözeltisinde dekalsifiye edilmiştir. Beş-altı mikrometre kalınlıkta alınan kesitler genel morfolojiyi incelemek için hematoksilin eozinle kollagen içeriği için Masson trikromla ve elastik fibril içeriği içinse Weigert elastik lif boyasıyla boyanmıştır. Tüm örnekler ait fotomikrograflar dijital kamera ataşmanlı ışık mikroskopunda (Leica, DMR Model DFC 480, Westlar Almanya) incelenmiştir. Sonuçlar; hiyalin yerine elastik kıkırdağın değerlendirilmesi için modifiye edilen Pineda ve Lohan skorları kullanılarak, semi-kantitatif olarak kritik büyüklükte kıkırdak defekti iyileşmesi için

istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. İlgili histolojik skorlama tablo içerikleri Çizelge 3.3. ve Çizelge 3.4 'de verilmiştir.

Çizelge 3.3 Lohan Histolojik skorlama sistemi

LOHAN HİSTOLOJİK SKORLAMA		Puanlama
Hücreler		
Hücesellik		
Normal		2
Az hipo veya hiper hücesellik		1
Aşırı hipo veya hiper hücesellik		0
Dağılım ve düzenlenme		
Homojen		2
Fokal yapılanma		1
Hücre bulgusu yok		0
Hücesel morfoloji		
ECM lakün içerisinde yuvarlak yapılı		3
Lakün içinde olmayan yuvarlak yapılı		2
Uzmaış fibroblast benzeri hücre		1
Hücre bulgusu yok		0
Enflamasyon		
Enflamasyon hücreleri ve yapı etrafında fibrin birikimi		
Yok		2
Orta		1
Aşırı		0
Fiberler çevresi enflamasyon		
Yok		2
Orta		1
Aşırı		0
ECM		
Weigert boyama etkinliği		
Normal		2
Orta		1
Yok		0
ECM matrix dağılımı		
Homojen		2
Fokal yapılanma		1
Yok		0
ECM kalitesi		
Homojen		3
Gevşek		2
Fibröz		1
Yok		0
Puanlama (max:18)		

Çizelge 3.4 Pineda Histolojik skorum sistemi

Pineda Histolojik Skorum		Puanlama
Defekt alanı dolu		
125%		1
100%		0
75%		1
50%		2
25%		3
0%		4
Osteokondral bağlantılarda rekonstrüksiyon		
Var		0
Kısmen		1
Çok Az		2
Matriks boyanması		
Normal		0
Az boyanma		1
Belirgin şekilde az boyanma		2
Silik boyanma		3
Boyanma yok		4
Hücre Morfolojisi		
Normal		0
Çokça elastik ve fibröz kırkırdak		1
Çokça fibröz kırkırdak		2
Kırkırdak olmayan hücreler veya fibröz kırkırdak		3
Kırkırdak olmayan hücreler		4

3.9.1. İstatistiksel analiz

Bağımsız değişkenler gruplar, bağımlı değişkenler histoloji, kalsifikasyon ölçümleridir. Verilerin normal dağılıp dağılmadığı ve varyansların homojenliği Shapiro-Wilk testiyle değerlendirilmiştir. Tüm veriler parametrik olmayan testlerle (çoklu karşılaştırma için Kruskal Wallis, ikili karşılaştırma için posthoc Dunn testi ile değerlendirilmiştir. Tüm veriler ortanca, minimum ve maksimum değerleriyle temsil

edilmiştir. Analizler SPSS versiyon 15.0 ile gerçekleştirilmiştir. Fark, p 0.05'ten küçük olduğunda anlamlı olarak kabul edilmiştir.

3.10 Gen İfadelenmesinin İncelemesi

Hayvan deneyleri ile elde edilen sonuçlar ile korelasyonu sağlamak ve iyileşme üzerindeki etkilerini incelemek amacıyla kıkırdak gelişimi ve genetik modifikasyon için kullandığımız plazmid'in ekspresyonunun incelenmesi amacıyla erken dönem gen ekspresyonu (ifadelenme) çalışması yapılmıştır. Bu çalışmada kıkırdak fizyolojisi ile de ilgili olarak Kolajen Tip I (COL Type I) ; Kolajen Tip II (COL Type II), kıkırdak ECM proteini Agrecan, BMP7 ve kontrol amacı ile bir "housekeeping" gen olan (tüm canlı hücrelerde ifade olan) GAPDH seçilmiştir.

Erken dönem gen ekspresyonu (ifadelenme) çalışmaları için 3. 7. ve 14. günler zaman olarak seçilmiştir. Normal primer kıkırdak hücrelerinin bulunduğu; genetik modifiye (transfekte) primer kıkırdak hücrelerinin bulunduğu ve kontrol olarak muamele edilmemiş kıkırdak hücrelerinin bulunduğu 3 grup incelenmiştir. Belirlenen zamanlar sonucunda her gruptan üç örnek alınarak incelenmiştir. Bununla birlikte normal hayvan deneyi çalışmasından gelen ilgili grupların 1. Ay sonuçları da gen ekspresyonu açısından incelenmiştir.

3.10.1 Dokudan RNA izolasyonu

Deney sonunda çıkartılan kıkırdak dokuları steril petri kabında, steril serum fizyolojik ile yıkandıktan sonra RNA izolasyonuna uygun (50mg-100mg) büyüklüklerde steril bistüri ile küçük parçalara ayrılmıştır. DNAz ve RNAz free 1.5 ml'lik ependorf tüplerine alınan doku örnekleri hızlı bir şekilde sıvı azot içinde dondurulmuştur. Kıkırdak dokuları, analiz gününe kadar - 80°C' de saklanmıştır. Doku örneklerinden RNA izolasyon kiti kullanılarak Ek-E'de verilen protokol ile toplam RNA elde edilmiştir. Kontaminasyonun engellemesi amacı ile saflaştırma işlemi güvenlik kabininin içinde gerçekleştirilmiştir.

3.10.2. cDNA sentezi

Dokudan RNA izolasyon protokolü ile elde edilen RNA'lar spektrofotometre'de (NanoDrop, ThermoScientific, ABD) 260 nanometre (nm) dalga boyunda ölçülerek mikrolitredeki mikrogram değerleri belirlendikten sonra, primer olarak Random Hekzamerler kullanılarak cDNA sentez kiti ile total RNA'dan cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. cDNA sentezi sırasında kullanılan kimyasallar ve miktarları Çizelge 3.5'te verilmiştir. cDNA için PCR karışımı 0.2 ml'lik tüplere dağıtıldıktan sonra saflaştırılan total RNA üzerlerine eklenmiştir.

Çizelge 3.5 cDNA RT-PCR tepkime karışımı

	Son konsantrasyon	Hacim
Steril H ₂ O-PCR grade	-	RNA miktarına göre değişken
Reaksiyon Tamponu	1x (8mM MgCl ₂)	4 µl
dNTP	1mM	2 µl
Random hekzamer primeri	60 µM	2 µl
RNaz inhibitörü	20 ünite	0.5 µl
Transcriptor Ters Transkriptaz	10 ünite	0,5 µl
Total RNA	1 µg	1 µg olacak şekilde

Daha sonra Ters-Transkriptaz PCR (RT-PCR) Programı (Lightcyler 480, ABD) kullanılarak RNA üzerinden cDNA sentez işi gerçekleştirilir. Sentez için kullanılan RT-PCR otomatik ısı döngüsü programı Çizelge 3.6 'te verilmiştir.

Çizelge 3.6 RT-PCR cDNA Sentezi için Otomatik Isı Döngüsü Programı

	Sıcaklık	Zaman	Döngü sayısı
Primer Bağlanması	25 °C	10 dk	1
Ters transkripsiyon	50 °C	60 dk	1
İnaktivasyon	85 °C	5 dk	1
Soğutma	4 °C	-	1

Reaksiyon sonucunda elde edilen cDNA örnekleri Real-Time PCR'da kullanılıncaya kadar -20°C'lik derin dondurucuda saklanmıştır.

3.10.3 Gen ifadenmesinin Real-Time PCR ile Belirlenmesi

Aggrecan, BMP-7, COL Tip I ve COL Tip II genlerinin mRNA miktarları Real-time PCR yöntemi ile Light Cycler™ (LC) cihazı kullanılarak belirlenmiştir. Amplifikasyonlar 20 µl toplam tepkime hacmi içerisinde, cDNA, mRNA'ya özgü primerler, UPL probu, LightCycler TaqMan Master karışımı ve distile su kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Aggrecan, BMP-7, COL Tip I ve COL Tip II gen ifadenme miktarlarını normalize etmek için GAPDH mRNA düzeyi referans olarak alınmıştır. Seçilen genler ile ilgili primer-prob seçim kantitatif analizleri Şekil 3.2 ; 3.3 ; 3.4 ; 3.5 ve Şekil 3.6'da verilmiştir.

ProbeFinder has designed an optimal real-time PCR assay for:
gene_1

Assay rank 10

Use probe #28 (cat. no. 04687604001)

Primer	Length	Position	Tm	%GC	Sequence
Left	18	607 - 624	60	67	caggaggcagccagtgag
Right	19	652 - 670	60	63	ggtagagctggcctgtggt
Amplicon (64 nt)					
caggaggcagccagtgagtgccggcggctgggcccgcctggccaccacaggccagctctacc					

This assay has: **All criteria met.**



Şekil 3.2 Aggrecan mRNA'sının belirlenmesinde kullanılan primerler ve UPL probun cDNA dizisi üzerindeki yerleşimi

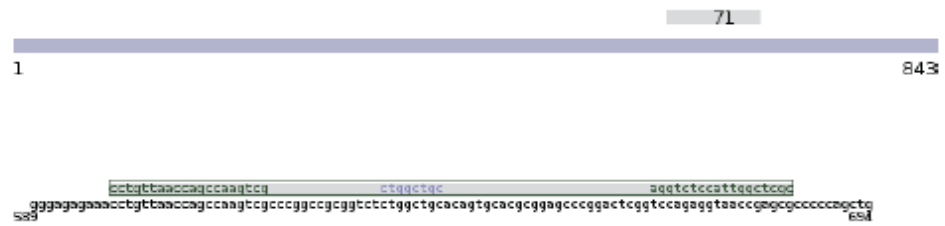
ProbeFinder has designed an optimal real-time PCR assay for:
gene_1

Assay rank 1

Use probe #71 (cat. no. 04688945001)

Primer	Length	Position	Tm	%GC	Sequence
Left	20	599 - 618	60	55	cctgtaaccagccaagtgcg
Right	18	667 - 684	59	61	cgctcgggttaacctctgga
Amplicon (86 nt)					
cctgtaaccagccaagtgcgccccggcggtctctggctgcacagtgcaacgggagccccgactcgggtccagaggttaaccagagcg					

This assay has: All criteria met.



Şekil 3.3 BMP-7 mRNA'sının belirlenmesinde kullanılan primerler ve UPL probun cDNA dizisi üzerindeki yerleşimi

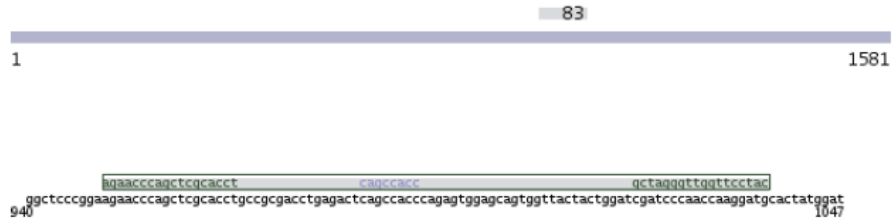
ProbeFinder has designed an optimal real-time PCR assay for:
gene_1

Assay rank 5

Use probe #83 (cat. no. 04689062001)

Primer	Length	Position	Tm	%GC	Sequence
Left	18	950 - 967	60	61	agaaccagctcgcacct
Right	18	1020 - 1037	59	56	catccttggtgggatcg
Amplicon (88 nt)					
agaaccagctcgcacctcgcgcgacctgagactcagccaccagagtgaggacagtggttactactggatgatcccaaccaaggatg					

This assay has: All criteria met.



Şekil 3.4 COL Tip I mRNA'sının belirlenmesinde kullanılan primerler ve UPL probun cDNA dizisi üzerindeki yerleşimi

ProbeFinder has designed an optimal real-time PCR assay for:
gene_1

Assay rank 2

Use probe #22 (cat. no. 04686969001)

Primer	Length	Position	Tm	%GC	Sequence
Left	19	264 - 282	60	63	gacctgcgtctacccaac
Right	18	317 - 334	59	61	gctgctcttggtctttgc
Amplicon (71 nt)					
gacctgcgtctacccaaccccgccacccgtgcccaagaagaactggtggagcagcaagagccagaagcagc					

This assay has: All criteria met.



Şekil 3.5 COL Tip II mRNA'sının belirlenmesinde kullanılan primerler ve UPL probun cDNA dizisi üzerindeki yerleşimi

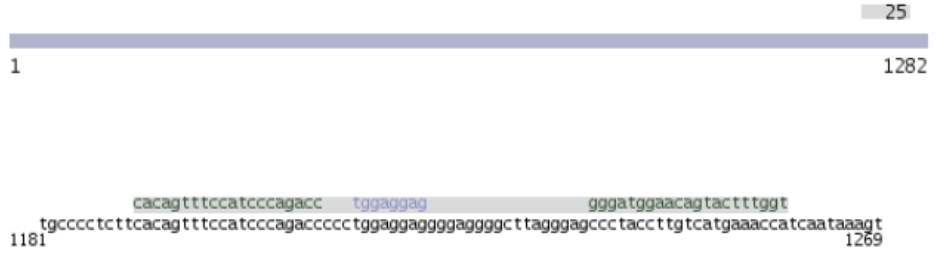
ProbeFinder has designed an optimal real-time PCR assay for:
gene_1

Assay rank 1

Use probe **#25** (cat. no. 04686993001)

Primer	Length	Position	Tm	%GC	Sequence
Left	20	1191 - 1210	60	55	cacagtttccatcccagacc
Right	21	1239 - 1259	59	48	tggtttcatgacaaggtagg
Amplicon (69 nt)					
cacagtttccatcccagacccccctggaggaggggaggggcttagggagccctacottgtcatgaaacca					

This assay has: **All criteria met.**



Şekil 3.6 GAPDH mRNA'sının belirlenmesinde kullanılan primerler ve UPL probun cDNA dizisi üzerindeki yerleşimi

İlgili genlerin ifadenleme çalışmaları için yukarıdaki şekillerde verilen prob-primer ilişkisinden de yararlanılarak her grup için Real Time PCR çalışmalarında kullanılacak tepkime karışımları hazırlanmıştır. Bu tepkime karışımlarını hazırlamak için kullanılan bileşenler ve miktarları Çizelge 3.7'de verilmiştir.

Çizelge 3.7 Aggrecan, BMP-7, COL Tip I, COL Tip II ve GAPDH Real-time PCR tepkime karışımı

	Son konsantrasyon	Hacim
dH ₂ O	-	6.2µL
MgCl ₂ (25 mM)	4mM	1.2µL
Primer F (10 pmol/µl)	2.5pmol	0.25µL
Primer R (10 pmol/µl)	2.5pmol	0.25µL
TaqMan prob (100 pmol/µl)	10pmol	0.1µL
LC TaqMan karışımı (10x)	1x	1µL
cDNA	-	1µL

Real-time PCR karışımları hazırlandıktan sonra tüplere dağıtılmış ve üzerine cDNA'lar eklenmiştir. PCR plağı 3000 rpm'de 10 saniye santrifüj edildikten sonra cihaza yerleştirilmiştir. Çizelge 3.8 'da belirtilen amplifikasyon programı kullanılarak PCR tepkimesi gerçekleştirilmiştir.

Reaksiyon sonucu deney gruplarına ait Aggrecan, BMP-7, COL Tip I, COL Tip II ve GAPDH genlerinin mRNA ifade düzeylerini gösteren Crossing point (Cp) değerleri belirlemiştir. Aggrecan, BMP-7, COL Tip I ve COL Tip II gen ifade düzeyleri GAPDH ifade düzeyine göre normalize edilmiştir.

Çizelge 3.8 Aggrecan, BMP-7, COL Tip I, COL Tip II ve GAPDH genlerinin ifade düzeylerinin belirlenmesi için kullanılan Real Time PCR tepkime programı.

Program 1. Ayrılma (Denatürasyon)		
Program Verisi	Değer	
Döngüler	1	
Analiz Modu	-	
Sıcaklık Hedefleri	Kısım 1	
Hedef Sıcaklık (°C)	95	
İnkübasyon zamanı (s:dk:sn)	10:00dk	
Sıcaklık Geçiş Hızı (°C/sn)	20.0	
Program 2. Primer Bağlanması ve Uzama (Hibridizasyon ve Polimerizasyon)		
Program Verisi	Değer	
Döngüler	50	
Analiz Modu	Çoğalma	
Sıcaklık Hedefleri	Kısım 1	Kısım 2
Hedef Sıcaklık (°C)	95	60
İnkübasyon zamanı (s:dk:sn)	10sn	20sn
Sıcaklık Geçiş Hızı (°C/sn)	20.0	10.0
Program 3. Soğutma		
Program Verisi	Değer	
Döngüler	1	
Analiz Modu	-	
Sıcaklık Hedefleri	Kısım 1	
Hedef Sıcaklık (°C)	40	
İnkübasyon zamanı (s:dk:sn)	30sn	
Sıcaklık Geçiş Hızı (°C/sn)	20.0	

Doza ve zamana bağlı olarak değişen Aggrecan, BMP-7, COL Tip I ve COL Tip II mRNA ifade düzeylerindeki farklılıklar “REST (2009 V2.0.13)” istatistik programı ile karşılaştırılmıştır [Pfaffl 2002]. Veriler “SPSS 15.0” istatistik programı kullanılarak değerlendirilmiş. ve 0.05’den küçük olan p değerleri istatistiksel açıdan anlamlı olarak kabul edilmiştir.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞILMASI

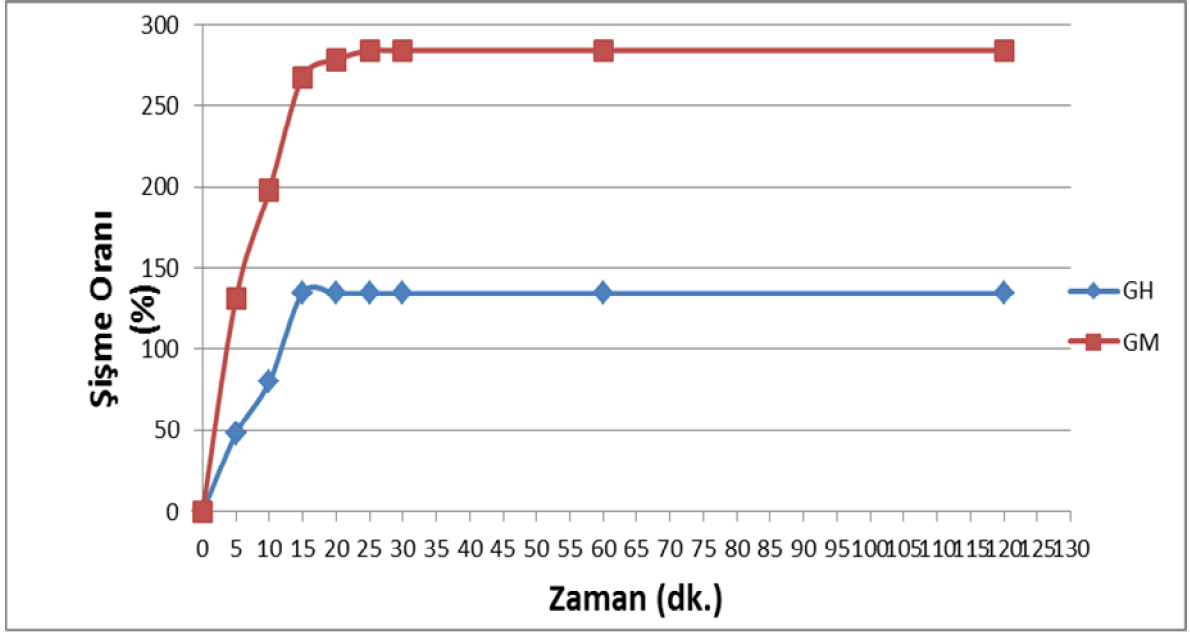
Sunulan tez kapsamında kıkırdak doku hasarları için mevcut doku mühendisliği uygulamalarına yeni bir yaklaşım katarak genetik modifikasyon temellinde yeni bir strateji geliştirmek amaçlanmaktadır. Yapılan çalışmalar ile ilgili sonuçlar üç bölümde sunulmuştur. İlk bölümde; tez kapsamında kullanılan ve matriks görevini üstlenen doku iskelesinin sentezi ve karakterizasyonu ile ilgili sonuçlar verilmiştir. İkinci bölümde genetik modifikasyon temel alınarak plazmid hazırlama ve karakterizasyonu ile *in-vitro* denemeler ile ilgili sonuçlar sunulmuştur. Son bölümde ise bu sonuçlar ışığında yapılan *in-vivo* hayvan modeli çalışması ve ilgili radyolojik, histolojik ve gen ekspresyonu düzeyinde elde edilen sonuçlar ortaya konulmuştur.

4.1. Doku iskelelerinin Hazırlanması ve Karakterizasyonu

Tez çalışmalarında kullanılmak üzere okside-dekstran/jelatin doku iskeleleri hazırlanmıştır. Bu amaçla daha önce grubumuz bünyesinde gerçekleştirilen çalışmalar esas alınmıştır. Bu çalışmalar ışığında iki farklı okside-dekstran içeren (yüksek konsantrasyonda ve normal konsantrasyonda) jelatin temelli kriyojenik doku iskelesi karakterizasyon ve uygunluk çalışmaları için seçilmiştir.

Seçilen iki farklı doku iskelesinin öncelikle sulu ortamda davranışlarını incelemek amacıyla şişme karakteristikleri belirlenmiştir. Doku iskelelerinin sulu ortamda zamana bağlı şişme özellikleri Şekil 4.1 'de verilmiştir. Doku iskeleleri sulu ortamda normal boyutlarından 1-3 kat oranında şişebilmektedir. Dikkat edileceği gibi çapraz bağlayıcı olan okside-dekstran konsantrasyonu arttıkça şişme özelliği azalmaktadır ki; bu beklenen bir durumdur [Kathuria 2009].

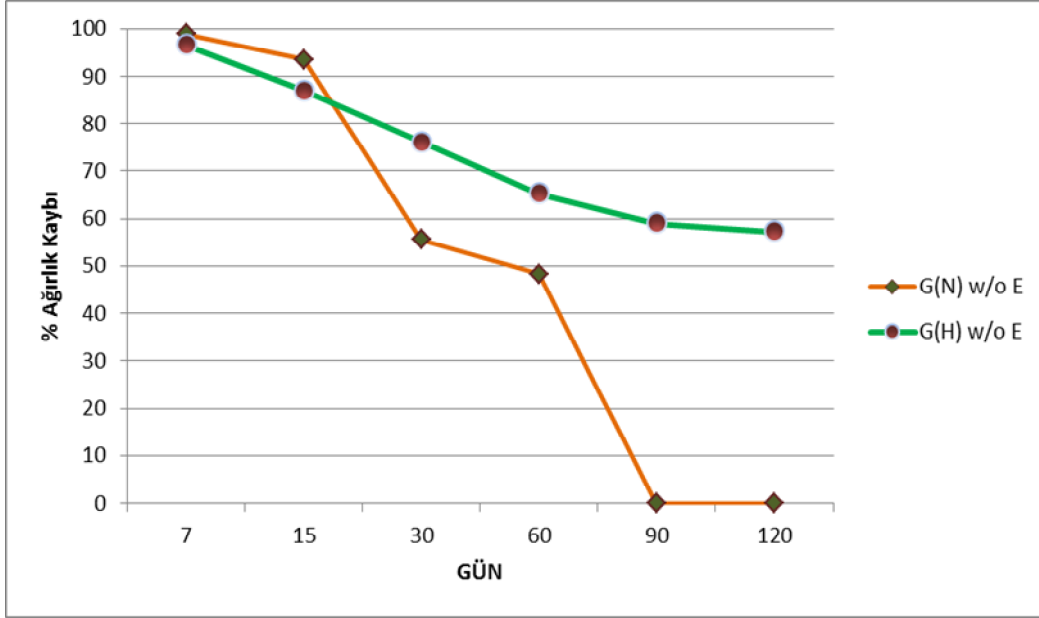
Bu tez kapsamında “kulak kıkırdak hasarı” model olarak alınmıştır. Bu model için hazırlanacak doku iskelelerinin diğer bir sert doku olan kemik modelleri ya da eklem kıkırdağı modellerinde olduğu gibi belirgin bir mekanik kuvvete gereksinimi yoktur. Çalışmalar kapsamında hazırlanan doku iskelelerinin mekanik özellikleri de incelenmiştir fakat bu tez kapsamında raporlanmamıştır.



