

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

TEMEL BİYOTEKNOLOJİ

DOKTORA TEZİ

OSTEOKONDRAL DOKU MÜHENDİSLİĞİNDE BİYOMİMETİK YAKLAŞIMLAR:
GRADYAN YAPIDA DOKU İSKELELERİNİN HAZIRLANMASI ve
KARAKTERİZASYONU

Serdar Korpayev

Danışman Öğretim Üyesi

Doç. Dr. Ayşe Karakeçili

TEMMUZ

2019

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının; akademik kural ve etik ilkelere bağlı kalınarak hazırlandığını, çalışmada yararlanılan ve bu çalışma ürünü olmayan bütün bilgiler için kaynak yayınlara atıfta bulunulmuş olduğunu beyan ederim.

Serdar Korpayev

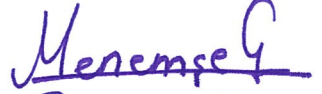
İmzası



ONAY

Doç. Dr. Ayşe Karakeçili danışmanlığında Serdar Korpavev tarafından hazırlanan bu çalışma 02/07/2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Menemşe Gümüşderelioğlu

İmza: 

Üye: Doç. Dr. Ayşe Karakeçili

İmza: 

Üye: Prof. Dr. Zekiye Serpil Takaç

İmza: 

Üye: Prof. Dr. Hilal Özdağ

İmza: 

Üye: Prof. Dr. Murat Şen

İmza: 

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Aykut ÖZKUL

Enstitü Müdürü

ÖZET

Doktora Tezi

Osteokondral Doku Mühendisliğinde Biyomimetik Yaklaşımlar: Gradyan Yapıda Doku
İskelelerinin Hazırlanması ve Karakterizasyonu

Serdar Korpayev

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

Doç. Dr. Ayşe Karakeçili

Osteokondral defektler, eklemlerde hastalık, yaşlanma ya da yaralanma sonucu oluşan ve kırık dokusundan başlayarak subkondral kemik yapısını da içine alan ortopedik problemlerdir. Hızla artan ve çözümlenemeyen klinik ihtiyaçlar doğrultusunda, osteokondral dokunun rejenerasyonunu sağlayacak yapıların geliştirilmesini hedefleyen **doku mühendisliği yaklaşımı** ön plana çıkmaktadır. Gerçekleştirilmiş olan doktora tez çalışmasında, doğal osteokondral yapının hücre dışı matris bileşenleri dikkate alınarak, biyomimetik özelliğe sahip, gradyan yapıda, biyobozunur, çok fazlı sistemlerin tasarlanması, üretimi ve karakterizasyonuna yönelik çalışmalar yürütülmüştür. Buna göre, subkondral kemik fazının, ağırlıkça %80 kitosan ve %20 kollajen tip I içeren süspansiyona %1 nanohidroksiapatit (nHA) eklenmesi ile elde edilen karışımdan oluşturulmasına karar verilmiştir. Kalsifiye kırık faz bileşiminin ağırlıkça %70 kitosan, %30 kollajen tip II ve %0,5 oranında nHA içeren ATDC5 kırık öncül hücrelerinin enkapsüle edildiği jel yapılar olmasına karar verilmiştir. Kırık faz ise, ağırlıkça %50 kitosan ve %50 kollajen tip II içeren ATDC5 kırık öncül hücrelerinin enkapsüle edildiği jellerden hazırlanmıştır. Her üç fazın bir araya getirilmesi ile hazırlanan gradyan yapıdaki osteokondral doku üniteleri ile *in-vitro* ko-kültür çalışmaları yürütülmüştür. Çalışmalardan elde edilen sonuçlar her doku katmanına (kemik, kalsifiye kırık ve kırık) spesifik genlerin tamamının eksprese olduğunu göstermektedir. Tez çalışmasından elde edilen sonuçlar, tasarımı ve üretimi gerçekleştirilen doku ünitesinin doğal ECM yapısına benzer biyomimetik gradyan yapıda olduğu, ko-kültür ortamında pre-kondrojenik ve pre-osteoblastik hücre hatlarının hücre üremesi ve farklılaşmasını desteklediği yönündedir.

2019, 189 sayfa

Anahtar kelimeler: Osteokondral doku mühendisliği, biyomimetik doku iskelesi, kitosan, kollajen, nanohidroksiapatit

ABSTRACT

PhD Thesis

Biomimetic Approaches In Osteochondral Tissue Engineering: Preparation and Characterization Of Gradient Scaffolds

Serdar Korpavev

Ankara University Biotechnology Institute

Prof. Dr. Ayşe Karakeçili

Osteochondral defects caused by traumatic injury, disease or aging are associated with damage of articular cartilage and underlying bone. Driven by the growing unmet clinical need to develop more efficient therapies, **tissue engineering** offers an alternative to develop new strategies and structures for long term osteochondral regeneration. In this thesis, biomimetic, gradient, biodegradable, multiphase tissue constructs have been designed, produced and characterized by using appropriate techniques. In this essence, subchondral bone phase has been composed of 80% chitosan and 20% collagen type I by weight and 1% (w/v) nanohydroxyapatite (nHA), where MC3T3-E1 preosteoblasts were cultured. Calcified cartilage phase was composed of 70% chitosan and 30% collagen type II to mimic the gradient structure and 0.5% (w/v) nHA was added as the inorganic component. ATDC5 pre chondrogenic cells were encapsulated to differentiate into hypertrophic chondrocytes. Cartilage phase as the third layer was composed of 50% chitosan and 50% collagen type II by weight, also hosting encapsulated ATDC5 cells. The gradient osteochondral structure was maintained by combining these three phases, iteratively. Co-culture studies were performed in vitro. The results obtained from these studies showed that all specific markers were expressed for all three phases in the osteochondral unit. The conclusion is that the biomimetic gradient osteochondral tissue construct was able to support the viability and differentiation of pre-osteoblastic and pre-chondrogenic cells in co-culture medium without using additional growth factors.

2019, 189 pages

Keywords: Osteochondral tissue engineering, biomimetic tissue scaffold, chitosan, collagen, nanohydroxyapatite.

TEŞEKKÜR

Benim gelişimim için çok önemli katkılar sağlayan, her zaman yanımda olan, destekleyen ve hayatım boyunca unutamayacağım saygıdeğer hocam Doç. Dr. Ayşe Karakeçili'ye, sonsuz saygı ve şükranlarımı yürekten arz ediyor ve kendileriyle çalışmanın benim için büyük bir şans, nimet ve onur verici olduğunu belirtmek istiyorum.

Tez çalışmam sürecinde 116M437 no'lu 1001 projesi kapsamında maddi destek sağlayan Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumuna (TÜBİTAK) teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmasında 18L0443009 no'lu proje kapsamında Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Koordinasyon Birimine (BAP) teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin qRT-PCR çalışmaları için laboratuvar imkanı sağlayan Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsüne ve güler yüzüyle qRT-PCR çalışmalarında desteklerini ve tecrübesini benden esirgemeyen sayın hocam Prof. Dr. Hilal Özdağ'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Tez izleme jürisinde yer alan ve çalışmanın şekillenmesinde katkılarından dolayı saygıdeğer hocalarım Sayın Prof.Dr. Menemşe Gümüşderelioğlu ve Sayın Prof.Dr. Zekiye Serpil Takaç'a sonsuz saygılarımı sunarım.

Tezimin reoloji çalışmalarında yardımını esirgemeyen ve laboratuvar imkanı sunan Prof. Dr. Murat Şen'e saygılarımla teşekkürlerimi sunarım.

Mekanik testin yapılmasında yardımlarını esirgemeyen Davut Aksüt'e saygı ve sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin histolojik ve immünohistokimyasal analizlerinin yapılmasında gösterdiği yardımlarından dolayı Prof. Dr. Gülşah Kaygusuz'a saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez sürecinde laboratuvar imkanlarını paylaşarak yardımlarını esirgemeyen sayın Doç. Dr. Sedat Odabaş ve Doç. Dr. Berna Topuz'a saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

qRT-PCR çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen ve tecrübelerini paylaşan Ankara Üniversitesi Genom bilimi lab üyeleri sevgili Edibe Ece Abacı, Seçil Durel ve Sulgun Charyyeva'ya sevgi ve teşekkürlerimi borç bilirim.

Tez çalışma süresinde birlikte olmaktan mutluluk duyduğum ve gerektiğinde yardımlarını esirgemeyen lab arkadaşlarım Özge Toprak, Ali Mert Erdek, Tugçe Kurt, Şimal Mirza, Semih Yurttaş, Şevval Ersoy, Toygun Şahin ve Yaren Akdağ'a teşekkürlerimi sunarım.

Ankara Üniversitesi Kök Hücre Enstitüsü Öğr. Gör. Dr. Orkun Cevheroğlu'na konfokal mikroskop ile hücre görüntülenmesindeki yardımlarından dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Histolojik çalışmaların yapılmasında yardımlarını bizden esirgemeyen Ankara Üniversitesi Patoloji laborantı Kadriye Yücel Aydın'a sonsuz teşekkür ederim.

DNA miktar tayinin yapılmasında floresans spektrofotometre ölçümlerinin alınmasında yardımlarını esirgemeyen Dr. Soner Çakmak'a saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Hayvan deneylerinin gerçekleştirilmesinde yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Çağdaş Oto'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Uzun süreli eğitim hayatım boyunca sabırla gelmemi bekleyen ve yardımlarını esirgemeyen değerli annem, babam ve kardeşlerime sevgi ile teşekkürlerimi sunarım.

Bu zorlu süreçte sevgi ve sonsuz sabrıyla hep yanımda olan ve bekleyen hayat arkadaşım canım eşim Merjen Yomudova'ya ve canım kızım Meryem'e varlıklarıyla zorluklara dayanma gücümü arttırdıkları için sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN	i
ÖZET.....	iii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vii
SEKİLLER DİZİNİ	xiii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xxii
SİMGELER DİZİNİ	xxiv
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	5
2.1. OSTEOKONDRAL DOKUNUN BİYOKİMYASAL GRADYAN YAPISI	5
2.2. OSTEOKONDRAL DOKU HASARLARI.....	9
2.3. OSTEOKONDRAL DOKU HASARLARININ TEDAVİSİ.....	10
2.4. OSTEOKONDRAL DOKU HASARLARININ TEDAVİSİNDE DOKU MÜHENDİSLİĞİ YAKLAŞIMLARI	12
2.5. OSTEOKONDRAL DOKU MÜHENDİSLİĞİNDE DOKU İSKELELERİ	16
3. GEREKÇE VE AMAC.....	28
4. MATERYAL VE YÖNTEM.....	30
4.1. MATERYAL.....	32
4.2. OSTEOKONDRAL DOKU ÜNİTESİ TASARIMI VE ÜRETİMİNDE UYGULANAN YÖNTEMLER.....	33

4.3. SUBKONDRAL KEMİK FAZI ÜRETİMİ.....	34
4.4. KALSİFİYE KIKIRDAK (GEÇİŞ BÖLGESİ) FAZI.....	39
4.5. KIKIRDAK FAZI.....	40
4.6. OSTEOKONDRAL DOKU ÜNİTESİNİ OLUŞTURAN FAZLARA AİT YAPILARIN KARAKTERİZASYONU.....	41
4.6.1. FOURİER DÖNÜŞÜMLÜ KIZIL ÖTESİ SPEKTROSKOPİSİ – AZALTILMIŞ TOPLAM YANSIMA (FTIR-ATR) İLE KİMYASAL ANALİZ	41
4.6.2. TARAMALI ELEKTRON MİKROSKOBU (SEM) İLE MORFOLOJİK ANALİZİ	42
4.6.3. MEKANİK ÖZELLİKLER.....	42
4.6.4. REOLOJİK ANALİZLER	42
4.6.5. MİKRO-BİLGİSAYARLI TOMOGRAFİ (μ-CT) İLE 3-BOYUTLU (3B) GÖRÜNTÜLEME VE GÖZENEKLİLİK ANALİZİ.....	43
4.6.6. SU TUTMA KAPASİTESİ	44
4.6.7. ÇÖZÜNME TESTİ	44
4.6.8. SUBKONDRAL FAZ DOKU İSKELELERİNDEN KOLLAJEN SALIMININ İNCELENMESİ	45
4.7. OSTEOKONDRAL DOKU ÜNİTESİNİ OLUŞTURAN FAZLAR İLE GERÇEKLEŞTİRİLEN HÜCRE KÜLTÜR ÇALIŞMALARI.....	45
4.7.1. SUBKONDRAL KEMİK FAZI İLE GERÇEKLEŞTİRİLEN HÜCRE KÜLTÜR ÇALIŞMALARI....	45
4.7.2. KALSİFİYE KIKIRDAK VE KIKIRDAK FAZ JELLERİ İLE GERÇEKLEŞTİRİLEN ÇALIŞMALAR	47
4.7.3. PRESTOBLUE ANALİZİ İLE HÜCRE ÜREMESİNİN TAKİBİ	49
4.7.4. HÜCRE CANLILIK (LIVE/DEAD) ANALİZİ.....	49
4.7.5. DNA ANALİZİ.....	49
4.7.6. GLİKOZAMİNOGLİKAN (GAG) ANALİZİ	50
4.7.7. KOLLAJEN İÇERİĞİ ANALİZİ.....	50

4.7.8. TARAMALI ELEKTRON MİKROSKOBU (SEM) İLE HÜCRE MORFOLOJİSİNİN İNCELENMESİ.....	50
4.7.9. KALSİYUM TAYİNİ.....	51
4.7.10. ALKALİN FOSFOTAZ (ALP) AKTİVİTESİ.....	51
4.7.11. HİDROJELLERDE KONTRAKSİYON	52
4.7.12. EŞ ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (QRT-PCR) ANALİZİ.....	52
4.7.13. AGAROS JEL ELEKTROFOREZİ	54
4.7.14. HİSTOLOJİK ÇALIŞMALAR.....	55
4.8. ÇOK FAZLI GRADYAN YAPIDA OSTEOKONDRAL DOKU ÜNİTESİNİN ÜRETİMİ	55
4.8.1. ÇOK FAZLI GRADYAN OSTEOKONDRAL DOKU ÜNİTESİNİN KARAKTERİZASYONU	56
4.8.2. MC3T3-E1 VE ATDC5 HÜCRELERİNİ İÇEREN OSTEOKONDRAL DOKU ÜNİTESİNİN ÜRETİMİ	56
4.8.3. MTT İLE ÜREME ANALİZİ	57
4.8.4. DNA ANALİZİ.....	58
4.8.5. GLİKOZAMİNOGLİKAN (GAG) ANALİZİ	58
4.8.6. TOPLAM KOLLAJEN İÇERİĞİ ANALİZİ.....	58
4.8.7. ALKALİN FOSFOTAZ (ALP) AKTİVİTESİ.....	58
4.8.8. QRT-PCR ANALİZİ İLE GEN EKSPRESYON ANALİZİ	58
4.8.9. HİSTOLOJİK ANALİZ.....	59
4.8.10. İMMÜNHİSTOKİMYASAL ANALİZ.....	59
4.9. OSTEOKONDRAL DOKU ÜNİTESİ İLE GERÇEKLEŞTİRİLEN <i>IN VIVO</i> BİYUYUMLULUK ANALİZİ	60
4.10. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER.....	60
<u>5. ARAŞTIRMA BULGULARI.....</u>	<u>61</u>
5.1. SUBKONDRAL KEMİK FAZININ BELİRLENMESİNE YÖNELİK ÇALIŞMALARDAN ELDE EDİLEN SONUÇLAR.....	61

5.1.1. FTIR İLE KİMYASAL YAPI ANALİZİ	62
5.1.2. SUBKONDRAL KEMİK FAZINA AİT MORFOLOJİK ANALİZLER	67
5.1.3. MEKANİK TESTLER.....	73
5.1.4. SU TUTMA KAPASİTESİNİN BELİRLENMESİ	77
5.1.5. KOLLAJEN SALIMI.....	78
5.1.6. MİKRO-CT ANALİZİ.....	79
5.2. SUBKONDRAL KEMİK FAZA AİT HÜCRE KÜLTÜRÜ ÇALIŞMALARINDAN ELDE EDİLEN SONUÇLAR.....	81
5.2.1. PRESTOBLUE İLE ÜREME ANALİZİ	81
5.2.2. DNA ANALİZİ.....	82
5.2.3. ALKALEN FOSFATAZ (ALP) AKTİVİTESİ	82
5.2.4. MİNERALİZASYON	83
5.2.5. SEM İLE HÜCRE MORFOLOJİSİ ANALİZİ	84
5.2.6. HİSTOLOJİK ANALİZ.....	88
5.2.7. QRT-PCR.....	88
5.3. KALSİFİYE KIKIRDAK (GEÇİŞ BÖLGESİ) FAZİ İLE GERÇEKLEŞTİRİLEN HÜCRE KÜLTÜR ÇALIŞMALARINDAN ELDE EDİLEN SONUÇLAR	89
5.3.1. FTIR-ATR İLE KALSİFİYE KIKIRDAK FAZINA AİT KİMYASAL YAPI ANALİZİ	91
5.3.2. KALSİFİYE KIKIRDAK FAZINA AİT SEM İLE MORFOLOJİ ANALİZİ	93
5.3.3. KALSİFİYE KIKIRDAK FAZINA AİT JELLERİN SU TUTMA KAPASİTELERİ	94
5.3.4. REOLOJİK ANALİZLER	94
5.3.5. MEKANİK DAYANIM.....	98
5.3.6. KALSİFİYE KIKIRDAK FAZINA AİT MİKRO-CT (μ-CT) ANALİZİ.....	99
5.3.7. PRESTOBLUE İLE ÜREME ANALİZİ	100
5.3.8. KALSİFİYE KIKIRDAK FAZINA AİT HÜCRE CANLILIK (LİVE/DEAD) ANALİZİ.....	101
5.3.9. KALSİFİYE KIKIRDAK FAZINA AİT DNA MİKTAR ANALİZİ	103

5.3.10. HİDROJELLERDE KONTRAKSİYON.....	103
5.3.11. KALSİFİYE KIKIRDAK FAZINA AİT GLİKOZAMİNOGLİKAN (GAG) ANALİZİ	104
5.3.12. KOLLAJEN İÇERİK ANALİZİ	105
5.3.13. KALSİFİYE KIKIRDAK FAZINA AİT ALKALİN FOSFATAZ (ALP) AKTİVİTESİ.....	106
5.3.14. RT-PCR ANALİZİ.....	107
5.3.15. HİSTOLOJİK ANALİZLER	109
5.4. KIKIRDAK FAZINA AİT ÇALIŞMALAR	112
5.4.1. KIKIRDAK FAZINA AİT FTIR İLE KİMYASAL YAPI ANALİZİ	112
5.4.2. KIKIRDAK FAZINA AİT SEM ANALİZİ	113
5.4.3. KIKIRDAK FAZINA AİT REOLOJİK ANALİZLER	114
5.4.4. MEKANİK DAYANIM.....	117
5.4.5. KIKIRDAK FAZINA AİT JEL YAPININ MİKRO-CT (μ -CT) ANALİZİ	117
5.4.6. KIKIRDAK FAZINA AİT PRESTO BLUE İLE ÜREME ANALİZİ	118
5.4.7. KIKIRDAK FAZINA AİT HÜCRE CANLILIK (LIVE/DEAD) ANALİZİ	119
5.4.8. KIKIRDAK FAZINA AİT DNA ANALİZİ	119
5.4.9. KIKIRDAK FAZINA AİT GLİKOZAMİNOGLİKAN (GAG) ANALİZİ	120
5.4.10. HİSTOLOJİK ANALİZ	121
5.5. OSTEOKONDRAL DOKU ÜNİTESİNE AİT SONUÇLAR.....	121
5.5.1. OSTEOKONDRAL DOKU ÜNİTESİNE AİT SEM ANALİZİ	122
5.5.2. OSTEOKONDRAL DOKU ÜNİTESİNE AİT μ -CT ANALİZİ	124
5.5.3. MEKANİK DAYANIM.....	126
5.5.4. SEÇİLEN SUBKONDRAL KEMİK FAZINA AİT HÜCRE CANLILIK ANALİZİ.....	126
5.5.5. MTT İLE ÜREME ANALİZİ	127
5.5.6. DNA ANALİZİ.....	128
5.5.7. GAG TAYİNİ.....	129

5.5.8. TOPLAM KOLLAJEN TAYİNİ	130
5.5.9. ALP AKTİVİTESİ.....	131
5.5.10. HİSTOLOJİK ANALİZLER	132
5.5.11. İMMÜNHİSTOKİMYASAL ANALİZ	135
5.5.12. QRT-PCR ANALİZİ.....	135
5.6. <i>In vivo</i> BİYOUYUMLULUK ANALİZİ.....	136
<u>6. TARTIŞMA VE SONUÇ.....</u>	<u>139</u>
6.1. SUBKONDRAL KEMİK FAZINA AİT SONUÇLAR.....	139
6.2. KALSİFİYE KIKIRDAK (GEÇİŞ BÖLGESİ) FAZINA AİT SONUÇLAR.....	148
6.3. KIKIRDAK FAZINA AİT SONUÇLAR.....	155
6.4. OSTEOKONDRAL DOKU ÜNİTESİNE AİT SONUÇLAR.....	156
<u>7. KAYNAKLAR.....</u>	<u>160</u>
<u>8. EKLER.....</u>	<u>178</u>
EK 1: MC3T3-E1 HÜCRESİNE AİT ÜREME EĞRİSİ	178
EK 2: ATDC5 HÜCRESİNE AİT ÜREME EĞRİSİ.....	178
EK 3: DNA KALİBRASYON GRAFİĞİ	179
EK 4: ALP KALİBRASYON GRAFİĞİ	179
EK 5: GAG KALİBRASYON GRAFİĞİ	180
EK 6: KOLLAJEN KALİBRASYON GRAFİĞİ	180
EK7: KAUKUK ESNEKLİK TEORİSİ (<i>RUBBER ELASTIC THEORY</i>) İLE ÇAPRAZ BAĞLAR ARASI ORTALAMA MOLEKÜL AĞIRLIĞI (M_c) VE GÖZ BOYUTU (<i>MESH SIZE</i>) HESAPLANMASI	181
EK 8: HİSTOLOJİK BOYAMA PROTOKOLÜ	182
<u>ÖZGEÇMİŞ</u>	<u>186</u>
<u>TEZDEN ÇIKAN YAYINLAR.....</u>	<u>189</u>

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Osteokondral doku tabalarının şematik gösterimi ((4) no’lu referanstan değiştirilerek kullanılmıştır).	5
Şekil 2.2. Bir osteokondral dokuda bulunan farklı fazların özellikleri; A) osteokondral doku boyunca kollajen tip I, kollajen tip II, hidroksiapatit ve su içeriği varyasyonlarına odaklanan biyokimyasal gradyan, (B) osteokondral bölgede etki eden farklı mekanik kuvvetler ve viskoelastik davranış farklılıkları açısından biyomekanik gradyan, (D) porozite ve geçirgenlik varyasyonlarına ve ayrıca osteokondral kalınlığı boyunca damar ağının varlığına odaklanan yapısal gradyan.	8
Şekil 2.3. (A) Normal ve sağlıklı eklem kıkırdığı (B) Kıkırdak kaybı, subkondral kemik kalınlaşması ve ayrıca kıkırdak matrislerinde değişiklikler gösteren osteoartritlik eklem (24).	9
Şekil 2.4. Osteokondral hasarların sınıflandırılmasında kullanılan <i>Outbridge Classification System</i> şematik gösterimi.	10
Şekil 2.5. Osteokondral defektlerin rejenerasyonunda uygulanan klinik ve doku mühendisliği stratejileri	11
Şekil 2.6. OK doku hasarları için klinikte uygulanan mevcut tedavi yöntemler.	12
Şekil 2.7. Hücre yüklü hidrojel yapıları ile osteokondral arayüz ve tam kalınlıkta kıkırdak hasarlarının tedavisine yönelik doku mühendisliği stratejisinin şematik gösterimi ((25)no’lu referans değiştirilerek kullanılmıştır).	13
Şekil 2.8. Farklı osteokondral doku ünitesi tasarım yaklaşımları.	14
Şekil 2.9. Osteokondral ünitenin ve biyokimyasal gradyanın şematik gösterimi. Şekil, hücre sayısı ve oryantasyonunda olduğu kadar, osteokondral ara yüz boyunca hücre dışı matris fiberlerin düzenlemesindeki farklılıkları göstermektedir. Dahası, kemiğin vaskülarize gözenekli yapısı ve kıkırdığın avasküler oldukça geçirimsiz doğası temsil edilmektedir.	16

Şekil 2.10. Kitin ve kitosanın kimyasal yapıları.	17
Şekil 2.11. Hidroksiapatitin moleküler yapısı.	20
Şekil 2.12. Dondurarak kurutma yönteminin şematik gösterimi ((64) no'lu referans değiştirilerek kullanılmıştır).	21
Şekil 2.13. Sıcaklık-duyarlı kitosan/poliol-fosfat sistemlerinin jelleşme mekanizmasının şematik gösterimi ((69) no'lu referans değiştirilerek kullanılmıştır).	22
Şekil 2.14. Kitosan hidrojel ağlarının β –GP ve genipin çapraz bağlayıcılarının varlığında olası çapraz bağlanma mekanizması ((71) no'lu referans değiştirilerek kullanılmıştır).	22
Şekil 2.15. İki kitosan zincirinin bir genipin molekülü ile çapraz bağlanmasının şematik gösterimi.	23
Şekil 4.1. Tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen deneysel basamakların şematik gösterimi.	31
Şekil 4.2. (a) Subkondral kemik fazı üretimine yönelik gerçekleştirilen deneysel basamakların şematik gösterimi (b) TPP-chi/nHA-kf doku iskelelerinin kollajen kaplama işleminin şematik gösterimi.	36
Şekil 4.3. Kalsifiye kıkırdak fazı üretimine yönelik gerçekleştirilen deneysel basamakların şematik gösterimi.	40
Şekil 4.4. Kıkırdak fazı üretimine yönelik gerçekleştirilen deneysel basamakların şematik gösterimi.	41
Şekil 4.5. Hücre kültür çalışmaları kullanılan sterillenmiş doku iskelelerinin (10mmx2mm) görüntüleri	46
Şekil 4.6. Subkondral kemik fazına ait <i>in-vitro</i> hücre kültür çalışmalarının şematik gösterimi.	47
Şekil 4.7. Kalsifiye kıkırdak fazına ait <i>in-vitro</i> hücre kültür çalışmalarının şematik gösterimi.	48

Şekil 4.8. Kıkırdak fazına ait <i>in-vitro</i> hücre kültür çalışmalarının şematik gösterimi.....	48
Şekil 4.9. Osteokondral doku ünitesinin üretimine yönelik gerçekleştirilen deneysel basamakların şematik gösterimi.	56
Şekil 5.1. Kemik faz bileşimlerine ait FTIR-ATR spektrumları, a) Chi/nHA doku iskeleleri (çapraz bağlanmamış yapı), chi/nHA-kf (TPP çapraz bağlı yapı), chi/nHA-kf (kollajen kaplı TPP çapraz bağlı yapı), (glioksal çapraz bağlı yapı). b) Chi80/Coll20/nHA doku iskeleleri (çapraz bağlanmamış yapı), (NHS/EDAC çapraz bağlı yapı), (glioksal çapraz bağlı yapı). c) Chi50/Coll50/nHA doku iskeleleri (çapraz bağlanmamış yapı), (NHS/EDAC çapraz bağlı yapı),(glioksal çapraz bağlı) doku iskelelerinin kimyasal yapılarını göstermektedir.	64
Şekil 5.2. Çapraz bağlanmamış (a) chi/nHA-kf, (b) chi80/coll20/nHA ve (c) chi50/coll50/nHA doku iskelelerine ait SEM görüntüleri (100X, 200X ve 500X) ve EDAX verileri.	67
Şekil 5.3. NHS/EDAC ile çapraz bağlama sonrasında (a) NHS/EDAC-chi/nHA-kf, (b) NHS/EDAC-chi80/coll20/nHA ve (c) NHS/EDAC-chi50/coll50/nHA doku iskelelerine ait SEM görüntüleri (100X, 200X ve 500X) ve EDAX verileri.	68
Şekil 5.4. Glioksal ile çapraz bağlama sonrasında (a) glioksal-chi/nHA-kf, (b) glioksal-chi80/coll20/nHA ve (c) glioksal-chi50/coll50/nHA doku iskelelerine ait SEM görüntüleri (100X, 200X ve 500X) ve EDAX verileri.	70
Şekil 5.5. TPP ile çapraz bağlama sonrasında (a) TPP-chi/nHA-kf, (b) TPP ile çapraz bağlama ve ardından kollajen tip I ile kaplanmış (TPP-chi/nHA-kf+Coll) doku iskelelerine ait SEM görüntüleri (100X, 200X ve 500X) ve EDAX verileri.....	71
Şekil 5.6. chi/nHA-kf, TPP-chi/nHA-kf, NHS/EDAC-chi/nHA-kf ve glioksal-chi/nHA-kf doku iskelelerine ait gerilim-gerinim eğrileri.....	73
Şekil 5.7. chi80/coll20/nHA, NHS/EDAC-chi80/coll20/nHA ve glioksal-chi80/coll20/nHA doku iskelelerine ait gerilim-gerinim eğrileri.....	74

Şekil 5.8. chi50/coll50/nHA, NHS/EDAC-chi50/coll50/nHA ve glioksal-chi50/coll50/nHA doku iskelelerine ait gerilim-gerinim eğrileri.....	75
Şekil 5.9. TPP-chi/nHA-kf+Coll doku iskelelerine ait gerilim-gerinim eğrileri.....	76
Şekil 5.10. Kemik faz olarak kullanılması planlanan doku iskelelerinin basma testi sonucunda elde edilen basma modül (E, kPA) değerleri.	77
Şekil 5.11. Kemik faz doku iskelelerine ait %şişme oranı ve %su tutma kapasitesi değerleri.....	78
Şekil 5.12. Chi/nHA, Chi80/Coll20/nHA ve Chi50/Coll50/nHA doku iskeleleri üzerinde çoğalan MC3T3-E1 hücrelerine ait Presto-Blue grafiği (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık, n=3, kontrol grubu Chi/nHA iken *p<0,05, **p< 0,01, ***p< 0,001).....	81
Şekil 5.13. chi/nHA-kf, glioksal-chi80/coll20/nHA ve glioksal-chi50/coll50/nHA doku iskeleleri üzerinde çoğalan MC3T3-E1 hücrelerine ait DNA miktar tayini (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık, n=3, kontrol grubu Chi/nHA iken *p<0,05, **p< 0,01).....	82
Şekil 5.14. Chi/nHA-kf, glioksal-chi80/Coll20/nHA ve chi50/Coll50/nHA doku iskeleleri üzerinde çoğalan MC3T3-E1 hücrelerine ait ALP aktivitesi grafiği (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık, n=3, kontrol grubu Chi/nHA iken *p<0,05, **p< 0,01).	83
Şekil 5.15. Chi/nHA-kf, glioksal-chi80/coll20/nHA ve glioksal-chi50/coll50/nHA doku iskeleleri üzerinde çoğalan MC3T3-E1 hücrelerine ait mineralizasyon grafiği (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık, n=3, kontrol grubu Chi/nHA iken ***p< 0,001).....	84
Şekil 5.16. chi/nHA-kf üzerinde çoğalan MC3T3-E1 hücrelerine ait SEM (1000 X) görüntüleri: 7. gün.....	85
Şekil 5.17. Glioksal-chi80/Coll20/nHA üzerinde çoğalan MC3T3-E1 hücrelerine ait SEM (1000 X ve 2500 X) görüntüleri: 7.gün.....	85
Şekil 5.18. Glioksal-chi50/Coll50/nHA üzerinde çoğalan MC3T3-E1 hücrelerine ait SEM (500 X ve 2500 X) görüntüleri: 14.gün.....	86

Şekil 5.19. chi/nHA-kf üzerinde çoğalan MC3T3-E1 hücrelerine ait SEM (1000 X ve 2500 X) görüntüleri: 14.gün.....	86
Şekil 5.20. Glioksal-chi80/coll20/nHA üzerinde çoğalan MC3T3-E1 hücrelerine ait SEM (1000 X ve 2500 X) görüntüleri: 14.gün.....	87
Şekil 5.21. Glioksal-chi50/Coll50/nHA-kf üzerinde çoğalan MC3T3-E1 hücrelerine ait SEM (2500 X ve 5000 X) görüntüleri: 14.gün.	87
Şekil 5.22. MC3T3-Ê1 hücrelerin chi/nHA-kf, glioksal-chi80/coll20/nHA ve glioksal-chi50/coll50/nHA doku iskelelerindeki 28. gün H&E boyaması görüntüleri.	88
Şekil 5.23. Kültürün 14. gününde elde edilen doku iskelelerine (chi/nHA-kf, glioksal-chi80/coll20/nHA ve glioksal-chi50/coll50/nHA) ait Ocn, Opn, RunX2 ve Col I gen ekspresyon seviyelerini gösteren RT-PCR analizi sonuçları. Kontrol grubu chi/nHA-kf iken istatistiksel farklar; *p<0.05, **p<0.01 ve ***p<0.001).....	89
Şekil 5.24. Kalsifiye kıkırdak fazına ait (chi/nHA, chi/coll II/nHA 70:30, chi/coll II/nHA 50:50, chi/coll II/nHA 30:70) FTIR-ATR spektrumları.	92
Şekil 5.25.Kalsifiye kıkırdak fazına ait SEM (2 500 X, 5000 X ve 10000 X) görüntüleri ve EDAX verileri, (a) chi/nHA, (b) chi/Coll/nHA 70: 30, (c) chi/coll/nHA 50:50, (d) chi/coll/nHA 30:70.....	93
Şekil 5.26. Kalsifiye kıkırdak fazına ait deformasyon (γ) değerlerine karşılık G' ve G'' (Pa) değerleri, (a) chi/nHA, (b) chi/Coll/nHA 70: 30, (c) chi/coll/nHA 50:50, (d) chi/coll/nHA 30:70.....	95
Şekil 5.27. Kalsifiye kıkırdak fazına salınımlı frekans değerlerine karşılık gelen G' ve G'' değerleri (a) chi/nHA, (b) chi/Coll/nHA 70: 30, (c) chi/coll/nHA 50:50, (d) chi/coll/nHA 30:70.....	96
Şekil 5.28. Hidrojellerin frekans değerinin bir fonksiyonu olarak kayıp tanjant ($\tan \delta$) değeri.....	97

Şekil 5.29. Chi/coll II/ nHA 50:50 hidroجلي için sıcaklık ve zamana göre viskozite değişimi.	98
Şekil 5.30. Kalsifiye kırıldak fazına ait jellerin sıkıştırma sonucu elde edilen gerilim-gerinim eğrileri.	99
Şekil 5.31. Chi/nHA, chi/coll II/nHA 70:30, chi/coll II/nHA 50:50 ve chi/Coll/nHA 30:70 jel yapılarında çoğalan ATDC5 hücrelerine ait Presto-Blue grafiğı (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık, n=3, kontrol grubu Chi/nHA iken *p<0,05, **p< 0,01).	101
Şekil 5.32. Chi/nHA, chi/coll II/nHA 70:30, chi/coll II/nHA 50:50 ve chi/coll/nHA 30:70 jel yapılarında kültürün 7. gününde üremekte olan ATDC5 hücrelerine ait konfokal görüntüleri. Yeşil ışığa canlı hücreleri, kırmızı ise ölü hücreleri göstermektedir.	102
Şekil 5.33. Hidrojel gruplarının DNA içerik analizi (*p<0.05, 7.gün hidrojeller kontrol olarak kabul edilmiştir).	103
Şekil 5.34. ATDC5 hücre içeren hidrojellerin zamana bağlı kontraksiyonu.	104
Şekil 5.35. Hidrojellere enkapsüle edilmiş ATDC5 hücrelerinin ürettiğı GAG analizi (*p<0.05, **p<0.01 kontrol grubu chi/nHA, ♦p<0.05 chi/coll II/nHA 70:30, ●p<0.05 7. gün ve +p<0.05 14.gün hidrojeller kontrol grubu olarak seçilmiştir).	105
Şekil 5.36. Hidrojellerin 7.ve 28. günlerde toplam kollajen içerik analizi (*p<0.05, 7.gün hidrojeller kontrol olarak kabul edilmiştir).	106
Şekil 5.37. Hidrojellerin 7., 14. ve 21. günlerdeki ALP aktivitesi (*p<0.05, 7.gün hidrojeller kontrol olarak kabul edilmiştir).	107
Şekil 5.38. Kalsifiye kırıldak fazına ait ATDC5 enkapsüle edilerek hazırlanmış jellerde kültürün 7. 14. ve 21. günlerinde RT-PCR ile gerçekleştirilmiş gen (COL X, MMP-13 ve RunX2) ekspresyonları. (*p<0.05, * *p<0.05 7.gün chi/nHA ve ♦ p<0.05, ♦♦ p<0.01 chi/coll II/nHA 70:30 hidrojelleri kontrol olarak kabul edilmiştir). Agaroz jelde yürütölmüş olan sonuçlar sağ alt köşede verilmiştir.	108

Şekil 5.39. Kalsifiye kıkırdak fazına ait boş hidrojellerin (3X) optik mikroskop ile alınmış H&E, Masson Trikom, Picrosirius red ve Alcian blue boyama görüntüleri.	110
Şekil 5.40. Kalsifiye kıkırdak fazına ait ATDC5 hücresi enkapsüle edilmiş hidrojellerin kültürün 28. günde (3X) optik mikroskop ile alınmış H&E, Masson's Trichrome, Picrosirius red ve Alcian blue boyama görüntüleri.....	111
Şekil 5.41. Kıkırdak fazına ait jellerin (Chi, chi50/coll50, chi30/coll70) FTIR-ATR spektrumları.	112
Şekil 5.42. Kıkırdak fazı için hazırlanan hidrojel yapılara ait (a) chi, (b) chi/ coll II 50:50 ve (c) chi/ coll II 30:70 SEM (1000 X, 2500 X ve 5000 X) görüntüleri ve EDAX verileri.	114
Şekil 5.43. Kıkırdak fazına ait deformasyon (γ) değerlerine karşılık G' ve G'' (Pa) değerleri, a) Chi, b) Chi50/Coll50, c) Chi30/Coll70.	115
Şekil 5.44. Kıkırdak fazına ait salınımlı frekans değerlerine karşılık gelen G' ve G'' değerleri, a) Chi, b) Chi50/Coll50 c) Chi30/Coll70.	116
Şekil 5.45. Chi50/coll50 jeline ait gerilim-gerinim eğrileri.	117
Şekil 5.46. Chi50/Coll50 jel yapılarda çoğalan ATDC5 hücrelerine ait Presto-Blue grafiği (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık, n=3, kontrol grubu Chi/nHA iken ***p< 0,001)...118	118
Şekil 5.47. chi50/coll50 jel yapısında kültürün 7. gününde üremekte olan ATDC5 hücrelerine ait konfokal görüntüleri.....	119
Şekil 5.48. Chi50/50 jeline ait DNA içerik analizi (*p<0.05, **p<0.05 7.gün hidrojeller kontrol olarak kabul edilmiştir).	120
Şekil 5.49. Chi50/coll50 jeline enkapsüle edilmiş ATDC5 hücrelerinin ürettiği GAG analizi (*p<0.05, **p<0.05 kontrol grubu olarak kültürün 7.günündeki jel seçilmiştir)...120	120
Şekil 5.50. Enkapsüle ATDC5 hücrelerin kıkırdak fazına ait chi50/coll50 jellerindeki 28. gün H&E boyaması görüntüleri (2.1X ve 19.1 X).....	121

Şekil 5.51. Osteokondral doku ünitesini oluşturan biyomimetik ve gradyan bileşim.	122
Şekil 5.52. Osteokondral doku ünitesinin makroskopik yapısı ve kesitin SEM (16 X) görüntüsü.	122
Şekil 5.53. Osteokondral doku ünitesine ait SEM (100 X ve 150 X) görüntüleri.	123
Şekil 5.54. Osteokondral doku ünitesine ait fazların EDAX verileri ve gözenek çapları. .	124
Şekil 5.55. Osteokondral doku ünitesine ait μ -CT görüntüsü.	125
Şekil 5.56. Osteokondral doku ünitesinin basma analizi sonucu elde edilen gerilim-gerinim eğrileri.	126
Şekil 5.57. Chi80/coll20/nHA doku iskelelerinde kültürün 7. gününde üremekte olan MC3T3-E1 hücrelerine ait konfokal görüntüleri. Yeşil ışığa canlı hücreleri, kırmızı ise ölü hücreleri göstermektedir.	127
Şekil 5.58. chi50/coll50 jel yapısında kültürün 7. gününde üremekte olan ATDC5 hücrelerine ait konfokal görüntüleri.	127
Şekil 5.59. MC3T3-E1 ve ATDC-5 hücre içeren gradyan osteokondral doku iskelesi üreme analizi (* $p<0.05$, ** $p<0.01$ ve *** $p<0.001$ 7.gün gradyan osteokondral doku iskelesi kontrol olarak kabul edilmiştir).	128
Şekil 5.60. MC3T3-E1 ve ATDC5 hücrelerini içeren osteokondral doku ünitesine ait DNA içerik analizi (* $p<0.05$, ** $p<0.05$ 7.gün osteokondral doku ünitesi kontrol olarak kabul edilmiştir).	129
Şekil 5.61. MC3T3-E1 ve ATDC5 hücrelerini içeren gradyan osteokondral doku iskelesi tarafından üretilen GAG miktarı (* $p<0.05$ 7.gün gradyan osteokondral doku iskelesi kontrol olarak seçilmiştir).	130
Şekil 5.62. MC3T3-E1 ve ATDC5 hücrelerini içeren gradyan osteokondral doku iskelesi tarafından üretilen kollajen miktarı (* $p<0.05$ 7.gün gradyan osteokondral doku iskelesi kontrol olarak seçilmiştir).	131

Şekil 5.63. Osteokondral doku ünitesinin 7., 14. ve 21. günlerdeki ALP aktivitesi (**p<0.01, **p<0.001 kontrol grubu olarak 7.gün hidrojel kontrol olarak kabul edilmiştir).	132
Şekil 5.64. MC3T3-E1 ve ATDC5 hücrelerini içeren osteokondral doku ünitesinin kültürün 28.gününde kesitlerden alınan optik mikroskop ile H&E, picrosirius red, masson trikrom, Alcian blue ve Alizarin red boyama görüntüleri.	134
Şekil 5.65. Osteokondral doku ünitesinin kültürün 28. gününde COL I, COL I ve COL X immünohistokimyasal boyaması.	135
Şekil 5.66. Osteokondral doku ünitesine ait Col I, Col II, Col X, MMP-13 ve ALP ekspresyon seviyeleri.(İstatistik analizi ,* p<0.05, ** p<0.01, n=3).	136
Şekil 5.67. Osteokondral doku ünitelerinin (a) Balb/C erkek farelerin subkutan bölgesine yerleştirme işlemi, (b) farelere dikiş atıldıktan sonra antibiyotik uygulanması ve (c) 14 gün sonunda biyopsi yoluyla deri altından alınarak histolojik incelemesi yapılan doku ünitesi örnekleri (n=6).	137
Şekil 5.68. Osteokondral doku ünitesi yerleştirilmiş olan farelerin izlenmesi ve (a) ve (b) farelerdeki 3 gün sonraki yara iyileşme görüntüleri ve (c) 10 gün sonrasında yara iyileşmesi resimleri.	137
Şekil 5.69. Hayvan deneylerine ait sonuçlar (A) Kitosan içeren eksizyonel biyopsi (H&Ex5). (B) Yoğun iltihaplı sızıntı ile çevrili boşluk (H&Ex38, kara ok). (C) Kitosan, PMNL'ler (H&Ex90, sarı ok) tarafından yoğunlukla sızmış ve parçalanmış görüntüleri. (D) Makrofajlar siyah okla gösterilmiştir (H&Ex238).	138

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Biyokimyasal gradyan içeriklerine göre çok fazlı osteokondral iskeleleri.	27
Çizelge 4.1. Subkondral kemik fazı için üretilen doku iskelesi grupları ve bileşimleri. Tüm doku iskelelerinde nHA oranı %1 (w/v) olacak şekilde sabit tutulmuştur.	38
Çizelge 4.2. Subkondral kemik ve kıkırdak farklılaşmasının incelenmesinde kullanılan primer dizileri.	54
Çizelge 4.3. Osteokondral doku ünitesinde farklılaşmanın incelenmesinde kullanılan primer dizileri.	59
Çizelge 5.1. Kollajen tip I içermeyen chi/nHA doku iskelelerine ait FTIR-ATR spektrumundan elde edilen pikler ve açıklamaları.	65
Çizelge 5.2. Kollajen tip I içeren çapraz bağlanmamış chi/nHA doku iskelelerine ait FTIR-ATR spektrumundan elde edilen pikler ve açıklamaları.	66
Çizelge 5.3. Kemik fazına ait doku iskelelerinin EDAX ile elemental analiz sonuçları	72
Çizelge 5.4. Kitosan/kollajen tip I/nHA doku iskelelerinden kollajen salımı (n=4).	78
Çizelge 5.5. TPP-chi /nHA+Coll doku iskelelerinden kollajen salımı (n=4).	79
Çizelge 5.6. Subkondral kemik fazı örneklerinin mikro-CT analizinden elde edilen veriler. chi/nHA-kf, TPP-chi/nHA-kf, glioksal-chi80/coll20/nHA ve glioksal-chi50/coll50/nHA-kf doku iskeleleri glioksal ile çapraz bağlanmış olan yapılardır.	80
Çizelge 5.7. Kitosan çözeltisine ait hızlı jelleşme parametrelerinin bulunmasına yönelik gerçekleştirilen deneyler.	90
Çizelge 5.8. Farklı oranlardaki chi/ col II / nHA jel örneklerinin hazırlanmasında kullanılan karışımların bileşimi.	91
Çizelge 5.9. Kalsifiye kıkırdak jel fazına ait FTIR-ATR spektrumlarının değerlendirilmesi	92

