

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ALJİNAT İLE MİKROENKAPSÜLASYONU YAPILAN PRİMER
KONDROSİTLERİN HİDROJEL İÇİ VE DIŞI KONDROJENİK
POTANSİYELLERİ**

Rumeysa AKÇAPINAR

**HİSTOLOJİ-EMBRYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Siyami KARAHAN**

2014 – KIRIKKALE

TEŞEKKÜR

Çalıőmalarımı yönlendiren, araőtırmalarımın her aşamasında bilgi, öneri ve yardımlarını esirgemeyerek yetiőme ve geliőmeme katkıda bulunan danışman hocam Sayın Prof. Dr. Siyami KARAHAN'a

Katkılarından ve önerilerinden dolayı Sayın Prof. Dr. Hakan KOCAMIŐ'a

Çalıőmalarım süresince bilimsel ve manevi desteklerini esirgemeyen Sayın hocam Doç. Dr. Mustafa TÜRK'e

Lisansüstü eđitimim boyunca bana her zaman destek olan, bilgi ve deneyimlerini benimle paylaőan hocam Yrd. Doç. Dr. Aytül KÜRÜM'e

Yardımlarını benden esirgemeyen ve her zaman yanımda olan arkadaşlarım Uzman Esra ARAT, Uzman Gamze TURALI, Uzman Aslı AĖAR KELEŐ, Canan ÇAKIR ÇOBAN, Selçuk TOKLUCU ve Sema TUNCER'e

Beni akademisyen olmaya teővik eden ve her zaman maddi ve manevi yardımlarını yanımda hissettiğim canım aileme,

Çalıőmalarım boyunca beni her koőulda destekleyen, birçok fedakarlık göstererek bütün kahrımı çeken, bir gün olsun őikayet etmeyen canım eőim Adem AKÇAPINAR' a teőekkürü bir borç bilirim.

Rumeysa AKÇAPINAR

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	v
ŞEKİLLER.....	vii
ÇİZELGELER	ix
ÖZET	x
ABSTRACTxii

1. GİRİŞ	1
1.1. Kıkırdak Dokusu.....	4
1.1.1. Hiyalin Kıkırdak.....	5
1.1.2. Hiyalin Kıkırdağın Histogenezi ve Büyümesi.....	5
1.1.3. Kıkırdak Hücreleri.....	6
1.1.4. Elastik Kıkırdak.....	7
1.1.5. Fibröz Kıkırdak.....	7
1.1.6. İntervertebral Diskler.....	7
1.2. Kıkırdak Yaralanmaları.....	8
1.3. Kıkırdak yaralanmalarının sınıflandırılması.....	9
1.3.1. Kısmi kalınlıktaki kıkırdak hasarları.....	9
1.3.2. Tam kalınlıktaki kıkırdak hasarları.....	9
1.4. Kıkırdak yaralanmalarının tedavi teknikleri.....	10
1.4.1. Artroskopik tedavi tekniği.....	10
1.4.2. Yumuşak doku greftleri.....	10
1.4.3. Osteokondral Otogreft Transplantasyon.....	11
1.4.4. Osteokondral Allogreft Transplantasyon.....	12

1.4.5. Otolog Kondrosit İmplantasyonu.....	12
1.4.5.1. Birinci Nesil Otolog Kondrosit İmplantasyonu.....	13
1.4.5.2. İkinci Nesil Otolog Kondrosit İmplantasyonu.....	14
1.4.5.3. Üçüncü Nesil Otolog Kondrosit İmplantasyonu.....	14
1.5. Hücre kapsülleme teknolojisi.....	15
1.5.1. Mikroküre ve Mikrokapsül Kültür Sistemleri.....	16
1.5.2. Hücre Kapsülleme Teknolojisinde Kullanılan Biyomalzeme ve Polimerler.....	16
1.5.2.1. Hidrojeller.....	16
1.5.2.2. Aljinat.....	17
1.5.2.3. Termoplastik polimerler.....	18
1.5.2.4. Polimerik olmayan materyaller.....	18
1.6.Çalışmanın amacı.....	19
2. MATERYAL VE YÖNTEM.....	20
2.1. Kullanılan Cihazlar ve Kimyasallar.....	20
2.1.1. Cihazlar.....	20
2.1.2. Kimyasallar ve Malzemeler.....	20
2.2. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Çözeltiler ve Solüsyonlar.....	21
2.2.1. Besiyeri Hazırlanması.....	21
2.2.2. Double Staining Çalışma Solüsyonunun Hazırlanması.....	21
2.2.3. MTT Çalışma Solüsyonunun Hazırlanması.....	22
2.2.4. Aljinat Çözeltisinin Hazırlanması.....	22
2.2.5. Çapraz Bağlayıcı Çözeltisinin Hazırlanması.....	22
2.3. Hücre Kültürü.....	23
2.3.1. Hücre İzolasyonu.....	23
2.3.2. Hücre Sayımı.....	23
2.3.3. Kültürü Yapılan Kondrosit Hücrelerinin Enkapsülasyonu.....	24
2.3.4. Aljinat İle Kapsülenmiş Kondrositlerin Toksisitesinin Belirlenmesi.....	24
2.3.5. MTT Test.....	24
2.3.6. İkili Boyama Metodu ile Apoptozun ve Nekrozun Belirlenmesi... ..	25
2.3.7. Toluidin Boyama ile Glikozaminoglikan	

Depolanmasının Gösterilmesi.....	25
2.3.8. DMMB Analizi ile Glikozaminoglikan Miktarının Belirlenmesi...26	
2.3.9. Real Time PCR ile Kondrositlerin Tip I ve II Kollajen, SOX9 Ekspresyonlarının Değerlendirilmesi.....	26
2.3.9.1. RNA İzolasyonu.....	26
2.3.9.2. cDNA Sentezi.....	27
2.3.9.3. Real Time PCR (Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu).....	28
3. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	29
3.1. Hücre İzolasyonu.....	29
3.2. Kültürü Yapılan Kondrosit Hücrelerinin Kapsülasyonu.....	30
3.3. Aljinat İle Kapsüllenmiş Kondrositlerin Toksikitesinin Belirlenmesi.....	31
3.4. MTT Test.....	32
3.5. İkili Boyama ile Apoptotik ve Nekrotik İndeks Sonuçları.....	34
3.5.1. Apoptotik İndeks Sonuçları.....	34
3.5.2. Nekrotik İndeks Sonuçları.....	39
3.6. Toluidin Boyama ile Glikozaminoglikan Sentezinin Belirlenmesi.....	44
3.7. DMMB Analizi ile Glikozaminoglikan Miktarının Belirlenmesi.....	54
3.8. Real Time PCR ile Kondrositlerin Tip I ve II Kollajen, SOX9 Ekspresyonlarının Değerlendirilmesi.....	56
4. TARTIŞMA VE SONUÇLAR.....	58
5. KAYNAKLAR.....	62

SİMGELER VE KISALTMALAR

cDNA	Komplementer DNA
CO ₂	Karbondioksit
Ct	Cycle Threshold
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dilactate
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMMB	Dimethyl Methyln Blue
DMSO	Dimethyl Sulfoxide
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DNAz	Deoksiribonükleaz
ECM	Eksracellular Matrix
EDTA	Etilendiamin Tetraasetik Asit
ELİSA	Enzim Bağlantılı İmmün Analiz
FBS	Foetal Bovine Serum
FITC	Fluorescein İsothiocyanate
GAG	Glikozaminoglikan
HA	Hyalüronik Asit
HCl	Hidroklorik Asit
MACI	Matriks Uyarımlı Kondrosit İmplantasyonu
MTT	(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5- Diphenyltetrazolium Bromide)

NaCl	Sodyum Klorür
PBE	Fosfat Buffer EDTA
PBS	Fosfat Buffer Saline
PCR	Polimerase Chain Reaction
RNA	Ribonükleik Asit
RNAaz	Ribonükleaz
RT-PCR	Real Time Polimerase Chain Reaction
UV	Ultraviyole

ŞEKİLLER

Şekil No:

Sayfa No:

1.1	A) Aljinat, B) Aljinatın guluronik asit monomerlerinin Ca+2 iyonları ile oluşturduğu “egg-box” yapısı.....	18
3.1	A) Kıkırdak dokudan izole olan fibroblast benzeri kondrosit hücreleri, B) Birinci pasajdan sonra fibroblast benzeri kondrosit hücreleri.....	29
3.2	A) Kapsül içerisindeki kondrosit hücreleri 5. gün, B) Kapsül içerisindeki kondrosit hücreleri 15. gün.....	30
3.3	Aljinat ile kapsüllenen hücrelerin WST-1 Testi sonucundaki canlılık düzeyleri.....	32
3.4	Aljinat ile kapsüllenen hücrelerin canlılık oranları.....	34
3.5	Kapsüllenen kondrosit hücrelerinin 5. gündeki DAPI görüntüsü.....	35
3.6	Kapsüllenen kondrosit hücrelerinin 8. gündeki DAPI görüntüsü.....	36
3.7	Kapsüllenen kondrosit hücrelerinin 15. gündeki DAPI görüntüsü.....	37
3.8	Kapsüllenen kondrosit hücrelerinin 30. gündeki DAPI görüntüsü.....	38
3.9	Kapsüllenen kondrosit hücrelerinin 40. gündeki DAPI görüntüsü.....	39
3.10	Kapsüllenen kondrosit hücrelerinin 5. gündeki FITC görüntüsü.....	40
3.11	Kapsüllenen kondrosit hücrelerinin 8. gündeki FITC görüntüsü.....	41
3.12	Kapsüllenen kondrosit hücrelerinin 15. gündeki FITC görüntüsü.....	42
3.13	Kapsüllenen kondrosit hücrelerinin 30. gündeki FITC görüntüsü.....	43
3.14	Kapsüllenen kondrosit hücrelerinin 40. gündeki FITC görüntüsü.....	44
3.15	A), B), C), Kapsüllenmiş kondrositlerin toluidin mavisi ile 5. gündeki görüntüsü.....	46
3.16	A), B), C), Kapsüllenmiş kondrositlerin toluidin mavisi ile 8. gündeki görüntüsü.....	48
3.17	A), B), C), Kapsüllenmiş kondrositlerin toluidin mavisi ile 15. gündeki görüntüsü.....	50
3.18	A), B), C), D), Kapsüllenmiş kondrositlerin toluidin mavisi ile 30. gündeki görüntüsü.....	52
3.19	A), B), C), D), Kapsüllenmiş kondrositlerin toluidin mavisi ile 40. gündeki görüntüsü.....	54

3.20	0-10 µg/ml konsantrasyonlardaki GAG depolanmasının 5., 8., 15., 30., 40., günlerdeki miktarı.....	55
3.21	Real Time PCR çalışmasında elde edilen Amplifikasyon eğrisi Grafiği.....	57
3.22	SOX9, Kollajen Tip I ve Tip II genlerinin 8., 15., 40., günlerine göre ifadelenmesi.....	58

ÇİZELGELER

Çizelge No:	Sayfa No:
1.1 Birinci nesil otolog kondrosit implantasyonu (dikişli yöntem) ve üçüncü nesil otolog kondrosit implantasyonu (hücre-jel karışımı) karşılaştırması.....	15
2.1 cDNA PCR karışım oranları.....	27
2.2 Roche Cyler 480 koşulları.....	28
3.1 Aljinat kapsülün kondrosit hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi.....	31
3.2 Aljinat kapsülün kondrosit hücrelerinin metabolik aktivite ve canlılığı üzerindeki etkisi.....	33
3.3 Kapsüllenmiş kondrosit hücrelerinin 5., 8., 15., 30., 40., günlerdeki apoptotik indeks sonuçları.....	35
3.4 Kapsüllenmiş kondrosit hücrelerinin 5., 8., 15., 30., 40., günlerdeki nekrotik indeks sonuçları.....	40
3.5 0-10 µg/ml konsantrasyonlardaki GAG depolanmasının 5., 8., 15., 30., 40., günlerdeki absorbansı.....	55
3.6 Eşitlik 3.1’de gösterildiği gibi hesaplanan 8., 15., 40., günlere dair $\Delta\Delta Ct$ değerleri.....	57

ÖZET

Kıkırdak dokusunun tamir yeteneği oldukça sınırlıdır. Bu nedenle, osteoarthritis gibi dejeneratif eklem hastalıklarında, hasarlı bölgelere taşıyıcı matriksler içinde kondrosit implantasyonu yapılması en güncel yaklaşımlar arasında yer alır. Bununla birlikte, implantasyon sonrası kondrositlerin korunması, taşıyıcı matriksin biyouyumluluğu ve stabilitesi konularında, yoğun olarak araştırmalar devam etmektedir. Mitojenik kapasiteleri sınırlı olan kondrositler, hücre kültüründe bölünme yeteneği kazanırlar ve kollajen tip II yerine kollajen tip I sentezlemeye başlarlar. Bu şekilde, fibroblast benzeri yapıya dönüşmüş olan kondrositler, hasarlı bölgeye aktarılmadan önce kondrojenik kapasitelerini geri kazanabilmeleri için 3 boyutlu taşıyıcı matrikslere alınırlar. Ancak, kondrojenik potansiyeli tam anlamıyla koruyan bir mekanizma bugüne kadar geliştirilememiştir. Son yıllarda kondrositlerin yarı geçirgen zarlarla mikrokapsülasyonu, kıkırdak doku mühendisliği alanında yeni teknik ve teknolojilerin gelişmesini sağlamıştır. Sunulan tezde aljinat ile mikrokapsülasyonu yapılmış primer sığır kondrositlerin, kondrojenik potansiyeli geri kazanımlarının ortaya konulması amaçlanmıştır. Bu çalışmada, sığır fetusu hyalin kıkırdak dokusundan izole edilen primer kondrositlerden hücre kültürü yapılmıştır. Daha sonra aljinat ile mikrokapsülasyonu yapılmış ve yapılmamış kondrositler 40 gün boyunca kültür ortamında bekletilmiştir. Kültürün 5, 8, 15, 30 ve 40'ncı günlerinde alınan hücrelerin kondrojenik kapasiteleri histolojik, histokimyasal, immunohistokimyasal yöntemlerle detaylı olarak ortaya konulmuştur. Bu amaçla; apoptoz/nekroz testi, MTT sitotoksosite testi, GAG depolanmasını göstermek için toluidine blue boyaması, kollajen tip I ve kollajen tip II için immunohistokimya analizleri yapılmıştır. Tüm örnekler 3 tekrarlı çalışılmıştır ve sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Sonuç olarak, kapsüllenen kondrosit hücreleri 40. güne kadar canlılıklarını büyük ölçüde devam ettirmişlerdir. Apoptoz nekroz için yapılan ikili boyama testinde 5. gününde kapsüllenmiş hücrelerin apoptoz/ nekroz oranı %3,03/ %0,61 iken, 8. günde %5,45/ %1,82, 15. günde %5,65/ %3,23, 30. günde %16,39/ % 14,75 ve 40. günde %17,31/ %16,54 olarak hesaplanmıştır. Ayrıca yapılan MTT sitotoksosite testinde canlılık oranı 5. günde %91,37, 8. günde %84,32, 15. günde %81,17, 30. günde %77,65 ve 40. günde %61,30 olarak kaydedilmiştir.

GAG sentezinin belirlenmesi için yapılan toluidin boyamada ve DMMB analizinde sentezin gerekeştiği gösterilmiş ve Real-Time PCR alışması sonucunda ise tip II ve SOX9 genlerinin ekspresyonuna rastlanmamıştır.

Anahtar kelimeler: Aljinat, enkapsülasyon, hidrojel, kıkırdak, kondrosit

ABSTRACT

Cartilage tissue has a limited capacity of repair. Mainly for this reason, chondrocyte implantation via carrier matrices to damaged cartilage areas is among the most current approaches in degenerative joint disease such as osteoarthritis. Chondrocytic condition as well as biocompatibility and biodegradation of the carrier matrices are still of scientific interest to a high degree. Chondrocytes, which normally have a limited mitogenic capacity, gain capacity of proliferation and synthesize collagen type I instead of collagen type II in 2 dimensional cell culture environment (dedifferentiation). Dedifferentiated chondrocytes are loaded to 3 dimensional matrices in order for them to regain chondrogenic capacity before implantation to damaged cartilage regions. However, absence of a mechanism that fully fosters and protects chondrogenic potential is the main reason behind this ongoing interest. Microcapsulation of chondrocytes with a semi permeable membrane has been studied for the last few years and opened doors for new technology opportunities in cartilage tissue engineering. In this proposed study, primary bovine chondrocytes were microcapsulated with alginate. Bovine chondrocytes, isolated from fetal cartilage provided from a local slaughterhouse, were expanded in cell culture. Chondrocytes either microcapsulated or uncapsulated will be cultured for at least 40 days. The chondrogenic capacity was revealed in sampled chondrocytes at the 5, 8, 15, 30, and 40. days of the culture using histological, histochemical, immunohistochemical techniques. For this purpose, apoptosis/necrosis test, MTT cytotoxicity test, toluidine blue staining for GAG deposition and immunohistochemistry for collagen type I and collagen type II were done. All samples will be studied in triplicate and results will be evaluated statistically. As a consequence, viability of encapsulated chondrocytes continued at high levels until 40 days. According to results of double staining for apoptosis and necrosis, apoptosis/necrosis ratio of encapsulated chondrocytes in 5th day were calculated as %3,03/ %0,61, in 8th day %5,45/ %1,82, in 15th day %5,65/ %3,23, in 30th days %16,39/ %14,75, and 40th days %17,31/ %16,54. Furthermore, according to MTT cytotoxicity test, viability ratio of capsulated chondrocytes were recorded as %91,37 in 5th day, %84,32 in 8th days, %81,17 in 15th day, %77,65 in 30th day and %61,30

in 40th day. In toluidine blue staining and DMMB assay for detecting deposition of GAG, synthesis were observed and type II and SOX9 genes expression were not observed with Real Time PCR analysis.

Keywords: Alginate, cartilage, chondrocyte, encapsulation, hydrogel

1. GİRİŞ

Kıkırdak dokusu oldukça sınırlı iyileşme kapasitesi nedeniyle doku mühendisliği çalışmalarının en önemli hedef dokularından birisidir (1, 2). Son yıllarda gelişmekte olan kıkırdak doku mühendisliği alanında, özellikle ilerleyen yaşla birlikte artan kıkırdak kaybı nedeniyle gelişen eklem hastalıkları için umut verici sonuçlar elde edilmektedir. Kıkırdak doku mühendisliğinin temelinde; yük taşımayan kıkırdak bölgelerinden izole edilen kondrositlerin hücre kültüründe çoğaltılarak ya da çoğaltılmadan, taşıyıcı matrikslere yüklenmesi ve hasarlı bölgelere aktarılması yer almaktadır (3). Bilindiği gibi kondrositler, kültür ortamında fenotipik ve fonksiyonel farklılaşma göstererek bölünme yeteneği kazanırlar (4) ve fibroblast benzeri hücrelere dönüşürler (de-diferansiyon) (5). Bunlar, kıkırdağa özel olan kollajen (tip II kollajen) yerine tip I kollajen sentezler (6,7). Fibroblast benzeri hücrelere farklılaşan kondrositler, tekrar üç boyutlu matrikslere aktarılmadıkça, kültür ortamında tekrar eski hallerine dönmezler (5). Doğal veya sentetik polimerler kullanılarak yapılan 3 boyutlu matriksler ve misket şekilli küreler gibi hücrelerin sperikal morfolojisini destekleyen uygulamalar, fibroblast benzeri hücrelere farklılaşan kondrositlerin, tekrar kollajen tip II sentezleyen kondrositlere dönüşmesini (re-diferansiyon) sağlarlar (8). Kondrositlere geri dönüşmesi amacıyla, mezenşimal kök hücreler de kullanılmaktadır (9). Taşıyıcı matrikslerden hidrojeller (örn; hyalüronan, aljinat ve agaroz), 3-4 haftalık kültür sonunda fibroblastlara farklılaşan kondrositlerin, tekrar farklılaşmasında (rediferansiyon) iyi sonuçlar gösterir. Çünkü, yüksek hidratlı 3 boyutlu ağlara sahip olduklarından kıkırdağı taklit edebilirler (4, 8, 10). Aljinat jel matrikslerin içerisine hapsedilen yetişkin artiküler kondrositlerin 8 ay sonra bile kollajenden ve proteoglikandan zengin matriks üretebildiği rapor edilmiştir (11).

Son yıllarda gelişmekte olan hücre mikrokapsülleme teknolojsinin kıkırdak doku mühendisliği açısından da avantajlar sunabileceğine dair güçlü veriler bulunmaktadır (11, 12). Hücre mikrokapsülleme teknolojisi; oksijen, besin, hücre metabolizması için gerekli olan büyüme faktörleri, atık ürünler ve terapötik proteinlerin difüzyonuna izin veren polimerik yarı geçirgen zar içinde hücrelerin immobilize hale

getirilmesidir (13, 14). Aynı zamanda, zarın yarı-geçirgen özelliği, hücrelerin yabancı işgallerle zarar görmesinden ve konak bölgenin bağışıklık hücreleri ve antikorlarından korur (13, 15). Kapsüllenmiş hücrelerin transplantasyonu, uygun bir teknoloji kullanılarak tedavi edilebilir veya edilemez çeşitli hastalıklar ve bozuklukların tedavisi için umut vericidir. Bu güçlü teknik, hastalık veya dejenerasyondan dolayı fonksiyonunu kaybetmiş özel fizyolojik alanların yeniden yapılandırılması için terapötik ürünlerin kontrollü dağılımına izin verir (13). Hücre kapsülasyonu, yarı-geçirgen zarın sınırındaki hem varlığını devam ettiren, hem de ölü hücreleri yakalamayı hedefler. Membranın, istenilen moleküllerin geçmesine izin veren geçirgen yapısının yanısıra, istenilen büyüklüğün üzerine çıkan büyük moleküllerin transportunu önleme yeteneği de bulunur (14, 16). Mikrokapsülasyonun yarı-geçirgen zarı hücrel metabolizmayı, proliferasyonu, farklılaşmayı ve hücrel morfogenezi destekleyecek yapıdadır (14). Hücre mikrokapsülasyonunun yararlarından birisi de, herhangi bir immunosupresif ilaç kullanımı olmadan bir immunolojik bariyer üzerindeki hücrelerin naklinin mümkün olmasıdır. Bu sayede, bir yandan taşınan hücrenin hayatta kalmasını sağlarken, diğer taraftan alıcı bireyin immun sistemi tarafından reddedilmesini önler (13, 14). Kapsüllenen hücrelerin mekanik davranışları ve dayanıklılıkları kapsüle edilmemiş olanlara göre çok daha iyi olduğu belirlenmiştir (17)

Enkapsülasyon için, doğal ve sentetik polimerik bileşikler içeren çeşitli skaffold materyalleri test edilmiştir (6, 10). Hidrojeller, doku benzeri elastikliği, yüksek su içeriği ve dokunun iç ortamını taklit edebilme yeteneğinden dolayı en çok dikkat çeken yapı iskelesidir (13, 14, 18). Hidrojel materyalleri sitotoksik değildir ve hücre kapsülleme yöntemlerinde zararsızdır (18). Agaroz, kollajen, fibrin, hyalüronik asit, sentetik polimerler ve aljinat, mikrokürelerin yapımında sıkça kullanılan hidrojellerdir (4,11). Bu polimerlerin arasında aljinat, üç boyutlu kondrogenez çalışmaları için deneysel olarak kullanışlı bir materyaldir (11, 19).

Aljinat, deniz yosunundan izole edilen ve 2 üronik asit tuzu (β -D-mannuronat (M) ve α -L-guluronat) içeren bir polisakarittir (20, 21). Non-toksik özelliği ve biyouyumluluğundan dolayı tıbbi alanlardaki uygulamalarda sıklıkla kullanılır (6, 22, 23). Aljinat solüsyonunun içine kalsiyum iyonlarının eklenmesiyle 3 boyutlu kalsiyum-aljinat hidrojel formu elde edilir, çünkü iki değerlikli kalsiyum katyonları,

biopolimer zincirini çapraz bağlar ve bunlar yumurta şekilli yapılar (egg-box) adını alır (6, 22). Kalsiyum aljinat küreleri içinde hücrelerin kapsüllemesi, konağın bağışıklık sisteminden hücreleri korumak için iyi bir metoddur (4).

Son zamanlarda kıkırdak doku mühendisliği çalışmaları kondrositlerin çeşitli hidrojellerle mikro düzeyde kapsüllemesi üzerine odaklanmıştır (21). Yapılan çalışmalarda fibrin jellerle kapsüllemesi kondrositler, in vitro ortamda 5 hafta boyunca canlılığını sürdürmüş ve aynı zamanda fibrin jelle hyalüronik asit jel eklenmesiyle in vivo kültürden 4 hafta sonra büzülme derecesi düşürülmüş ve ekstraselüler matriks (ECM) ürünleri de saf fibrin jel kapsüllere göre artmıştır (24). Başka bir çalışmada, kollajen ve jelatin jellerle kapsüllemesi kondrositlerin in vitro kültürde 21 günün sonunda kıkırdağa özel matriks ürünü ürettiği gösterilmiştir. Bu kollajen jel, bir gün sonra büzülme göstermiş ve ilk 7 gün boyunca hücre sayısında artış gözlenmiştir (25). Bir diğer çalışmada, ultra yüksek akışkanlıkta aljinatın, kalsiyum klorürle çapraz bağlanmasıyla yaklaşık 500µm çapında kapsüller oluşturulmuş, her kapsülün içine de 50 mezenşimal projenitör hücre hapsedilmiştir (6). Agaroz yardımı ile oluşturulan kapsüllemesi kondrositler daha sonra dextran-tyramine hidrojellere hapsedilmiş ve kondrosit kümelerinin hücre bazında kondrojenik kapasitelerinin, tek hücre olarak hapsedilen kondrositlere göre çok daha iyi olduğu rapor edilmiştir (26). Sonuçta mikrokapsülleme tekniğinin birden çok daha fazla hücreden oluşan kondrosit kümeleri oluşturması nedeniyle kondrojenik kapasitenin geri kazanımında fayda sağlayacağı düşünülmektedir.

Kondrositler için kullanılan taşıyıcı matriksler arasında hidrojeller, sağladıkları bazı avantajlar sayesinde öne çıkmaktadırlar. En önemli özellikler ise sulu ortamda kolayca şişme özelliği gösterdiklerinden besinlerin ve birçok kimyasal sinyalin hücrelere daha kolay ulaşmasını sağlamaktadırlar (27). Birçok doğal ve sentetik materyal kıkırdak doku mühendisliği açısından hidrojel yapımı için denenmiş ve hala da denenmektedir. Bunlar arasında fibrin, kollajen, agaroz, aljinat, HA, jelatin, elastin benzeri polipeptidler, polietilen glikol gibi doğal ve sentetik polimerler hidrojel yapımında kullanılmaktadır (27, 28). Jelatin kollajen denatürasyonu ile elde edilmektedir. Biyouyumluluk ve biyobozunurluk özelliklerinin yanında oldukça iyi olan jelleşme şişme özellikleri nedeniyle jelatin hidrojel çalışmalarında tercih edilen bir materyaldir (29). Jelleşmesine yardımcı olmak için dextran gibi hidrofilik,

biyoyumlu ve toksik olmayan polisakkaritler jelatin hidrojel yapımında kullanılmaktadır (30).