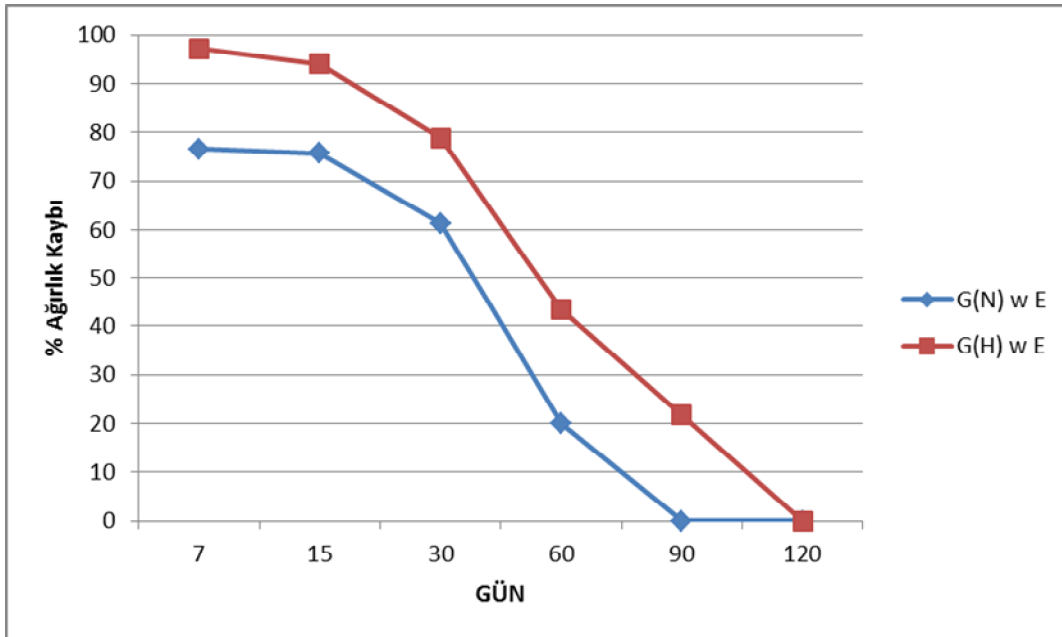
Şekil 4.1 Kriyojenik doku iskelelerinin şişme özellikleri

Doku iskelelerinin şişme özellikleri yanında sulu ortamda biyo-bozunma profilleri de incelenmiştir. Doku iskeleleri özellikle in-vivo hayvan modelinde oluşturulacak olan kırıkta hasar bölgesinde destek/ matriks olarak görev alacaktır. İn-vivo çalışmalar boyunca sulu bir ortam ile temas halinde olacaktır. Bu nedenle sulu ortamdaki biyo-bozunma hızı önemlidir. Vücut içerisine yerleştirilen bir matriks/implant'a vücudun ilk cevaplarından biri litik enzimlerden biri olan lizozim enzim aktivitesini arttırmaktır [Noyan 2008]. Bu amaçla in-vitro koşullarda gerçekleştirilen çalışmalarda hazırlanan doku iskeleleri hem normal sulu ortamda (besi ortamı) hem de enzim katkılı sulu ortamda (besi ortamı + lizozim enzimi) kullanılmıştır. Hazırlanan doku iskelelerinin enzim katkılı ve normal sulu ortamda zamana bağlı olarak biyo-bozunma profilleri Şekil 4.2 ve Şekil 4.3'de verilmiştir. Elde edilen biyo-bozunma profilleri incelenecek olursa enzimli degradasyon hızı enzimsiz degradasyon hızından yüksektir ki bu beklenen bir sonuçtur. Aynı zamanda yapılan iki farklı konsantrasyonda Okside-Dekstran/Jelatin doku iskelelerinin de biyo-bozunma hızları hem enzim katkılı hem de katkısız ortamda farklılık göstermektedir. Çapraz bağlayıcı olan okside dekstran konsantrasyonu arttıkça yapı daha kompakt hale gelmektedir. Her ne kadar bu çapraz bağlanma oranı şişme özelliğini bir miktar azaltsa da degradasyon süresini her iki ortamda da uzatmıştır. Broderick ve ark. yaptıkları çalışmada farklı konsantrasyonda hazırlanan (jelatin ve çapraz bağlayıcı oranları farklı) jelatin doku iskelelerinin enzimatik

ortamdaki kararlılıkları incelenmiş ve benzer sonuçlar elde etmişlerdir. [Broderick 2005].

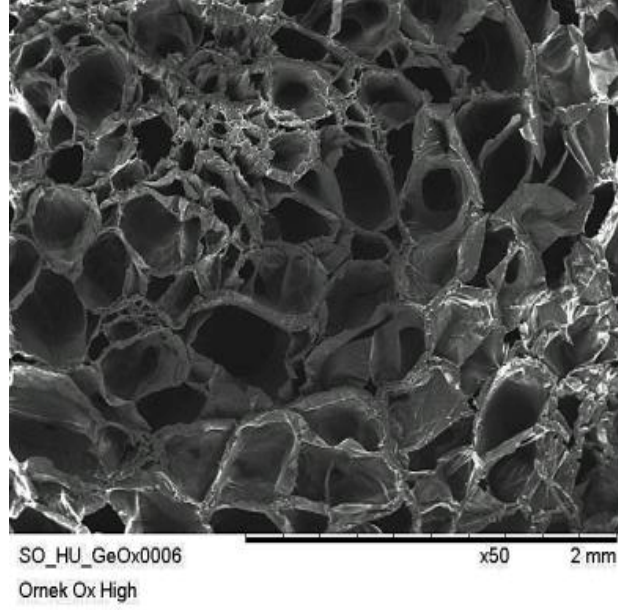


Şekil 4.2 Doku iskelelerinin enzim katkısız biyo-bozunma profilleri

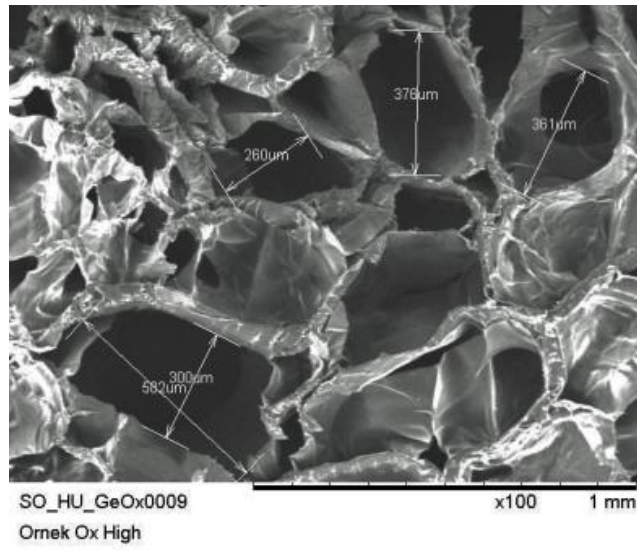


Şekil 4.3 Doku iskelelerinin enzim katkılı biyo-bozunma profilleri

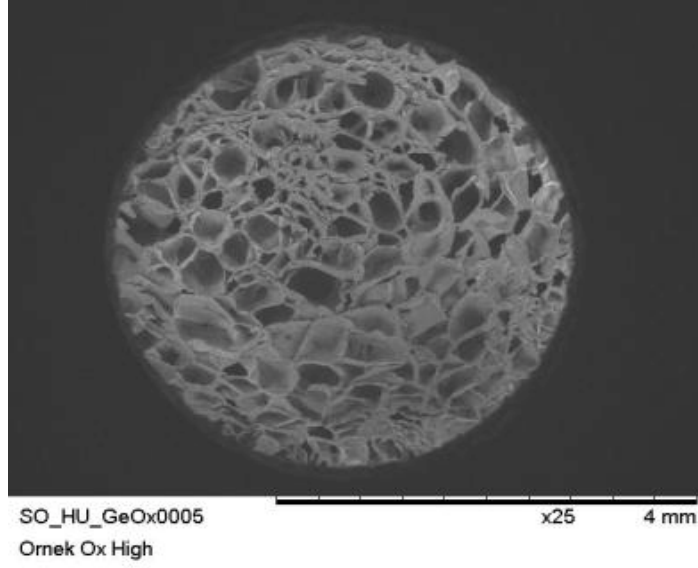
Bir doku iskelesinin hücre ve doku etkileşimlerinde kullanılabilmesi için gerekli temel parametreler içerisinde biyoyumlu olmasının yanında hücrelerin gelişimine imkan verecek şekilde uygun gözenek yapı ve boyutuna sahip olması beklenir [Hutmacher 2000]. Tez kapsamında hazırlanan doku iskelesinin hücre gelişimi destekleyecek gözenek yapı özellikleri taramalı elektron mikroskopisi (SEM/ Hitachi, Japonya) kullanılarak incelenmiştir. Elde edilen SEM mikrografları Şekil 4.4'de verilmiştir.



(A)



(B)



(C)

Şekil 4.4 Okside-Dekstran/Jelatin Doku iskelelerinin SEM mikrografları

Bir kıkırdak hücresi *in-vivo* koşullarda yaklaşık olarak 30-40 mikrometre boyutlarındadır. Fakat bu hücreler tek bir düzlemde teker teker bulunmazlar bir lakün içerisinde küme halindedirler. Bu nedenle 200-300 mikronluk gözenekler kıkırdak gelişimi için oldukça idealdir. Şekilde verilen taramalı elektron mikrografları incelenecek olursa kullanılan biyomalzemenin oldukça gözenekli olduğu, gözeneklerin birbiri ile iç içe yapıda bulunduğu ve kıkırdak gelişimi için uygun gözenek büyüklüklerine sahip olduğu görülebilmektedir.

4.2. *In-vitro* çalışmalar

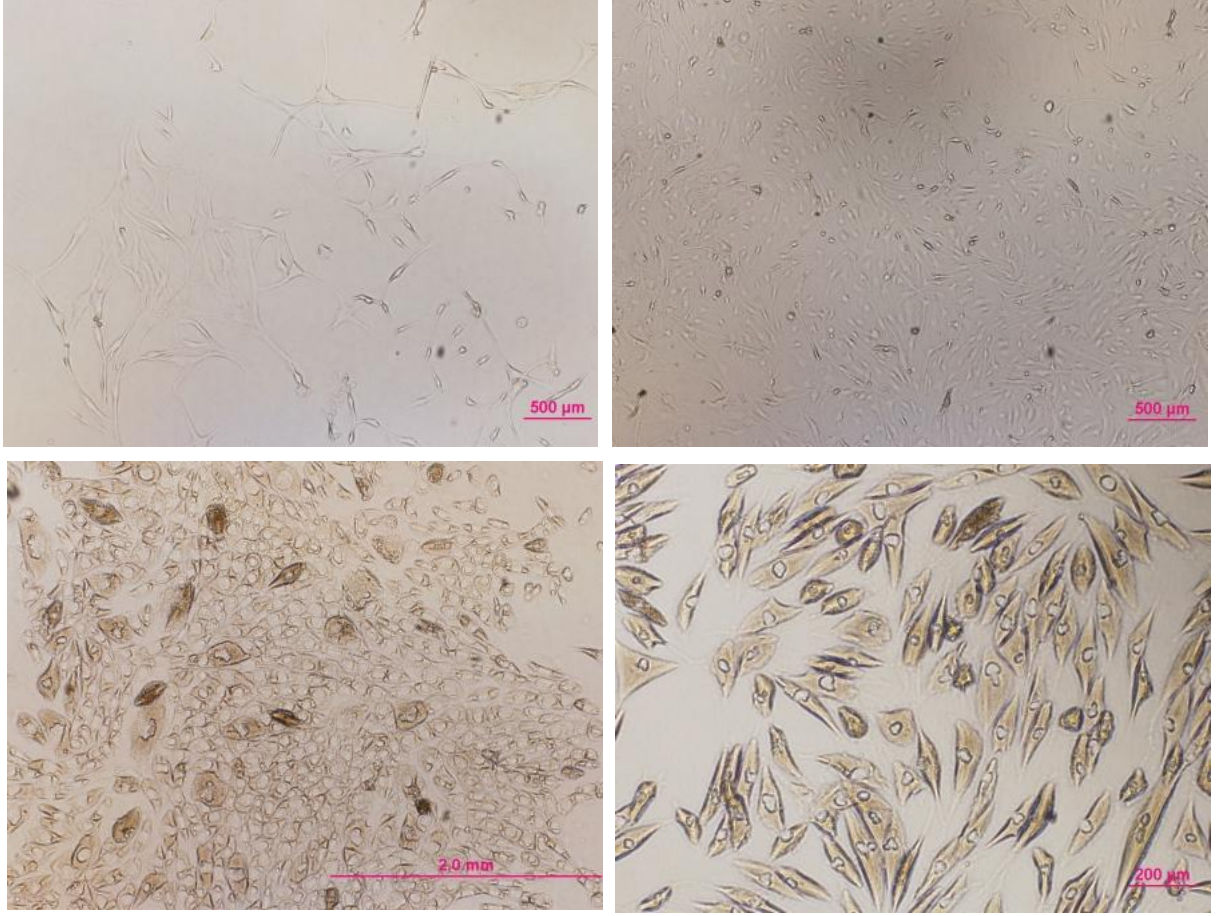
Tez kapsamında kıkırdak gelişimi için *in-vivo* hayvan çalışmalarına geçmeden önce hücre-doku iskelesi etkileşimleri, hücrelerin *in-vitro* koşullarda davranışlarının incelenmesi ve tez kapsamında hazırlanan plazmid ve model plazmid kullanılarak yapılan farklı hücrelerdeki transfeksiyon ve *in-vitro* ekspresyon çalışmaları yapılmıştır.

4.2.1. Primer kıkırdak hücre izolasyonu

Tez kapsamında, Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu G.Ü.ET-10.059 kod numaralı kararı doğrultusunda 1 adet New Zealand Cinsi Tavşan kullanılarak primer kıkırdak hücrelerinin izolasyonu gerçekleştirilmiştir. İlgili izolasyon prosedürü önceki bölümlerde verilmiştir. Transfeksiyon çalışmaları ve *in-vivo* hayvan deneyleri için 3. ve 4. Pasaj primer kıkırdak hücreleri kullanılmıştır.

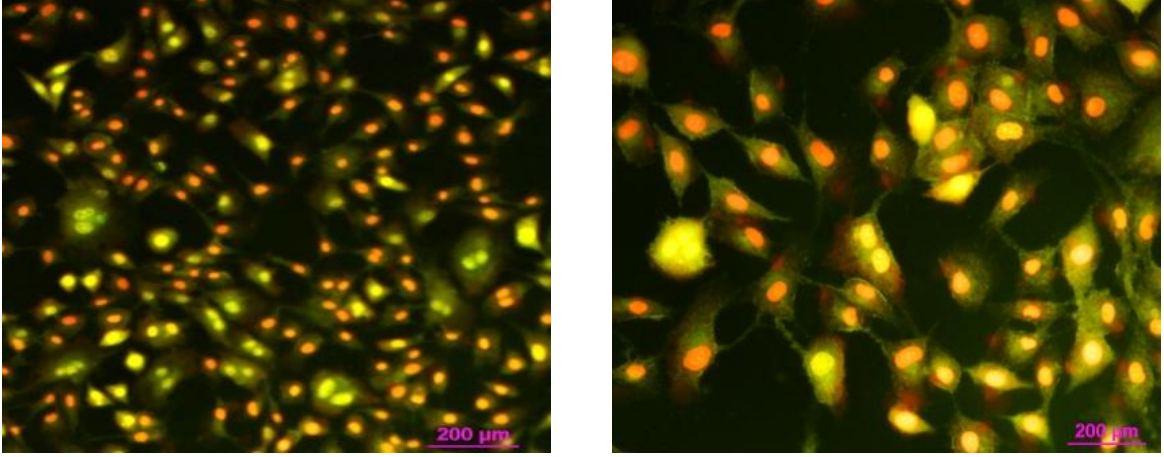
Kıkırdak hücreleri de-differansiyasyon denen olguya oldukça açıktır. De-differansiyasyon primer hücrelerin *in-vitro* koşullarda *in-vivo* koşullardaki bazı fenotipik ve metabolik özelliklerini kaybetmesi olarak adlandırılabilir [Hitaki 1985]. Kulak kıkırdağı elastik kıkırdak morfolojisi göstermektedir. Primer kıkırdak hücreleri *in-vitro* koşullarda ilerleyen pasajlarda uygun olmayan kültür ortamlarında tipik morfolojisini kaybedip fibroblast benzeri hücre morfolojisine dönüşmektedir. Tez kapsamında önceki bölümlerde belirtilen katkılı kültür ortamı kullanılmıştır.

In-vitro koşullarda üretilen primer kıkırdak hücreleri ile ilgili ışık mikroskopisi görüntüleri Şekil 4.5'de verilmiştir.



Şekil 4.5 Primer kıkırdak hücrelerin ışık mikroskopisi görüntüleri

İzole edilen primer kıkırdak hücrelerin morfolojisi literatür ile uygunluk göstermektedir [Hutmacher 2000, Picot 2005]. Hücrelerin in-vitro koşullarda sürekli olarak kalması hücrelerde sitoplazmik değişimlere ve granülleşme ile birlikte apoptotik oluşumlara neden olabilmektedir. Bu nedenle hücrelere 3. pasaj öncesi in-vitro koşullarda bir toksisite ve apoptotik belirteç olarak kullanılan ikili boyama tekniği uygulanmıştır. Hücreler Acridine Oranj (AO) ve Propidium idoide (PI) ile boyanarak hücre morfolojileri ayrıca incelenmiştir. Hücrelerin ikili boyama ışık mikroskobu görüntüleri Şekil 4.6'de verilmiştir.



Şekil 4.6 Primer kıkırdak hücrelerin AO/PI boyamaları

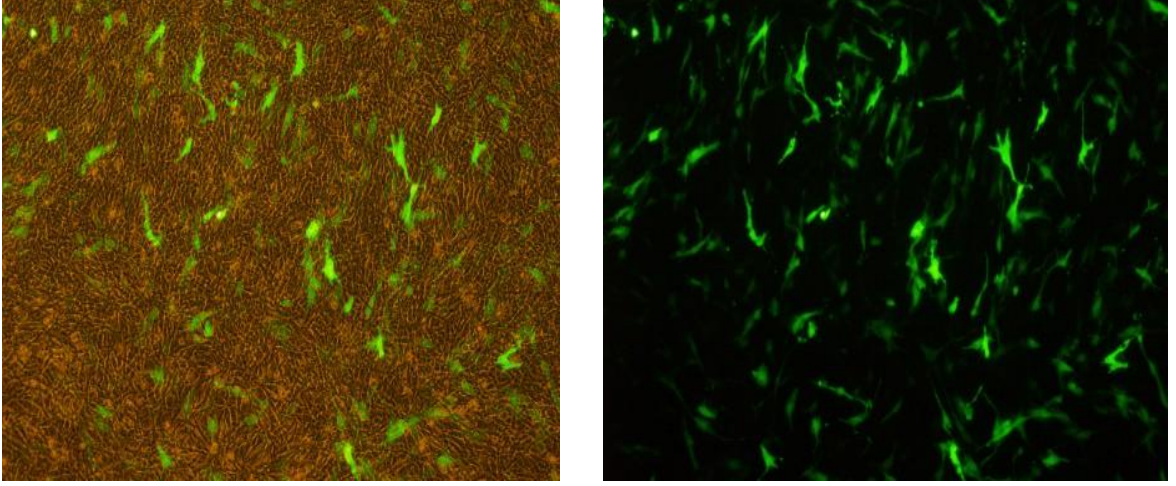
4.2.2. Sitotoksikite Çalışmaları

Tez kapsamında kullanılacak olan doku iskelesi yapısının hücreler ile olası sitotoksik etkisi MTT testi kullanılarak doğrudan etkileşim ve dolaylı etkileşim yolları kullanılarak incelenmiştir. Doku iskelesinin doğal yapı-taşı jelatin'dir. Jelatin doku matriks elemanı olan kolajen in denatüre halidir. Tamamen doğal ve biyo-bozunurdur. Yapılan çalışmalarda literatüre paralel olarak bir sitotoksik etkisi söz konusu değildir [Cai 2002]. Bu tez kapsamında kullanılan doku iskelesinin yapısında çapraz bağlayıcı olarak okside dekstran kullanılmaktadır. Dekstran bir polisakkarit olarak tamamen doğal ve biyo-bozunurdur. Bu yapının da literatüre paralel olarak bir sitotoksik etkisi yoktur.