Çizelge 5.10. Kalsifiye kıkırdak fazına ait jel yapıların EDAX ile elemental analiz sonuçları.	94
Çizelge 5.11. Tüm hidrojellerin reolojik verileri.	98
Çizelge 5.12. Kalsifiye kıkırdak fazı örneklerinin mikro-CT analizinden elde edilen veriler.	100
Çizelge 5.13. Kıkırdak jel fazına ait FTIR-ATR spektrumlarının değerlendirilmesi ile elde edilen pikler ve açıklamaları.	113
Çizelge 5.14. Kıkırdak fazına ait jel yapıların EDAX ile elemental analiz sonuçları.	114
Çizelge 5.15. Kıkırdak fazına ait hidrojellerin reolojik verileri.	116
Çizelge 5.16. Kıkırdak fazına ait jel yapıdaki Chi50/Coll50 örneklerinin mikro-CT analizinden elde edilen veriler.	118
Çizelge 5.17. Osteokondral doku ünitesinin mikro-CT analizinden elde edilen veriler.	125

SİMGELER DİZİNİ

μ -CT	Mikro-bilgisayarlı tomografi
μ g	Mikrogram
μ l	Mikrolitre
ALP	Alkalin fosfotaz
ATDC5	Sıçan kondrojenik hücreleri
Chi	Kitosan
Coll I	Tip I Kollajen
Coll II	Tip II Kollajen
Coll X	Tip X Kollajen
Coll	Kollajen
ddH ₂	Çift distile su
dk	Dakika
DMEM	Dulbecco'nun modifiye eagle ortamı
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
ECM	Hücre Dışı Matris
EDX	Enerji dağıtıcı X ışını analizi
FBS	Fetal sığır serum
GAG	Glikozaminoglikan
Gp	Gliserol fosfat
H&E	Hemotoksilen&Eozin
HA	Hidroksiapatit
HPRT	Hipoksantin Guanin Fosforibozil Transferaz
ITS	İnsülin-Transferin-Selenyum

MC3T3-E1	Fare Osteoblastik Hücre Hattı
mg	Milligram
MKH	Mezenkimal kök hücre
mM	Milliomolar
MMP	Matris Metalloproteinaz
MTT	3-[4,5-Dimetiltiazol-2-il]-Difeniltetrazolyum Bromür
OCN	Osteokalsin
OK	Osteokondral
OPN	Osteopontin
PBS	Fosfat Tamponu Çözeltilisi
PPIA	Peptidilprolil izomeraz A
RNA	Ribo Nükleik asit
qRT-PCR	Eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
RUNX2	Runt-ilişkili Transkripsiyon Faktörü 2
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
TPP	Sodyum tripolifosfat
UV-VIS	Ultraviyole Görünür Bölge Spektroskopisi

1. GİRİŞ

Eklemdaki osteokondral dokunun dejenerasyonu olarak bilinen osteoartrit (OA) rahatsızlığı yaşayan nüfusun sürekli artmasıyla birlikte osteokondral doku mühendisliği çalışmalarına olan ihtiyaç giderek artmaktadır (1). Dünya genelinde yaklaşık 630 milyon insanı etkilemekte ve nüfus yaşlandıkça da genişlemeye devam etmektedir (2). Genel olarak, osteokondral hasarlar yaşlanmaya bağlı yıpranma veya eklem yaralanmasına bağlı yıpranma ve degradasyon (osteoartirit) sonucu hem subkondral kemik hem de kıkırdak fazının hasar görmesi ile ortaya çıkmaktadır (3). Eklem kıkırdağındaki yaralanmalar, sadece yaşlı hastalarda değil, gençlerde de önemli bir kas-iskelet sistemi morbiditesini uyarabilmektedir. Vücudun kendi kendini onarma kapasitesinin yetersiz kaldığı bu defektler sonucunda, rahatsızlık ağırlı olarak ilerlemekte, hastanın hareket kabiliyeti sınırlanmakta ve yaşam kalitesi olumsuz yönde etkilenmektedir. Osteokondral defektlerin tedavisindeki mevcut klinik yaklaşımlar; yaralı bölgenin temizlenmesi (debridman), mikrokırık (kemik iliği stimülasyon teknikleri), otogreft transplantasyon/mozaikplasti, allogreft transplantasyon ve otolog kondrosit implantasyonudur. Bu tedaviler klinik semptomları azaltmakla birlikte, altta yatan patoloji tedavi edilememektedir. Bununla birlikte, bu tedavilerin uygulanması sonucu, sağlıklı dokuda dejenerasyon, verici saha morbiditesi ve greftin vücut tarafından reddedilmesi (immün reaksiyon) gibi komplikasyonlar ortaya çıkmaktadır. Doku mühendisliği yaklaşımı, osteokondral defektlerin tedavisinde, dokuya spesifik hücrelerin ve biyomalzemelerden elde edilen doku iskelelerinin bir araya getirilmesiyle, biyolojik dokunun yerine geçebilecek ve rejenerasyonunu sağlayacak sistemlerin geliştirilmesi fikrine dayanan bir tedavi opsiyonu sunmaktadır. Osteokondral dokunun tedavisindeki en önemli zorluk; eklem kıkırdağı ve subkondral kemik gibi farklı iyileşme kapasitesine sahip, farklı morfoloji ve fizyolojideki dokuların bir arada ve aynı zamanda hasar görmüş olmasıdır. Vücut içerisinde, endokronal ossifikasyon prosesi sonucu kıkırdak ve kemiğin bir ağ yapı oluşturacak şekilde birbirini tamamlaması ile özgün biyomekanik özelliklere sahip osteokondral doku ünitesinin oluşumu gerçekleşmektedir. Bu doku ünitesi, kıkırdak tabakası, yumuşak/esnek kıkırdak ve rijid kemik dokusu arasındaki kalsifiye kıkırdak geçiş tabakası ve subkondral kemik dokusundan oluşmaktadır. Karmaşık yapıdaki bu biyolojik organizasyonun *in vitro* ortamda elde edilebilmesindeki temel adım, biyomimetik yaklaşımla doğal dokunun hücre dışı matris bileşenlerini içeren çok fazlı, biyobozunur yapıların tasarlanması ve spesifik

hücreler ile bir araya getirilmesidir. Osteokondral dokunun tabakalı yapısının ‘taklit’ edilebilmesinde, çok fazlı doku iskelelerinin bir araya getirilmesi ve faza spesifik hücre fenotipinin korunmasının yanı sıra, tabakaların birbirinden ayrılmadan yapısal bütünlüğün korunması en önemli zorluk ve problemlerin başında gelmektedir.

Yukarıda özetlenen literatür bilgisi ışığında tez çalışması kapsamındaki hedefler aşağıda özetlenmiştir:

- Doktora tez çalışmasının amacı, çok fazlı, biyomimetik ve gradyan yapıda entegre doku ünitelerinin tasarımı, üretimi ve osteokondral doku rejenerasyonunda kullanılabilirliğinin araştırılmasıdır. Bu amaç doğrultusunda, doğal osteokondral yapının katmanlarındaki farklı rejeneratif gereksinimleri karşılayacak şekilde, her bir fazın spesifik özelliklerini taşıyan, çok fazlı doku iskelelerinin tasarımı hedeflenmiştir. Bu fazlar arasındaki entegrasyonun doku iskelelerinin üretimi sırasında oluşturulması ve fazlar arası kesintisiz geçişe sahip osteokondral doku ünitelerinin üretimi amaçlanmıştır. Dondurarak kurutma ve termal jelleşme yöntemlerinin iteratif olarak birbiri ardına uygulanmasıyla heterojen yapıda tek bir doku iskelesinin tasarımı ve üretimi hedeflenmiştir.
- Üretimi hedeflenen doku ünitesindeki her bir fazın (subkondral kemik, kalsifiye kıkırdak, kıkırdak) doğal osteokondral yapının hücre dışı matris bileşenleri kullanılarak hazırlanması amaçlanmıştır. Ayrıca, bu bileşenlerin kompozisyonunun doğal osteokondral yapıyı taklit etmesi hedeflenmiş, bu doğrultuda gradyan faz yapıları tasarlanmıştır. Subkondral kemik fazı kitosan, kollajen tip I ve nanohidroksiapatit bileşenlerinden oluşan gözenekli doku iskelesi olarak tasarlanmıştır. Kemik fazın hemen üzerinde yer alan kalsifiye kıkırdak fazı kitosan, kollajen tip II ve kemiğe göre azalan oranda nanohidroksiapatit içermektedir. En üst tabaka olan kıkırdak dokuya gelindiğinde kalsifiye kıkırdak fazına göre daha yüksek oranda kollajen tip II içeren kitosan/kollajen tip II hidrojel yapılar sentezlenmiştir. Böylelikle tüm bileşenlerin biyobozunur özellikte olduğu, hem biyomimetik hem de gradyan yapıya sahip doku ünitelerinin üretimi hedeflenmiştir.

- Doku mühendisliği yaklaşımı ile üretilen osteokondral yapıların tasarımında göz önünde bulundurulması gereken diğer bir önemli nokta, kondrosit ve osteoblastlar gibi farklı hücre tiplerinin etkileşimidir. Osteokondral yapıda farklı doku fazları arasındaki heterotipik hücre etkileşimlerinin, fazlar arası kesintisiz geçişlerin oluşmasında önemli bir rol oynayacağı düşünülmektedir. Tez çalışmasında, kıkırdak ve kalsifiye kıkırdak fazda kondrosit hücrelerin, subkondral kemik fazında ise osteoblastların bulunduğu bir ko-kültür oluşturulması hedeflenmiştir. Kondrositlerin ve osteoblastların biyomimetik ve gradyan yapıda tasarlanan çok fazlı doku ünitesi içerisinde faza spesifik dağılımlarının *in vitro* ortamda belirgin fakat sürekli yapıda kıkırdak, kalsifiye kıkırdak ve kemik matris oluşumu üzerine olan etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Tez kapsamında yürütülmesi planlanan *in vivo* çalışmalarda ise, elde edilen doku ünitesinin çevre dokular ile biyouyumluluğu, yapısal bütünlüğü, hücre infiltrasyonu ve degradasyonunun araştırılması hedeflenmiştir.

Tez çalışmasının başlıca özgün yanları aşağıda özetlenmiştir;

- Osteokondral doku ünitesinin biyomimetik ve gradyan tasarımı ve bu tasarımın üretiminde kullanılacak tekniklerin iteratif olarak ilk kez bir osteokondral doku ünitesinin üretiminde uygulanmıştır. Tez çalışmasında, karmaşık osteokondral doku ünitesinin üretiminde farklı doku iskelesi üretim yöntemlerini bir araya getirmektedir. Subkondral kemik fazın üretiminde, rijid yapıdaki gözenekli doku iskeleleri dondurarak kurutma yöntemi ile hazırlanırken, kalsifiye kıkırdak ve kıkırdak dokusu fazları hidrojel yapıda hazırlanacak olan doku iskelelerinden oluşmaktadır. Bu üretim tekniklerinin bir arada kullanılmasıyla hazırlanan bir osteokondral doku iskelesi literatürde mevcut değildir. Tez çalışması bu yönüyle özgün değere sahiptir. Bu özgün biyomimetik yaklaşım, karmaşık yapıya sahip dokuların *in vitro* ortamda en iyi şekilde taklit edilmesi için doku mühendisliğinde uygulanan doku iskelesi üretim yöntemlerinin geliştirilmesine de özgün katkı sağlayacaktır.
- Tasarlanan osteokondral doku ünitesine ait her bir doku fazı özgün bileşimdedir. Kıkırdak ve kalsifiye kıkırdak doku iskelelerinin bileşimleri sırasıyla, kitosan/kollajen tip II ve kitosan/nHA/kollajen tip II olarak tasarlanmıştır. Literatürde kitosan ile yapılan çok sayıda araştırma bulunmasına karşın, kollajen tip

II ile yapılan sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Kalsifiye kıkırdak doku için kitosan/nHA/kollajen tip II bileşenlerinin kullanıldığı bir yapay doku iskelesine literatürde rastlanılmamıştır. Sentezlenecek osteokondral doku ünitesinin biyomimetik ve gradyan yapısı bir bütün olarak özgün olmakla birlikte, doku ünitesinin parçalarını ve çok fazlı tabakalarını oluşturacak doku iskelelerinin de her biri özgün yapıda tasarlanmıştır.

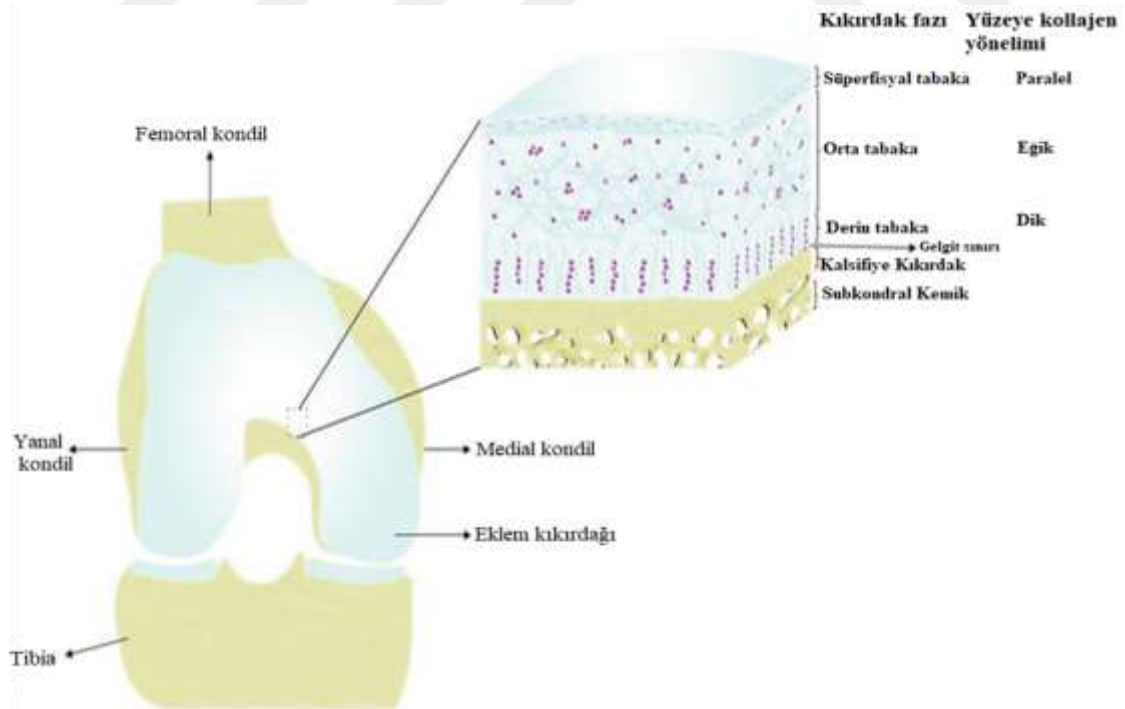
- Osteokondral doku ünitesi, doğal osteokondral dokunun istiflenmiş tabaka yapısına benzer olarak, subkondral kemik, kalsifiye kıkırdak ve kıkırdak tabakalarını içeren doku iskelelerinin üretim prosesi sırasında bir araya getirilmesi ile elde edilecektir. Literatürde, subkondral kemik ve kıkırdak dokularının bir arada bulunduğu iki fazlı sistemlerin sentezine yönelik oldukça fazla sayıda çalışma bulunmaktadır. Bununla birlikte, yapay olarak hazırlanan bir osteokondral doku ünitesinin uzun dönemde fonksiyonel olabilmesi için kalsifiye kıkırdak ara yüzeyinin de mutlaka yapıya eklenmesi gerekmektedir. Literatür araştırmasında da değinildiği üzere, kalsifiye kıkırdak yapısı, kemik ve kıkırdak gibi birbirinden çok farklı morfolojik ve mekanik özelliklere sahip fakat osteokondral bölgede birbiri ile uyum halinde ve entegre durumda bulunması gereken dokulardır. Bu iki doku arasında keskin mekanik geçişleri ve kıkırdak dokunun damarlaşmasını engelleyen kalsifiye kıkırdak dokusu uzun dönemde fonksiyonel yapıların elde edilebilmesi için son derece önem taşımaktadır. Literatürde kalsifiye kıkırdak dokusunun da içinde bulunduğu çok az sayıda çalışma bulunmaktadır. Gerçekleştirilen tez çalışması bu yönüyle de özgün değer taşımaktadır.

2. KURAMSAL TEMELLER

Bu kısımda, gerçekleştirilen tez çalışmasının esas aldığı konular, literatür bilgileri kullanılarak özetlenmiştir. Bunun için öncelikle, osteokondral dokunun yapısı ve osteokondral doku hasarlar açıklanmıştır. Sonrasında, osteokondral doku mühendisliği yaklaşımlar ve osteokondral doku ünitesinin üretiminde kullanılan malzemeler ile ilgili bilgiler verilmiştir.

2.1. OSTEOKONDRAL DOKUNUN BİYOKİMYASAL GRADYAN YAPISI

Osteokondral (OK) dokunun doğal yapısı, **kıkırdak**, **kemik** ve ara yüzeydeki **kalsifiye kıkırdak** dokularının istiflenmiş tabakalar halinde bir arada bulunduğu karmaşık bir biyolojik organizasyondur. **Kıkırdak** tabakası, süperfisyal (yüzeysel), geçiş (*transitional*) ve derin bölge (radyal) şeklinde üç bölgeye ayrılmıştır. Derin kıkırdak tabakasının dibinde bulunan “gelgit sınırı (*tidemark*)” olarak adlandırılan ince bir çizgi, kıkırdaktan kalsifiye kıkırdağa geçişi işaret eder (3). Kıkırdak tabakanın altında, kalsifiye kıkırdak ile iç içe geçmiş ve gözenekli subkondral kemik fazı mevcuttur. OK doku ünitesinin ana tabakaları şematik olarak Şekil 2.1’de sunulmuştur.



Şekil 2.1. Osteokondral doku tabakalarının şematik gösterimi ((4) no’lu referanstan değiştirilerek kullanılmıştır).

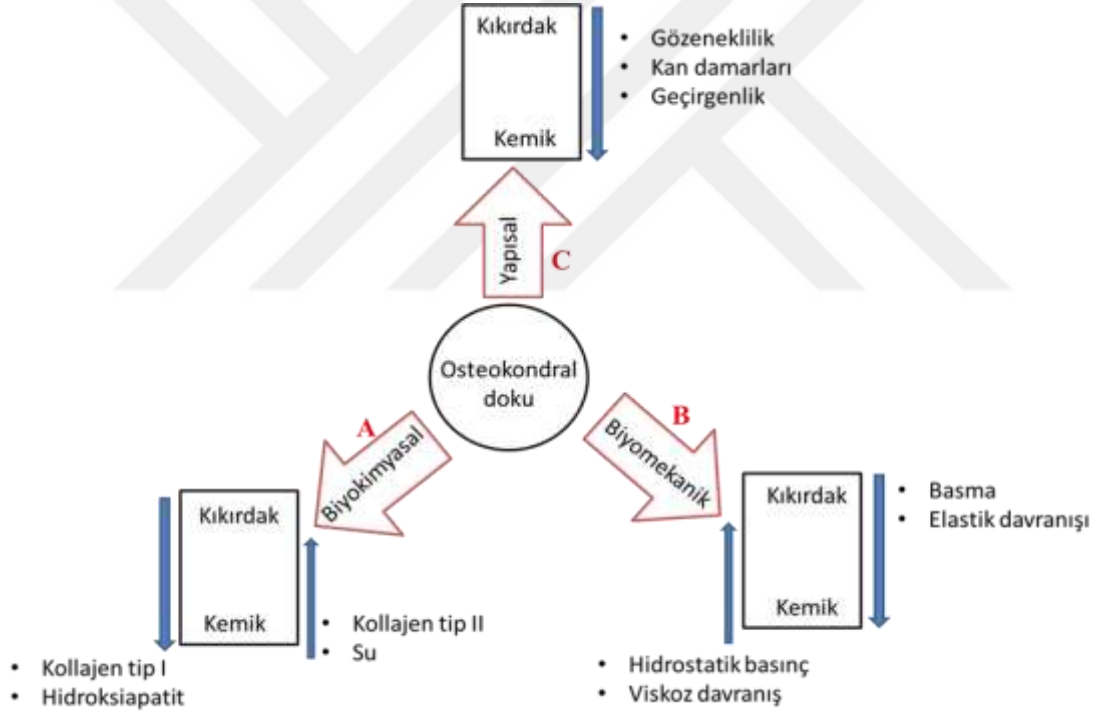
Osteokondral doku ünitesinin üst bölgesinde yer alan ve hacimce en yüksek yüzdeye sahip olan **kıkırdak** tabakasıdır. **Kıkırdak** benzersiz matris kompozisyonu ve düzenlemesine sahiptir. Genel olarak, eklem kıkırdağının toplam ıslak ağırlığının % 60-80'i su ve elektrolitler içeren sıvılardan oluşur ve su içeriği, yüzeysel katmandan derin bölgeye gidildikçe % 80'den % 65'e düşmektedir (5). Toplam ıslak ağırlığın % 20-40'ı hücre dışı matris (ECM) bileşenleri ve kondrositlerden oluşmaktadır. Kıkırdak hücre dışı matris yapısı genel olarak kollajen ve proteoglikanlardan oluşmaktadır (3,6). Kollajen fiberlerinin yapıda bulunması eklem kıkırdağına artan yapısal ve elastik güç sağlar. Eklem kıkırdağı temel olarak tip II kollajen ve proteoglikanlara bağlı olan glikozaminoglikan (GAG) bileşenlerinden oluşmaktadır. Yapıdaki temel bileşen olan kollajen tip II'ye ek olarak kollajen III (%10), V, IX (%1) ve XI (%3) türleri de kıkırdak yapısında mevcuttur (7). Tüm bu kollajen tipleri, kollajen tip II fibril ağının stabilizasyonundan sorumludurlar (5,8). Kondrositlerin ürettiği kıkırdak hücre dışı matrisi % 45-50 oranında kollajen içerir. Hücreler tarafından üretilen bu kollajenin % 90-95'i kollajen tip II'dir (5,8). Kollajen fibrillerinin miktarı ve oryantasyonu, süperfisyal katmandan derin bölgeye göre değişmektedir. Süperfisyal (yüzeysel) tabaka, kıkırdak kuru ağırlığının % 86'sına kadar olan yüzdesi ile doku içindeki en yüksek kollajen yoğunluğuna sahiptir (6). Derin tabakadaki kollajen fibrilleri kıkırdak dokusunun kuru ağırlığının % 67'sini içermektedir. Kıkırdak dokusunda en bol bulunan ve hücre dışı matrisin % 20-25 oranını içeren ikinci makromolekül **proteoglikanlardır**. Kıkırdaktaki en bol proteoglikanlar agrekan, decorin ve fibromodulin ve su alımından ve ozmolariteden sorumludurlar. Aynı zamanda, yapıdaki GAG ağları ve proteoglikanlar, kollajen yapısından dolayı bir polimerik kafes olarak görev yapmaktadır (9). Kıkırdak bütünü aynı esas bileşenleri içermekle birlikte, yapı içindeki farklı bölgelerde her bileşenin derişimleri değişmektedir. Proteoglikanlar süperfisyal, orta ve derin tabakalarda sırasıyla kıkırdak kuru ağırlığının %15, % 25 ve % 20'sini oluştururlar (6). Dört bölgeden oluşan kıkırdak fazının ilkinin, % 10-20'lik yüzdeye sahip olan süperfisyal tabaka oluşturur. Süperfisyal tabakada kondrositler yüzeye düz ve paralel olarak hizalanır ve hücre yoğunluğu bu tabakada maksimumdur (10,11). Medial femoral kondilde eklem kıkırdağının farklı bölgelerindeki hücre yoğunluğu, birim kıkırdak hacmi başına kondrosit sayısı $24.0 \pm 7.5 \times 10^3 \text{ mm}^{-3}$ olarak bulunmuştur (12). Yüzeysel ve derin tabakalar arasında yer alan orta tabaka, eklem kıkırdak kalınlığının % 40-60'ını oluşturur. Bu tabakada bulunan kondrositler daha yuvarlak yapıdadır (5). Medial femur kondilinin

orta tabakasında birim kıkırdak hacmi başına kondrosit sayısı $10.3 \pm 1.1 (x 10^3) \text{ mm}^{-3}$ 'tür (12). Derin tabaka, eklem kıkırdağının kütlelerinin % 30-40'ını temsil eder. Derin tabakada kondrositler yuvarlak veya elipsoidir. Derin tabakadaki hücreler dikey düzenlenmiş ve eklem yüzeyine dik olarak yerleşmişlerdir (5,10,11). Derin tabakada, birim kıkırdak hacmi başına kondrosit sayısı, diğer iki tabakaya göre en düşük olarak bulunmuş ve $7.7 \pm 2.0 (x 10^3) \text{ mm}^{-3}$ 'tür (12). Süperfisyal tabakdan orta ve derin tabakalara kadar hücre yoğunluğu sırasıyla % 59 ve % 67 azalmaktadır.

Üç kıkırdak bölgesinin altında, derin tabakayı kalsifiye kıkırdaktan ayıran gelgit sınırı (*tidemark*) vardır. Bu ince bazofilik çizgi, mineralize olmayan ve mineralize tabakaların ayırımını ve iki kıkırdak bölgesi arasında kademeli geçişi sağlar (8). Kıkırdak ve subkondral kemik arasında **kalsifiye kıkırdak** arayüzü, işlevsel bir kıkırdaktan kemiğe entegrasyon ve yapısal devamlılığın korunmasından sorumludur (13,14). Bu faz, kıkırdak ve kemik dokularının özelliklerini ve niteliklerini içermektedir. Bariyer görevi gören bu ara yüzeyin temel bileşenlerini organik kısım ve mineraller oluşturmaktadır. Subkondral kemik fazında bulunan hidroksiapatit minerallerinin kimyasal ve kristal yapısına benzer olan hidroksiapatit minerallerinden oluşmakla birlikte, kemik dokuya göre daha az yüzdeye sahiptir (65.09 ± 2.31) (15). Organik kısım ise kollajen tip II, proteoglikan ve kollajen tip X bileşenlerinden oluşmaktadır. Kollajen tip X, kalsifiye bölgesinde bulunan hipertrofik kondrosit hücrelerinin ürünüdür ve mineral depolanmasını sağlar. Kıkırdak ile ilgili özelliklere ek olarak, alkalın fosfataz aktivitesi gibi kemik dokusuna ait özelliklerin bir kısmı da bu bölgede bulunabilir (14,16). Ayrıca, bu bölgede bulunan kollajen fibrilleri, subkondral kemiğe bağlı şekilde subkondral kemik ve kıkırdak fazlarını bir arada tutmaktadır (6).

Kalsifiye kıkırdak fazının altında bulunan **subkondral kemik** fazı tüm kalsifiye kıkırdak ve kıkırdak bütünlüğünü korumakta ve kıkırdaklı doku için mekanik destek sağlamaktadır. Subkondral kemik yapısının organik kısmını oluşturan esas bileşenler; tip I kollajen, proteoglikanlar, glikoaminoglikanlar ve sialoproteinler gibi protein yapılarıdır (17). Kemiğe sertliğini veren inorganik kısmın esas bileşeni ise yapıdaki hidroksiapatit mineralleridir (18). Osteokondral ara yüzeyinde bulunan subkondral kemikteki hidroksiapatit minerallerinin yüzdesi kalsifiye kıkırdak dokusundan daha yüksektir (85.78 ± 3.42). (15,19). Kemik dokusunun organik fazı, kemik ağırlığının % 30'unu oluşturur. Organik

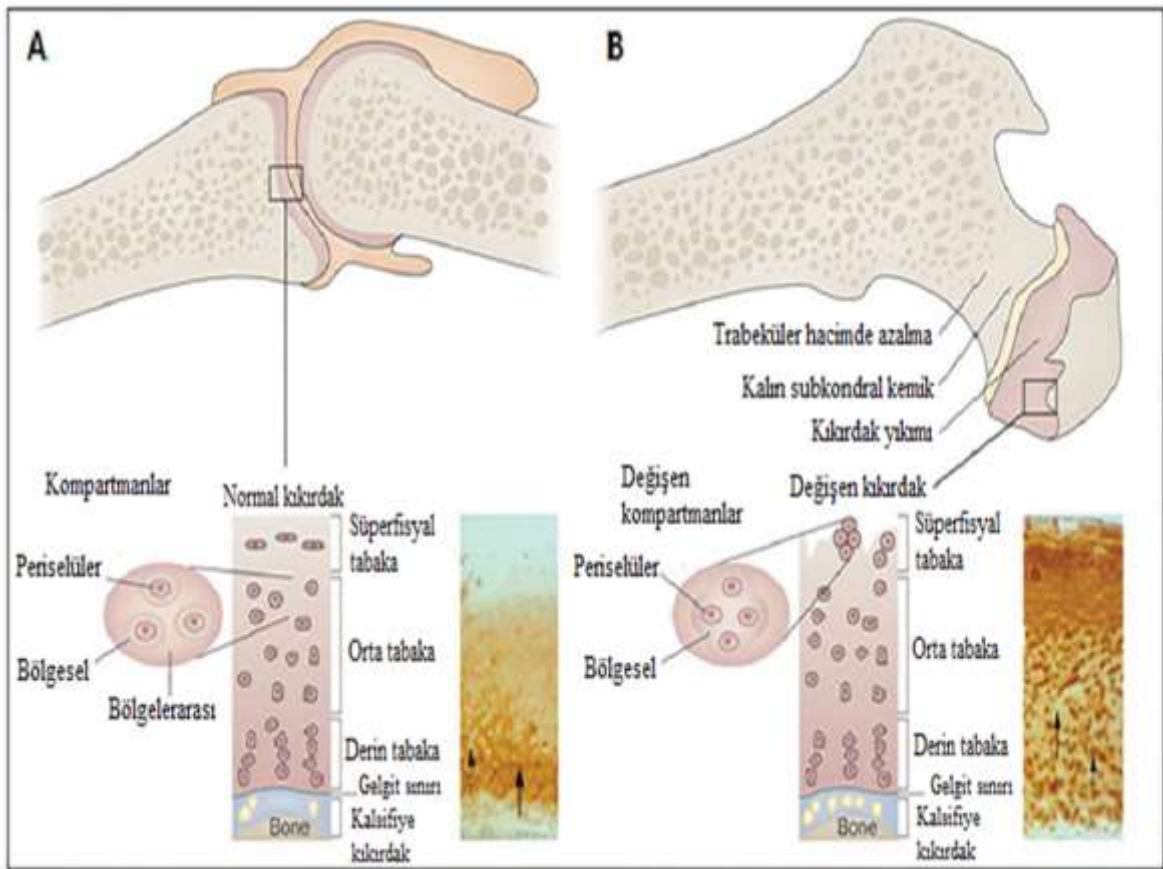
bileşen, % 90 kollajen tip I ve osteopontin, trombospondin, kemik sialoprotein, osteokalsin ve osteonektin gibi hücre sinyal metabolizması, matris organizasyonu ve mineralizasyonu için önemli olan proteinleri (%5) içermektedir. Kemik dokusu, hücre içerikleri bakımından kıkırdak dokusundan önemli ölçüde farklıdır. Sadece kondrositlerden oluşan kıkırdaktan farklı olarak, kemik dokusu osteoblastlar, osteoklastlar, osteositler, kondrositler, endotel hücreleri ve mezenkimal kök hücreleri (MKH'ler) gibi çeşitli hücre tiplerini içermektedir. Kemik oluşturunca hücreler olarak bilinen ve hidroksiapatit sentezinden sorumlu olan osteoblastlar, kemik dokusunun toplam hücrelerinin % 4-6'sını oluşturmaktadırlar. Bu tür hücreler çoğunlukla kemik yüzeyinde bulunurlar (20,21). Şekil 2.2, osteokondral dokuya ait fazların farklılık derecesini göstermektedir. **Sonuç olarak, kıkırdaktan kemik fazına doğru gidildikçe, kondrosit hücre ve kollajen tip II yüzde azalırken proteoglikan, kollajen tip I ve hidroksiapatit bileşenleri kademeli olarak artmaktadır.**



Şekil 2.2. Bir osteokondral dokuda bulunan farklı fazların özellikleri; A) osteokondral doku boyunca kollajen tip I, kollajen tip II, hidroksiapatit ve su içeriği varyasyonlarına odaklanan biyokimyasal gradyan, (B) osteokondral bölgede etki eden farklı mekanik kuvvetler ve viskoelastik davranış farklılıkları açısından biyomekanik gradyan, (D) porozite ve geçirgenlik varyasyonlarına ve ayrıca osteokondral kalınlığı boyunca damar ağının varlığına odaklanan yapısal gradyan.

2.2. OSTEOKONDRAL DOKU HASARLARI

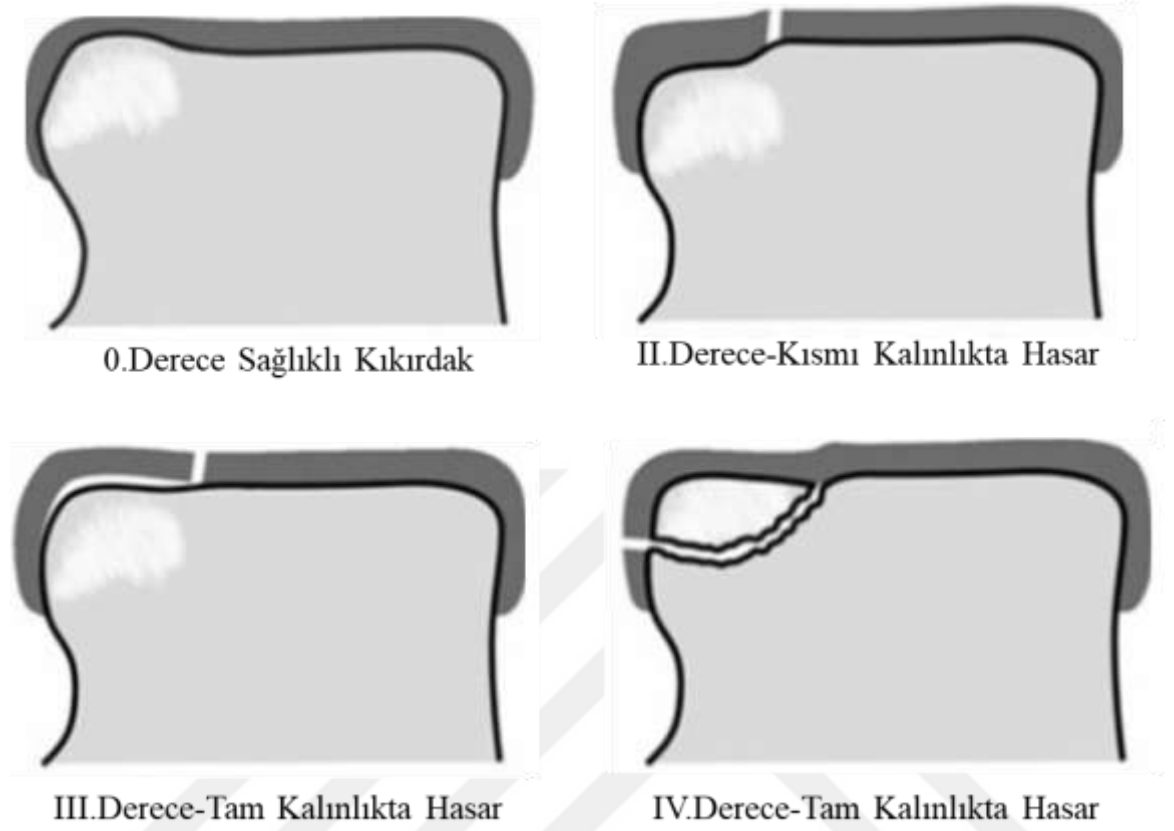
Osteokondral arayüz hasarları genellikle hem eklem (hiyalin) kıkırdak hem de subkondral kemik fazlarını kapsayacak şekilde travma, hastalık veya yaşlanmanın sonucu olarak ortaya çıkmaktadır (Şekil 2.3). Diğer dokuların büyük çoğunluğundan farklı olarak, kıkırdak temelde avaskülerdir ve hücre yoğunluğu düşüktür (22). Kıkırdak, bol miktarda besin ve uygun progenitör hücrelerin bulunmamasından kaynaklı olarak kendi kendine iyileşme yeteneğine sahip değildir. Bununla birlikte, bir kıkırdak hasarı tedavi edilmediğinde, eklem geri dönüşümsüz ve aşamalı olarak bozularak, osteoartrit ve sakatlıklara yol açmaktadır (23).



Şekil 2.3. (A) Normal ve sağlıklı eklem kıkırdığı (B) Kıkırdak kaybı, subkondral kemik kalınlaşması ve ayrıca kıkırdak matrislerinde değişiklikler gösteren osteoartritik eklem ((24) no'lu referanstan değiştirilerek kullanılmıştır).

Derinlik ve boyut gibi faktörlere bağlı olarak, kıkırdak hasarları farklı metotlara göre farklı sınıflara ayrılabilir; tedavisi en maliyetli ve en zor hasar türü **osteokondral hasarlardır**. *Outbridge Classification System* olarak bilinen sınıflandırmaya göre subkondral kemik

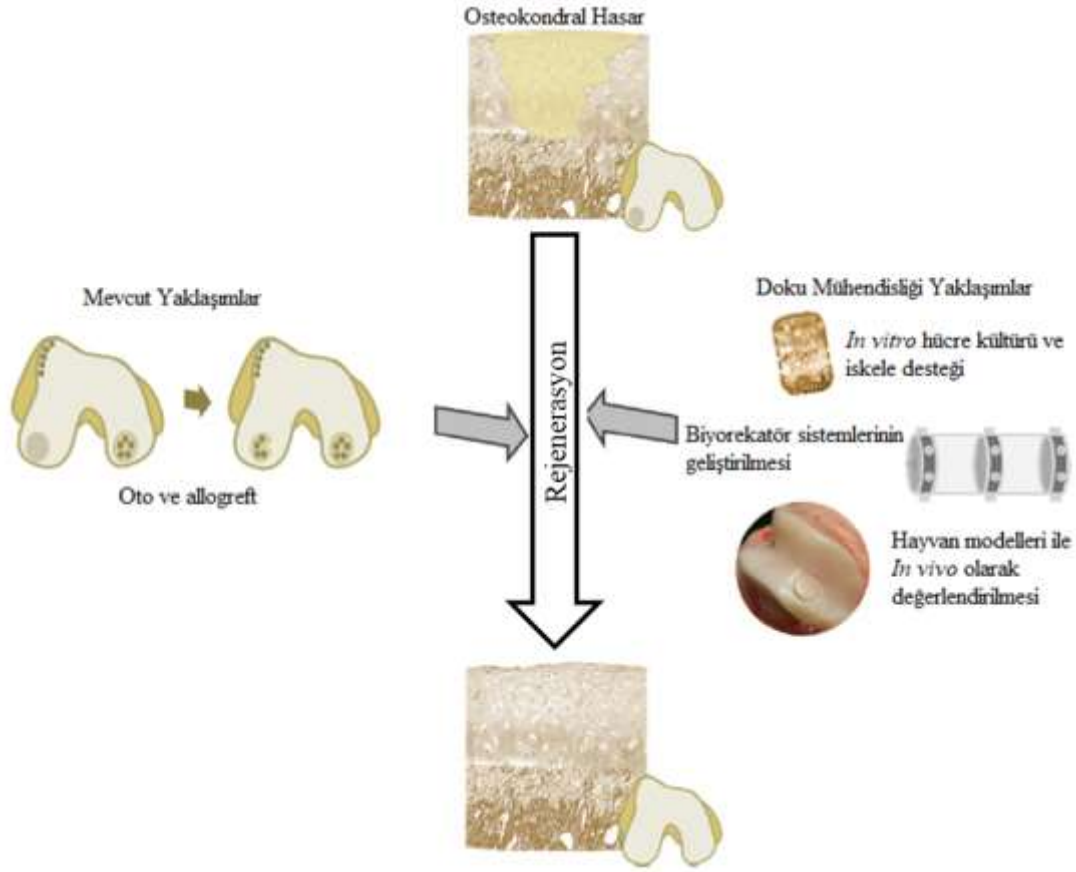
bölgesinin de hasar gördüğü kıkırdak hasarları IV.Derece: Osteokondral hasar olarak sınıflandırılmıştır (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Osteokondral hasarların sınıflandırılmasında kullanılan *Outbridge Classification System* şematik gösterimi.

2.3. OSTEOKONDRAL DOKU HASARLARININ TEDAVİSİ

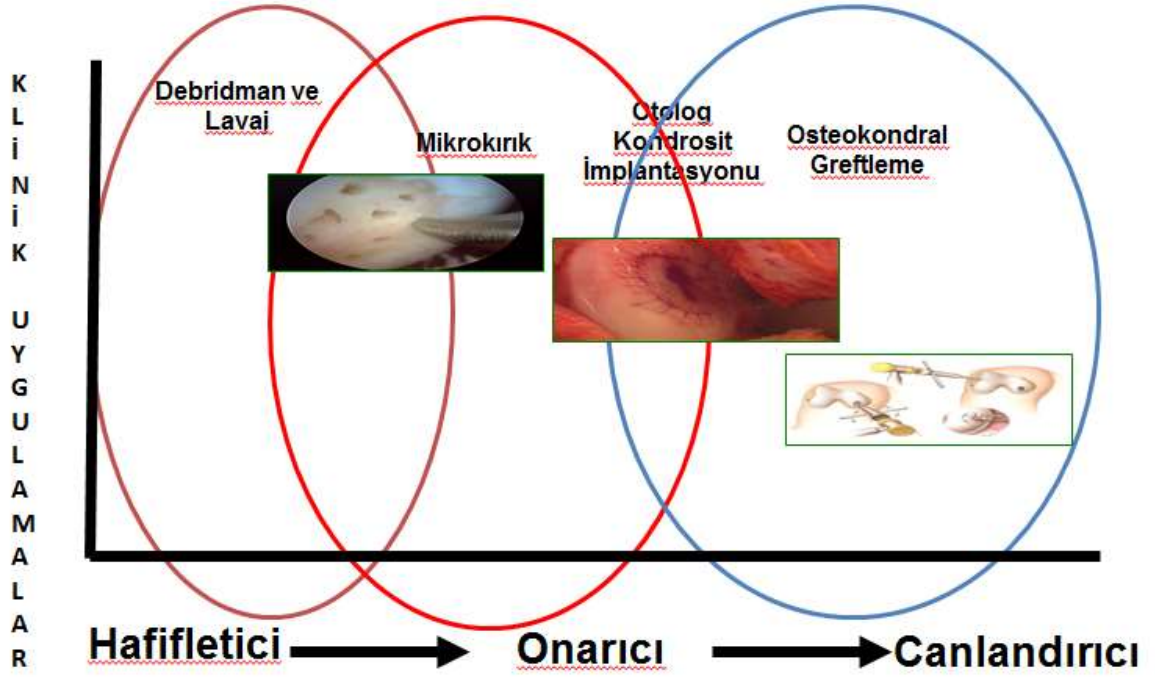
Klinikte osteokondral hasarların tedavisine yönelik yaklaşımlar; **geçici (*palliative*)**, **düzeltilici (*reparative*)** ve **güçlendirici (*restorative*)** yöntemler olarak sınıflandırılabilir (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. Osteokondral defektlerin rejenerasyonunda uygulanan klinik ve doku mühendisliği stratejileri .