1.1. Kıkırdak Dokusu

Kıkırdak dokusu, mekanik streslere karşı koyan , yumuşak fakat dayanıklı matriksli özel bir bağ dokusu tipidir. Matriks kıkırdak hücreleri tarafından sentezlenir. Kıkırdak hücreleri (kondrosit) laküna adı verilen küçük boşluklara yerleşmişlerdir. Kıkırdak dokusu damarlardan, lenflerden ve sinirlerden yoksundur (31).

Ekstrasellüler matriks, kollajen ve elastik liflerle birebir ilişkili glikozaminoglikan (GAG) ve proteoglikan (PG) lardan oluşur. Kıkırdağın bükülgenliği ve şıkıştırmaya karşı olan direnci, şok ve darbe emici olarak görev yapmasına olanak verir. Ayrıca çok düzgün yüzeyli olması nedeniyle eklemlerin sürtünmesiz olarak hareketine olanak sağlanması, yumuşak dokuların desteklenmesi aracılığı ile normal şeklin korunması ve uzun kemiklerin gelişiminde gerekli olması kıkırdağın diğer önemli görevleridir (32).

Matrikste bulunan fibrillere göre 3 tip kıkırdak bulunur; Hiyalin kıkırdak; Tip II kollajen sentezler, en yaygın kıkırdaktır ve bir çok fonksiyonu vardır. Elastik kıkırdak; TipII kollajen sentezler, elastik lifli, bükülgen matrikslidir. Fibröz kıkırdak; kaba kalın Tip I kollajen sentezler, çekme güçlerine karşı dirençlidir (31).

Perikondrium bir çok kıkırdağı çevreleyen bağ dokusudur. Fibriler bir dış tabaka ile matriksi sentezleme kapasitesindeki daha hücreli bir iç tabakadan oluşur. Perikondrium vasküler bir tabakadır; kan damarlarının taşıdığı besinler kıkırdak hücrelerini besler. Kıkırdağın perikondriyuma sahip olmadığı alanlarda (kemiğin eklem yüzeyi) kıkırdak hücreleri eklem yüzeyini yıkayan snovial sıvıdan beslenir (33).

1.1.1. Hiyalin Kıkırdak

Taze halde, mavimsi gri renkli, ışığı yarı geçirgen, bükülgen matriksli ve vücudun en yaygın kıkırdağıdır. Burun, larinks, kostaların sternuma bağlandığı ventral yüz, trakeal ve bronşial halkalarda ve hareketli eklem yüzeylerinde bulunur. Ayrıca embriyonik gelişim dönemlerinde, birçok uzun kemiğin şablonunu oluşturur. Erişkin dönemde ise epifizial plak hiyalin kıkırdaktan oluşur (31).

1.1.2. Hiyalin Kıkırdağın Histogenezi ve Büyümesi

Kıkırdağın geliyeceği bölgelerde mezenşimal hücreler, uzantılarını kaybeder, yuvarlaklaşarak yoğunlaşır. Böylece yoğun hücrelerden meydana gelen bir kondrifikasyon (kıkırdaklaşma) merkezi ortaya çıkar (31). Bu hücreler daha sonra kondroblastlara farklılaşırlar. Kondroblastlar hemen bir matriks sentezlerler. Bu süreç ilerlerken kondroblastlar kendine ait küçük kompartmanlar olan laküna içine hapsolurlar, bundan sonra artık kondrosit olarak isimlendirilirler (34). Bu hücreler halen bölünme yeteneğini sürdürdüklerinden, bir laküna içinde 2-4 veya daha fazla hücre grubu oluştururlar (31). 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 içerden büyümeye başlar. Bu içsel (interstisyel) tipte büyümedir (34).

Gelişmekte olan kıkırdağın periferindeki mezenşimal hücreler ise ilk olarak fibroblastlara farklılaşır. Fibroblastlar sıkı kollajenöz bir bağ dokusu olan perikondriyumu şekillendirir. Perikondriyum kıkırdağın varlığını ve büyümesini sürdürmesinde sorumludur. Perikondriyum iki tabakalıdır (32). Dışta fibröz olan tabaka Tip I kollajen, 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 (31).

İnterstisyel büyüme yalnızca hiyalin kıkırdağın oluşumu sırasında, perikondriyumu olmayan eklem kıkırdağı ve epifizial plaklarda (kemik boyuna büyümesi) meydana

gelir. Bunlar dışındaki vücut bölgelerinde büyüme çoğunlukla appozisyondur, kontrollü bir süreç olup kırıkdağın yaşamı boyunca devam eder (31)

1.1.3. Kırıkdağ Hücreleri

Kırıkdağ doku ile ilgili 3 hücre tipi vardır (31, 32)

Kondrojenik Hücreler; dar, iğ şekilli ve mezenşimal hücrelerden farklıdır. Sitoplazmaları azdır, bir iki nukleoluslu oval bir nukleusları bulunur. Elektron mikroskopik gözlemlerinde, Küçük Golgi, az mitokondri ve granilli endoplazmik retikulum (GER) ile bol ribozom içerirler. Bu hücreler hem kondroblast hem de osteoprojenitör hücrelere farklılaşabilirler (31)

Kondroblast; kondrifikasyon merkezindeki mezenşimal hücrelerden ve perikondriumdaki kondrojenik hücrelerden köken alabilirler. Kondroblastlar daha şişkin ve protein sentezi için gerekli organellere sahip hücrelerdir. Bu nedenle bazofilik olarak boyanırlar. Zengin GER, iyi gelişmiş Golgi, bol mitokondri ve zengin salgı vezikülleri içerirler (31, 32).

Kondrositler; bir matriksle çevrili laküna içine yerleşik hücrelerdir. Kırıkdağın periferinde ovoid daha derin bölgedekiler ise yuvarlaktır ve bu bölgede izogen grup artar. Histolojik preparasyonlarda büzülme ve hücre kaybı gözlenir. Kondrositler de belirgin nukleoluslu iri bir nukleusa sahiptir, protein sentezleyen hücrelerin genel özelliklerine sahiptir (31, 32).

Genç kondrositler açık boyanan sitoplazmaya, bol mitokondri, GER ve iyi gelişmiş Golgi kompleksine ve bol glikojen içerirken, Yaşlı kondrositlerde, aktivite daha düşük olup, organellerde belirgin azalma vardır. Ancak bu hücrelerde serbest ribozom boldur, kondroblastlara dönüşebilme durumunda aktif protein sentezi yaparlar (31,32).

1.1.4. Elastik Kıkırdak

Hiyalin kıkırdağa benzer fakat matriks ve pekondriyumu elastik lif içerir. Elastik kıkırdak pinna (kulak kepçesi), östaki borusu, epiglottis, larinkste yerleşmiştir. Elastik lif içeriğinden dolayı hiyaline göre daha sarı ve opak görünümlüdür (31).

Birçok açıdan hiyalin kıkırdağa benzemesine karşın perikondriyumun dış fibröz tabakası elastik liflerce zengindir. Matrikste de bol miktarda inceden kalına kadar değişen ve tip II kollajen lifler arasında dallanan elastik lifler bulunur. Bu lifler elastik kıkırdak matriksini oldukça esnek yapar. Buna karşın matriks hiyalin kıkırdak kadar bol değildir, matriks kalsifikasyon göstermez (31)

1.1.5. Fibröz Kıkırdak

Perikondriyum içermez, matriks tip I kollajene sahiptir. Fibröz kıkırdak intervertebral disklerde, bazı artiküler disklerde ve tendonların kemik insersiyolarında bulunur. Hiyalin kıkırdak ile sıkı bağ dokusu arasında geçiş formu sayılabilir. Perikondriyum içermez (31). Dermatan sülfat ve kondroidin sülfatça zengin az bir matrikse sahiptir. Asidofilik olarak boyanan tip I kollajen bantları yoğun olarak bulunur. Kondrositler genellikle doku üzerindeki zorlayıcı çekme gücü yönünde uzanan kaba kalın lif bantları üzerinde paralel sıralar oluştururlar. Burada kondrositler genellikle fibroblastlardan köken alırlar (32).

1.1.6. İntervertebral diskler.

Her intervertebral disk iki vertebra arasında bulunur. Bunları bir arada tutar. Disk annulus fibrozus ve nukleus pulposus olmak üzere iki komponenten oluşur. İntervertebral diskler spinal kolonun hareketi esnasında komşu vertebraların aşınmasını engelleyen hareketli yastıkçıklar olarak görev yapar (33). Annulus fibrozus, dışta sıkı bağ dokusu ile çevrili ve bunun içinde temel olarak üst üste binmiş lameller şeklindeki fibröz kıkırdaktan oluşur. Komşu lamellerde kollajen lif bantları birbirine dik açı ile yerleşmişlerdir. Çok sayıda lif ve lamellerin böyle düzenlenişi diske vertebraya binen yük basıncının üstesinden gelebilme esnekliği kazandırır (33). Nukleus pulposus, annulus fibrozusun merkezinde yer alır. Notakord

kökenli az miktarda hücre, hiyaluronik asit ve tip II kollajenden oluşan daha akışkan bir dokudur. Çocukluk döneminde daha geniş olan nukleus ileri yaşlarda küçülür ve kısmen fibröz kıkırdağa dönüşür (33).

1.2. Kıkırdak Yaralanmaları:

Farklı tipte yaralanmalardan ve eksikliklerden kaynaklanan doku ve organ yetmezlikleri insan sağlığında en dikkat çekici ve pahalı problemlerden birisidir.(35). Kıkırdak yaralanmaları da bu problemlerden bir tanesidir. Çevresel etmen kaynaklı travmatik yaralar veya eksikliklerin dışında, Paget hastalığı, hemofili ve akromegali gibi doğuştan ve metabolik hastalıklar da kondral hasarlara neden olabilir (36). Günümüzde, travmatik lezyonlardan veya kademeli dejeneratif hastalıklardan dolayı meydana gelen doku hasarlarının, hem in vivo hem in vitro olarak yapısal ve fonksiyonel olarak yeniden yapılanmasına büyük talep vardır. Bu talep tıp,temel bilimler ve biyomühendislik gibi tamamlayıcı alanların ilgilendiği bir konudur (37).

Eklem kıkırdağı ileri derecede farklılaşmış bir dokudur ve sınırlı iyileşme özelliği gösterir (38). Ayrıca, hayatı boyunca, ilerleyen ve fokal kıkırdak kaybı içeren ve tekrarlayan dejeneratif hasara uğrayabilir (37). Yapısını ağırlıklı olarak kondrositler ve tip II kollajenler oluşturur. Hücreler arası ağın üç boyutlu yapısı, yük taşıma ve kayma gibi işlevleri açısından önemlidir. Eklem kıkırdağı sinoviyal sıvıdan beslenir. Bu nedenle kan kökenli büyüme etmenleri dokuya ulaşamadığından onarımın veya yeniden yapılanmanın (rejenerasyon) doku içerisinde gerçekleşmesi söz konusudur. Eklem kıkırdağının katmanları farklı yapısal ve işlevsel özellikler gösterir. Onarım gerçekleşirken subkondral kemik dahil bu katmanların yapılarının göz önüne alınması gerekir (38, 39)

Kıkırdak lezyonları nadiren kendiliğinden iyileşir ve bu da eklem yetmezliklerinin en büyük ana sebeplerinden birini oluşturur. Kıkırdak yaralanmaları kademeli olarak eklem kıkırdağının dejenerasyonuna ve osteoartirise sebep olur (36). Yapılan çalışmalar gösteriyor ki, otolog, yani organizmaya ait hücre veya dokular, hiyalin kıkırdak üretebilme yeteneğine sahiptir. Bu da eklem kıkırdağı tamirinde avantaj kazandırmaktadır (36).

Embriyogenez, postnatal gelişme ve yetişkinlik boyunca kıkırdak dokunun, özellikle kondrositlerin, homeostasisi ve büyümesi, önemli sayıda humoral faktörler tarafından yönlendirilir. Bu faktörler hem gerçek veya yapay tedavi boyunca kullanılır, hem de yeniden yapılanmaya neden olur. Bununla birlikte, yayınlanmış birçok araştırma, bu faktörlerin yapay doku kültürü, kıkırdak tamirinin hayvan modelleri ve yeniden yapılanma üzerindeki pozitif etkilerine dikkat çekmiştir (40). Bu faktörlerden bazıları, iyonlar (özellikle kalsiyum), düşük molekül ağırlıklı bileşikler (örn. steroid hormonlar), ekstraselüler matriks moleküllerinin izole edilen kısımları, peptid hormonları ve proteinlerdir (41).

1.3. Kıkırdak yaralanmalarının sınıflandırılması:

1.3.1. Kısmi kalınlıktaki kıkırdak hasarları

Kıkırdak lezyonları, subkondral kemiğe uzanıp uzanmamalarına bağlı olarak, tam ya da kısmi kalınlıkta olma durumlarına göre sınıflandırılır. Kısmi kalınlıktaki eklem kıkırdağı hasarları, osteoartritin ilk aşaması boyunca gözlenen çatlaklara benzerler (36). Bu tür hasarlar kendiliğinden iyileşemez ve bu lezyonlar subkondral kemiğe ulaşamaz ve bundan dolayı kemik iliğinin öncü (progenitor) hücrelerine erişimi yoktur. Kısmi kalınlıkta yaralanmalara maruz kalan hücre yüzeyleri hücre yapışmasını ya da fibrin pıhtılaşmasını destekleyemez (42). Glikozaminoglikan dermatan sülfat içeren matriks proteoglikanlar hücrenin yapışmasını ve hasar alanında pıhtı oluşumunu engeller (43). Sonuç olarak kısmi kalınlıktaki eklem kıkırdak hasarlarında, subkondral kemik, hasar ve kemik iliği hücreleri arasında bariyer görevi görür (36).

1.3.2. Tam kalınlıktaki kıkırdak hasarları:

Tam kalınlıktaki kıkırdak hasarlarında, pluripotent mezenşimal kök hücreyle iletişim mümkündür (36). Kondrositler sınırlı onarıcı özelliğe sahiptir. Eğer hasar tam kalınlıktaysa vasküler boşluk ve kemik iliğinden türeyen hücreler ile sınırlı bir kendiliğinden iyileşme reaksiyonu vardır (42). Kendiliğinden iyileşme, boşluğu

dolduran bir fibrocartilagious dokusunun üretiminden oluşmaktadır. Bu doku, zamanla dejenere olan zayıf bir hiyalin kıkırdak muadilidir. Kendiliğinden onarım sırasında hasarın kenarlarındaki fibrokartilaj doku nekrotik hale gelir ve hasarın merkezinde çok az veya hiç hiyalin kıkırdak meydana gelmez (36).

1.4. Kıkırdak yaralanmalarının tedavi teknikleri

1.4.1. Artroskopik tedavi tekniği:

Eklem ağrılarını hafifletmek için lavaj veya debridman sıklıkla kullanılır. Artroskopi sırasındaki lavaj, eklem yıkamasını gerektirir. Bu yıkama işleminin ağrıyı hafiflettiği görülmüştür fakat bu mekanizmanın nasıl olduğu bilinmemektedir (36, 44). Bu prosedürle eklem alanındaki enkaz kaldırılmış olabilir ve böylece ağrı hafifletilmiş olabilir. Debridman, hasarlı dokunun artroskopik olarak kaldırılmasıdır. Ayrıca lavaj ile birlikte kullanıldığında uzun ömürlü bir ağrı kesici olarak görünür (45). Bu yöntemlerin her ikisi de eklem ağrılarını hafifletmek için rutin kullanılır ve osteoartrit aşamalarının erken tedavisinde başarılı olduğu gösterilmiştir (44). Fakat, hem lavajın hem de debridmanın biyolojik onarım gerçekleştirdiğine dair somut bir delil yoktur (36, 44).

1.4.2. Yumuşak doku greftleri:

Tam kalınlıktaki eklem kıkırdağı hasarlarında periost ve perikondrium nakli hem insan hem de deneysel hayvan modellerinde uygulanmıştır. Sonuçlar çeşitlilik gösterse de hiyalin kıkırdak benzeri dokuların oluşumu rapor edilmiştir (36). Bu sonuçlar ışığında perikondriumdan oluşan ve periosttan oluşan dokular arasında anlamlı bir fark olmadığı tespit edilmiştir (44). Ancak periostun elde edilmesi daha kolay olduğundan perikondriumdan daha sık kullanılır (36). Kıkırdak hasarının tamiri sırasında periost kondrojenik potansiyel göstermiştir. Periostun bu kondrojenik potansiyeli kondrosit öncü hücreler olarak atfedilir. Periost kemiğe yapışık bir kambiyum tabakası ve fibröz bir tabaka içerir. In vitro çalışmaların gösterdiği üzere, kondrosit farklılaşması kambiyum tabakasında gerçekleşir ve fibröz tabakaya doğru

ilerler ancak fibröz tabakada kıkırdaklaşma olmaz. Kıkırdak büyümesi apozisyonel ve fibröz tabakadan uzaktır. Ayrıca kambiyum tabakasının juxta-fibröz kısmında kondrosit öncü hücrelerinin bulunmasını destekler (44).

Kıkırdak tamiri sırasında, periostal kondrosit öncü hücreleri ve subkondral kemikten türetilen mezenşimal kök hücreler iki potansiyel hücre kaynağıdır. Tavşanlarla yapılan bir çalışmada periosttan nakledilen dokular vakaların sadece % 33 ünü tamir edebilmiştir. Geri kalan % 67 si hem periosttan nakledilen dokularla hem de kemik iliği mezenşimal kök hücrelerle tamir edilmiştir (36, 44).

Periostal greftlerle yapılan klinik çalışmalar zayıf sonuçlar göstermiştir (36). Tam anlamıyla bir hiyalin kıkırdak tabakası oluşumuna ve tamir edilen dokuda uzun süre dayanıklılığa ulaşılmamıştır. Dahası, greftlerin dikiş ve yapıştırma yöntemiyle hasarlı bölgeye eklenmesi, greftlerin kalsifikasyonundan dolayı yüksek oranda oluşan greft kaybı gibi teknik güçlüklerden dolayı engellenir (36).

1.4.3. Osteokondral Otogreft Transplantasyon

Osteokondral otogreftler, altındaki kemiğe bağlı tam kalınlıklı kıkırdağın dairesel silindirlerdir. Bu otogreftler, eklem kıkırdağının ve altındaki kemiğin kaldırılabilceği yük taşımayan alanlarda herhangi bir semptom veya fonksiyon kaybına sebep olmadan artroskopik yöntemlerle giderilebilir. Donör greft, press-fit tekniği kullanılarak sokulur (46).

Bu osteokondral otogreft fişlerinin nakli en sık femoral kondilleri içeren semptomatik lezyonlarda yapılır. Bu lezyonlar küçük-orta boy (0.5 - 3 cm²) olmalıdır çünkü mevcut donör doku miktarı sınırlıdır. Bazen küçük bir kesit bile gerekli olabilir. Daha büyük lezyonlar için, "mozaikplasti" olarak adlandırılan, çoklu fişleri kullanarak uygulanan bir teknik kullanılabilir (46).

Osteokondral otogreftlerin avantajı, dokunun otojen ve normal yaşayan hiyalin kıkırdak olmasıdır. Bu nedenle, bu teknik yaralanan kıkırdağa çok benzer bir kıkırdağın oluşumu ile sonuçlanır. Dezavantajları ise, donör dokuda morbidite (ağrı ve yeni kıkırdak hasarı), eklem kıkırdak yüzey hattı ile donör dokudaki eşleşmede

teknik zorluklar, kıkırdak fişleri arasındaki boşluklar ve kıkırdak veya kemik çökmesi riskidir (46).

1.4.4. Osteokondral Allogreft Transplantasyon

Taze osteokondral allogreft transplantasyonu sırasında, kıkırdak defektinin tamiri için kadavra grefti kullanılır. kıkırdak kusuru ortaya çıkarmak için küçük bir artronomi yapılır. Osteokondral allogreft fişleri defekt boyutuyla hattını eşleştirmek için toplanır ve daha sonra pres-fit tekniği kullanılarak stabilite sağlanır (46).

Bu prosedür orta ve büyük eklem kıkırdağı hasarlarında (3 cm² ye kadar bütün bir hemikondil) ,kemik kaybı olan yaşlı hastalarda kullanılır. Sıklıkla femoral kondilleri kapsayan kusurlar için kullanılan osteokondral allogreftler, aynı zamanda patella, troklea veya tibial plak lezyonları için de kullanılabilir (46).

Osteokondral allogreftlerin büyük avantajı, tek aşamalı bir prosedürle geniş osteokondral kusurların yerine geçme yeteneğidir. Buna ek olarak, eklem kıkırdağı hasarı fibröz kıkırdak yerine eklem kıkırdağına dönüşür. Dezavantajları, greft kullanılabilirliği, teknik zorluklar, maliyet ve olası hastalıkların taşınmasını içerir (46).

1.4.5. Otolog Kondrosit İmplantasyonu

Eklem kıkırdağı yaralanmaları, ortopedide en ilginç sorunlardan birini sunan, tedavisi gelişen bir hastalıktır (47). Kıkırdak transferi günümüzde sadece kıkırdak hasarı diz ekleminde (nadiren bilekte) küçük bir alanda olan kişilerde kullanılmıştır ve artrit için yaygın değildir. Boyutu yeterince küçük olan kıkırdak hasarlarında etkilidir çünkü fişler hasar alanını yeterince doldurur. Fakat boşlukları dolduran yeni kıkırdak normal eklem kıkırdağıyla aynı olmaz ve zamanla tutunamaz. Mozaikplasti yöntemi ise yama veya mozaik oluşumu ile sonuçlanır ve genellikle greftler arasında ölü boşluk oluşur. Bu gibi kusurlar ise umut verici sonuçlar vermesine rağmen başarısızlığa sebep olmaktadır (48).

Bu koşullar altında doku mühendisliğinin güçlü hücre bazlı terapisi, zarar görmüş doku veya organların biyolojik olarak yenilenebileceğini kanıtlamıştır (48, 49). Daha önceden otolog kıkırdak transplantasyonu olarak bilinen otolog kondrosit implantasyonu, semptomatik diz kıkırdağı hasarı tedavisinde kullanılan bir yaklaşım olarak tanımlanmıştır (48). Günümüzde, otolog kondrosit implantasyonu, kondral madde kaybı tedavisi için ihtiyaç duyulan alternatif bir tedavi tekniği haline gelmiştir (50). Bu tedavi yöntemini önemli kılan, hiyalin veya hiyalin benzeri kıkırdağın yeniden oluşmasını sağlaması ve eklem normal fonksiyonlarına geri getirmesidir (51).

Bilindiği gibi hiyalin kıkırdak proteoglikanlardan ve az miktarda elastinle birlikte tip II kollajenden oluşan oldukça organize bir dokudur ve kendi kendini yenileyebilme yeteneği yoktur (52). Semptomatik tam kalınlıklı eklem kıkırdağı hasarları, genellikle bu hasarların ağrı ve fonksiyon kaybı ile osteoartriti ilerletme potansiyeline sahip olduğu kabul edilmektedir (53), yıllarca otolog kondrosit implantasyonu ile tedavi edilmiştir (52).

Otolog kondrosit implantasyonunun, modifikasyonlara ve gelişmesine dayalı üç katagorisi vardır.

1.4.5.1. Birinci Nesil Otolog Kondrosit İmplantasyonu

Birinci nesil otolog kondrosit implantasyonu ilk olarak 1987 yılında tanıtılmış ve 1994 yılında da yayınlanmıştır. Bu terapi, periostal yamanın altındaki kıkırdak hasarı içine, kültürlenmiş süspansiyon otolog kondrositlerin implantasyonunu yöntemi ile yapılır (48, 49). Birinci nesil otolog kondrosit implantasyonu, önceki artroskopik veya cerrahi tedavi yöntemlerinin (debridman, mikroparçacık, sondaj, abrazyon artroplastisi veya osteokondral otograft/allograft) yetersiz kaldığı distal femurunda semptomatik kıkırdak hasarı olan hastalarda kullanılan bir tekniktir (53). Bu klasik tekniğin kullanımı, hem periostal hipertropinin sık sık meydana gelmesiyle hem de cerrahi prosedürlerin morbiditesi ve karışıklığıyla ilgili birkaç sınırlandırmayla ilişkilendirilmiştir. Dahası, bu teknik artronomi , periost kapağı, uzun operasyon süresi, büyük kesikler gerektirir. Üstelik ameliyat sonrası komplikasyonlar görülebilir ve rehabilitasyon süresi oldukça yavaştır (48).

1.4.5.2. İkinci Nesil Otolog Kondrosit İmplantasyonu

Kıkırdak doku mühendisliği alanında son teknolojik gelişmeler, klasik otolog kondrosit implantasyon yöntemlerinin dezavantajlarının, otolog hücrelerin yapay doku yapılarını ve biyomateryalleri kullanarak üstesinden gelmeyi amaçlamıştır (48). Bu teknik kültüre edilmiş kondrositlerin implantasyonu, 3 boyutlu yapıyla ve absorbe edilebilen yapı iskeleleriyle, iki aşamalı yöntem (hem artroskopik biyopsinin ilk aşaması ve açık artronominin ikinci aşaması hem de artroskopik implantasyonun ikinci aşaması) olarak tanımlanmıştır (52). İkinci nesil otolog kondrosit implantasyonunda, periost kapağı için bir yedek olarak domuz kollajen zarı kullanılmıştır. Bu teknik ile operasyon sonrasında bazı hastalarda immunolojik problemlerle karşılaşma ve doku büyümesinin kalitesi tatmin edici olmaması gibi sonuçlar elde edilmiştir (48).

İkinci nesil otolog kondrosit implantasyonu aynı zamanda matriks uyarımlı otolog kondrosit implantasyonu (MACI) olarak da adlandırılır (54). Matriks uyarımlı otolog kondrosit implantasyonunda hücreler, hyaluronan veya çift kollajen katmanı gibi matriks adı verilen zarlara ekilir ve hasar görmüş alana implante edilir. Bu yöntem periostal düzeltme gerektirmez ve aynı zamanda, birinci nesil otolog kondrosit implantasyonuna kıyasla dikişsiz olup operasyon süresi daha kısadır (48).