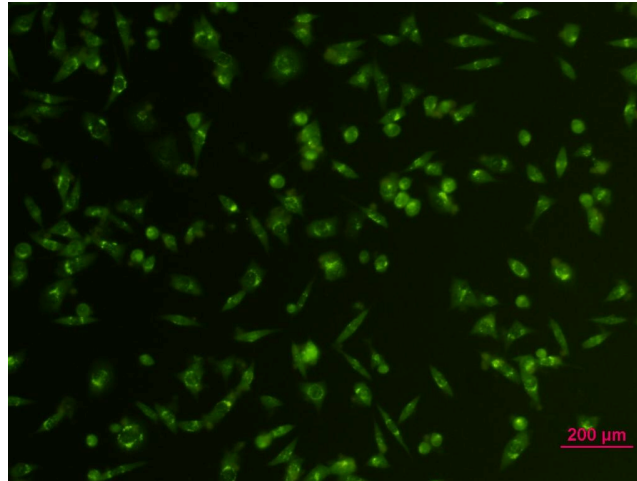
4.2.3. Transfeksiyon çalışmaları

Tez kapsamında kıkırdak doku mühendisliğinin için yeni bir strateji geliştirilmesindeki temel basamak hücrelerin genetik olarak önceden modifiye edilmesidir. Bu amaçla hücreler in vivo çalışmalar öncesinde ticari model plazmid ile (Yeşil Floresans Proteini (GFP) eksprese eden) tez kapsamında Avusturya Ludwig Boltzman Enstitüsünde tasarlanan BMP7 plazmidini ile transfeksiyon çalışmaları yapılmıştır. Transfeksiyon aracı olarak Fermantas / ABD firmasına ait Turbofect ticari ürünü kullanılmıştır. GFP eksprese eden plazmid ile yapılan

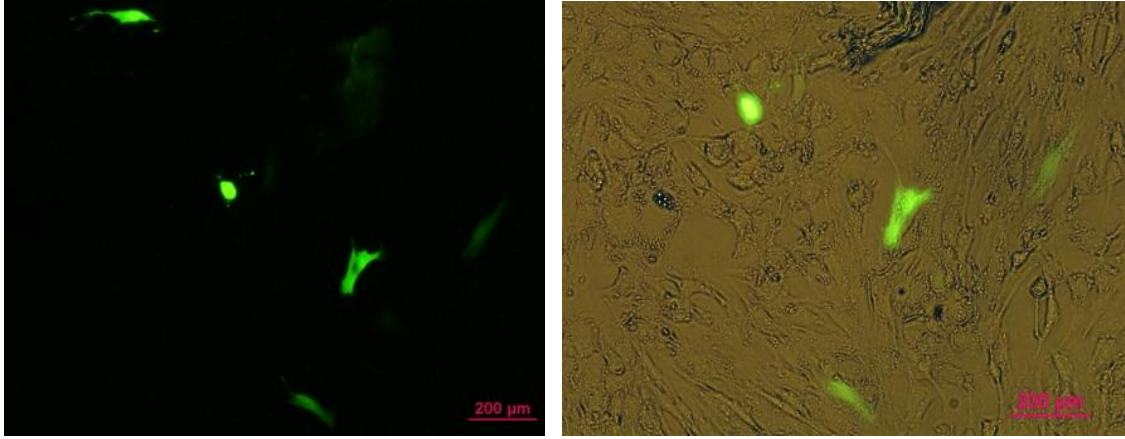
transfeksiyon çalışmalarında primer kondrositler dışında çok çeşitli hücre hatları kullanılmıştır. GFP (Yeşil Floresan Protein) eksprese eden plazmid ile yapılan transfeksiyon çalışmalarına ait ışık ve floresans mikroskobisi görüntüleri Şekil 4.7 ; 4.8 ve Şekil 4.9'da verilmiştir. (Yeşil renk: GFP ifadesi)



Şekil 4.7 C2C12 Miyoblast hücre hatlarında GFP ifadesi (60saat)



Şekil 4.8 L929 hücre hattında GFP ifadesi (60saat)



Şekil 4.9 Primer kıkırdak hücrelerinde GFP ekspresyonu (60saat)

Şekil 4.7 ve Şekil 4.8 'de görülebileceği gibi bir hücre hattı kullanılarak yapılan transfeksiyon çalışmalarında transfeksiyon ve buna bağlı ekspresyon oranı (verim olarak) oldukça iyi düzeyde olabilmektedir. Bu oran uygun şartlarda % 40-70 arasında olabilmektedir. Bu verimin arttırılmasında kullanılan taşıyıcının ve hedef hücrenin yapısı çok önemlidir. Tez kapsamında kullanılan taşıyıcı bir lipofilik taşıyıcıdır. Hücre hem endositoz yollarından hem de hücre zarında bulunan lipid kanallarından girebilmektedir. Hücre hatlarının hücresel zar yapıları endositoza daha açık bir yapıdadır. Oysaki primer hücrelerde hücre zarı daha rigid ve kapalıdır. Primer hücreler hücresel zarın ve sitoplazmadaki anlık madde konsantrasyonu değişikliklerine karşı daha hassastır [Hamm 2002]. Bu nedenle primer hücrelerde transfeksiyon ve buna bağlı ekspresyon verimi düşük kalmaktadır. Özellikle kıkırdak hücreleri gibi hassas hücrelerde bu oran %5-15 oranında seyretmektedir [Hamm 2002, Schüler 2008]. Tez kapsamında primer kıkırdak hücreleri ile yapılan in-vitro transfeksiyon çalışmalarında da transfeksiyon ve buna bağlı GFP ekspresyon verimi yaklaşık %15 oranında bulunmuştur.

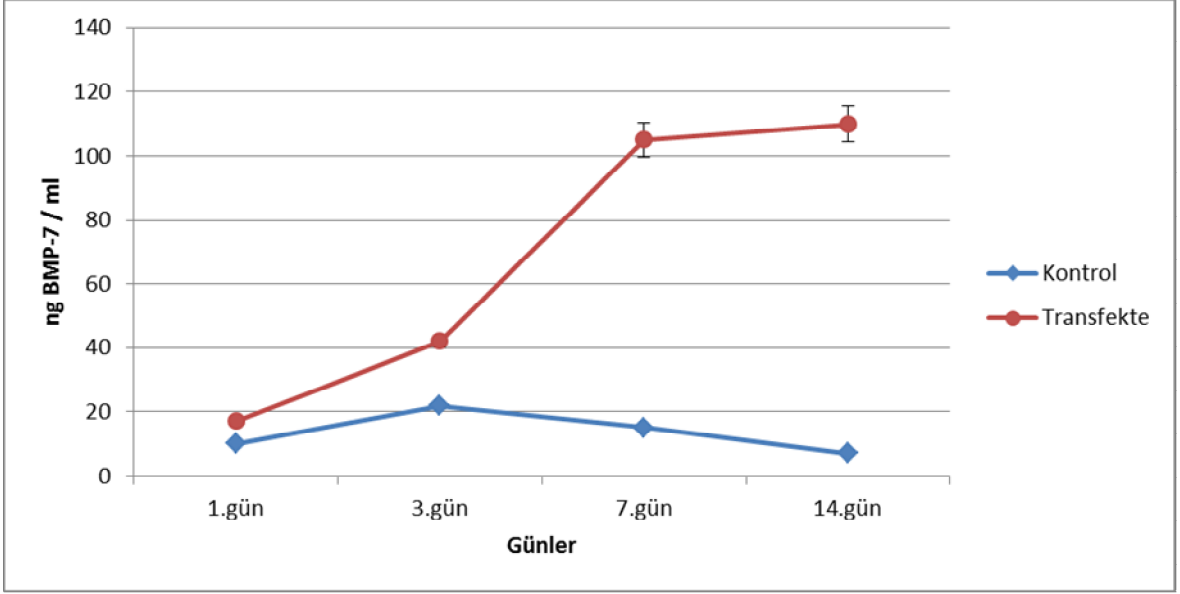
Transfeksiyon çalışmalarının ikinci aşamasında Avusturya Ludwig Boltzman Enstitüsü'nde tasarlanan BMP7 plazmid kullanılmıştır. İlgili Enstitü'deki uzmanlık çalışmalarında BMP7'nin in vitro koşullarda primer kıkırdak hücrelerinde ekspresyonu ELISA temelli yöntemler ile zamana karşı saptanmıştır [Schüler 2008].

Çalışmalar kapsamında ek olarak doku iskelesine ekilen transfekte hücrelerden erken dönemde BMP-7 salımı incelenmiştir. RayBiotech BMP-7 Eliza Kiti kullanılarak salınan BMP-7 miktarları belirlenmiştir. Şekil 4.10'da verilen zamana bağlı BMP-7 salımları incelenirse, Schüller ve ark. yaptıkları çalışmaya benzer sonuçlar aldığı gözlemlenebilir. Yapılan bu çalışmada, doku iskelesine ekilmiş olan kıkırdak hücrelerinin, Schüller ve ark. yaptıkları çalışmada kültür kabındaki primer kıkırdak hücrelerinden çok daha fazla miktarda BMP-7'nin hücrelerden salındığı ölçülmüştür. Fakat Schüller ve ark. yaptıkları aynı koşullardaki diğer transfeksiyon çalışması sonucu ölçtükleri BMP-7 değerleri ile arasındaki fark çok azdır [Schüler 2008].

Bu olgu transfeksiyon verimi ile açıklanabilir. Transfeksiyon protokolleri genel protokoller olsa da hücrede pasajdan pasaja, kültürden kültüre transfeksiyon verimi farklılıklar gösterebilmektedir. Yüksek bir transfeksiyon verimi yüksek bir biyosenteze işaret etmektedir.

Aynı şekilde doku iskelesine ekilen hücrelerde daha yüksek konsantrasyon bir BMP-7 sentezi bekleniyordu fakat hücrelerin kültür kaplarında transfekte edilip daha sonra doku iskelelerine aktarımı gerçekleştirilmiştir. Bu durum aktarılan hücrelerde ekspresyonun ertelenmesine veya hücre kayıplarına neden olmuş olabilir.

Tez kapsamındaki *in-vivo* çalışmalardaki erken dönem gen ekspresyonu çalışmalarında da bu veriler temel alınmıştır.



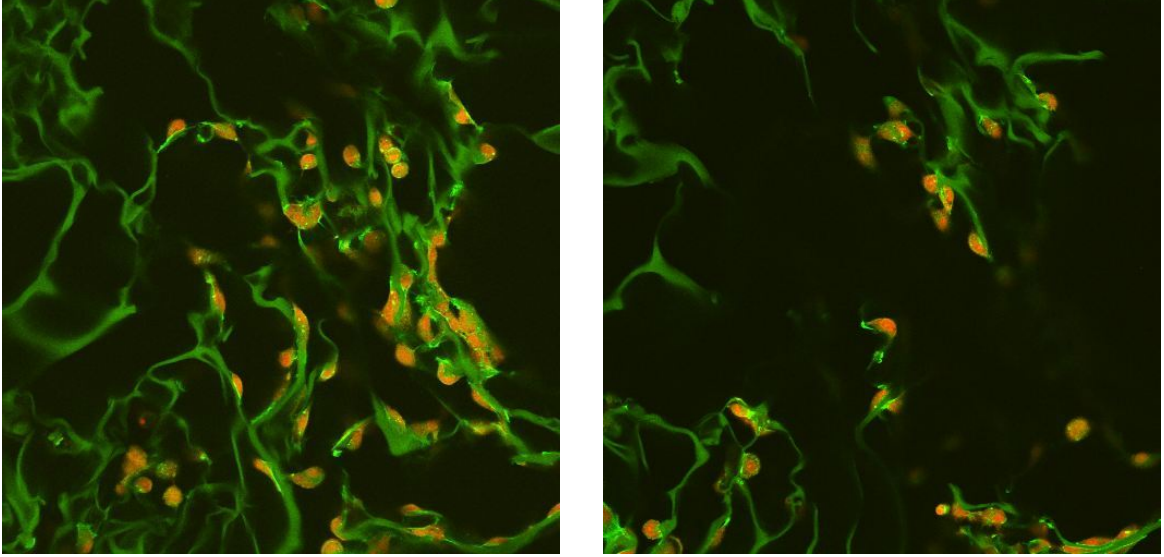
Şekil 4.10 Doku iskelesine ekilmiş olan primer kıkırdak hücrelerinde zamana bağlı olarak hBMP-7 salımı (n=3)

4.3. Doku iskelesi – Hücre Etkileşimleri

Tez çalışmaları kapsamında in-vivo çalışmalara geçmeden önce son olarak doku iskelesi ile primer kıkırdak hücrelerinin etkileşimi incelenmiştir. Bu kapsamda 8mm çaplı 1cm yüksekliğinde Okside-dekstran/Jelatin doku iskeleleri kullanılmıştır. Doku iskeleleri işlemler öncesi %70 Mutlak Etanol kullanılarak steril edilmiştir. Ayrıca hücreler ile etkileştirilmeden önce 2 saat boyunca kültür ortamında bekletilmişlerdir. Kültür ortamı olarak DMEM/F12 Ham's %10 FBS , %1 Antibiyotik –Antimikotik Solusyonu %1 L-Glutamine %0,2 Insulin kullanılmıştır. Primer kıkırdak hücreleri doku iskelesi üzerine 1×10^6 hücre /200 mikrolitre olacak şekilde pipetlenerek ekilmiştir. 30 dakika 24 gözlü kültür kaplarında 37°C bekletildikten sonra üzerine 1 ml kültür ortamı ilave edilmiştir. Hücrelerin doku iskelesi ile etkileşimleri 14 gün boyunca incelenmiştir. 2-3 günde bir kültür ortamı yenisi ile değiştirilmiştir.

Doku iskelesi – hücre etkileşimini incelemek amacıyla Alexa Fluor (488nm) ve Propidium Iodide boyaması yapılarak, Konfokal Mikroskopisi altında inceleme

yapılmıştır. Şekil 4.11'de ve Şekil 4.12'de yüzey tabakasından ve farklı kesit alanlarından alınan Konfokal Mikroskopi görüntüleri verilmiştir.

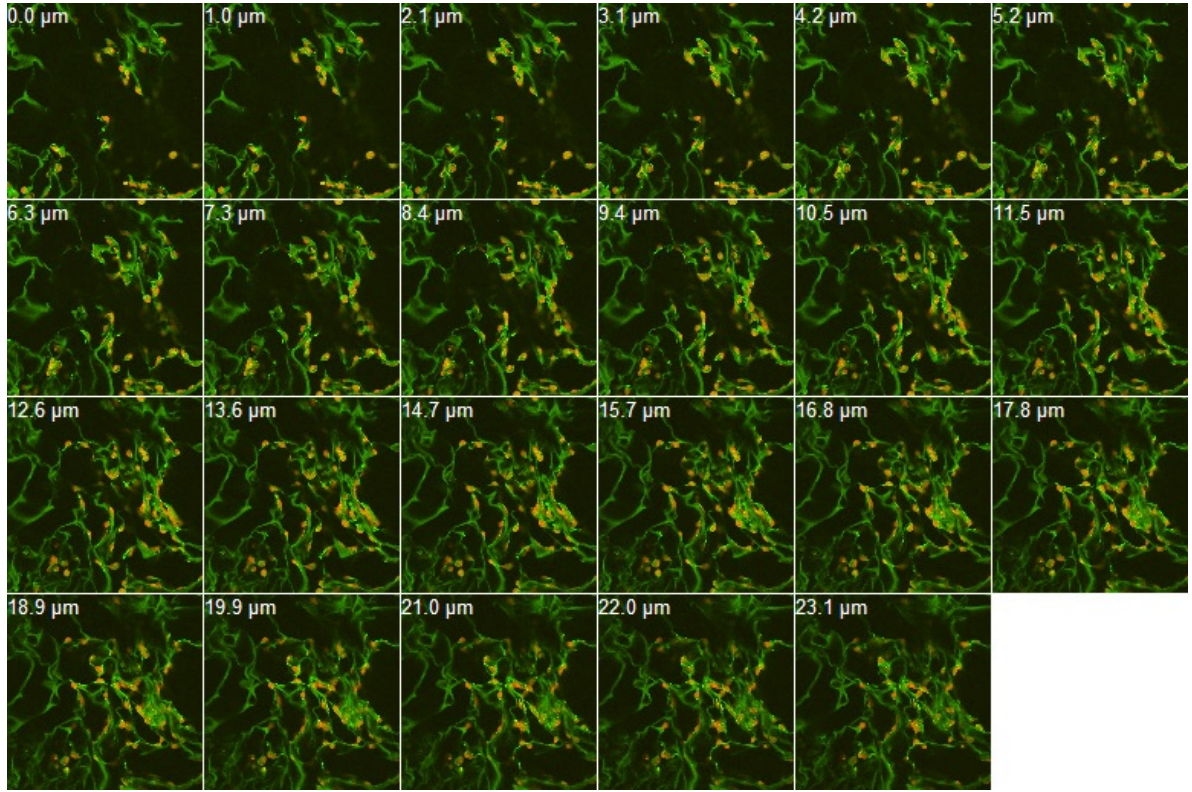


Şekil 4.11 Okside-dekstran/Jelatin doku iskeleleri ile primer kıkırdak hücrelerinin etkileşimi – 10 .gün sonuçları – yüzeysel tabaka (Yeşil – Alexa fluor : Hücre sitoplazması ve doku iskelesi yapıları ; Kırmızı – Propidium iodide : Hücre çekirdekleri)

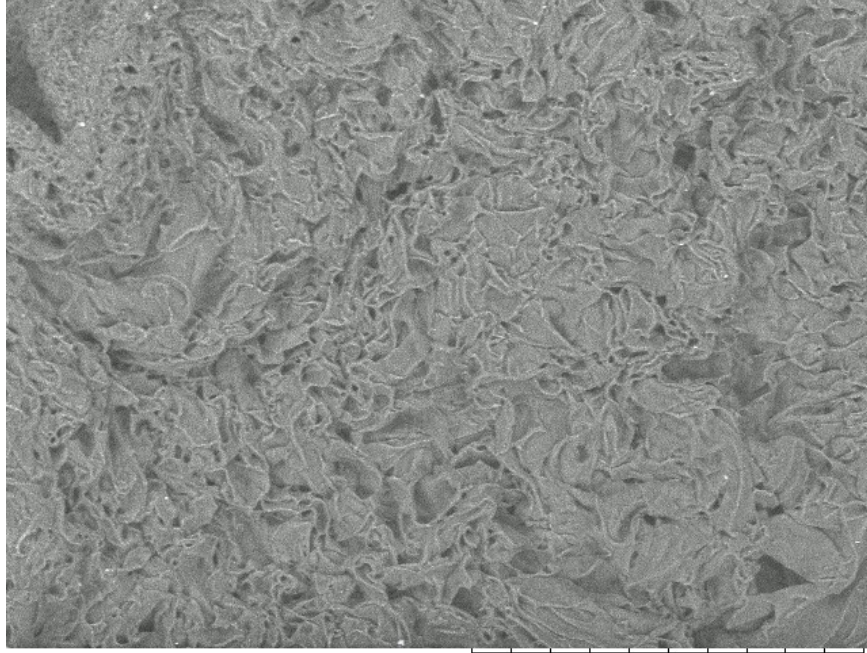
Primer kıkırdak hücrelerinin doku iskelesi ile etkileşimleri için ayrıca Taramalı Elektron mikroskopisinden de yararlanılmıştır. Şekil 4.13 'de ilgili mikrograf sonuçları verilmiştir.

Her iki grup hücre çalışmaları da göstermektedir ki hücreler doku iskelesi ile çok uyumlu bir etkileşimde bulunmuşlardır. Bu sonuç aynı zamanda matriks yapısı olan Okside-dekstran/jelatin doku iskelelerinin biyouyumluluğunu teyit etmektedir.

Literatürde dekstran temelli çok sayıda doku iskelesi ile yapılmış çalışmalar mevcuttur. Bu çalışmalarda dekstran ya tek başına hidrojel olarak ya da diğer polimerik malzemeler ile blend formunda ortamda bulunmaktadır. Cai ve ark. PLA/dekstran doku iskeleleri üzerinde 3T3 hücreleri ile yaptıkları hücre tutunması çalışmalarında başarılı sonuçlar almışlardır [Cai 2002].

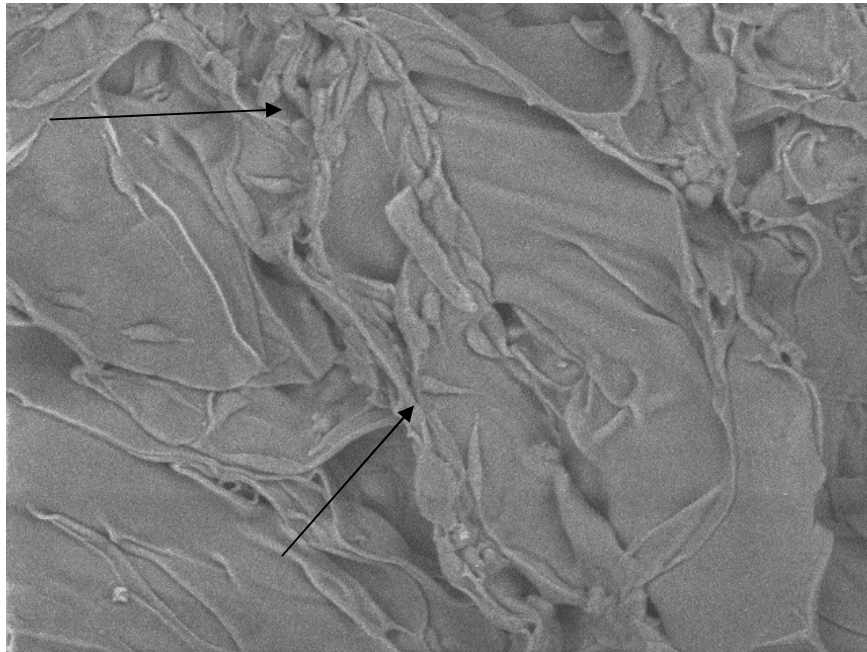


Şekil 4.12 Okside-dekstran/Jelatin doku iskeleleri ile primer kıkırdak hücrelerinin etkileşimi – 10 .gün sonuçları - kesitler (Yeşil – Alexa fluor : Hücre sitoplazması ve doku iskelesi yapıları ; Kırmızı – Propidium iodide : Hücre çekirdekleri)



SO_HU.GH0004

L x250 300 um



SO_HU.GH0001

L x500 200 um

Şekil 4.13 Okside-Dekstan / Jelatin doku iskeleleri ile primer kıkırdak hücrelerinin etkileşimi – 14. Gün sonuçları

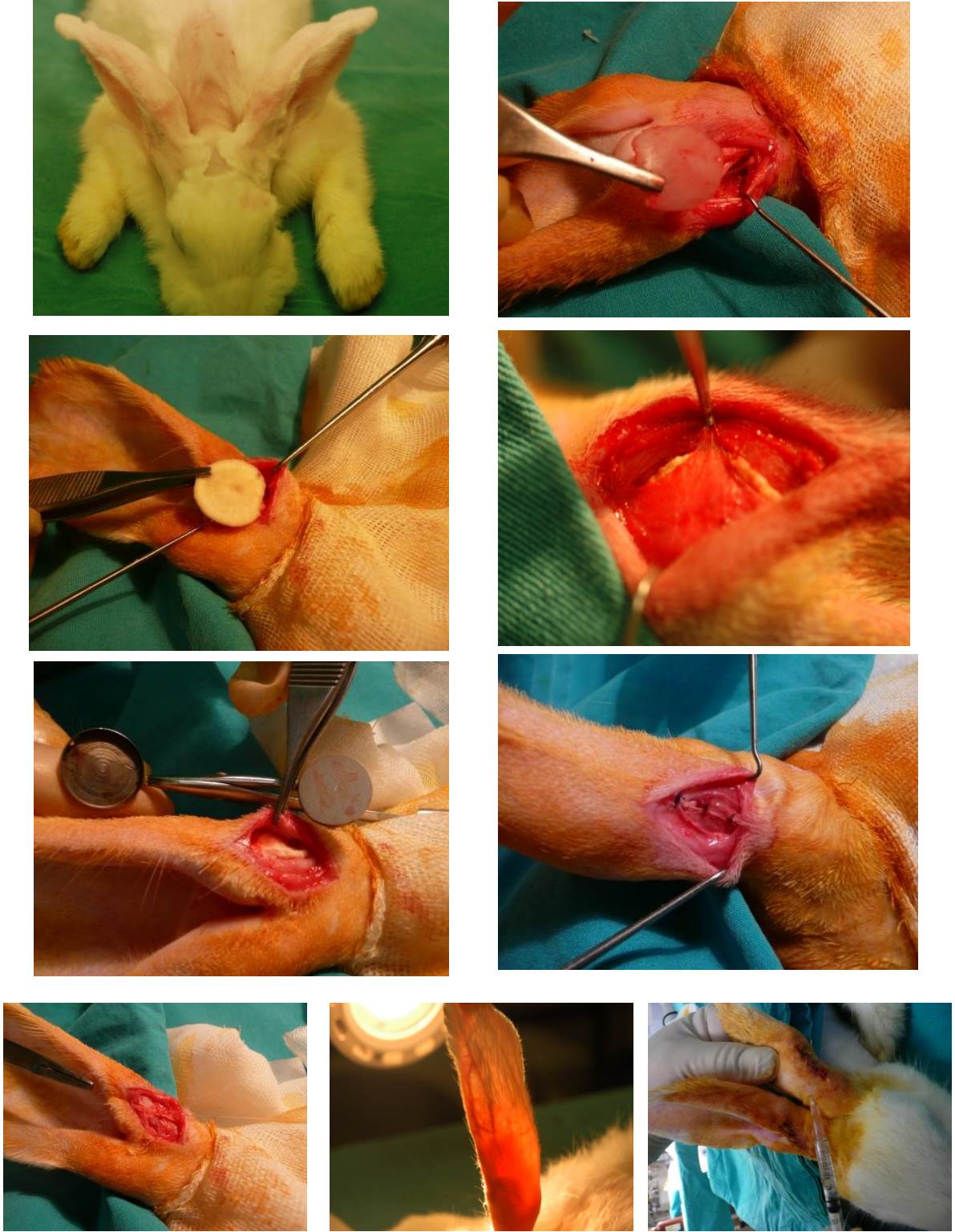
4.4 *In-vivo* Çalışmalar

Kıkırdak doku hasarları için yeni doku mühendisliği stratejilerinin geliştirilmesi amacıyla yürütülen tez çalışması kapsamında kulak kıkırdağı model olarak seçilmiştir. Bu model New Zealand tavşan hayvan modelleri üzerinde uygulanmıştır.