Geçici yaklaşımlar, ilk uygulanan klinik tedavi yöntemi olup, artroskopik debridman ile yaralı bölgedeki hasarlı dokuların uzaklaştırılmasıdır. Enfekte olmuş bölge temizlenerek kanın pıhtılaşması ve bölgeyi doldurması beklenir. Yeni doku oluşumuna izin vermeyen ve istenmeyen fibrokartilaj oluşumuna neden olan yöntemlerdir (3,25). **Düzeltilici** yaklaşımlar ise; kemik bölgesinde mikrokırıkların (*microfracture*) oluşturulması ve kök hücrelerin yaralı bölgeye ulaşarak hasarlı dokuyu onarması temeline dayanmaktadır. Operasyon sonrasında rehabilitasyon uzun sürmekte ve tedavi istenmeyen fibröz doku oluşumu ile sonlanabilmektedir. Bu yaklaşımlar içinde uygulanan diğer bir tedavi yöntem mozaikplastidir. Hastanın kendisinden (otograft) veya uygun vericiden alınan (allograft) osteokondral greftler yaralı bölgeye nakledilmektedir. Ne var ki, bu yaklaşımda da, nakledilen dokuyla birlikte hastalıkların transferi, immün reaksiyon ve hastanın çok sayıda operasyona maruz kalması gibi birçok dezavantaj bulunmaktadır. **Güçlendirici** (canlandırıcı) yaklaşımlarda ise, otolog kondrosit implantasyonu (ACI) yapılmakla birlikte, tedavi kıkırdak rejenerasyonu ile sınırlı kalmakta, subkondral kemik bölgesine ulaşmış tam

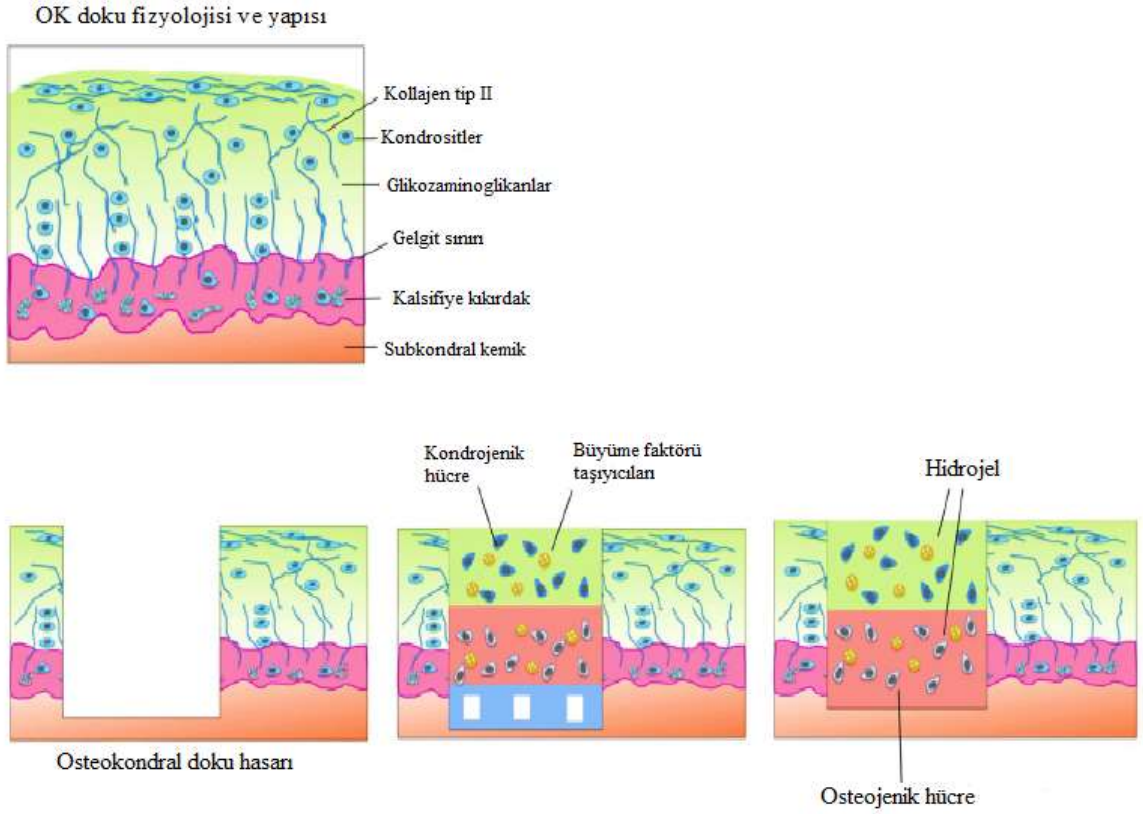
bir hasarın tedavisi mümkün olmamaktadır (3,26). OK doku hasarlarının tedavisinde uygulanan mevcut klinik tedavi yöntemleri Şekil 2.6’da sunulmuştur.



Şekil 2.6. OK doku hasarları için klinikte uygulanan mevcut tedavi yöntemleri.

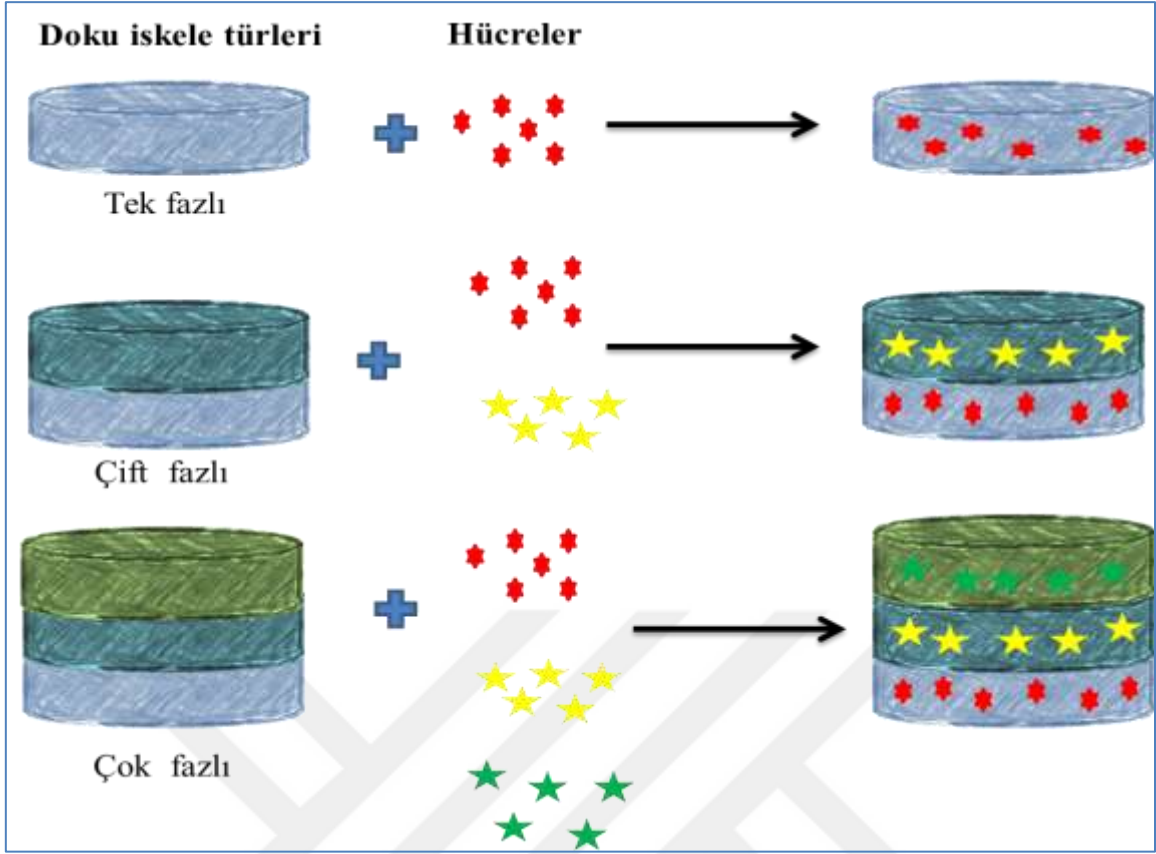
2.4. OSTEOKONDRAL DOKU HASARLARININ TEDAVİSİNDE DOKU MÜHENDİSLİĞİ YAKLAŞIMLARI

Osteokondral doku mühendisliği yaklaşımı, uygun hücre kaynaklarından elde edilen hücreler ve doku iskelelerinin bir araya getirilmesiyle, heterojen yapıdaki osteokondral ünitenin *in vitro* koşullarda elde edilmesi ve hastadaki hasarlı bölgeye nakledilerek doku rejenerasyonunun gerçekleştirilmesini hedeflemektedir (Şekil 2.7).



Şekil 2.7. Hücre yüklü hidrojel yapıları ile osteokondral arayüz ve tam kalınlıkta kıkırdak hasarlarının tedavisine yönelik doku mühendisliği stratejisinin şematik gösterimi ((25) no'lu referans değiştirilerek kullanılmıştır).

Doğal dokunun biyokimyasal gradyan yapısı düşünüldüğünde, osteokondral hasarların tedavisine yönelik yapıların geliştirilmesinin farklı üretim tekniklerinden yararlanmanın doğru bir strateji olacağı düşünülmektedir. Osteokondral doku rejenerasyonuna yönelik doku iskelelerinin tasarımı genel olarak **tek fazlı** (*monophasic*), **iki fazlı** (*biphasic*) veya **çok fazlı** (*multiphasic*) olarak sınıflandırılabilir (Şekil 2.8) (3).



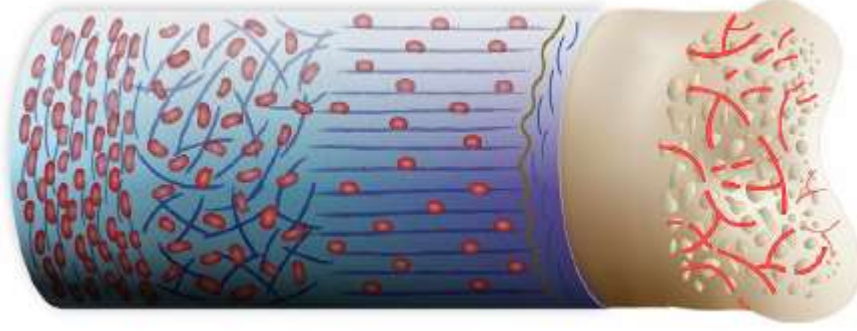
Şekil 2.8. Farklı osteokondral doku ünitesi tasarım yaklaşımları.

Tek fazlı yaklaşımda, hazırlanan doku iskeleleri tek tip biyomalzeme ya da tek tip kompozit malzemeden oluşmaktadır. Doku iskelesi hiçbir yapısal farklılık içermemekte, hücresel veya biyolojik perspektiften bakıldığında, tek bir hücre tipi barındırmaktadır. Buna karşın, iki fazlı veya çok fazlı yaklaşımlar, birden fazla malzemenin, kompozitin ya da morfolojik yapının bir araya getirilmesiyle çok katlı ünitelerin elde edilmesi temeline dayanmaktadır. Tek bir malzeme çeşidi kullanılarak her tabakası farklı fiziksel özelliğe sahip iki veya üç fazlı doku iskelelerinin hazırlanması da mümkündür. Bazı osteokondral rejenerasyon çalışmalarında tek fazlı sistemler halen kullanılmakla birlikte, son yıllarda yapılan araştırmalar son derece karmaşık yapıdaki osteokondral dokunun rejenerasyonu için çok fazlı tasarımlar üzerinde yoğunlaşmaktadır (13). Çok fazlı yapıların en önemli avantajı, spesifik olarak kıkırdak ve kemik doku gelişiminin hedeflendiği fiziksel ve biyokimyasal yapıların eldesine olanak sağlamasıdır. Kemik ve kıkırdakın farklı mekanik, yapısal ve biyokimyasal özelliklere sahip dokular olması ve osteokondral doku iskelesi tasarımının bu farklılıkları yüksek oranda karşılamaması durumunda doku rejenerasyonu kısıtlanabilmektedir. Ayrıca son yıllarda yapılan çalışmalarda, yapay osteokondral

greftlerin tasarımı da kemik ve kıkırdak bileşenlerinin yanı sıra, **osteokondral ara yüzey rejenerasyonunun** da uzun dönemli fonksiyonel yapıların elde edilmesi ve yapay dokunun entegrasyonu bakımından son derece önemli olduğu sonucuna varılmıştır (13–15,27). Önemli yaklaşımlardan biri, çok fazlı bir yapı tasarlanırken kıkırdak, kalsifiye kıkırdak ve subkondral kemik fazların spesifik bileşenlerini düşünmektir. Örneğin, kollajen tip II, kıkırdak fazını oluşturmak için kullanılabilir. Öte yandan, belirli yüzdelerde kollajen tip I, kollajen tip II ve hidroksiapatit bileşenleri ile kalsifiye kıkırdak fazı, daha yüksek yüzdelerde kollajen tip I ve hidroksiapatit ile kemik fazı oluşturulabilir (28–30). Osteokondral dokuda hem kıkırdak hem de kemik fazlarının ana bileşenlerinin biri sudur (6). Bununla ilgili farklı su absorplama kapasitesine sahip polimerlerin kullanılması, OK dokuyu düzgün olarak onarmaya ve taklit etmeye yönelik olası bir yaklaşım olabilir. Kıkırdak doku mühendisliği için çekici bir seçenek, yüksek şişme özelliklerine sahip hidrojeller geliştirmektir. Bu hidrojeller, sulu ortamda glikozaminoglikanlar ve kollajenlerin polimer zincirlerinden oluşan kıkırdak dokusuna benzerler (31–35). Bir osteokondral dokunun mekanik özellikleri, eklem kıkırdaktan subkondral kemiğe doğru değişmektedir. Osteokondral dokunun heterojen bileşimi ve yapısı, stres konsantrasyonunu en aza indirmeye ve karmaşık kuvvetleri yumuşak-sert arayüzlerde dağıtmaya katkıda bulunmaktadır. Doku mühendisliği alanındaki tüm ilerlemeler ve başarılarla rağmen, arayüz dokularının mühendisliğinde hala büyük zorluklar yaşanmaktadır. Bu zorluklar çoğunlukla, iki farklı subkondral kemik ve kıkırdak dokuları arasındaki arayüz (kalsifiye kıkırdak) orta derecede fiziksel, yapısal ve mekanik özellikler gösterdiğinden, arayüz dokusunun karmaşıklığından kaynaklanmaktadır (10). Bu nedenle, kademeli özelliklere sahip kıkırdak-kemik, tendon/ligament - kemik, menisküs ve kas - tendon gibi yumuşak-sert arayüzlerin oldukça karmaşık özellikleri göz önüne alındığında, yumuşak-sert doku gradyanının yeniden yapılandırılması için yeni teknolojilerin geliştirilmesi üzerine çalışmalar yürütülmektedir (6).

2.5. OSTEOKONDRAL DOKU MÜHENDİSLİĞİNDE DOKU İSKELELERİ

Osteokondral ünitenin doğal yapısı, bileşenleri, kollajen oryantasyonu, hücre içerikleri ve mimarisi gibi doku fizyolojisini bilmek OK doku rejenerasyonu için esastır (Şekil 2.9).

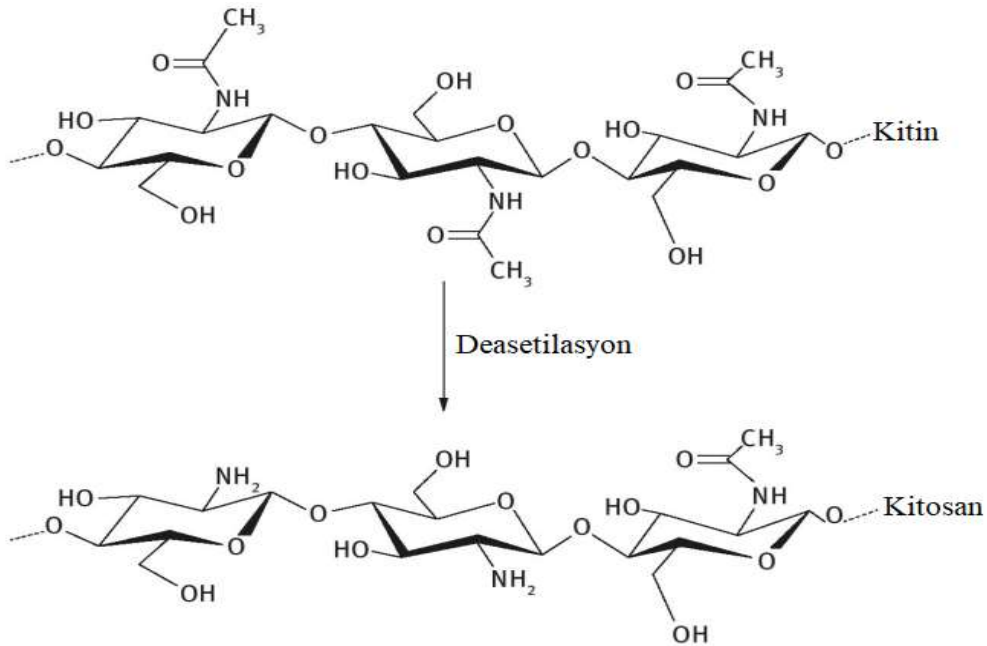


Şekil 2.9. Osteokondral ünitenin ve biyokimyasal gradyanın şematik gösterimi. Şekil, hücre sayısı ve oryantasyonunda olduğu kadar, osteokondral ara yüz boyunca hücre dışı matris fiberlerin düzenlemesindeki farklılıkları göstermektedir. Dahası, kemiğin vaskülarize gözenekli yapısı ve kıkırdığın avasküler oldukça geçirimsiz doğası temsil edilmektedir.

Osteokondral doku mühendisliği yaklaşımı ile geliştirilen yapılarda; yapay hücre dışı matriks (doku iskelesi), hücreler (osteoblastlar, kıkırdak öncül hücreleri, kök hücreler) ve büyüme faktörleri üç temel bileşen olarak bulunmaktadır. Doku iskelesi kullanılmayan teknikler doku mühendisliği uygulamalar için ilgi çekici olsa da, osteokondral doku mühendisliğinde doku iskeleleri kritik bir öneme sahiptir. Bir OK iskele biyolojik olarak uyumlu (toksik olmayan, immünojenik olmayan) ve yeterli mekanik bütünlüğe sahip olmalı, kıkırdak, kemik ve bu iki doku arasındaki ara yüzün oluşumuna ve yeni doku oluşumunu destekleyecek şekilde bozunma davranışı göstermelidir (13). Bir OK ünitesinin oluşumunu desteklemek amacıyla, biyomalzemelerden elde edilen kompozitleri kullanarak gradyan çok fazlı moleküler, yapısal ve mekanik özelliklere sahip iskelelerin tasarlanması gerekmektedir. Başka bir deyişle, OK iskeleler, aynı anda kıkırdak, kalsifiye kıkırdak ve subkondral kemik dokularını rejenere etmek amacıyla tasarlanmalıdır. Kıkırdaklı bileşen, düşük sıkıştırma modülüne sahip hidrate bir viskoelastik matris olmalıdır (36). Oysa, subkondral kemik yüksek modüllü, vaskülarizasyon kapasiteli ve sert iskele yapısına sahip olması gerekmektedir (37). Osteokondral hasarlarda, yaralı kıkırdak ve subkondral kemiğin eşzamanlı tedavisi, her üç doku fazının eşzamanlı rekonstrüksiyonunu destekleyebilmek amacıyla gradyan çok fazlı doku iskelelerine ihtiyaç duyulmaktadır (38).

Doğal polimerlerden sentetik polimerlere, inorganik (seramik ve biyoaktif camlar) ve metalik malzemelere kadar geniş yelpazede OK greftleri için kullanılmakta olan biyoyumlu birçok malzeme bulunmaktadır. Karmaşık, gradyan çok fazlı OK dokunun oluşumu için gereklilikleri karşılayabilecek tek bir malzeme olmadığından, yaygın yaklaşım olarak çok bileşenli sistemler ve hibrit iskeleler kullanılmaktadır (39). Doğal polimerler arasında kollajen, jelatin, ipek, fibrin, polisakaritler (kitosan veya nişasta), aljinat, hiyalüronik asit, kondroitin sülfat ve polyesterler bulunur (13,40,41). Genel olarak, doğal polimerler, hücrelere gerekli biyolojik ortamları sağlayabildiklerinden ve doğal hücre dışı matrisi (ECM) taklit edebildiklerinden yüksek kullanılabilirliğe sahiptirler. Ayrıca, düşük maliyet, biyoyumluluk ve bozunabilirlik gibi birçok avantajlar sunduklarından OK greft olarak sıklıkla kullanılmaktadır. Çok fazlı OK doku iskelelerini geliştirmek amacıyla, her bir faz doğru bileşim ile hazırlanarak ve daha sonra bu fazlar, dikiş, fibrin tutkal, sinterleme işlemi, fotopolimerizasyon, pres-fitting ve dondurarak kurutma gibi çeşitli tekniklerle birleştirilmektedirler (13,42,43).

Kitosan, kitinin kısmi deasetilasyonu ile elde edilen doğrusal ve katyonik yapıda doğal bir polikasakkarittir (44). N-asetil D-glukozamin ((1→4)-2-asetamido-2-deoksi-β-D-glukan) ve D-glukozamin ((1→4)-2-asetamido-2-deoksi-β-D-glukan) birimlerinin rastgele ya da blok halinde zincir boyunca dağılımları sonucu oluşan bir kopolimerdir (44) (Şekil 2.10).



Şekil 2.10. Kitin ve kitosanın kimyasal yapıları.

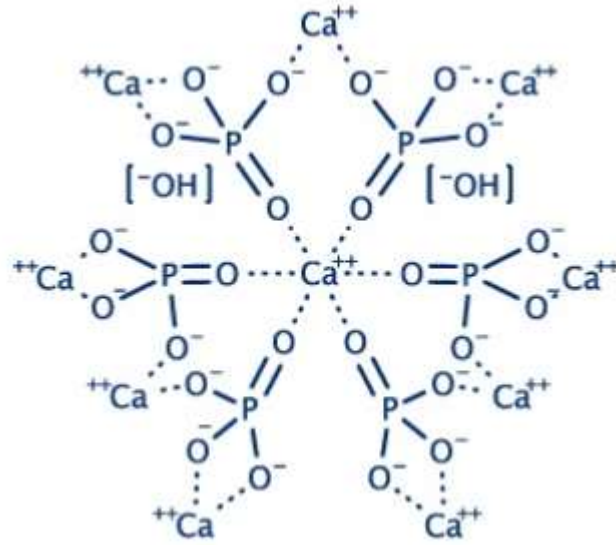
Biyobozunur ve **biyouyumlu** yapıda olan kitosan, kimyasal özellikleri sayesinde hücre yapışmasını ve üremesini desteklemektedir. Polisakkarit ana zinciri yapısal olarak kemik ve kıkırdığın hücre dışı matrisinin temel bileşeni olan **glikozaminoglikanlara** benzerlik göstermektedir (44,45). *In vitro* ve *in vivo* koşullarda **kemik** doku oluşumunu destekleyen gözenekli ve içsel bağlantılı gözeneklere sahip doku iskeleleri üretilebilmektedir (46–49). Kemik doku ile temas halinde olduğunda kitosanın endokronal ossifikasyon prosesini hızlandırdığı ve başlattığı bilinmektedir (44). Glikozaminoglikan yapısına benzerliği nedeniyle **kıkırdak** doku mühendisliği uygulamalarında da kullanım alanı bulunan kitosan, kondrosit hücrelerin fenotipini ve hücreye spesifik matris üretimini destekleyen bir malzemedir (44,50,51). Kitosan daha çok doku mühendisliği uygulamalarında biyokompozit oluşturularak kullanılmaktadır. Literatürde, biyoseramik malzemeler kitosan polimerlere katılarak mekanik özellikleri iyileştirilmektedir. Kitosana nHA ilavesi üzerine basma modülünde yaklaşık % 30'luk bir artış ve fare preosteoblastik hücrelerinin (MC3T3-E1) proliferasyonunda önemli artış gözlenmiştir (52). Diğer bir çalışmada ise nHA partiküllerinin kitosa/aljinat matrisine dahil edilmesi sonucu iskelelerin mekanik özelliklerinin artırılmasının yanı sıra, fare pre-osteoblastik hücrelerin (MC3T3-E1) hücrelerinin osteositlere farklılaşmasını tetiklediği görülmüştür (53).

Kollajen, doğal dokuların moleküler ve yapısal özelliklerinin taklit edilebilmesinde sıklıkla tercih edilen diğer önemli bir doğal polimerdir (54). Kollajen proteini dört yapıya bölünmüş karmaşık bir hiyerarşik yapıya sahiptir: birincil yapı (amino asit üçlüsü), ikincil yapı (a sarmalı), üçüncül yapı (üçlü sarmal) ve kuaterner yapı (fibriller) (55). Omurgalıların yapısında en yüksek oranda bulunan protein kollajendir ve vücuttaki toplam protein kütlelerinin %30'unu oluşturmaktadır. Vücutta bulunduğu dokulara göre farklı tipleri bulunan kollajen, dokuya gerekli fiziksel nitelikleri sağlayarak hücre dışı matris yapının biyolojik ve yapısal bütünlüğünün korunmasında önemli bir rol oynamaktadır. Farklı hayvan kaynaklarından tendon veya deri dokusunun asetik asit ile ekstraksiyonu sonucu elde edilmektedir. Biyobozunur ve biyouyumlu özelliklerinin yanı sıra hücre etkileşimi için gerekli olan reseptör tanıyıcı β_1 integrinlerini içermektedir (54). **Kemik** dokuda bulunan esas protein yapısı **kollajen tip I**'dir. Kemik doku mühendisliğine yönelik yapılan çalışmalarda, glikozaminoglikanlar ile birlikte kullanılarak hidrojel yapıda ya da gözenekli yapıda doku iskeleleri üretimi gerçekleştirilmiştir (55–57). Doku mühendisliği

çalışmalarında kollajen I'e göre daha az sıklıkta kullanılan bir diğer kollajen yapısı, kollajen tip II'dir. **Kıkırdak** dokunun esas protein yapısını **kollajen tip II** oluşturmaktadır. Bunun yanı sıra, osteokondral kalsifiye kıkırdak bileşiminde de glikozaminoglikan yapılar ve hidroksiapatit kristalleri ile birlikte kollajen II bulunmaktadır. Tip II kollajen, yapısal özellikleri ve hücre ile olan etkileşimler açısından tip I kollajenden farklılık göstermektedir ve tip II kollajenin yapısı kıkırdak dokuya özgü bir yapıdır (58). *Transforming growth factor* sinyal yollarını ayarlayan integrin etkileşimleri üzerinden kondrojenezini arttırdığı bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda, tip I kollajenin mezenkimal kök hücrelerin yapışmasında etkin olduğu sonucuna varılırken, kondrojenik farklılaşmanın tip II kollajen ile hızlandığı görülmüştür (58). Ayrıca, tip II kollajen, kondrositler tarafından hücre çoğalmasında, hücre dışı matris sentezini ve yara iyileşmesini desteklemektedir (59,60). Ragetly vd (2010) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, fibröz yapıda kitosan doku iskeleleri farklı yoğunluklarda kollajen tip II ile kaplanmış ve mezenkimal kök hücrelerin yapışma ve farklılaşma davranışı incelenmiştir (61). Hücre davranışının kollajen yoğunluğuna göre farklılık gösterdiği ve kitosan ile tip II kollajenden hazırlanan doku iskelelerinin biyomimetik olarak kondrojenezini desteklediği sonucuna varılmıştır. Lu vd (2010) tarafından yapılan diğer bir araştırmada ise, adipoz kökenli kök hücreler tip I ve tip II kollajenden hazırlanan jeller içerisinde enkapsüle edilerek kondrojenik farklılaşması incelenmiştir. Kollajen tip II'nin kondrojenik farklılaşmayı desteklediği ve küresel formdaki kondrosit hücrelerinin oluşumunu desteklediği sonucuna varılmıştır (58). Doğal hücre dışı matris (ECM) yapısında, glikozaminoglikanlar ve proteoglikanlar kollajenin fibröz yapısı arasına sarmalanmış halde bulunarak mekanik dayanım ve stabilite sağlamaktadır (62). Kollajen-kitosan karışımından hazırlanan doku iskelelerinin hücrelerin biyomimetik mikroçevresi için son derece uygun olacağı bildirilmiştir (62).

Hidroksiapatit (HA, $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$) kemik doku mühendisliği uygulamalarında sıklıkla tercih edilen biyoseramik malzemedir (Şekil 2.11) (63). HA, hekzagonal rombik kafes yapısına sahip olup, mekanik dayanımının arttırılmasında ve kemiğin mineral dengesinin sağlanmasında aktif bir rol oynamaktadır. Yüksek biyoaktiviteye ve osteoindüktif özelliğe sahiptir ve sitotoksikiteye neden olmamaktadır (63). Hidroksiapatitin kemik dokunun çevresi ile bağ oluşturma yetenekleri bilinmekle birlikte, kırılğan yapılarından dolayı tek başına kullanıldığında kemik dokunun ve kalsifiye kıkırdak ara

yüzeyinin spesifik gereksinimlerini karşılayamamaktadır. Bu sebeple organik matrisler ile birleştirilmektedir (45).



Şekil 2.11. Hidroksiapatitin moleküler yapısı.

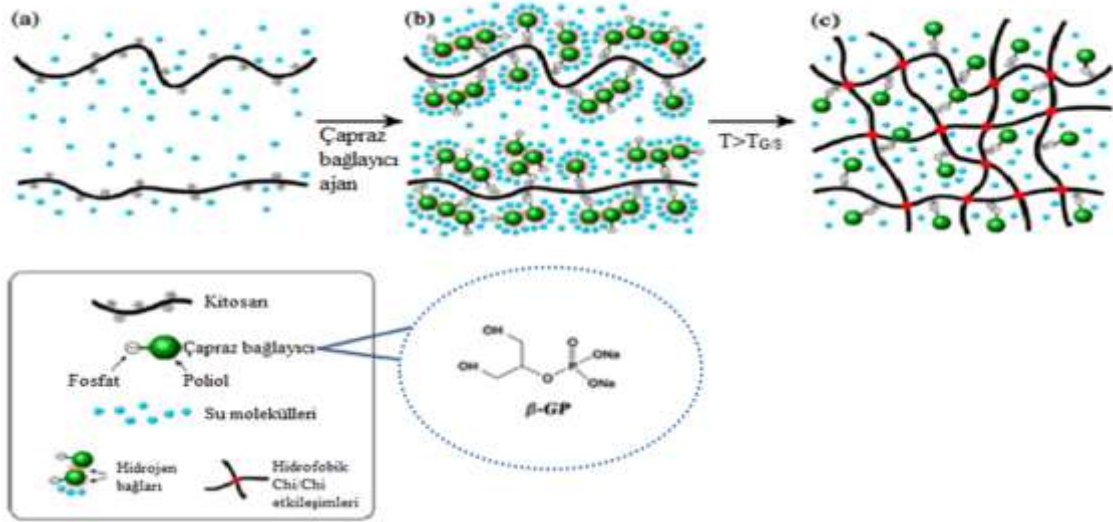
Literatürde kitosan temelli doku iskelelerinin hazırlanmasında kullanılan çeşitli yöntemler bulunmaktadır. Bu yöntemler arasında üç boyutlu gözenekli yapıların hazırlanmasında sıklıkla tercih edilen ve karşılaşılan yöntem dondurarak kurutma yöntemidir. Kitosan temelli jel yapıların hazırlanmasında ise termal jelleşme yöntemi sıklıkla karşımıza çıkmaktadır.

Kitosan çözeltisinin dondurulması sonucu faz ayrılması ve buz kristallerinin oluşmasına neden olmaktadır. Buz kristallerin doldurduğu alan yüksek vakum altında süblimasyon yoluyla çözücünün ayrılması sonucu gözeneklerin oluşumuna yol açmaktadır. Kullanılan polimer-çözücü türüne göre kapiler ya da yaprak benzeri mikro gözenekli yapılar elde edilebilmektedir. Örnek olarak kitosan bazlı süspansiyonun seyreltik asitte çözünmesi, kalıplara dökülmesi ve ardından dondurulmasıyla süspansiyon içerisinde oluşan buz kristallerinin süblimleşmesiyle gözenekli yapıda doku iskeleleri elde edilmesi verilebilir (Şekil 2.12).



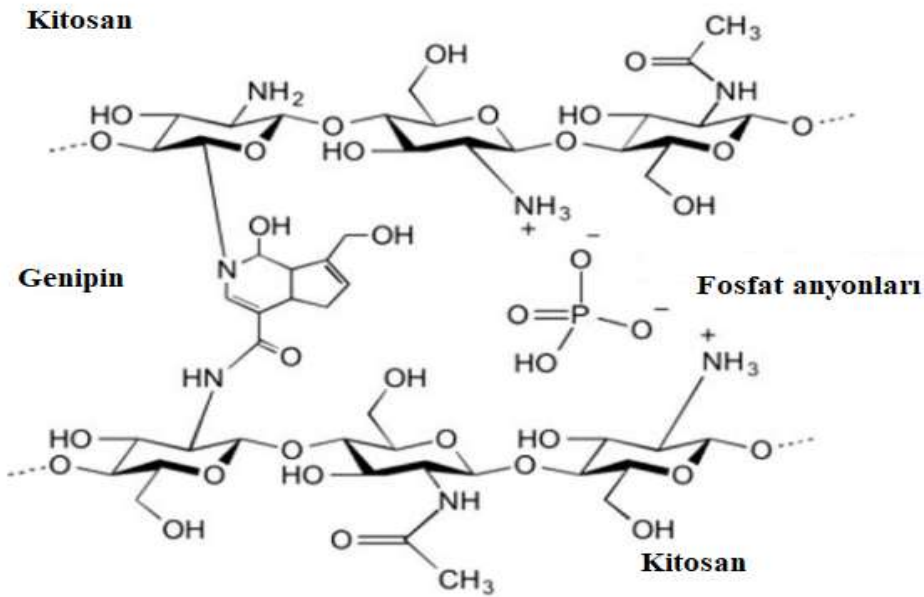
Şekil 2.12. Dondurarak kurutma yönteminin şematik gösterimi ((64) no'lu referans değiştirilerek kullanılmıştır).

Sıcaklık duyarlı polimerik yapılarda sıcaklık değişimi sonrasında sol-jel dönüşümü gözlenmektedir. Termo-jeller, *in situ* jelleşme için organik çözücüler veya çapraz bağlama maddeleri gibi herhangi bir dış uygulama kullanılmasını gerektirmemektedir. Kitosan ve poliol-fosfat kombinasyonları ile oluşturulan kitosan bazlı sıcaklık-duyarlı jel sistemleri, ilk olarak Chenite ve ark. (2000) tarafından yapılan çalışmada jelleşme ajanı olarak β -gliserofosfat (β GP) kullanılması ile gerçekleştirilmiştir (65). Kitosan asidik çözücülerde çözünmektedir. Asidik kitosan çözeltilerinin poliol-fosfatların eklenmesiyle çözelti nötrleşmekte ve fizyolojik pH aralığında sol-jel dönüşümü gerçekleşmektedir. Bu kitosan/poliol-fosfat sistemleri, düşük sıcaklıklarda sıvı halde kalmakta ve vücut sıcaklığında sol-jel geçişi yapmaktadır. Şekil 2.13'de gösterildiği gibi, polioller, büyük ölçüde hidrojen bağları gibi zayıf moleküller arası etkileşimler yoluyla kitosan zincirlerinin etrafında hidrasyondan koruyucu bir tabaka oluşturmaktadırlar. Sıcaklıktaki artış bu poliol katmanını bozmakta ve polimerlerin birbirleriyle güçlü hidrofobik bağlanma yoluyla etkileşime girmesini sağlamakta, böylece jelleşmeyi indüklemektedir. Poliol kısmının, bu hidrasyon tabakasının stabilitesi ve dolayısıyla sol-jel geçişinin sıcaklığı ve kinetiği üzerinde bir etkisi olduğu açıklanmıştır (66). Bu tür kitosan/poliol-fosfat sistemleri literatürde de yoğun olarak çalışılmaktadır (67,68).



Şekil 2.13. Sıcaklık-duyarlı kitosan/poliol-fosfat sistemlerinin jelleşme mekanizmasının şematik gösterimi ((69) no'lu referans değiştirilerek kullanılmıştır).

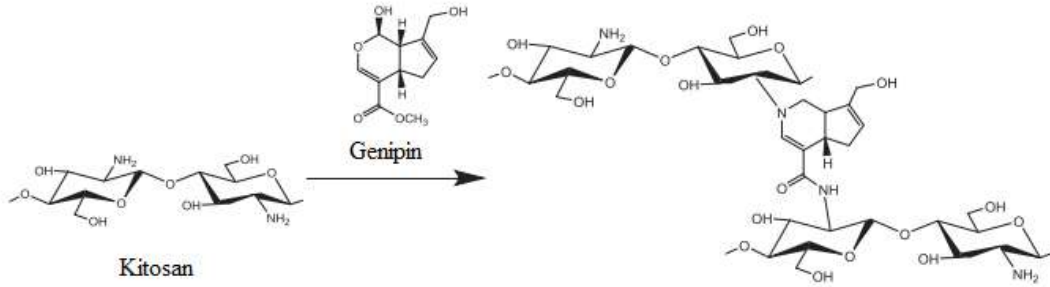
Literatürde, hidrojellerin mekanik özelliklerini ve kimyasal stabilitesini iyileştirmek amacıyla kitosan/ β -GP sistemlerine çapraz bağlayıcı olarak **genipin** de eklenmektedir (Şekil 2.14) (70).



Şekil 2.14. Kitosan hidrojel ağlarının β -GP ve genipin çapraz bağlayıcılarının varlığında olası çapraz bağlanma mekanizması ((71) no'lu referans değiştirilerek kullanılmıştır).

Genipin, kitosan bazlı hidrojelleri üretmek için sık tercih edilen, toksik olmayan bir çapraz bağlayıcı olup gardenya meyvesi ekstresinden (*Geniposid*) elde edilmektedir. Suda çözünebilen iki fonksiyon gruplu bir çapraz bağlama reaktifidir. Jelleşme süresi, reolojik

özellikler ve jelleşme sistemlerinin morfolojisi genipin konsantrasyonuna, pH durumuna ve farklı tuzlara (Na_3PO_4 , Na_2SO_4 ve NaHCO_3) göre değişmektedir. Örneğin, kitosan, genipin ve Na_3PO_4 'ten oluşan hidrojel, fizyolojik koşullar altında 8 dakikalık kısa sürede jelleşme gerçekleşmiş ve toksisite gözlenmemiştir (71). Genipinli kitosana ait çapraz bağlama reaksiyon mekanizmaları farklı pH değerlerinde farklılık göstermektedir (72). Asidik ve nötr koşullar altında, genipin, kitosan üzerindeki amino gruplarıyla bir Schiff reaksiyonu gerçekleştirmektedir. İki yeni kimyasal grup veren: monosüstitüe edilmiş amit ve üçüncül amin veren didehit ile benzer fonksiyonel gruplara sahiptir. Kitosan ve genipin karışımı saydam olmasına rağmen, sol-jel geçişini tamamladıktan sonra mavi renkli hidrojellere dönüşmektedir ve çapraz bağlanma mekanizması Şekil 2.15'de verilmiştir (66).



Şekil 2.15. İki kitosan zincirinin bir genipin molekülü ile çapraz bağlanmasının şematik gösterimi.

Literatürde osteokondral doku mühendisliği yaklaşımı ile gerçekleştirilen çalışmalarda tek fazlı ve çok fazlı iskele yapıları çeşitli teknikler kullanılarak hazırlanmış ve farklı yöntemler ile biraraya getirilerek doğal osteokondral doku benzeri yapıların elde edilmesine yönelik araştırmalar gerçekleştirilmiştir.

Tampieri vd. (2008) tarafından yürütülen bir çalışmada, artiküler kıkırdak ve subkondral kemik dokuya yönelik biyomimetik yapıda çok tabakalı kompozit doku iskelelerinin hazırlanması ve osteokondral lezyonların onarımında kullanılmasına yönelik araştırmalar yapılmıştır (73). Gradyan özelliklere sahip doku iskelesinde, subkondral kemik tabakası için magnezyum içerikli hidroksiapatit kristalleri ve kollajen I içerikli malzeme hazırlanmıştır. Osteokondral ara yüzeyi (*tidemark*), kemik tabakasına benzer fakat daha düşük hidroksiapatit içeriğine sahip olacak şekilde hazırlanmıştır. Kıkırdak dokusunu taklit eden üst tabaka ise kollajen I ve hyaluronik asit bileşenlerini içermektedir. Tabakalara ait tüm kompozitler 1,4-buta-nediol diglisidil eter ile ayrı ayrı çapraz bağlanmıştır. Çapraz

bağlama işleminin ardından filtrelenen yapılar Mylar levhalar üzerinde üst üste dizilerek tabakalı yapılar elde edilmiştir. Ne var ki, ayrı ayrı üretilerek bir araya getirilen tabakalar arasında entegrasyon sağlanamadığından, istif yapıda tabakaların birbirinden ayrılmasını önlemek için tüm ünitenin örgü benzeri bir yapı ile birbirine bağlanması gerekmiştir. Dondurarak kurutma işleminin ardından gözenekli, üç tabakalı monolitik yapı elde edilmiştir. Kıkırdak benzeri tabakanın kondrosit hücreleri desteklediği sonucuna varılmıştır. Kemik iliği kök hücrelerinin kompozit doku iskelesinde kültürlenmesi sonucunda ise, alt tabakada kemik oluşumu gözlenmiştir.

Osteokondral dokunun rejenerasyonuna yönelik olarak yapılan bir diğer çalışmada, çok katlı doku iskelesi üretimi agaroz hidrojel ile poli(laktik asit-ko-glikolik asit) (PLGA)/biyoaktif cam kompozit mikrokürelerin fabrikasyonu ile gerçekleştirilmiştir. Kıkırdak doku fazı için agaroz hidrojel sentezlenmiştir. Kemik fazı için ise PLGA ve biyoaktif cam mikroküreleri sentezlenerek sinterlenmiş ve üç boyutlu içsel bağlantılı mikroküre fazı elde edilmiştir. Ara yüzey ise agaroz hidrojel ve kompozit mikrokürelerin bir arada bulunduğu hibrid bir yapı olarak tasarlanmıştır. Kondrosit ve osteoblastlar ile gerçekleştirilen *in vitro* ko-kültür çalışmaları sonucunda, birbirinden farklı tabakalarda hücre fenotiplerinin korunduğu görülmüştür (27).

Khanarian vd. (2012) osteokondral ara yüzeyin dizaynına yönelik yaptıkları bir çalışmada, hibrid yapıda aljinat ve hidroksiapatit (HA) minerallerinden oluşan bir hidrojel sentezlemişlerdir. HA varlığının kondrosit hücre cevabı üzerine olan etkileri incelenmiş ve optimal kondrosit popülasyonunun belirlenmesine yönelik çalışmalar yürütülmüştür. Kompozit yapıdaki hidrojellerde, HA fazının kondrosit hücre aktivitesini etkilediği, tip II kollajen üretiminin arttığı sonucuna varılmıştır. Bununla birlikte HA, kondrosit hipertropiyi tetikleyerek tip X kollajen üretimine neden olmuştur. Çalışmadan elde edilen sonuçlar HA minerallerinin osteokondral ara yüzey bileşiminde mutlaka bulunması gerektiğini ortaya koymaktadır (14).

Galperin vd (2013) tarafından yapılan bir çalışmada, poli(hidroksietil metakrilat) (pHEMA) bazlı iki fazlı doku iskeleleri hazırlanmıştır. Yapının subkondral kemik dokusunu taklit eden bileşeninde monodispers pHEMA partiküller hidroksiapatit (HA)

tabakası ile kaplanmıştır. Çalışmada, HA varlığının mezenkimal kök hücrelerin kemiğe farklılaşmasında önemli rol oynadığı ve kemik farklılaşmasını destekleyecek büyüme faktörlerine ihtiyaç duyulmadığı sonucuna varılmıştır (74).

Tabakalı yapıda doku iskelelerinin osteokondral lezyonların onarımında kullanılabilmesi amacıyla gerçekleştirilen diğer bir çalışmada, kollajen bazlı doku iskeleleri dondurarak kurutma yöntemi kullanılarak sentezlenmiştir. Kemik doku, kalsifiye kıkırdak ve kıkırdak doku bileşenleri, kollajen I, kollajen II, hyaluronik asit ve HA mineral süspansiyonunun dondurarak kurutulmasıyla elde edilmiştir. Pre-osteoblastik hücrelerin kullanıldığı biyouyumluluk çalışmalarında, hücrelerin çok katmanlı yapı içerisine infiltrasyonu incelenmiş, hücre farklılaşması ya da farklı hücrelerin fenotiplerinin korunabileceğini gösteren çalışmalara yer verilmemiştir (29).

Ping Yan vd. (2015) tarafından yapılan bir çalışmada, ipek fibroin ve ipek-nano kalsiyum fosfat tabakalarından oluşan gözenekli yapıdaki doku iskelelerinin osteokondral defekt rejenerasyonunda kullanılabilirliği araştırılmıştır. Partikül ayırma/çözücü buharlaştırma tekniği ile hazırlanan gözenekli doku iskeleleri *in vitro* ortamda tavşandan elde edilen kemik iliği kök hücreleri ile kültüre edilmiştir. Osteojenik kültür ortamında ALP aktivitesinin arttığı sonucuna varılmıştır. Osteokondral ara yüzeyin bulunmadığı sistemde kıkırdaktan kemiğe sert bir geçiş-biyolojik olarak istenmeyen-bulunmaktadır. Tavşanlarda gerçekleştirilen subkutan implantasyon deneylerinde, integrasyonun korunduğu, yapının bağ doku ile çevrelendiği ve bağ dokunun gözenekli yapının içine doğru ilerleyebildiği sonucuna varılmıştır (75).