1.4.5.3. Üçüncü Nesil Otolog Kondrosit İmplantasyonu

Üçüncü nesil otolog kondrosit implantasyonu ikinci nesilin gelişmiş halidir ve matrikslerin yerine enjekte edilebilir jeller kullanılır. Bu teknik, in vitro kültürü yapılan otolog kondrositlerin ve biyobozunur ve biyoyumlu jellerin karıştırılmasıyla uygulanır ve nispeten dikiş türüne göre daha kolay uygulanabilen bir yöntemdir (48). Orijinal kondrojenik fenotiplerinin ekspresyonunu gösteren ve in vivo ortamda kondrositlerin yüksek canlılıkta büyüme gösterdiğini destekleyen çalışmalar yapan araştırmacılar, biyobozunur scaffoldların önemini belgelemişlerdir (55). Bu teknik, dayanıklı olması ve uzun vadede osteoartriti önlemek için daha hiyalin benzeri kıkırdak üretmesi sebebiyle daha etkilidir (56).

Çizelge 1.1. Birinci nesil otolog kondrosit implantasyonu (dikişli yöntem) ve üçüncü nesil otolog kondrosit implantasyonu (hücre-jel karışımı) karşılaştırması (48).

	Dikişli yöntem	Hücre-jel karışımı
Operasyon süresi	uzun (3-4 saat)	kısa (20-30 dakika)
Kesik	büyük (>10cm)	küçük (<5cm)
Cerrahi teknikler	Yavaş	Hızlı
Uygulama	zor (ağrı ve acı)	Kolay
Hasarlı alan	küçük (10 cm ² den az)	büyük (20 cm ² den fazla)

1.5. Hücre kapsülleme teknolojisi:

Son yıllarda, hücrelerin hasarlı dokuya taşınmasında kavramsal olarak farklı iki strateji geliştirilmiştir. Birincisi, serbest otolog allojenik ve ksenojenik hücrelerin enjeksiyonu, ikincisi ise yapı iskelelerine gömülen veya ekilen hücrelerden temel alır. Özellikle ikinci yöntem hem in vitro, temel uygulamalı araştırma protokollerinde, hem de in vivo, tıbbi tedavi biliminde kullanılır (57, 58).

Ne yazık ki, serbest hücrelerin kullanımı, üstün uygulama tekniklerine rağmen, transplante edilen bölgenin immun sisteminin nakledilen serbest hücreyi antijen olarak tanıyıp reddetmesinden dolayı dezavantaj sağlar (59). Ayrıca nakledilen serbest hücreler, dış mekanik yüklerden korunmaz ve düzgün bir mikro çevreyle kaplı değildir. Bundan dolayı hücreler fonksiyonelliğini ve canlılığını hızlı bir şekilde kaybedebilir. Bu sınırlamaların çözülmesi için doğal ve sentetik yapılar potansiyel bağışıklık izolasyon iskelesi olarak geliştirilmiştir (57).

Hücre kapsülleme teknolojisi oksijen, besin, hücre metabolizması için gerekli olan büyüme faktörleri, atık ürünler ve terapötik proteinlerin difüzyonuna izin veren yarı geçirgen zar içinde hücrelerin immobilize hale getirilmesidir (13, 14). Aynı zamanda zarın yarı geçirgen özelliği kapsüllerin yabancı işgallerle zarar görmesinden korur (14, 15, 60). Kapsülün yarı-geçirgen zarı hücrel metabolizmayı, proliferasyonu, farklılaşmayı ve hücrel morfogenezi destekleyecek yapıdadır (14).

1.5.1. Mikroküre ve Mikrokapsül Kültür Sistemleri

Klinik amaçlı sistemlerde, hücre sayısını daha da artırmak için hücreler, daha geniş yüzey alanına sahip mikroküre, mikrokapsül ve mikrotarıyıcılara yerleştirilerek kültüre edilmişlerdir. Besiyeri ve oksijen, özellikle küçük yarıçapa sahip sistemlerde her hücreye rahatça ulaşabilirken, yarıçap büyüdükçe iç kısımda bulunan hücrelere yeterince ulaşamaması söz konusu olabilmekte ve merkezde bulunan hücreler canlılık ve metabolik aktivitelerini yitirebilmektedir (61).

1.5.2. Hücre Kapsülleme Teknolojisinde Kullanılan Biyomalzeme ve Polimerler

1.5.2.1. Hidrojeller :

Hidrojeller doku benzeri elastikliği, yüksek su içeriği ve dokunun iç ortamını taklit edebilme yeteneğinden dolayı en çok dikkat çeken yapı iskeleleridir (13, 14, 18). Hidrojel materyalleri sitotoksik değildir ve hücre kapsülleme yöntemleri zararsızdır (18). Hücre kapsülleme için kullanışlı hidrojel seçerken birkaç kriter göz önünde bulundurulmalıdır. Birincisi, organik çözücüler genelde hücreye zarar verdiği için su bazlı yöntemler kullanılmadır. İkincisi, jelatin kullanırken oluşan reaksiyonlar ılımlı olmalı ve hücrenin fizyolojisine zarar vermemelidir. Üçüncüsü, hidrojellerin yapısı ve kimyasal özellikleri hücrenin proliferasyonu ve doku formasyonu için uygun olmalıdır. Ayrıca, Hidrojeller hücre kapsüllemeye oluşan yan etkileri de düşürülmelidir (18). Hücrelerin adheze olmasını sağlayacak adhezyon reseptörleri,

büyüme faktörleri ya da diğer sinyal molekülleri bulunduran ve bu amaçla modifiye edilmiş biyoaktif malzemeler, hücreler için en ideal polimer iskele sistemlerini oluşturur. Selüloz, pektin, nişasta, dekstran, aljinat, modifiye kitinler, kitosan, kollajen, jelatin vb. doğal polimerler, hücrelerin bağlanması için yaygın olarak kullanılan biyomalzemelerdir (61, 62). Doğal Hidrojeller başarılı bir implantasyon için önemli olan proliferasyonu ve gelişmesini artıran biyolojik sinyalleri sağlamasıyla bilinmektedir (13, 63).

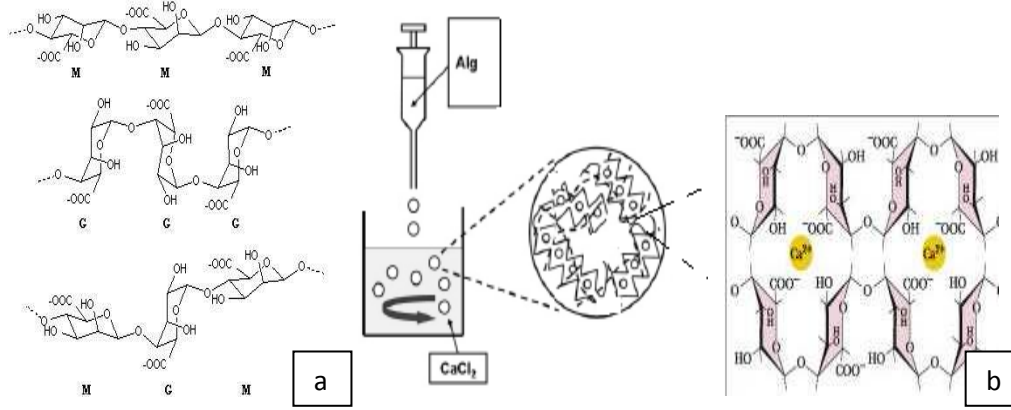
Sentetik hidrojeller alternatif bir membran olarak geliştirilmiştir ve uygun kompozisyon ve kolayca kontrol edilebilen elverişli fiziksel ve mekanik özellikler gösterir. Bunun yanında sentetik hidrojeller hücre implantasyonu sırasında gerekli olan biyolojik sinyalleri sağlama kapasitesine sahip değildir. Poliesterler (Laktik asit-glikolik asit kopolimerleri, poli (b-hidroksibütirat), poli (ekaprolakton), poli (trimetilenkarbonat), poli (ortoesterler), vd.), poliamidler poli (glutamik asit), poli (lizin) ve kopolimerleri, poli (fosfatesterler), poli (anhidritler), poli (ortoesterler) vb. ise çalışmalarda kullanılan sentetik polimerlere örnek olarak verilebilir (61).

Biyosentetik hidrojeller, biyoaktif parçaların sentetik ağlar içinde birleştirilmesiyle, doğal ve sentetik hidrojellerdeki eksiklikler için elverişli çözüm haline gelir, böylece doku mühendisliği alanında hem doğal hem de sentetik hidrojellerin kombiniyle daha avantajlı hale gelmektedir (13).

1.5.2.2. Aljinat:

Aljinat, üç farklı kahverengi deniz yosunundan (*Laminaria hyperborea*, *Ascophyllum nodosum* ve *Macrocystis pyrifera*) ve bakterilerden (*Azotobacter vinelandii* ve *Pseudomonas*) elde edilen, -D-mannuronik asit (M) ve]-L-guluronik asit (G) monomerlerinden oluşan lineer bir polisakkarittir (1,4-bağlı -D mannuronik asit ve 1,4-bağlı -L-guluronik asit heteropolimeri)(64). Aljinatın, hidrofilik olması, organik çözücülere gerek duyulmadan hücreler için ılıman koşullarda matris yapıların oluşturulması, geniş gözenek boyutuna sahip olmasından dolayı difüzyon kısıtlamasının az olması, istenilen durumlarda çeşitli modifikasyonlarla gözenek büyüklüğünün ayarlanabilmesi, biyouyumlu ve biyobozunur özellikleri nedeniyle

ilaç vb. salım uygulamalarında, implantasyon ve hücre enkapsülasyon çalışmalarında yaygın olarak kullanılmıştır (61). Çözelti halindeki sodyum aljinatdaki, guluronik asite (G) bağlı sodyum iyonlarının, kalsiyum gibi divalent katyonlarla yer değiştirmesi ile yumurta kutusu (egg-box) adı verilen jel yapılar oluşur (şekil 1.1).



Şekil 1.1: a. Aljinat, b. aljinatın guluronik asit monomerlerinin Ca⁺² iyonları ile oluşturduğu 'egg-box' yapısı (61)

1.5.2.3. Termoplastik polimerler

Termoplastik polimerler uzun, doğrusal, suda çözünmeyen zincirlerden meydana gelir, soğuma aşamasıyla erime ısısı takip edilen farklı konfigürasyonlar halinde işlenebilir. Termoplastik polimerler kimyasal ve mekanik stabilite özelliklerinden dolayı hücre kapsüllemeye tercih edilmektedir ve hidrojellerden daha iyidir. Bundan dolayı makrokapsüllerde ve damar içine dahil etme işleminde sıklıkla tercih edilirler. Son zamanlarda hücre immunoizolasyonu için kullanılan en popüler Termoplastik materyal acrylanitrile vinyl chloride kopolimer (PAN-PVC)dir. Hücre enkapsülasyonunda kullanılan diğer termoplastikler poliüretan, polisülfat ve diyaliz membranlarıdır. Elverişli stabilite özellikleri olmasına rağmen termoplastikler suda çözünen besinlere karşı düşük geçirgenlik gösterir ve kapsüllü hücrelerin canlılığını sınırlar (13).

1.5.2.4. Polimerik olmayan materyaller

Polimerik membranların geniş gözenek boyutu, zararlı immun sistem bileşenlerinin bloke edilmesinde sıkıntı çıkarabilir ve bu da önemli bir problemdir. Bu problemin üstesinden gelmek için Polimerik olmayan materyaller geliştirilmiştir (13). Polimerik olmayan materyaller, örneğin silikon ve seramik, tek tip gözenek boyutunu kontrol altına alacak potansiyele sahiptir. Son zamanlarda silikon nanopor membranları immunoizolasyon için mikrofabrikasyon teknikleri kullanılarak üretilmektedir. Bu silikon nanopor membranları 5µm kalınlığında ve %1 gözeneklidir. Bu gözeneklerin boyutu seçiciliğe izin verir. Biyoseramikler ise son zamanlarda kemik hücre transplantasyonunda ortaya çıkmıştır (13).

Bu membranlar iyi stabilite ve yüksek seviyede mekanik dayanıklılık gösterir. Polimerik olmayan materyaller gözenek büyüklüğünün kontrolü açısından avantajlı olsa da komplike oluşu ve sert fabrikasyon koşulları, hücre enkapsülasyon uygulamalarında gelişmesini kısıtlamaktadır (13).

1.6. Çalışmanın Amacı

Bu tezde, doku uyumluluğu oldukça iyi olduğu gösterilmiş aljinat ile sentezlenmiş olan mikrokapsüllere hapsedilmiş dedifferensiye kondrositlerin, kondrojenik potansiyellerinin geri kazanımı ve canlılık süresinin uzatılması amaçlanmıştır.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Kullanılan Cihazlar ve Kimyasallar

2.1.1. Cihazlar

Laminar flow kabin (ESCO class II BSC Laminar Flow Cabinet, Labor İldam, Türkiye)

Soğutmalı santrifüj (ROTINA 380R Hettich, Almanya)

İnverted mikroskop (Leica DM6000B, İsveç),

Vorteks (Heidolph)

Elisa plate okuyucu (BİOTEK GEN5 Elisa Reader PowerWave XS2)

Karbondioksitli etüv (Binder CB150)

Hemositometri (İnvitrogen, Countess)

Hassas terazi (Mettler toledo MS204)

Isıtıcılı manyetik tabla (IKA C-MAG HS 7)

Dondurmalı mikrotom (Leica)

LightCycler Real Time PCR cihazı (Roche)

2.1.2. Kimyasallar ve malzemeler

Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM, Biological Industries, İsrail)

Fetal bovin serum (FBS, Biological industries, İsrail)

Penicillin-streptomycin (antibiyotik, Biological Industries, İsrail)

Tripsin-EDTA Solution C in PBS (Biological Industries, İsrail)

WST-1 (Roche, Almanya)

48 well plate (BD, USA)

96 well plate (BD, USA)

25 cm²'lik hücre kültür flaskı (BD, USA)

15 ml santrifüj tüpü (Nunc, Almanya)

Mikropipet (20µm-100µm-1000µm Scaltec, Almanya)

Disposable pipet (2ml, 5ml, 10ml, Corning)

Etanol (Merck, Almanya)

PBS (fosfat buffer saline) (Sigma, ABD)

Aljnik asit(Sigma, ABD)

Kalsiyum klorür(Sigma, ABD)

Serum fizyolojik

Toluidine blue (Bio Optica)

Sodyum klorür (Amresco, İsrail)

Dimetil metilen mavisi (sigma, ABD)

Sodyum fosfat, EDTA (Amresco, İsrail)

Kondroitin sülfat (sigma, ABD)

N-Acetyl-L-Cysteine (Amresco, İsrail)

EDTA (Amresco, İsrail)

Papain (Sigma, ABD)

Primer antikolar(tip I, tip II, SOX9, GAPDH) (Roche, Almanya)

Hydrolise probe master kit (Roche, Almanya) ve çeşitli cam malzemeler kullanılmıştır.

2.2. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Çözeltiler ve Solüsyonlar

2.2.1. Besiyeri Hazırlanması

%89 Dulbecco's Modified Eagles Medium/F-12 (DMEM/F-12)

%10 Fetal bovin serum

%1 Penicillin-Streptomycin

2.2.2. Double Staining Çalışma Solüsyonunun Hazırlanması

Ribonükleaz A'dan 1mL PBS'de 10 mg RNA olacak şekilde hazırlandı.

Hoechst ise 1 mL PBS'de 200 mikrogram olacak şekilde hazırlandı.

Propidium Iodide 1mL PBS'de 100 mikrogram olacak şekilde hazırlandı.

Solüsyonlar kullanılana kadar – 20 °C'de saklandı.

Çalışma solüsyonunun hazırlanışı:

10 mL PBS içine RNAaz stoktan 100 mikrolitre
Hoechst stoktan 500 mikrolitre
Propidium Iodide stoktan 100 mikrolitre ilave edilerek hazırlandı.

2.2.3. MTT Çalışma Solüsyonunun Hazırlanması

5mg MTT, 1ml PBS de çözüldü.

0,2µ filtreden geçirildi.

Solüsyon kullanılana kadar +4°C de karanlıkta saklandı.

2.2.4. Aljinat Çözeltisinin Hazırlanması

20ml serum fizyolojik içerisinde 0,2 g aljinat tozu çözdürüldü.

Isıtıcılı manyetik tabla üzerinde homojen bir karışım elde edene kadar manyetik balık yardımıyla karıştırıldı.

Hazırlanan %1'lik çözelti UV de yarım saat bekletilerek sterilizasyonu yapıldı.

2.2.5. Çapraz Bağlayıcı Çözeltisinin Hazırlanması

100ml serum fizyolojik içerisinde 5g CaCl₂ çözdürüldü.

Isıtıcılı manyetik tabla üzerinde homojen bir karışım elde edene kadar manyetik balık yardımıyla karıştırıldı.

Hazırlanan %5'lik çözelti UV de yarım saat bekletilerek sterilizasyonu yapıldı.

2.3. Hücre Kültürü

2.3.1. Hücre İzolasyonu

Mezbahanedен tüketim amaçlı kesilen sığırlardan steril pens ve makas yardımı ile çıkartılan kıkırdak doku örnekleri antibiyotikli taşıma solüsyonu içeren şişelere alınarak polistiren kutularda buz kasetleri ile laboratuvara taşındı. Örnekler, laboratuvarında laminar akışlı kabinde antibiyotikli PBS ile yıkandıktan sonra petrilere yerleştirilerek, steril pens, makas ve bistüri yardımı ile dokunun önce dış kısmındaki bağ doku parçaları uzaklaştırıldı. Örnekler yeterince temizlendikten sonra ayrı ayrı steril petri kutularına alındı.

Kıkırdak parçalarından kondrosit hücrelerini izole etmek için steril bir bistüri ile nazikçe kazındı ve çok küçük parçalara ayrıldı. Ardından kollajenaz enzimi ile yarım saat muamele edildi ve santrifüj edilerek dipte kalan doku parçaları alındı. Daha sonra 25cm² lik flasklara koyulan parçaların üzerine 3ml medyum ilave edildi ve etüvde 37 derecede bekletildi. Hücrelerin çoğalmasına paralel olarak 48 saatte bir medyum değiştirildi.

Çalışmanın tümünde hücre kültürleri 37°C de % 5 CO₂ % 95 hava içeren rutubetli ortamda genel hijyen kurallarına uyularak inkübe edildi.

2.3.2. Hücre Sayımı

Hücre sayımı hemositometri ile yapıldı. İnkübasyon sonrasında flask inkübatörden alındı ve steril ortamda Laminar kabinde, flask içerisindeki medyum döküldü ve 0,5ml PBS ile yıkandı. Daha sonra 0,5 ml tripsin-EDTA ilave edilerek flask 3-4 dakika inkübatörde bekletildi. İnkübasyon sonrasında mikroskobik olarak hücrelerin flask yüzeyinden ayrılıp ayrılmadıkları kontrol edildi. Hücrelerin yüzeyden ayrıldıkları mikroskobik olarak gözlendikten sonra, flaska medyum eklenerek hücreler falkon tüpe aktarılarak 2500rpm'de 2 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında süpernatant atıldı, tüpün dibinde kalan hücre pelleti üzerine 1 ml (%10 FBS ve %1 antibiyotik içeren) DMEM/F-12 medyum eklendi. Pipet yardımıyla pellet ve DMEM/F-12 süspanse edildi ve süspanse edildikten sonra 10µl karışımdan alınıp mikrosantrifüj tüpüne koyuldu. Üzerine 10µl tripan blue eklenip homojenize edildi.

Karışımdan 10µl alınıp hemositometri lamına koyuldu. Lam cihaza yerleştirildikten sonra sayım yapıldı.

2.3.3. Kültürü yapılan kondrosit hücrelerinin enkapsülasyonu

Hücre sayımı sonrasında yaşayan 5.0×10^6 hücre pelleti, laminar flow kabin içerisindeki manyetik tabla üzerinde karışmakta olan aljinat çözeltisine eklendi. Aljinat çözeltisinden 10µm lik mikropipet yardımıyla 5µl çekilerek diğer manyetik tabla üzerinde karışmakta olan CaCl_2 çapraz bağlayıcı çözeltisinin içerisine damlatılarak mikrokapsüller oluşturuldu. Yaklaşık 500µm çapında, içerisinde 1250 hücre olacak şekilde damlatma işlemi yapıldı. Yeterli sayıya ulaşan kapsüller, 0., 5., 8., 15., 30. ve 40. günlerde incelenmek üzere ayrı ayrı petrilere konuldu ve her bir petrinin içerisine 7ml medyum konularak etüve kaldırıldı. Petrilerin içerisindeki kapsüllenmiş hücrelerin medyumunu 3 günde bir değiştirildi.

2.3.4. Aljinat İle Kapsüllenmiş Kondrositlerin Toksisitesinin Belirlenmesi

Toksisite deneyi için 48 kuyucuklu pleyt kullanıldı. Her kuyucuğa aynı sayıda kapsül konuldu. Kuyucukların bir kısmına pozitif kontrol için sadece hücre, negatif kontrol için içerisinde hücre bulunmayan kapsüller konuldu. Fenol red'siz DMEM kullanılarak hazırlanan DMEM/F-12 medyumdan 200 µl kuyucuklara koyuldu, üzerine 10 µl WST-1 çözeltisi ilave edildi. 37 °C'de 4 saat inkübe edildikten sonra hücre yaşayabilirliğinin tespiti için 48 kuyucuklu plate'in absorbans yoğunluk değerleri ELİSA plate okuyucuda 420 nm'de okundu..

2.3.5. MTT Test

Her kuyucukta aynı sayıda kapsül olacak şekilde 48 kuyucuklu pleyte yerleştirildi. Kuyucukların bir kısmına pozitif kontrol için sadece hücre, negatif kontrol için içerisinde hücre bulunmayan kapsüller konuldu. Fenol red'siz DMEM kullanılarak hazırlanan DMEM/F-12 medyumdan 200 µl kuyucuklara koyuldu. Üzerlerine 20µl MTT solüsyonu damlatıldı. 3,5 saat inkübasyondan sonra oluşan formazan kristalleini gidermek için üzerlerine 150µl DMSO damlatılıp 15 dk daha inkübe

edildi. Daha sonra hücre yaşayabilirliğinin tespiti için 48 kuyucuklu plate in absorbans yoğunluk değerleri ELİSA plate okuyucuda 590 nm’de okundu.

2.3.6. İkili Boyama Metodu ile Apoptozun ve Nekrozun Belirlenmesi

İkili boyama metodu çekirdeği boyamakta ve bu sayede apoptozu ve nekrozu göstermektedir. Ribonükleaz A kullanılır. – 20 °C’de saklanır (Sigma R-500). Ribonükleaz A RNA’yı boyamaz. Bu sayede sitoplazmik RNA’yı yok eder. Hoechst (33342). boyası +4 °C’da saklanır. Apoptotik hücreleri boyar. Bu sayede gerçek apoptotik hücreler belirlenir. Propidium Iodide: +4 °C’de saklanır. DNA’yı ve RNA’yı boyar. Kırmızıya boyayarak sekonder nekrozu gösterir.

İkili boyama için 48 well plate kullanıldı. Her kuyucuğa aynı sayıda kapsül konuldu. Kuyucukların bir kısmına pozitif kontrol için sadece hücre, negatif kontrol için içerisinde hücre bulunmayan kapsüller konuldu. Üzerlerine 70µl ikili boyama solüsyonu (double staining çalışma solüsyonu) damlatıldı. Hiç ışık görmeyecek şekilde 15dk inkübe edildi. İnkübasyon sonunda floresan mikroskopta DAPI filtresi kullanılarak apoptoza uğramış hücrelerin ve FITC (480-520nm dalga boyunda) nekroza uğramış hücrelerin değerlendirmesi yapıldı.

2.3.7. Toluidine Boyama ile Glikozaminoglikan Depolanmasının Gösterilmesi

Kapsüller dondurmali mikrotom (kryostat) stamplarının üzerine konuldu ve tissue freezing medium yardımıyla -20°C de donduruldu. Donmuş kapsül bloklarından kryostat ile 3µm kalınlığında kesitler alınarak lamel üzerine yerleştirildi. Kesit alma işlemi -20°C de gerçekleşti. Kapsül kesitlerinin olduğu lameller öncelikle %96,%80 ve %70 lik alkol serilerinden geçirildi. Daha sonra üzerlerine 1:10 oranında seyreltilmiş toluidine blue boyası damlatılıp 1 dk bekletildikten sonra boya aspire edildi ve lameller distile su ile yıkandı. Lameller kuruduktan sonra ışık mikroskobunda inceleme yapıldı.

2.3.8. DMMB Analizi ile Glikozaminoglikan Miktarının Belirlenmesi

Temel olarak Kim ve ark.(2011), kullandığı metod takip edildi. Özetle 16 mg Dimetil metilen mavisi, 2,37 g NaCl, 95 ml 0,1 mol/l HCl 1000ml distile suda çözüldü ve pH 3.0 olarak ayarlandı. Hazırlanan DMMB çözeltisi kullanılıncaya kadar kahverengi şişede 4°C de saklandı. Üzerinde kondrosit kültürü yapılmış yaklaşık 1 gr ağırlığındaki makroküre 300 mg/ml papain (Amresco, İsrail), 2 mM EDTA (Amresco, İsrail), 2 mM N-acetyl L-cysteine (Sigma-Aldrich, Almanya) içeren çözelti içerisinde 65°C'de 1 saat süreyle parçalandı. 100 Mm Na₂HPO₄ ve 5mM EDTA 100ml distile suda çözülerek PBE(fosfat buffer edta) tampon çözeltisi hazırlandı. Standart için 125µg/ml kondroitin sülfat, hazırlanan PBE çözeltisi içerisinde çözdürülerek hazırlandı. 0-10µg/ml arasında hazırlanan kondroitin sülfat çözeltileri 48 well plate in kuyucuklarına koyuldu ve üzerlerine 200 µl DMMB stok çözeltisi eklendi. 1 saat süreyle parçalanmış kapsüller 8000 g de 15 dk santrifüj edildikten sonra üstte kalan süpernatant PBE çözeltisi kullanılarak 1-10µg/ml arasında hazırlanıp 3 tekrarlı olarak kuyucuklara yerleştirildi ve üzerlerine 200 µl DMMB stok solüsyonu eklendi. Örnekler 525nm de ELİSA plate okuyucuda okutuldu.