In vivo çalışmalar Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu G.Ü.ET-10.059 No'lu kararı ile uygulanmıştır. Bu model temel olarak şöyledir: Kulak kıkırdağının proksimal bölgesinde 15mm çapında bir hasar oluşturulmuştur. Bu hasar bölgesinin zamana bağlı iyileşmesi 4 farklı grupta 4 ay boyunca izlenmiştir. Bu gruplar kısaca,

- i) Kontrol / Hasar grubu (K)
- ii) Boş Doku iskelesi grubu (S)
- iii) Doku iskelesi ve primer kıkırdak hücreleri grubu (N)
- iv) Doku iskelesi ve genetik modifiye primer kıkırdak hücreleri grubu (T) 'dur.

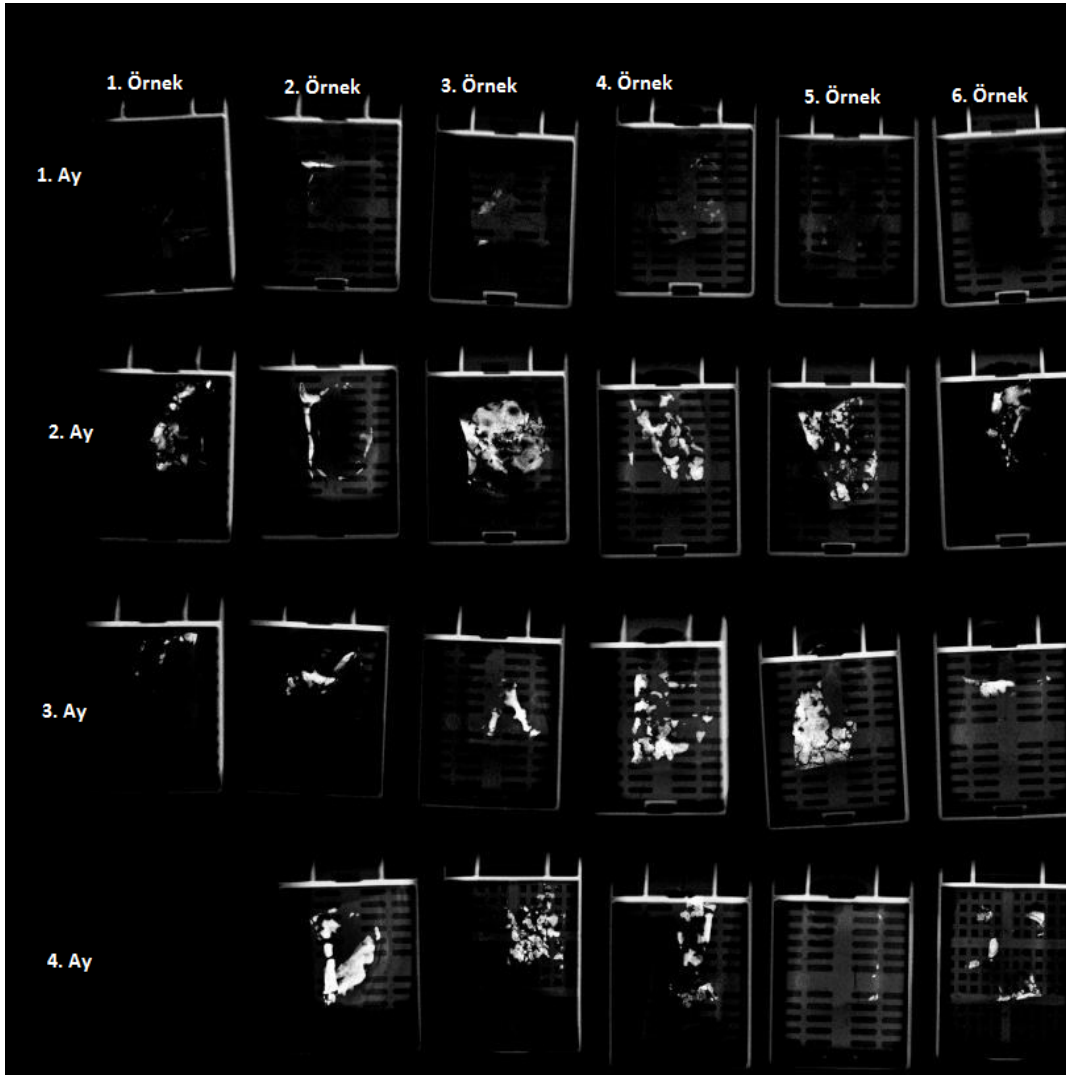
Çalışmalar hakkında genel prosedür önceki bölümlerde verilmiştir. Hasar bölgesinde uygulanan cerrahi operasyon görüntüleri Şekil 4.14 'de verilmiştir.



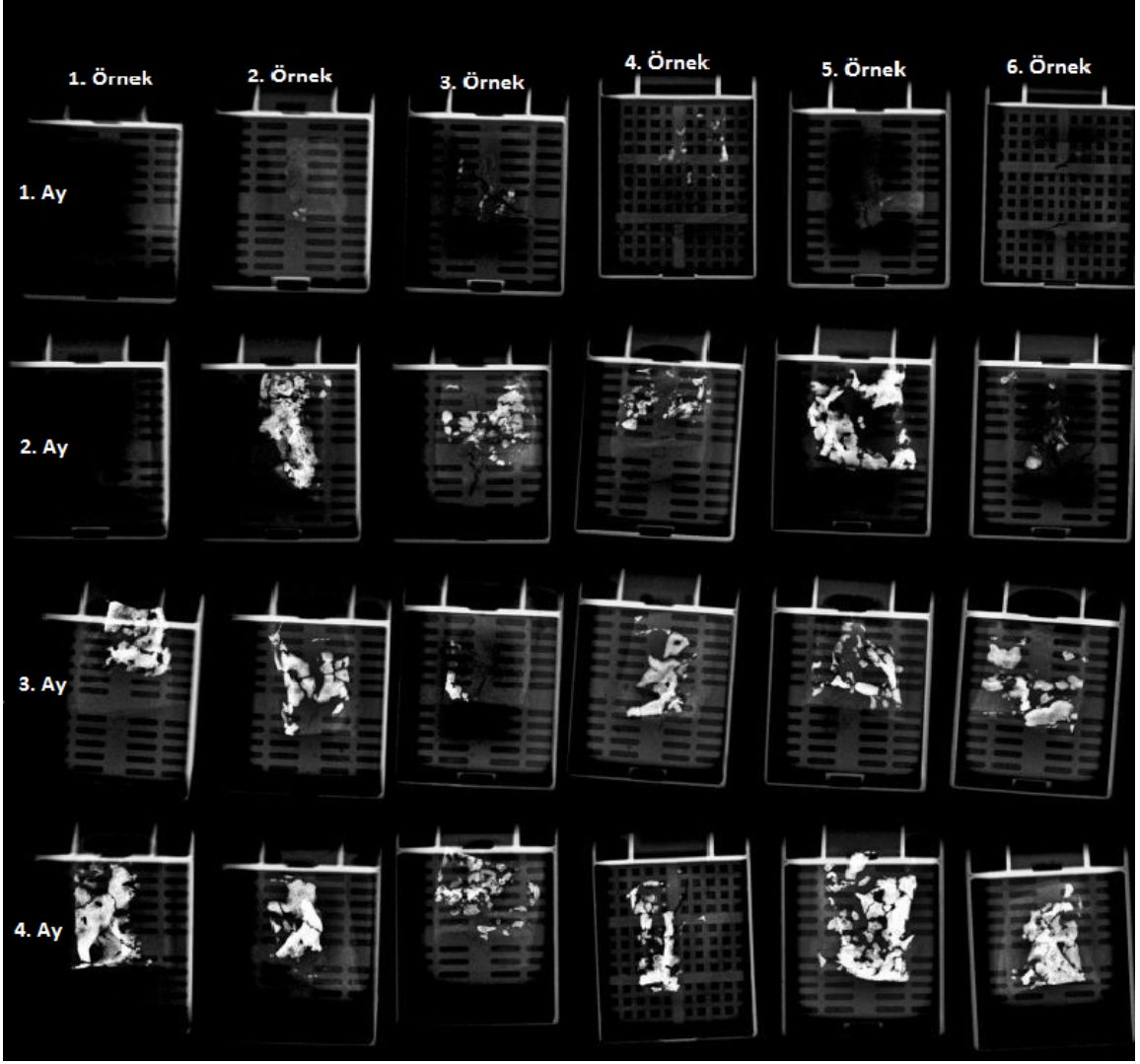
Şekil 4.14 *In-vivo* hayvan çalışmaları cerrahi operasyonlar

4.5. Radyolojik Çalışmalar

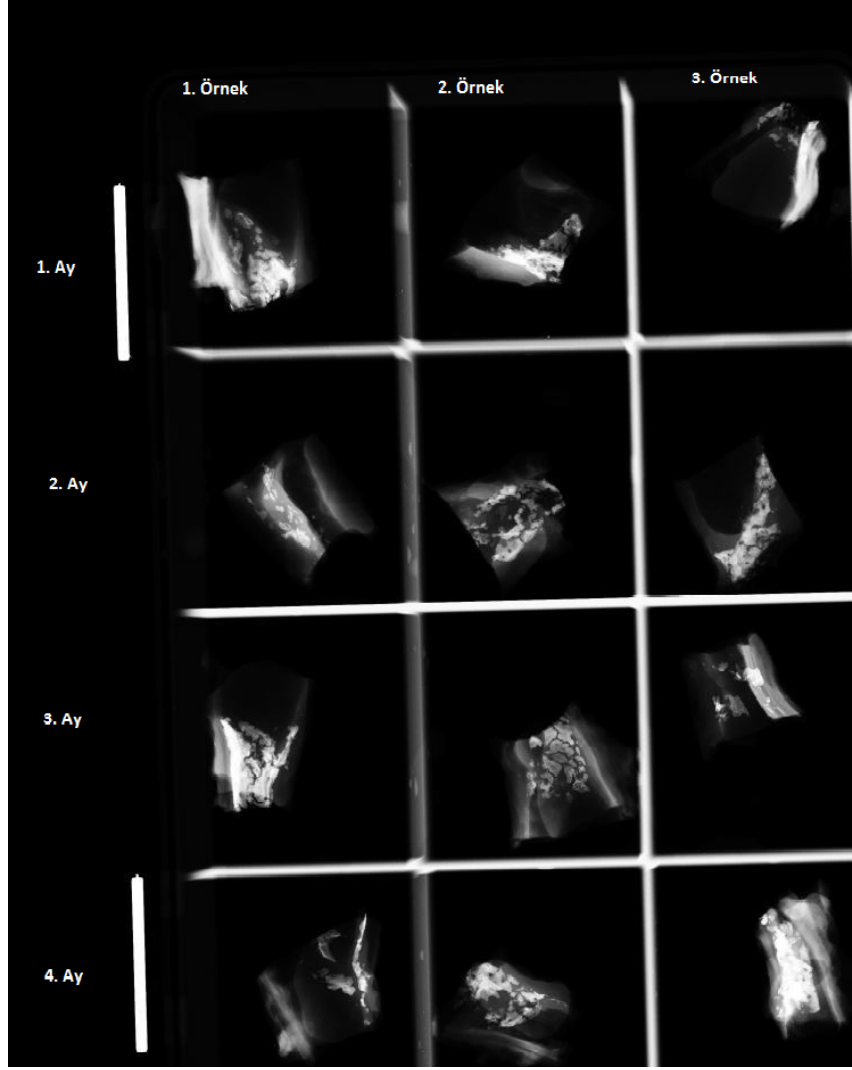
Hayvan deneylerini izleyen aylarda belirli sürelerde (1-4 aylık sürelerde) örnekler operasyon ile hasar bölgesinden çıkartıldıktan sonra histolojik analiz öncesi radyolojik incelemeye tabi tutulmuşlardır. Radyolojik incelemede amaç dokuda zamana bağlı olabilecek kalsifikasyonun araştırılmasıdır. Radyolojik inceleme sonucunda elde edilen radyograflar Şekil 4.15 ; 4.16 ; 4.17 ve Şekil 4.18'de verilmiştir.



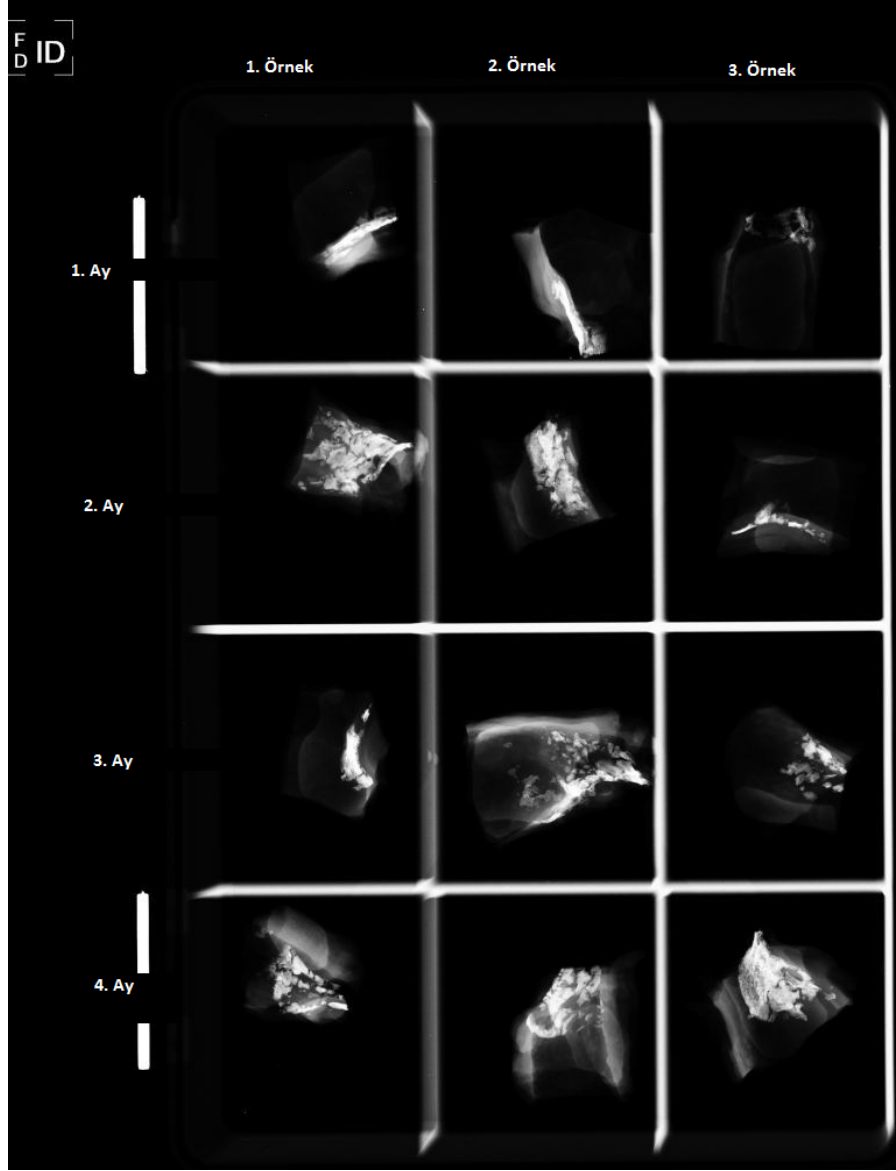
Şekil 4.15 Kontrol grubu (K) aylara göre radyolojik inceleme sonucu



Şekil 4.16 Boş Doku iskelesi grubu (S) aylara göre radyolojik inceleme sonucu



Şekil 4.17 Normal Hücre grubu (N) örneklerin aylara göre radyografik analizi



Şekil 4.18 Genetik modifiye / Transfekte Hücre grubu (T) örneklerin aylara göre radyografik analizi

Radyolojik inceleme sonucu dokularda zamana bağlı bir kalsifikasyonun olduğu gözlemlenmiştir. Kıkırdak iyileşme yolunun kemik yolağı üzerinden olduğu düşünüldüğünde kalsifikasyon beklenmedik bir sonuç değildir. Literatürde de kıkırdak hasar bölgelerinde belirli kalsifikasyon noktaları rapor edilmiştir [Karam 2006, Bian 2011]. Fakat kalsifikasyonun derecesi önemlidir. Bu amaçla elde edilen radyograflar kullanılarak bir kalsifikasyon skorlaması yapılmıştır. Kalsifikasyon skorlaması Çizelge 4.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.1 Zamana bağlı kalsifikasyon skorlaması

Gruplar	Kalsifikasyon derecesi 0: yok 5: yoğun					
	1.Örnek	2.Örnek	3.Örnek	4.Örnek	5.Örnek	6.Örnek
Kontrol / Boş Defekt						
1.Ay	0	1	1	1	1	1
2.Ay	2	2	4	3	3	2
3.Ay	2	2	2	3	4	1
4.Ay		4	3	3	4	1
Scaffold Grubu						
1.Ay	0	0	1	1	0	0
2.Ay	0	3	3	2	4	1
3.Ay	2	3	1	2	2	3
4.Ay	4	3	2	2	4	4
Normal Hücre Grubu						
1.Ay		3		2		1
2.Ay		3		3		2
3.Ay		3		3		2
4.Ay		2		3		4
Transfekte Hücre Grubu						
1.Ay		1		1		0
2.Ay		3		2		1
3.Ay		1		3		2
4.Ay		3		4		4

Kalsifikasyon skorlaması 0 -5 arasında yapılmıştır. 0 derecede kalsifikasyon yok 5 derecede çok yoğun kalsifikasyon var demektir. Çizelge 4.1 'de verilen kalsifikasyon skorlama incelendiğinde dokularda zamana bağlı kalsifikasyon olduğu görülebilmektedir. Kalsifikasyonun gruplardan bağımsız olarak her grupta görülebilmektedir. Burada dikkati çeken kalsifikasyonun grupların kendi aralarındaki örnekleri arasındaki uyumsuzluktur. Bu skorlama histolojik bulgular ile korele edilecektir.

4.6 Gen ifadelenme çalışmaları

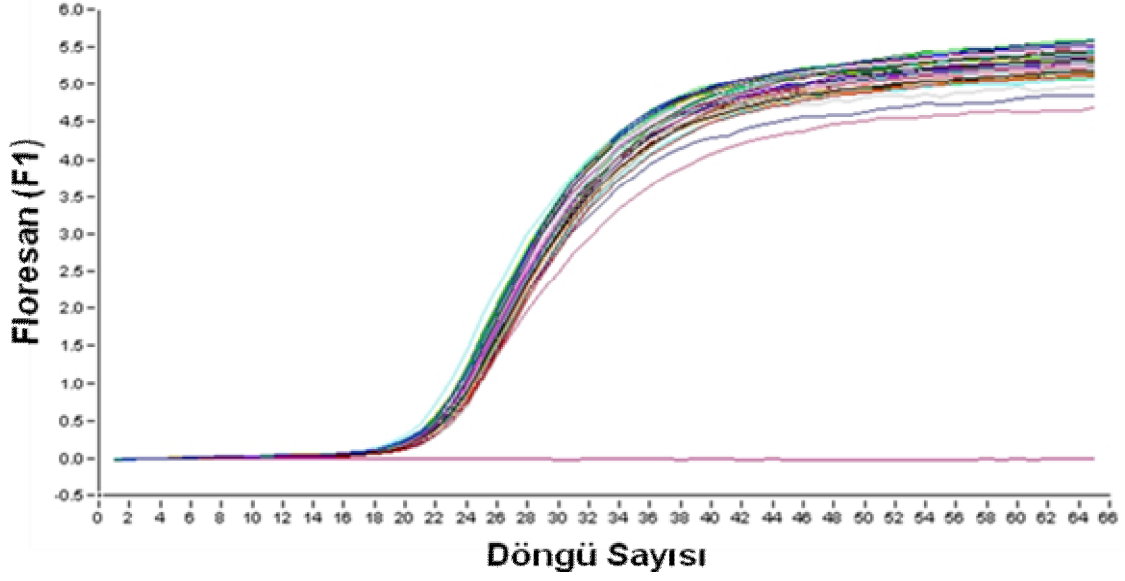
Hayvan deneyleri ile elde edilen sonuçlar ile yapılan histolojik ve radyolojik incelemeler ile birlikte ilişkilendirilmesi ve tez kapsamında genetik olarak modifiye edilen hücrelerin BMP-7 ifadesi ile sağladığı etkinin incelenmesi amacıyla erken dönem gen ifadelenmesi çalışması yapılmıştır. Bu amaçla kıkırdak gelişimi ve ECM yapısı için önemli olan temel genler seçilmiştir. Bunlar temel olarak; Kolajen Tip I (COL Tip I) ; Kolajen Tip II (COL Tip II), kıkırdak ECM proteini Aggrecan, BMP-7 ve kontrol amacı ile bir housekeeping gen olan (tüm canlı hücrelerde ifade olan) GAPDH olarak ifade edilebilir.

Erken dönem gen ifadelenme çalışmaları için 3. 7. 14 ve 30.günler zaman olarak seçilmiştir. Sonuçlar normal primer kıkırdak hücreleri ve transfekte hücreler ile kontrol grubu olmak üzere, ayrı ayrı gruplar, kendi aralarında ilgili genlere göre zamansal, ve gruplar kendi aralarında gen ifadesi düzeylerine göre incelenmiş ve analiz edilmişleridir. Elde edilen sonuçlar kantitatif olarak değerlendirilmiştir.

4.6.1. Gen İfade Düzeylerinin Kantitatif Değerlendirilmesi

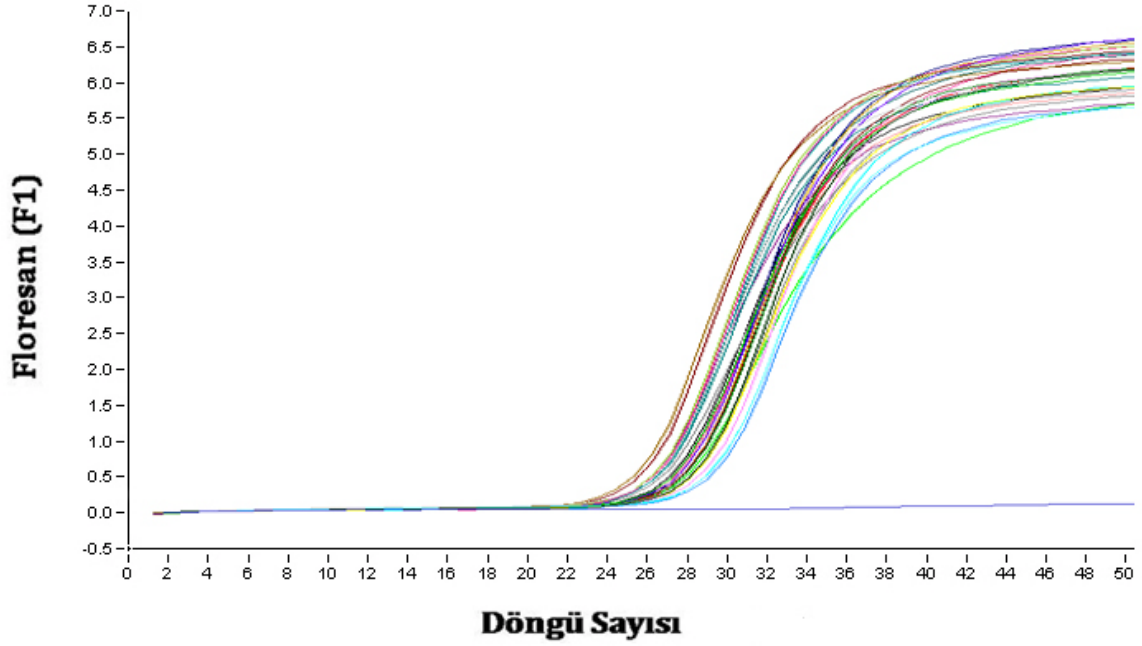
Aggrecan, BMP-7, Col Tip I ve Col Tip II genlerinin ifade düzeyinin kantitatif değerlendirilmesi için Light Cycler 480 cihazı kullanılmıştır. Tavşan kıkırdak dokularından elde edilen Aggrecan, BMP-7, COL Tip I ve COL Tip II ve bu genlerin ifadelenmesini normalize etmek için GAPDH genlerine özgül primerler ve UPL LNA problemleri kullanılarak çalışılmıştır.