İpek fibroin biyoaktif seramiklerin kullanıldığı bir diğer çalışmada, keskin ara yüzey geçişinin önüne geçmek amacıyla, kıkırdak fazı oluşturacak ipek süspansiyonu, kemik fazı oluşturacak biyoaktif seramik içeren ipek içerisine daldırılmış ve -20°C’de ani olarak dondurulmuştur. İki fazlı tasarlanan doku iskelesinin yapısal karakterizasyonundan elde edilen sonuçlar, kıkırdak ve kemik doku ile uyumlu olacak şekilde farklı gözenek morfolojisine sahip yapıların sürekli ve kesintisiz bir ara yüzey ile üretildiğini göstermiştir (76).

Nover vd (2015) tarafından yapılan bir diğ er çalışmada ise, selektif lazer eritme y ontemiyle g ozekli titanyum diskler hazırlanmıştır. Kemik dokuyu desteklemek üzere tasarlanan bu diskler üzerine kondrosit hücreleri içeren agaroz jeller yerleştirilerek osteokondral doku iskeleleri elde edilmiştir. Agaroz jelin titanyum g ozeklere bir miktar difüzyonu ile bir geçiş bölgesi sağlanmış ve kayma gerilimine karşı direnç kazandırılmıştır (77).

Bu çalışmalara ek olarak literatürde yer alan biyokimyasal gradyan içeriklerine göre çok fazla osteokondral iskeleleri  izelge 2.1’de sunulmuştur.



Çizelge 2.1. Biyokimyasal gradyan içeriklerine göre çok fazlı osteokondral iskeleleri.

Kıkırdak	Kalsifiye kıkırdak	Subkondral kemik	Sonuç	Kaynak
Kollajen tip I- Kollajen tip II- Hyuluronik asit	Kollajen tip I- Kollajen tip II-HA	Kollajen tip I-HA	Hücre yapışma ve çoğalmasının arttırılması,doku yenilenmesinin desteklenmesi ve kıkırdak tabakanın oluşumu	(29,30)
Kollajen tip I- kollajen tip II- hyaluronik asit	Kollajen tip I- hyaluronik asit	Kollajen tip I-HA	Hasarlı bölgede kıkırdaklı bir tabaka ile kaplanmış kemik dokusunun oluşumu	(78)
Kollajen jele ekilmiş MKH'ler	Otolog plazma	Trikalsiyum fosfatta ekilmiş MKH'ler	Uygun osseointegrasyon ve kıkırdak bağı ile osteokondral dokunun oluşumu.	(79)
Kondrosit ekilmiş fibrin hidrojel ile kolajen tip I/III matrisi.	-	Silindirik deselülerize kemik.	Kıkırdak ve kemik tabakaları arasında doğru bağlanma ve kıkırdak matris sentezinde iyileşme.	(80)
Kollajen tip I	Kollajen tip I (% 60) - hidroksiapatit (% 40)	Kolajen tip I (% 30) -hidroksiapatit(% 70)	Klinik çalışmada kemik ve kıkırdak oluşumunun görülmesi.	(81)
Domuz eklem kondrosit	-	Kollajen-hidroksiapatit PLA	Neo-kıkırdak oluşumu ve neo-kıkırdak ile üstün entegrasyon.	(82)
Kondrosit PGA'ya ekilmesi	-	PLGA/PEG içine yüklenen periostal kaynaklı hücreler	Kıkırdak tabakasında GAG artışı ve kemik tabakasında mineralizasyon.	(43)
Kondrosit PGA mesh yapıları yüklenmiştir.	-	Kollajen-hidroksiapatit sünger	<i>In vivo</i> 6 aylık implantasyondan sonra karakteristik mimari özelliklerle osteokondral onarımın iyileştirilmesi	(83)

3. GEREKÇE VE AMAÇ

Travmatik yaralanmalar ya da yaşlanmaya bağlı yıpranmalar sonucu ortaya çıkan osteokondral lezyonlar, yaygın olarak karşılaşılan ortopedik problemlerdir. Osteokondral dokuda, eklem kıkırdığı, subkondral kemik ve kalsifiye kıkırdak ara yüzeyini içeren farklı fazların katmanlı yapısı, dokunun onarımı ve rejenerasyonunda zorluklarla karşılaşılmasına neden olmaktadır. Fizyoloji, morfoloji, biyomekanik özellikler ve iyileşme kapasitesi açısından birbirinden farklı olan ve aynı anda bir arada hasar gören bu dokuların rejenerasyonunda, **doku mühendisliği** yaklaşımı klinik tedavi yöntemlerine önemli bir alternatif oluşturmaktadır. Birbirleri ile entegre olmuş çok fazlı yapıları içeren tek bir doku iskelesinin tasarımı etkin bir yaklaşımdır.

Gerçekleştirilen tezde amaç, çok fazlı, biyomimetik ve gradyan yapıda entegre doku ünitelerinin tasarımı, üretimi ve osteokondral doku rejenerasyonunda kullanılabilirliğinin araştırılmasıdır. Tezde, doğal osteokondral yapının katmanlarındaki farklı rejeneratif gereksinimleri karşılayacak şekilde, her bir fazın spesifik özelliklerini taşıyan, çok fazlı doku iskelelerinin tasarımı hedeflenmiştir. Bu fazlar arasındaki entegrasyonun doku iskelelerinin üretimi sırasında oluşturulması ve fazlar arası kesintisiz geçişe sahip osteokondral doku ünitelerinin üretimi amaçlanmıştır. Dondurarak kurutma ve termal jelleşme yöntemlerinin iteratif olarak birbiri ardına uygulanmasıyla heterojen yapıda tek bir doku iskelesinin tasarımı ve üretimi hedeflenmiştir. Tez çalışmasında, çok fazlı osteokondral doku ünitelerinin biyomimetik olarak üretilmesi amaçlanmıştır. Üretimi hedeflenen doku ünitesindeki her bir fazın (subkondral kemik, kalsifiye kıkırdak, kıkırdak) doğal osteokondral yapının hücre dışı matris bileşenleri kullanılarak hazırlanacaktır. Ayrıca, bu bileşenlerin kompozisyonunun doğal osteokondral yapıyı taklit etmesi hedeflenmiş, bu doğrultuda gradyan faz yapıları tasarlanmıştır. Subkondral kemik fazı kitosan, kollajen tip I ve nanohidroksiapatit bileşenlerinden oluşan gözenekli doku iskelesi olarak tasarlanmıştır. Kemik fazın hemen üzerinde yer alan kalsifiye kıkırdak fazı kitosan, kollajen tip II ve kemiğe göre azalan oranda nanohidroksiapatit içerecektir. En üst tabaka olan kıkırdak dokuya gelindiğinde kalsifiye kıkırdak fazına göre daha yüksek oranda kollajen tip II içeren kitosan/kollajen tip II hidrojel yapılar sentezlenecektir. Böylelikle tüm

bileşenlerin biyobozunur özellikte olduğu, hem biyomimetik hem de gradyan yapıya sahip doku ünitelerinin üretimi hedeflenmiştir.

Doku mühendisliği yaklaşımı ile üretilen osteokondral yapıların tasarımında göz önünde bulundurulması gereken diğer bir önemli nokta, kondrosit ve osteoblastlar gibi farklı hücre tiplerinin etkileşimidir. Osteokondral yapıda farklı doku fazları arasındaki heterotipik hücre etkileşimlerinin, fazlar arası kesintisiz geçişlerin oluşmasında önemli bir rol oynayacağı düşünülmektedir. Gerçekleştirilen tez çalışmasında, kıkırdak ve kalsifiye kıkırdak fazda kondrosit hücrelerin, subkondral kemik fazında ise osteoblastların bulunduğu bir ko-kültür oluşturulması hedeflenmiştir. Kondrositlerin ve osteoblastların biyomimetik ve gradyan yapıda tasarlanan çok fazlı doku ünitesi içerisinde faza spesifik dağılımlarının *in vitro* ortamda belirgin fakat sürekli yapıda kıkırdak, kalsifiye kıkırdak ve kemik matris oluşumu üzerine olan etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Tez kapsamında yürütülmesi planlanan *in vivo* çalışmalarda ise, elde edilen doku ünitesinin çevre dokular ile biyoyumluluğu, yapısal bütünlüğü, hücre infiltrasyonu ve degradasyonunun araştırılması hedeflenmiştir.

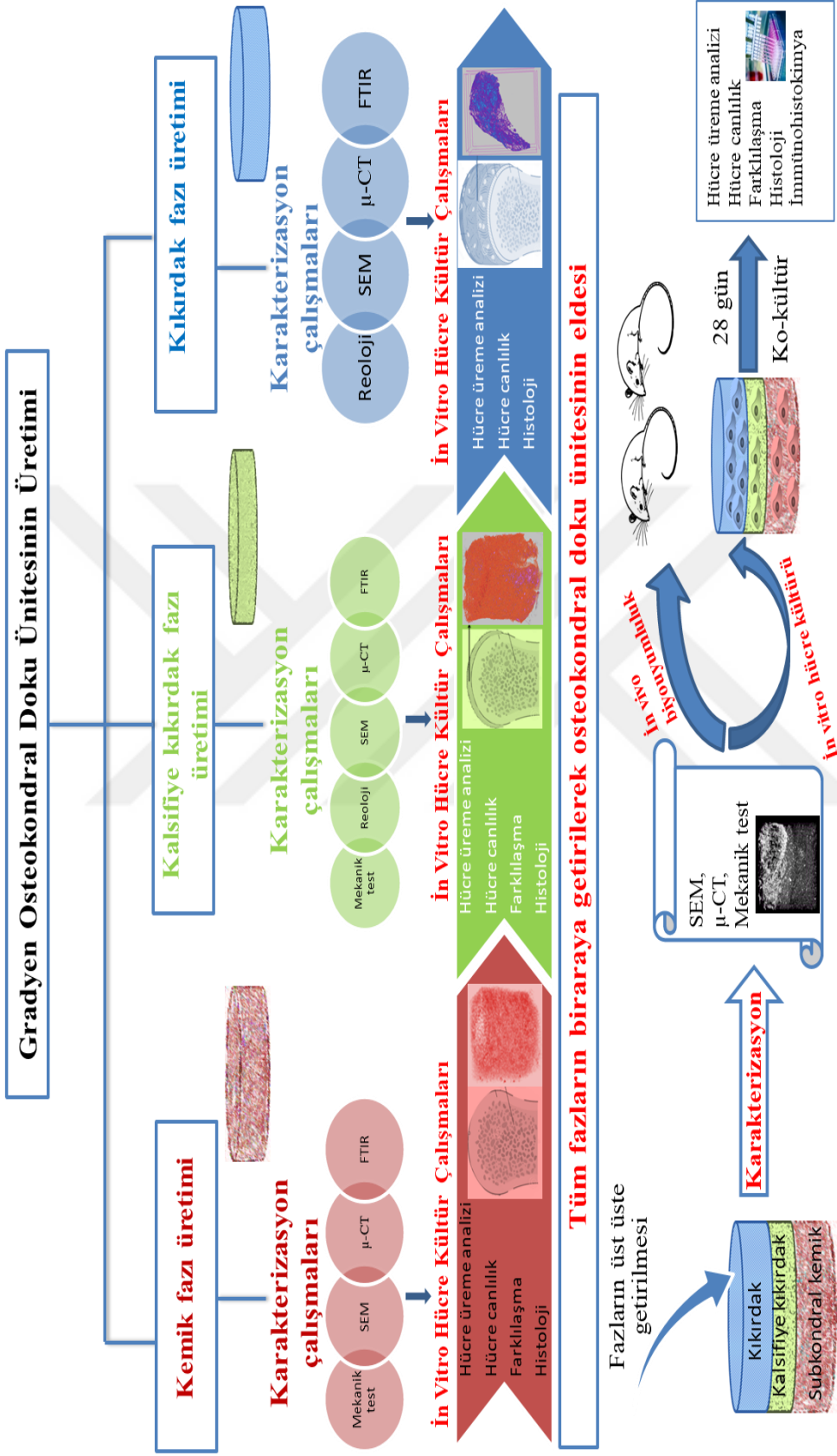
4. MATERYAL VE YÖNTEM

Bu bölümde tez çalışması kapsamında kullanılan kimyasal malzemeler ve gerçekleştirilen deneysel çalışmalar hakkında ayrıntılı bilgi verilmiştir. Tezin ilk aşamasında, gradyan yapıdaki çok fazlı osteokondral doku ünitesini oluşturacak olan subkondral kemik, kalsifiye kıkırdak ve kıkırdak fazlarının ayrı ayrı üretimine yönelik yapılan çalışmalar sunulmuştur. Her bir faza ait doku iskeleleri ile gerçekleştirilmiş olan *in-vitro* hücre kültür çalışmalarına yer verilmiştir. İlk olarak subkondral kemik fazını oluşturacak gözenekli doku iskelelerinin dondurarak kurutma yöntemi ile üretimi ve MC3T3-E1 ile gerçekleştirilen hücre kültür çalışmaları üzerinde durulmuştur.

Ardından kalsifiye kıkırdak fazını oluşturacak hidrojel yapının üretimi detaylı olarak anlatılmıştır. Termal jelleşme yönteminin kullanıldığı çalışmalarda nanohidroksiapatit ile desteklenmiş farklı bileşimlerdeki kitosan/ kollajen tip II jellerin üretimi, karakterizasyonu ve ATDC5 hücreleri ile gerçekleştirilen *in-vitro* hücre kültür çalışmalarına yer verilmiştir. Son olarak, osteokondral doku ünitesinde kıkırdak fazını oluşturacak kitosan/kollajen tip II jellerin termal jelleşme yöntemi ile üretimi ve ATDC5 hücreleri ile gerçekleştirilen *in-vitro* hücre kültür çalışmaları açıklanmıştır.

Tezin son kısmında ise osteokondral dokuda gradyan yapıyı oluşturacak fazların (subkondral kemik, kalsifiye kıkırdak ve kıkırdak) üst üste bir araya getirilmesi ile çok fazlı osteokondral doku ünitesinin elde edilmesine yönelik olarak gerçekleştirilen çalışmalar açıklanmıştır. Osteokondral doku ünitesinin üretimi sonrası gerçekleştirilen karakterizasyon çalışmaları ve MC3T3-E1 ve ATDC5 hücrelerini içeren doku üniteleri ile yürütülen *in-vitro* hücre ko-kültür çalışmalarına yer verilmiştir. Üretimi gerçekleştirilen doku ünitelerinin *in-vivo* biyouyumluluğunun test edilmesi amacıyla BALB/c erkek fareleri ile gerçekleştirilmiş olan çalışmalar açıklanmıştır.

Tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen deneysel çalışmalar şematik olarak Şekil 4.1’de verilmiştir.



Şekil 4.1. Tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen deneysel basamakların şematik gösterimi.

4.1. MATERYAL

Tez kapsamında doku iskelesi üretiminde kullanılan başlıca ticari kimyasallar; kitosan (orta moleküler ağırlıklı, $\geq$ % 75-85 deasetilasyon derecesi), kollajen tip I (sıçan kuyruğundan), kollajen tip II (tavuk sternal kıkırdak) ve nanohidroksiapatit partikülleri (nHA, <200 nm) Sigma-Aldrich (Almanya) firmasından temin edilmiştir. Subkondral kemik fazın hazırlanmasında çapraz bağlayıcı ajan olarak kullanılan sodyum tripolifosfat (TPP), N-Hidroksisüksinimit (NHS), 1-etil-3- (3-dimetilaminopropil) karbo-diimid hidroklorür (EDAC) ve glioksal Sigma-Aldrich (Almanya) firmasından satın alınmıştır. Jel yapıya sahip kalsifiye kıkırdak ve kıkırdak fazları hazırlanmasında kullanılan β -gliserol fosfat disodyum pentahidrat (β -GP) ve genipin sırasıyla Sigma-Aldrich (Almanya) ve Wako (ABD) firmasından satın alınmıştır. Çalışmalarda, pH ayarlaması için kullanılan sodyum hidroksit (NaOH) ve hidroklorik asit (HCL) Merck (Almanya) firmasından temin edilmiştir. Subkondral fazı oluşturacak kitosan/kollajen tip I/ nanohidroksiapatit içerikli doku iskelelerinden Bradford yöntemiyle kollajen salımının incelenmesi amacıyla kullanılan Coomassie parlak mavi G-250 boyası Sigma-Aldrich (Almanya) firmasından temin edilmiştir. Şişme ve bozunma deneylerinde kullanılan fosfat tamponlu tuz (PBS, pH:7.4) Sigma-Aldrich (Almanya) firmasından satın alınmıştır.

Tez çalışması kapsamında kullanılan MC3T3-E1 (pre-osteoblast) ve ATDC5 (öncül kondrosit) hücre hatları Riken (Japonya) firmasından satın alınmıştır. Hücre kültür çalışmaları aşamasında kullanılan Dulbecco's Modified Eagle's Medium Nutrient Mixture F-12 Ham Sigma (Almanya) ve Minimum Essential Medium Alpha Modification (α -MEM) Biowest (Fransa) firmasından satın alınmıştır. Fetal sığır serumu (FBS), Penisilin-Streptomisin (Pen-Strep), Tripsin/EDTA, askorbik asit ve β -gliserol fosfat Sigma-Aldrich (Almanya) firmasından satın alınmıştır. Hücre üremesinin belirlenmesinde kullanılan Presto Blue, Live&Dead analiz kiti Invitrogen (ABD) firmasından, DNA içeriği analizinde kullanılan papain, sodyum asetat, etilendiamintetraasetik asit (EDTA) sistein HCL ve Tris-HCL Sigma-Aldrich (Almanya) firmasından temin edilmiştir.. Subkondral kemik fazı DNA içerik analizinde kullanılan Tris-HCL (1 M, pH 7) Sigma-Aldrich firması tarafından temin edilmiştir. Kondrojenik hücre farklılaşmasında kullanılan ITS Media Sigma Aldrich (Almanya) firmasından satın alınmıştır. Hücre fiksasyonu için kullanılan %10 formalin (v/v) ve gluteraldehit Sigma-Aldrich (Almanya) firmasından satın alınmıştır. Kalsiyum

taininde kullanılan Alizarin red (ARS) ve setilpiridinyum klorür (CPC) Sigma- Aldrich (Almanya) firmasından satın alınmıştır. GAG taininde kullanılan 1,9-dimetilmetilen mavisi (DMMB) boyası ve standart eğrisi çiziminde kullanılan kondroitin sülfat Sigma-Aldrich firmasından sağlanmıştır. Kollajen taininde kullanılan Ehrlich'in çözeltisi, hidroksiprolin ve kloramin T Sigma-Aldrich (Almanya) firmasından temin edilmiştir. Alkalın Fosfataz (ALP) aktivitesi taininde kullanılan p-nitrofenil fosfat substratı Sigma Aldrich, Triton X-100 ve magnezyum klorür heksahidrat ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$) Merck (Almanya) firmasından satın alınmıştır. Reverse transkripsiyon-polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) analizi için mRNA izolasyonunda kullanılan izoamil alkol Merck (A.B.D) ve fenol/ kloroform/izoamil alkol Amresco (Fransa) firmasından temin edilmiştir. RT-PCR analizinde seyreltme işlemlerinde kullanılan steril Dnaaz ve Rnaaz içermeyen su Bioshop (Kanada) firmasından satın alınmıştır.

Histoloji çalışmasında kullanılan hemotoksilen&eoizin, Alizarin red, Alcian blue, Picrosirius red ve Masson's Trichrome boyaları Sigma Aldrich (Almanya) firmasından temin edilmiştir. İmmünhistokimya çalışmalarında kullanılan primer antikorlar, kollajen tip I (sc-59772, Col I), kollajen tip II (sc-52658, Col II) ve kollajen tip X (sc-59954, Col X) Santa Cruz (California, ABD) firmasından satın alınmıştır. Çalışmalar Roche (Almanya) firmasından temin edilen ultraview DAB detection kit ile gerçekleştirilmiştir. Sekonder antikor olarak Horseradish peroxidase (HRP) kullanılmıştır.

4.2. OSTEOKONDRAL DOKU ÜNİTESİ TASARIMI VE ÜRETİMİNDE UYGULANAN YÖNTEMLER

Osteokondral hasarların rejenerasyonunda kullanılacak doku iskelesi, doğal dokunun bileşenlerini göz önüne alınarak tasarlanmıştır. Bu biyomimetik yaklaşım doğrultusunda, tez kapsamında tasarlanan 3-boyutlu gradyan yapıdaki doku ünitesi; kemik doku ile entegrasyonu sağlayacak rijid subkondral faz, kondrosit hücrelerin üremesi ve kıkırdak oluşumunu destekleyecek kıkırdak tabaka ve kemik-kıkırdak ara yüzeyinde bulunan kalsifiye kıkırdak dokusu bileşenlerinden oluşmaktadır. Tabakaların bir araya getirilmesiyle çok fazlı gradyan yapıda bir doku ünitesinin elde edilmesi hedeflenmiştir. Her bir faza ait üretim yöntemi ayrıntılı olarak Bölüm 4.3, 4.4 ve 4.5'de açıklanmıştır.

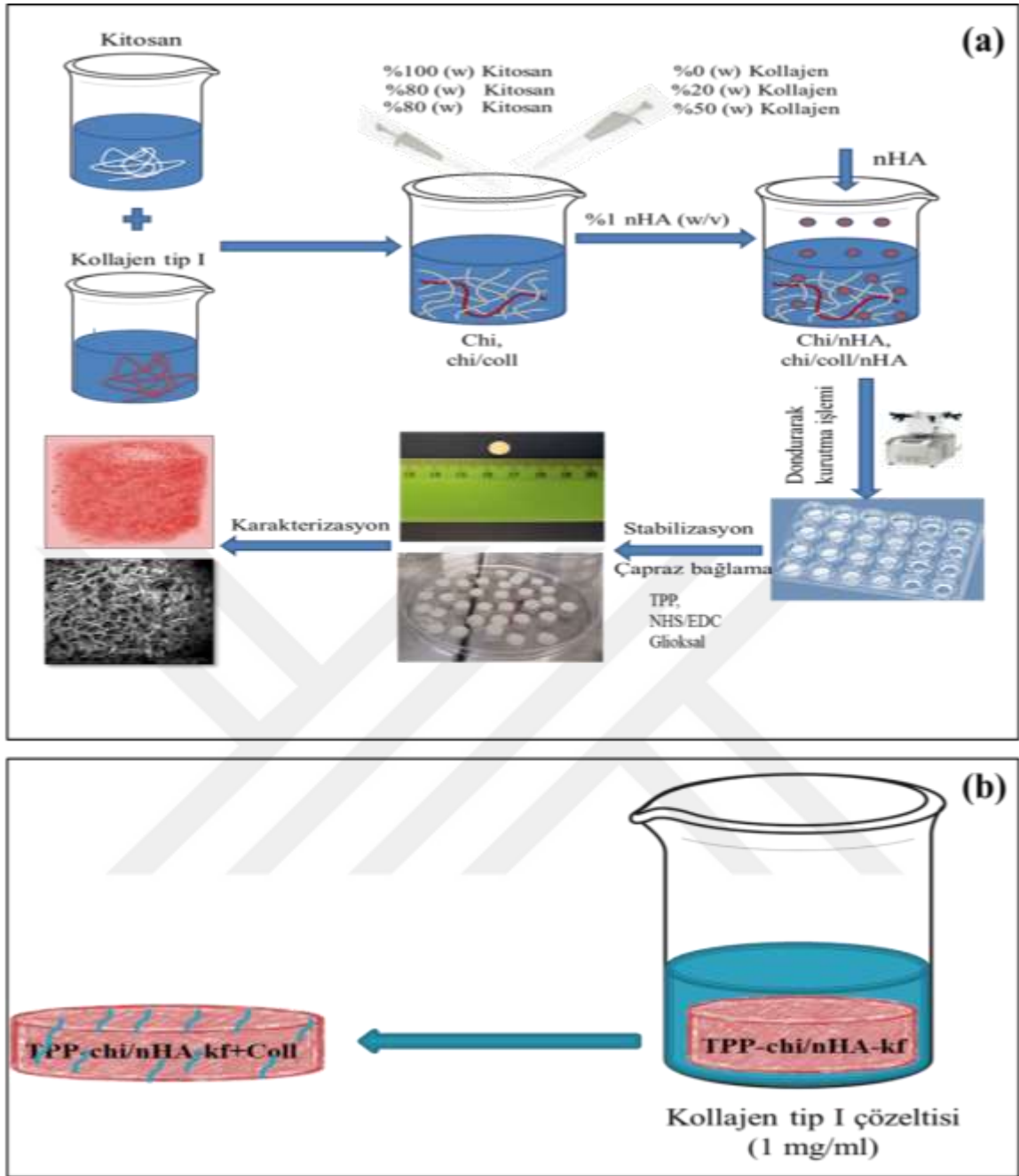
4.3. SUBKONDRAL KEMİK FAZI ÜRETİMİ

Subkondral kemik fazı, hücre dışı matriks (ECM) bileşenleri göz önünde bulundurularak kitosan, kollajen tip I ve nanohidroksiapatit (nHA) malzemeleri kullanılarak üç boyutlu gözenekli yapıda doku iskelelerinin üretimi ile elde edilmiştir. Bu amaçla, kitosanın 0,2 M asetik asit içerisinde çözülmesiyle %2 (w/v) derişimde kitosan çözeltisi hazırlanmıştır. Kemik fazını oluşturacak süspansiyonlar, buz banyosunda ağırlıkça kitosan/kollajen tip I oranları (100/0, 80/20, 50/50, w/w) olacak şekilde hazırlanmış ve karışmaya bırakılmıştır. Hazırlanan karışıma nanohidroksiapatit partikülleri (%1, w/v) eklenmiş ve nanopartiküller tam olarak dağılana dek buz içerisinde karıştırma işlemi devam ettirilmiştir. Subkondral kemik fazı için hazırlanan bu süspansiyonlar 24 gözlü Petri kaplarına aktararak, 24 saat süreyle -20°C’de dondurulmuştur. Bu işlem sonrasında liyofilizatöre (Heraus, Almanya) alınan yapılar -80°C’de 96 saat boyunca dondurularak kurutulmuştur (46). Dondurarak kurutma işlemi sonucunda gözenekli yapıya sahip doku iskeleleri elde edilmiştir (84). Doku iskelelerinin yapısal bütünlüğünün korunması amacıyla sırasıyla stabilizasyon ve fiziksel veya kimyasal çapraz bağlama işlemleri gerçekleştirilmiştir. Stabilizasyon işlemi, %96’lık (v/v) ve %70’lik (v/v) etanol çözeltilerinde sırasıyla 24 ve 2’şer saat bekletilerek sağlanmıştır. Stabilize edilmiş olan gözenekli doku iskelelerinin çapraz bağlanmasında üç farklı yöntem kullanılmıştır.

İlk yöntemde doku iskeleleri için fiziksel çapraz bağlayıcı olan **tripolifosfat (TPP)** çözeltisi kullanılmıştır. Doku iskeleleri distile su içerisinde hazırlanan %1’lik (w/v) TPP çözeltisi içerisinde oda sıcaklığında 2 saat boyunca bekletilerek çapraz bağlanmış, saf su ile yapılan yıkama işleminin ardından liyofilizatörde kurutulmuştur (62). İkinci yöntemde ise doku iskeleleri 2 saat süre ile 33 mM **EDAC** ve 6 mM **NHS** içeren % 95 etanol (%w/v) çözeltisinde bekletilerek kimyasal çapraz bağlama işlemi gerçekleştirilmiştir. Son olarak, **glioksal**’in çapraz bağlayıcı ajan olarak kullanıldığı yöntemde, doku iskeleleri 20 mM glioksal içeren etanol:su (1:1) çözeltisinde 2 saat boyunca oda sıcaklığında bekletilerek kimyasal çapraz bağlama işlemi gerçekleştirilmiştir (85). Çapraz bağlama işleminin ardından örnekler, sırasıyla %96 ,%70, ve %50 (v /v) etanol içinde ve son olarak distile su ile 10’ar dakika süre ile yıkama işlemine tabi tutulmuş ve liyofilizatörde kurutulmuştur. Subkondral kemik fazının üretiminde kollajen tip I’in yapıya entegre edilmesi için öngörülen diğer bir yöntem kitosan-nHA kompozit çözeltisi ile hazırlanan doku

iskelelerinin tip I kollajen çözeltisine daldırılarak emdirme yoluyla kaplanmasıdır (51,61) (Şekil . Kollajen tip I kaplama işlemi için, %1 (w/v) nHA içeren kitosan/nanohidroksiapatit doku iskeleleri su:etanol (1:1) karışımında hazırlanan 1 mg mL^{-1} kollajen tip I çözeltisinde 20 dak. süre ile bekletilmiş, ardından 10 dak vakum etüvüne alınarak kollajenin iskele yapısı içerisine iyice difüzenmesi sağlanmıştır. Kollajen kaplama işlemi ardından örnekler, sırasıyla %96 ,%70, ve %50 (v /v) etanol içinde ve son olarak distile su ile 10’ar dakika süre ile yıkama işlemine tabi tutulmuş ve liyofilizatörde kurutulmuştur. Subkondral kemik fazı için kullanılması öngörülen doku iskelesi grupları bu yöntemlerle hazırlanmış ve karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Subkondral kemik fazın üretimine yönelik gerçekleştirilen çalışmalar Şekil 4.2’de özetlenmiştir.





Şekil 4.2. (a) Subkondral kemik fazı üretimine yönelik gerçekleştirilen deneysel basamakların şematik gösterimi (b) TPP-chi/nHA-kf doku iskelelerinin kollajen kaplama işleminin şematik gösterimi.

Subkondral kemik fazı için üretilen doku iskelesi grupları aşağıdaki şekilde isimlendirilmiştir.

- **Chi/nHA-kf:** Kollajen içermeyen kitosan/nanohidroksiapatit doku iskeleleri
- **Chi80/Coll20/nHA:** 80:20 (w:w) kitosan:kollajen I/ nanohidroksiapatit içeren doku iskeleleri
- **Chi50/Coll50/nHA:** 50:50 (w:w) kitosan:kollajen I/ nanohidroksiapatit içeren doku iskeleleri
- **NHS/EDAC-Chi/nHA, NHS/EDAC-Chi80/Coll20/nHA, NHS/EDAC-Chi50/Coll50/nHA:** NHS/EDAC çapraz bağlı yapılar
- **Glioksal-Chi/nHA, Glioksal-Chi/nHA+Coll, Glioksal-Chi80/Coll20/nHA, Glioksal-Chi50/Coll50/nHA:** Glioksal çapraz bağlı yapılar
- **TPP-Chi/nHA, TPP-Chi/nHA+Coll:** 100:0 (w:w) TPP çapraz bağlı yapılar

Farklı bileşimlerde hazırlanan doku iskelelerinin içerikleri Çizelge 4.1’de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Subkondral kemik fazı için üretilen doku iskelesi grupları ve bileşimleri. Tüm doku iskelelerinde nHA oranı %1 (w/v) olacak şekilde sabit tutulmuştur.

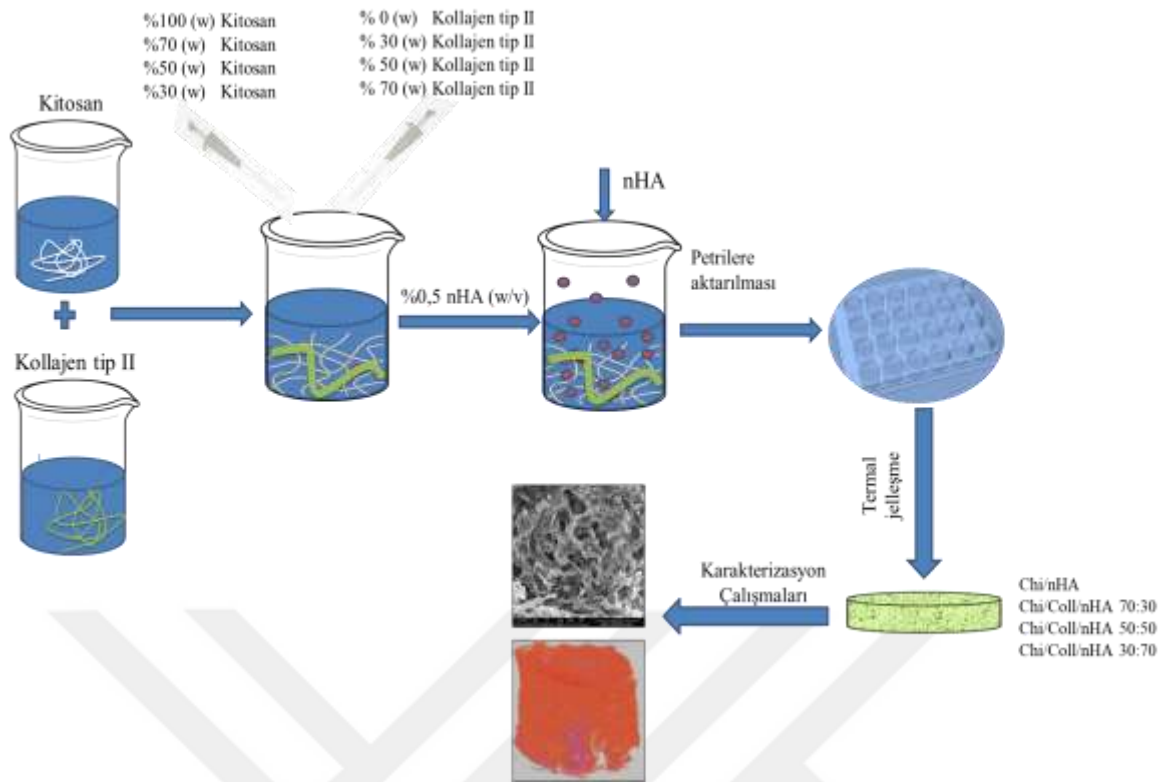
Doku iskelesi	Kitosan (%w)	Kollajen (%w)	Çapraz bağlayıcı ajan
Chi/nHA-kf	100	-	-
TPP- Chi/nHA-kf	100	-	1 % (w/v) TPP
NHS/EDAC- Chi/nHA-kf	100	-	33mM EDAC ve 6mM NHS
Glioksal- Chi/nHA-kf	100	-	20 mM glioksal
Chi80/Coll20/nHA	80	20	-
NHS/EDAC- Chi80/Coll20/nHA	80	20	33mM EDAC ve 6mM NHS
Glioksal-Chi80/Coll20/nHA	80	20	20 mM glioksal
Chi50/Coll50/nHA	50	50	-
NHS/EDAC- Chi50/Coll50/nHA	50	50	33mM EDAC ve 6mM NHS
Glioksal-Chi50/Coll50/nHA	50	50	20 mM glioksal
TPP- Chi/nHA-kf+Coll	100	1 mg/ml kollajen (daldırarak bekletme)	1 % (w/v) TPP (Kollajen kaplı)
NHS/EDAC-Chi/nHA-kf+Coll	100	1 mg/ml kollajen (daldırarak bekletme)	33mM EDAC ve 6mM NHS
Glioksal- Chi/nHA-kf +Coll	100	1 mg/ml kollajen (daldırarak bekletme)	20 mM glioksal

4.4. KALSİFİYE KIKIRDAK (GEÇİŞ BÖLGESİ) FAZI

Kalsifiye kıkırdak fazı, hücre dışı matriks (ECM) bileşenleri göz önünde bulundurularak kitosan, kollajen tip II ve nanohidroksiapatit (nHA) malzemelerinin varlığında üç boyutlu jel yapıda üretilmiştir. Bu amaçla, kitosan çözeltisi, %1'lik (v/v) (0,175 M) asetik asit içerisinde çözülerek %2.5 (w/v) derişiminde hazırlanmıştır. Kollajen tip II çözeltisi, 0.5M asetik asit ile çözülerek 8 mg mL⁻¹ derişiminde hazırlanmıştır. Her iki çözelti buz banyosu içerisinde kitosan/kollajen tip II oranları (100/0, 70/30, 50/50 ve 30/70, w/w) olacak şekilde hazırlanıp karışmaya bırakılmıştır. Karıştırma işleminin ardından çözeltilere %0.5 (w/v) oranında nHA partikülleri ilave edilmiş ve 12 saat süre ile karıştırmaya devam edilmiştir. Elde edilen süspansiyonlara % 15 (w/v) oranında fizyolojik pH ve sıcaklık değerlerinde fiziksel çapraz bağlama görevi görerek kitosan ve kollajen çözeltilerinde sol-jel geçişini sağlayan β -GP eklenmiştir (57). Daha sonra süspansiyonlara, elde edilecek jellerin stabilizasyonunu arttırmak amacıyla 0.25 mM derişiminde genipin çözeltisi eklenmiştir. Ardından 10 M NaOH çözeltisi kullanılarak süspansiyonun pH'ı 7.0-7.3 olacak şekilde ayarlanmıştır. Farklı bileşimlerdeki tüm süspansiyonların karışma işlemleri ani jelleşmenin önlenmesi amacıyla buz banyosu üzerinde gerçekleştirilmiştir. Elde edilen süspansiyonlar 48 gözlü Petri kaplarına aktararak 30 dakika süre ile 37°C'de termal jelleşme işlemi gerçekleştirilmiştir. Kalsifiye kıkırdak fazı için üretilen jel grupları aşağıdaki şekilde isimlendirilmiştir.

- **Chi/nHA:** Kollajen içermeyen nHA içeren (%0.5 w/w) jeller
- **Chi/Coll/nHA 70:30:** 70:30 (w:w) kitosan:kollajen II + %0.5 (w/w) nHA içeren jeller
- **Chi/Coll/nHA 50:50:** 50:50 (w:w) kitosan:kollajen II + %0.5 (w/w) nHA içeren jeller
- **Chi30/Coll70/nHA 30:70:** 30:70 (w:w) kitosan:kollajen II + %0.5 (w/w) nHA içeren jeller: Chi30/Coll70/nHA

Kalsifiye kıkırdak fazı üretim basamakları Şekil 4.3'de özetlenmiştir.



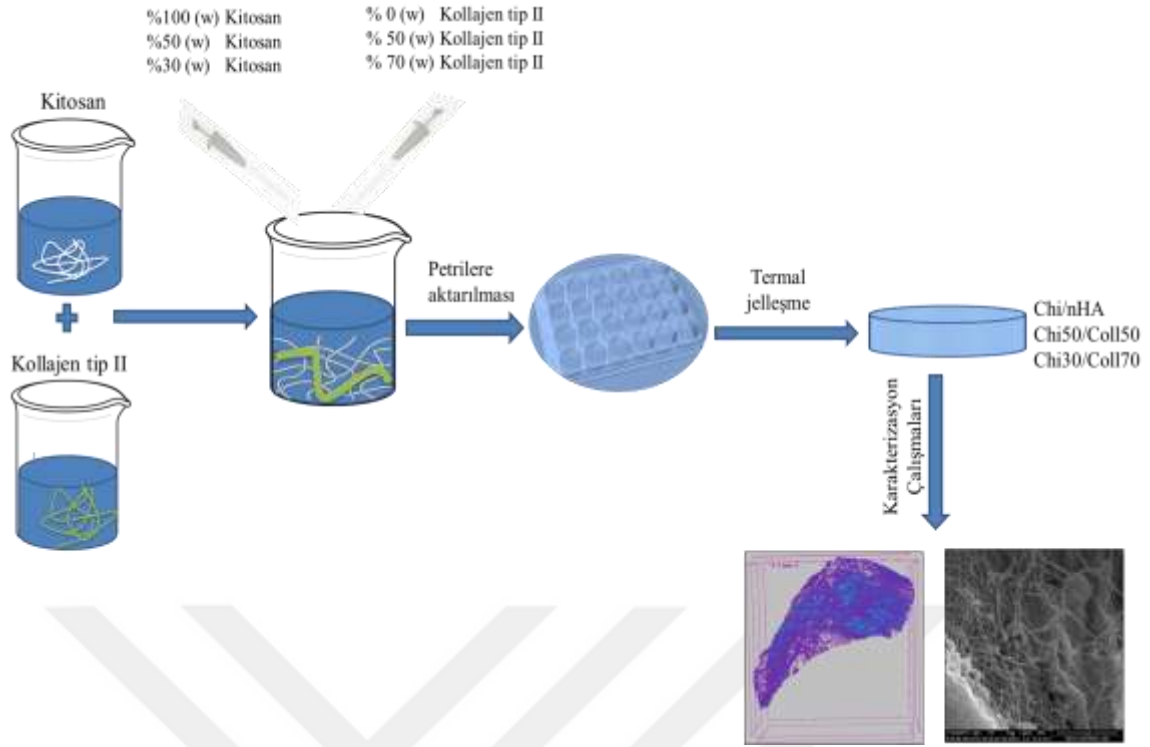
Şekil 4.3. Kalsifiye kıkırdak fazı üretimine yönelik gerçekleştirilen deneysel basamakların şematik gösterimi.

4.5. KIKIRDAK FAZI

Kıkırdak fazı, hücre dışı matriks (ECM) bileşenleri göz önünde bulundurularak kitosan ve kollajen tip II malzemelerinin varlığında üç boyutlu jel yapıda üretilmiştir. Bölüm 4.4’de açıklandığı gibi hazırlanan %2.5 (w/v) kitosan ve 8 mg mL^{-1} kollajen tip II çözeltileri kitosan/kollajen tip II bileşimi (100/0, 50/50 ve 30/70, w/w) olacak şekilde karıştırılmıştır. Hazırlanan karışımlara yine Bölüm 4.4’de açıklandığı şekilde aynı derişimde β -GP, genipin ve NaOH (10 M) eklenmiştir. Kıkırdak faz tabakası nHA içermediğinden ilave edilmemiştir. Elde edilen süspansiyonlar 48 gözlü Petri kaplarına aktararak 37°C ’de 30 dakika süre ile termal jelleşme işlemi gerçekleştirilmiştir. Kıkırdak fazı için üretilen jel grupları aşağıdaki şekilde isimlendirilmiştir.

- **Chi100/Coll0:** 100:0 (w:w) kitosan:kollajen II içeren jeller
- **Chi50/Coll50:** 50:50 (w:w) kitosan:kollajen II içeren jeller
- **Chi30/Coll70:** 30:70 (w:w) kitosan:kollajen II içeren jeller

Kıkırdak fazı üretim yöntemleri Şekil 4.4’de açıklanmıştır.



Şekil 4.4. Kıkırdak fazı üretimine yönelik gerçekleştirilen deneysel basamakların şematik gösterimi.

4.6. OSTEOKONDRAL DOKU ÜNİTESİNİ OLUŞTURAN FAZLARA AİT YAPILARIN KARAKTERİZASYONU

Her bir fazın morfolojik yapısı için Taramalı elektron mikroskobu (SEM), kimyasal yapıları için FTIR-ATR ve Enerji Yayılımlı X-ışını Analizi (EDAX), gözeneklilik ve içsel bağlantılılık analizi için Mikro-Bilgisayarlı Tomografi (μ -ct), mekanik özellikleri için basma testi analizleri gerçekleştirilmiş, jel yapıdaki fazlar için ayrıca reolojik analizler yapılmıştır.

4.6.1. FOURIER DÖNÜŞÜMLÜ KIZIL ÖTESİ SPEKTROSKOPİSİ – AZALTILMIŞ TOPLAM YANSIMA (FTIR-ATR) İLE KİMYASAL ANALİZ

Liyofilizatörde kurutulmuş olan **kemik**, **kalsifiye kıkırdak** ve **kıkırdak** fazını oluşturacak doku iskelesi ve jellerinin kimyasal yapılarının analizi amacıyla ATR modunda 32 tarama kullanılarak 4 cm^{-1} çözünürlükte $4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$ dalga boyu aralığında FTIR-ATR analizleri gerçekleştirilmiş ve fazları oluşturan bileşenlere ait spesifik piklerin varlığı belirlenmiştir.

4.6.2. TARAMALI ELEKTRON MİKROSKOBU (SEM) İLE MORFOLOJİK ANALİZİ

Osteokondral doku ünitesini oluşturacak olan kemik, kalsifiye kıkırdak ve kıkırdak fazı çalışmalarına yönelik fazların morfolojik yapısı SEM (FEI Quanta 200 FEG) ve elemental içeriği EDAX ile karakterize edilmiştir. **Kemik fazı** oluşturacak gözenekli doku iskelelerinin SEM analizlerini gerçekleştirmek amacıyla, çapraz bağlı ve çapraz bağlı olmayan liyofilizatörde kurutularak hazırlanan yapılar kullanılmıştır. **Kalsifiye kıkırdak** ve **kıkırdak** fazları için hazırlanan jellerin analizinde ise jelleşme işleminden sonra sıvı azota daldırılarak ani dondurulan ve liyofilizatörde kurutulan yapılar kullanılmıştır. Kesitleri alınan yapılar altın/palladyum ile kaplama işlemi ardından farklı büyütmelerde SEM-EDAX (FEI Quanta 200 FEG) ile analizlenmiştir.