2.3.9. Real Time-PCR ile kondrositlerin Tip I ve II Kollagen, SOX9, ekspresyonlarının değerlendirilmesi

2.3.9.1. RNA izolasyonu:

RNA izolasyonu, High Pure RNA Isolation Kit'i (Roche) kullanılarak yapıldı. Üretici Firmanın katalogundaki protokol takip edildi. Özetle; 8., 15. ve 40. günlerde alınan kapsüllenmiş hücreler 200ml PBS içerisinde süspansiyon haline getirildi. Daha sonra üzerine 400µl Lysis/-Binding Buffer eklendi ve 15 dakika sonikatörde kapsüllerin parçalanması sağlandı. Örnekleri filtre tüpüne transfer etmek için bir filtreli tüp toplama tüpünün içine yerleştirildi, maksimum 700µl örnek alınıp filtreli tüpe aktarıldı ve 8000g de 15 saniye santrifüj edildi. Santrifüjden sonra filtreli tüp toplama tüpünün içinden çıkartılıp sıvı kısmı atıldı ve tekrar filtreli tüp toplama tüpünün içine koyuldu. Steril reaksiyon tüplerinin içine her örnek için 90µl DNase Incubation Buffer koyuldu ve 10µl DNase I eklenip karıştırıldı ve cam filtrenin

üzerindeki solüsyon alınıp filtre tüpünün üst kısmına eklendi. 15 dakika +15 ten 25°C ye kadar sıcaklıkta inkübe edildi. Daha sonra filtrelili tüpe 500µl Wash Buffer I eklendi ve 8000g de 15 saniye santrifüj edildi. Santrifüjden sonra toplama tüpünde kalan sıvı kısım atılıp filtre tüpü yeni bir toplama tüpünün içerisine koyuldu. Daha sonra filtrelili tüpe 500µl Wash Buffer II eklendi ve 8000xg de 15 saniye santrifüjden sonra toplama tüpünün içinde kalan sıvı kısım atıldı. Ardından filtrelili tüpe 200µl Wash Buffer II eklendi ve hiçbir wash buffer kalıntısı kalmaması için 2 dk maksimum hızda (yaklaşık 13000g) santrifüj edildi ve daha sonra toplama tüpü atıldı ve filtrelili tüp temiz ve steril 1.5ml lik mikrosantrifüj tüplerine yerleştirildi. RNA nın ayrıştırılması için; filtre tüpüne 50-100µl Elution buffer eklenerek 8000g de 1 dakika santrifüj edildi. Mikrosantrifüj tüpünün içine ayrıştırılan RNA, RT-PCR da kullanılmak üzere – 80°C de saklandı.

2.3.9.2. cDNA sentezi:

cDNA sentezi, Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis kit'i (Roche) kullanılarak yapıldı. Üretici firmanın katoloğundaki protokol takip edildi. İlk olarak RNA'lardan cDNA sentezi için elde ettiğimiz her bir derişimde ki RNA örneklerine, primer ve su karışımını son hacim 13 µl olacak şekilde hazırlayarak 65°C 'de 10 dakika Termal Cycle Cihazında inkübe edildi. Ardından PCR karışımı hazırlandı.

Her bir örnek için cDNA PCR karışımı oranları Çizelge 2.1' de gösterilmiştir.

Çizelge 2.1. cDNA PCR karışım oranları

Transcription Reverse Buffer	4 µl
Protector RNase Inhibitör	0,5 µl
Deoxynucleotide Mix	2 µl
Transcriptor Reverse Transcriptase	0,5 µl
Son hacim	7 µl

Son hacim 20 µl olarak Termal Cycle Cihazında 55 °C de 30 dakika, 85 °C de 5 dakika inkübe edildi. Elde edilen cDNA'lar böylece çoğaltılmış oldu.

Kullanılan primerler:

1. Kollagen tip II Primer ileri (forward): 5' ATC CAT TGC AAA CCC AAA GG
Primer geri (reverse): 5' CCA GTT CAG GTC TCT TAG AG
2. Kollagen tip I Primer ileri (forward): 5' TGC TGG CCA ACC ATG CCT CT
Primer geri (reverse): 5' CGA CAT CAT TGG ATC CTT GCA G
3. SOX9 Primer ileri (forward): 5' CAT GAA GAT GAC CGA CGA G
Primer geri (reverse): 5' CGT CTT CTC CGT GTC GGA
4. GAPDH Primer ileri (forward): 5' CCT TCA TTG ACC TTC ACT ACA TGG TCT A
Primer geri (reverse): 5' TGG AAG ATG GTG ATG GCC TTT CCA TTG (9)

2.3.9.3. Real Time PCR (Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu):

PCR Mix'in hazırlanması:

PCR mix hazırlanırken her bir örnek için su (4µl), Light Cyler 480 Probes Master (10µl), Real Time Ready Assay (1µl) toplam hacim 15 µl olacak şekilde hazırlandı. Hazırlanan mix, vortex kullanılmadan pipetaj yapılarak karıştırıldı. Light Cyler 480 multiwell plate in her kuyucuguna PCR Mix'ten 15 µl, üzerine 5µl cDNA eklendi. Kuyucuklardaki hacim 20 µl oldu. Multiwell Plate 2 dk 1500 x g santrifüj edildi. Santrifüj işleminden sonra plate cihaza yerleştirilip kullanılan olan Monocolor Hydrolysis Probe/ UPL Probe programı seçildi. UPL Probe için gerekli protokoller cihazda seçildikten sonra Light Cyler 480 PCR başlatıldı.

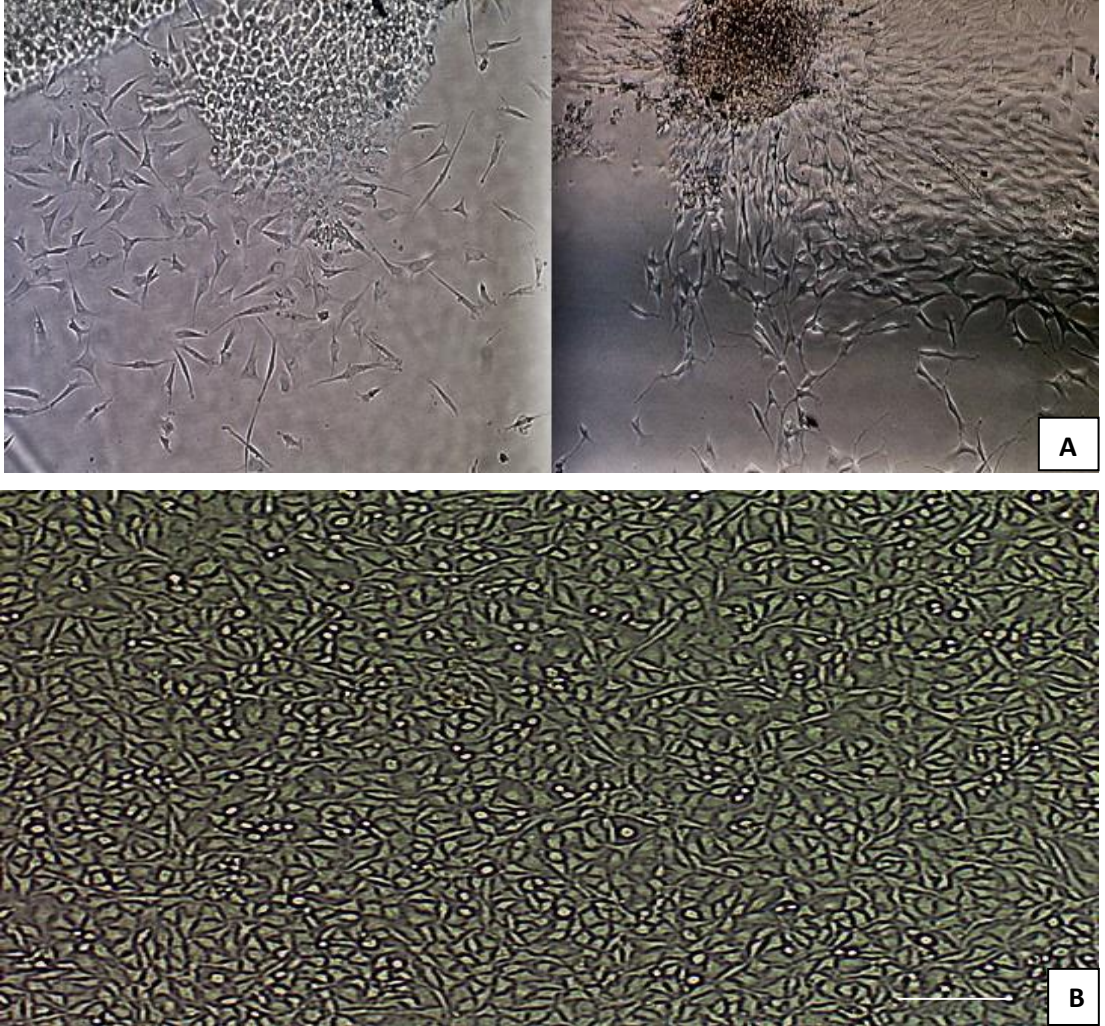
Çizelge 2.2. Roche LightCyler 480 koşulları.

	Sıcaklık- Zaman	Döngüler
Ön İnkübasyon Evresi	95°C'de 10 dk	1
Büyüme Evresi	95°C'de 15 sn	45
Soğutma Evresi	72°C'de 1 sn	1

3. ARAŞTIRMA BULGULARI

3.1. Hücre izolasyonu:

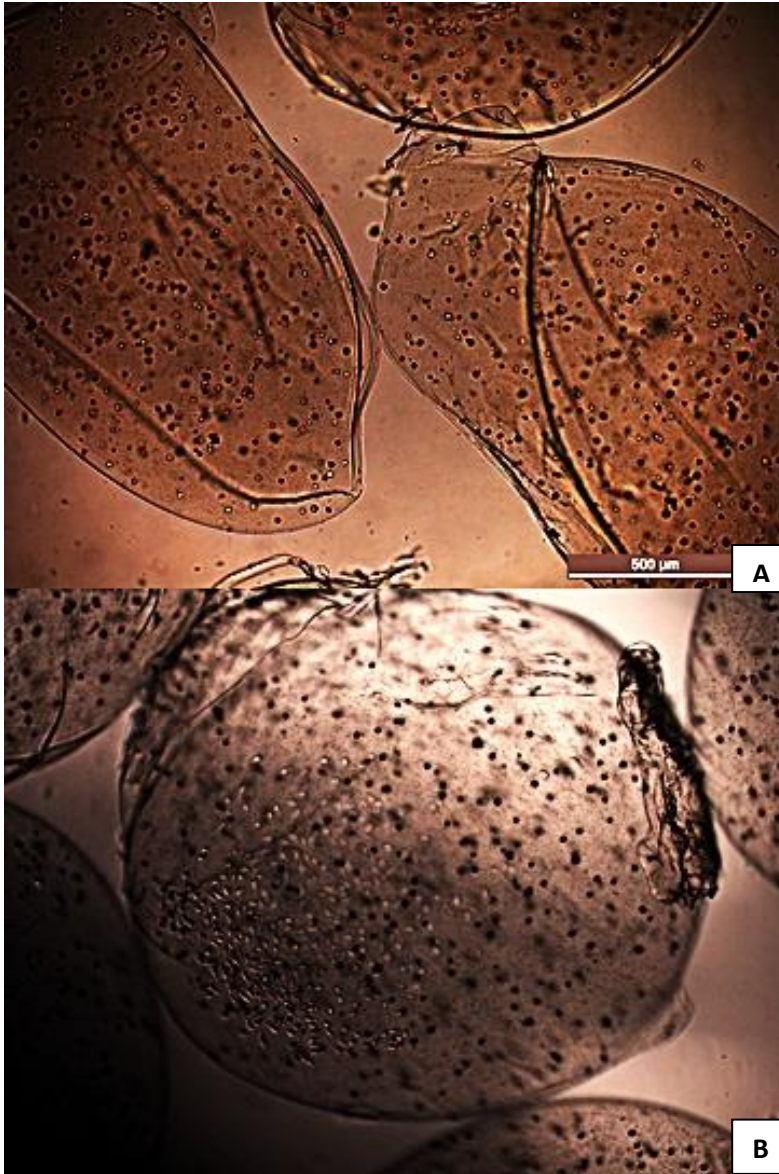
Yapılan çalışmada, primer kültürü yapılan kıkırdak dokudan 1 hafta içerisinde hücre kolonisi oluşumu gözlenmiştir ve yaklaşık 2 hafta içerisinde hücreler istenilen sayıya ulaşmıştır. Kondrosit hücrelerinin mikroskop görüntüleri Şekil 3.1’de gösterilmiştir.



Şekil 3.1 : **A)** kıkırdak dokudan izole olan fibroblast benzeri kondrosit hücreleri, **B)** birinci pasajdan sonra fibroblast benzeri kondrosit hücreleri (Bar=200µm-10X büyütmede LeicaDM6000 İverted Mikroskop ile görüntülenmiştir.)

3.2. Kùltürü yapılan kondrosit hücrelerinin kapsülasyonu:

Sayımı yapılan 5.0×10^6 yaşayan kondrosit hücresinin kapsülasyonu yapılmış ve yaklaşık 500 μm çapında kapsüller elde edilmiştir. 15. günden itibaren kapsül içerisindeki kondrositlerde, kapsül yüzeyine tutunma ve 2 boyutlu hücre kültüründeki fibroblasta farklılaşan hücre morfolojisi gözlenmiştir.



Şekil 3.2. A) Kapsül içerisindeki kondrosit hücreleri 5. gün,
B) Kapsül içerisindeki kondrosit hücreleri 15. gün.

(20X büyütmede LeicaDM6000 İverted Mikroskop ile görüntülenmiştir.)

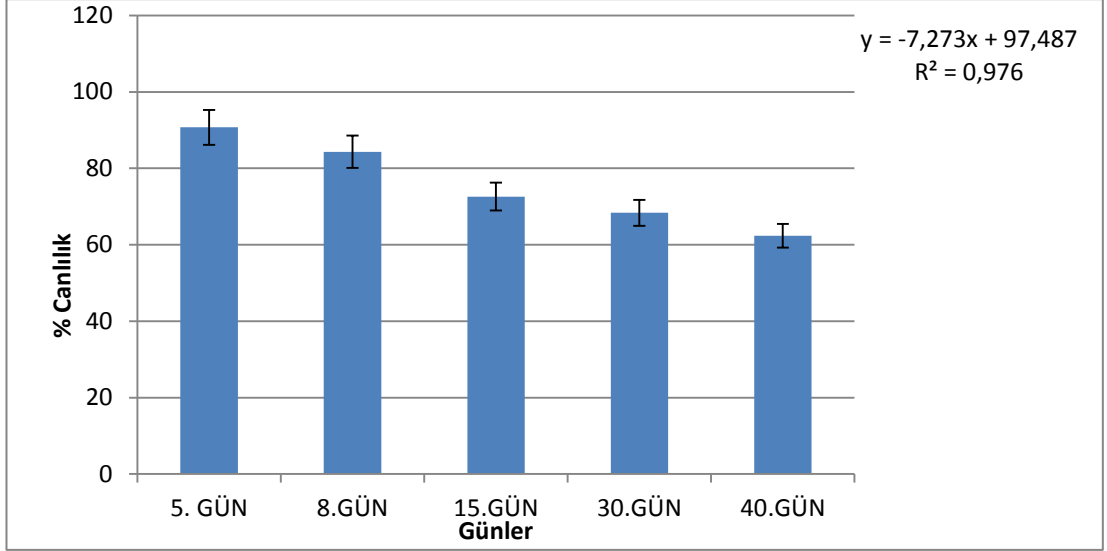
3.3. Aljinat İle Kapsüllenmiş Kondrositlerin Toksisitesinin Belirlenmesi

WST-1 ile yapılan sitotoksisite testinde aljinat kapsülün kondrosit hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi Çizelge 3.1’de ve Şekil 3.3’de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. Aljinat kapsülün kondrosit hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi.

WST-1		absorbans (440nm)	% canlılık
5.gün	kapsüllü hücreler	0,192 ± 0,082	90,72
	Kontrol	0,212 ± 0,023	100
8.gün	kapsüllü hücreler	0,109 ± 0,051	84,32
	Kontrol	0,130 ± 0,068	100
15.gün	kapsüllü hücreler	0,167 ± 0,041	72,61
	Kontrol	0,230 ± 0,003	100
30.gün	kapsüllü hücreler	0,072 ± 0,010	68,35
	Kontrol	0,105 ± 0,039	100
40.gün	kapsüllü hücreler	0,240 ± 0,034	62,34
	Kontrol	0,338 ± 0,037	100

Çizelge 3.1’ deki sonuçlara göre 5. Gündeki canlılık oranı %90,72 olup, 8. Günde %6,40 oranında azalma olmuştur. 15. Günde, 8. Güne göre % 11,71 oranında azalma olmuştur. 30. Günde 15. Güne göre % 4, 26 oranında azalma olmuştur. 40. Günde ise canlılık % 62,34’ e gerilemiştir fakat, hücre canlılığı buna rağmen %50’ nin üzerinde hesaplanmıştır.



Şekil 3.3. Aljinat ile kapsüllenen hücrelerin WST-1 Testi sonucundaki canlılık düzeyleri.

3.4. MTT Testi

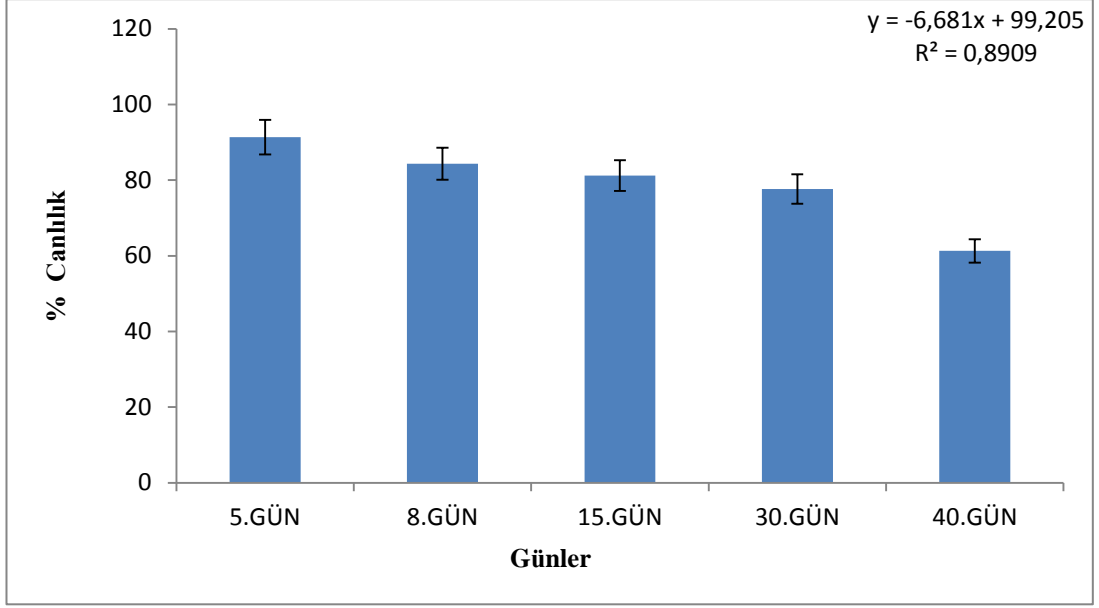
MTT (3-(4,5-dimetildiazol-2-il)-2,5 difenil tetrazolyum bromür) metodunda canlı hücrelerdeki mitokondriyal dehidrojenaz enziminin, sarı renkli bir çözelti olan MTT çözeltisini, suda çözünmeyen formazan tuzuna dönüştürmesi ve oluşan renkli kristallerin izopropanol/HCl ile çözülerek, çözeltinin optik yoğunluğunun 570 nm’de spektrofotometrik olarak belirlenmesi prensibine dayanır (61)

Elde edilen verilere göre aljinat kapsülün kondrosit hücrelerinin metabolik aktivitesi üzerindeki etkisi Çizelge 3.2’ de ve Şekil 3.4’de gösterilmiştir.

Çizelge 3.2. Aljinat kapsülün kondrosit hücrelerinin metabolik aktivite ve canlılığı üzerindeki etkisi.

MTT		absorbans (590nm)	% canlılık
5.gün	kapsüllü hücreler	0,095 ± 0,01	91.37
	Kontrol	0,104 ± 0,005	100
8.gün	kapsüllü hücreler	0,076 ± 0,003	84.32
	Kontrol	0,090 ± 0,005	100
15.gün	kapsüllü hücreler	0,069 ± 0,06	81,17
	Kontrol	0,085 ± 0,001	100
30.gün	kapsüllü hücreler	0,066 ± 0,005	77.65
	Kontrol	0,085 ± 0,001	100
40.gün	kapsüllü hücreler	0,070 ± 0,06	61.30
	Kontrol	0,115 ± 0,005	100

Çizelge 3.2'deki MTT sonuçlarına göre 5. gündeki kapsüllenmiş hücrelerin canlılık oranı kontrol grubuna yakın olmakla birlikte % 91,37 oranındadır. 8. günde canlılık %7,05 oranında azalmıştır. 15. günde canlılık 8. güne göre %2,95 azalmıştır. 30. günde canlılık 15. güne göre % 4,05 oranında azalmıştır. 40. günde canlılık 30. güne göre % 16,35 azalmasına rağmen % 50 nin üzerinde canlılık vardır.



Şekil 3.4. Aljinat ile kapsüllenen hücrelerin canlılık oranları.

3.5. İkili Boyama Metodu İle Apoptotik ve Nekrotik İndeks Sonuçları

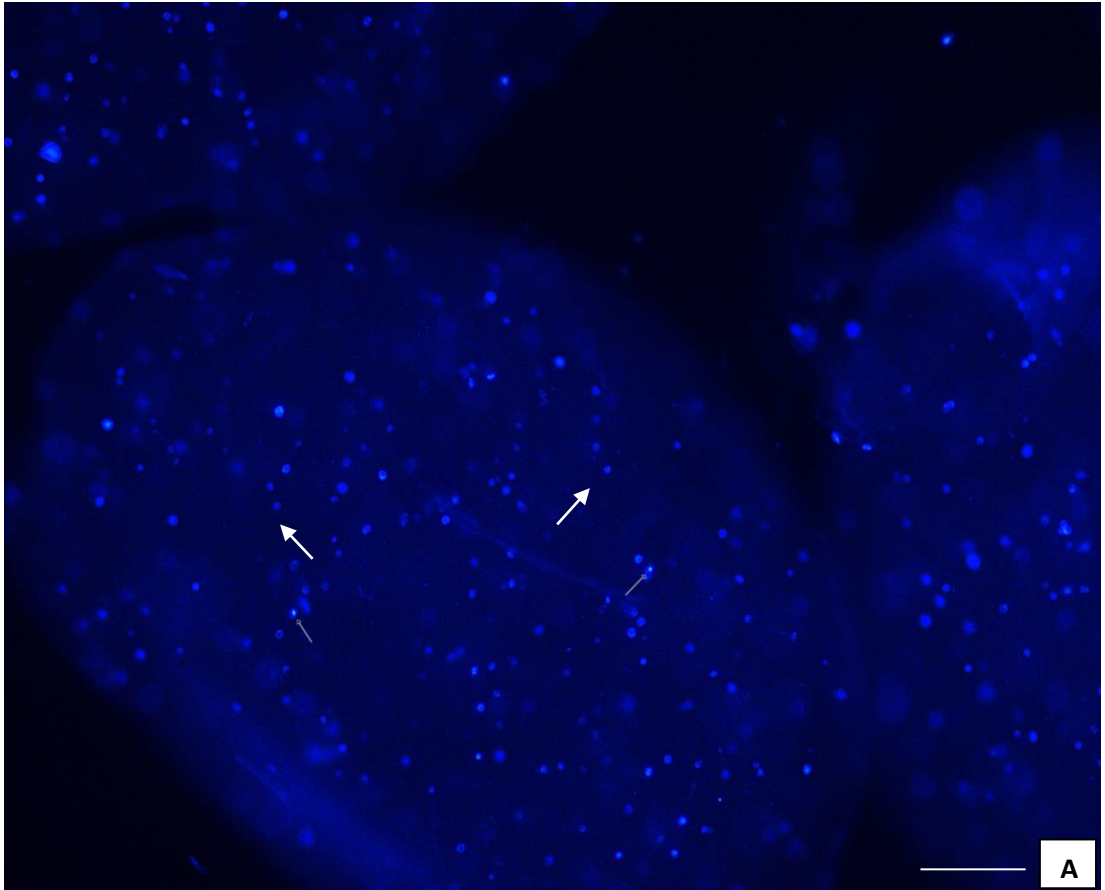
3.5.1. Apoptotik indeks sonuçları:

Kapsüllenmiş kondrosit hücrelerinde apoptozun belirlenmesi için ikili boyama metodu kullanılmıştır. İkili boyama solüsyonu içerisinde bulunan Hoechst (33342) flouresan boyası DNA'ya bağlanarak mavi flouresan ışık altında hücre çekirdeklerinin mavi renge boyanmasını sağlar. Apoptotik hücre çekirdekleri, parçalanmış, daha parlak ve çekirdek sınırları bozulması vb. özelliklerinden diğer mavi boyanmış çekirdeklerden ayırt edilirler.