Gen ifadelenmesinin Pfaffl matematiksel yöntemi ile hesaplanabilmesi için gerekli olan GAPDH geninin mRNA düzeyinde ifadelenmesini kantitatif olarak gösteren Real-Time PCR tepkimesine ait amplifikasyon eğrisi Şekil 4.19 'da gösterilmiştir.



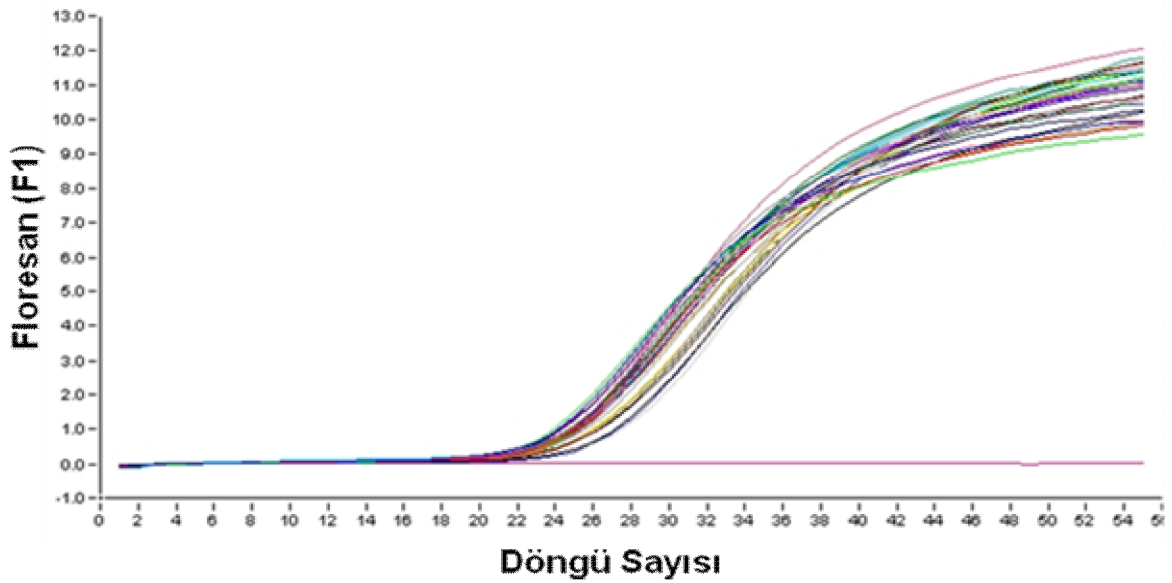
Şekil 4.19 GAPDH geninin mRNA düzeyinde ifadesini kantitatif olarak gösteren amplifikasyon eğrileri. GAPDH geninin Real-Time PCR tepkimesine ait Cp değerleri yatay ekseninde yer almaktadır. Dikey ekseninde floresan sinyal izlenmektedir.

Aggrecan geninin mRNA düzeyinde ifadesini kantitatif olarak gösteren Real-Time PCR tepkimesine ait amplifikasyon eğrisi Şekil 4.20’de gösterilmiştir.



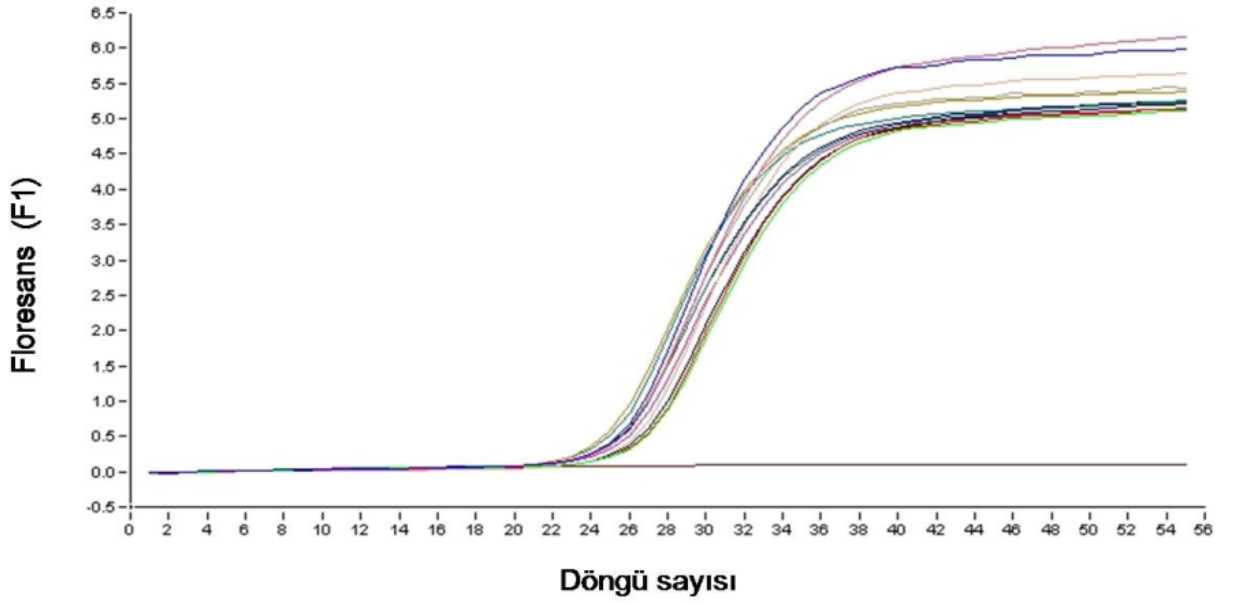
Şekil 4.20 Aggreca geninin mRNA düzeyinde ifadesini kantitatif olarak gösteren amplifikasyon eğrileri. Aggreca geninin Real-Time PCR tepkimesine ait Cp değerleri yatay ekseninde yer almaktadır. Dikey ekseninde floresan sinyal izlenmektedir.

BMP-7 geninin mRNA düzeyinde ifadesini kantitatif olarak gösteren Real-Time PCR tepkimesine ait amplifikasyon eğrisi Şekil 4.21’de gösterilmiştir.



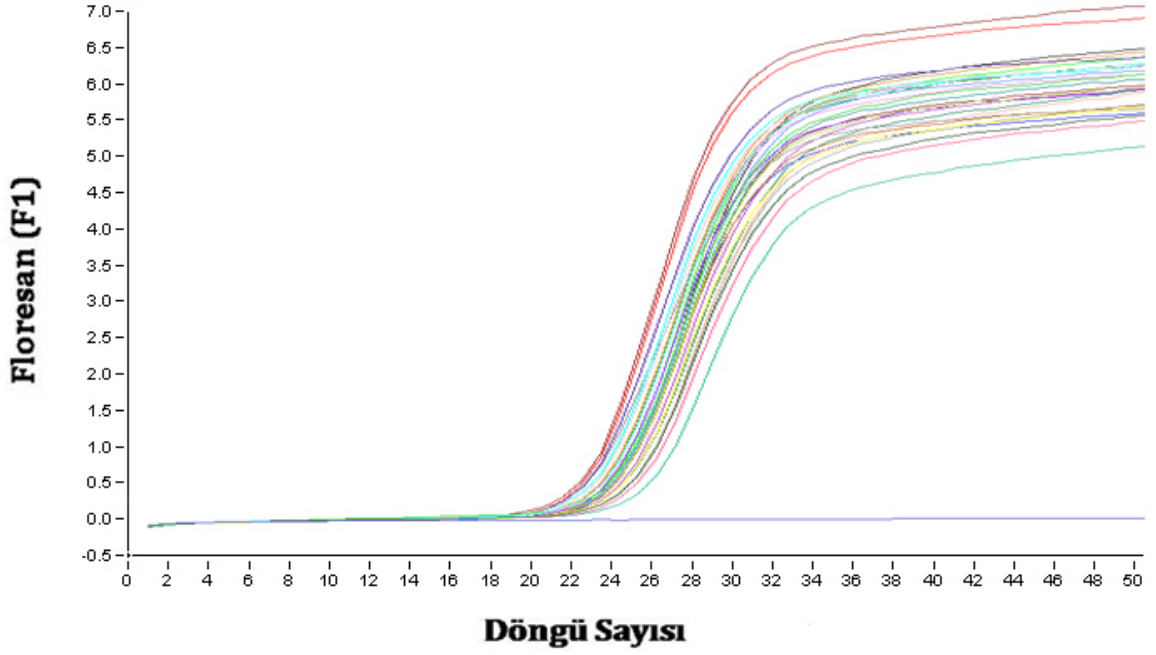
Şekil 4.21 BMP-7 geninin mRNA düzeyinde ifadesini kantitatif olarak gösteren amplifikasyon eğrileri. BMP-7 geninin Real Time PCR tepkimesine ait Cp değerleri yatay ekseninde yer almaktadır. Dikey ekseninde floresan sinyal izlenmektedir.

Col Tip I geninin mRNA düzeyinde ifadesini kantitatif olarak gösteren Real-Time PCR tepkimesine ait amplifikasyon eğrisi Şekil 4.22’de gösterilmiştir.



Şekil 4.22 Col Tip I geninin mRNA düzeyinde ifadesini kantitatif olarak gösteren amplifikasyon eğrileri. Col Tip I geninin Real Time PCR tepkimesine ait Cp değerleri yatay ekseninde yer almaktadır. Dikey ekseninde floresan sinyal izlenmektedir.

Col Tip II geninin mRNA düzeyinde ifadesini kantitatif olarak gösteren Real-Time PCR tepkimesine ait amplifikasyon eğrisi Şekil 4.23’de gösterilmiştir.



Şekil 4.23 Col Tip II geninin mRNA düzeyinde ifadesini kantitatif olarak gösteren amplifikasyon eğrileri. Col Tip II geninin Real Time PCR tepkimesine ait Cp değerleri yatay ekseninde yer almaktadır. Dikey ekseninde floresan sinyal izlenmektedir.

Göreceli gen ifadesi sonuçları REST programı kullanılarak “Pfaffl” matematiksel yöntemi ile hesaplanmıştır. Pfaffl eşitliği aşağıda belirtilmiştir [Pfaffl 2002].

$$R = \frac{E^{(\text{hedef}) \Delta C_t (\text{kontrol- hasta})}}{E^{(\text{referans}) \Delta C_t (\text{kontrol- hasta})}}$$

Eşitlikte belirtilen Ct, tepkime sırasında oluşan flüoresans sinyalin eşik değeri geçtiği andaki döngü sayısını ifade etmektedir. Ct değeri tepkimenin başında mevcut olan mRNA (cDNA) miktarı ile ters orantılıdır. ΔC_t değeri ise kontrol ile örneklerin Ct değerleri arasındaki farkı göstermektedir. Eşitlikte belirtilen E, PCR etkinliğini, eşitlikte elde edilen R ise oranını göstermektedir [Walker 2002].

4.6.2 Gen İfade Düzeylerinin Karşılaştırması

Bir önceki bölümde şekillerde görülen Real-Time PCR değerleri floresan ışığa ve döngü sayısı ile ifade edilen bir grafik vermektedirler. Bu grafikler gen ifadelerini gösteren basit Real Time PCR analiz sonucudur. Real Time PCR'da primerlerin ilgili gen dizileri ile bağlanması temeli klasik PCR'da olduğu gibi ilgili genin (ya da örneğin) ortamdaki konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Yani; temel olarak bir gen (örnek) ortamda ne kadar fazla bulunursa eşleşme olasılığı o kadar fazladır ki bu da eşleşmenin erken ışığa yapması anlamına gelir [Dorak 2006]. Bu temel alındığında gen ifadenmesinin zamansal ve grupsal incelenmesi ile ilgili ortaya çıkan grafikler Şekil 4.24 ; 4.25 ; 4,26 ; 4.27 ; 4.28 ve Şekil 4.29'da verilmiştir. İfadeleme düzeylerinin karşılaştırılması QIAGEN-REST-2009 (Relative Expression Software Tool) analiz programında gerçekleştirilmiştir. Bu yazılım kullanılarak ilgili gen ifadenmeleri 2 gen düzeyinde yapılabilmektedir. Bu nedenle yapılan 2'li analizler kullanılarak aşağıdaki sonuçlara ulaşılmıştır. Gen ifadenme düzeyleri ile ilgili çizelgeler ve istatistik değerleri Ek F'de ve özet formu Çizelge 4.2 ve Çizelge 4.3'de verilmiştir.

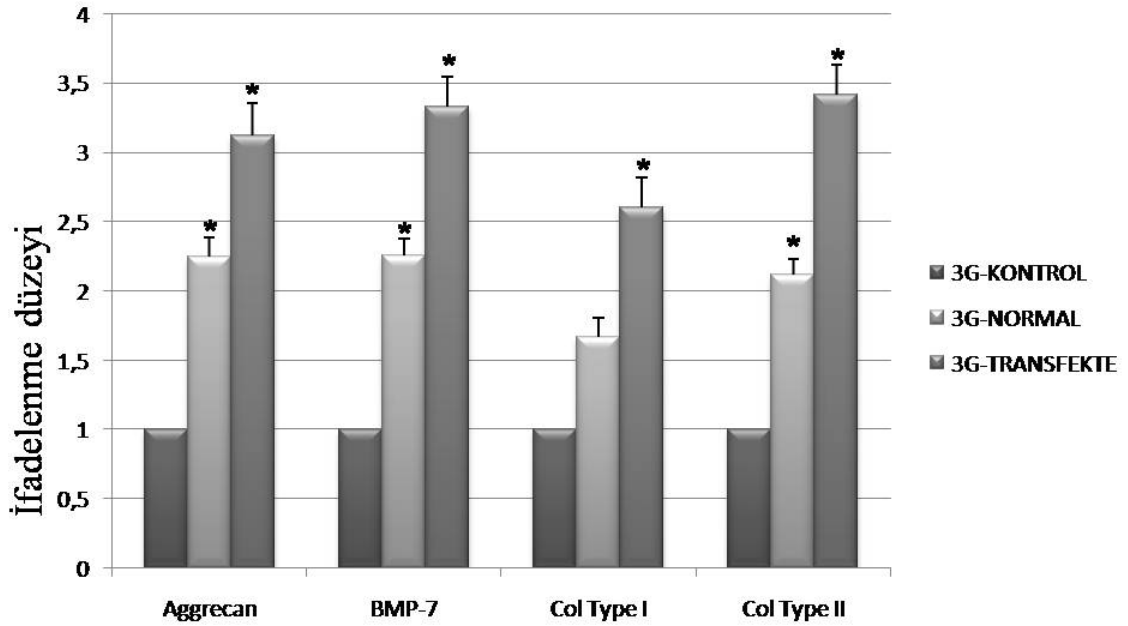
Çizelge 4.2 3., 7., 14, ve 30. günlerdeki Aggrecan, BMP-7, Col Tip I ve Col Tip II gen ifadenmelerinin Normal gruplar arasındaki istatistiksel analizi

Gen	3. Gün		7. Gün		14. Gün		30. Gün	
	İfadeleme	P değeri	İfadeleme	P değeri	İfadeleme	P değeri	İfadeleme	P değeri
GAPDH	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
Aggrecan	1,000	1,000	2,698	0,0001	3,065	0,0001	3,002	0,029
BMP-7	1,000	1,000	2,209	0,0001	3,605	0,034	3,38	0,037
Col Tip I	1,000	1,000	1,533	0,067	2,124	0,049	2,11	0,0001
Col Tip II	1,000	1,000	3,205	0,0001	4,845	0,0001	4,731	0,0001

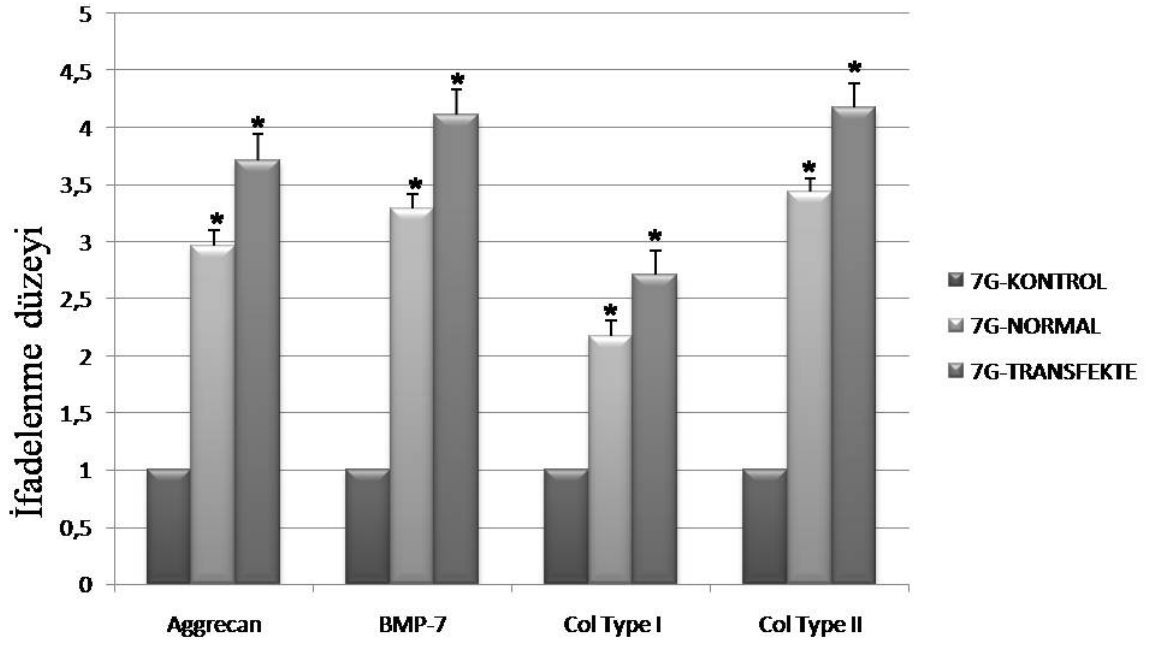
Çizelge 4.3 3., 7., 14, ve 30. günlerdeki Aggrecan, BMP-7, Col Tip I ve Col Tip II gen ifadelenmelerinin Transfekte gruplar arasındaki istatistiksel analizi

Gen	3. Gün		7. Gün		14. Gün		30. Gün	
	İfadelenme	P değeri	İfadelenme	P değeri	İfadelenme	P değeri	İfadelenme	P değeri
GAPDH	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
Aggrecan	1,000	1,000	3,9	0,0001	5,339	0,0001	5,302	0,0001
BMP-7	1,000	1,000	3,655	0,0001	5,116	0,0001	4,97	0,0001
Col Tip I	1,000	1,000	2,261	0,043	3,06	0,0001	3,103	0,0001
Col Tip II	1,000	1,000	3,782	0,0001	5,084	0,0001	5,141	0,0001

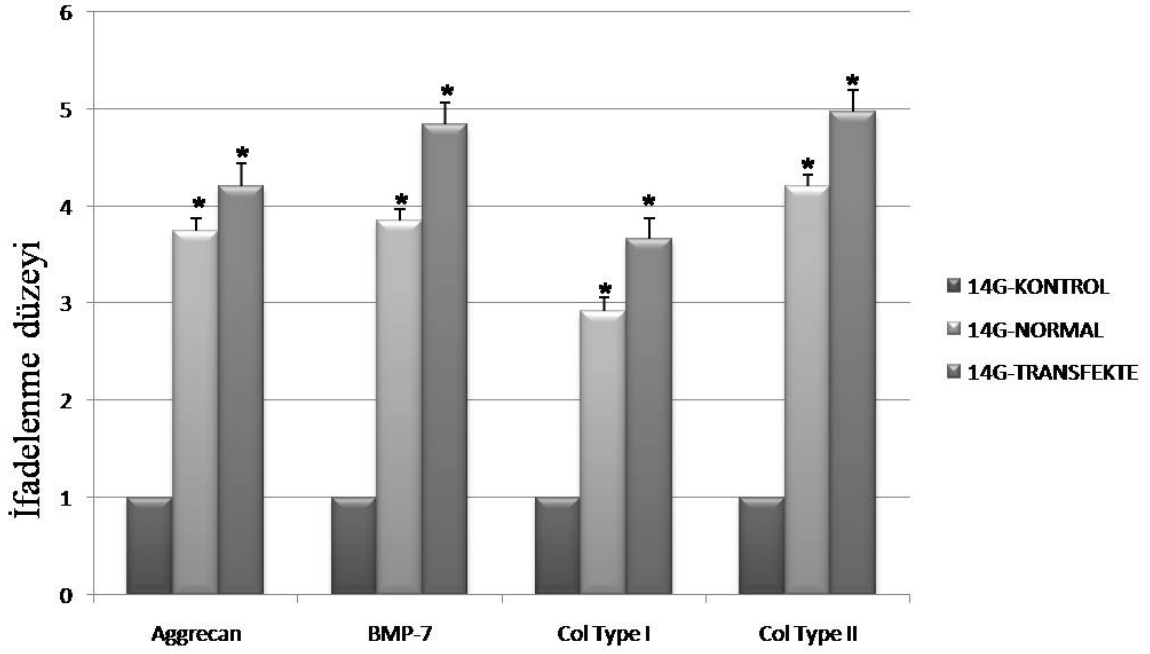
Gruplar zamansal olarak incelendiğinde;



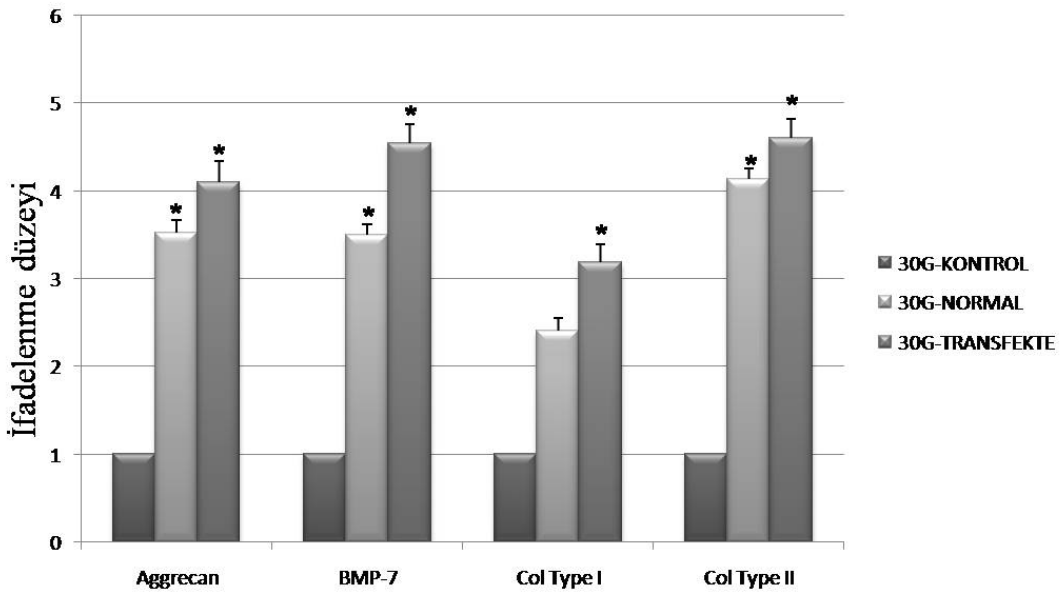
Şekil 4.24 Tavşan kıkırdak dokusunda deneysel uygulamadan sonra 3. gündeki Aggrecan, BMP-7, Col Tip I ve Col Tip II genlerinin mRNA düzeylerindeki değişiklik. Hedef genlerin ifade düzeyleri GAPDH mRNA ifade düzeyi temel alınarak normalize edilmiştir. *; $p < 0.05$. “y eksenini: gen ifadelenme değerleri”.