4.6.3. MEKANİK ÖZELLİKLER

Osteokondral doku ünitesini oluşturan **kemik**, **kalsifiye kıkırdak** ve **kıkırdak** fazlarına ait doku iskelelerinin ve jellerin mekanik dayanımı sıkıştırma testleri (Zwick/Roell Z-250) ile analiz edilmiştir. Yapılan analiz öncesinde örnekler, PBS (pH:7.4) içerisinde 37°C'de hidrate edilmiştir. Elde edilen gerilim-gerinim eğrilerinin doğrusal bölgesinden sıkıştırma modül değerleri hesaplanmıştır. Fazları oluşturacak doku iskelelerinin ve jellerin analizinde uygulanan ön kuvvet (*pre-load*) 0,05 N ve basma hızı 2 mm dak⁻¹ olarak ayarlanmıştır. Çapraz bağlama işlemi sonrası mekanik dayanımdaki artış Eşitlik 4.1 kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\% \text{Artış} = \frac{(E_{\text{son}} - E_{\text{ilk}})}{E_{\text{ilk}}} \times 100 \quad (4.1)$$

4.6.4. REOLOJİK ANALİZLER

Osteokondral doku ünitesinin **kalsifiye kıkırdak** ve **kıkırdak** fazlarını oluşturan jel yapıların reolojik davranışı Thermo-Haake Modular Advanced Rheometer sistemi (MARS) ve 20 mm çapına sahip paralel plakalar kullanılarak 25 °C'de analiz edilmiştir. Jel formundaki örneklerin viskoelastik davranışının incelenmesi ve doğrusal viskoelastik bölgenin tespit edilebilmesi amacıyla öncelikle sabit frekansta (1 Hz), % 1x10⁻⁴–0.1

deformasyon aralığında deformasyon (gerinim, γ) taraması testleri gerçekleştirilmiştir. Doğrusal viskoelastik bölgenin gözlendiği deformasyon oranı (LVR) tespit edildikten sonra 0,01-10 Hz'lik frekans aralığında frekans tarama testleri uygulanarak jellerin elastik modül (depo modülü, G') ve viskoz modülü (kayıp modül, G'') değerlerinin salınımlı frekans ile değişimi belirlenmiştir. Hidrojellerin vizkozite değişimine göre jelleşme sıcaklığını ve zamanını belirlemek amacıyla chi/coll II/nHA 50:50 bileşimindeki jel seçilmiştir. Jelleşme sıcaklığını belirlemek amacıyla chi/coll II/nHA 50:50 süspansiyonuna 32 ila 38 °C sıcaklık aralığında 35 mm'lik plaka-plaka sisteminde 1 °C/dak. hızında sıcaklık taraması yapılmıştır. Jelleşme sıcaklığının belirlenmesinden sonra, viskozite değişiminin ölçülmesiyle jelleşme zamanı belirlenmiştir. Elde edilen değerlerden kayıp tanjant değeri ($\tan\delta$), çapraz bağlar arası ortalama molekül ağırlığı (M_c) and gözenek boyutu (ξ) parametreleri Eşitlik 4.2, 4.3 ve 4.4 kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\tan\delta = \frac{G''}{G'} \quad (4.2)$$

$$M_c = \frac{c\rho RT}{G'_p} \quad (4.3)$$

$$\xi = \left(\frac{G' N_A}{RT} \right)^{-1/3} \quad (4.4)$$

Bu eşitliklerde T, sıcaklık (298 K), R, modülün tespit edildiği gaz sabiti (8,3143 J mol⁻¹ K⁻¹) ve polimer derişimi (c, % w/v), G'_p , G'' 'nin en yüksek değeri ve N_A , Avogadro sabitidir (86).

4.6.5. MİKRO-BİLGİSAYARLI TOMOGRAFİ (μ -CT) İLE 3-BOYUTLU (3B) GÖRÜNTÜLEME VE GÖZENEKLİLİK ANALİZİ

Kemik, kalsifiye kıkırdak ve kıkırdak fazlarına ait doku iskelelerinin ve jellerin gözeneklilik değerleri μ -CT analizleri ile belirlenmiştir. Analizler yüksek çözünürlüklü

Micro-CT (Bruker Skyscan 1275, Belçika) sistemi ile gerçekleştirilmiştir. Örnekler 120 mA akım, 32kV voltaj ve 0.5 mm Al/Cu filtre varlığında 9.2 µm çözünürlükte, 360° rotasyonla 0.2° basamak aralığında taranmıştır. Kantitatif ölçümler Nrecon 3D yazılımı (ver 1.6.10.4, Skyscan, Belçika) kullanılarak yapılmıştır. Yapılan analizler sonucunda, örneğin birim hacminde bulunan toplam gözeneklilik, açık gözenek yüzdesi ve içsel bağlantılılık değerleri belirlenmiştir.

4.6.6. SU TUTMA KAPASİTESİ

Kemik, kalsifiye kıkırdak ve kıkırdak fazlarına ait şişme davranışı ve denge su içeriği değerlerinin saptanması amacıyla şişme deneyleri gerçekleştirilmiştir. Deneyler PBS (pH:7.4) ortamında 37° C'de gerçekleştirilmiş ve % su tutma kapasitesi değerleri ıslak bazda Eşitlik 4.5 kullanılarak hesaplanmıştır (87).

$$\% \text{ Denge su içeriği} = \frac{(W_{\text{Islak}} - W_{\text{kuru}})}{W_{\text{kuru}}} \times 100 \quad (4.5)$$

Bu eşitlikte W_{kuru} yapıların kuru ağırlığı W_{Islak} ise yapıların denge şişmedeki ağırlığını ifade etmektedir.

4.6.7. ÇÖZÜNME TESTİ

Subkondral kemik, kalsifiye kıkırdak ve kıkırdak fazlarına ait doku iskeleleri ve jellerin yapısal kararlılığını değerlendirmek amacıyla 37 ° C'de 5 ml PBS'de (pH 7.4) ortamında bırakılmış ve 28 gün sonunda kütle kaybı gravimetrik olarak tayin edilmiştir. Yapılar 2 mm kalınlığında hazırlanmış ve analizin öncesinde tartılmıştır. Tampon çözeltisindeki örnekler 1., 7., 14. ve 28. günlerde çıkarılmış ve PBS tuzları kalmayana kadar yıkanmıştır. Yıkama işlemi sonrası örnekler 37 ° C'de kurutulularak tartılmıştır. Son olarak, yüzde ağırlık kaybı Eşitlik 4.6 kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Kütle kaybı} = \frac{(W_i - W_f)}{W_i} \times 100 \quad (4.6)$$

Bu eşitlikte, W_i örneklerin ilk ağırlığı, W_f ise örneklerin son ağırlığıdır.

4.6.8. SUBKONDRAL FAZ DOKU İSKELELERİNDEN KOLLAJEN SALIMININ İNCELENMESİ

Kollajen içeren **kemik fazı** doku iskelelerinden kollajen tip I salımı modifiye Bradford analizi ile saptanmıştır (88). Analizde kullanılan Bradford çözeltisi Coomassie Brilliant Blue G-250 boyasının %15 (v/v) metanol ve %55 (v/v) fosforik asitte çözülmesi ve distile su ile seyreltilmesiyle hazırlanmıştır. Analizde kullanılacak doku iskeleleri 37°C’de PBS (pH:7.4) ortamına alınmış ve belirli aralıklarda (7, 14, 21 ve 28. günler) salım ortamından alınan süpernatantlara Bradford çözeltisi ilave edilmiştir. Bradford çözeltisinin kollajen ile etkileşimini arttırmak amacıyla reaksiyon ortamına sodyum dodesil sülfat eklenmiştir. Elde edilen çözeltilerin 595 nm’de UV absorbands değeri ölçülmüş ve bilinen kollajen derişimleri ile hazırlanan standart kalibrasyon grafiğı kullanılarak doku iskelelerinden ortama salınan kollajen miktarı belirlenmiştir.

4.7. OSTEOKONDRAL DOKU ÜNİTESİNİ OLUŞTURAN FAZLAR İLE GERÇEKLEŞTİRİLEN HÜCRE KÜLTÜR ÇALIŞMALARI

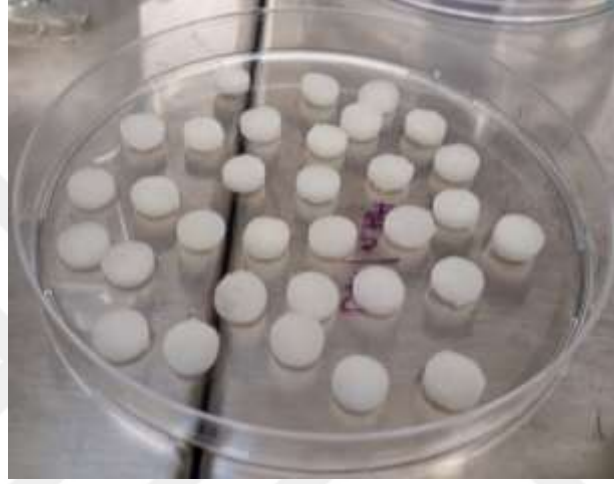
Tez kapsamında **kemik fazı** için fare preosteoblastik hücre hattı olan MC3T3-E1(Riken, Japonya) hücreleri %10 (w/v) FBS ve %1 (w/v) penisillin-streptomisin içeren α -MEM besi ortamı kullanılarak 37°C’de %95 neme ve %5 CO₂’ye sahip inkübatörde (Thermo Scientific, Heracell 150i) kültürlenmiştir.

Kalsifiye kıkırdak ve kıkırdak fazı için fare kıkırdak öncül hattı olan ATDC5 (Riken, Japonya) hücreleri kullanılmış olup %5 FBS, %1 penisillin-streptomisin içeren DMEM-F12 besi ortamı kullanılarak 37°C’de %95 nem ve %5 CO₂ ortamına sahip inkübatörde (Thermo Scientific, Heracell 150i) kültürlenmiştir. Tüm hücre kültür çalışmaları Laminar akışlı kabin (Bioair, Type II Laminar Flow Cabinet, İtalya) altında gerçekleştirilmiştir.

4.7.1. SUBKONDRAL KEMİK FAZI İLE GERÇEKLEŞTİRİLEN HÜCRE KÜLTÜR ÇALIŞMALARI

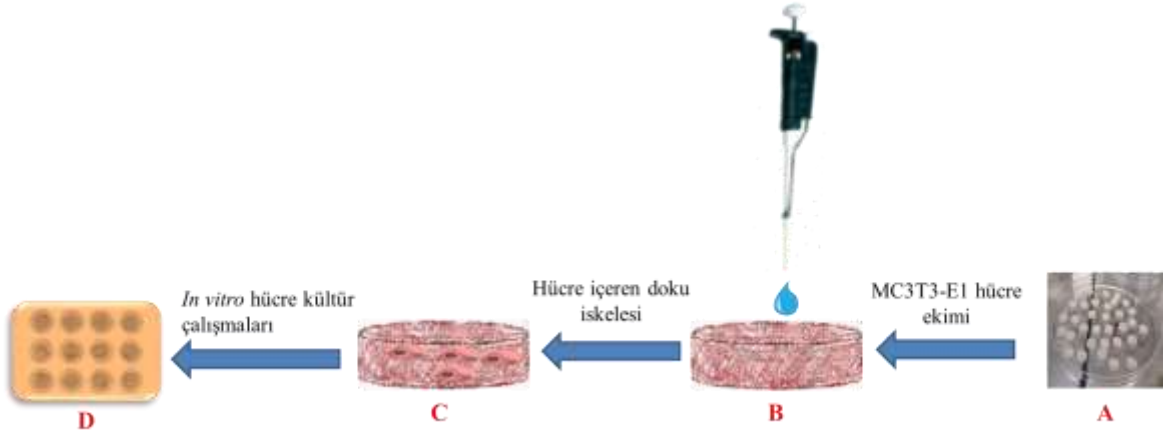
Dondurarak kurutma yöntemi ile hazırlanan doku iskelelerinin subkondral kemik fazında kullanılabilirliğinin araştırılması amacıyla yürütülen hücre kültürü çalışmalarında MC3T3-E1 (Riken, Japonya) hücreleri kullanılmıştır. Karakterizasyon çalışmaları sonucunda en uygun özelliklere sahip üç farklı grup doku iskeleleri seçilmiş ve hücre

kültür çalışmalarına dahil edilmiştir. Bu doku iskeleleri; **chi/nHA-kf**, **glioksal-chi80/coll20/nHA** ve **glioksal-chi50/coll50/nHA** doku iskeleleridir. Çalışmalar parafilm kaplı 24 gözlü Petrilerde (Costar, ABD) gerçekleştirilmiştir. Hücre kültür çalışmaları öncesinde doku iskelelerinin (10mmx2mm) sterilizasyon işlemi, %100 (v/v) etanol içerisinde 24 saat bekletilerek ve ardından 60 dak. UV altında gerçekleştirilmiştir. Ardından, doku iskeleleri DPBS (15 dak.) ve besi ortamı (15 dak.) içerisinde bekletilerek 3'er kez yıkanmıştır (Şekil 4.5). Son olarak, doku iskeleleri CO₂ etüvünde serumlu kültür ortamı (koşullandırılmış ortamı) içerisinde 30 dakika süre ile bekletilmiştir.



Şekil 4.5. Hücre kültür çalışmaları kullanılan sterillenmiş doku iskelelerinin (10mmx2mm) görüntüleri

MC3T3-E1 hücreleri, doygunluk tabakasına ulaştıktan sonra tripsin/EDTA çözeltisiyle yüzeyden kaldırılmış ve 1:1 (v:v) oranında besi ortamı eklenerek santrifüjlenmiştir. Dibe çökmüş olan hücreler tekrar taze besi ortamında süspanse edilerek hemositometrik sayım gerçekleştirilmiştir. Sayım sonrası, hücre yoğunluğu 1×10^5 hücre/doku iskelesi olacak şekilde 50 µl hacim ile hücre ekimi gerçekleştirilmiştir. Hücrelerin doku iskelelerine tutunmasını sağlamak amacıyla CO₂ etüvünde 2 saat bekletildikten sonra besi ortamı eklenerek kültüre devam ettirilmiştir. Kültürün bir sonraki gününde besi ortamı uzaklaştırılarak farklılaşma ortamı (α -MEM içerisine % 10 FBS, %1 penisilin streptomisin, 50 µg/ml askorbik asit ve 10 mM gliserol fosfat) eklenmiş ve inkübasyona devam edilmiştir (Şekil 4.6).

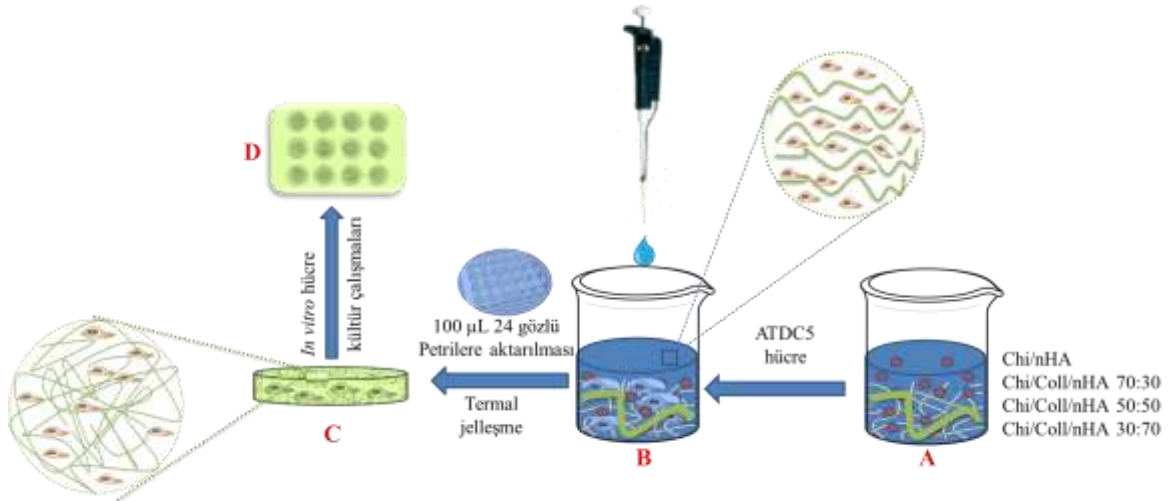


Şekil 4.6. Subkondral kemik fazına ait *in-vitro* hücre kültür çalışmalarının şematik gösterimi.

4.7.2. KALSİFİYE KIKIRDAK VE KIKIRDAK FAZ JELLERİ İLE GERÇEKLEŞTİRİLEN ÇALIŞMALAR

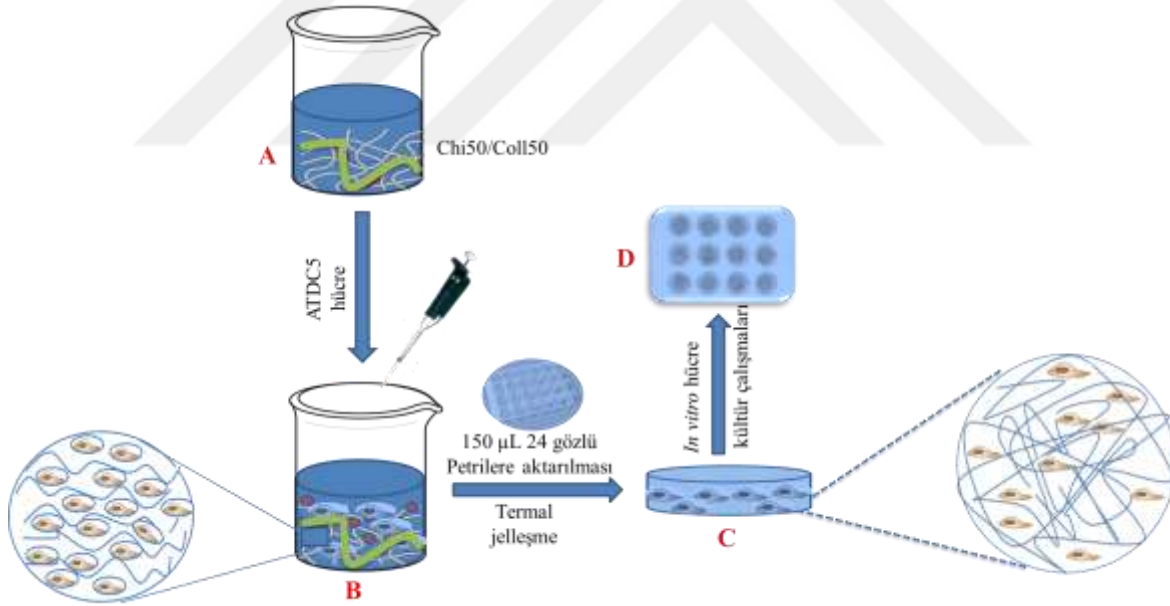
Çalışmalarda, jellerin hazırlanmasında kullanılan kitosan etilen oksit altında (Erna, EE0003TP) sterillemiştir. Kullanılan çapraz bağlayıcı çözeltileri 0,22 μm 'lik filtrelerden geçirilerek sterillemiştir. Bölüm 4.4 ve 4.5'de açıklanan şekilde hazırlanan kalsifiye kıkırdak ve kıkırdak fazını oluşturan süspansiyonların 1 mL'sine 1×10^7 ATDC5 hücresi eklenerek hafifçe karıştırılmıştır. Bu karışımdan kalsifiye kıkırdak ve kıkırdak fazları için sırasıyla 100'er ve 150'şer μL alınarak 1 cm çapındaki plastik kalıplara aktarılmıştır. Örnekler 30 dakika süreyle 37°C'de bekletilerek hücre içeren süspansiyonların jelleşmesi sağlanmıştır.

Kalsifiye kıkırdak fazını oluşturacak olan jeller 24 gözlü Petri kaplarına aktarılmış ve üzerlerine %1 (v/v) ITS, %1 (v/v) pen-strep, %5 (v/v) FBS ve 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ askorbik asit içeren DMEM-F12 besi ortamı eklenmiştir (14) (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. Kalsifiye kıkırdak fazına ait in-vitro hücre kültür çalışmalarının şematik gösterimi.

Kıkırdak fazını oluşturacak olan jellerin üzerine ise %1 (v/v) ITS, %1 (v/v) pen-strep, %5 (v/v) FBS içeren besi DMEM-F12 ortamları eklenmiş ve kültürlerine devam edilmiştir (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. Kıkırdak fazına ait in-vitro hücre kültür çalışmalarının şematik gösterimi.

4.7.3. PRESTOBLUE ANALİZİ İLE HÜCRE ÜREMESİNİN TAKİBİ

Resazurin bazlı Presto Blue ile üreme analizi, kemik fazda hücre ekiminden, kalsifiye kıkırdak ve kıkırdak fazlarında ise hücre enkapsülasyonundan sonra 1, 3, 5, 7, 14 ve 21. günlerde gerçekleştirilmiştir. Belirlenen günlerde, kültür ortamı uzaklaştırılıp yerine kültür ortamında seyreltilmiş Presto Blue çözeltisi (% 10, v/v) eklenmiş ve 37°C’de 2 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından mikropłaka okuyucuda (Raito, Kore) 570 nm’de UV absorbans değeri okunmuştur (89).

4.7.4. HÜCRE CANLILIK (LIVE/DEAD) ANALİZİ

Jel formundaki **kalsifiye kıkırdak** ve **kıkırdak** fazlarında üremekte olan ATDC5 hücrelerin canlılık tayini Live/Dead analizi ile belirlenmiştir. Kültürün 7. gününde besi ortamı uzaklaştırılmış ardından örnekler 4µM calcein AM ve 2µM ethidium homodimer içeren DPBS içerisinde oda sıcaklığında 30 dak. süreyle inkübe edilmiştir. DPBS tamponu ile yıkama işleminin ardından örnekler konfokal mikroskopu altında (Zeiss, LSM 510, Almanya) farklı büyütmelede gözlemlenmiştir.

4.7.5. DNA ANALİZİ

Kemik, kalsifiye kıkırdak ve kıkırdak fazlarının DNA miktar tayini Picogreen® kullanılarak kültürün 7., 14. ve 21. günlerinde floresan spektrofotometresi ile indirekt olarak belirlenmiştir. **Kemik fazına** ait doku iskeleleri, 1mL Tris-EDTA çözeltisinde 37°C’de 2 saat süre bekletilerek liziz işlemi gerçekleştirilmiştir. Liziz çözeltisinden 100 µL 96 gözlü Petrilere aktararak üzerine 100 µL PicoGreen (Quant-IT) reaktifi eklenmiş ve 10 dak. süreyle oda sıcaklığında karanlıkta inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından floresan mikro plaka okuyucuda (Varian, ABD) 480 nm uyarma, 520 nm emisyon dalga boylarında floresan ışıması okunmuştur (90).

Kalsifiye kıkırdak ve kıkırdak fazlarını oluşturan jel yapılarında DNA miktarı kültürün 7., 14. ve 21. günlerinde yine floresan spektrofotometresi ile indirekt yolla belirlenmiştir. DPBS içerisinde yıkanan jeller 16 saat boyunca 65 ° C’de ve pH 7.3’te 500 µL 600 mg protein/mL papain çözeltisi (20mM L-sistein, 0.1 M sodyum-asetat ve 50 mM EDTA) içinde lizis edilerek DNA’nın çözeltiye geçmesi sağlanmıştır. Elde edilen süpernatant, 96 gözlü Petri kabının her gözüne 25 µl aktarıldıktan sonra üzerine 175 µL Picogreen®

çözeltisi eklenmiştir. Inkünasyonun (10 dak.) ardından floresan ışıması bir mikropilaka okuyucu (Varian, Cary Eclipse, ABD) ile sırasıyla 485 nm ve 535 nm uyarma ve emisyon dalga boylarında ölçülmüştür. Liziz sonrası elde edilen aynı süpernatant, glikozaminoglikan ve toplam kollajen içerik tayininde de kullanılmıştır.

4.7.6. GLİKOZAMİNOGLİKAN (GAG) ANALİZİ

Glikozaminoglikanlar (GAG), kıkırdak dokusuna özgü bileşenlerdir (91). Glikozaminoglikan içeriği, 1,9-dimetilmetilen mavisi (DMMB) bağlanma deneyi kullanılarak belirlenmiştir. Kültürün 7. 14. ve 28. günlerinde Bölüm 4.7.5'te açıklanan şekilde elde edilen liziz çözeltileri üzerine 250 µL DMMB çözeltisi eklenmiştir. Karışım 5 saniye karıştırıcıda karıştırıldıktan sonra absorbans değeri bir mikropilaka okuyucu (BioTek, ABD) kullanılarak 525 nm'de tayin edilmiştir. Kondroitin sülfat, standart bir eğri oluşturmak için kullanılmış ve GAG konsantrasyonları bu eğriye göre belirlenmiştir.

4.7.7. KOLLAJEN İÇERİĞİ ANALİZİ

Kültürün 7. 14. ve 28. günlerinde, toplam kollajen içeriği kolorimetrik hidroksiprolin miktar tayini ile belirlenmiştir. Hidrolizasyon için 90 µl 10 N NaOH çözeltisine 10 µl Bölüm 4.7.5'te elde edilen liziz çözeltileri ilave edilmiş ve 30 dakika boyunca 125 ° C'de tutulmuştur. Sonrasında, 50 µl hidroliz çözeltisi alınmış ve 450 µl 56 mM Chloramine T çözeltisi eklenmiştir. Oda sıcaklığında oksidasyon reaksiyonunun tamamlanmasından sonra, 500 µL Ehrlich reaktantı ilave edilmiş ve 65 °C'de 25 dakika süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası absorbans değeri, bir mikropilaka okuyucu (BioTek, ABD) kullanılarak 550 nm'de tespit edilmiştir. Kalsifiye kıkırdak ve kıkırdak fazına ait jellerde kollajen içeriği hücre içermeyen hidrojellere göre normalize edilmiştir.

4.7.8. TARAMALI ELEKTRON MİKROSKOBU (SEM) İLE HÜCRE MORFOLOJİSİNİN İNCELENMESİ

Subkondral kemik fazına ait doku iskeleleri (**chi/nHA-kf**, **glioksal-chi80/coll20/nHA** ve **glioksal-chi50/coll50/nHA**) üzerinde üreyen MC3T3-E1 hücrelerin morfolojik yapıları SEM (FEI Quanta 200 FEG) ile görüntülenmiştir. Kültürün 7. ve 14. günlerinde doku iskeleleri üzerindeki besi ortamı uzaklaştırılmış ve %2.5'luk glutaraldehit içerisinde oda sıcaklığında 30 dk süre ile bekletilerek hücreler fikslenmiştir. SEM analizinden önce DPBS

ile yıkanan örnekler sırasıyla %30, %50, %70, %90 (v/v) ve mutlak etanol çözeltilerinde 3'er dak. bekletilerek dehidrasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Ardından örnekler 400 µL hekzametildisilazan (HMDS) içerisinde 5 dak. bekletilmiş ve oda sıcaklığında kurutulduktan sonra altın-palladyum ile kaplanmış ve SEM (FEI Quanta 200 FEG) görüntüleri alınmıştır (92).

4.7.9. KALSİYUM TAYİNİ

Subkondral kemik fazına ait MC3T3-E1 hücrelerini içeren üç farklı **chi/nHA-kf**, **glioksal-chi80/coll20/nHA** ve **glioksal-chi50/coll50/nHA** doku iskelesindeki mineralizasyonunu tayin etmek amacıyla kalsiyum analizi gerçekleştirilmiştir. Kültürün 14. ve 21. günlerinde doku iskeleleri 3 kez DPBS ile yıkanmış ve 10 dak. süreyle %4 (w/v) paraformaldhit içerisinde alınarak fiksasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Ardından 30 dakika boyunca 37°C'de 40 mM Alizarin red (ARS) ile boyama işlemi gerçekleştirilmiştir. Deiyonize su ile 5'er kez 5'er dak. yıkamanın ardından 1 saat süreyle setilpiridinyum klorür içerisinde boya desorbe edilmiş ve elde edilen çözeltinin absorbansı UV spektrofotometresi (Thermo Scientific, ABD) kullanılarak 540 nm'de okunmuştur (93).

4.7.10. ALKALİN FOSFOTAZ (ALP) AKTİVİTESİ

Subkondral kemik farklılaşması ve **kalsifiye kıkırdak** için kalsifikasyonun önemli belirteçlerinden olan ALP aktivitesi incelenmiştir (94). Bu amaçla, kültürünün 7., 14. ve 21. günlerinde doku iskeleleri üzerindeki kültür ortamı uzaklaştırılmış ve iskeleler 1 mL DPBS ile yıkanmıştır. Ardından kemik doku iskeleleri ve kalsifiye kıkırdak fazına ait jel örnekleri liyofilizatörde kurutulmuş ve 250 µL %0,2 Triton-X ile muamele edilmiştir. Sonrasında, 4°C'de 12 000 rpm'de 10 dakika süre ile santrifüjlenmiş ve 50 µL Triton çözeltisi 125 µL ALP çözeltisi (1 mM MgCl₂ ve 56 mM 2-amino-2-metil-1-propanol içeren p-nitrofenil fosfat (10 mL) sıvı substrat sistemi) ile 37°C'de 30 dakika süreyle inkübe edilmiştir. Oluşan tepkime 2.5 M NaOH ilave edilerek durdurulmuştur. Ardından 405 nm'de süpertanatın absorbans değerleri mikropilaya okuyucusunda (Raito, Kore) belirlenmiştir (47,57).

4.7.11. HİDROJELLERDE KONTRAKSİYON

ATDC5 hücrelerini içeren hidrojeller farklı zaman dilimlerinde (7, 14, 21 ve 28 günler) fotograflanmış ve jel alanındaki değişim izlenmiştir (n=3) (85,95). %Kontraksiyon hesaplaması aşağıda verilen kullanılarak hesaplanmıştır (Eşitlik 4.7).

$$\%Kontraksiyon = \frac{(A_0 - A_f)}{A_0} \times 100 \quad (4.7)$$

A_0 jelin ilk andaki alanı, A_f jelin belirli günlerden sonraki alanı ifade etmektedir.

4.7.12. EŞ ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (QRT-PCR) ANALİZİ

MC3T3-E1 hücrelerinin kitosan, kollajen tip I ve nanohidroksiapatit varlığında **kemik** doku iskeleleri üzerindeki farklılaşmasını tayin etmek amacıyla kültürün 14.günü chi/nHA-kf, glioksal-chi80/Coll20/nHA ve glioksal-chi50/coll50/nHA doku iskelerinde üreyen hücrelerin ALP, kollajen I, osteokalsin ve osteopontin ekspresyon seviyeleri RT-PCR (Light Cycler® Nano, Roche, İsviçre) ile saptanmıştır. **ATDC5** hücrelerinin farklılaşmasını değerlendirmek amacıyla **kalsifiye kıkırdak** ile ilişkili hipertrofik genlerin (Col10a1, Runx2 ve Mmp13) kültürün 7., 14. ve 21.günlerinde ekspresyon seviyeleri araştırılmıştır. MC3T3-E1 ve ATDC5 hücrelerini içeren osteokondral doku ünitelerinde ise ALP, MMP-13, Coll I, Coll II ve Coll X ekspresyon seviyeleri kültürün 14 ve 21. günlerinde tayin edilmiştir. RT-PCR analizi için toplam mRNA ekstraksiyonu, genişletilmiş çözücü saflaştırma yöntemi kullanılarak yapılmıştır (96). Kısaca, hidrojeller küçük parçalar haline getirilmiş ve buz banyosunda 3 kez 1 ml trizol reaktifi içinde sonikleştirilmiştir. Daha sonra 200 µL kloroform ilave edilmiş ve 12.000 rpm'de 15 dakika süreyle 4°C'de santrifüjlenmiştir. Süpernatant toplandıktan sonra, 500 µL fenol:kloroform:izoamil (25:24:1) eklenmiş ve 15 dakika boyunca 12,000 rpm'de 4 ° C'de santrifüjlenmiştir. Üst sulu faz toplanmış, daha sonra 500 µL kloroform izoamil alkol (49: 1) eklenmiş ve 4 ° C'de 12,000 rpm'de 15 dakika santrifüjlenmiştir. Elde edilen süpernatanta 500 µL izopropanol (% 100) eklenmiş ve tekrar 12,000 rpm'de santrifüjlenmiştir. Süpernatant atılmış ve RNA topağı, 4 ° C'de 500 µL% 75 etanol ile yıkanmıştır. Toplam RNA miktarı Nanodrop (NanoDrop 1000 Spektrofotometre V3.7, Thermo Fisher Scientific Inc, ABD) kullanılarak tayin edilmiştir.

cDNA sentezi, izole edilen 500 ng RNA ile Applied Biosystems cDNA Kit (ABD) (Katalog no: 4368814) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kısaca, cDNA sentezi, thermal cyclers (Bio-rad) kullanılarak 4 basamaklı sıcaklık döngüsünde; 25 °C’de 10 dak., 37 °C’de 120 dak., 85 °C’de 5 dak. ve 4 °C’de ∞ şeklinde gerçekleştirilmiştir. cDNA sentezi sonrası elde edilen 20 µl’lik cDNA çözeltisi 100 µl’ye seyreltilmiştir. Daha sonra, kantitatif eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) FirePol® EvaGreen® qPCR Mix Plus (Estonya) kiti kullanılarak LightCycler® Nanoinstrument (Roche, Almanya) cihazında gerçekleştirilmiştir. Analiz, cDNA ve forward-reverse primerlerin varlığında, aktivasyon basamağı 95 °C’de 12 dak., uzatma basamağı 95 °C’de 15 s, 60 °C’de 30 s, 72 °C’de 30 s ve ayrılma basamağı 95 °C’de 10 s, 65 °C’de 1 dak. olmak üzere 40 döngüde gerçekleştirilmiştir.

Gerçekleştirilen çalışmalarda “Housekeeping gen” olarak kemik ve kalsifiye kıkırdak fazları için sırasıyla stabil olan Hipoksantin Guanin Fosforibozil Transferaz (HPRT) ve peptidilprolil izomeraz A (PPIA) genleri kullanılmıştır. **Kemik** ve **kalsifiye kıkırdak** fazı çalışmalarında kullanılan tüm genlerin primer dizileri (BM labosis, Türkiye) Çizelge 4.2’de ayrıntılı olarak verilmiştir.

Çizelge 4.2. Subkondral kemik ve kıkırdak farklılaşmasının incelenmesinde kullanılan primer dizileri.

Kemik farklılaşmasında kullanılan genler		
Genler	Forward primer	Reverse primer
HPRT	CTGGTGAAAAGGACCTCTCGAA	CTGAAGTACTCATTATAGTCAAGGGCAT
COL I	ATGCCGCGACCTCAAGATG	TGAGGCACAGACGGCTGAGTA
ALP	CACCTTGACTGTGGTTACTGCTG	CTTCTTGTCCTGTGCTGCTCAC
Runx2	ACCAGATGGGACTGTGGTTA	AAGGTGAAACTCTTGCCTCG
Osteokalsin (OC)	AAGCAGGAGGGCAATAAGGT	TTAGGGCAGCACAGGTCCTA
Osteopontin (OPN)	CACTTTCACTCCAATCGTCCCTAC	ACTCCTTAGACTCACCGCTCTTC
Kalsifiye kıkırdak farklılaşmasında kullanılan genler		
PPIA	CGCGTCTCCTTCGAGCTGTTTG	TGTAAAGTCACCACCCTGGCACAT
RunX2	ACCAGATGGGACTGTGGTTA	AAGGTGAAACTCTTGCCTCG
COL X	GTTCTTGACCCTGGTTCATGG	TCCTCTTACTGGAATCCCTTTACT
MMP-13	GTGACTTCTACCCATTTGATG	AAACAAGTTGTAGCCTTTGG

4.7.13. AGARUZ JEL ELEKTROFOREZİ

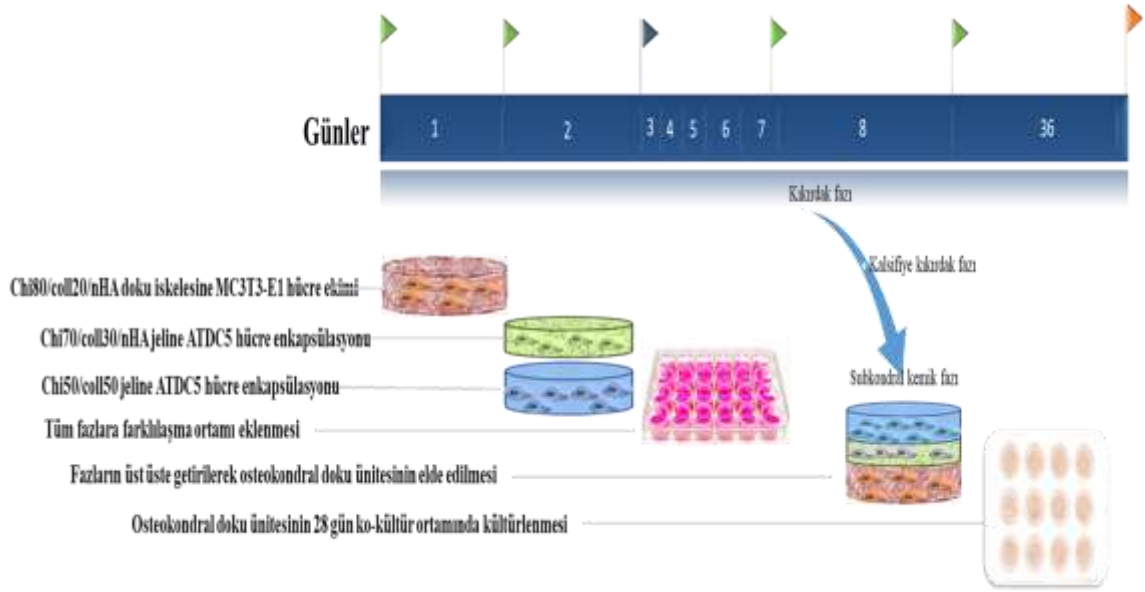
RT-PCR sonrası elde edilen DNA örneklerin nitel analizi %2'lik agaroz jelde görünür hale getirilmiş ve DNA örneğinin bütünlüğü belirlenmiştir. Bunun için hazırlanan %2'lik agaroz jele 5 µl DNA ve 5 µl 6x Loading Dye ile karıştırılarak jele yüklenmiş ve 100 voltta 30 dakika yürütülmüştür. Ardından jel UV görüntüleme sistemi (Syngene Gene Genius Bio Imaging System) kullanılarak görüntülenmiştir.

4.7.14. HİSTOLOJİK ÇALIŞMALAR

Subkondral kemik, kalsifiye kıkırdak ve kıkırdak fazlarında üreyen hücrelerin yapıdaki dağılımı, glikozaminoglikan ve toplam kollajenlerin birikimlerini belirlemek amacıyla histolojik boyamalar yapılmıştır. Çalışmalarda kültürün 28. gününde DPBS ile yıkandıktan sonra %10 (v/v) formalinde fikslenmiş örnekler kullanılmıştır. Fiksleme işleminin ardından örnekler etanol serisinden (%70, %95 ve %100) ve ksilende 30'ar dak. geçirilerek dehidrasyon işleminden sonra parafine içine gömülerek 1 gece bekletilmiştir. Parafine gömülü örneklerden mikrotom kullanılarak 8 µm'lik kesitler alınmıştır. Bu şekilde elde edilen kesitler, ksilen ve etanol serisinden geçirilerek deparafinizasyon işlemi gerçekleştirildikten sonra Hemotoksilen-Eozin, Masson's trichrome Alcian blue, Picrosirius red ve Alizarin red ile histolojik boyamalar gerçekleştirilmiştir. Boyama işlemlerinde uygulanan basamaklar EK 8'de verilmiştir.

4.8. ÇOK FAZLI GRADYAN YAPIDA OSTEOKONDRAL DOKU ÜNİTESİNİN ÜRETİMİ

Osteokondral doku ünitesinin üretiminde doğal dokunun bileşenleri ve özellikleri göz önünde bulundurularak biyomimetik olarak fazların oluşturulmasında optimum bileşenler ve koşullar belirlenmiştir. Osteokondral doku ünitesinin elde edilmesinde subkondral kemik fazı için Bölüm 4.3'te anlatıldığı gibi üretilen **chi80/coll20/nHA**, kalsifiye kıkırdak fazında Bölüm 4.4'te anlatılan **chi/coll II/nHA 70:30** ve kıkırdak fazı için de Bölüm 4.5'te üretilen **chi50/coll50** yapıları seçilmiştir. Her fazın üretimi sonrasında fazlar kitosan bazlı jellerin biyo-yapışma özelliği kullanılarak üst üste getirilerek birleştirilmiş ve osteokondral doku ünitesi elde edilmiştir (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. Osteokondral doku ünitesinin üretimine yönelik gerçekleştirilen deneysel basamakların şematik gösterimi.

4.8.1. ÇOK FAZLI GRADYAN OSTEOKONDRAL DOKU ÜNİTESİNİN KARAKTERİZASYONU

Osteokondral doku ünitesine ait karakterizasyonu çalışmaları kapsamında Bölüm 4.6.1, Bölüm 4.6.3 ve Bölüm 4.6.4’de detaylı olarak anlatılan sırasıyla SEM, μ -CT ve mekanik analizleri uygulanmıştır.

4.8.2. MC3T3-E1 VE ATDC5 HÜCRELERİNİ İÇEREN OSTEOKONDRAL DOKU ÜNİTESİNİN ÜRETİMİ

Tez çalışmasının son kısmında fazlara spesifik MC3T3-E1 (preosteoblast) ve ATDC5 (öncül kıkırdak) hücreleri yüklü çok fazlı gradyan yapıda osteokondral doku ünitesinin *in vitro* hücre ko-kültür çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Subkondral kemik fazı üretimi kısmında seçilmiş olan **chi80/coll20/nHA** doku iskelesi Bölüm 4.6.9’da açıklanan sterilizasyon işleminin ardından Bölüm 4.7.1’de anlatıldığı gibi **MC3T3-E1** hücre ekimi gerçekleştirilmiştir. Besi ortamında 24 saat bekletildikten sonra besi ortamı farklılaşma ortamı (% 10 (v/v) FBS, % 1 (v/v) penisilin-streptomisin, 10 mM β -gliserol fosfat ve 50 μ g / mL askorbik asit ile ilave edilmiş α -MEM) ile değiştirilerek 1 hafta boyunca kültürlenmiştir.

Kalsifiye kıkırdak fazı üretimi kısmında seçilmiş olan **chi/coll II/nHA 70:30** jellerine ve Bölüm 4.7.2’de anlatıldığı gibi **ATDC5** hücre enkapsülasyonu gerçekleştirilmiştir. Petri (24 gözlü) kaplarına aktarılan jeller üzerine %1ITS, %1 pen-strep, %5 FBS ve 50 µg mL⁻¹ askorbik asit içeren DMEM-F12 içeren farklılaşma ortamı eklenerek 1 hafta boyunca kültürlenmiştir (57).

Kıkırdak fazı üretimi kısmında seçilmiş olan **chi/coll 50:50** jellerine ve Bölüm 4.7.2’de anlatıldığı gibi **ATDC5** hücre enkapsülasyonu gerçekleştirilmiştir. Petri (24 gözlü) kaplarına aktarılan jeller üzerine %1ITS, %1 pen-strep ve %5 FBS içeren DMEM-F12 içeren farklılaşma ortamı eklenerek 1 hafta boyunca kültürlenmiştir (57).

Ayrı ayrı 7 gün süre ile kültürü devam ettirilen doku iskelelerinin iteratif olarak birleştirme işlemi gerçekleştirilmiştir. Bunun için öncelikle hücre içeren subkondral kemik fazını oluşturacak olan **chi80/coll20/nHA** doku iskelesi petri kabına alınmış ve sırasıyla jel yapıdaki kalsifiye kıkırdak (**chi/coll II/nHA 70:30**) ve kıkırdak (**chi/coll II 50:50**) fazları üst üste getirilerek birleştirilmiştir. Birleştirme işlemi sonrası elde edilen gradyan yapıdaki ko-kültür besi ortamına (%10 FBS, 1% pensilin/streptomisin ve 50 µg/mL askorbik asit içeren DMEM) besi ortamına alınmış ve 28 gün boyunca kültüre devam edilmiştir (Şekil 4.6).

4.8.3. MTT İLE ÜREME ANALİZİ

Osteokondral doku ünitesinde ko-kültür ortamında üreyen MC3T3-E1 ve ATDC5 mitokondriyal aktiviteleri, belirli kültür sürelerinde (1, 7, 14, 21 ve 28. günlerde), 3-[4,5-dimetiltiyazol-2-il]- difeniltetrazolyum bromür (MTT) ile kantitatif olarak belirlenmiştir. Yapı içerisindeki canlı hücrelerin mitokondrisi tetrazolyum bileşenini indirgeyerek formazan kristallerine dönüştürür ve mor renkli çözelti verir. Süpertanttan okunan absorbans değeri, üremesini devam ettiren canlı hücre miktarı ile doğru orantılı sonuç vermektedir. Analiz için osteokondral doku ünitesinin üzerindeki ko-kültür ortamı uzaklaştırılmış ve üzerlerine 600 µL serumsuz besi ortamı (DMEM) ve 60 µL MTT çözeltisi (2.5 mg mL⁻¹ PBS) eklenmiştir. Ardından, osteokondral doku ünitesi içerisindeki hücreler 3 saat süre ile 37°C’deki etüvde inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonrası, osteokondral doku ünitesi üzerindeki ortam uzaklaştırılmış ve iskeleler başka bir 24 gözlü Petri kabına aktarılmıştır. Her bir göze 400 µL 0.04 M HCl içeren dimetil sülfoksit

(DMSO) çözeltisi ilave edilerek oluşan formazan kristallerinin çözünmesi sağlanmıştır. Mor renkli çözeltiden 200 µL alınarak 570 nm’de mikropilaka okuyucu (Raito, Kore) ile optik yoğunluk belirlenmiştir.