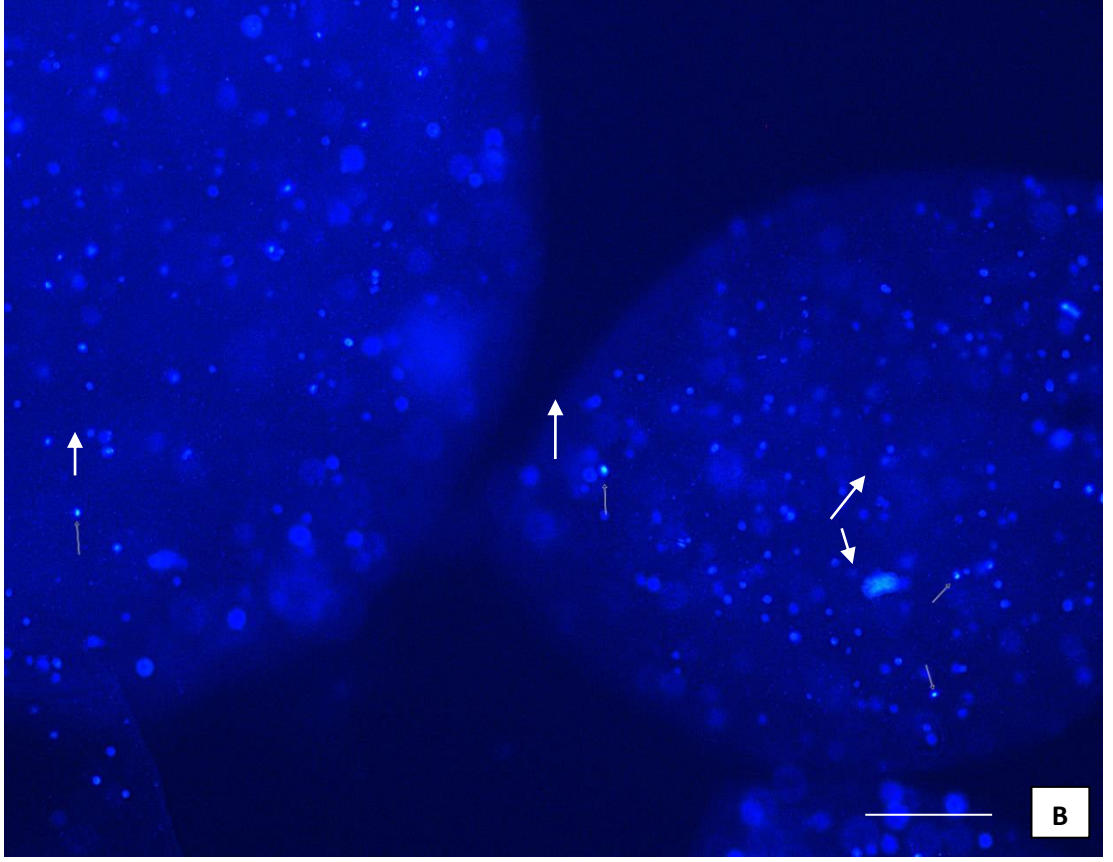
Çizelge 3.3. Kapsüllenmiş kondrosit hücrelerinin 5., 8., 15., 30. ve 40. günlerdeki apoptotik indeks sonuçları

	Kontrol (Kapsüllenmemiş hücre)	5.gün	8.gün	15.gün	30.gün	40.gün
% Apoptoz	1±	3,03±0,71	5,45±0,50	5,65±2,38	16,39±3,54	17,31±1

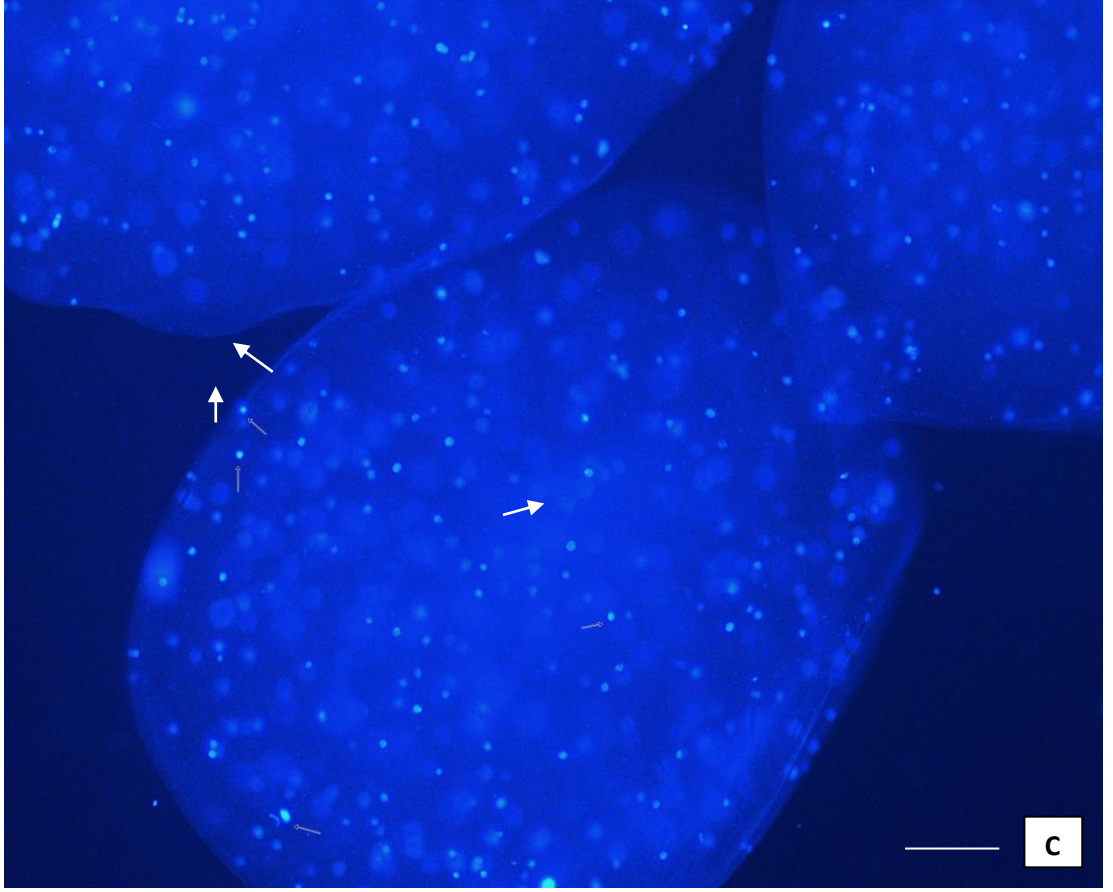
Çizelge 3.3' de belirtilen sonuçlara göre kapsüllenen kondrosit hücrelerinin 5. günde apoptotik indeksi diğer günlere göre en düşüktür. İlerleyen günlerde apoptoz oranı düşük oranlarda artış göstermiş fakat buna rağmen %20' yi bulamamıştır.



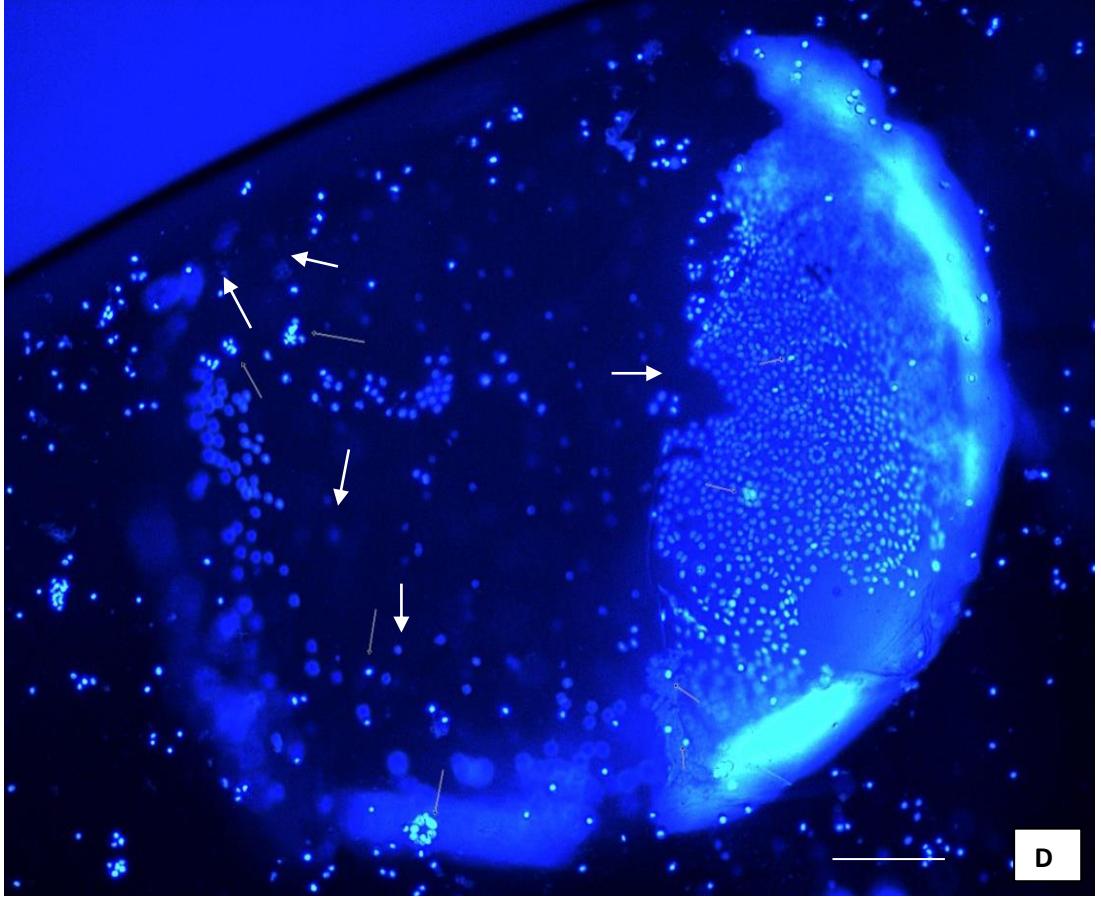
Şekil 3.5 Kapsüllenen kondrosit hücrelerinin 5. gündeki DAPI görüntüsü. (Bar=200µm-10X büyütmede Leica DM6000 ile görüntülenmiştir)



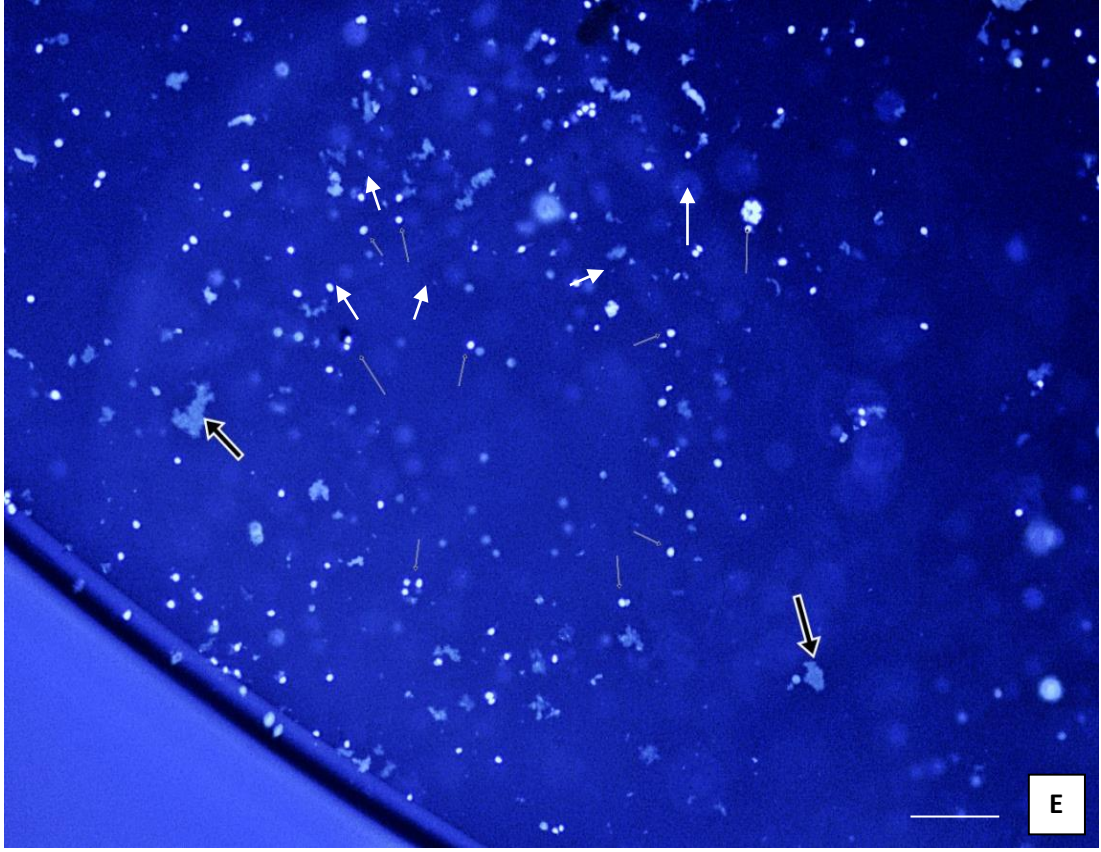
Şekil 3.6: Kapşüllenmiş kondrosit hücrelerinin 8. gündeki DAPI görüntüsü (Bar=200µm-10X büyütmede Leica DM6000 ile görüntülenmiştir)



Şekil 3.7 : Kapsüllenmiş kondrosit hücrelerinin 15. gündeki DAPI görüntüsü (Bar=200µm-10X büyütmede Leica DM6000 ile görüntülenmiştir)



Şekil 3.8 : Kapsüllenmiş kondrositlerin 30. gündeki DAPI görüntüsü (Bar=200µm-10X büyütmede Leica DM6000 ile görüntülenmiştir)



Şekil 3.9 : Kapsüllenmiş kondrositlerin 40. Gündeki DAPI görüntüsü, siyah oklar; degrades olmuş kapsül parçaları (Bar=200µm-10X büyütmede Leica DM6000 ile görüntülenmiştir)

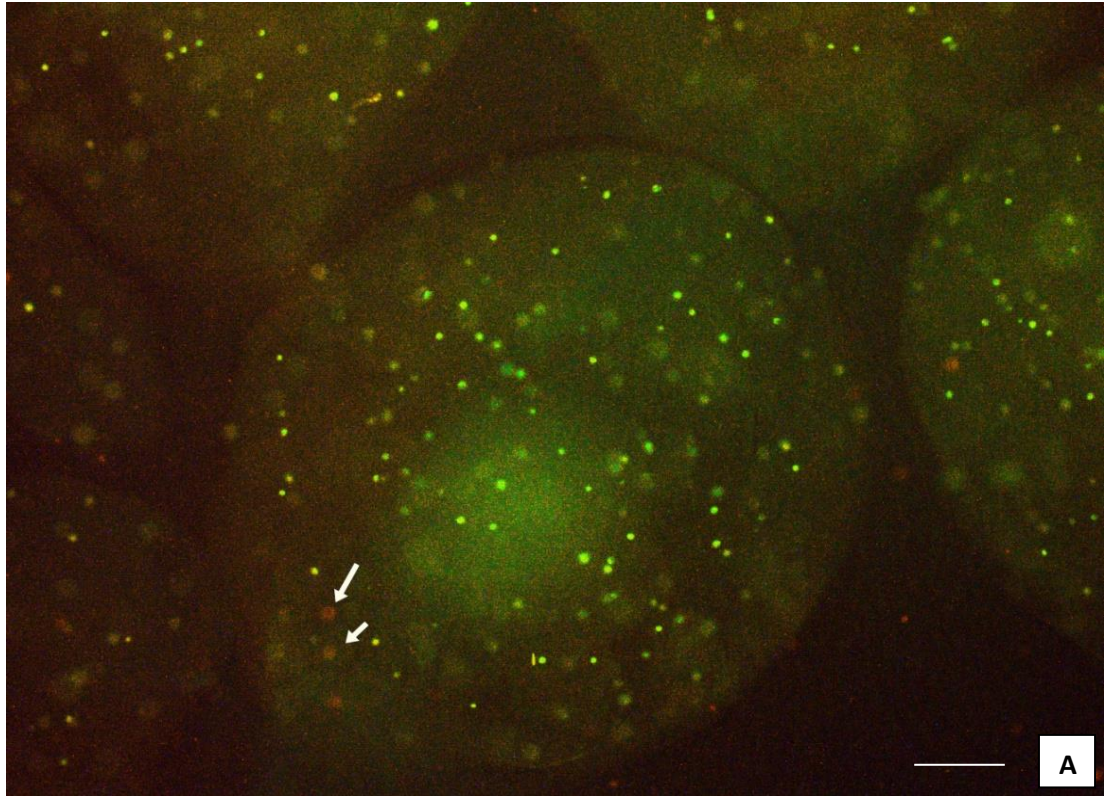
3.5.2. Nekrotik İndeks Sonuçları

Kapsüllenmiş kondrosit hücrelerinde nekrozun belirlenmesi için, apoptozda olduğu gibi ikili boyama metodu kullanılmıştır. İkili boyama solüsyonu içerisinde bulunan propodium iyodid floresan boyası ile boyandığında nekroza uğramış hücrelerin çekirdekleri kırmızı floresan ve yeşil floresan ışık altında kırmızı olarak görülmekte olup hücrelerin nekroza uğradığını göstermektedir.

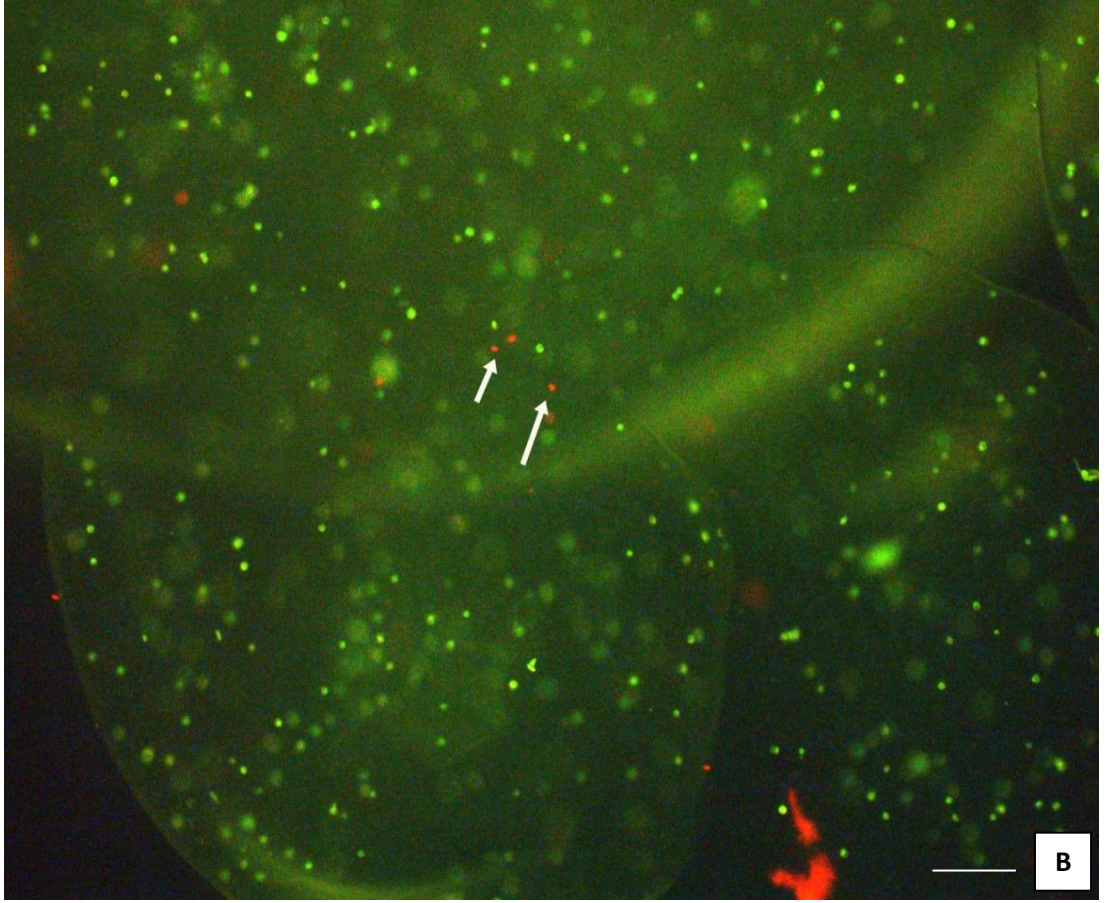
Çizelge 3.4. : Kapsüllenmiş kondrosit hücrelerinin 5., 8., 15., 30. Ve 40. günlerdeki nekrotik indeks sonuçları

	kontrol (kapsüllenmemiş hücre)	5.gün	8.gün	15.gün	30.gün	40.gün
% nekroz	1±	0,61±0,71	1,82±0,50	3,23±1,63	14,75±5,66	16,54±2,83

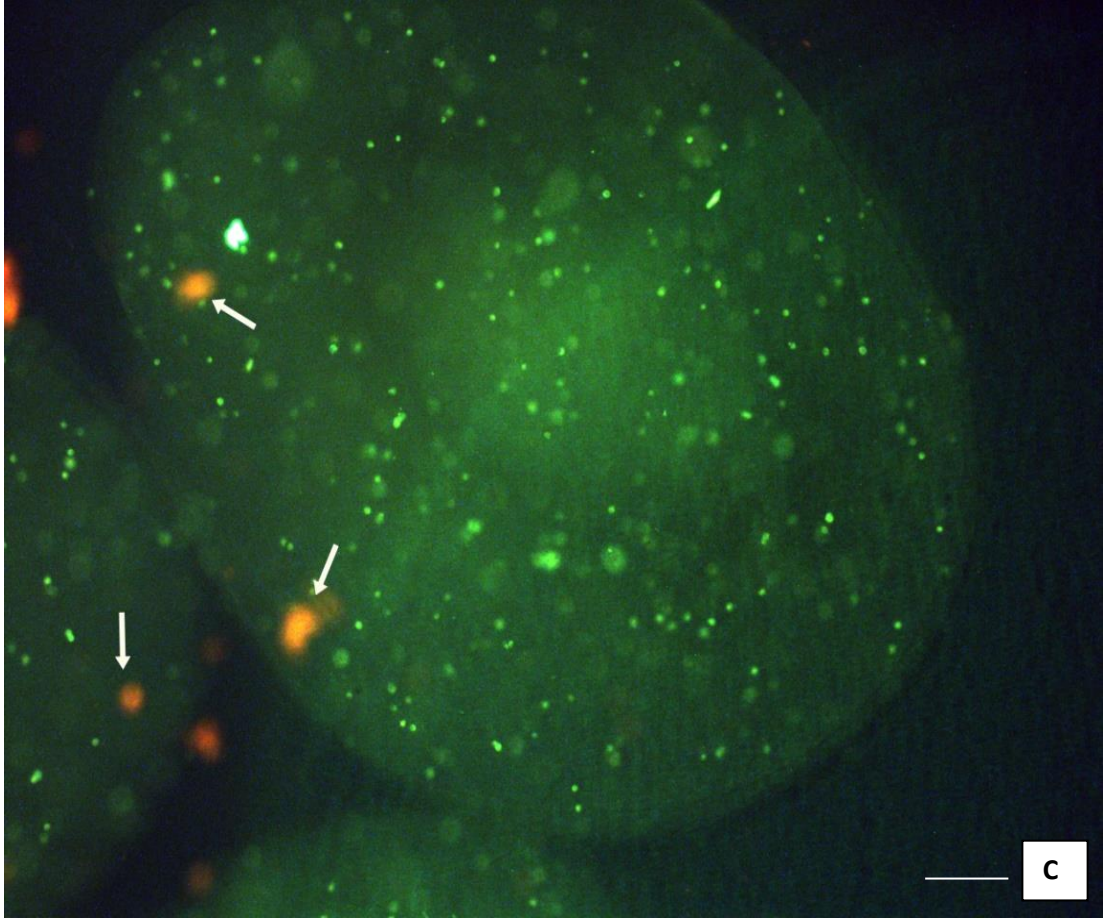
Çizelge 3.4' teki sonuçlara göre kapsüllenmiş kondrosit hücrelerinin 5. gününde nekrotik indeksi en düşüktür. İlerleyen günlerde düşük oranda artış göstermiş olmasına rağmen 40. günde nekroz oranı %16,54 olup %20 yi bulmamıştır.



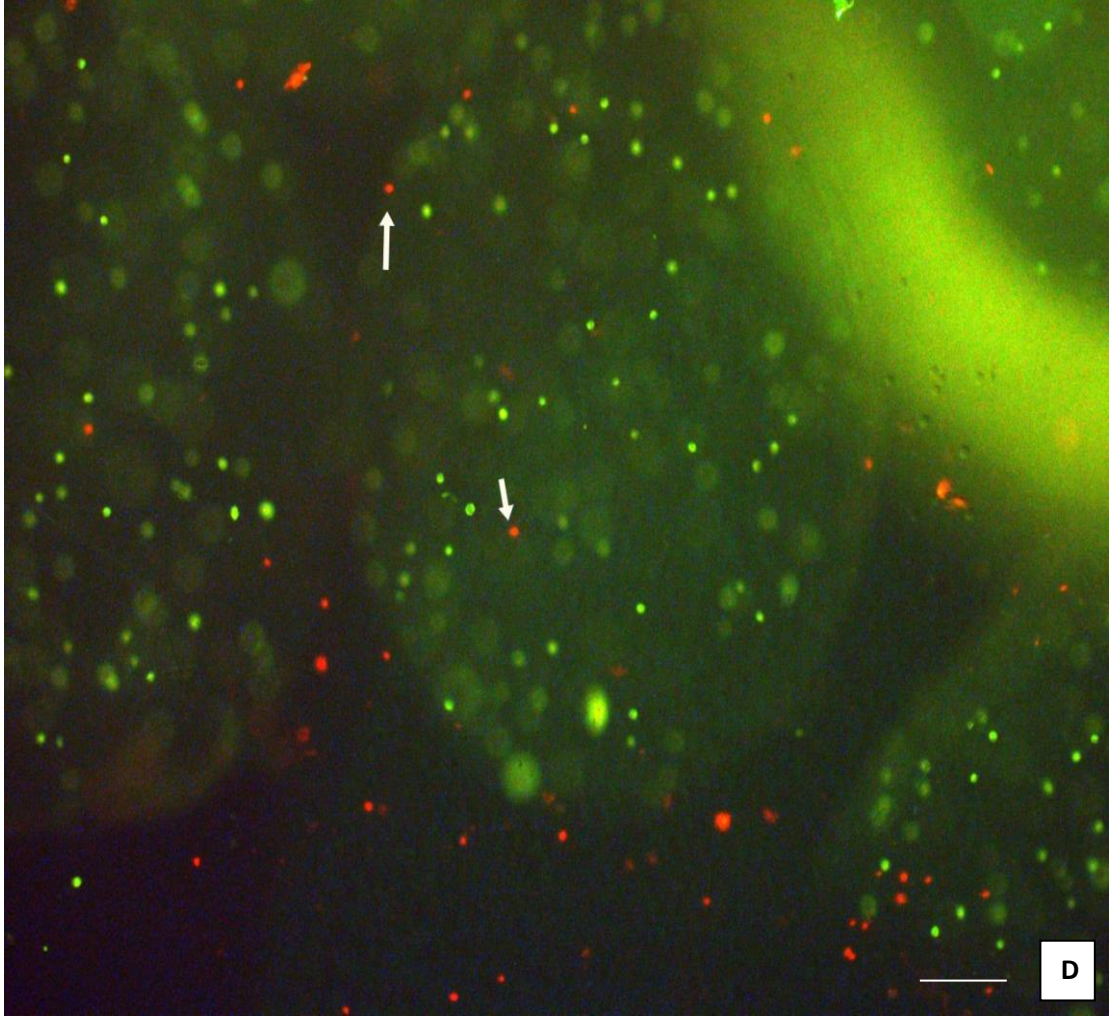
Şekil 3.10 : Kapsüllenmiş kondrositlerin 5. günündeki FITC görüntüsü (Bar=200µm-10X büyütmede Leica DM6000 ile görüntülenmiştir)