Şekil 4.25 Tavşan kıkırdak dokusunda deneysel uygulamadan sonra 7. gündeki Aggrecan, BMP-7, Col Tip I ve Col Tip II genlerinin mRNA düzeylerindeki değişiklik. Hedef genlerin ifade düzeyleri GAPDH mRNA ifade düzeyi temel alınarak normalize edilmiştir. *; $p < 0.05$. “y eksen: gen ifadenme değerleri”.

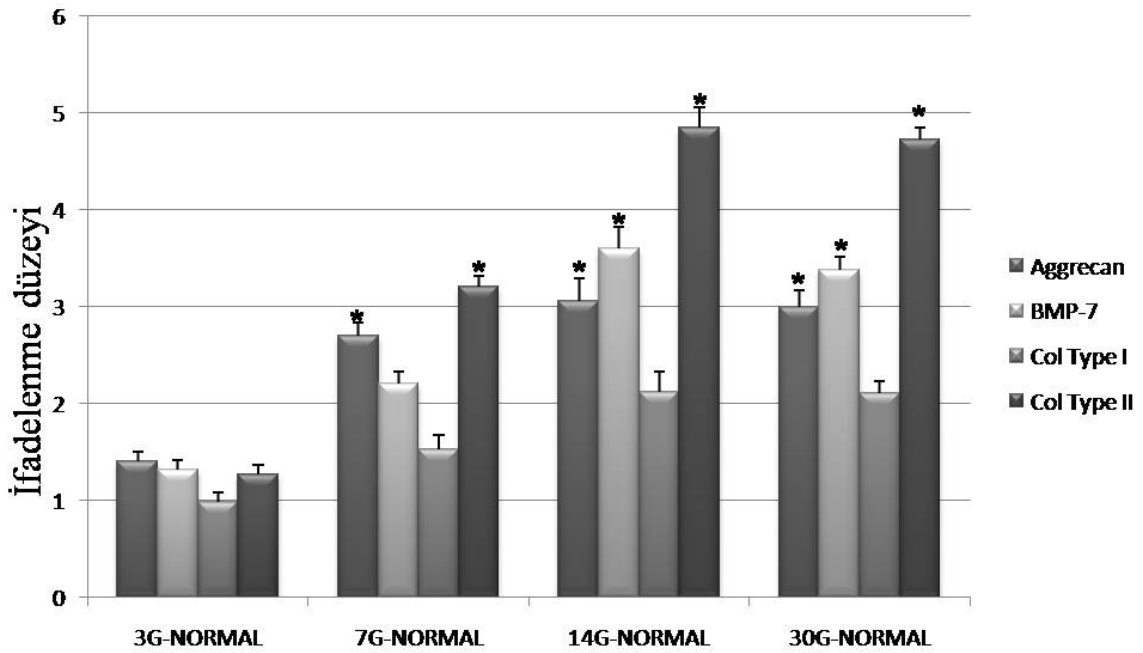


Şekil 4.26 Tavşan kıkırdak dokusunda deneysel uygulamadan sonra 14. gündeki Aggrecan, BMP-7, Col Tip I ve Col Tip II genlerinin mRNA düzeylerindeki değişiklik. Hedef genlerin ifade düzeyleri GAPDH mRNA ifade düzeyi temel alınarak normalize edilmiştir. *; $p < 0.05$. “y eksen: gen ifadenme değerleri”.

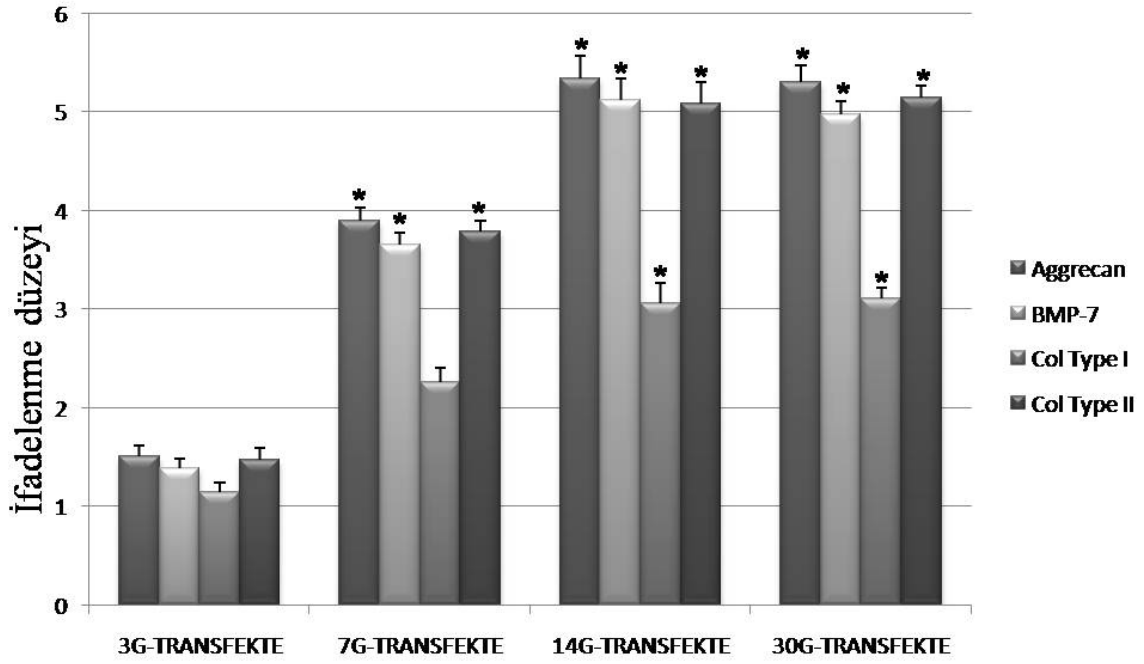


Şekil 4.27 Tavşan kıkırdak dokusunda deneysel uygulamadan sonra 30. gündeki Aggrecan, BMP-7, Col Tip I ve Col Tip II genlerinin mRNA düzeylerindeki değişiklik. Hedef genlerin ifade düzeyleri GAPDH mRNA ifade düzeyi temel alınarak normalize edilmiştir. *; $p < 0.05$. “y eksen: gen ifadenenme değerleri”.

Gruplar kendi aralarında ilgili genlere göre incelendiğinde;



Şekil 4.28 Tavşan kıkırdak dokusunda deneysel uygulamadan sonra normal hücreli dokularının 3., 7., 14. ve 30. günler arasındaki Aggrecan, BMP-7, Col Tip I ve Col Tip II genlerinin mRNA düzeylerindeki değişiklik. Hedef genlerin ifade düzeyleri GAPDH mRNA ifade düzeyi temel alınarak normalize edilmiştir. *; $p < 0.05$. “y eksen: gen ifadenenme değerleri”.



Şekil 4.29 Tavşan kıkırdak dokusunda deneysel uygulamadan sonra transfekte hücreli dokularının 3., 7., 14. ve 30. günler arasındaki Aggrecan, BMP-7, Col Tip I ve Col Tip II genlerinin mRNA düzeylerindeki değişiklik. Hedef genlerin ifade düzeyleri GAPDH mRNA ifade düzeyi temel alınarak normalize edilmiştir. *; $p < 0.05$. “y eksenini: gen ifadenleme değerleri”.

İlgili grafikler kendi aralarında ve gruplara bağlı olarak incelendiğinde kontrole göre ifadelenme düzeyleri hakkında şu görüşler ortaya konabilir.

-Tüm incelenen genlerin ifadelenmesi kontrole göre bakıldığında normal hücreli ve transfekte hücreleri gruplarda gerçekleşmiştir. Bu ifadelenme transfekte grupta normal gruba göre daha anlamlıdır.

- Tüm gen ifadelenmeleri genel olarak zamana göre bir artış göstermektedir. Bu gen ifadelenmeleri 14.gün en yüksek seviyelere ulaşmış 30. günde genel olarak ifadelenme yatay kalmıştır.

- En yüksek ifadelenme normal ve transfekte hücrelerde Col tip II ve BMP 7'de görülmekle birlikte transfekte hücrelerdeki ifadelenme normal hücrelere göre daha fazladır ve anlamlıdır.

- Normal hücreler ile Transfekte hücreler BMP-7 gen ifadelenmesi bakımından karşılaştırıldığında gen ifadelenmesinin transfekte hücrelerde daha yüksek olduğu söylenebilir.

- Kontrole göre normalize edilmiş sonuçlara göre, genlerin ifadelenme değerleri transfekte grupta normale göre daha yüksektir.

- Col Tip I sentezi normal ve transfekte hücrelerde de ifade olmuştur. Kıkırdak hasarının yenilenmesinin kemik yolağı üzerinden geçtiği düşünülürse hasar bölgesinde Col Tip I ifadesi normaldir. Örneklerdeki görülen kalsifikasyonlar Col Tip I ifadesi ile ilişkilendirilebilir.

Bu çalışmalarda kontrol grubu ve doku iskelesi grubu erken dönem gen ekspresyonu çalışmalarına dahil edilmemişlerdir. Bunun nedeni gen ifadelenmesi için seçilen sürenin oldukça kısa olmasıdır. 3; 7; 14; ve 30.günler analiz için seçilmiştir. Fakat hiç hücre ekilmeyen veya enjekte edilmeyen defekt ortamında 3 günün sonunda analiz için yeterli hücre bulunması olanaksızdır. Yetersiz seviyedeki hücreden elde edilecek mRNA düzeylerine göre yapılacak bir Real Time PCR sonuçları ise anlamsız çıkacaktır.

4.7 Histolojik Çalışmalar

Tez kapsamında hayvan deneyleri sonucunda elde edilen dokulardaki kırık iyileşme sonuçları literatürler [Pineda 1992, Lohan 2011] benzer şekilde Pineda ve Lohan skorlama sistemine göre yapılmıştır. İstatistik çalışmalarına ait tablo değerleri ise Ek-G ve Ek-H'de verilmişlerdir.

İncelen tüm gruplarda defekt alanında değişen sayılarda kırık adası ve pekçoğunda da kalsifikasyon (kemikleşme) odaklarına rastlanmıştır. Hücre uygulanan her iki doku iskelesi grubunda da diğer gruplara göre Weigert ile işaretli elastik kırık adalarına daha çok sayıda rastlanılmıştır. Tek başına doku iskelesi uygulanan gruplarla defektin boş bırakıldığı kontrol gruplarında fibröz kırık oluşumuna daha sıklıkla rastlanılmıştır. Doku iskelesi biyouyumluydu ve kırık rejenerasyonu için uygun bir rehberlik sağlamıştır. Ancak 4 ayın sonunda kritik defekt boyunca her yerde elastik kırık oluşumunu sağlayamamıştır. Oluşan yeni kırık dokusu homojen değildir ve tüm gruplarda yer yer fibröz bağ dokusu ile devam etmiştir (Şekil 4.30).

Birinci ayda normal ($p=0.023$ and $p=0.00$) ve transfekte hücre ile doku iskelesi ($p=0.00$ and $p=0.00$) uygulanan gruplar kontrole göre anlamlı biçimde daha yüksek Pineda ve Lohan iyileşme skorları almışlardır. Transfekte ($p=0.00$ Pineda ve $p=0.00$ Lohan) ve normal hücreyle doku iskelesi ($p=0.03$ Lohan) uygulanan gruplar birinci ayda tek başına doku iskelesi uygulanan gruba göre anlamlı biçimde daha iyi skorlar almıştır.

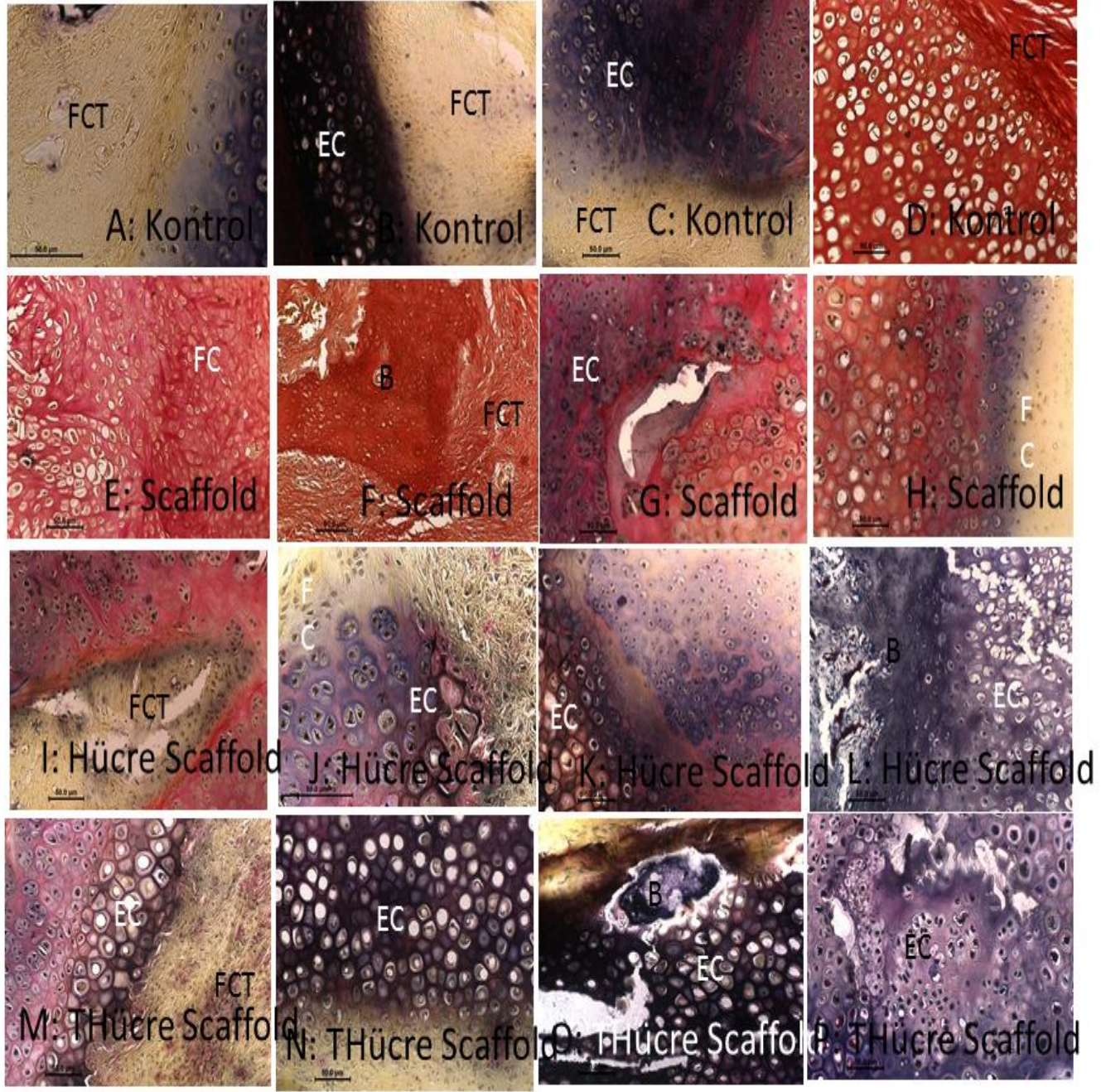
Transfekte hücre doku iskelesi uygulanan ($p=0.00$ and $p=0.00$) grup ikinci ayda kontrole göre anlamlı biçimde daha yüksek Pineda ve Lohan iyileşme skorları almışlardır. Transfekte hücre doku iskelesi uygulanan grup ikinci ayda (Lohan $p=0.00$). tek başına doku iskelesi grubuna göre daha iyi iyileşmiştir.

Üçüncü ayda Lohana göre transfekte hücre doku iskelesi uygulanan grup kontrole göre (Lohan $p=0.003$); Pinedaya göre normal hücre uygulanan grup kontrole göre ($p=0.007$) anlamlı biçimde daha iyi iyileşmişti.

Dördüncü ayda; Pineda ve Lohana göre transfekte hücre ve doku iskelesi uygulanan grup ($p=0.001$ and $p=0.002$) kontrole göre daha iyi iyileşmiştir. Lohana

göre transfekte hücre-doku iskelesi grubu 4 ayda tek başına doku iskelesi uygulanan gruba göre anlamlı bir biçimde daha iyi skorlar almıştır ($p=0.012$).

İncelen hiçbir zaman diliminde (1-4 ay) tek başına doku iskelesi uygulaması kritik büyüklükteki kırıldak defekt iyileşmesini kontrole göre anlamlı bir biçimde iyileştirmemiştir.



1. ay

2. ay

3. ay

4. ay

Şekil 4.30: Aylara göre tüm gruplarda kıkırdak dokusunda histolojik boyama bulguları. (Weigert elastik fibrilleri siyah boyanmaktadır. . EC: Elastik kıkırdak, FC: Fibröz kıkırdak, FCT: Fibröz bağ dokusu, B: Kemik.)

Tüm çalışmalar birlikte değerlendirilecek olursa, yapılan çalışmalarda gruplar histolojik, erken dönem gen ekspresyonu ve radyolojik incelemeler ışığında; Transfekte hücreler ve doku iskelesi kombinasyonu kulak kıkırdak bölgesinde yaratılan kıkırdak hasarının tamirinde ve elastik kıkırdak rejenerasyonda en ileri ve en iyi ortamı sağladığı sonucuna varılmaktadır.

Tez kapsamında yapılan çalışmayı büyüme faktörü etkisinde kulak kıkırdak hasarlarının iyileşmesi olarak genel bir perspektife indirger isek, yapılan çalışmaya benzer literatürde birkaç çalışma mevcuttur. Literatürdeki diğer çalışmalar bir hiyalin kıkırdak olan artiküler / eklem kıkırdak hasarı iyileşmesi üzerinedir. Özgenel ve ark. yaptıkları çalışmada [Ozgenel 2004] tavşan kulak kıkırdağında 20x20mm²'lik bir defekt alanındaki kıkırdak gelişimini 8 haftalık (2ay) bir sürede incelemişlerdir. Doğrudan büyüme faktörü kullanımı yerine hyaluronik asit ve diğer büyüme faktörlerince zengin, insan amniyotik sıvısının mikroçevrede ve iyileşmede yaratacağı etkiyi temel almışlardır. 2 aylık sonuçlarda ince tabakalı bir yeni kıkırdak yapısı ortaya koymuşlardır fakat elastik belirteçler hakkında çalışma yapılmamıştır. Bos ve ark. yaptıkları çalışmada [Bos 2001] tavşan kulağından oluşturdukları 6 mm'lik hasar alanında oluşan büyüme faktörü etkilerini 28 günlük çalışma ile incelemişlerdir. Bos ve ark. buradaki amacı kıkırdak iyileşmesinde erken dönemde ortaya çıkan büyüme faktörü ve matrix değişimlerini ortaya koymuşlardır. Yaptıkları çalışmada TGF- β 1 ve TGF- β 3 büyüme faktörlerinin 3 .günden itibaren anlamlı şekilde arttığını ortaya koymuşlardır. TGF- β 1 'in kolajen sentezi (ağırlıklı olarak kolajen tip I) üzerindeki etkileri göz alındığında [Horstmeyer 2005] tez kapsamında erken dönemde ortaya çıkan kolajen Tip I sentezi daha kolay açıklanabilir.

Bu tez çalışmaları sonucunda özellikle genetik modifiye edilen kıkırdak hücrelerinin kullanıldığı grupta diğer gruplara göre daha iyi bir kıkırdak gelişimi ile birlikte daha iyi ve daha homojen bir elastik lif yapılanması ortaya çıkmıştır.

Tez çalışması sonucunda ortaya çıkan sonuç ve literatürdeki kıkırdak çalışmaları da dikkate alınarak üzerinde durulması gereken birkaç olgu vardır. Bunlardan en önemlisi plazmid modelleme teknolojisinin gelişmesi ile hücrelerin büyüme faktörleri ile sürekli beslenmesi yerine yenilenme için gerekli olduğu anlarda büyüme faktörlerinin yeterli derecede sentezinin sağlanmasıdır. Burada önemli

olan diğer bir olgu ise plazmidlerin hücre içerisine aktarım tekniklerinin geliştirilmesidir. Transfeksiyon sonucunda sadece transfekte hücrelerin toplanarak kullanılması ya da hücrelerin in-vivo olarak transfekte edildikten sonra ortamdaki doku iskelesine yönlendirilmesi sonucu daha kısa sürede daha iyi doku iyileşmesi sonucu alınabilir.

5. SONUÇLAR

- Tez kapsamındaki çalışmalarda; hücreleri genetik olarak modifiye etmek için başvurulan yöntem olan transfeksiyon için bir ticari kit olan Turbofect, kullanılmıştır.
- Tez kapsamındaki çalışmalarda; genetik modifikasyon için İnsan Kemik Morfojenik Proteini 7'yi (hBMP7) kodlayan plazmid modellemesi gerçekleştirilmiştir.
- Tez kapsamındaki çalışmalarda; Tavşan kulak kıkırdak dokusundan steril ortamda kıkırdak hücresi izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen primer kıkırdak hücreleri in-vitro ve in-vivo çalışmalarda kullanılmıştır.
- Tez kapsamındaki çalışmalarda; hücrelerin matriks olarak kullanılacağı, oldukça biyoyumlu Jelatin/Okside-Dekstran doku iskeleleri kriyojelasyon tekniği ile hazırlanmıştır.
- Tez kapsamındaki çalışmalarda hazırlanan Jelatin/Okside-Dekstran doku iskeleleri için yüksek Okside-Dekstran ve Normal Okside-Dekstran olmak üzere iki farklı konsantrasyonda doku iskelesi hazırlanmıştır.
- Tez kapsamındaki çalışmalarda hazırlanan Jelatin/Okside-Dekstran doku iskelelerinin şişme özellikleri, MTT ile biyoyumluluk özellikleri, enzimli (lizozim) ve enzimsiz ortamda aylara göre biyodegradasyon profilleri incelenmiştir.
- Tez kapsamındaki çalışmalarda hazırlanan Jelatin/Okside-Dekstran doku iskelelerinin gözenek boyutları, yapı ve dağılımları Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM) kullanılarak incelenmiştir. Yapılan analiz ve incelemeler sonucu yüksek okside-dekstran içeren jelatin kriyojellerin tez kapsamında in-vitro hücre kültürü ve in-vivo hayvan çalışmaları kullanımasına karar verilmiştir.
- Tez kapsamındaki çalışmalarda hazırlanan Jelatin/Okside-Dekstran doku iskeleleri ile izole edilen primer kıkırdak hücrelerinin in-vitro kültür çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Hücrelerin doku iskelesi ile etkileşimleri ve hücre-hücre

etkileşimleri Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM) ve Konfokal Mikroskop kullanılarak incelenmiştir.