4.8.4. DNA ANALİZİ

MC3T3-E1 ve ATDC5 hücrelerini içeren osteokondral doku ünitesinde kantatif olarak DNA miktar tayini kültürün 7., 14., ve 21.günlerinde papainle liziz edilerek Bölüm 4.7.5’te anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiştir. Bölüm 4.7.5’te anlatıldığı gibi liziz sonrası elde edilen süpernatant osteokondral doku içerisinde üreyen hücreler tarafından üretilen GAG ve toplam kollajen içerik tayininde de kullanılmıştır.

4.8.5. GLİKOZAMİNOGLİKAN (GAG) ANALİZİ

Kültürün 7., 14., ve 28. günlerinde osteokondral doku ünitesinde üremekte olan hücreler tarafından sentezlenen GAG üretiminin tayini Bölüm 4.7.6’da anlatıldığı gibi yapılmıştır.

4.8.6. TOPLAM KOLLAJEN İÇERİĞİ ANALİZİ

Osteokondral doku ünitesinde toplam kollajen üretimi Bölüm 4.7.7’de anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir. Kollajen içeriği hücre içermeyen osteokondral doku ünitesine göre normalize edilmiştir.

4.8.7. ALKALİN FOSFOTAZ (ALP) AKTİVİTESİ

Mineralizasyonun önemli belirteçlerinden olan osteokondral doku ünitesine ait ALP aktivitesi testi Bölüm 4.7.10’da anlatıldığı gibi yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar aynı kültür günlerine ait DNA miktarına bölünerek normalize edilmiştir.

4.8.8. QRT-PCR ANALİZİ İLE GEN EKSPRESYON ANALİZİ

MC3T3-E1 ve ATDC5 hücrelerini içeren osteokondral doku ünitesinin gen ekspresyonu Bölüm 4.7.12’de anlatıldığı gibi qRT-PCR analizi ile kültürün 14. ve 21.günlerinde Col I, Col II, Col X, Mmp-13 ve ALP gen ifadeleri ile saptanmıştır. “Housekeeping gen” olarak her iki hücre için stabil gen olan HPRT kullanılmıştır. Primerlere ait diziler Çizelge 4.3’te verilmiştir.

Çizelge 4.3. Osteokondral doku ünitesinde farklılaşmanın incelenmesinde kullanılan primer dizileri.

Genler	Forward primer	Reverse primer
HPRT	CTGGTGAAAAGGACCTCTCGAA	CTGAAGTACTCATTATAGTCAAGGGCAT
COL I	ATGCCGCGACCTCAAGATG	TGAGGCACAGACGGCTGAGTA
COL II	CAATCCTGGTGAACCTGGCG	TTTCCCCAGACTTTCCGGGC
COL X	GTTCTTGACCCTGGTTCATGG	TCCTCTTACTGGAATCCCTTTACT
MMP-13	GTGACTTCTACCCATTTGATG	AAACAAGTTGTAGCCTTTGG
ALP	CACCTTGACTGTGGTTACTGCTG	CTTCTTGTCCTGTGCTGCTCAC

4.8.9. HİSTOLOJİK ANALİZ

Osteokondral doku ünitesine ait histolojik çalışmalar Bölüm 4.7.13’de anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir. Parafine gömülü doku ünitelerinden 8 µm’lik kesitler alınarak Hemotoksilen-Eozin, Mason’s trichome, Alcian blue, Picrosirius red ve Alizarin red ile histolojik boyamalar gerçekleştirilmiştir.

4.8.10. İMMÜNHİSTOKİMYASAL ANALİZ

Kollajen tip I (sc-59772, Santa Cruz), kollajen tip II (sc-52658, Santa Cruz) ve kollajen tip X (sc-59954, Santa Cruz) monoklonal antikorlar için sekonder görüntüleme cihazı (Ventana Benchmark automated immunostainer) ile immünhistokimyasal boyamalar yapılmıştır. Kısaca, birincil antikorlar gece boyunca % 5 (v/v) keçi serumu içinde COL1A (1/200), COL2A (1/300) ve COLXA (1/200) oranları olacak şekilde inkübe edilmiş, ardından 1: 100 (v/v) oranda 1 saat süreyle HRP ile etiketlenmiş antifare ikincil antikor 3.3’-diaminobenzidin (DAB) kiti (Vector Labs, İngiltere) ile 10 dakika boyunca boyanmıştır. Devamında, haematoksilen ile karşı boyanmış ve dehidre edilerek görüntüler alınmıştır. Uygun pozitif (ECM) ve negatif doku kontrolleri kullanılmıştır.

4.9. OSTEOKONDRAL DOKU ÜNİTESİ İLE GERÇEKLEŞTİRİLEN *IN VIVO* BİYOUYUMLULUK ANALİZİ

Osteokondral doku iskelesinin *in vivo* biyoyumluluğunun, biyodegradasyonun, hücre infiltrasyonunun ve çevre doku cevaplarının araştırılması amacıyla (6 hayvan) yetişkin BALB/c erkek fareler kullanılarak *in vivo* deneyleri gerçekleştirilmiştir. Hayvanlarla ilgili tüm işlemler Ankara Üniversitesi HADYEK tarafından onaylanmış ve çalışmalar Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarında yürütülmüştür. Fareye anestezi ilaç uygulanması ve tespit işlemlerini takiben dorsal bölgede yaklaşık 1.0 cm lik kesiler ile doku iskelelerinin yerleştirileceği cepler oluşturulmuştur. Ardından her bir fareye 1 doku iskelesi olacak şekilde açılan ceplere yerleştirilmiş ve 4.0 naylon suture kullanılarak kapatılmıştır. Bölge enfeksiyona karşı antibiyotik içeren krem ile muamele edilmiş ve ertesi gün antibiyotik enjekte edilmiştir. 14 günlük bekleme süresinin ardından fareler sakrifiye edilerek dorsal bölgeye implante edilmiş olan doku iskeleleri çevre doku ile birlikte incelenmek üzere alınmıştır. **Osteokondral doku ünitelerinin *in vivo* histolojik analizinde yapısal bütünlüğünün korunup korunmadığı ve sağlıklı dokunun yapılar infiltrasyonu incelenmiştir.** Bu histolojik incelemeler, hemoksilen&eosin boyama Bölüm 4.7.13’de açıklandığı şekilde ile gerçekleştirilmiştir.

4.10. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER

Çalışmalar sonucu elde edilen sonuçlar InStat3GraphPad software programı kullanılarak gruplar arasındaki farklılık istatistiksel açıdan değerlendirilmiştir. Veriler 3 deney için ortalama $\pm$ SD değerleri ile birlikte sunulmuştur. Farklı grupların ve günlerin istatistiksel açıdan karşılaştırılması için Student’s T-test kullanılmış ve p değerinin 0.05’den az olduğu durumlar anlamlı kabul edilmiştir.

5. ARAŞTIRMA BULGULARI

Bu bölümde, **subkondral kemik, kalsifiye kıkırdak ve kıkırdak** fazlarını oluşturan doku iskelesi ve jel yapılar ile gradyan **osteokondral doku ünitesinin** üretimi ve karakterizasyonu ile ilgili olarak elde edilen sonuçlar sunulmuştur. İlk olarak doku iskelelerinin subkondral kemik faza ait kitosan bazlı doku iskelelerinin üretimi ve karakterizasyonuna ilişkin sonuçlar verilmiş, ardından seçilmiş olan doku iskeleleri ve MC3T3-E1 preosteoblastik hücreleri ile gerçekleştirilen *in-vitro* hücre kültür çalışmaları sunulmuştur.

İkinci kısımda ise, **kalsifiye kıkırdak** fazın üretimi ve karakterizasyonu yer almıştır. Elde edilen jellere ATDC5 kıkırdak öncül hücreleri enkapsüle edilerek gerçekleştirilen *in vitro* hücre kültürü çalışmalarına ilişkin sonuçlar verilmiştir.

Ardından, **kıkırdak** fazın üretim ve karakterizasyonuna ait sonuçlar sunulmuş, sentezlenen jellerin *in vitro* hücre çalışmaları ile kıkırdak fazı olarak kullanılabilirlik potansiyeli değerlendirilmiştir.

Son olarak, her bir fazın ayrı ayrı 7 gün süre ile kültürlenmesinden sonra üst üste getirilerek elde edilen gradyan yapıda **osteokondral doku ünitesinin** üretimi ve karakterizasyonu üzerinde durulmuştur.

Ko-kültür ortamında MC3T3-E1 ve ATDC5 hücreleri ile osteokondral doku ünitesinin 4 haftalık kültüründen sonra elde edilen sonuçlar verilmiş, son olarak, osteokondral doku ünitesinin *in vivo* biyoyumluluğuna ilişkin yapılan çalışmalar ve elde edilen bulgular açıklanmıştır.

5.1. SUBKONDRAL KEMİK FAZININ BELİRLENMESİNE YÖNELİK ÇALIŞMALARDAN ELDE EDİLEN SONUÇLAR

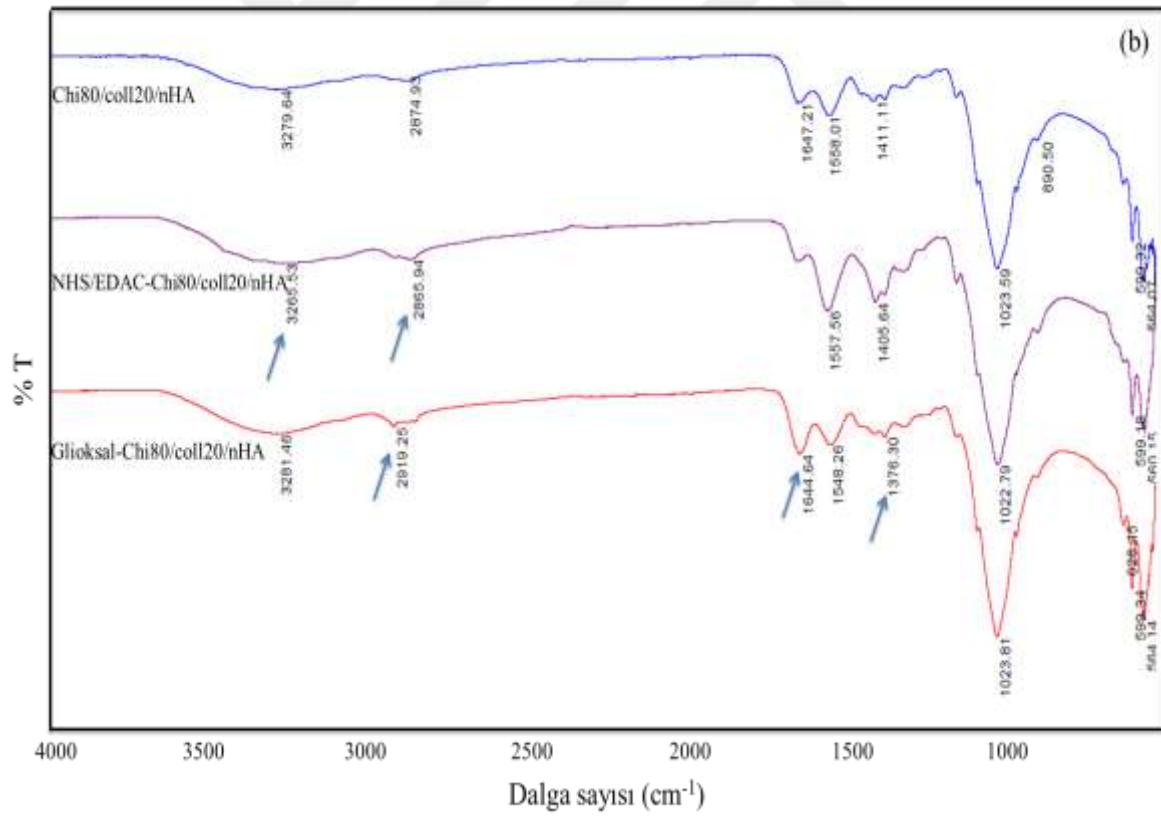
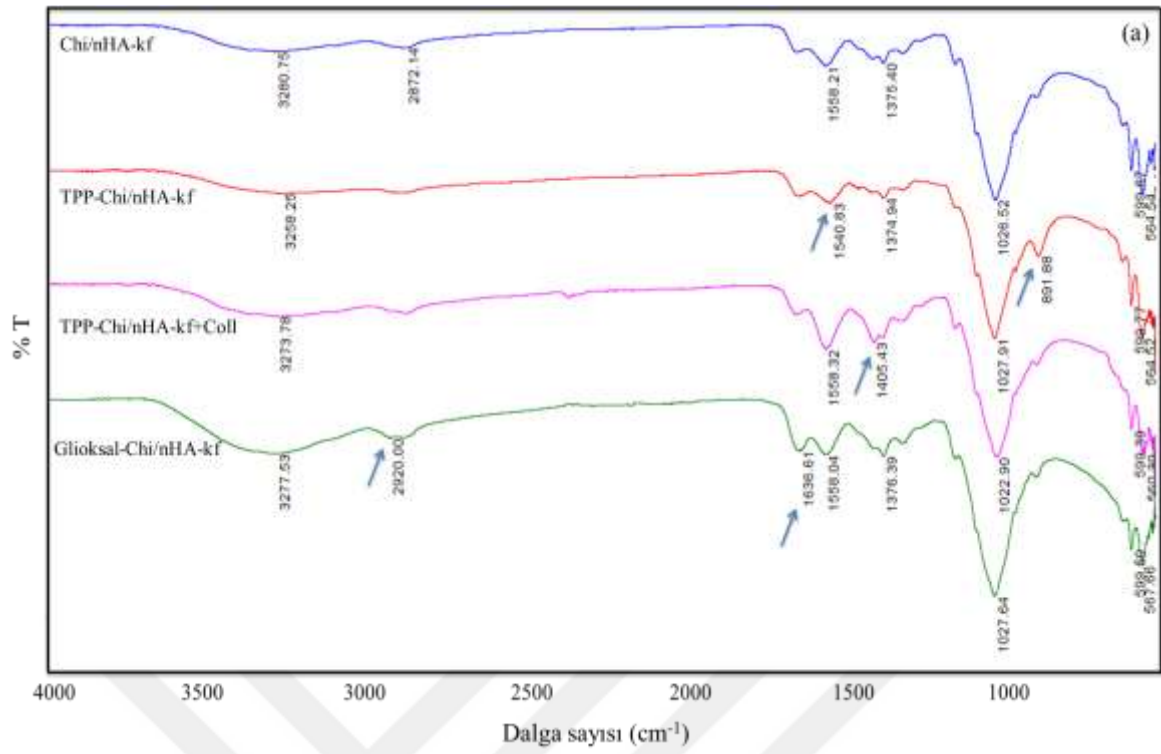
Osteokondral doku ünitesinin subkondral kemik fazını oluşturacak doku iskelesinin en uygun bileşimini belirlemek amacıyla, kitosan bazlı ve farklı oranlarda kollajen tip I ve %1'lik (w/v) nHA içeren, aynı zamanda farklı çapraz bağlayıcı ajanlar kullanılarak, gözenekli yapıda, dondurarak kurutma yöntemiyle gözenekli yapıda doku iskeleleri hazırlanmıştır. Elde edilen doku iskelelerinin morfolojik yapıları, çapraz bağlanma sonucu

kimyasal değişimleri, mekanik dayanımları, şişme oranları ve yapılarından meydana gelebilecek kolajen tip I salımının tayinine yönelik analizler Bölüm 4.6.8’de açıklandığı şekilde gerçekleştirilmiştir. İlk yöntem, kollajen tip I çözeltisinin farklı oranlarda kitosan çözeltisine ilave edilerek elde edilen süspansiyonun dondurularak kurutulması ve ardından çapraz bağlama işlemlerinin uygulanmasını içermektedir (62). Kollajen tip I’in yapıya katılmasıyla ilgili olarak yürütölen diğer çalışmalarda, çapraz bağlı chi/nHA doku iskelelerinin hazırlanmasının ardından kollajen tip I çözeltisine daldırılarak kaplama yolu ile yapıya kollajen ilave edilmesine yönelik çalışmalar yürütölmüştür. Çalışmada çapraz bağlayıcı ajan olarak kullanılan TPP, NHS/EDAC ve glioksal kitosanın çapraz bağlanmasında literatürde yaygın olarak yer alan ajanlardır (62,85).

Karakterizasyon çalışmaları farklı çapraz bağlayıcılar ile hazırlanan ve farklı kollajen tip I miktarları içeren doku iskeleleri ile yürütölmüştür.

5.1.1. FTIR İLE KİMYASAL YAPI ANALİZİ

Tez çalışması kapsamında, subkondral kemik fazı olarak hazırlanan yapılara ait FTIR-ATR spektrumları Şekil 5.1’de sunulmuştur.



Çizelge 5.1. Kollajen tip I içermeyen chi/nHA doku iskelelerine ait FTIR-ATR spektrumundan elde edilen pikler ve açıklamaları.

Örnekler	IR absorpsiyon bantları (cm^{-1})	Açıklama
Chi/nHA-kf	3279,61	N-H gerilme bandı
	2879,69	C-H gerilmesi
	1637,77 ve 1551,11	C=O gerilmesi
	1375,75	CH ₃ deformasyonu, C-H gerilmesi
	955,1086, 1029	PO_4^{-3} 'den gelen P-O vibrasyonu
	635	(O-H) gerilmesi
	1028	-(C-O-C) simetrik ve asimetrik gerilmesi
TPP-Chi/nHA-kf	3279,80	N-H gerilme bandı
	2880,02	C-H gerilmesi
	1641,30 ve 1552,49	C=O gerilmesi
	2824,69	C-H gerilmesi (H-C=O) için
	955,1086, 1029,17	PO_4^{-3} 'den gelen P-O vibrasyonu
	1029,17	-(C-O-C) simetrik ve asimetrik gerilmesi
	635	(O-H) gerilmesi
NHS/EDAC-Chi/nHA-kf	1375,89	CH ₃ deformasyonu, C-H gerilmesi
	3258	N-H gerilme bandı
	2919,32	C-H gerilmesi
	1645,72 ve 1540	C=O gerilmesi
	1378,53	CH ₃ deformasyonu, C-H gerilmesi
	955,1086, 1028,90	PO_4^{-3} 'den gelen P-O vibrasyonu
	1028,90	-(C-O-C) simetrik ve asimetrik gerilmesi
Glioksal-Chi/nHA-kf	635	(O-H) gerilmesi
	1377,53	CH ₃ deformasyonu, C-H gerilmesi
	3277	N-H gerilme bandı
	2878,32	C-H gerilmesi
	1641,78, 1554,13	C=O gerilmesi
	1376,61	CH ₃ deformasyonu, C-H gerilmesi
	955,1086, 1029,17	PO_4^{-3} 'den gelen P-O vibrasyonu
	1028,90	-(C-O-C) simetrik ve asimetrik gerilmesi

Çizelge 5.2. Kollajen tip I içeren çapraz bağlanmamış chi/nHA doku iskelelerine ait FTIR-ATR spektrumundan elde edilen pikler ve açıklamaları.

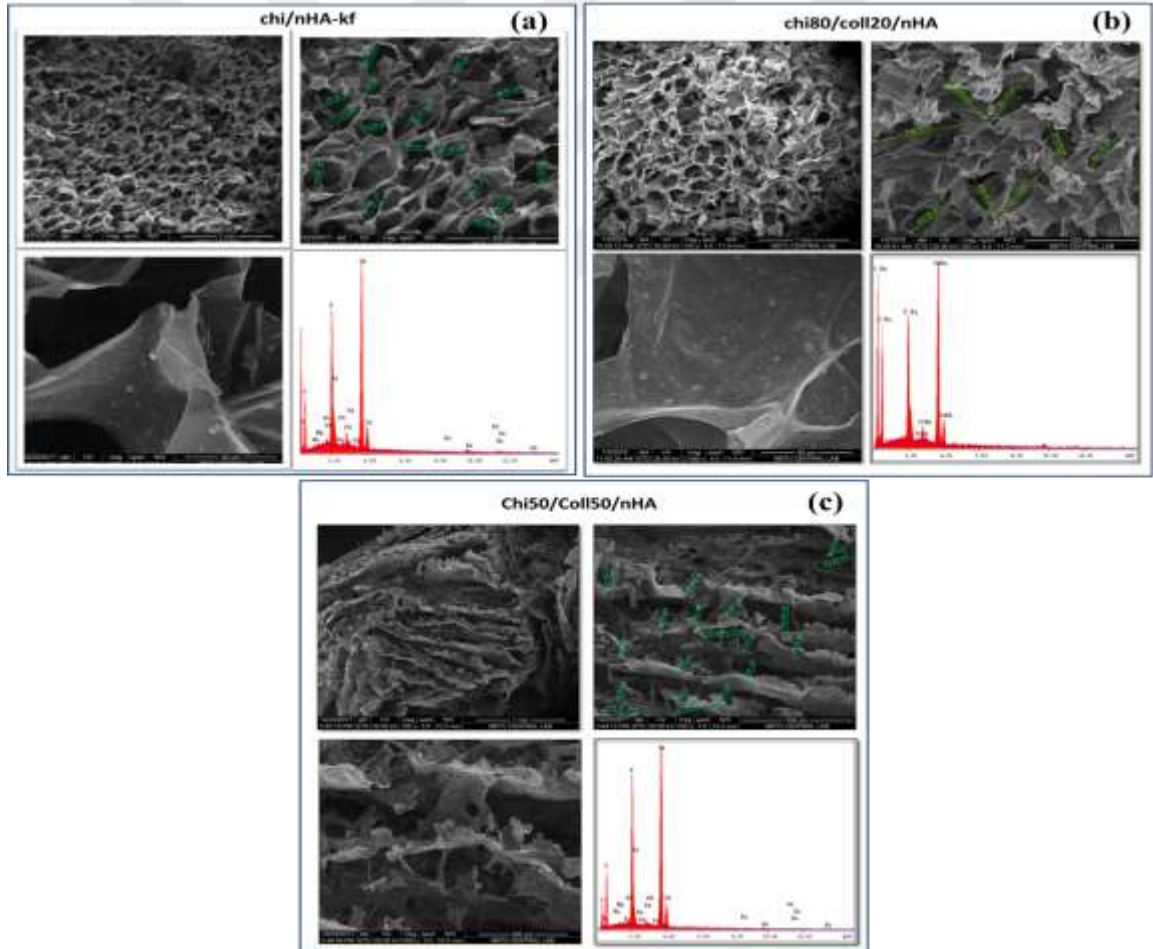
Örnekler	IR absorpsiyon bantları (cm^{-1})	Açıklama
Chi80/Coll20/nHA	3273	N-H gerilme bandı
	2880	C-H gerilmesi
	1644	C=O gerilmesi (amid I bandı)
	1548	NH ₂ deformasyonu (amid II bandı)
	1375	CH ₃ deformasyonu, C-H gerilmesi
Chi50/Coll50/nHA	1026	PO_4^{-3} 'den gelen P-O vibrasyonu
	3283	N-H gerilme bandı
	1647	C=O gerilmesi (amid I bandı)
	1547	NH ₂ deformasyonu (amid II bandı)
	955,1086, 1026	PO_4^{-3} 'den gelen P-O vibrasyonu

Kitosan ve Kollajen içeren doku iskeleleri benzer piklere sahip olduğundan çapraz bağlanma sonuçları da kitosan doku iskelelerine benzer olarak bulunmuştur.

Çizelge 5.1 ve 5.2 değerlendirildiğinde, kitosan ve hidroksiapatite ait tüm karakteristik piklerin yapıda olduğu görülmektedir. Kollajen ve kitosan kimyasal yapı olarak benzer gruplara sahip olduklarından karakteristik pikleri de aynı dalga sayılarında gözlenmektedir. Bununla birlikte, çapraz bağlama işlemlerinden sonra piklerin dalga sayılarında gözlemlenen kaymalar dışında, belirgin farklılıklar görülmemektedir.

5.1.2. SUBKONDRAL KEMİK FAZINA AİT MORFOLOJİK ANALİZLER

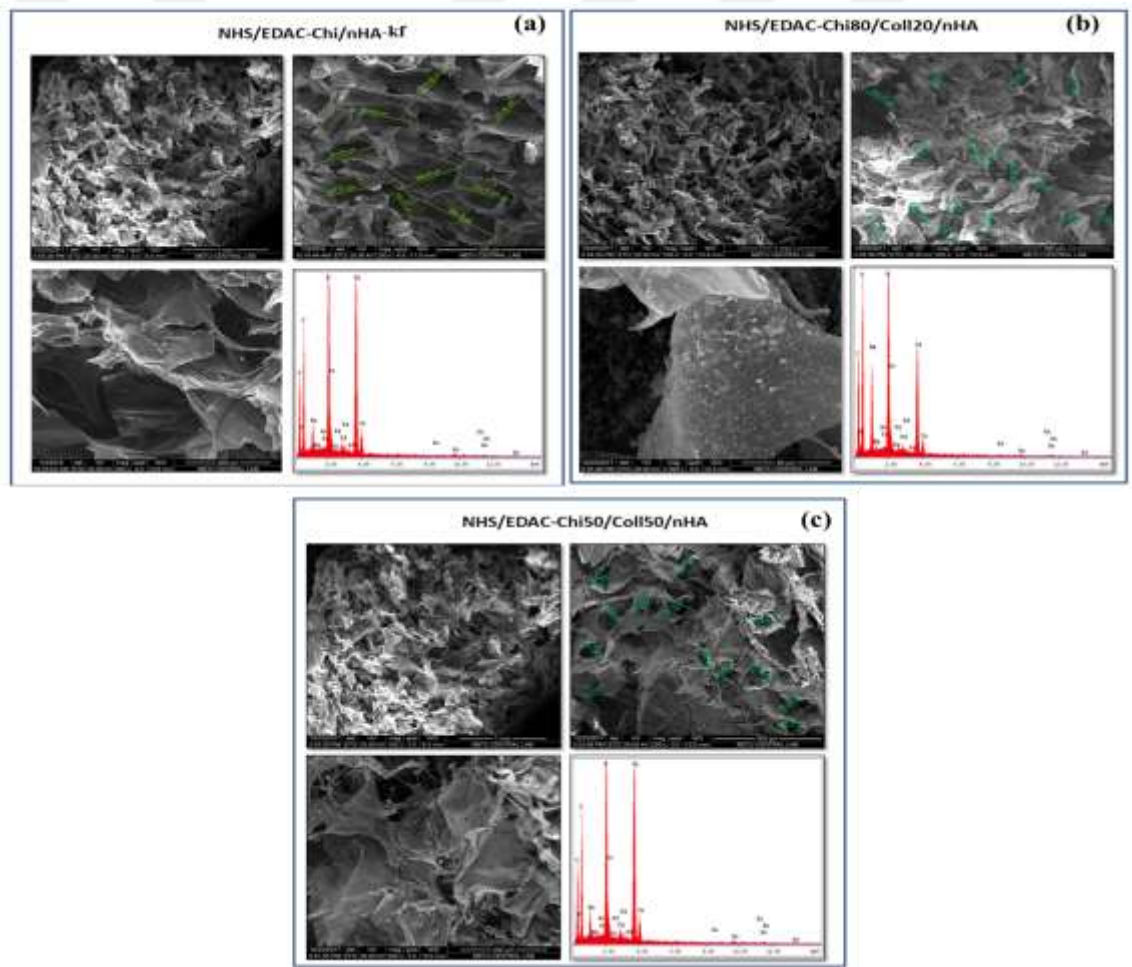
Subkondral kemik fazına ait doku iskelelerinin gözenekli yapıya ve bu gözeneklerin içsel bağlantılara sahip olduğu Bölüm 4.6.2’de açıklanan şekilde gerçekleştirilen Taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizi ile saptanmıştır. SEM analizinden elde edilen görüntüler ve EDAX analizinden elde edilen elemental analiz verileri Şekil 5.2-5.11’de farklı gruplardaki doku iskeleleri için verilmiştir.



Şekil 5.2. Çapraz bağlanmamış (a) chi/nHA-kf, (b) chi80/coll20/nHA ve (c) chi50/coll50/nHA doku iskelelerine ait SEM görüntüleri (100X, 200X ve 500X) ve EDAX verileri.

Çapraz bağ içermeyen chi/nHA-kf, chi80/coll20/nHA ve chi50/coll50/nHA doku iskelelerinin SEM görüntülerinden elde edilen sonuçlar, tüm gruplarda gözenekli ve içsel bağlantılı yapıların elde edildiğini göstermektedir. Yapılara ilave edilen %1 (w/v) oranında nHA partiküllerin, tüm doku iskeleleri içerisinde homojen olarak dağıldığı görülmüştür. SEM analizinden elde edilen ortalama gözenek çapı değerleri, chi/nHA-kf, chi80/coll20/nHA ve chi50/coll50/nHA doku iskeleleri için sırasıyla, $115,38 \pm 39 \mu\text{m}$, $204,41 \pm 41 \mu\text{m}$ ve $100,64 \pm 40 \mu\text{m}$ olarak saptanmıştır.

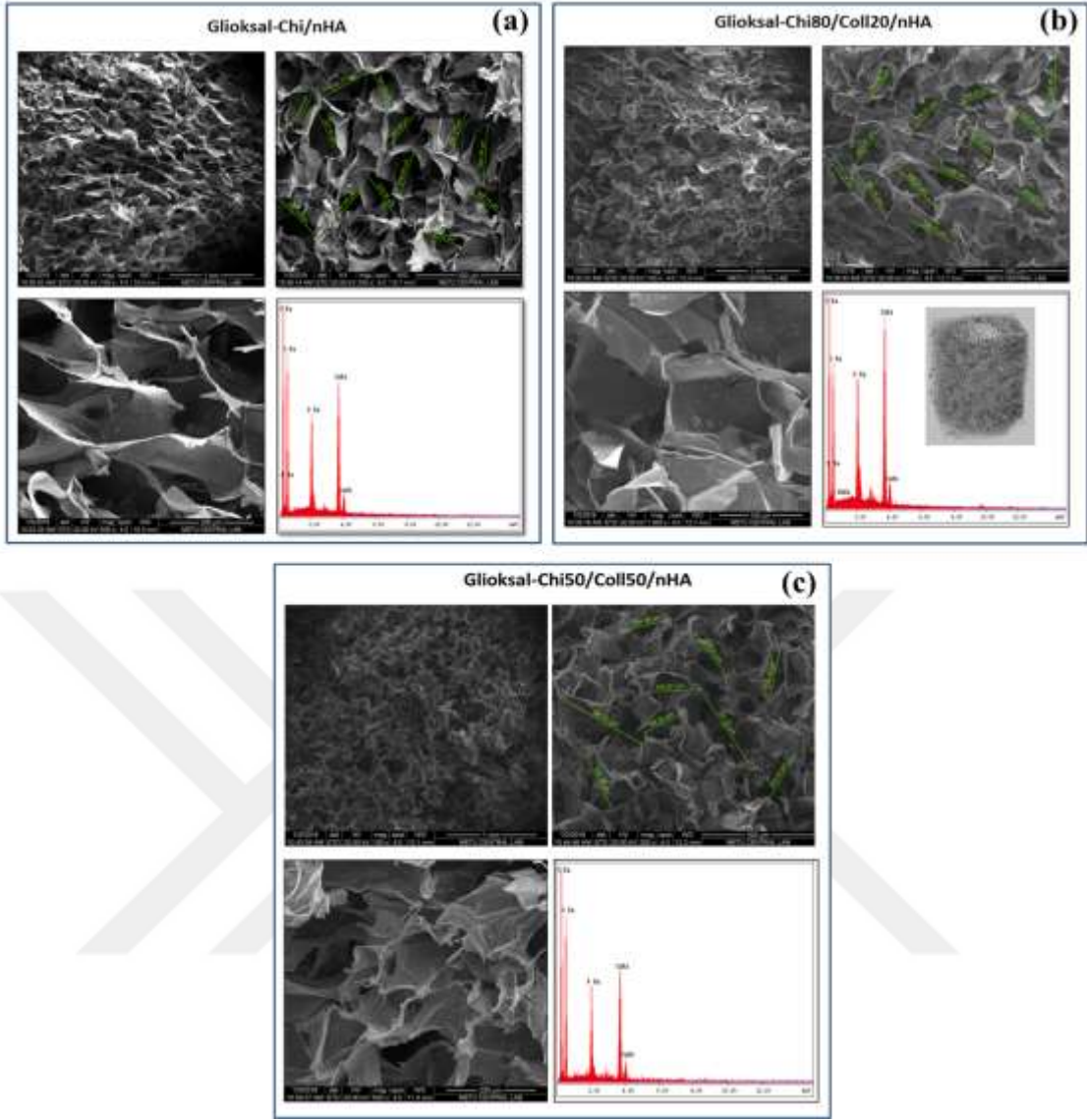
chi/nHA-kf ve kitosan/kollajen tip I/nHA doku iskelelerinin NHS/EDAC ile çapraz bağlanmasından sonra elde edilen doku iskelelerine ait SEM görüntüleri Şekil 5.3-5.6'da verilmiştir.



Şekil 5.3. NHS/EDAC ile çapraz bağlama sonrasında (a) NHS/EDAC-chi/nHA-kf, (b) NHS/EDAC-chi80/coll20/nHA ve (c) NHS/EDAC-chi50/coll50/nHA doku iskelelerine ait SEM görüntüleri (100X, 200X ve 500X) ve EDAX verileri.

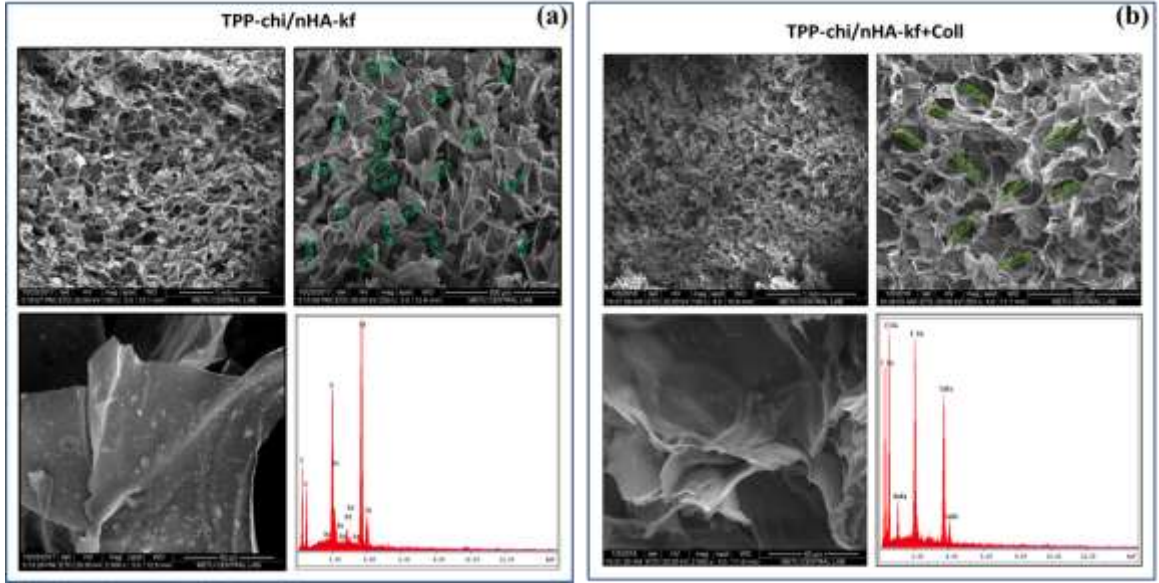
SEM analizinden elde edilen sonuçlar, NHS/EDAC ile çapraz bağlama sonrasında doku iskelelerinin gözenekliliğini koruduklarını göstermektedir. Gözenek çapı değerleri, NHS/EDAC-chi/nHA-kf, NHS/EDAC-chi80/coll20/nHA ve NHS/EDAC-chi50/coll50/nHA doku iskeleleri için sırasıyla, $153,98 \pm 58 \mu\text{m}$, $64,03 \pm 18 \mu\text{m}$ ve $83,02 \pm 15 \mu\text{m}$ olarak ölçülmüştür. NHS/EDAC ile çapraz bağlama sonrasında chi80/coll20/nHA ve chi50/coll50/nHA doku iskelelerinin ortalama gözenek çaplarında azalma olduğu sonucuna varılmıştır.

Gliksal ile çapraz bağlama işlemi sonrasında, SEM analizinden elde edilen sonuçlar Şekil 5.4-5.6'da verilmiştir. Tüm gruplarda çapraz bağlama işlemi sonrasında gözenek yapısının korunduğu, nHA partiküllerin yapı içerisinde homojen olarak dağıldığı gözlemlenmiştir. SEM analizinden elde edilen ortalama gözenek çapı değerleri, gliksal-chi/nHA-kf, gliksal-chi80/coll20/nHA ve gliksal-chi50/coll50/nHA doku iskeleleri için sırasıyla, $228,53 \pm 34 \mu\text{m}$, $217,36 \pm 42 \mu\text{m}$ ve $209,51 \pm 30 \mu\text{m}$ olarak belirlenmiştir. Gliksal ile çapraz bağlamanın ardından, NHS/EDAC çapraz bağlayıcı ajanlarının kullanıldığı durumun aksine gözenek çapında azalmaya neden olmamıştır.



Şekil 5.4. Glioksal ile çapraz bağlama sonrasında (a) glioksal-chi/nHA-kf, (b) glioksal-chi80/coll20/nHA ve (c) glioksal-chi50/coll50/nHA doku iskelelerine ait SEM görüntüleri (100X, 200X ve 500X) ve EDAX verileri.

Çapraz bağlayıcı ajan olarak TPP kullanıldığı durumda elde edilen SEM görüntüleri Şekil 5.5’de verilmiştir. Kollajen tip I ile kaplama sonrasında ise elde edilen görüntüler Şekil 5.5’de verilmiştir. TPP ile çapraz bağlama sonrasında ortalama gözenek çapı $74,83 \pm 20 \mu\text{m}$ değerine gelirken, kollajen tip I kaplama sonrasında ise gözenek çapı $142,56 \pm 32 \mu\text{m}$ değerine yükselmiştir.



Şekil 5.5. TPP ile çapraz bağlama sonrasında (a) TPP-chi/nHA-kf, (b) TPP ile çapraz bağlama ve ardından kollajen tip I ile kaplanmış (TPP-chi/nHA-kf+Coll) doku iskelelerine ait SEM görüntüleri (100X, 200X ve 500X) ve EDAX verileri.

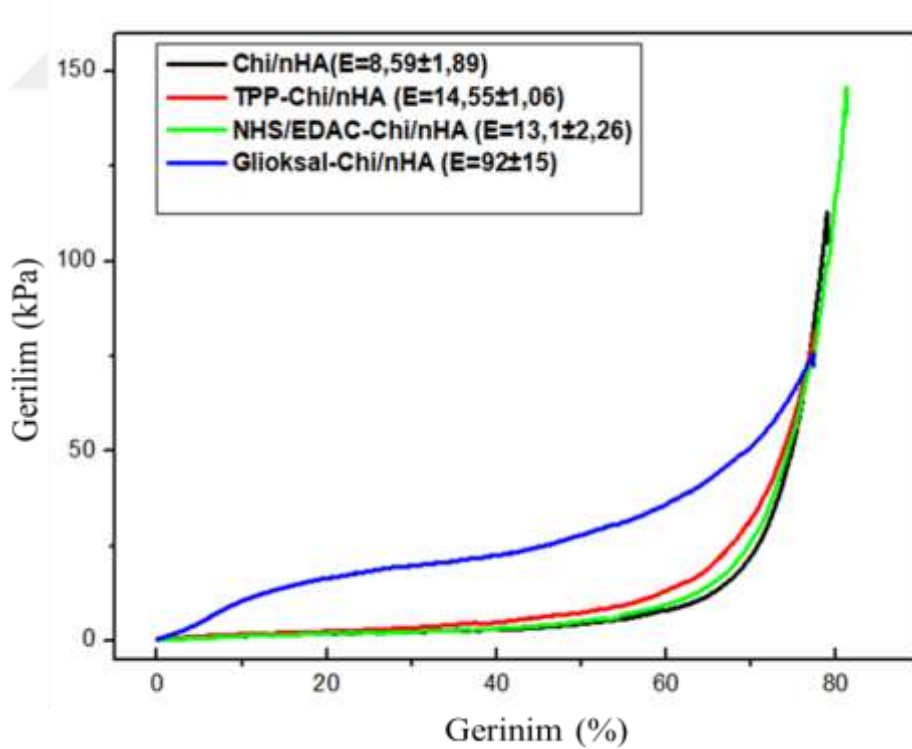
EDAX analizi sonucunda elde edilen elemental analiz sonuçlarının ortalama değerleri Çizelge 5.3’de verilmiştir. Tüm sonuçlarda ilave edilen %1’lik (w/v) nHA kaynaklı kalsiyum (Ca) ve fosfat (P) elementleri tüm iskelelerde saptanmıştır.

Çizelge 5.3. Kemik fazına ait doku iskelelerinin EDAX ile elemental analiz sonuçları

Örnekler	Elementler				
	C	O	Ca	P	N
chi/nHA-kf+Coll	40,4±1,21	26,65±3,3	18,47±2,65	8,29±2,26	-
TPP-chi/nHA-kf	35,74±0,049	23,18±4,12	22,89±2,52	9,92±0,46	-
TPP-chi/nHA- kf+Coll	50,7	42,78±15	16,75±8,2	10,68±7,52	-
NHS/EDAC- chi/nHA-kf	43±1,41	27,85±1,98	13,28±0,38	4,96±0,21	8,81±0,63
NHS/EDAC- chi/nHA-kf+Coll	49,35±2,4	29,51±1,95	11,22±0,73	4,76±0,028	7,32±0,03
Glioksal-Chi/nHA (koll kaplı)	40,89±2,63	34,42±2,09	10,75±0,7	8,78±0,04	6,09
NHS/EDAC- Chi80/Coll20/nHA	20,82±10,5	24,02±9,85	21,65±11,9	15,55±5,4	4,22±1,29
Glioksal- Chi80/Coll20/nHA	49,76±4,75	34,985±1,83	8,43±1,85	3,86±0,54	5,91
Chi50/Coll50/nHA	15±1,48	29,52±3,93	29,72±2,33	14,03±1,48	3,36±0,24
NHS/EDAC- Chi50/Coll50/nHA	27,80±7,99	20,27±11,39	25,29±16	11,52±2,84	4,72±1,35
Glioksal- Chi50/Coll50/nHA	47,17±3,49	34,85±1,80	10,63±1,61	4,50±0,31	5,67

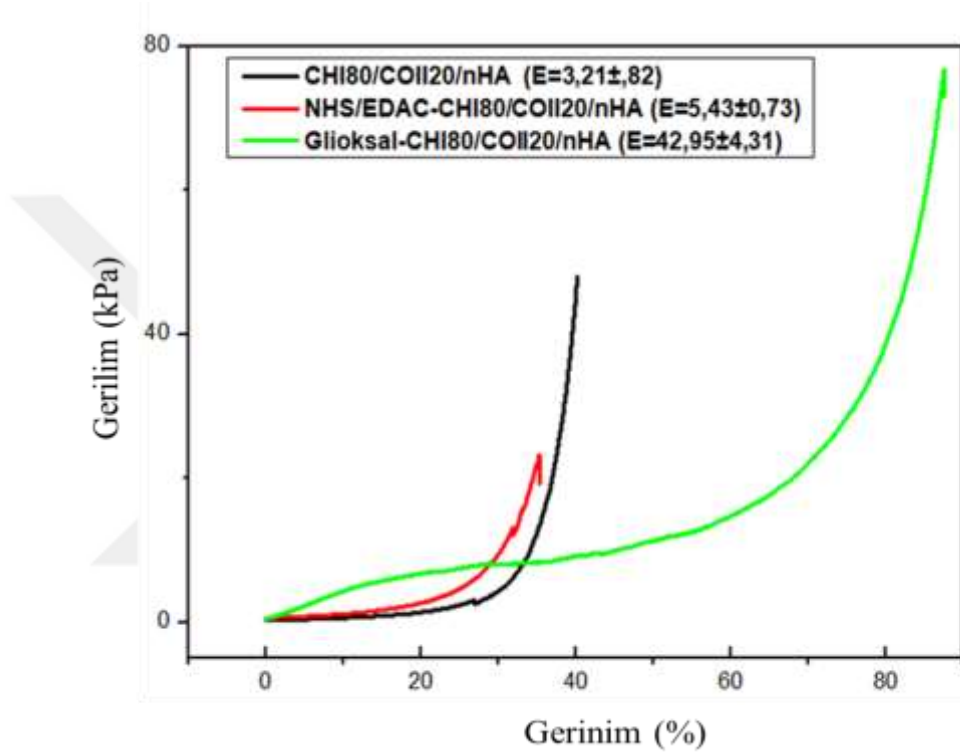
5.1.3. MEKANİK TESTLER

Tez çalışması kapsamında sentezlenen ve osteokondral doku ünitesinin subkondral kemik fazını oluşturacak gözenekli doku iskelelerinin mekanik dayanımları basma testleri ile incelenmiş ve testlerden elde edilen gerilim-gerinim eğrileri Şekil 5.6-5.10'da verilmiştir. Şekil 5.6'da verilen eğriler bileşiminde kollajen tip I bulunmayan kitosan/nanohidroksiaptit doku iskelelerine (Chi/nHA-kf) aittir. Farklı çapraz bağlayıcı ajanların mekanik dayanım üzerindeki etkisinin araştırılması amacıyla gerilim-gerinim eğrilerinden elastik modül değerleri hesaplanmıştır. Çapraz bağlayıcı ajanların kullanılması genel olarak tüm doku iskelesi gruplarında elastik modül değerlerinin yükselmesine ve mekanik dayanımın artmasına neden olmuştur. En yüksek mekanik dayanım glioksal çapraz bağlı Chi/nHA doku iskelelerinde elde edilmiş olmasına karşın, yapının kırılabilirliğinde önemli bir artış meydana geldiği ve manipülasyon sırasında doku iskelesinin yapısından kopmalar olduğu gözlenmiştir. TPP ile fiziksel çapraz bağlanma sonucunda yapının mekanik dayanımında ~%70 oranında bir artış sağlanırken, NHS/EDAC ile ~%50 oranında bir artış meydana gelmiştir.