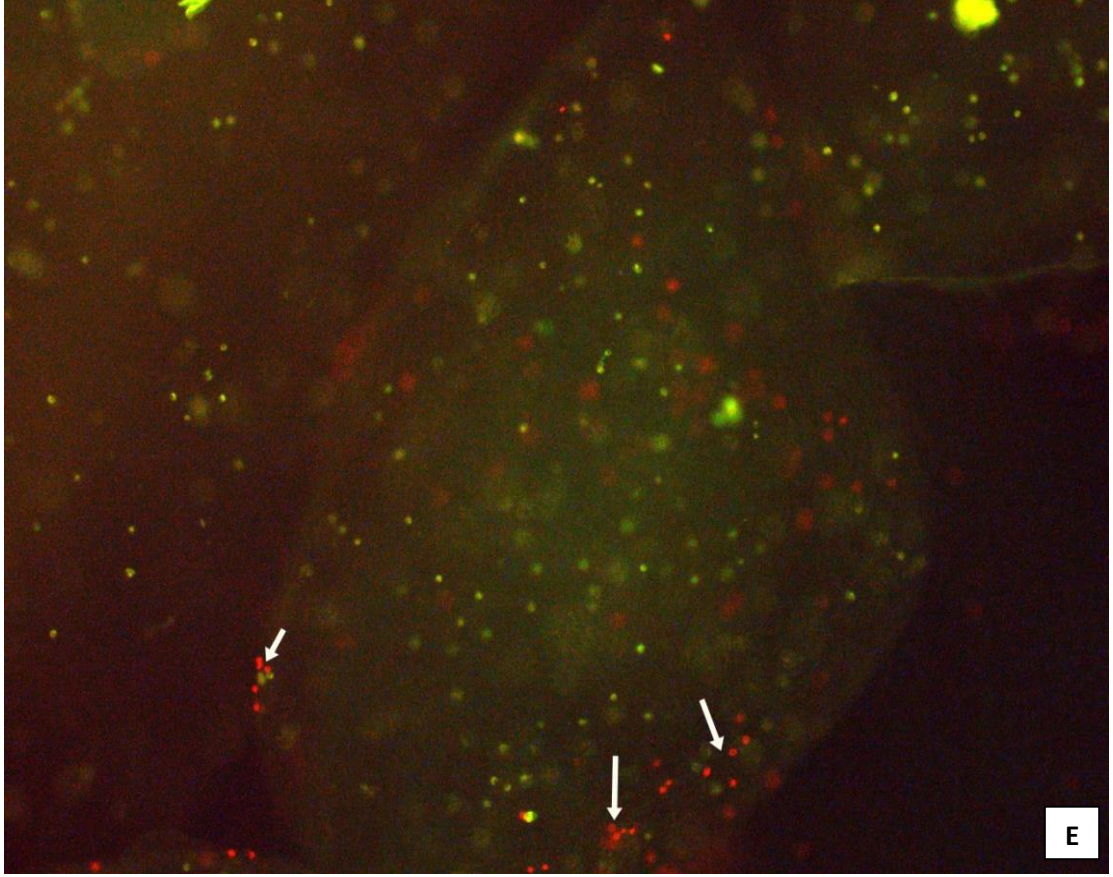
Şekil 3. 11 : Kapsüllenmiş kondrositlerin 8. gündeki FITC görüntüsü (Bar=200µm-10X büyütmede Leica DM6000 ile görüntülenmiştir)



Şekil 3.12 : Kapşüllenmiş kondrositlerin 15. gündeki FITC görüntüsü (Bar=200µm-10X büyütmede Leica DM6000 ile görüntülenmiştir)



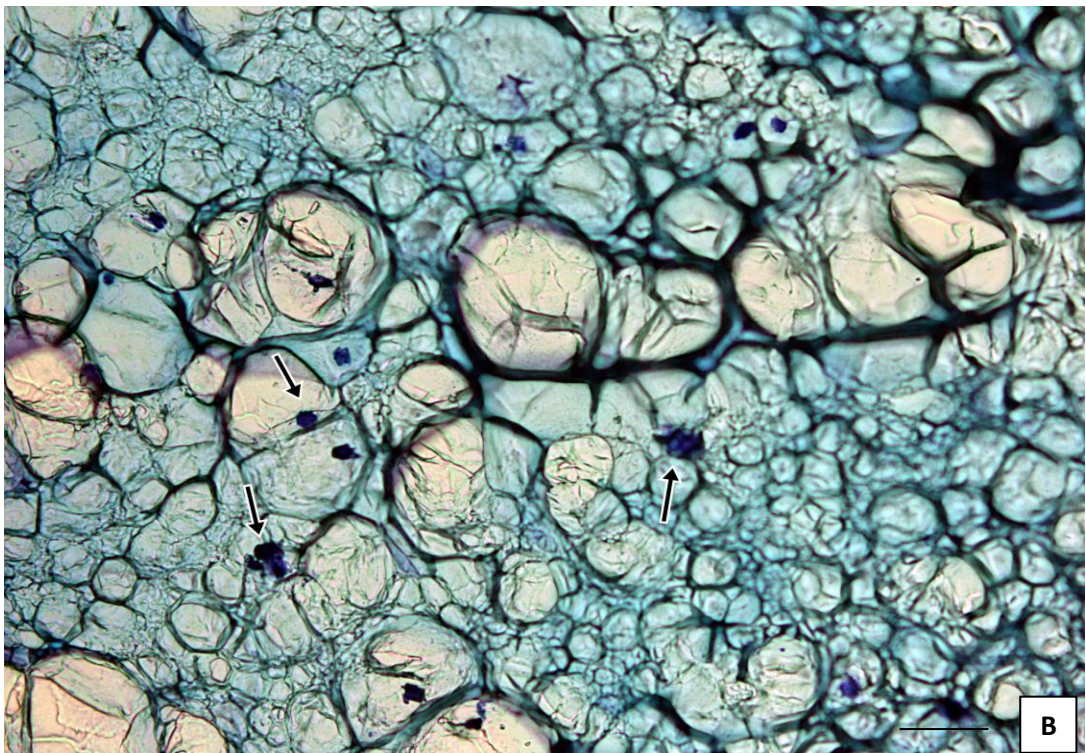
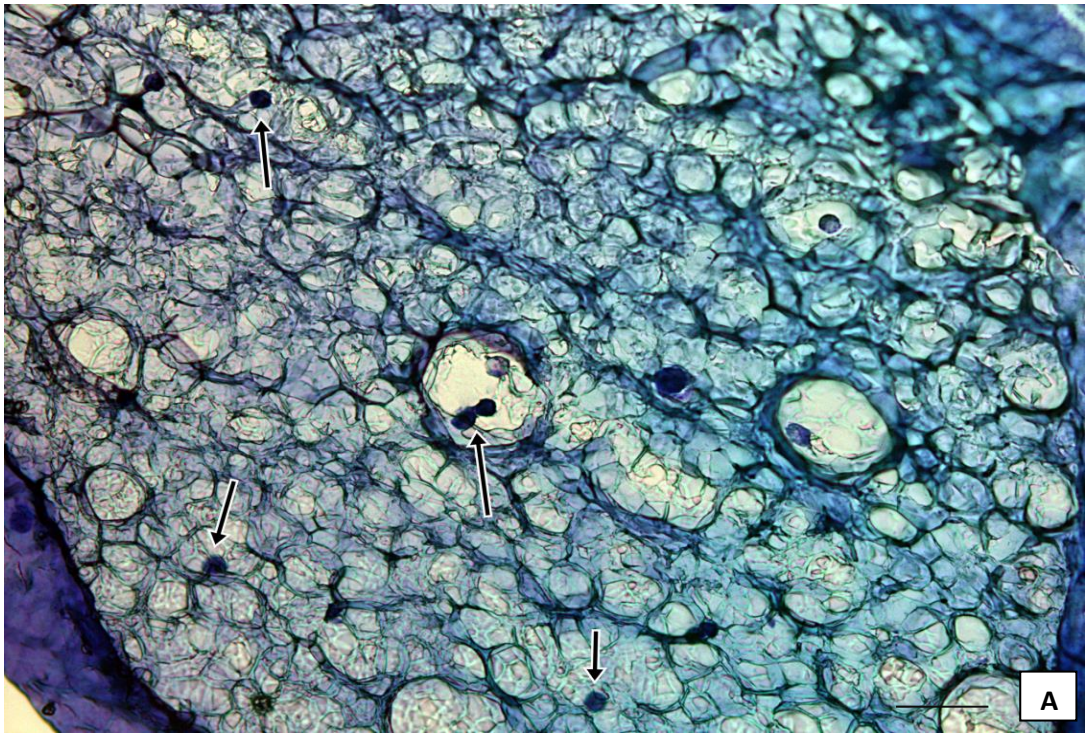
Şekil 3.13 : Kapsüllenmiş kondrositlerin 30. gündeki FITC görüntüsü (Bar=200µm-10X büyütmede Leica DM6000 ile görüntülenmiştir)

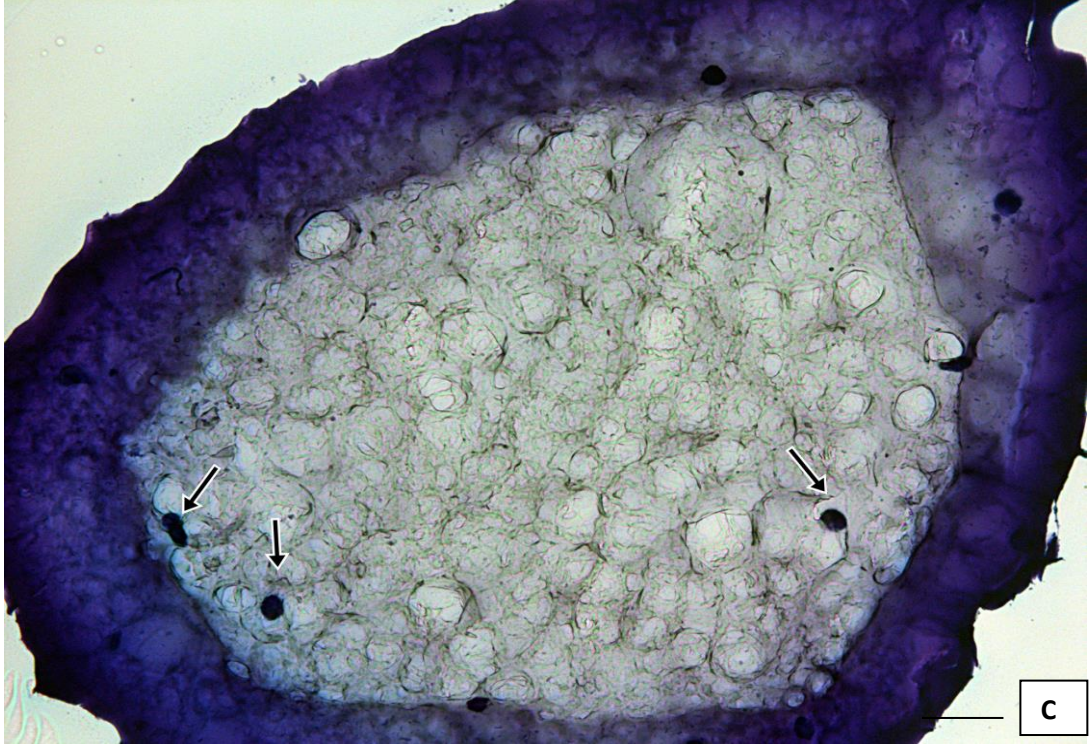


Şekil 3.14 : Kapsüllenmiş kondrositlerin 40. gündeki FITC görüntüsü (Bar=200µm-10X büyütmede Leica DM6000 ile görüntülenmiştir)

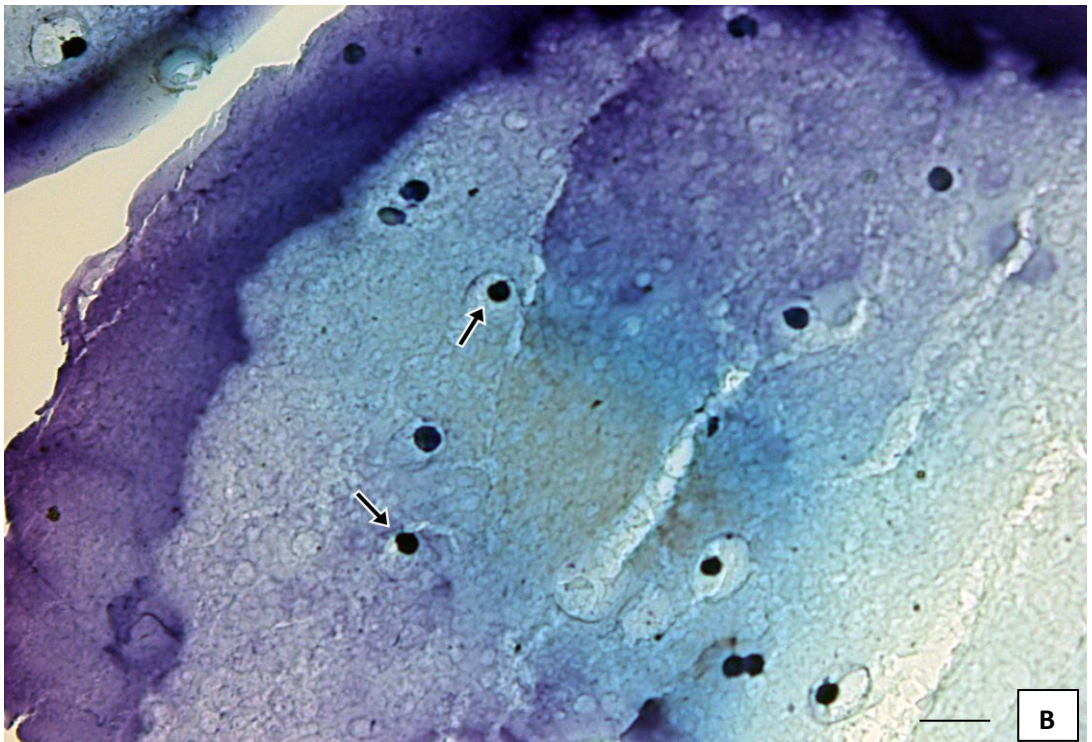
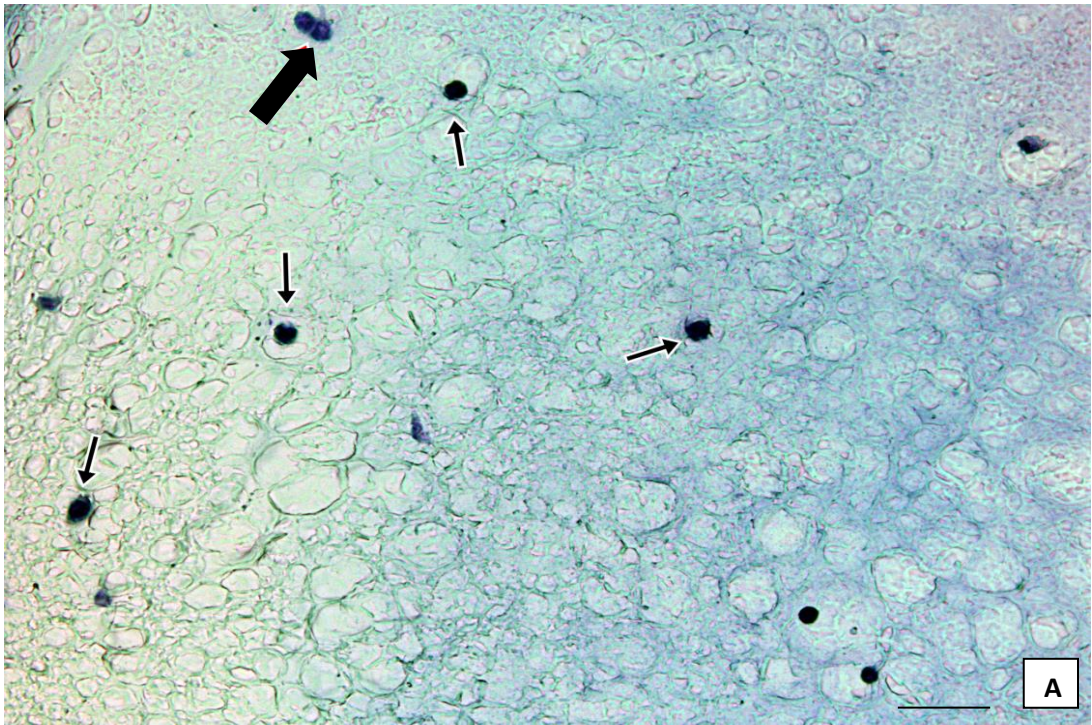
3.6. Toluidin Boyama ile Glikozaminoglikan Sentezinin Belirlenmesi

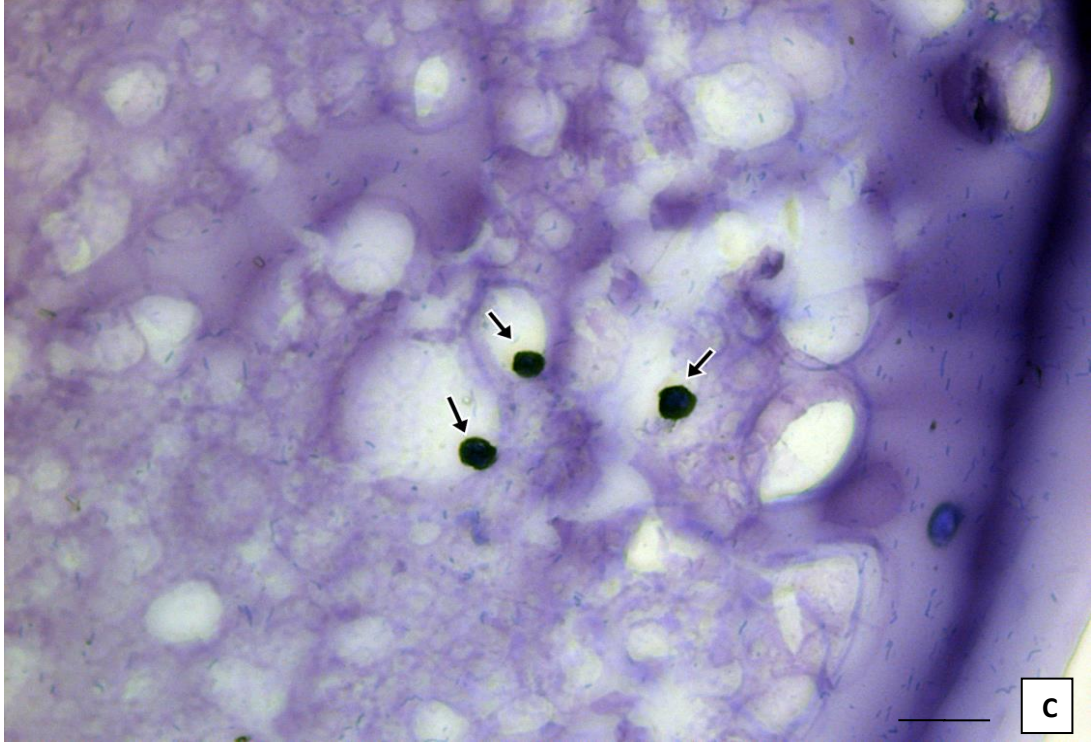
Dokulardaki GAG içeriğini biyokimyasal yöntemlerle tanımlamak zordur. Buna karşın histolojik boyamalarla GAG' lar görülür hale getirilebilir. Metakromatik özellikte katyonik bir boya olan toluidin mavisi, GAG ları mor renge boyar (66).



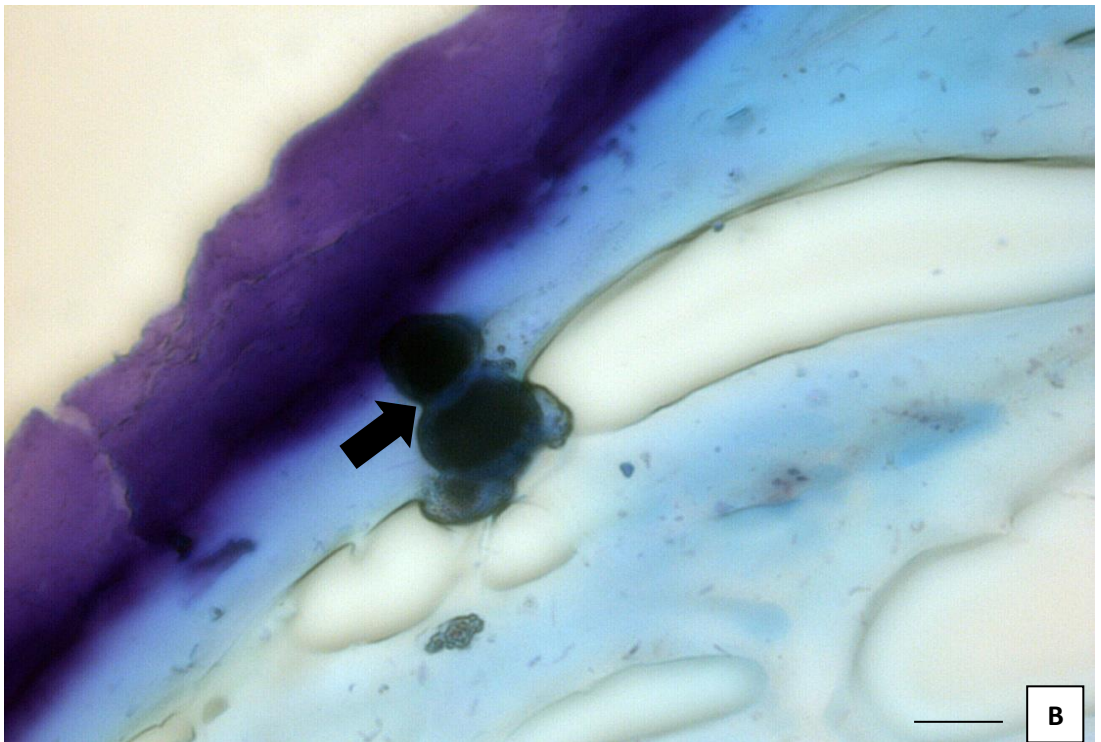
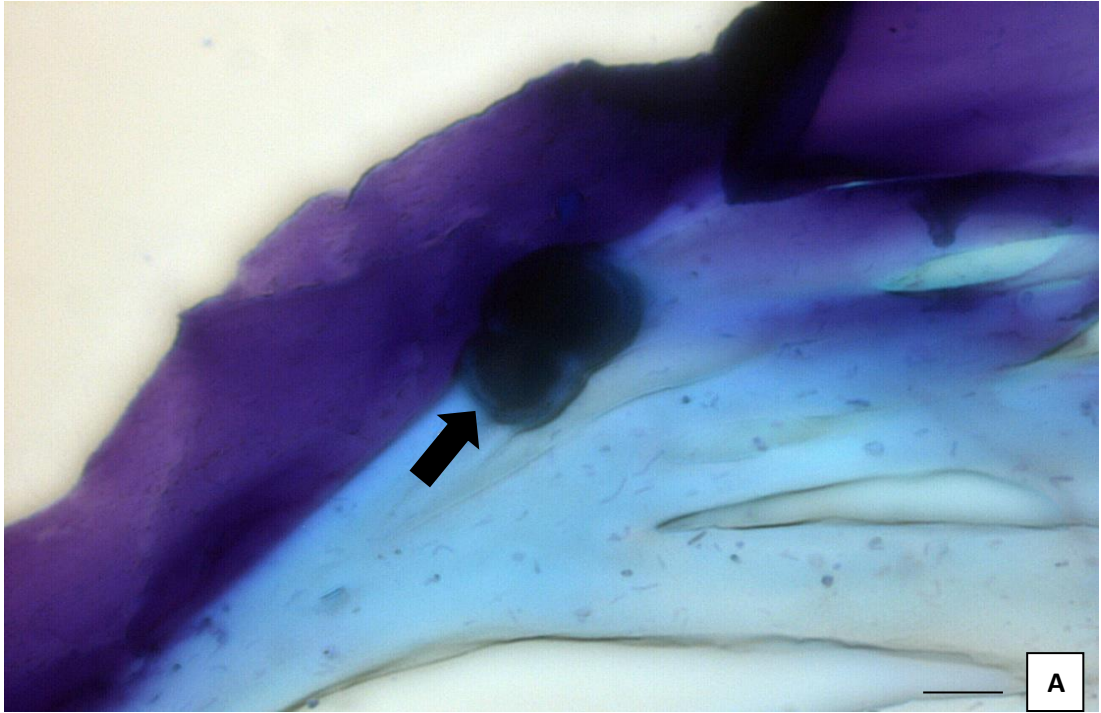


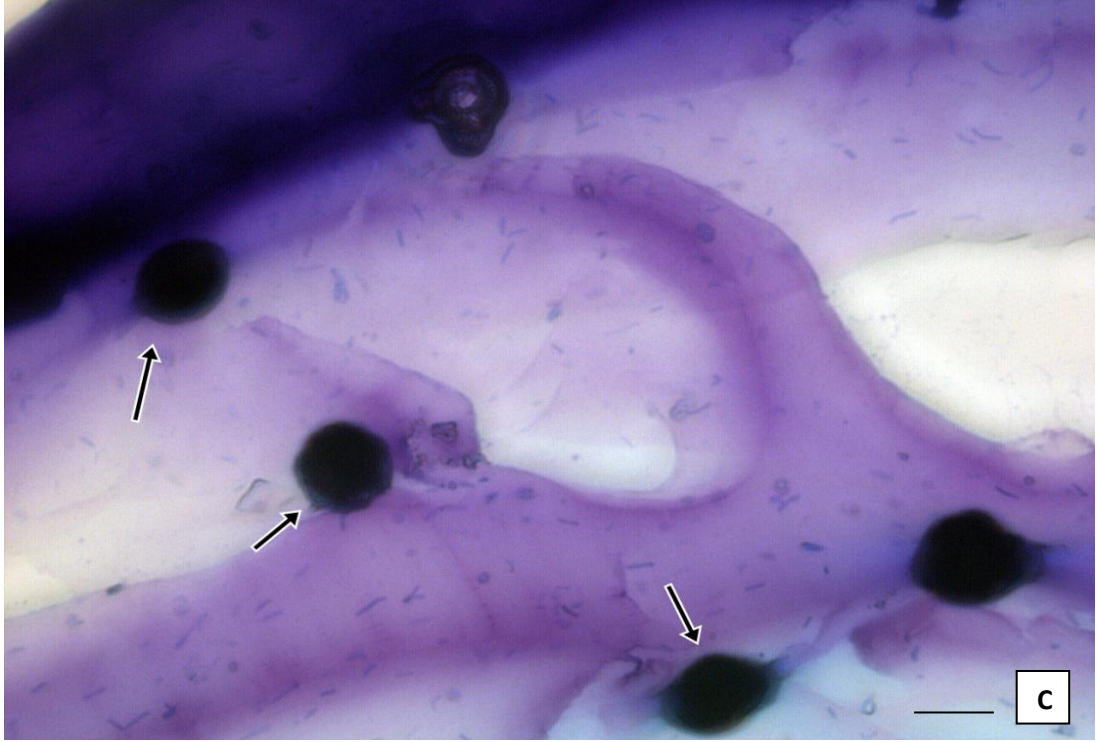
Şekil 3.15 : A,B,C) Kapsüllenmiş kondrositlerin toluidin mavisi ile 5. gündeki görüntüsü
(Bar=65µm-200X büyütmede Leica DM6000 ile görüntülenmiştir)