- Tez kapsamındaki çalışmalarda hazırlanan Jelatin/Okside-Dekstran doku iskelelerine ekilen normal primer kıkırdak hücrelerinden ve genetik modifiye primer kıkırdak hücrelerinden salınan BMP7 miktarları günlere bağlı olarak (3.-14.gün) incelenmiştir.
- Tez kapsamındaki çalışmalarda, *in-vivo* hayvan modeli olarak Tavşan (New Zealand White) kulak modeli seçilmiştir.
- Tez kapsamındaki *in-vivo* çalışmalarda toplam 58 hayvan incelenmiştir.
- Tez kapsamındaki *in-vivo* çalışmalar sadece kontrol, sadece doku iskelesi, doku iskelesi ve normal primer kıkırdak hücreleri; doku iskelesi ve genetik modifiye primer kıkırdak hücreleri olmak üzere 4 grupta incelenmiştir.
- Tez kapsamındaki *in-vivo* çalışmalarda tavşan kulak kıkırdağında 15x15mm² lik bir alanda yaratılan kıkırdak hasarının iyileşmesi gruplara bağlı olarak 4 ay boyunca, her ay örnek alınacak şekilde incelenmiştir.
- *In-vivo* çalışmaların sonuçları erken dönem gen ifadenmesi, histolojik ve radyolojik olarak incelenmiştir.
- Radyolojik inceleme sonucunda tüm gruplarda görülen aylara bağlı olarak az ya da çok bir kalsifikasyon gözlemlenmiştir. Bu kalsifikasyon sonucu; gruplara ve aylara bağlı olarak skorlanmıştır.
- Erken dönem gen ifadenmesi çalışmaları için normal primer hücrelerin kullanıldığı ile genetik modifiye primer hücrelerin kullanıldığı gruplar temel alınmıştır.
- Erken dönem gen ifadenmesi çalışmalarında 3, 7, 14 ,21 ve 30.günler zaman olarak seçilmiştir.
- Erken dönem gen ifadenmesi çalışmalarında Aggrecan, BMP7, COL Tip I, COL Tip II ve GAPDH (normalize kontrol) sentez gen dizilimleri seçilmiştir.

- Erken dönem gen ifadenmesi çalışmaları için belirlenen zamanlarda, dokular alınıp, dokudan RNA'lar izole edilmiştir. İzole edilen RNA'lardan cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen cDNA'lar önceden karar verilen primer be proplar kullanılarak Real- Time PCR programında analiz edilmiştir.
- Elde edilen sonuçlar REST programı kullanılarak, gruplar kendi aralarında gen ifadenme düzeylerine göre ve genler kendi aralarında zaman bağılı olarak incelenmiştir.
- Sonuçlar bir house-keeping gen olan GAPDH'a göre normalize edilmiştir ve ifadenme düzeyleri ortaya konulmuştur.
- Her iki grupta da zaman bağılı olarak ifadenme düzeylerinde bir artış bulunmaktadır.
- İnceleme sonucunda transfekte hücreli (genetik modifiye) grupta normal hücreli gruba göre ifadenme düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmaktadır.
- Transfekte hücreli grupta zaman bağılı olarak BMP7 sentezi ve buna bağılı olarak Aggrecan, Kolajen Tip II sentezleri belirgin şekilde artmıştır.
- İncelenen her iki grupta da ilk zamanlarda istatistiksel olarak anlamlı olmayan Kolajen Tip I varlığı tespit edilmiştir.
- Histolojik incelemelerde dokular Weigart Elastik boyası ile boyanmış ve aylara bağılı olarak yeni kıkırdak oluşumları incelenmiştir.
- Yeni kıkırdak oluşumu gruplara bağılı olarak yarı-nicel bir analiz olan Lohan ve Pineda histolojik skorlama sistemleri kullanılarak skorlanmıştır. Elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak incelenmiştir.
- Elde edilen Lohan ve Pineda histolojik skora göre ve histolojik kesit boyama bulgularına göre hücreli gruplardaki kıkırdak iyileşmesi 4 aylık gözlem sonucunda diğer hücresiz gruplara göre daha iyidir ve elastik kıkırdak adalarına rastlanmıştır. Diğer hücresiz gruplarda ise daha ziyade fibröz kıkırdak oluşumu söz konusudur.

- Her 4 grupta da ,4 ay sonunda, incelenen defekt alanında elastik liflerin homojen dağılmadığı sonucuna varılmıştır.
- Elde edilen skorlama sonuçları, histolojik kesit bulguları dikkate alındığında transfekte hücreli grupta diğer tüm gruplardan daha iyi bir kıkırdak iyileşmesi olduğu söylenebilir.
- Sonuç olarak tez kapsamında kulak kıkırdak bölgesinde oluşturulan hasarın iyileştirilmesi için hücrelerin genetik modifikasyonunu içeren, böylelikle hücrelerin belirli bir süre normal metabolizmalarına ek BMP7 sentezi sağlayacak ve kıkırdak iyileşme sürecini hızlandıracak, uygun kıkırdak gelişimini sağlayacak son derece biyouyumlu Jelatin/Okside-Dekstran kriyojenel doku iskelelerinin kullanıldığı bir doku mühendisliği çalışması gerçekleştirilmiş, zamana bağlı olarak hasar bölgesinde kıkırdak iyileşmesi ve yeni kıkırdak oluşumu gösterilmiş ve iyileşme protokolleri ortaya konulmuştur.

KAYNAKLAR DİZİNİ

Akay, T., Genel Histoloji, Palme Yayınları, 2006, ISDN:975-7477-92-3, Ankara, 262s.

Alberts B., et al. 4th Ed. Hücrenin Moleküler Biyolojisi, Garland Science P. ISBN:978-9944-252-22-5. Türkiye Bilimler Akademisi Çeviri Yayınları, 2010 Ankara, 1530s.

Anderson, W.F., Human gene therapy, Nature, 1998 392: 25-30.

Ardvisson, P., Plieva, F., Lozinsky, V., Galaev, I.Y., Mattiasson, B., 2003, Direct chromatographic capture of enzyme from crude homogenate using immobilized metal affinity chromatography on a continuous supermacroporous adsorbent, Journal of Chromatography A. 2003 , 986 :275–290.

Bessa, P.C., Casal M., Reis R.L, Bone morphogenetic proteins in tissue engineering: the road from the laboratory to the clinic, part I (basic concepts) ; J Tissue Eng Regen Med, 2008; 2: 1–13.

Bian., et. al., Enhanced MSC chondrogenesis following delivery of TGF- β 3 from alginate microspheres within hyaluronic acid hydrogels in vitro and in vivo, Biomaterials, 2011.

Blaese, M.R., et al., T Lymphocyte-Directed Gene Therapy for ADA– SCID: Initial Trial Results After 4 Years, Science, 1995, 270:475:480.

Bos, P.K., et. al., Growth factor expression in cartilage wound healing: temporal and spatial immunolocalization in a rabbit auricular cartilage wound model, Osteoarthritis and Cartilage, 2001, 9: 382–389.

Bölgen N., HEMA-laktat-dekstran kriyojellerin üretimi ve doku mühendisliğinde uygulamaları Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 2008 Ankara, 101s.

Broderick E.P., O'Halloran D.M., Rochev Y.A., Griffin M., Collighan R.J., Pandit A.S., Enzymatic stabilization of gelatin-based scaffolds. *J.Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* 2005, 1:37-42.

Cai, Q., Yang, J., Bei A.J, novel porous cells scaffold made of polylactide–dextran blend by combining phase-separation and particle-leaching techniques, *Biomaterials*, 2002, 23: 4483-4492.

Callis T.E, Cao D., Wang D.Z., Bone morphogenetic protein signaling modulates myocardin transactivation of cardiac genes. *Circ. Res.*, 2005, 97: 992–1000.

Carey J.C., Park A.H., Muntz H.R., . External ear. In: Stevenson RE, editor. *Human malformations and related anomalies*. Oxford; NewYork: Oxford University Press. 2006, pp 329-338.

Chang C., Lin F., Kuo, T. Z., Liu, H.C., *Cartilage Tissue Engineering, Biomed Eng Appl Basis Comm*, 2005; 17: 1-11.

Chen H, Shi S, Acosta L, et al., BMP10 is essential for maintaining cardiac growth during murine cardiogenesis, *Development*, 2004,131: 2219–2231.

Cho T.J, Gerstenfeld LC, Einhorn TA., Differential temporal expression of members of the transforming growth factor beta superfamily during murine fracture healing. *J. Bone Miner. Res.*, 2002, 17: 513–520.

Chung Y.C., Hsieh W.Y., Young T.H., Polycation/DNA complexes coated with oligonucleotides for gene delivery. *Biomaterials*. 2010, 14: 4194-203.

Deminie, C.A., Emerman, M., Incorporation of human immunodeficiency virus type 1 gag proteins into murine leukemia virus virions. *J. Virol.*, 1993, 11: 6460.

Dickson, G., Ed., Chapman and Hall, *Molecular and Cell Biology of Human Gene Therapeutics*. London, 1995.

Dorak M.T., Real Time PCR-Advanced Methods, Taylor & Francis; 1st Ed., 2006, 333syf.

Dudley, A.T., Lyons, K.M., Robertson, E.J., A requirement for bone morphogenetic protein-7 during development of the mammalian kidney and eye. *Genes Dev.* 1995, 9: 2795-807.

Evans C., Gene therapy for the regeneration of bone, *Injury.* 2011, 6: 599-604.

Fan, Z., et al. Regulation of anabolic and catabolic gene expression in normal and osteoarthritic adult human articular chondrocytes by osteogenic protein-1, *Clin. Exp. Rheumatol.*, 2004, 22: 103-6.

Farhadi J., Jaquiere C., Haug M., Pierer G., Zeilhofer H.F., Martin I., Bone and cartilage tissue engineering for facial reconstructive surgery, *IEEE Eng. Med Biol. Mag.* 2006,1: 106-9.

Fassina L, et al., Use of a gelatin cryogel as biomaterial scaffold in the differentiation process of human bone marrow stromal cells. *Conf. Proc. IEEE Eng. Med Biol. Soc.*, 2010, 2010: 247-50.

Flechtenmacher, J. et al. Recombinant human osteogenic protein 1 is a potent stimulator of the synthesis of cartilage proteoglycans and collagens by human articular chondrocytes, *Arthritis Rheum.*, 1996, 39 :1896-904.

Food and Drug Administration, FDA, 1996, Points to Consider on Plasmid DNA Vaccines For Preventive Infectious Disease Indications, December 1996, Docket No. 96N-0400, Rockville, USA, 39 p.

Frenkel SR, Di Cesare PE., Scaffolds for articular cartilage repair. *Ann Biomed Eng.*, 2004, 32:26-34.

Galaev, I.Yu., Mattiasson, B., Smart polymers and what they could do in biotechnology and medicine, *Trends in Biotechnology.*, 1999, 17: 335–340.

Ganta S, et al., A review of stimuli-responsive nanocarriers for drug and gene delivery., *J Control Release*. 2008 3: 187-204.

George J.A., Gene therapy progress and prospects: adenoviral vectors., *Gene Ther*. 2003, 4:1135-41.

Güven GU, Laçın NT, Pişkin, Monosize polycationic nanoparticles as non-viral vectors for gene transfer to HeLa cells., *J Tissue Eng Regen Med*. 2008,2-3:155-63.

Haisch A., Kläring S., Gröger A., Gebert C., Sittinger M., A tissue-engineering model for the manufacture of auricular-shaped cartilage implants. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2002, 6: 316-21.

Hall, K.B., *Bones and Cartilage: Developmental and Evolutionary Skeletal Biology*, Elsevier Academic Press,2005, ISBN:0-12-31906-06, ABD, 760s

Hamm A., et al., Efficient Transfection Method for Primary Cells, *Tissue Engineering*, 2002, 8: 235.

Hay, E., Lemonnier, J., Fromigue, O., Marie, P.J., Bone morphogenetic protein-2 promotes osteoblast apoptosis through a Smad-independent, protein kinase C-dependent signaling pathway. *J Biol Chem.*, 2001, 276: 29028-36.

Horstmeyer A, Licht C, Scherr G, Eckes B, Krieg, T., Signalling and regulation of collagen I synthesis by ET-1 and TGF-beta1., *FEBS J*. 2005, 24: 6297-309.

Heldin C.H., Miyazono K., Dijke P., TGF β signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. 1997, *Nature* 390: 465–471.

Hiraki Y., Yutani Y., Fukuya M., Takigawa M., Suzuki F., Differentiation and de-differentiation of cultured chondrocytes: increase in monomeric size of 'cartilage-specific' proteoglycans by dibutyryl cyclic AMP and complete inhibition of their synthesis by retinoic acid, *Biochem Int*. 1985, 2:267-72.

Hutmacher D.W., Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage, *Biomaterials* 2000, 21: 2529-2543.

Hyun, K.W., Han D.C., An Overview of Cartilage Tissue Engineering, *Yon. Med. Journal*, 2000, 41:766-773.

Isogai N., et al., Combined chondrocyte-copolymer implantation with slow release of basic fibroblast growth factor for tissue engineering an auricular cartilage construct. *J Biomed. Mater. Res. A*. 2005, 3: 408-18.

Israel D.I., Nove J., Kerns K.M., et al., Heterodimeric bone morphogenetic proteins show enhanced activity in vitro and in vivo. *Growth Factors*, 1996, 13: 291–300.

İbsirlioğlu, T., Gen Transferi İçin Uyarı-cevap Özellikli Polimerik Taşıyıcıların Tasarımı ve Hücre Kültürlerinde Transfeksiyonu Bilim Uzmanlığı Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 2003 Ankara, 67s.

Kaloğlu, C., Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Histoloji Embriyoloji ABD Yayınları.

Karam A.M., et al., Long-term Viability and Mechanical Behavior Following Laser Cartilage Reshaping, *Arch. Facial Plast. Surg.* 2006, 2: 105-116.

Kathuria N, Tripathi A, Kar KK, Kumar A. Synthesis and characterization of elastic and macroporous chitosan-gelatin cryogels for tissue engineering. *Acta Biomater.* 2009, 1:406-18.

Kauffmann C., et. al., Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cell-Derived Cartilage on Nanofiber-Supported Scaffolds for Microtia Repair, *Plastic & Reconstructive Surgery*, 2011, 127: 42.

Kessler E., Takahara K., Biniaminov L., et al. Bone morphogenetic protein-1: the type I procollagen C-proteinase, 1996, *Science* 271: 360–362.

Klug,W. S., Cummings, M. R., Genetik kavramlar, 2000. (çev. Prof. Dr. Cihan Öner), Palme yayıncılık, Ankara.

Knight P.G., Glister C., TGF β superfamily members and ovarian follicle development. *Reproduction*, 2006, 132: 191–206.

Kusuhara, H., et al., Tissue engineering a model for the human ear: Assessment of size, shape, morphology, and gene expression following seeding of different chondrocytes, *Wound Rep. Reg.*, 2009 17: 136–146.

Langer, R., Vacanti C., et al., *Principles of Tissue Engineering*, Third Edition, Elsevier Academic Publishing, ISBN:10-12-379615-7.

Latchman, D.S., 1994, *From Genetics to Gene Therapy*.

Laçin N.T., Utkan G.G., Kutsal T., Pişkin E., A Thermo-Sensitive NIPA-Based Copolymer and Monosize Polycationic Nanoparticle for Non-viral Gene Transfer to Smooth Muscle Cells. *J Biomater Sci. Polym. Ed.*, 2011 .

Lemmon J.C., Mc. Farland R.J., Rybicka J.M., Balce D.R., McKeown K.R., Krohn R.M., Matsunaga T.O., Yates R.M., In vitro and in vivo transfection of primary phagocytes via microbubble-mediated intraphagosomal sonoporation. *J Immunol. Methods*. 2011.

Lohan A., Marzahn U., et. al., In vitro and in vivo neo-cartilage formation by heterotopic chondrocytes seeded on PGA scaffolds, *Histochem. Cell Biol.* 2011, 1: 57-69.

Lozinsky VI, Galaev IY, Plieva FM, Savina IN, Jungvid H, Mattiasson B. Polymeric cryogels as promising materials of biotechnological interest. *Trends Biotechnol.* 2003, 10:445-51.

Luquetti D.V., et. al., Microtia-Anotia: A Global Review of Prevalence Rates, *Birth Defects Research (Part A): Clinical and Molecular Teratology*, 2011.

Luo, G., et al. BMP-7 is an inducer of nephrogenesis, and is also required for eye development and skeletal patterning. *Genes Dev.*, 1995, 9:2808-20.

Lyons, K.M., Hogan, B.L. Robertson, E.J. Co-localization of BMP 7 and BMP 2 RNAs suggests that these factors cooperatively mediate tissue interactions during murine development. *Mech. Dev.* 1995, 50: 71-83.

Marx H., Die Missbildungen des ohres. In: Denker A KO, editor. *Handbuch der Spez Path Anatomie Histologie* Berlin, Germany:Springer. 1926, p 131.

McDonald, N.Q., Hendrickson, W.A., A structural superfamily of growth factors containing a cystine knot motif. *Cell*,1993 73 :421-4.

McKay, F.W., Peckham, M.S., Badura J.M., A comprehensive clinical review of recombinant human bone morphogenetic protein-2 (INFUSE® Bone Graft), *International Orthopaedics (SICOT)*, 2007, 31:729–734.

Mitsuyasu R.T., Zack J.A., Macpherson J.L., Symonds G.P., Phase I/II Clinical Trials Using Gene-Modified Adult Hematopoietic Stem Cells for HIV: Lessons Learnt, *Stem Cells Int.* 2011; 393698.

Morille M., Passirani C., Vonarbourg A., Clavreul A., Benoit J.P., Progress in developing cationic vectors for non-viral systemic gene therapy against cancer. *Biomaterials.* 2008, 24-25:3477-96.

Nakashima M., Reddi A.H., The application of bone morphogenetic proteins to dental tissue engineering. *Nat.Biotechnol.*, 2003, 21: 1025–1032.

Nerem R., *Tissue Engineering: From Biology to Biological Substitutes*, Tissue Engineering, 1995, 1.

Niidome T., Huang L., Gene therapy progress and prospects: nonviral vectors., *Gene Ther.* 2002, 24: 1647-52.

Nishida, Y., Knudson, C.B., Eger, W., Kuettner, K.E. & Knudson, W. Osteogenic protein 1 stimulates cells-associated matrix assembly by normal human articular

chondrocytes: up-regulation of hyaluronan synthase, CD44, and aggrecan. *Arthritis Rheum.* 2000, 43: 206-14.

Noyan A. Prof. Dr., *Yaşamda ve Hekimlikte Fizyoloji*, 18.Baskı 2008, 1157syf.

Oshin, A.O., Stewart, M.C., The role of bone morphogenetic proteins in articular cartilage development, homeostasis and repair. *Vet Comp Orthop.Traumatol.* 2007, 20: 151-8.

Ozgenel, GY., Filiz G., Ozcan M., Effects of human amniotic fluid on cartilage regeneration from free perichondrial grafts in rabbits, *The British Association of Plastic Surgeons*, 2004 57: 423–428.

Pan B., Jiang H., Guo C., Huang S., Zhuang H., Microtia: ear reconstruction using tissue expander and autogenous costal cartilage, *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery*, 2008, 61: 98-103.

Pfaffl M.W., Horgan G.W., Dempfle L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res.* 2002; 9: e36.

Picot J., *Methods in Molecular Medicine: Human Cell Culture Protocols*, Humana Press, 2nd Ed. 2005, 376syf.

Pineda, S., Pollack, A., Stevenson, S., et al. A semiquantitative system for histologic grading of articular cartilage repair. *Acta Anat.* 1992, 143: 335.

Plank C., Rosenecker J., Magnetofection: the use of magnetic nanoparticles for nucleic acid delivery. *Cold Spring Harb. Protoc.* 2009 6: 5230.

Rotter, N., Steiner, A., Reconstruction of auricular cartilage using tissue engineering techniques, *Operative Techniques in Otolaryngology*, 2008, 19: 278-284.

Reddi, A.H., Bone morphogenetic proteins (BMPs): From morphogens to metabologens, *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 2009, 20: 341–342.

Reddi AH., Cartilage morphogenetic proteins: role in joint development, homeostasis, and regeneration. *Ann Rheum Dis*. 2003, 62 (suppl 2): ii73–78.

Rozin A.P., Gez E., Bergman R., Recurrent auricular chondritis and cartilage repair. *Ann Rheum Dis*. 2005, 5:783-4.

Ruszymah, B.H.I., Formation of tissue engineered composite construct of cartilage and skin using high density polyethylene as inner scaffold in the shape of human helix, *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*, 2011, 75: 805-810.

Sá-Lima H., Tuzlakoglu K., Mano JF., Reis RL., Thermoresponsive poly(N-isopropylacrylamide)-g-methylcellulose hydrogel as a three-dimensional extracellular matrix for cartilage-engineered applications, *J Biomed Mater Res A*. 2011 Jun 30.

Scheufler, C., Sebald, W., Hulsmeyer, M., Crystal structure of human bone morphogenetic protein-2 at 2.7 Å resolution. *J Mol. Biol* 1999., 287 :103-15.

Schmidt M.B, Chen E.H, Lynch S.E., A review of the effects of insulin-like growth factor and platelet derived growth factor on in vivo cartilage healing and repair. *Osteoarthritis Cartilage*. 2006, 5:403-12.

Schratzberger P., et al., Transcutaneous ultrasound augments naked DNA transfection of skeletal muscle, *Mol. Ther.*, 2002, 5: 576-83.

Schüler G, Overexpression of BMP-7 in monolayer chondrocytes, *Diplomarbeit*, Un, Wien, 2008

Seeherman H., Wozney J.M., Delivery of bone morphogenetic proteins for orthopedic tissue regeneration. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 2005, 16: 329–345.

Simic P., Vukicevic S., Bone morphogenetic proteins in development and homeostasis of kidney. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 2005, 16: 299–308.

Shi Y., Massague J., Mechanisms of TGF β signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell*, 2003, 113: 685–700.

Shimasaki S., Moore R.K., Otsuka F., et al., The bone morphogenetic protein system in mammalian reproduction. *Endocr. Rev.*, 2004, 25: 72–101.

Stokes, D.G., Liu, G., Dharmavaram, R., Jimenez S.A., Regulation of Type-II collagen gene expression during human chondrocyte de-differentiation and recovery of chondrocyte-specific phenotype in culture involves Sry-type high-mobility-group box (SOX) transcription factors, *Biochem J.* 2001, 360: 461–470.

Sun HT., Liu W., Zhou G., Zhang W., Cui L, Cao Y. Tissue engineering of cartilage, tendon and bone. *Front Med.* 2011, 5 (1):61-9.

Tarahovsky Y.S., Cell transfection by DNA-lipid complexes – lipoplexes, *Biochemistry*, 2009, 12:1293-304.

Tripathi A, Kumar A. Multi-featured macroporous agarose-alginate cryogel: synthesis and characterization for bioengineering applications. *Macromol Biosci.* 2011, 1: 22-35.

Tsumaki N., Yoshikawa H., The role of bone morphogenetic proteins in endochondral bone formation. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 2005, 16: 279–285.

Türk M, Dinçer S, Yuluğ IG, Pişkin E., In vitro transfection of HeLa cells with temperature sensitive polycationic copolymers. *J Control Release*, 2004, 2: 325-40.

Uchida M., Li X.W., Mertens P., Alpar H.O., Transfection by particle bombardment: delivery of plasmid DNA into mammalian cells using gene gun. *Biochim. Biophys. Acta.* 2009,8: 754-64.

Ulrich, V.M., et al. Adeno-Associated Mediated Vector Gene Transfer of Transforming Growth Factor- β 1 to Normal and Osteoarthritic Human Chondrocytes Stimulates Cartilage Anabolism. *European Cells and Materials*, 2005,10: 40-50.