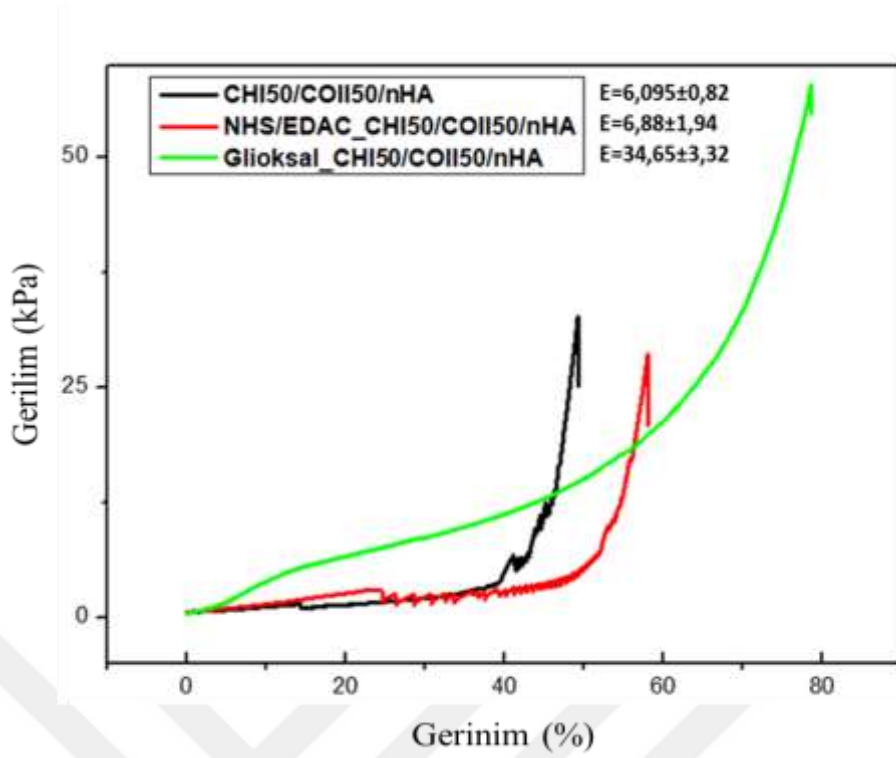
Şekil 5.6. chi/nHA-kf, TPP-chi/nHA-kf, NHS/EDAC-chi/nHA-kf ve glioksal-chi/nHA-kf doku iskelelerine ait gerilim-gerinim eğrileri.

Kitosan ve nanohidroksiapatit içeren yapılara kollajen tip I katılmasıyla sentezlenen doku iskelelerine ait gerilim-gerinim eğrileri Şekil 5.7-5.8’de sunulmuştur. Kollajen tip I içeren doku iskelelerinin çapraz bağlanmasında sadece NHS/EDAC ve glioksal yapılarına yer verilmiştir. Kitosan/kollajen tip I oranı 80:20 (w/w) olarak belirlendiğinde, sentezlenen yapılara ait gerilim-gerinim eğrileri Şekil 5.7’de görülmektedir. Chi80/coll20/nHA doku iskelelerinin mekanik dayanımı NHS/EDAC ile çapraz bağlanma sonrası ~%70 artış gösterirken, glioksal ile çapraz bağlama sonrasında bu artış ~% 1240 olarak hesaplanmıştır.



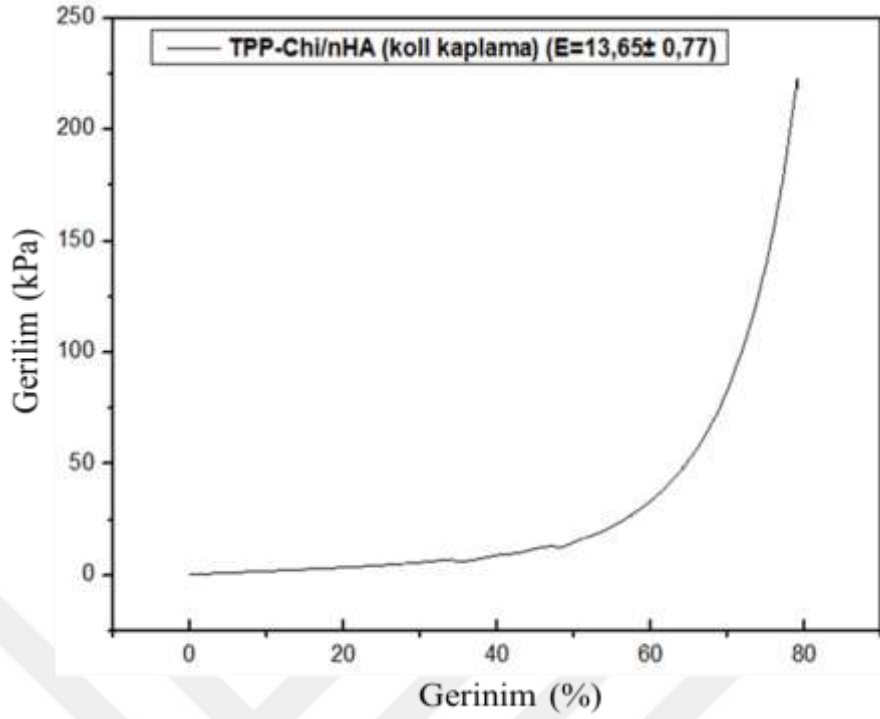
Şekil 5.7. chi80/coll20/nHA, NHS/EDAC-chi80/coll20/nHA ve glioksal-chi80/coll20/nHA doku iskelelerine ait gerilim-gerinim eğrileri.

Kitosan/kollajen oranı 50:50 olduğunda, mekanik dayanımdaki artış yine aynı yönde olmuş ve glioksal çapraz bağlı yapılarda daha yüksek elastik modül değerleri elde edilmiştir (Şekil 5.8).



Şekil 5.8. chi50/coll50/nHA, NHS/EDAC-chi50/coll50/nHA ve glioksal-chi50/coll50/nHA doku iskelelerine ait gerilim-gerinim eğrileri.

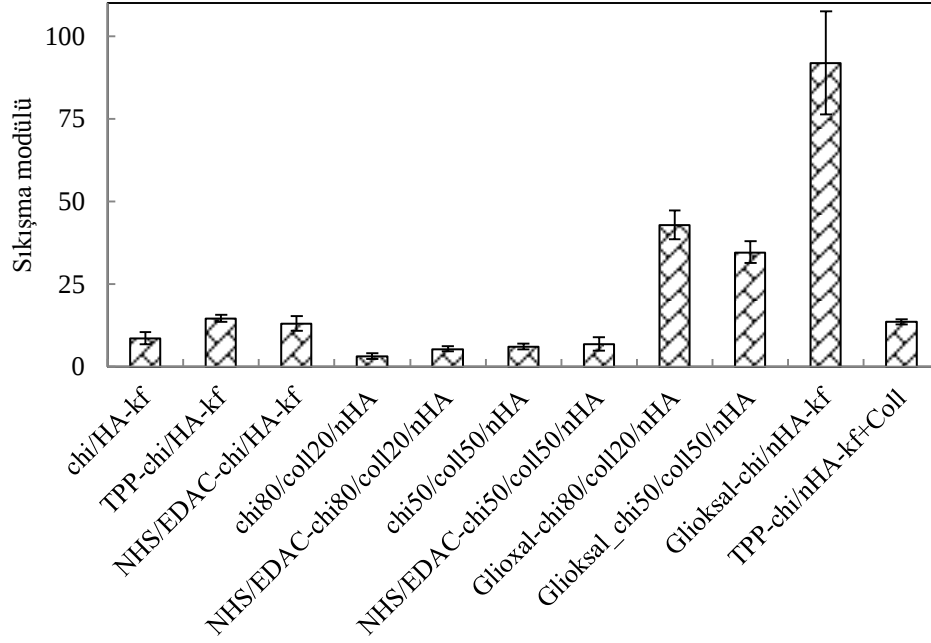
Kollajen tip I içeren doku iskelelerinin, kollajen çözeltisinde kaplanması ile hazırlandığı çalışmalarda ise, glioksal çapraz bağlı Chi/nHA doku iskeleleri kırılgen yapıları nedeniyle kullanılamamıştır. NHS/EDAC ile çapraz bağlanarak mekanik dayanımı arttırılan Chi/nHA doku iskeleleri, kollajen tip I ile kaplandığında ise, makroskopik yapının bozulduğu, şekilsel bütünlüğün kaybolduğu görülmüştür. Bu sonuçlar doğrultusunda, kaplama işlemi TPP çapraz bağlı yapılar ile yürütülmüştür. Kollajen I kaplı TPP çapraz bağlı Chi/nHA doku iskelesine ait gerilim gerinim eğrisi Şekil 5.9’da sunulmuştur.



Şekil 5.9. TPP-chi/nHA-kf+Coll doku iskelelerine ait gerilim-gerinim eğrileri.

Kaplama işlemi sonrasında basma modül değerinde % 10'luk bir azalma olduğu (E:14.55 değerinden E: 13.10 değerine düşmüştür), mekanik özelliklerin önemli ölçüde değişmediği sonucuna varılmıştır.

Kemik faz olarak kullanılması planlanan doku iskelelerinin basma modül değerleri Şekil 5.10'da toplu olarak verilmiştir.

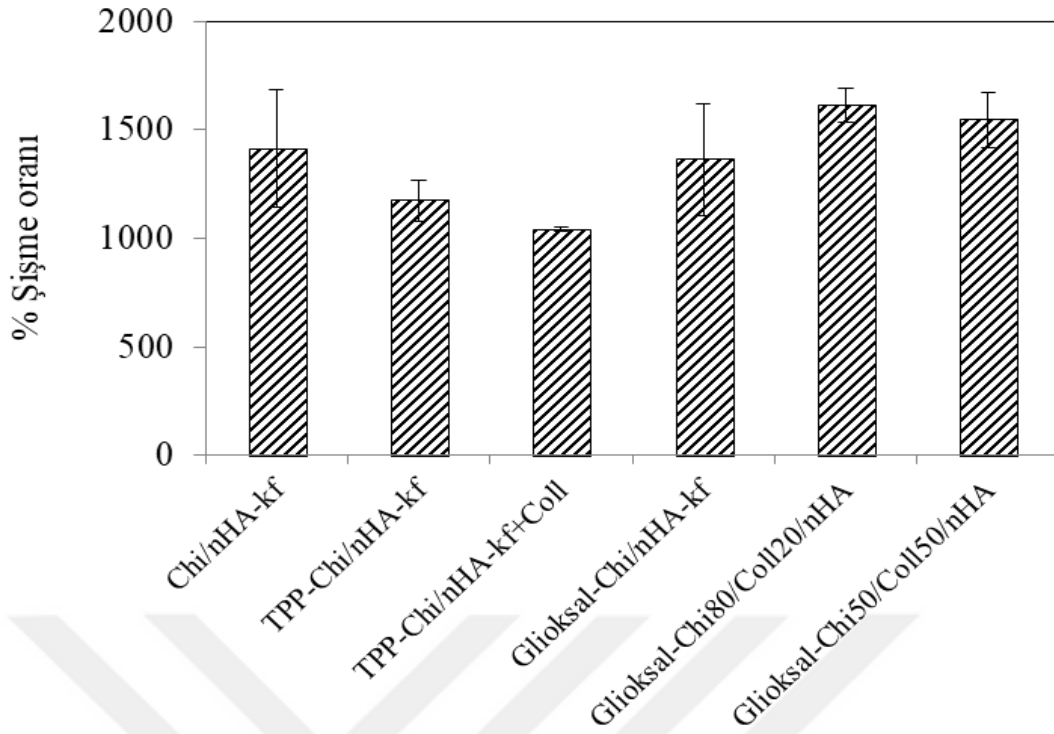


Şekil 5.10. Kemik faz olarak kullanılması planlanan doku iskelelerinin basma testi sonucunda elde edilen basma modül (E, kPA) değerleri.

Subkondral kemik fazda kullanılması planlanan yapıların mekanik dayanım analizleri değerlendirildiğinde, çapraz bağlama işleminin genel olarak tüm yapıların mekanik dayanımını arttırdığı, yapıya kollajen I eklenmesi ile mekanik dayanımda azalma meydana geldiği sonuçları ortaya çıkmaktadır. Çapraz bağlayıcı ajanlar arasında, glioksal en yüksek mekanik dayanımı kazandırmıştır.

5.1.4. SU TUTMA KAPASİTESİNİN BELİRLENMESİ

Tez çalışması kapsamında sentezlenen kemik fazına ait doku iskelelerinin şişme oranı ile su tutma kapasitesi değerleri saptanmış ve bu değerler Şekil 5.11’de verilmiştir. En yüksek şişme oranı glioksal çapraz bağlı Chi80/Coll20/nHA bileşimindeki doku iskelelerinde elde edilirken, en düşük şişme oranı TPP çapraz bağlı yapılarda gözlenmiştir. SEM analizinden elde edilen gözenek çap değerleri de düşünüldüğünde, en düşük şişme oranının gözenek çapı en düşük TPP çapraz bağlı yapılarda elde edilmesi beklenen bir sonuç olarak değerlendirilmiştir.



Şekil 5.11. Kemik faz doku iskelelerine ait %şişme oranı ve %su tutma kapasitesi değerleri.

5.1.5. KOLLAJEN SALIMI

Kemik fazı oluşturacak doku iskelelerinden kollajen tip I salımını incelemek amacıyla Bradford analizi modifiye edilerek uygulanmıştır. Deneylerde yalnızca glioksal çapraz bağlı yapılar kullanılmıştır (Çizelge 5.4). NHS/EDAC çapraz bağlı yapılar mekanik dayanımları düşük olduğundan deneylere dahil edilmemiştir.

Çizelge 5.4. Kitosan/kollajen tip I/nHA doku iskelelerinden kollajen salımı (n=4).

Kollajen salım (%)					
Örnekler	t=1 gün	t=7 gün	t=14 gün	t=21 gün	t=28 gün
Glioksal-Chi80/Coll20/nHA	-	-	6,31±2,78	22,31±9,68	33,20±9,81
Glioksal-Chi50/Coll50/nHA	3,01±0,8	12,66±8,35	28,85±6,93	39,20±3,40	50,40±7,30

Kitosan:kollajen tip I oranının 50:50 olarak belirlendiği durumda, yapıdan salınan kollajen miktarı %50 değerlerine ulaşmıştır. Kollajen kaplanmış ve TPP ile çapraz bağlanmış olan Chi/nHA doku iskelesinden 21.günde salınan kollajen miktarı 529 ± 44 μg olarak bulunmuştur. En yüksek salım ilk hafta sonrasında gözlenmiştir (Çizelge 5.5).

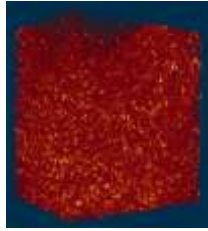
Çizelge 5.5. TPP-chi /nHA+Coll doku iskelelerinden kollajen salımı (n=4).

Örnekler (μg)	t=1 gün	t=7 gün	t=14 gün	t=21 gün
TPP-chi /nHA+Coll	$102,22\pm11,78$	$450,33\pm51$	497 ± 52	529 ± 44

5.1.6. MİKRO-CT ANALİZİ

Kemik fazına ait örneklerin birim hacminde bulunan toplam gözeneklilik, açık gözenek yüzdesi ve içsel bağlantılılık değerleri mikro-CT ($\mu\text{-CT}$) kullanılarak belirlenmiştir. Subkondral kemik fazı için hazırlanan **chi-nHA-kf**, **TPP-chi/nHA-kf+Coll** ve farklı oranlarda kollajen tip I içeren kitosan/nHA doku iskelesi örnekleri (**chi80/coll20/nHA** ve **chi50/coll50/nHA-kf**) glioksal ile çapraz bağlama ardından mikro-CT ($\mu\text{-CT}$) ile incelenmiştir. Mikro-CT analizinden elde edilen veriler Çizelge 5.6'da sunulmuştur.

Çizelge 5.6. Subkondral kemik fazı örneklerinin mikro-CT analizinden elde edilen veriler. chi/nHA-kf, TPP-chi/nHA-kf, glioksal-chi80/coll20/nHA ve glioksal-chi50/coll50/nHA-kf doku iskeleleri glioksal ile çapraz bağlanmış olan yapılardır.

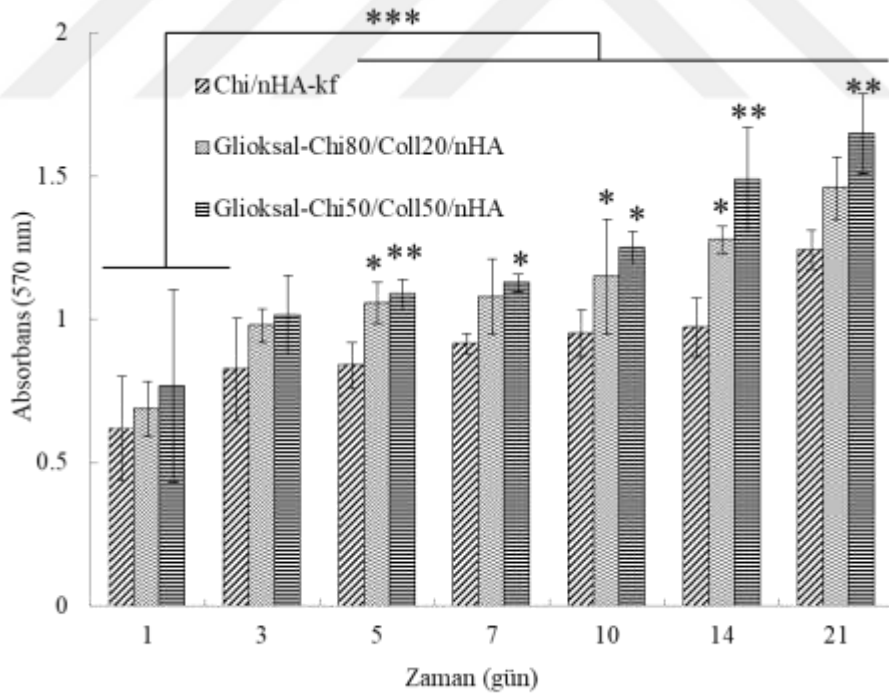
Kemik fazı doku iskeleleri				
	Chi/nHA-kf	Glioksal- chi80/coll20/nHA	Glioksal- chi50/coll50/nHA	TPP- chi/nHA+Coll
				
Özellikler				
Doku iskelesi hacmi (mm^3)	325,84	372,44	308,36	91,25
Kapalı gözenek sayısı	223764	27512	136006	21368
Açık gözeneklilik (%)	60	58,10	68,82	88,95
Kapalı gözeneklilik (%)	1,91	0,15	1,36	1,005
Toplam gözeneklilik (%)	60,11	58,16	69,24	89,06
İçsel bağlantı	631235	690065	693694	114258

chi-nHA-kf, chi80/coll20/nHA, chi50/coll50/nHA-kf ve TPP-chi/nHA-kf+Coll doku iskelelerine ait toplam gözeneklilik yüzdesi sırasıyla 60,11, 58,16, 69,24 ve 89,06, olarak bulunmuştur.

5.2. SUBKONDRAL KEMİK FAZA AİT HÜCRE KÜLTÜRÜ ÇALIŞMALARINDAN ELDE EDİLEN SONUÇLAR

5.2.1. PRESTOBLUE İLE ÜREME ANALİZİ

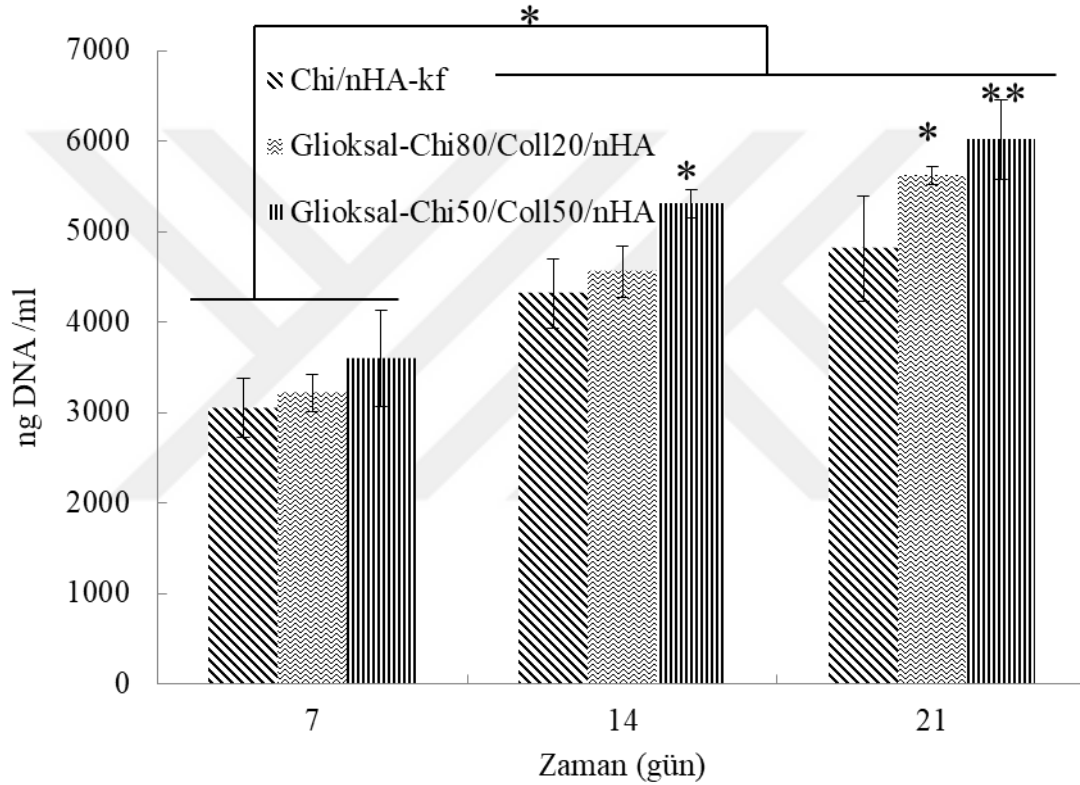
MC3T3-E1 preosteoblast hücrelerin **chi/nHA-kf** (kontrol), **glioksal-chi80/coll20/nHA** ve **glioksal-chi50/Coll50/nHA** iskeleler üzerindeki üreme davranışı ve mitokondriyal aktiviteleri kültürün belirli günlerinde Presto Blue analizi ile tayin edilmiş ve zamana bağlı olarak elde edilen optik yoğunluk değerleri Şekil 5.12’de verilmiştir. Hücreler 21 gün boyunca üremelerini sürdürmüşlerdir. Kollajen içeren doku iskeleleri üzerinde üreyen hücrelerden elde edilen optik yoğunluk değerleri, kültürün 5.gününden itibaren kontrol grubu olan Chi/nHA doku iskelelerine göre daha yüksektir ($p<0,001$). 21. gün sonunda hücre üremesinin en yüksek olduğu doku iskelesi grubu Chi50/Coll50/nHA olarak bulunmuştur ($p<0,001$). Kollajenin MC3T3-E1 hücre üremesini arttırdığı, Chi80/Coll20/nHA ve Chi50/Coll50/nHA gruplarında hücre yoğunluğunun kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu sonucuna varılmıştır.



Şekil 5.12. Chi/nHA, Chi80/Coll20/nHA ve Chi50/Coll50/nHA doku iskeleleri üzerinde çoğalan MC3T3-E1 hücrelerine ait Presto-Blue grafiği (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık, $n=3$, kontrol grubu Chi/nHA iken * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$).

5.2.2. DNA ANALİZİ

Doku iskeleleri üzerinde üreyen MC3T3-E1 hücrelerinin DNA miktar tayini PicoGreen ile analiz edilmiştir. Şekil 5.13'de gösterildiği gibi, 7., 14. ve 21. günler iskeleler karşılaştırıldığında **DNA miktarı** önemli ölçüde artan günlerle beraber artmıştır ($p < 0.05$). Doku iskeleleri üzerinde üreyen hücrelerdeki DNA miktarında 14.günde kontrol grubu chi/nHA-kf ile chi50/coll50/nHA-kf arasında anlamlı fark gözlenirken ($p < 0.05$), 21.günde hem chi80/Coll20/nHA($p < 0.05$) hem de chi50/Coll50/nHA ($p < 0.01$) gruplarında anlamlı istatistiksel fark gözlenmiştir.

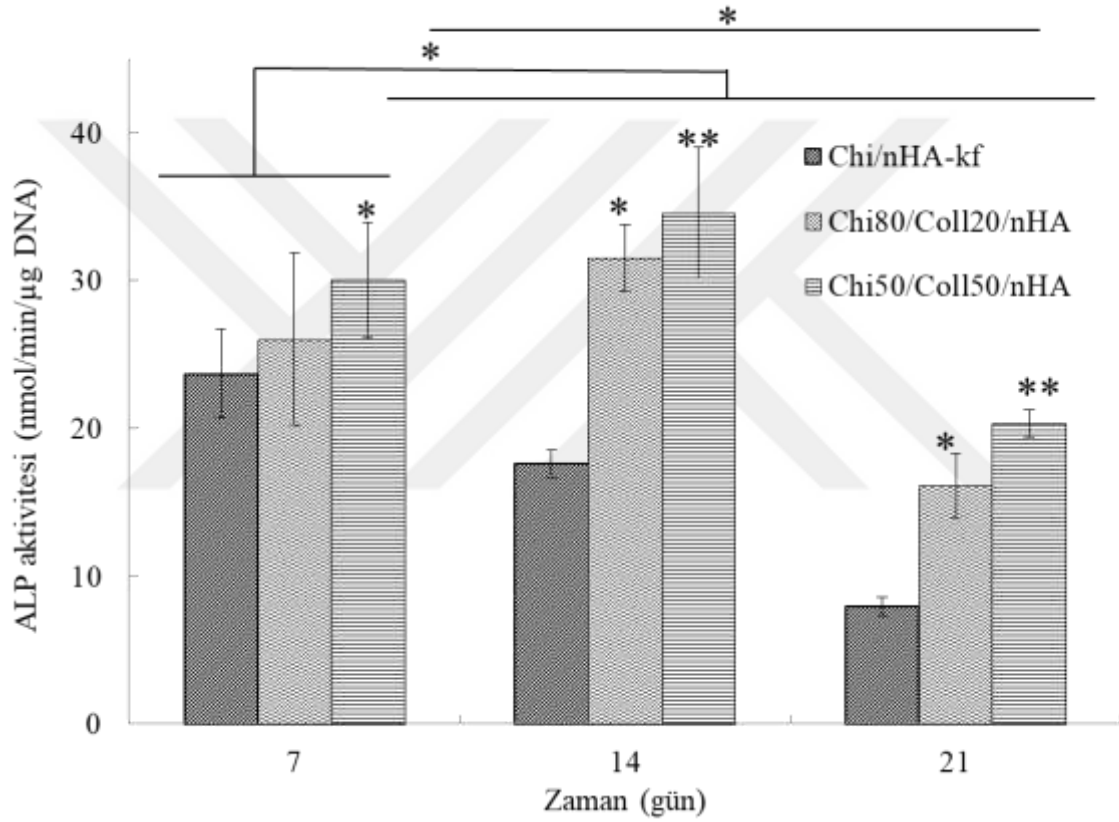


Şekil 5.13. chi/nHA-kf, glioksal-chi80/coll20/nHA ve glioksal-chi50/coll50/nHA doku iskeleleri üzerinde çoğalan MC3T3-E1 hücrelerine ait DNA miktar tayini (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık, $n=3$, kontrol grubu Chi/nHA iken * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

5.2.3. ALKALEN FOSFATAZ (ALP) AKTİVİTESİ

MC3T3-E1 preosteoblast hücreleri ile yürütülen hücre kültüründe 7., 14. ve 21. günlerde chi/nHA-kf, glioksal-chi80/coll20/nHA ve glioksal-chi50/coll50/nHA doku iskeleleri üzerinde üreyen hücreler ile yapılan analiz sonucu elde edilen ALP aktivitesi grafiği Şekil 5.14'de verilmiştir. Kültürün 7.gününde ALP aktivitesi açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir. Kültürün 14.gününde ise kollajen içeren

Chi80/Coll20/nHA ve Chi50/Coll50/nHA doku iskelelerinde kontrol grubu olan chi/nHA grubuna göre daha yüksek ALP aktivitesi bulunmuştur ($p<0.05$). Kültürün 21.gününde ise 14.güne oranla ALP değerleri düşmüştür ($p<0.01$). Bu da osteojenik farklılaşmanın en yüksek olduğu günün kültürün 14.gününde olduğunu göstermektedir. Chi/nHA-kf doku iskelelerinde 7.günden 14.güne gelindiğinde ALP düşüşü istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Sonuç olarak, kollajen içeren doku iskelelerinin erken osteoblastik farklılaşma belirteci olan ALP aktivite artışını desteklediği ve en yüksek ALP değerlerinin 14.günde chi50/coll50/nHA doku iskelelerinden elde edildiği saptanmıştır.

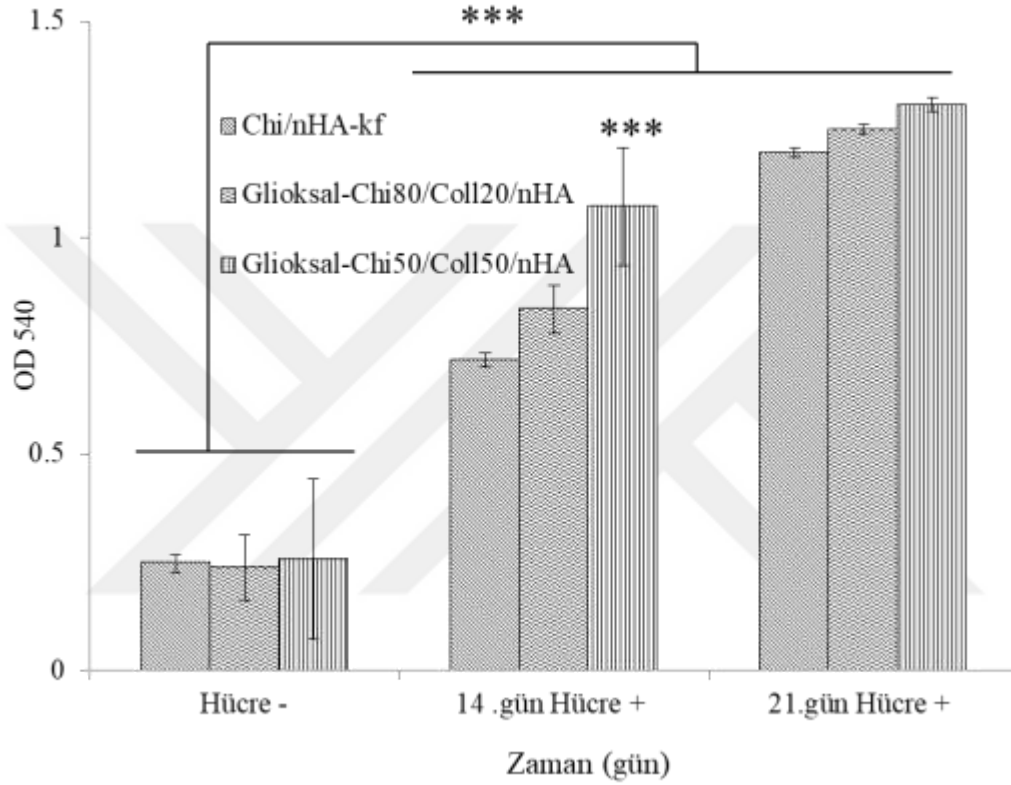


Şekil 5.14. Chi/nHA-kf, glioksal-chi80/Coll20/nHA ve chi50/Coll50/nHA doku iskeleleri üzerinde çoğalan MC3T3-E1 hücrelerine ait ALP aktivitesi grafiği (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık, $n=3$, kontrol grubu Chi/nHA iken * $p<0,05$, ** $p<0,01$).

5.2.4. MİNERALİZASYON

Kemik hücrelerinin mineralizasyon fazına geçtiğini ve mineralize hücre dışı matriksin (ECM) üretildiğini gösteren kemik farklılaşmasının belirtecidir. Kültürün 14. ve 21. günlerinde iskelelerdeki hücreler, mineralizasyonu incelemek için mineralize ECM'de Ca^{+2} 'e bağlanabilen ARS ile muamele edilmiştir. Hücre ekilmemiş iskeleler kontrol olarak

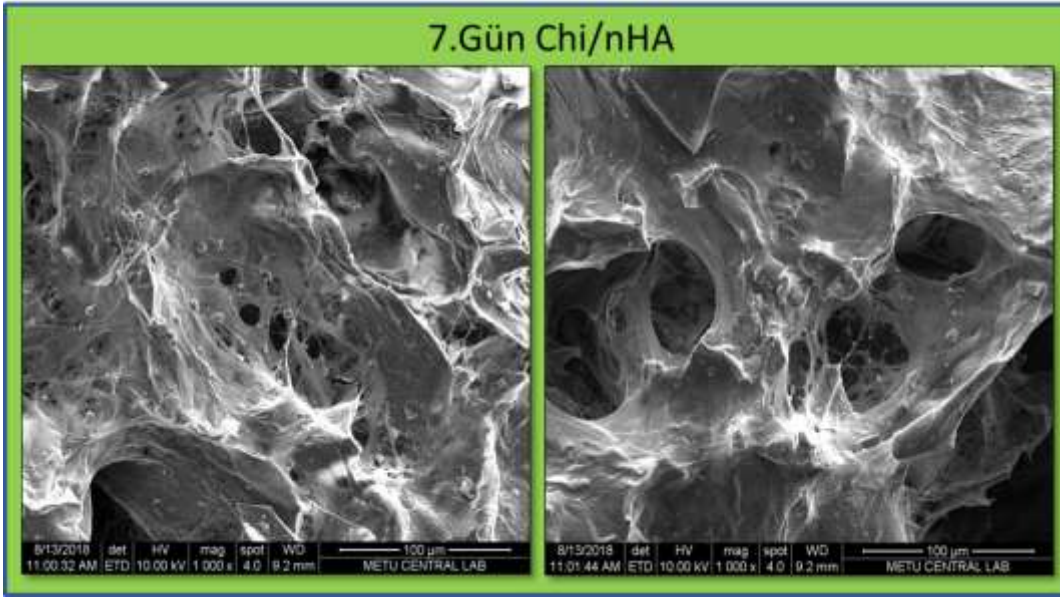
kullanılmıştır. Kantitatif hücre mineralizasyonu, kalsiyum açısından zengin mineral kalıntılarını değerlendirmek için %10 setilpiridinyum klorür (CPC) ile ARS desorbe edilerek yapılmıştır (Şekil 5.15). Kollajen içeren iskelelerde biriken minerallerdeki toplam kalsiyum içeriği Chi/nHA iskelesine göre önemli ölçüde daha yüksek bulunmuş ve geçen süreyle mineralleşmede önemli bir artış gözlenmiştir ($p<0.001$). Aynı eğilim ALP aktivitesi ile kantitatif hücre mineralleşmesinde de gözlenmiştir.



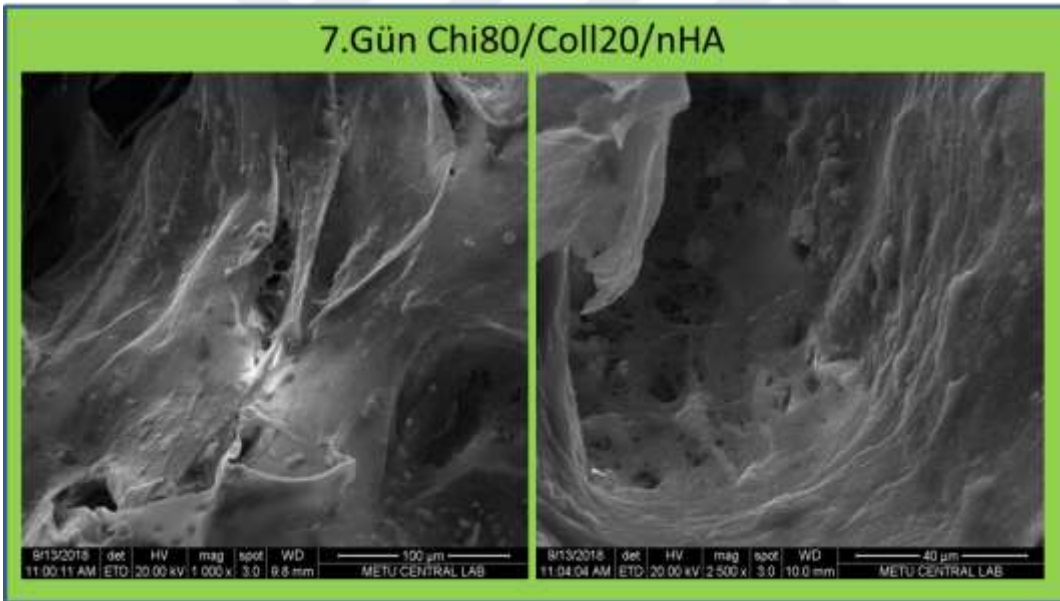
Şekil 5.15. Chi/nHA-kf, glioksal-chi80/coll20/nHA ve glioksal-chi50/coll50/nHA doku iskeleleri üzerinde çoğalan MC3T3-E1 hücrelerine ait mineralizasyon grafiği (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık, $n=3$, kontrol grubu Chi/nHA iken $***p<0,001$).

5.2.5. SEM İLE HÜCRE MORFOLOJİSİ ANALİZİ

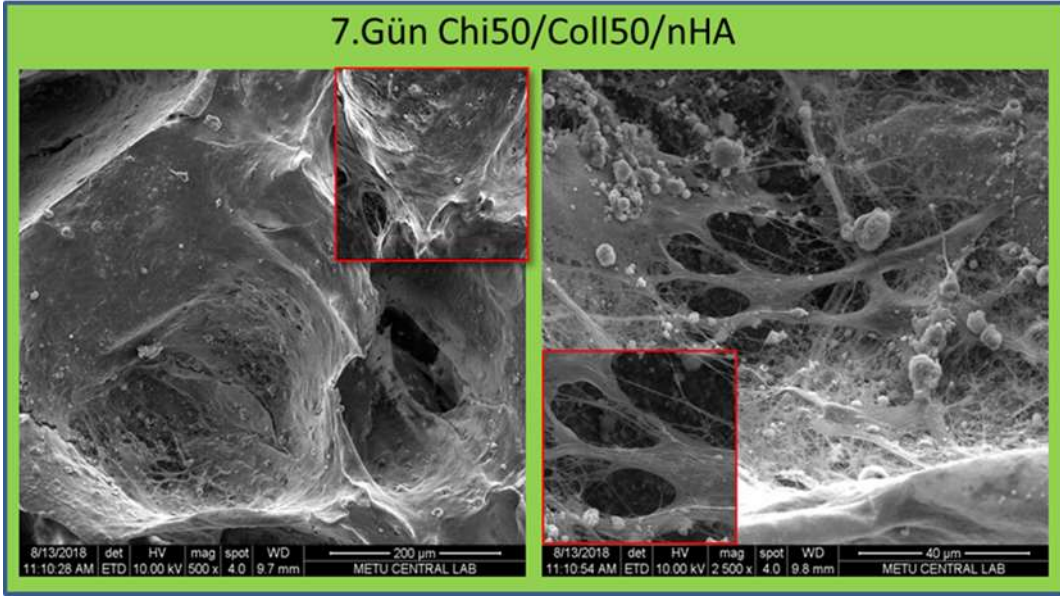
MC3T3-E1 hücrelerin doku iskeleleri üzerindeki morfolojileri SEM analizleri ile tayin edilmiştir. Kültürün 7. gününe ait SEM görüntüleri Şekil 5.16-21'de sunulmuştur. Hücrelerin iskelelere tutundukları, yayıldıkları ve içsel bağlantılı gözeneklere doğru göç ettikleri açıkça görülmektedir.



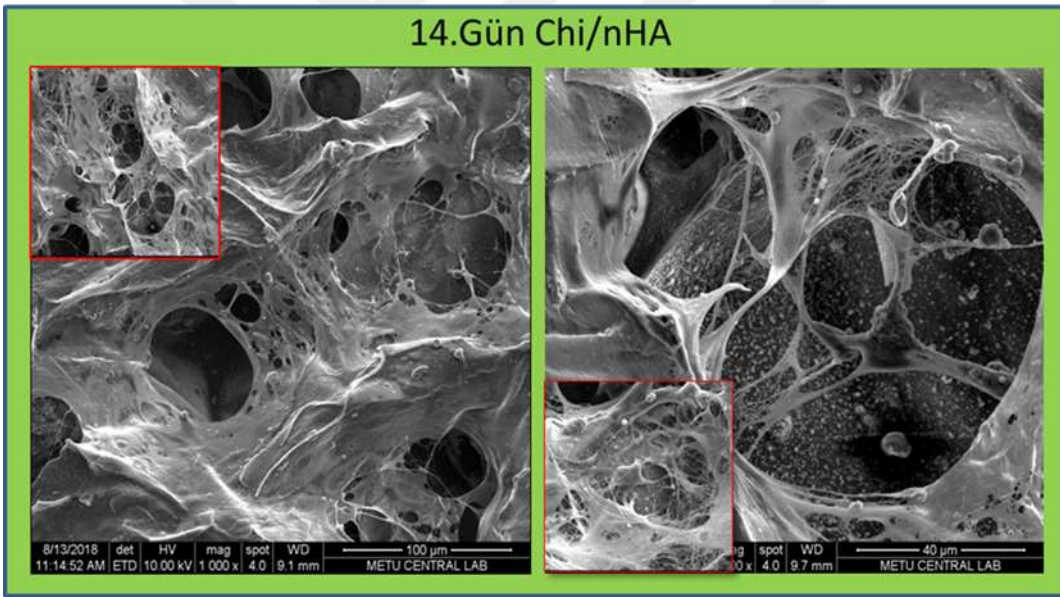
Şekil 5.16. chi/nHA-kf üzerinde çoğalan MC3T3-E1 hücrelerine ait SEM (1000 X) görüntüleri: 7. gün.



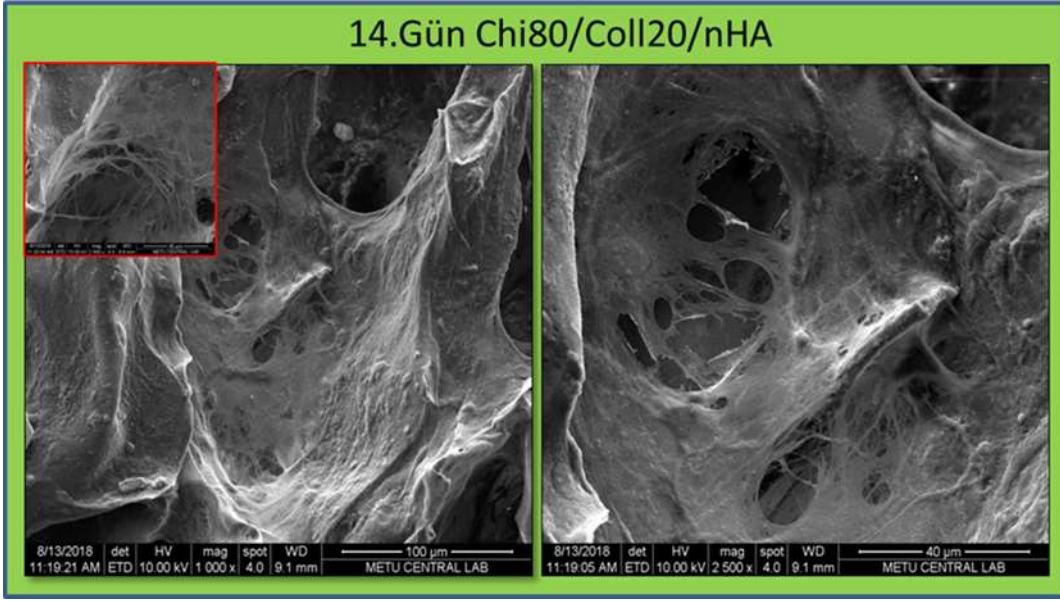
Şekil 5.17. Gliksal-chi80/Coll20/nHA üzerinde çoğalan MC3T3-E1 hücrelerine ait SEM (1000 X ve 2500 X) görüntüleri: 7.gün.