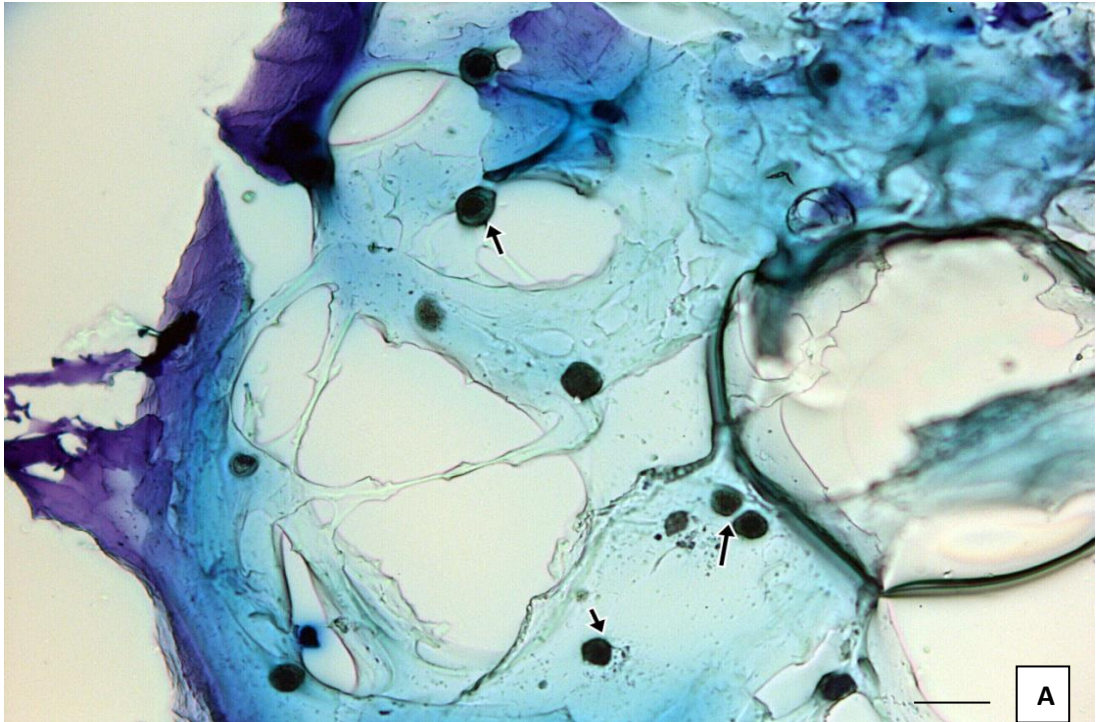


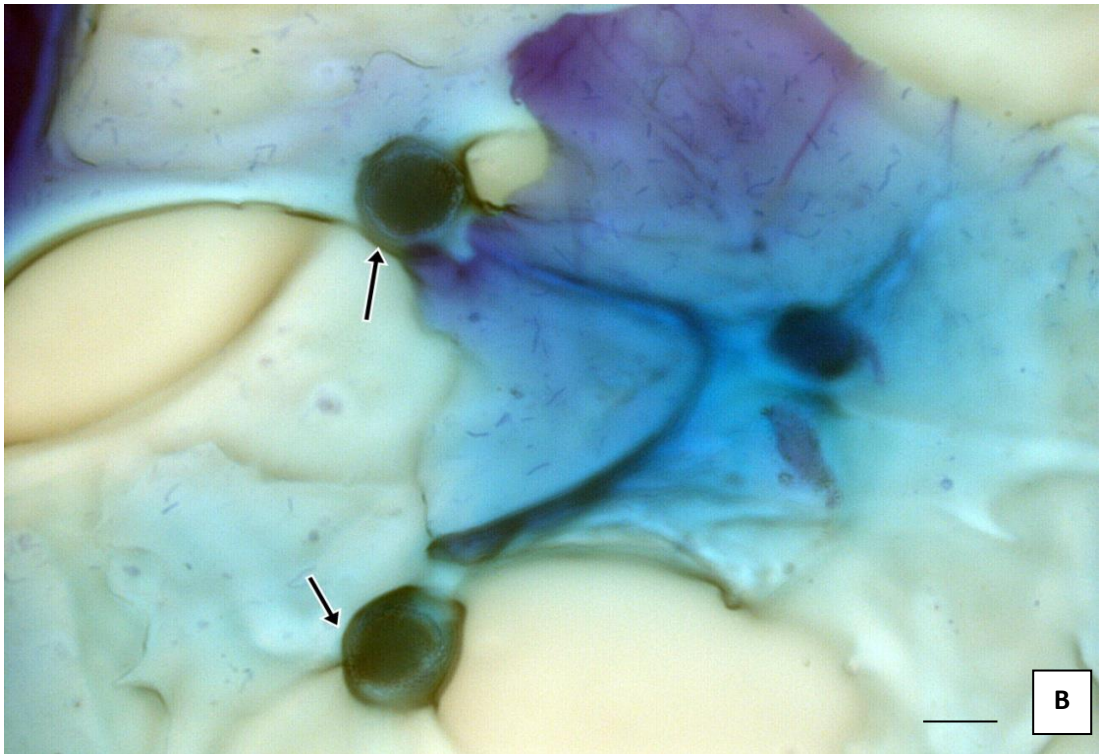
Şekil 3.16 : A,B,C) Kapsüllenmiş kondrositlerin toluidin mavisi ile 8. gündeki görüntüsü; kalın oklar, bölünen hücreler (Bar=100µm-200X büyütmede Leica DM6000 ile görüntülenmiştir)

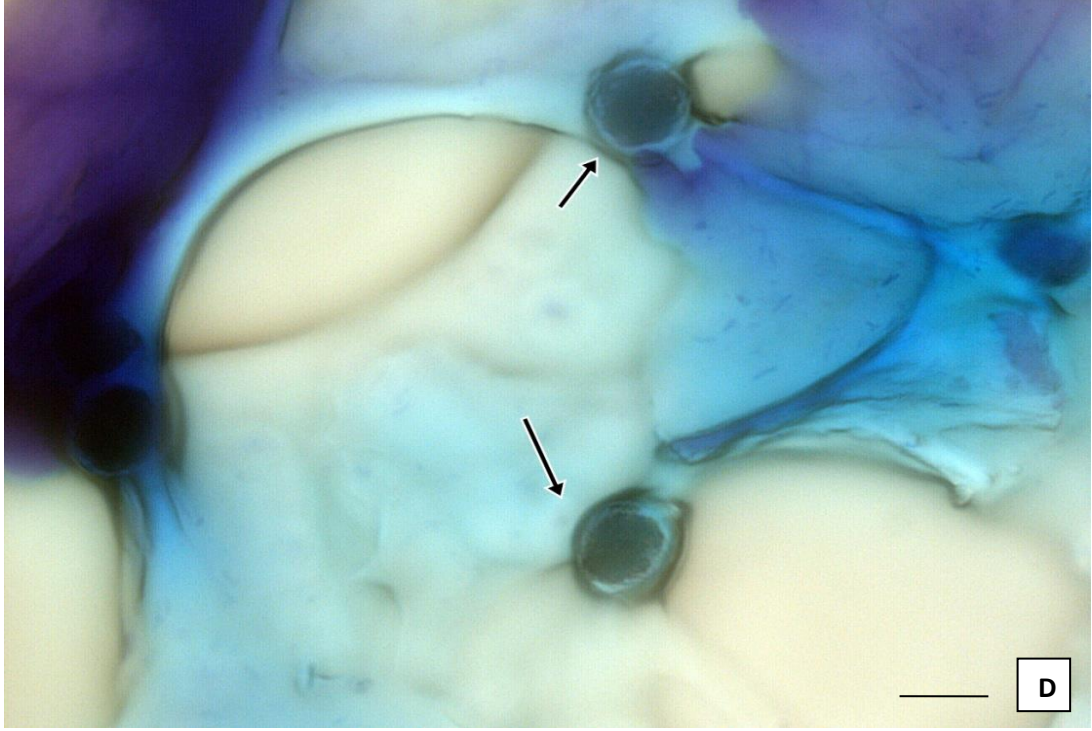




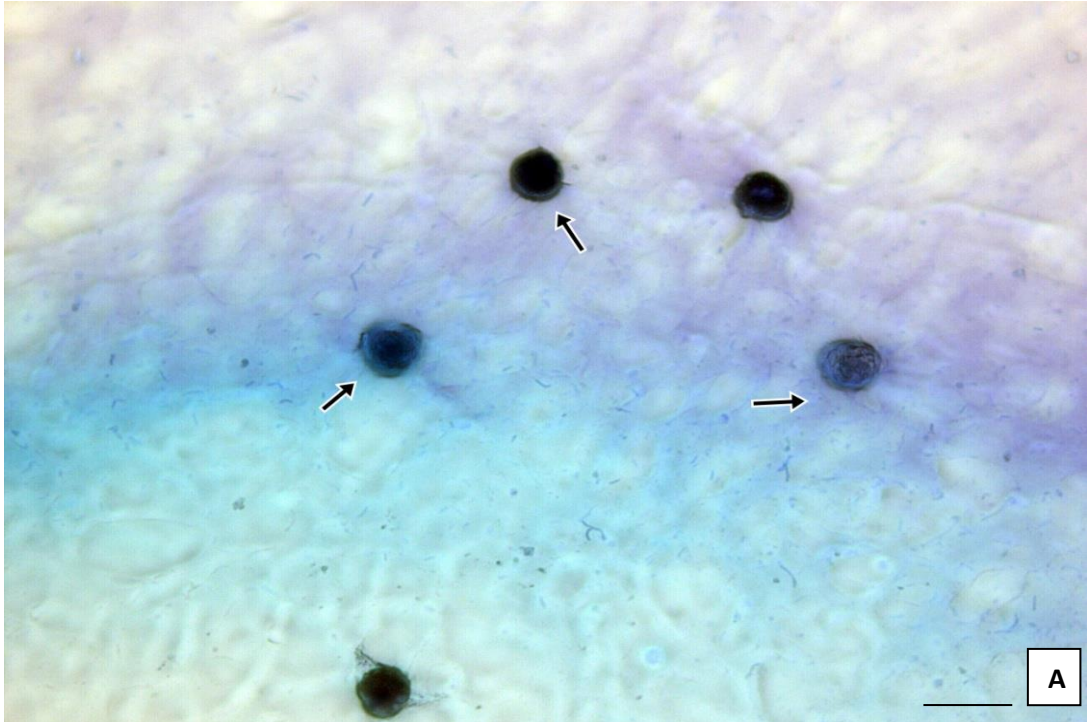
Şekil 3.17 : A., B., C. Kapsüllemiş kondrosit hücrelerinin toluidin mavisi ile 15. gündeki görüntüsü; kalın oklar, bölünen hücreler; ince oklar, GAG sentezi (Bar=65µm-400X büyütmede Leica DM6000 ile görüntülenmiştir)

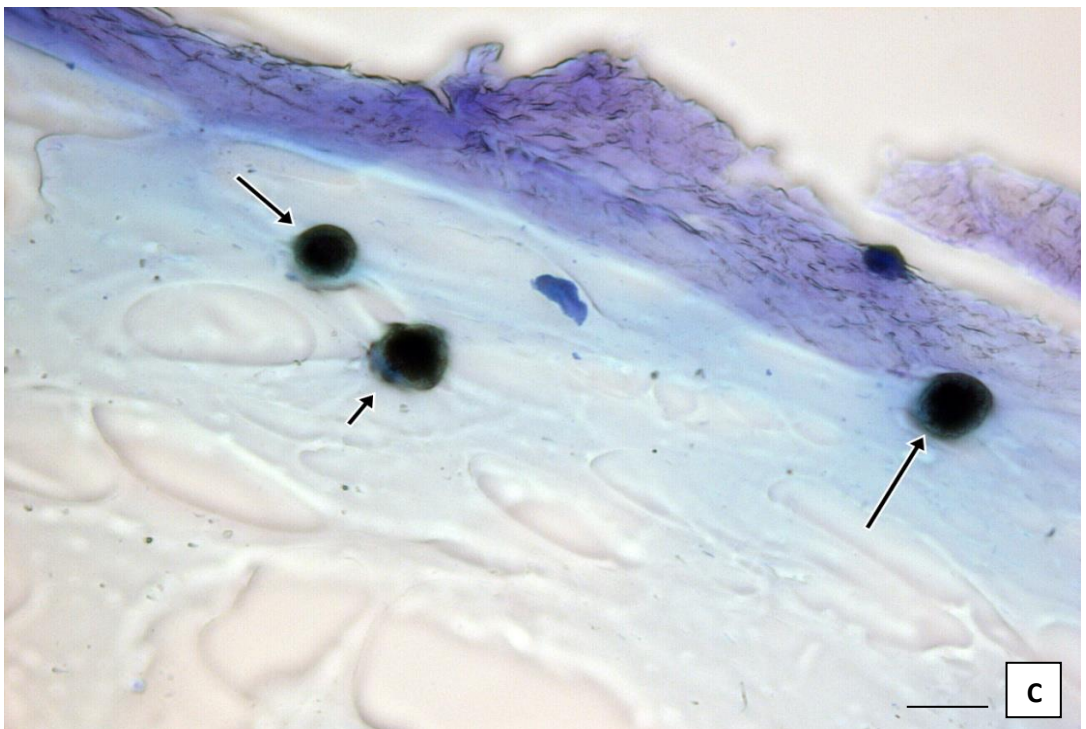
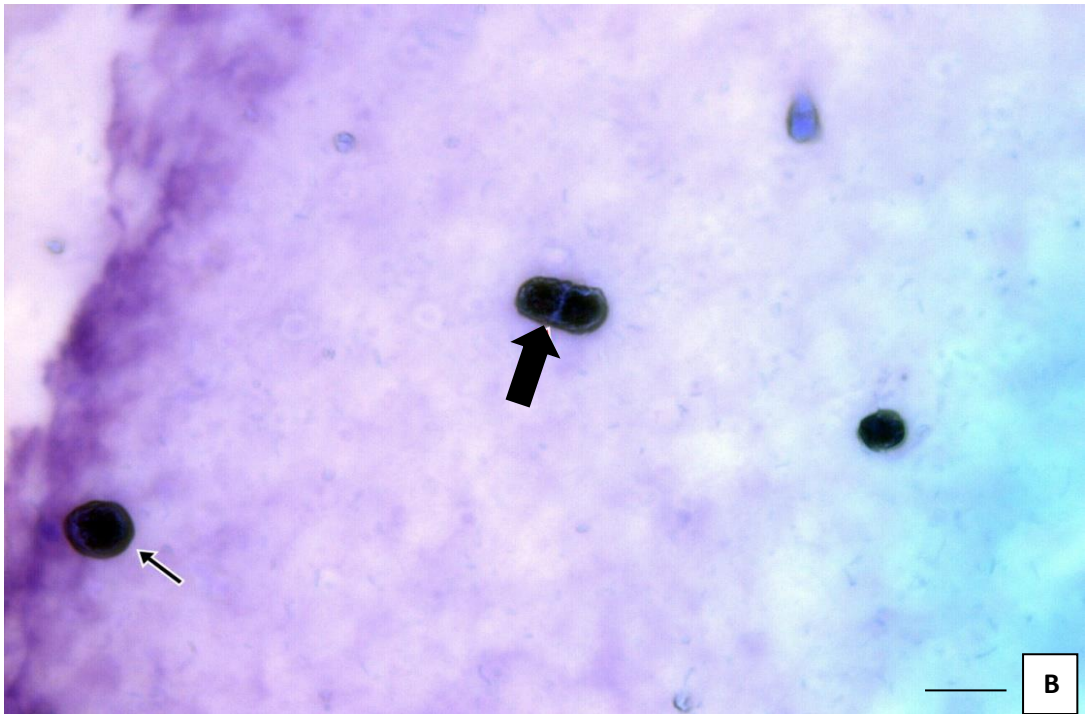


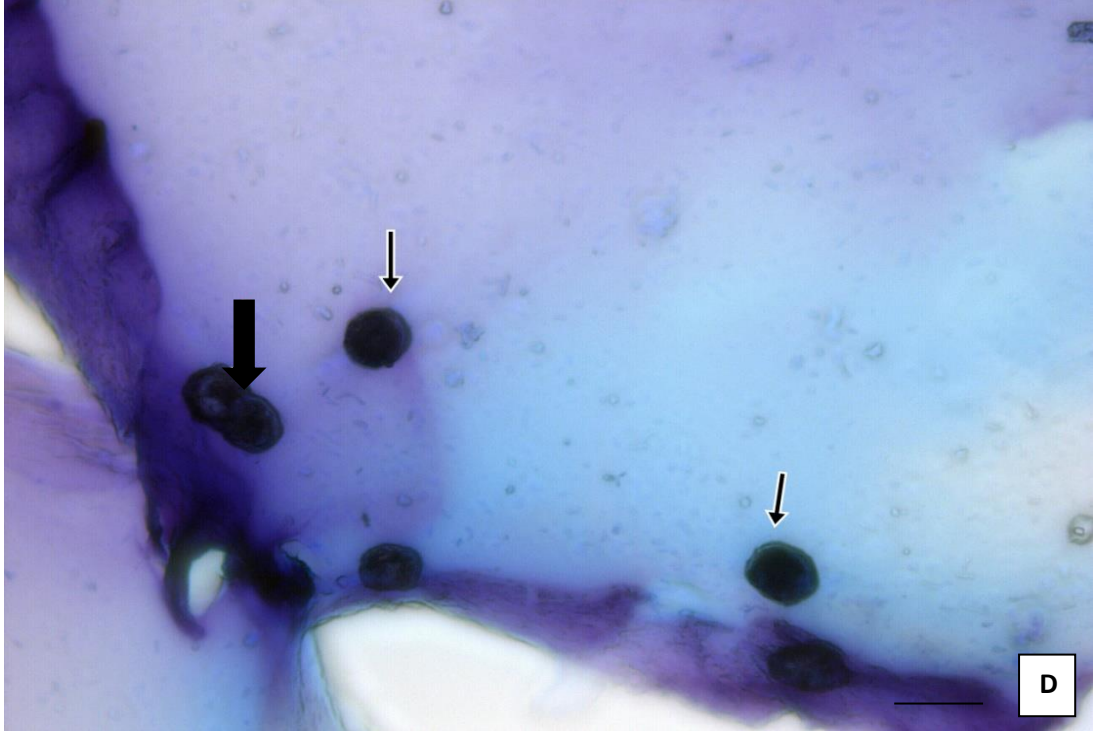




Şekil 3.18 : A., B., C., D) Kapsüllenmiş kondrositlerin toluidin mavisi ile 30. gündeki görüntüsü; kalın oklar, bölünen hücreler; ince oklar, GAG sentezi (Bar=65µm-400X büyütmede Leica DM6000 ile görüntülenmiştir)



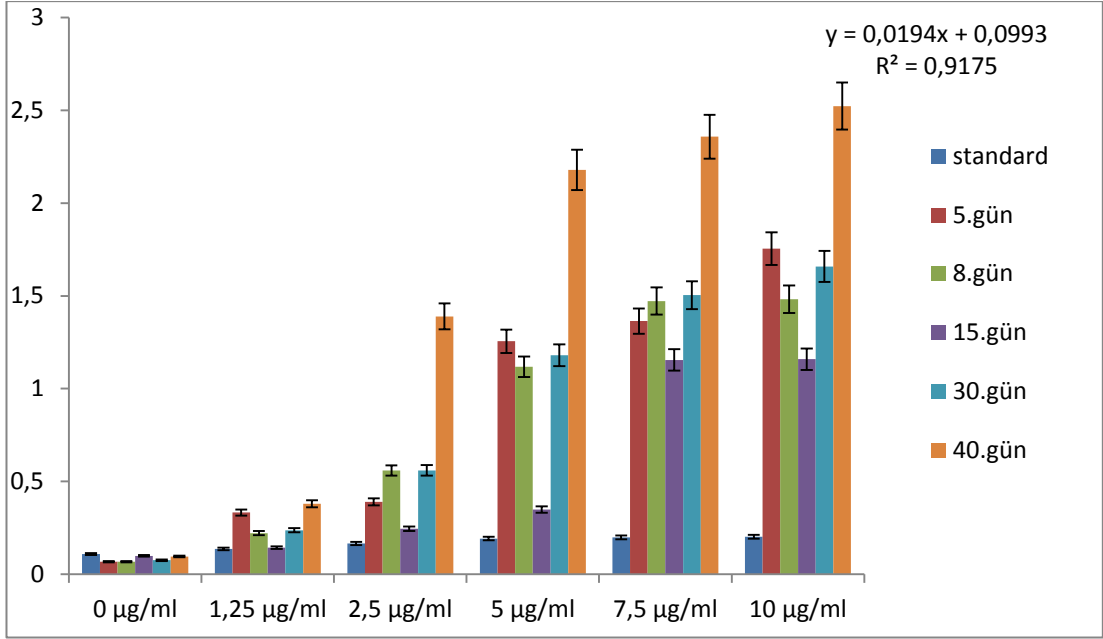




Şekil 3.19 : A., B., C., D) Kapsülennmiş kondrositlerin toluidin mavisi ile 40. gündeki görüntüsü; kalın oklar, bölünen hücreler; ince oklar, GAG sentezi (Bar=65µm-200X büyütmede Leica DM6000 ile görüntülenmiştir)

3.7. DMMB Analizi ile Glikozaminoglikan Miktarının Belirlenmesi

Dimethylmetilen mavisi de toluidin mavisi gibi katyonik bir boyadır ve glikozaminoglikanları mor renge boyar. GAG lardaki renk değişimi ELISA okuyucuda ölçülerek miktar tayini yapılır.



Şekil 3.20 : 0-10µg/ml konsantrasyonlardaki GAG depolanmasının 5., 8., 15., 30. ve 40. günlerdeki miktarları

Çizelge 3.5: 0-10µg/ml konsantrasyonlardaki GAG depolanmasının 5., 8., 15., 30. ve 40. günlerdeki absorbanı

Konsantrasyon	GAG miktarı (absorbans)					
	Standard	5.gün	8.gün	15.gün	30.gün	40.gün
0 µg/ml	0,071± 0,03	0,072± 0,01	0,066± 0,00	0,103± 0,00	0,076± 0,00	0,093± 0,00
1,25 µg/ml	0,102± 0,02	0,203± 0,18	0,173± 0,08	0,132± 0,01	0,349± 0,10	0,515± 0,14
2,5 µg/ml	0,111± 0,04	0,226± 0,31	0,54± 0,15	0,243± 0,01	0,451± 0,24	1,503± 0,12
5 µg/ml	0,118± 0,05	0,773± 0,42	1,134± 0,28	0,352± 0,01	0,46± 0,65	2,16± 0,05
7,5 µg/ml	0,121± 0,06	1,546± 0,52	1,433± 0,11	1,149± 0,00	0,733± 0,71	2,355± 0,00
10 µg/ml	0,128± 0,05	1,534± 0,19	1,512± 0,03	1,157± 0,01	1,891± 0,41	2,505± 0,04

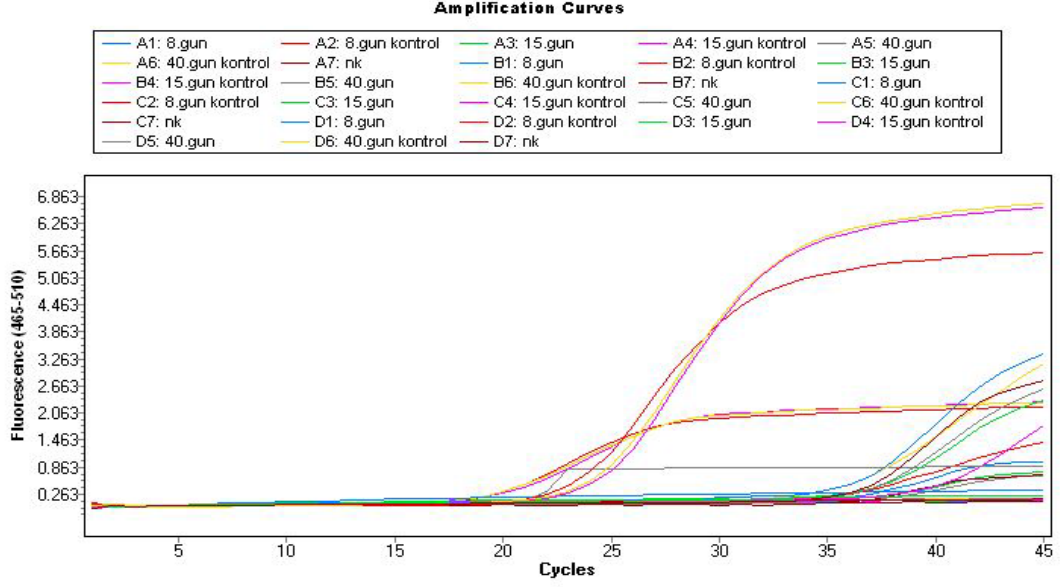
3.8. Real Time-PCR ile kondrositlerin Tip I ve II Kollagen, SOX9, ekspresyonlarının değerlendirilmesi

SOX9, kondrojenik transkripsiyon faktörü olarak bilinir. Dolayısıyla ekspresyonun varlığı kondrojenik potansiyeli ve kondrositlerin de-diferensiyondan sonra re-diferensiyona geçtiğini yani fibroblast benzeri yapıdan kurtulup tekrar kondrosit olduklarını ve olmaya başladıklarını göstermesi açısından önemli bir parametredir (68, 69). Tip II kollajen, Hyalin kondrositler tarafından sentezlenmektedir ve bunun varlığı da re-diferensiyona geçtiğini ve kondrosit olduklarını gösteren bir kanıttır. Tip I kollajen, hyalin kondrositler tarafından sentezlemez ve dolayısıyla ekspresyonun varlığı kondrojenik potansiyelin henüz olmadığını ve kondrositlerin hala de-diferensiyon aşamasında olduğunu ve hücrelerin hala fibroblast benzeri bir yapıda olduklarını göstermesi açısından önemli bir parametredir (58).