Urist MR., Bone: formation by autoinduction. *Science*, 1965, 150: 893–899.

Vrana N.E., Cahill P.A., McGuinness G.B., Endothelialization of PVA/gelatin cryogels for vascular tissue engineering: effect of disturbed shear stress conditions. *J Biomed. Mater. Res. A*. 2010, 4:1080-90.

Xu J., Ganesh S., Amiji M., Non-condensing polymeric nanoparticles for targeted gene and siRNA delivery. *Int. J Pharm.* 2011.

Walker N.J., A technique whose time has come. *Science*, 2002: 296: 557-559.

Warnock J.N, Daigre C., Al-Rubeai M., Introduction to Viral Vectors. *Methods Mol. Biol.* 2011, 737:1-25.

White, A.P., et al., Clinical applications of BMP-7/OP-1 in fractures, nonunions and spinal fusion, *Int Orthop.* 2007, 6: 735–741.

White P.M, Morrison S.J, Orimoto K., et al., Neural crest stem cells undergo cell-intrinsic developmental changes in sensitivity to instructive differentiation signals. *Neuron*, 2001, 29: 57–71.

Wong M.S., Hawthorne W.J., Manolios N., Gene therapy in diabetes. *Self Nonself.* 13: 165-175.

Wozney J.M., Rosen V., Celeste A.J, et al. Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science*, 1988, 242:1528–1534.

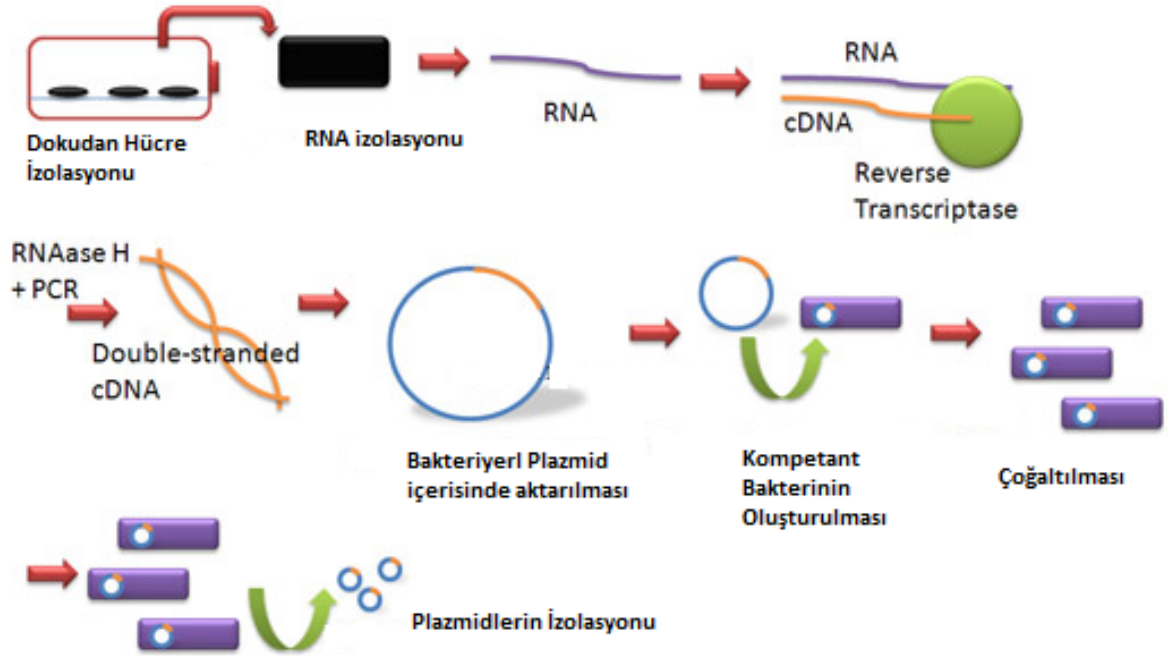
Wozney J.M., Rosen V., Bone morphogenetic protein and bone morphogenetic protein gene family in bone formation and repair, *Clin Orthop Relat Res*, 1998 346: 26–37.

Yamaoka, H., et al., Cartilage tissue engineering using human auricular chondrocytes embedded in different hydrogel materials, 2011, J. Biomed. Res. Part A.

Zhao G.Q, Deng K., Labosky P.A., et al., The gene encoding bone morphogenetic protein 8B is required for the initiation and maintenance of spermatogenesis in the mouse. Genes Dev. 1996, 10:1657–1669.

EK-A

Plazmid Klonlama Basamakları



Temel işlem basamakları;

- Primer tasarımı
- Primer template etkileşimi
- Ligasyon, Transformasyon ve Ekspresyon çalışmaları
- Kontrol ve DNA ekstraksiyonu
- Sekans analizi
- İn vitro ekspresyon çalışmaları

EK-B

Konfokal Boyama Prosedürü

- 1)** Malzemelerin bulunduğu kültür kabından üreme ortamı uzaklaştırılır.
- 2)** Malzemeler oda sıcaklığında PBS tamponu ile 3 defa yıkanır.
- 3)** Oda sıcaklığında, % 2.5 (v/v) gluteraldehit ile 10 dk. fiksasyon işlemi gerçekleştirilir.
- 4)** PBS ile 3 defa yıkama işlemi gerçekleştirilir ve örnekler PBS içerisinde +4°C'de saklanır.
- 5)** Görüntülemeye hemen önce Hücre membranlarının geçirgenliğini arttırmak için malzemeler % 0.1'lik Triton X-100 çözeltisinde 5 dk. bekletilir.
- 6)** Triton X-100 çözeltisi uzaklaştırılır ve PBS ile 3 defa yıkama yapılır.
- 7)** 400 µL Alexa Fluor 488 Phalloidin çözeltisi eklenir ve örnekler 20 dk. karanlıkta inkübe edilir.
- 8)** İnkübasyon sonunda Alexa Fluor 488 Phalloidin çözeltisi uzaklaştırılır ve %1 (w/v)'lik BSA çözeltisi ile 3 defa yıkama yapılır.
- 9)** 500 µL propidyum iyodit çözeltisi eklenir ve malzemeler karanlıkta 5 dk. inkübe edilir.
- 10)** Propidyum iyodit çözeltisi uzaklaştırılır ve %1 (w/v)'lik BSA çözeltisi ile 3 defa yıkama yapılır.

EK-C

Acridine Orange / Propidium Iodide Boyama Prosedürü

- 1) Kültür kabından üreme ortamı uzaklaştırılır.
- 2) Kültür kabı oda sıcaklığında PBS tamponu ile 3 defa yıkanır.
- 3) Kültür kabı 30 saniye Acridine Orange (3mg/ml) ile boyanır.
- 4) Kültür kabı PBS tamponu ile 3 defa yıkanır.
- 5) Kültür kabı Propidium Iodide (3mg/ml) ile boyanır
- 6) Kültür kabı PBS tamponu ile 3 defa yıkanır.
- 7) Kültür kabını kaplayacak kadar immersiyon sıvısı ile kaplanır.

EK-D

“Turbofect” ile genel transfeksiyon protokolü

- 1) 24 kuyucuklu kültür kaplarına 5×10^4 hücre olarak şekilde ekim yapılır. (Her bir kuyu için)
- 2) 1 gün sonra hücreler % 70 kaplamış hale geldiğinde transfeksiyon işlemlerine geçilebilir
- 3) 1 µg DNA ile 100 µl kültür ortamı karıştırılır.
- 4) 2 µl Turbofect çözeltisi DNA çözeltisi 'ne eklenir.
- 5) 15-20 dakika oda ısısında karanlıkta inkübasyona bırakılır.
- 6) 100ul Turbofect-DNA kompleksi karışımını kültür kabına eklenir.
- 7) Üzerine 1 ml kültür ortamı eklenir ve hafif çalkalanır.
- 8) 37°C'de inkübasyona bırakılır ve ekspresyon sonuçları izlenir.

EK-E

Dokudan RNA İzolasyon Protokolü

- 1- 1.5 ml' lik ependorf tüp içinde bulunan 50-100 mg arasındaki dokular çözünmeden pastle veya mortar ile homojenize edilir. Örnekler çözünmeye başladığı anda tekrar sıvı azotta dondurulur ve homojenizasyon işlemine devam edilir.
- 2- Homojenizasyon işlemine 1000 ul TriFast ile devam edilir. (Doku büyüklüğü arttığı oranda kullanılan Trifast miktarıda arttırılır). Örnek hacminin, homojenizasyon sırasında kullanılan TriFast hacminin %10'nu geçmemesine dikkat edilir.
- 3- Örnekler oda sıcaklığında 5 dakika bekletilir.
- 4- 200 ul kloroform eklendikten sonra 15 saniye boyunca (tamamen karışincaya kadar) vortekslenir ve 10 dakika oda sıcaklığında tutulur.
- 5- Örnekler 11.000 rpm'de 5 dakika 4 °C'de santrifüj edilir. Santrifüj sonunda karışım, altta kırmızı faz (fenol kloroform fazı), arafaz ve üstte renksiz sıvı faz olmak üzere üç faza ayrılmıştır.
- 6- Üst faz yeni bir steril 1.5 ml'lik ependorf tüpüne aktarılır.
- 7- Başlangıçta kullanılan TriFast miktarının yarısı kadar izopropanol eklenip vortekslenir.
- 8- Örnekler 1 yada 1.5 saat -20 °C' de bekletildi. 11.500 rpm'de 10 dakika 4 °C'de santrifüj edildi. Üstte kalan süpernatant atılır.
- 9- DNA kontaminasyonunu engellemek için 60 ul Dnaz (ug başına 5U DNaz), 300 ul Dnaz Buffer I (200mM Tris-HCL (pH:8.4), 20mM MgCl₂, 500mM KCl) ve 400 ul DEPC'li su eklenerek 30 dakika 37 °C sıcaklığında bekletilir.
- 10- Örneklerin üzerine 300 ul 25mM EDTA eklendi ve 65 °C'de 10 dak bekletilir.
- 11- 12.000 rpm'de 10 dakika 4 °C'de santrifüj edildi. Pelete dokunmadan üstte kalan süpernatant atılır.
- 12- 1000 ul %75'lik alkol (taze hazırlanır) eklenerek, 12.000 rpm'de 10 dakika 4 °C'de santrifüj edilir. Pelete dokunmadan üstte kalan süpernatant atılır.
- 13- Peletin üzerine tekrar 1000 ul %75'lik alkol eklenerek, 12.000 rpm'de 10 dakika 4 °C'de santrifüj edilir. Pelete dokunmadan üstte kalan süpernatant atılır.
- 14- Pelet kurumaya bırakılır. 30-50 ul DEPC'li su ile sulandırılır.

EK-F

Gen ifadenme analiz sonuç tabloları

3. gündeki Aggreca, BMP-7, Col Type I ve Col Type II gen ifadenmelerinin Normal ve Transfekte gruplar arasındaki istatistiksel analizi

Gen	İfadenme	P değeri
GAPDH	1,000	1,000
Aggreca	2,25	0,047
BMP-7	2,254	0,043
Col Type I	1,605	1,142
Col Type II	2,72	0,041

3. gündeki Aggreca, BMP-7, Col Type I ve Col Type II gen ifadenmelerinin Kontrol ve Normal gruplar arasındaki istatistiksel analizi

Gen	İfadenme	P değeri
GAPDH	1,000	1,000
Aggreca	3,122	0,0001
BMP-7	3,33	0,0001
Col Type I	2,17	0,036
Col Type II	4,409	0,0001

3. gündeki Aggreca, BMP-7, Col Type I ve Col Type II gen ifadenmelerinin Kontrol ve Transfekte gruplar arasındaki istatistiksel analizi

Gen	İfadenme	P değeri
GAPDH	1,000	1,000
Aggreca	5,122	0,0001
BMP-7	5,254	0,0001
Col Type I	4,605	0,0001
Col Type II	6,409	0,0001

7. gündeki Aggrecan, BMP-7, Col Type I ve Col Type II gen ifadelenmelerinin Normal ve Transfekte gruplar arasındaki istatistiksel analizi

Gen	İfadenme	P değeri
GAPDH	1,000	1,000
Aggrecan	3,227	0,0001
BMP-7	3,63	0,0001
Col Type I	2,511	0,032
Col Type II	5,566	0,0001

7. gündeki Aggrecan, BMP-7, Col Type I ve Col Type II gen ifadelenmelerinin Kontrol ve Normal gruplar arasındaki istatistiksel analizi

Gen	İfadenme	P değeri
GAPDH	1,000	1,000
Aggrecan	2,969	0,0001
BMP-7	3,315	0,0001
Col Type I	2,168	0,042
Col Type II	3,442	0,0001

7. gündeki Aggrecan, BMP-7, Col Type I ve Col Type II gen ifadelenmelerinin Kontrol ve Transfekte gruplar arasındaki istatistiksel analizi

Gen	İfadenme	P değeri
GAPDH	1,000	1,000
Aggrecan	3,715	0,0001
BMP-7	4,115	0,0001
Col Type I	2,71	0,021
Col Type II	4,176	0,0001

14. günde Aggrecan, BMP-7, Col Type I ve Col Type II gen ifadenmelerinin Normal ve Transfekte gruplar arasındaki istatistiksel analizi

Gen	İfadenme	P değeri
GAPDH	1,000	1,000
Aggrecan	2,45	0,018
BMP-7	3,051	0,0001
Col Type I	2,242	0,021
Col Type II	3,474	0,0001

14. günde Aggrecan, BMP-7, Col Type I ve Col Type II gen ifadenmelerinin Kontrol ve Normal gruplar arasındaki istatistiksel analizi

Gen	İfadenme	P değeri
GAPDH	1,000	1,000
Aggrecan	3,745	0,0001
BMP-7	3,846	0,0001
Col Type I	2,915	0,0001
Col Type II	4,205	0,0001

14. günde Aggrecan, BMP-7, Col Type I ve Col Type II gen ifadenmelerinin Kontrol ve Transfekte gruplar arasındaki istatistiksel analizi

Gen	İfadenme	P değeri
GAPDH	1,000	1,000
Aggrecan	4,209	0,0001
BMP-7	4,846	0,0001
Col Type I	3,664	0,0001
Col Type II	4,974	0,0001

30. günde Aggrecan, BMP-7, Col Type I ve Col Type II gen ifadenmelerinin Normal ve Transfekte gruplar arasındaki istatistiksel analizi

Gen	İfadenme	P değeri
GAPDH	1,000	1,000
Aggrecan	2,395	0,039
BMP-7	3,523	0,0001
Col Type I	2,139	0,045
Col Type II	4,616	0,044

30. günde Aggrecan, BMP-7, Col Type I ve Col Type II gen ifadenmelerinin Kontrol ve Normal gruplar arasındaki istatistiksel analizi

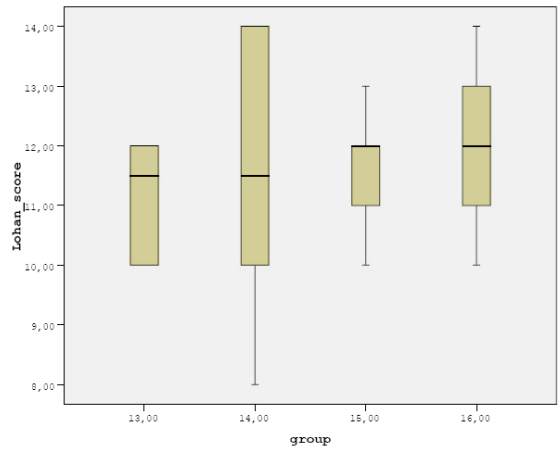
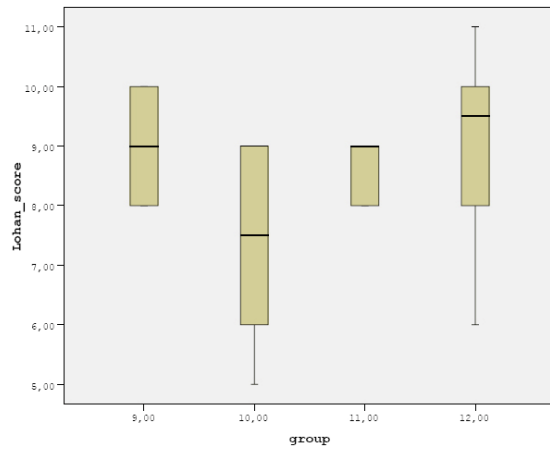
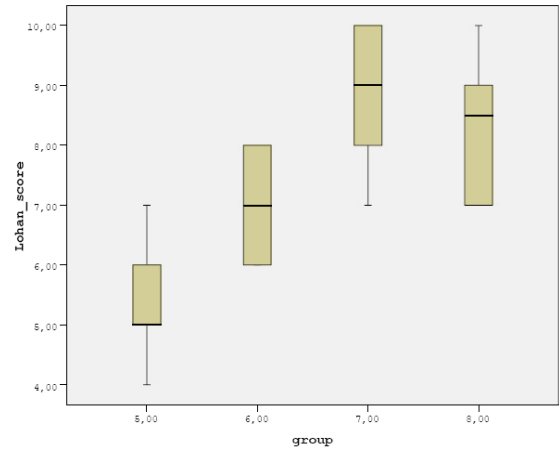
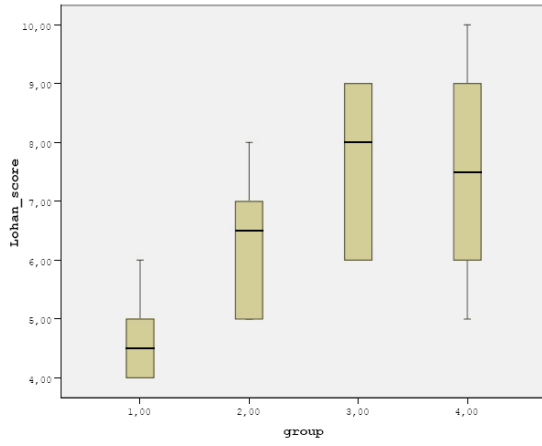
Gen	İfadenme	P değeri
GAPDH	1,000	1,000
Aggrecan	3,532	0,0001
BMP-7	3,502	0,0001
Col Type I	2,408	0,037
Col Type II	4,143	0,0001

30. günde Aggrecan, BMP-7, Col Type I ve Col Type II gen ifadenmelerinin Kontrol ve Transfekte gruplar arasındaki istatistiksel analizi

Gen	İfadenme	P değeri
GAPDH	1,000	1,000
Aggrecan	4,106	0,0001
BMP-7	4,547	0,0001
Col Type I	3,185	0,0001
Col Type II	4,612	0,0001

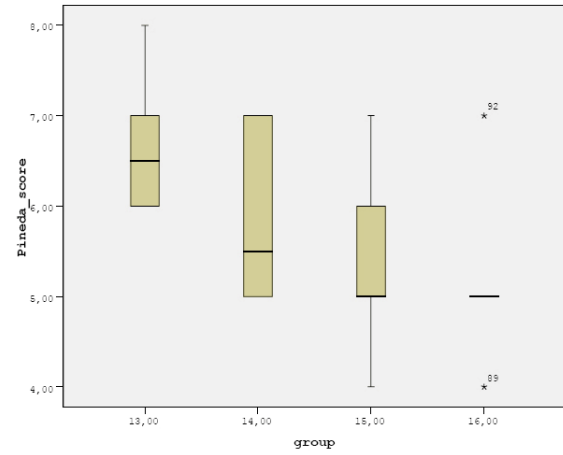
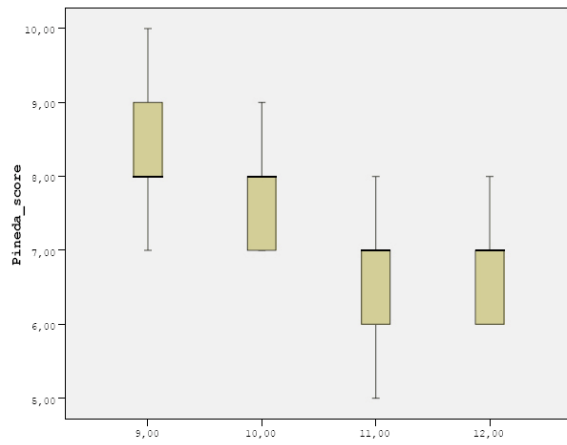
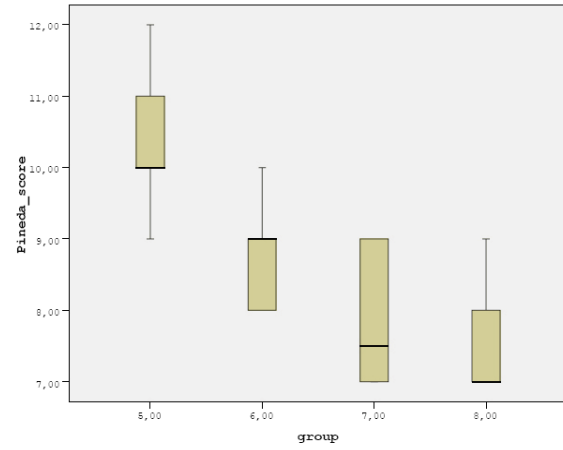
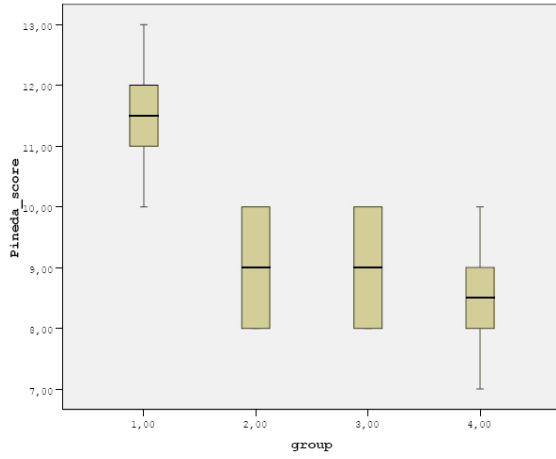
EK-G

Lohan Histolojik Skorlama İstatistik Analizi Tabloları



EK-H

Pineda Histolojik Skorlama İstatistik Analizi Tabloları



EK-I



T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanlığı

29.11/2010

SAYI : B.30.2.GÜN.0.05.06.00/ 109 - 7143
KONU:

Sayın

Prof.Dr.Erhan BİŞKİN
Hacettepe Üniversitesi Mühendislik Fakültesi
Kimya Mühendisliği Bölümü
Öğretim Üyesi

Araştırmacı grubu Prof Dr.Erhan BİŞKİN, Doç.Dr.İbrahim VARGEL ve Uzman Biyolog Sedat ODABAŞ`dan oluşan, G.Ü.ET-10.059 kod numaralı ve "**Kıkırdak Doku Oluşumunda Yeni Doku Mühendisliği Stratejilerinin Geliştirilmesi**" başlıklı araştırma öneriniz incelenmiş ve Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Yönergesindeki ilkelere uygun olduğu saptanarak onaylanmasına oybirliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi saygılarımla rica ederim.

It is unanimously approved that the research project numbered G.Ü.ET-10.059 and entitled "**Development of Novel Tissue Engineering Strategies on Cartilage Tissue Formation**" is in compliance with Gazi University Animal Experiments Local Ethics Committee regulations.

With my best regards.

EK : 1 Liste


Prof.Dr.Gökhan ALPASLAN
Gazi Üniversitesi
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanı

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Sedat Odabaş

Doğum Yeri : Ankara

Doğum Yılı : 1982

Medeni Hali : Evli

Eğitim ve Akademik Durumu:

Y.Lisans : 2004-2006 Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyomühendislik ABD.

Lisans : 2000 – 2004 Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü

Lise : 1997-2000 Milli Piyango Anadolu Lisesi

Yabancı Dil: İngilizce