Bu çalışmada Tip I, Tip II, SOX9 genlerinin 8., 15. ve 40. günlerde ekspresyon analizi yapılmıştır. Hedef genlerle kıyaslamak üzere referans gen olarak GAPDH kullanılmıştır. Hedef genler ve referans genler arasındaki Ct (Cycle threshold; ΔR_n de önemli artışın olduğu ilk döngü sayısını ifade eder) değerleri karşılaştırılarak gösterilmiştir. Kullanılan yöntem de $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ değerleri her bir örnek için ayrı ayrı hesaplanmıştır. Bulgular Çizelge 3.6, Şekil 3.21 ve Şekil 3.22 gösterildiği gibidir.

$$\Delta\Delta Ct = ((C_{T,Target} - C_{T,Ref.}) - (C_{T,Target} - C_{T,Ref.})) \quad (\text{Eşitlik 3.1.})$$

$$\text{Hedef genin ekspersyon seviyesi} = 2^{-\Delta\Delta Ct} \quad (67)$$

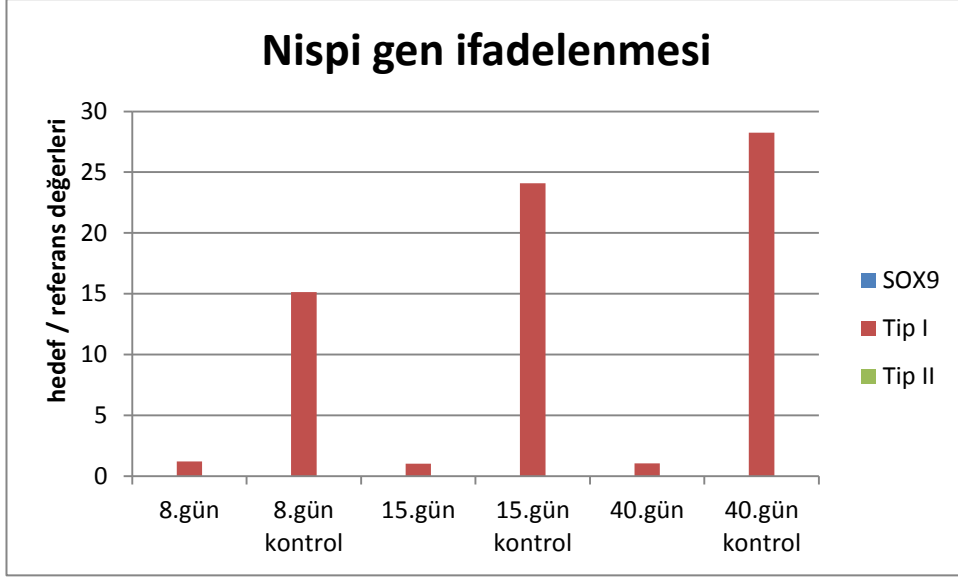


Şekil 3. 21: Real Time PCR çalışmasında elde edilen Amplifikasyon Eğrisi grafiği

Çizelge 3.6 : Eşitlik 3.1 de gösterildiği gibi hesaplanan 8., 15., 40. günlere dair $\Delta\Delta Ct$ değerleri

	8. gün	8. gün kontrol	15. gün	15. gün kontrol	40. gün	40. gün kontrol
SOX9	0	0	0	0	0	0
Tip I	1,21	15,14	1,02	24,08	1,03	28,25
Tip II	0	0	0	0	0	0

Çizelge 3.5’ deki sonuçlara göre SOX9 ve Tip II geninde ekspresyon gözlenmemiştir. Tip I geninde ise ekspresyon görülmüştür.



Şekil 3.22: SOX9 ve Kollajen Tip I ve Kollajen Tip II genlerinin 8., 15. ve 40. günlere göre ifadenmesi

4. TARTIŞMA VE SONUÇLAR

Yapılan bu çalışmada aljinat ile mikroenkapsülasyonu yapılan kondrosit hücrelerinin hidrojel içinde kondrojenik potansiyellerini geri kazanımı araştırılmıştır. Sığır kıkırdağından izole edilip kültüre edilen kondrositler, 2 boyutlu kültür ortamında bölünme yeteneği kazanmıştır ve de-diferensiye olup fibroblast benzeri bir yapıya dönüşmüştür. Kondrojenik özelliklerini geri kazanabilmeleri için kondrositlerin, aljinat ile mikroenkapsülasyonu yapılmış ve hücreler 3 boyutlu ortamda re-diferensiye olmaları beklenmiştir. Böylece tip II kollajen sentezi ve kondrosite özgü ekstraselüler matriks ürünlerinin sentezinin gerçekleşeceği düşünülmüştür.

Kültür aşamasında gerekli sayıya ulaşan hücreler tripsinizasyon ile kaldırıldıktan sonra aljinat ile kapsüllenmiş ve yaklaşık 500µm çapında kapsüller elde edilmiştir. mikroküreler içerisinde bölünmeye devam eden hücreler kapsül içerisindeki sayısını artırmış ve canlılıklarını sürdürmek için gerekli olan alan azaldığı için bir kısmı apoptoza gitmiş, bir kısmı ise kapsül yüzeyine tutunup tekrar de-diferensiye olarak 2 boyutlu fibroblast benzeri yapıya dönüşmüştür.(Şekil 3.2). Bu durum 30. günden sonra kapsüllerin degradasyonuna neden olmuştur. Ayrıca aljinat mikrokürelerin kısa dönem mekanik dayanımının iyi olmasına karşın, 30 gün gibi bir sürenin sonunda jel oluşumunu sağlayan Ca^{+2} iyonlarının kademeli olarak besiyerindeki iyonlarla (Na^{+} , H^{+} , vd.) yer değiştirmesine bağlı olarak mekanik dayanımın azaldığı belirlenmiştir (61).

Mendes ve ark. (2012) yaptığı 21 günlük in vitro çalışmada, kondrositler, xhantan türevi kapsüllere hapsedilmiş ve canlılığının tespiti için Calcein AM canlı/ ölü hücre analizi, sitotoksitesite testi için MTS ([3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium salt] testi yapılmıştır. Yapılan analizler sonucunda kullanılan kapsül materyali sitotoksitesite göstermemiş, hücreler ise canlılığını 21 güne kadar sürdürmüşlerdir.

Yapılan çalışmada ise sitotoksitesitenin belirlenmesi için WST-1 ve MTT Testleri, canlılığın tespiti için ise Double Staining (İkili Boyama) yapılmıştır.

WST-1 sitotoksisite testi sonucunda, kapsülasyon yapıldıktan sonra hücrelerin kültürdeki 5. gününde % 8,28, 8. gününde % 15,68, 15. gününde % 27,39, 30. gününde % 31,65 ve 40. gününde % 37,66 oranında sitotoksisite görülmüştür. MTT Test sonuçlarına göre, 5. gününde % 8,63, 8. gününde 15,68, 15. gününde % 18,83, 30. gününde 22,35, 40. Gününde % 38,70 oranında sitotoksisite görülmüştür. MTT Test, WST-1 testini doğrulamak amacıyla yapılmıştır ve paralel sonuçlar elde edilmiştir. Kapsül içerisindeki hücrelerin sayılarını artırması ve buna bağlı olarak kapsül alanının yetersiz hale gelmesi, Ca^{+2} iyonlarından dolayı meydana gelen mekanik dayanıksızlığın sebep olduğu degradasyon, sitotoksisitenin 40. güne kadar artış göstermesine sebep olduğu gözlenmiştir.

Apoptoz ve nekrozu göstermek için ikili boyama yapılmıştır. İkili boyama metodu çekirdeği boyamakta ve bu sayede apoptozu ve nekrozu göstermektedir. İkili boyama solüsyonunu oluşturmak için Ribonükleaz A, Hoescht 33342 ve Propodium iodide kullanılmıştır. RNA'nın boyanmaması için Ribonükleaz A kullanılmış, bu sayede sitoplazmik RNA yok edilmiştir. Hoechst (33342) apoptotik hücreleri boyamaktadır, bu sayede gerçek apoptotik hücreler belirlenmiştir. Propidium Iodide, DNA'yı ve RNA'yı boyamaktadır. Kırmızıya boyayarak sekonder nekrozu gösterir. İkili boyama sonucunda 40. Günde apoptoz oranı %17, nekroz oranı %16 olarak ölçülmüştür. Bu sonuçlar hücre canlılığının 40. günde % 50 den fazla olduğunu göstermektedir.

Küçük yarıçapa sahip alginat mikrokürelerin mekanik dayanımları, büyük yarıçapa sahip mikrokürelerden daha yüksektir (61). Küçük yarıçaptaki kürelerde besiyeri difüzyonu kapsülün içindeki hücrelere homojen olarak dağılma olanağına sahiptir. Yapılan çalışmadaki kapsül çapının 500µm olmasından dolayı kültür ortamında besiyerinin difüzyonunun kapsülün merkezindeki hücrelere ulaşma oranının dış taraftaki hücrelere ulaşma oranından daha düşük olduğu için kapsül merkezindeki hücrelerin daha erken apoptoza uğradığı gözlenmiştir (Şekil 3.8).

Kim ve ark. yaptığı çalışmada Dimetiltelen mavisini ile glikozaminoglikan miktarı analizi yapılmış ve in vitro ortamda 28. güne kadar GAG miktarında artış gözlenmiştir. Yapılan bu çalışmada ise Toluidin blue ile morfolojik, DMMB analizi ile miktar analizi yapılmıştır. İki uygulamanın da sonuçlarına göre kapsül

içerisindeki hücreler GAG sentezini gerçekleştirmiş, 40. günde ise miktarını maksimum seviyeye çıkarmıştır.

DMMB analizinde 5. Günden 15. Güne kadar GAG miktarında düşüş gözlenmiş, 15. Günden 40. Güne kadar da dramatik bir artış gözlenmiştir (Şekil 3.20). GAG'lar disakkarit birimlerindeki hidroksil, karbosit ve sülfat yan gruplarından ötürü negatif yüklü moleküllerdir. Bu durum GAG ları hidrofilik duruma getirir; böylece, su ve özellikle Na⁺ gibi ozmotik olarak aktif katyonları bağlarlar. Bu şekilde sitoplazmanın sol/jel durumunu ayarlarlar (66). 5. günde hücreler kapsül ortamında GAG sentezini, hücrenin sitoplazmasındaki sol/jel dengesini korumak için artırmıştır fakat ilk 15 güne kadar adaptasyon süreci geçirmiş, canlılıkları yüksek olduğu halde GAG sentezinde azalma görülmüştür. 15. Günden sonra hücreler ortama alışmış ve GAG miktarını artırmıştır.

Bu tezde aynı zamanda Real Time PCR analizi ile SOX9, Tip I ve Tip II kollajen sentezinin varlığı moleküler düzeyde gösterilmek istenmiştir.

Coates ve ark.(2012) yaptığı 21 günlük çalışmada SOX9 geninin ekspresyonu, zamana bağlı azalarak tespit edilmiştir. Tip II kollajen sentezi 14. güne kadar artış göstermiş ve 14. günde zirveye ulaşmıştır, fakat 21. günde sentezi gözlenmemiştir.

Marsich ve ark. Yaptığı çalışmada kondrositler aljinat/laktoz modifiye kitosan kapsüllere hapsedilmiş ve 2. ve 17. Günlerde yapılan RT-PCR analizinin sonucunda Tip II kollajen ve agregan sentezi görülmüş ve Tip I kollajene rastlanmamıştır.

Yapılan çalışmada ise kapsüllenen hücrelerin 8., 15. ve 40. günlerinde cDNA ları sentezlenmiş ve RT-PCR analizi sonucunda Kollajen Tip II ve SOX9 genlerinin sentezine rastlanmamıştır. Tip I kollajen sentezi ise gözlenmiştir (Şekil 3.21 ve Şekil 3.22). Bu sonuçlar dahilinde, kapsüllenen kondrositlerin re-diferensiye olmadığı saptanmıştır.

Sığır kıkırdağından izole edilen hücreler kültür aşamasında çoğaltılmak amacıyla pasajlanmış ve belli bir sayıya ulaşması sağlanmıştır. Yapılan birçok araştırma, her

pasaj işleminin hücre morfolojisinde, uyarılara yanıtında, büyüme oranlarında, protein ifadesinde, transfeksiyon ve sinyallerde değişikliklere yol açtığını göstermektedir (70). Dolayısıyla hücrenin morfolojisini ve biyokimyasal özelliklerini koruyabilmesi için asgari düzeyde pasaja maruz kalması gerekmektedir. Bu sebeplerden dolayı mevcut çalışmada pasaj sayısı fazla olduğundan hücreler kapsül içerisine girdiğinde canlılıklarını sürdürebildikleri, bölünebildikleri ve GAG sentezini gerçekleştirebildikleri halde kondrosite tekrar farklılaşma gösterememiştir. Ayrıca, hücrelerin kapsül ortamındaki kültürünün kondrojenik besiyeri ile gerçekleşmemesi re-diferensiyasyon olmamasının sebeplerinden biri olabileceği öngörülmektedir.

İlerleyen çalışmalarda sığır kıkırdağından izole edilen hücrelerin kapsüllenmeden önce kültür ortamında kondrojenik besiyeri ile kültüre edilip, en fazla 3 pasajdan sonra flow sitometri yöntemi ile kondrosit markırları kullanılarak hücrelerin yapısını koruduğu kanıtlandıktan sonra kapsüllenmesi hedeflenmektedir. Ayrıca kapsül materyalinin yapısının geliştirilmesi, kapsül boyutunun enjekte edilebilir boyutlara getirilerek kalitesinin iyileştirilmesi de amaçlanmaktadır.

5. KAYNAKLAR

- (1) Wang Q., G., Nguyen B., Thomas C.R., Zhang Z., El Haj A.J., Kuiper N.J., Molecular profiling of single cells in response to mechanical force: Comparison of chondrocytes, chondrons and encapsulated chondrocytes, *Biomaterials*, 31 1619-1625, 2010
- (2) Hayami J.W.S., Waldman S.D., Amsden B.G., A photocurable hydrogel/ elastomer composite scaffold with bi-continous morphology for cell encapsulation, *Macromolecular Bioscience*, 11, 1672-1683, 2011
- (3) Park H., Choi B., Hu J., Lee M., Injectable chitosan hyaluronic acid hydrogels for cartilage tissue engineering, *Acta Biomaterialia*, 9 4779-4785, 2013
- (4) Marsich E., Borgogna M., Donati I., Mozertic P., Strand B.C., Salvador S.G., Vittur F., Paoletti S., Alginate/ Lactose modified chitosan hydrogels: A bioactive biomaterial for chondrocyte encapsulation, *Wiley InterScience*, DOI: 10.1002/jbm.a.31307, 2007
- (5) Grunder T., Gaissmaier C., Fritz J., Stoop R., Hortschansky P., Mollanhauer J., Aicher W. K., Bone morphogenetic protein (BMP)-2 enhances the expression of type II collagen and aggrecan in chondrocytes embedded in alginate beads, *OsteoArthritis and Cartilage* , 12, 559e567, 2004
- (6) " Steinert A., Weber M., Dimmler A., Julius C., Schiitze N., Noth U., Cramer H., Eulert J., Zimmermann U., Hendrich C., Chondrogenic differentiation of mesenchymal progenitor cells encapsulated in ultrahigh-viscosity alginate, *Journal of Orthopaedic Research* ,21 1090-1097, 2003
- (7) Nadzir M.M., Kino-oka M., Maruyama N., Sato Y., Kim M.H., Sugawara K., Taya M., Comprehension of terminal differentiation and dedifferentiation of

chondrocytes during passage cultures, *Journal of Bioscience and Bioengineering*
VOL. 112 No. 4, 395–401, 2011

- (8) Kim M. et al., The use of de-differentiated chondrocytes delivered by a heparin-based hydrogel to regenerate cartilage in partial-thickness defects, *Biomaterials*, 32 7883-7886, 2011.
- (9) Coates E.E., Riggin C.N., Fisher J.P., Photocrosslinked alginate with hyaluronic acid hydrogels as vehicles for mesenchymal stem cell encapsulation and chondrogenesis, *Society For Biomaterials*, DOI: 10.1002/jbm.a.34499, 2012
- (10) Ghidoni et al., Alginate cell encapsulation: new advances in reproduction and cartilage regenerative medicine, *Cytotechnology*, 58:49–56 DOI 10.1007/s10616-008-9161-0, 2008
- (11) Ma H., , Hung S.C., , Lin S.Y., Chen Y.L., Lo W.H., Chondrogenesis of human mesenchymal stem cells encapsulated in alginate beads, *National Scientific Council (NSC 90-2314-B-075-045)*, 2002
- (12) Taguchi et al., Encapsulation of chondrocytes in injectable alkali-treated collagen gels prepared using poly(ethylene glycol)-based 4-armed star polymer, *Biomaterials* ,26 1247–1252, 2005
- (13) Nafea E.H., Marson A., Warren L.A., Martens P.J., Immunoisolating semi-permeable membranes for cell encapsulation: Focus on hydrogels, *Journal of Controlled Release* 110-122, 2011.
- (14) Uludag H., Vos P.D., Tresco P.A., Technology of mammalian cell encapsulation, *Advanced Drug Delivery Reviews* 42 29–64, 2000
- (15) Orive et al., Cell encapsulation: Promise and progress, *Nature Medicine*, Volume 9 Number 1, 2003

- (16) Zussman E., Encapsulation of cells within electrospun fibers, *Polymers advanced Technologies*, DOI: 10.1002/pat.1812, 2010
- (17) Svaldo-Lanero T, Krol S, Magrassi R, Diaspro A, Rolandi R, Gliozzi A, et al. Morphology, mechanical properties and viability of encapsulated cells. *Ultramicroscopy*;107:913–21., 2007.
- (18) Chien H.W., Tsai W.B., Jiang S., Direct cell encapsulation in biodegradable and functionalizable carboxybetaine hydrogels, *Biomaterials* 33 5706e5712, 2012
- (19) Li Y., Rodrigues J., Tomas H., Injectable and biodegradable hydrogels: gelation, biodegradation and biomedical applications, *Chem. Soc. Rev.*, 41, 2193–2221, 2012
- (20) Hunt et al., Encapsulation of fibroblasts causes accelerated alginate hydrogel degradation, *Acta Biomaterialia* 6 3649–3656, 2010
- (21). Hunt N.C., Grover L.M., Cell encapsulation using biopolymer gels for regenerative medicine, *Biotechnol Lett* ,32:733–742 DOI 10.1007/s10529-010-0221-0, 2010
- (22) Tan et al., Encapsulation of a glycosaminoglycan in hydroxyapatite/ alginate capsules, *Wiley InterScience* , DOI: 10.1002/jbm.a.32297, 2008
- (23) Lee K.Y., Mooney D.J., Alginate: properties and biomedical applications, *NIH Public Access*, 37(1): 106–126. doi:10.1016/j.progpolymsci.2011.06.003., 2012
- (24) Park S.H., Park S.R., Chung SI, Pai K.S., Min B.H., Tissue-engineered cartilage using fibrin/hyaluronan composite gel and its in vivo implantation, *Artif Organs* 29:838-845, 2005.

- (25) Hoshikawa A., Nakayama Y., Matsuda T., Oda H., Nakamura K., Mabuchi K., Encapsulation of chondrocytes in photopolymerizable styrenated gelatin for cartilage tissue engineering, *Tissue Eng* 12:2333-2341, 2006.
- (26) Moreira Teixeira LS, Leijten JC, Sobral J, Jin R, van Apeldoorn AA, Feijen J, van Blitterswijk C, Dijkstra PJ, Karperien M. High throughput generated micro-aggregates of chondrocytes stimulate cartilage formation in vitro and in vivo. *Eur Cell Mater.*, 5;23:387-99., 2012
- (27) Spiller KL, Maher SA, Lowman AM. Hydrogels for the repair of articular cartilage defects. *Tissue Eng Part B Rev.*;;17(4):281-99, 2011
- (28) Kim IL, Mauck RL, Burdick JA., Hydrogel design for cartilage tissue engineering: a case study with hyaluronic acid., *Biomaterials.*;;32(34):8771-82, 2011
- (29) Schuurman W, Levett PA, Pot MW, van Weeren PR, Dhert WJ, Hutmacher DW, Melchels FP, Klein TJ, Malda J., Gelatin-Methacrylamide Hydrogels as Potential Biomaterials for Fabrication of Tissue-Engineered Cartilage Constructs., *Macromol Biosci.*, Feb 18. doi: 10.1002/mabi.201200471, 2013
- (30) Pan J, Guo C, Fei T, Fan W, Liu J, Li S, Yan Z. Preparation and Characterization of a Novel Injectable Hydrogel. *Adv Genet Eng*, 2:1-5., 2013
- (31) Kaloğlu C., Kıkırdak Dokusu, Cumhuriyet Üniversitesi, <http://tippedu.cumhuriyet.edu.tr> (Erişim Tarihi 10. 12. 2014)
- (32) Şimşek N., Kıkırdak Doku, Kemik Doku, Atatürk Üniversitesi, <http://veterinerhistoloji.atauni.edu.tr> (Erişim Tarihi 10. 12. 2014)
- (33) Kendall D., The aetiology, diagnosis, and treatment of prolapsed intervertebral disk, with a review of 300 cases of sciatica, *Q J Med.*;16(3):157-79, 1947

- (34) Streeter G.L., Developmental horizons in human embryos; a review of the histogenesis of cartilage and bone., *Contrib Embryol.*, 33(213-221):149-68, 1949
- (35) Puppi D. Chiellini F., Piras A.M., Chiellini E., Polymeric materials for bone and cartilage repair, *Progress in Polymer Science* ,35 403-440, 2010
- (36) Alexandros. E. Beris, Marios G. Lykissas, Christos D. Papageorgiou, Anastasios D. Georgoulis, Advances in articular cartilage repair, injury, *Int. J. Care injured*, 365, 514-523, 2005
- (37) Freyria A.M., Mallein-Gerin F., Chondrocytes or adult stem cells for cartilage repair: The indisputable role of growth factors, *Injury, Int. J. Care Injured* 43 259–265, 2012
- (38) Korkusuz F., Doğan M., Bozkurt M., Kıkırdak dokusu mühendisliği, *TOTBİD Dergisi*, 9(3):175-178, 2010
- (39) Liu et al., Tissue Engineering Stratified Scaffolds for Articular Cartilage and Subchondral Bone Defects Repair, *Ortopedics*, doi: 10.3928/01477447-20131021-10, 2013
- (40) Irion V.H., Flanigan D.C., New and Emerging Techniques in Cartilage Repair: Other Scaffold-Based Cartilage Treatment Options, *Oper TechSportsMed*21:125-137, 2013
- (41) Gaismaier C., Koh J., Weise K., Growth and differentiation factors for cartilage healing and repair, *Injury, Int. J. Care* , 3951, 588-596, 2008
- (42) Sellards et al., Chondral injuries, *Current Option In Rheumatology*, 14:134-141, 2002

- (43) Kim M., Kim S.E., Kang S.S., Kim Y.H., Tae G., The use of de-differentiated chondrocytes delivered by a heparin-based hydrogel to regenerate cartilage in partial-thickness defects, *Biomaterials*, 32 7883e7896, 2011
- (44) Redman S. N., Oldfield S. F. and Archer C. W., Current strategies for articular cartilage repair, *European Cells and Materials* Vol. 9., 2005
- (45) Sampson T., Arthroscopic Treatment for Chondral Lesions of the Hip, *Clin Sports Med* 30 (2011) 331–348, 2002
- (46) Detterline A.J., Goldberg S., Bach B.R., Cole J.B., Treatment Options for Articular Cartilage Defects of the Knee, *Orthopaedic Nursing* ,Volume 24 Number 5, 2005
- (47) 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*, 32(27): 6425–6434. doi:10.1016/j, 2011
- (48) Kedage et al., Autologous chondrocyte implantation (ACI): an innovative technique for articular cartilage defects, *JCOT*, Vol 1 No 1, 2010
- (49) Dunkin B.S., Lattermann C, New and Emerging Techniques in Cartilage Repair: Matrix-Induced Autologous Chondrocyte Implantation, *Oper Tech Sports Med* 21:100-107, 2013
- (50) Demoor et al., Deciphering chondrocyte behaviour in matrix-induced autologous chondrocyte implantation to undergo accurate cartilage repair with hyaline matrix, *Pathologie Biologie*, 60 199–207, 2012

- (51) Enea et al., Single-stage cartilage repair in the knee with microfracture covered with a resorbable polymer-based matrix and autologous bone marrow concentrate, *The Knee*, 20 562–569, 2013
- (52) McCarthy H.S. , Roberts S., A histological comparison of the repair tissue formed when using either Chondrogide or periosteum during autologous chondrocyte implantation, *Osteoarthritis and Cartilage* 21 2048e2057, 2013
- (53) Harris et al., Failures, re-operations, and complications after autologous chondrocyte implantation e a systematic review, *Osteoarthritis and Cartilage* 19 779e791, 2011
- (54) Marcacci M., Berruto M., Brocchetta D., et al., Articular cartilage engineering with Hyalograft C: 3 year clinical results., *Clin Orthop Relat Res* 435:96–105, 2005
- (55) Campoccia D., Doherty P., Radice M., Brun P., Abatangelo G., Williams D., Semi synthetic resorbable materials from hyaluronan esterification., *Biomaterials*;19:2101–27., 1998
- (56) Clar C., Cummins E., McIntyre L. et al., Clinical and cost-effectiveness of autologous chondrocyte implantation for cartilage defects in knee joints: systematic review and economic evaluation., *Health Technology Assessment* ;9:3–4., 2005
- (57) Hubbell J., Biomaterials in tissue engineering, *Nat. Biotechnol.* 13 565–576., 1995
- (58) Murua et al., Cell microencapsulation technology: Towards clinical application, *Journal of Controlled Release* 132 76–83, 2008
- (59) Gryshkov et al., Process engineering of high voltage alginate encapsulation of mesenchymal stem cells, *Materials Science and Engineering C* 36 77–83, 2014

- (60) Wang et al., Inhibition of host cell encapsulation through inhibiting immune gene expression by the parasitic wasp venom calreticulin, *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 43 936e946, 2013
- (61) Durkut S., Primer sıçan karaciger hücrelerinin hidrojel yapılı kitosan ve alginat gibi polimerlerde enkapsülasyonu ve in vitro ortamda bazı özelliklerinin incelenmesi, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, 2008
- (62) Nicodemus G.D., Bryant S.J., Cell Encapsulation in Biodegradable Hydrogels for Tissue Engineering Applications, *Tissue Engineering: Part B Volume 14, Number 2*, 2008
- (63) Tan H., Marra K.C., Injectable, Biodegradable Hydrogels for Tissue Engineering Applications, *Materials* 3, 1746-1767; doi:10.3390/ma3031746, 2010
- (64) Mazzitelli et al., Preparation of cell-encapsulation devices in confined microenvironment, *Advanced Drug Delivery Reviews* 65 1533–1555, 2013
- (65) Kim M. et al., The use of de-differentiated chondrocytes delivered by a heparin-based hydrogel to regenerate cartilage in partial-thickness defects, *Biomaterials* 32 7883-7886, 2011
- (66) Ergün E., Veteriner Temel Histoloji. Ekstraselüler Matriks., ed: Özer A., Nobel Yayın Dağıtım / Akademi Kitapları Dizisi, Ankara,
- (67) Livak K.J., Schmittgen T.D., Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method, *Methods*. 25: 402–408, 2001.
- (68) Lefebvre V, Huang W, Harley VR, Goodfellow PN, de Crombrughe B. SOX9 is a potent activator of the chondrocyte-specific enhancer of the pro alpha1(II) collagen gene. *Mol Cell Biol*; 17:2336–2346., 1997

- (69) Estes BT, Diekman BO, Gimble JM, Guilak F. Isolation of adiposederived stem cells and their induction to a chondrogenic phenotype. *Nat Protoc*;5:1294–1311, 2010
- (70) Erac Y., Selli C., Filik P., Tosun M., Effects of passage number on proliferation and store-operated calcium entry in A7r5 vascular smooth muscle cells, *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, doi: 10.1016/ j.vascn..03.001, 2014