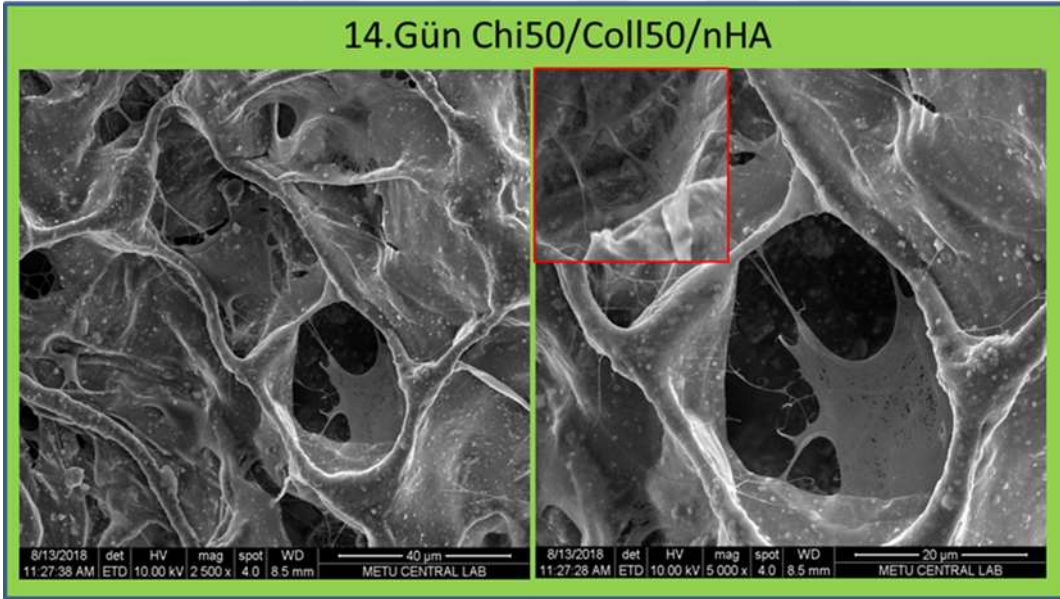
Şekil 5.18. Gliksal-chi50/Coll50/nHA üzerinde çoğalan MC3T3-E1 hücrelerine ait SEM (500 X ve 2500 X) görüntüleri: 14.gün.



Şekil 5.19. chi/nHA-kf üzerinde çoğalan MC3T3-E1 hücrelerine ait SEM (1000 X ve 2500 X) görüntüleri: 14.gün.



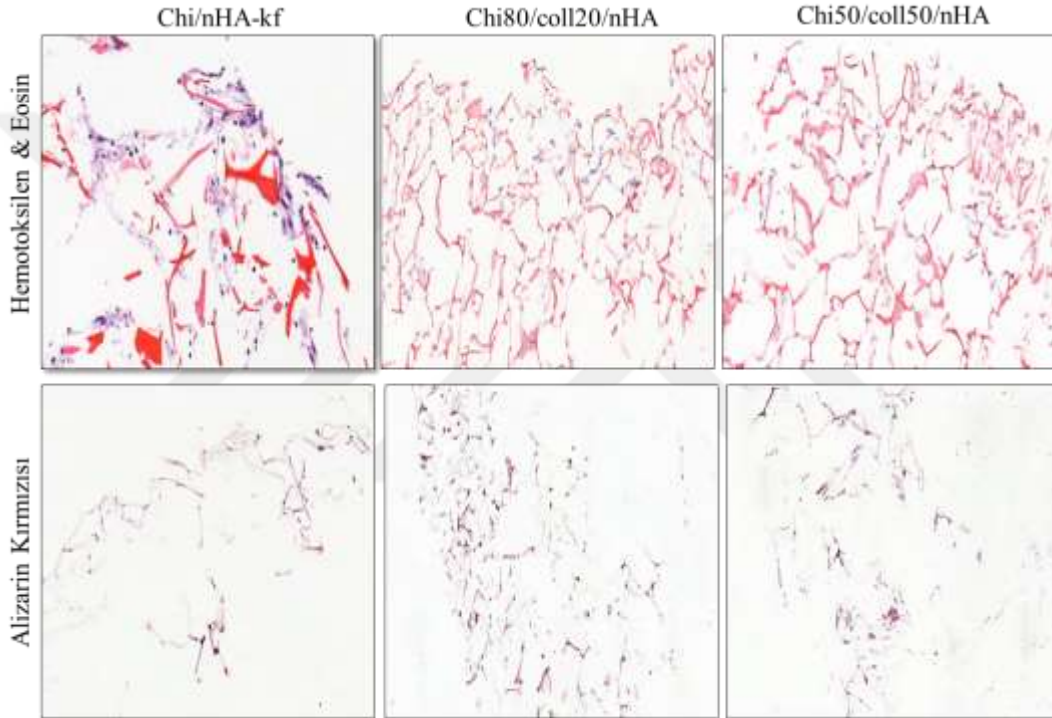
Şekil 5.20. Glioksal-chi80/coll20/nHA üzerinde çoğalan MC3T3-E1 hücrelerine ait SEM (1000 X ve 2500 X) görüntüleri: 14.gün.



Şekil 5.21. Glioksal-chi50/Coll50/nHA-kf üzerinde çoğalan MC3T3-E1 hücrelerine ait SEM (2500 X ve 5000 X) görüntüleri: 14.gün.

5.2.6. HİSTOLOJİK ANALİZ

MC3T3-E1 hücrelerin **chi/nHA-kf**, **chi80/coll20/nHA** ve **chi50/coll50/nHA** doku iskelelerindeki dağılımını saptamak amacıyla H&E boyama gerçekleştirilmiş ve Şekil 5.22’de 28. gün H&E boyamasına ait görüntüler sunulmuştur. Kemik matris mineralizasyonunu saptamak amacıyla, histolojik kesitler alınmış ve Alizarin red ile boyamalar gerçekleştirilmiştir. Şekil 5.22’de görülen görüntülerde hücrelerin ürettiği mineraller doku iskelesinin bazı bölgelerinde daha belirgindir. Bu da hücreler tarafından doku iskelelerindeki minerilizasyonu göstermektedir.

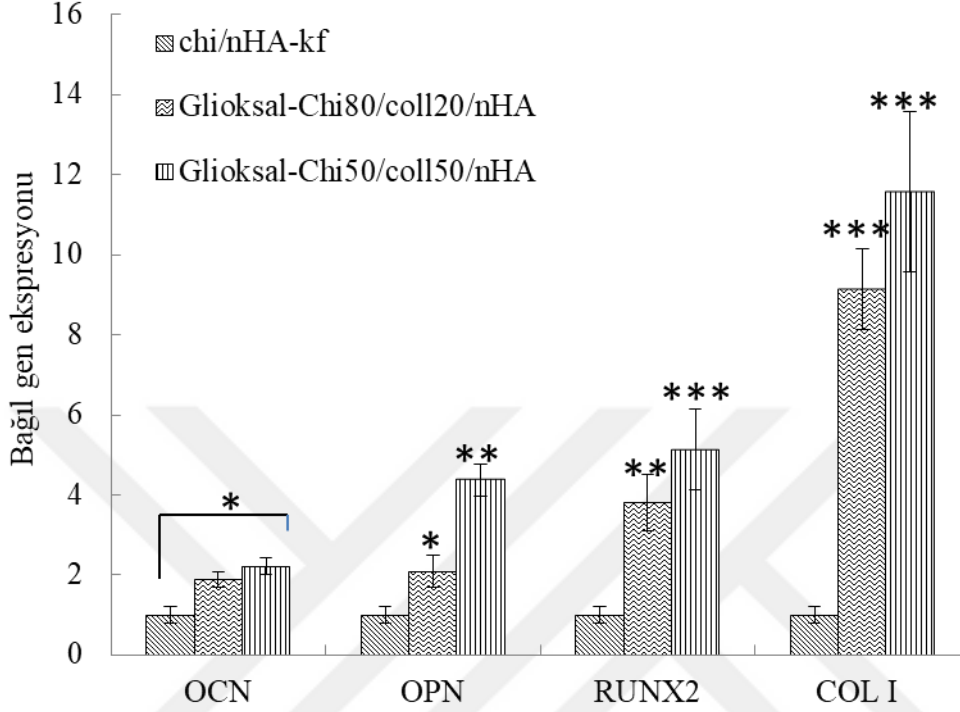


Şekil 5.22. MC3T3-Ê1 hücrelerin chi/nHA-kf, glioksal-chi80/coll20/nHA ve glioksal-chi50/coll50/nHA doku iskelelerindeki 28. gün H&E boyaması görüntüleri.

5.2.7. QRT-PCR

MC3T3-E1 hücrelerinin doku iskelelerindeki (**chi/nHA-kf**, **glioksal-chi80/coll20/nHA** ve **glioksal-chi50/coll50/nHA**) osteojenik farklılaşması kemiğe özgü 4 farklı genin, osteokalsin (*Ocn*) osteopontin (*Opn*), Runx2 ve Col I, kültürün 14.gününde ifade seviyeleri incelenmiştir. Doku iskelelerinden chi/nHA-kf kontrol grubu olarak belirlenmiş ve HPRT genine göre normalize edilmiştir. Şekil 5.23’de, MC3T3-E1 hücreleri kültürün 14. günde tüm kemiğe özgü genlerde doku iskelerinin kollajen içeriğinin artması ile

birlikte genlerin ekspresyon seviyelerinde kontrol grubuna (**chi/nHA-kf**) kıyasla anlamlı olarak artış göstermiştir ($p<0.001$).



Şekil 5.23. Kültürün 14. gününde elde edilen doku iskelelerine (chi/nHA-kf, glioksal-chi80/coll20/nHA ve glioksal-chi50/coll50/nHA) ait Ocn, Opn, RunX2 ve Col I gen ekspresyon seviyelerini gösteren RT-PCR analizi sonuçları. Kontrol grubu **chi/nHA-kf** iken istatistiksel farklar; * $p<0.05$, ** $p<0.01$ ve *** $p<0.001$).

5.3. KALSİFİYE KIKIRDAK (GEÇİŞ BÖLGESİ) FAZI İLE GERÇEKLEŞTİRİLEN HÜCRE KÜLTÜR ÇALIŞMALARINDAN ELDE EDİLEN SONUÇLAR

Osteokondral doku ünitesinin kalsifiye kıkırdak fazının biyomimetik bileşenleri göz önünde bulundurularak fazı oluşturacak farklı bileşimlerde kollajen tip II içeren kitosan/kollajen tip II/nHA jellerin hazırlanması amacıyla Bölüm 4.4’de açıklanan termal jelleşme yöntemi kullanılmıştır. Kollajen tip II içermeyen jeller (chi/nHA) kontrol grubu olarak seçilmiştir. Farklı kollajen tip II miktarlarının (w/w) hazırlanan jellerin kimyasal yapısı, morfolojik yapısı, reolojik özellikleri, mekanik dayanımı ve şişme davranışına olan etkisi incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar aşağıda açıklanmıştır. Kalsifiye kıkırdak fazının

bileşiminin belirlenmesine yönelik yürütülen çalışmalarda; kitosan/kollajen tip II bileşimleri (100:0, 70:30, 50:50 ve 30:70, w/w) olarak belirlenmiş, nHA oranı %0,5 (w/v) değerinde sabit tutulmuştur.

Çalışmalarda öncelikle, farklı kitosan derişimlerinde termal jelleşme deneyleri gerçekleştirilmiş ve jelleşme süreleri belirlenmiştir. Jelleşme şartları ve sonuçları, Çizelge 5.7’de sunulmuştur.

Çizelge 5.7. Kitosan çözeltisine ait hızlı jelleşme parametrelerinin bulunmasına yönelik gerçekleştirilen deneyler.

Kitosan çözeltisi hacmi ve derişimi	β - GP	NaOH (v,M)	pH	Açıklama
2ml (%1.5 w/v)	0.316g (susuz) ve 0.5 mL su	15 μ L 10 M	7.25	20 dk sonrasında hareketli
4ml (%1.5 w/v)	0.630 g (katı)	125 μ L 2 M	7.22	40 dak. jel
2ml (%2 w/v)	0.316g	120 μ L 2M	7.55	Anında Jelleşme
2ml (%2 w/v)	0.316g	100 μ L 2M	7.31	20 dak. az hareketli
2ml (%2 w/v)	0.316g	80 μ L 2M	7,18	20 dak. hareketli
2ml (%2 w/v)	0.316g (susuz) ve 0.5 mL su	100 μ L 2M	7.18	20 dak. yumuşak jel
2ml (%2 w/v)	0.316g	100 μ L 2M	6.98	20 dak. yumuşak jel
2ml (%2.5 w/v)	0.316g ve 0.5 mL su	110 μL 2M	7.30	15 dak. jel
2ml (%2.5 w/v)	0.316g ve 0.5 mL su	20 μL 10M	7.15	18 dak. jel

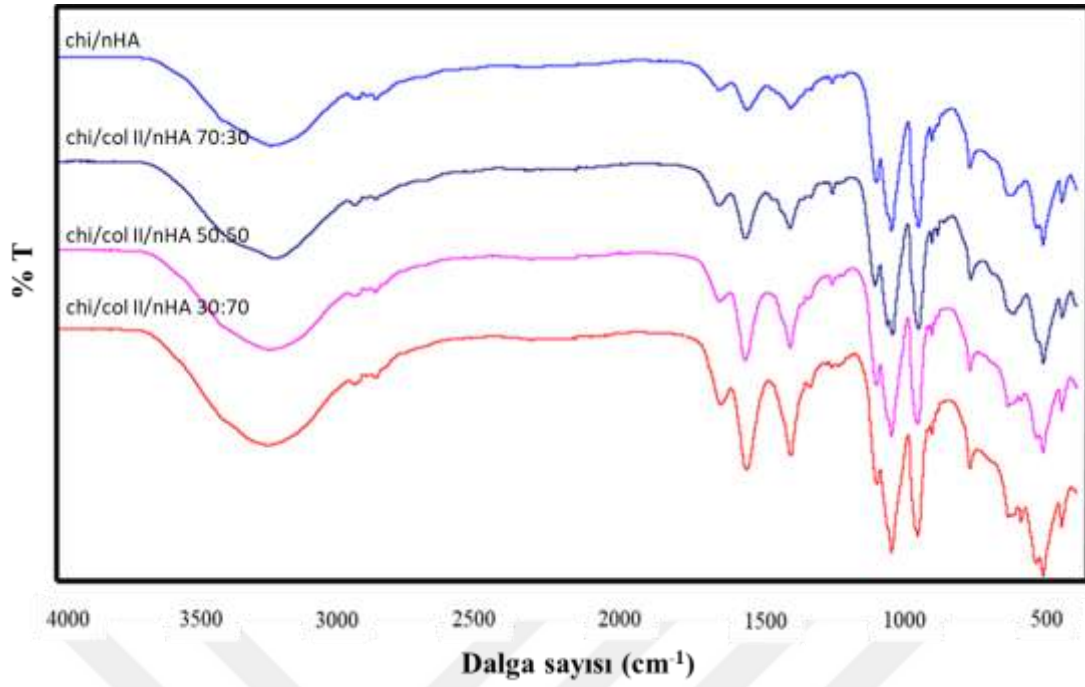
Jelin oluşumu ve jelleşme süresi, çözeltinin sıvı halindeki şeffaflıktan beyaz/griye dönüştüğü zamana göre belirlenmiştir. Gerçekleştirilen deneyler sonucunda en kısa jelleşme süresinin elde edildiği kitosan hacmi ve derişimi, kollajen içeren jellerin hazırlanmasında bu kitosan derişimi kullanılmıştır. Buna göre, chi/ coll II/ nHA bileşimindeki jellerin hazırlanmasında kullanılan karışımlar Çizelge 5.8’de özetlenmiştir.

Çizelge 5.8. Farklı oranlardaki chi/ col II / nHA jel örneklerinin hazırlanmasında kullanılan karışımların bileşimi.

chi:coll II (w/w)	Toplam hacim (μ L)	β -GP (μ L)	genipin (μ L)	NaOH (μ L)	nHA (mg)
100:0	1308	250	48	10	6.54
70:30	1184	224	43	25	5.92
50:50	1215	227	45	37	6.20
30:70	1204	224	43	45	6.18

5.3.1. FTIR-ATR İLE KALSİFİYE KIKIRDAK FAZINA AİT KİMYASAL YAPI ANALİZİ

Çalışma kapsamında kalsifiye kıkırdak yapısı için hazırlanan jellere ait FTIR-ATR spektrumları Şekil 5.24’de sunulmuştur. Spektrumlardan elde edilen veriler Çizelge 5.9’da ayrıntılı olarak verilmiştir. Kalsifiye kıkırdak fazı için hazırlanan jellerin kimyasal yapıları FTIR-ATR ile analiz edildiğinde, yapıda bulunan tüm karakteristik piklerin varlığı tespit edilmiştir. Bununla birlikte, kitosan ve kollajen tip II yapısında bulunan karakteristik yapılar birbirine benzerlik gösterdiğinden (amid I ve amid II grupları gibi), FTIR-ATR analizinden elde edilen pikler arasında farklılık gözlemlenememiştir.



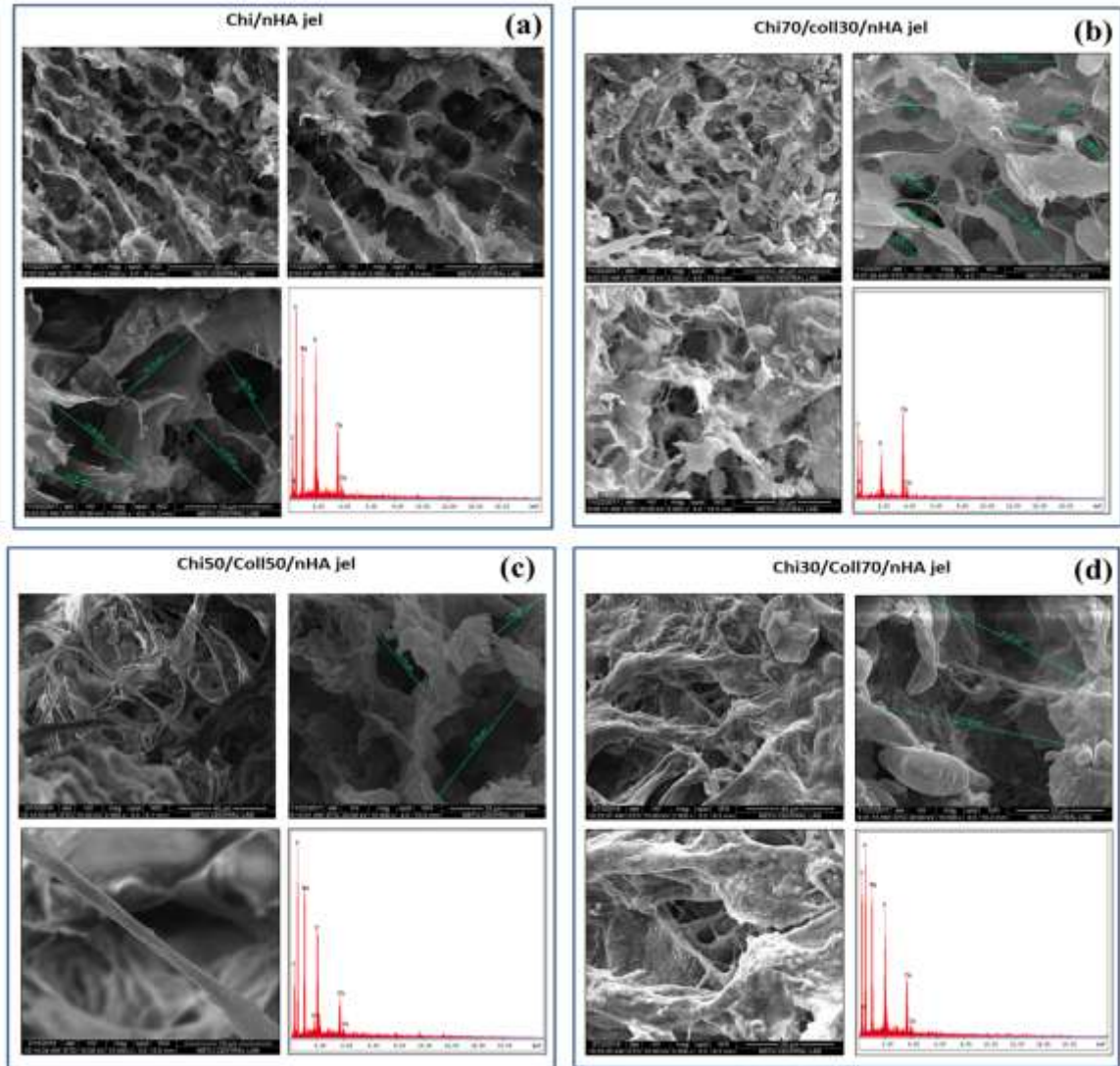
Şekil 5.24. Kalsifiye kıkırdak fazına ait (chi/nHA, chi/coll II/nHA 70:30, chi/coll II/nHA 50:50, chi/coll II/nHA 30:70) FTIR-ATR spektrumları.

Çizelge 5.9. Kalsifiye kıkırdak jel fazına ait FTIR-ATR spektrumlarının değerlendirilmesi

Örnekler	IR absorpsiyon bantları (cm ⁻¹)	Açıklama
Kalsifiye kıkırdak fazına ait jeller	3234	N-H gerilme bandı
	1659	C=O gerilmesi (amid I bandı)
	1564	NH ₂ deformasyonu (amid II bandı)
	1409	-CH ₂ - vibrasyonları
	1263,68	
	1109	C-O titreşimleri
	1054	C-O-C vibrasyonları
	959, 964	PO ₄ ⁻³ 'den gelen P-O vibrasyonu

5.3.2. KALSİFİYE KIKIRDAK FAZINA AİT SEM İLE MORFOLOJİ ANALİZİ

Taramalı elektron mikroskobundan (SEM) elde edilen görüntüler ve EDAX analizinden elde edilen veriler Şekil 5.25’de farklı gruptaki kalsifiye kıkırdak hidrojel yapıları için verilmiştir. Kalsifiye kıkırdak faz için hazırlanan jel yapılarının SEM analizinden elde edilen görüntüler incelendiğinde, tüm jellerde gözenekli yapılar elde edildiği görülmektedir.



Şekil 5.25.Kalsifiye kıkırdak fazına ait SEM (2 500 X, 5000 X ve 10000 X) görüntüleri ve EDAX verileri, (a) chi/nHA, (b) chi/Coll/nHA 70: 30, (c) chi/coll/nHA 50:50, (d) chi/coll/nHA 30:70.

Kollajen tip II'in yapıya katılmasıyla, kollajene özgü fiber yapıların varlığı dikkat çekmektedir ve EDAX verileri tüm jel yapılar içerisinde HA varlığını doğrulamaktadır (Çizelge 5.10).

Çizelge 5.10. Kalsifiye kıkırdak fazına ait jel yapıların EDAX ile elemental analiz sonuçları.

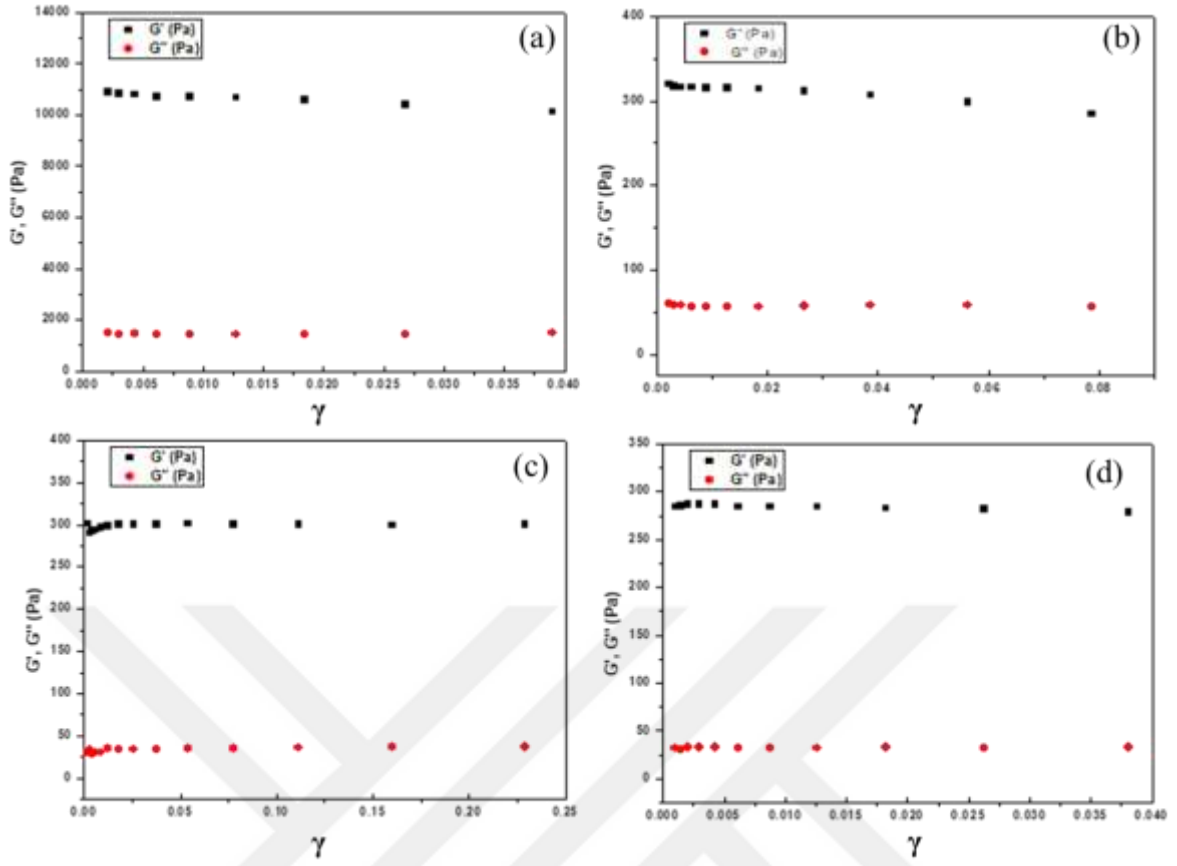
Kalsifiye kıkırdak fazı					
Örnekler	C	O	Ca	P	N
Chi/nHA jel	33,98±0,88	39,91±0,24	1,86±0,24	8,9±0,41	2,91
Chi/CollIII/nHA 70:30	38,9±1,81	36,01±0,33	4,09±0,88	7,58±0,24	4,58±0,5
Chi/CollIII/nHA 50:50	33,45±0,18	38,25±0,56	3,99±0,21	8,55±0,21	-
Chi/CollIII/nHA 30:70	39,31±6,8	34,82±3,4	4,91±0,55	6,22±0,44	3,81±0,53

5.3.3. KALSİFİYE KIKIRDAK FAZINA AİT JELLERİN SU TUTMA KAPASİTELERİ

Kalsifiye kıkırdak fazına ait jellerin (chi/nHA, chi/Coll/nHA 70: 30, chi/coll/nHA 50:50 ve chi/coll/nHA 30:70) su tutma kapasiteleri sırasıyla %96±0,24, 99,74±5,24, 97,87±0,56 ve 95,62±0,78 bulunmuş ve Çizelge 5.10'da verilmiştir.

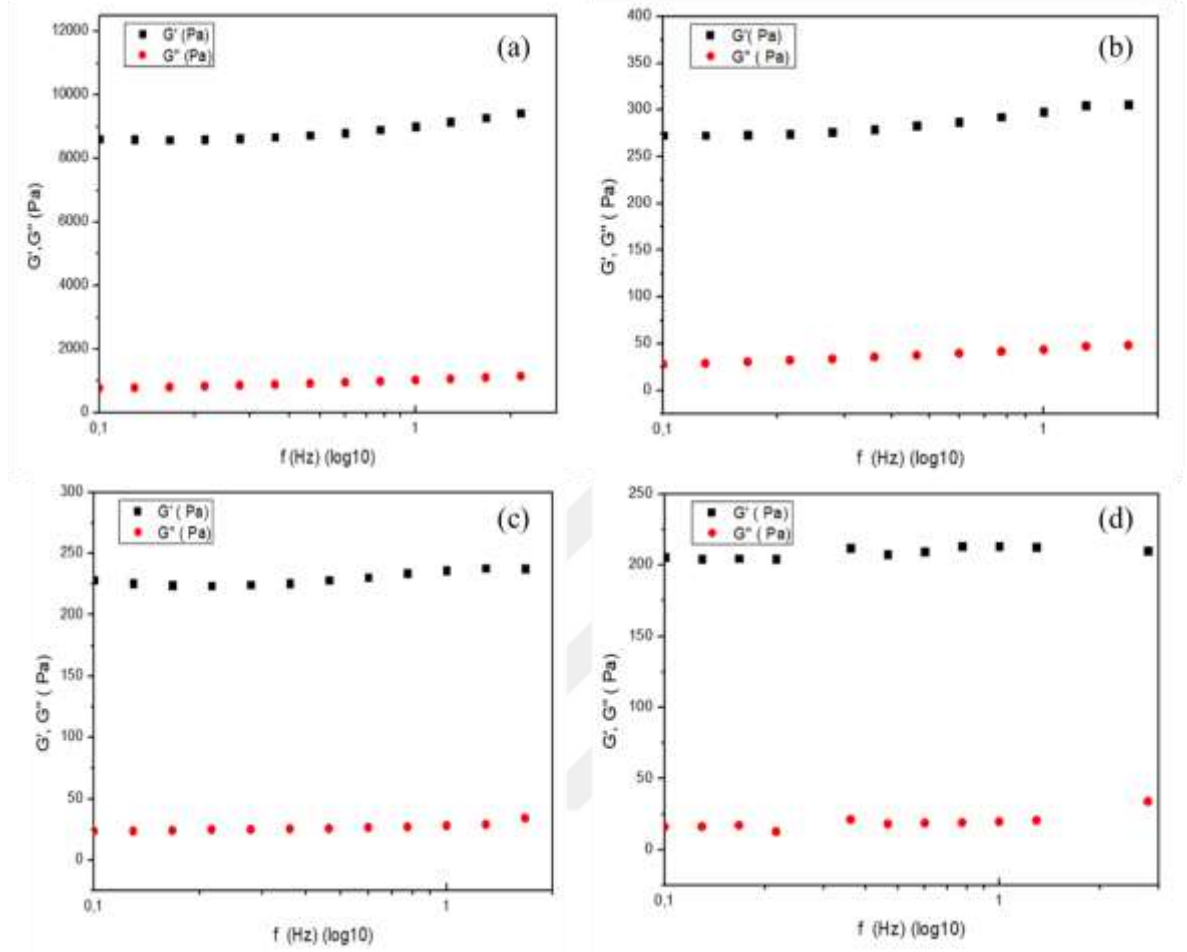
5.3.4. REOLOJİK ANALİZLER

Jel yapıların ağ yapılarının karakterizasyonu ve elastik modülüs değerlerinin belirlenmesinde kullanılan önemli yöntemlerden biri de reolojik analizlerdir. Reolojik analizlerden elde edilen sonuçlar Şekil 5.26'da ve Şekil 5.27'de sunulmuştur. Şekil 5.26'dan elde edilen verilerden hidrojellerin viskoelastik bölgesi (LVR) %0,01 olarak belirlenmiş, ardından bu aralıkta yapılan frekans taraması, G' ve G'' değerleri elde edilmiştir (Şekil 5.27).



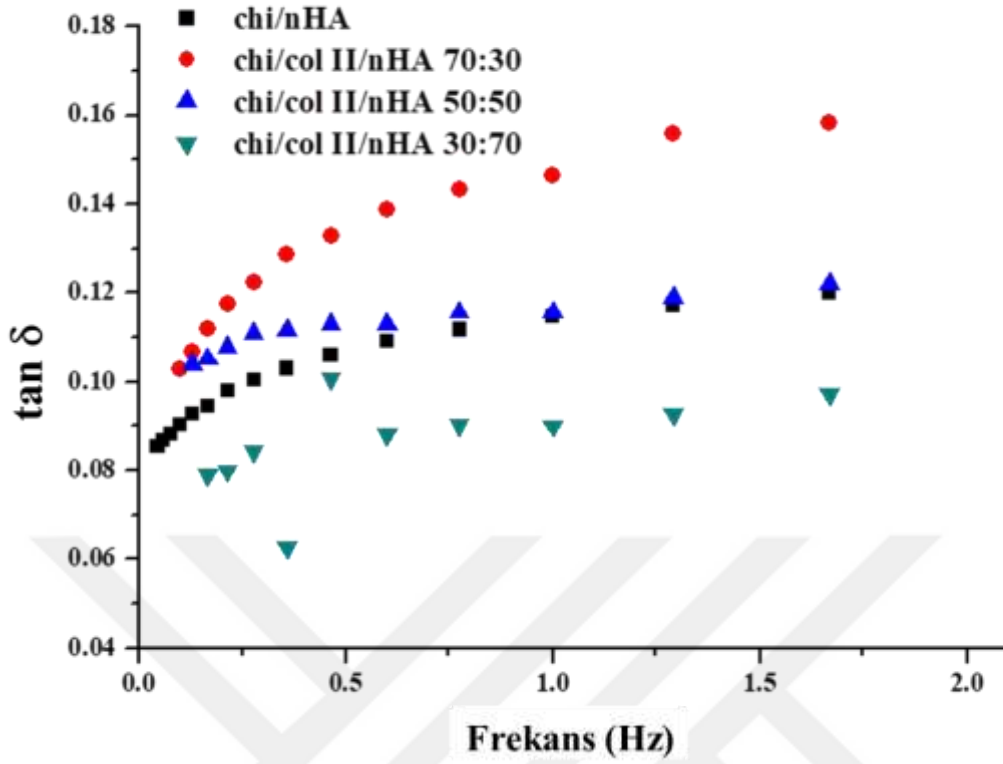
Şekil 5.26. Kalsifiye kıkırdak fazına ait deformasyon (γ) değerlerine karşılık G' ve G'' (Pa) değerleri, (a) χ/nHA , (b) $\chi/\text{Coll/nHA}$ 70: 30, (c) $\chi/\text{coll/nHA}$ 50:50, (d) $\chi/\text{coll/nHA}$ 30:70.

Hidrojel bileşiminde kollajen tip II miktarının artması ile G' değerlerinde bir azalma olduğu görülmüştür.



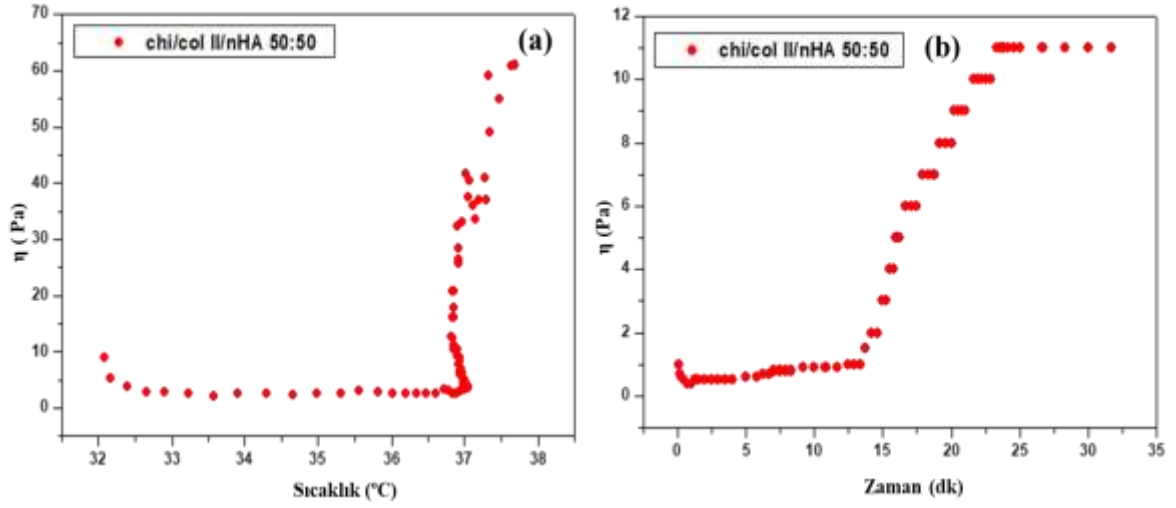
Şekil 5.27. Kalsifiye kıkırdak fazına salınımlı frekans değerlerine karşılık gelen G' ve G'' değerleri (a) chi/nHA, (b) chi/Coll/nHA 70: 30, (c) chi/coll/nHA 50:50, (d) chi/coll/nHA 30:70.

Viskoelastik özelliğin belirlenmesinde kullanılan bir diğer önemli parametre kayıp tanjant ($\tan \delta$) (loss tangent) değeridir. Jel yapılarına ait $\tan \delta$ değerleri Şekil 5.28 ve Çizelge 5.11’de verilmiştir. Çapraz bağlı hidrojellerin yapı-özellik ilişkisini bulmak amacıyla, çapraz bağlar arasındaki ortalama moleküler ağırlık (M_c) ve gözenek boyutu veya korelasyon uzunluğu (ξ) hesaplanmıştır (Eşitlik 4.2-4.3). Gözenek boyutu (ξ), viskoelastik hidrojeller üzerine uygulanabilen kauçuk elastik teorisinden elde edilmiştir (97). Çapraz bağlar arasındaki ortalama moleküler ağırlık (M_c) ve gözenek boyutu (ξ) Çizelge 5.10’da verilmiştir.



Şekil 5.28. Hidrojellerin frekans değerinin bir fonksiyonu olarak kayıp tanjant ($\tan \delta$) değeri.

Jelleşme sıcaklığı ve süresini bulunması amacıyla sıcaklık ve zamana göre viskozite değişimi incelenmiştir. Elde edilen sonuçlardan jelleşme sıcaklığı ve süresi sırasıyla 37 °C ve 25 dk olarak bulunmuştur.



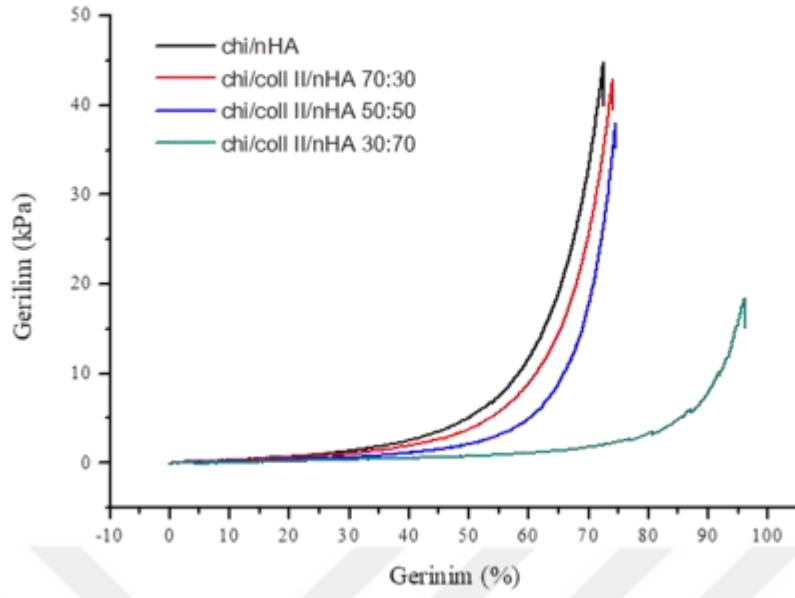
Şekil 5.29. Chi/coll II/ nHA 50:50 hidrojel için sıcaklık ve zamana göre viskozite değişimi.

Çizelge 5.11. Tüm hidrojellerin reolojik verileri.

Hidrojeller	%Su tutma kapasitesi	G' (Pa)	G''(Pa)	tanδ	Mc (kg/mol)	ξ (nm)
chi/nHA	96,00±0,2	9434,1	1160,06	0,12	4,97	7,6
chi/col II/nHA 70:30	99,74±5,2	305,8	48,41	0,16	91,61	24,0
chi/col II/nHA 50:50	97,87±0,6	238,3	29,13	0,12	93,84	26,0
chi/col II/nHA 30:70	95,62±0,8	213,5	19,76	0,092	94,39	27,4

5.3.5. MEKANİK DAYANIM

Chi/nHA, chi/coll II/nHA 70:30, chi/coll II/nHA 50:50 ve chi/coll/nHA 30:70 basma modül değerleri sırasıyla $6,48 \pm 1,19$, $2,21 \pm 0,22$, $1,47 \pm 0,021$ ve $1,07 \pm 0,084$ kPa olarak bulunmuştur (Şekil 5.30). Kollajen oranının artması ile birlikte basma modüllerinde azalma gözlenmiştir.

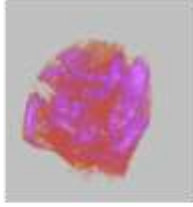
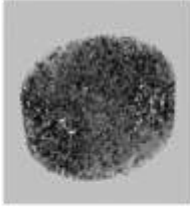


Şekil 5.30. Kalsifiye kıkırdak fazına ait jellerin sıkıştırma sonucu elde edilen gerilim-gerinim eğrileri.

5.3.6. KALSİFİYE KIKIRDAK FAZINA AİT MİKRO-CT (μ -CT) ANALİZİ

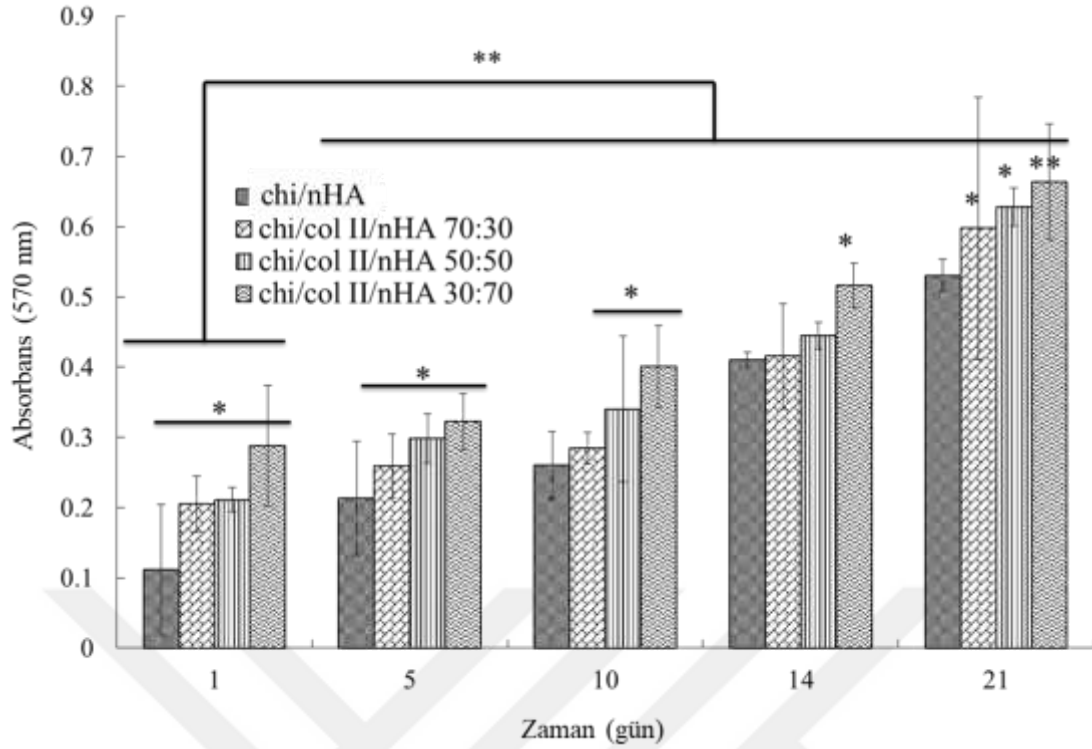
Kitosan/kollajen tip II/nHA jeller (Chi/nHA, chi/coll II/nHA 70:30, chi/coll II/nHA 50:50 ve chi/coll/nHA 30:70) ile gerçekleştirilen mikro-CT analizlerinden elde edilen sonuçlar Çizelge 5.12’de verilmiştir. Tüm jellerden %80 üzerinde %toplam gözeneklilik değerleri elde edilmiştir.

Çizelge 5.12. Kalsifiye kıkırdak fazı örneklerinin mikro-CT analizinden elde edilen veriler.

Örnekler	chi/nH A	chi/coll II/nHA 70:30	chi/coll II/nHA 50:50	chi/coll II/nHA 30:70
Özellikler				
Doku iskelesi hacmi (mm ³)	561,61	282,22	250,23	238,40
Kapalı gözenek sayısı	1408	6909	5734	6909
Açık gözeneklilik (%)	95,03	81,41	80,39	82,66
Kapalı gözeneklilik (%)	4,70	3,46	3,72	3,78
Toplam gözeneklilik (%)	95,27	82,05	83,73	83,32
İçsel bağlantı	5638	19818	3130	4193

5.3.7. PRESTOBLUE İLE ÜREME ANALİZİ

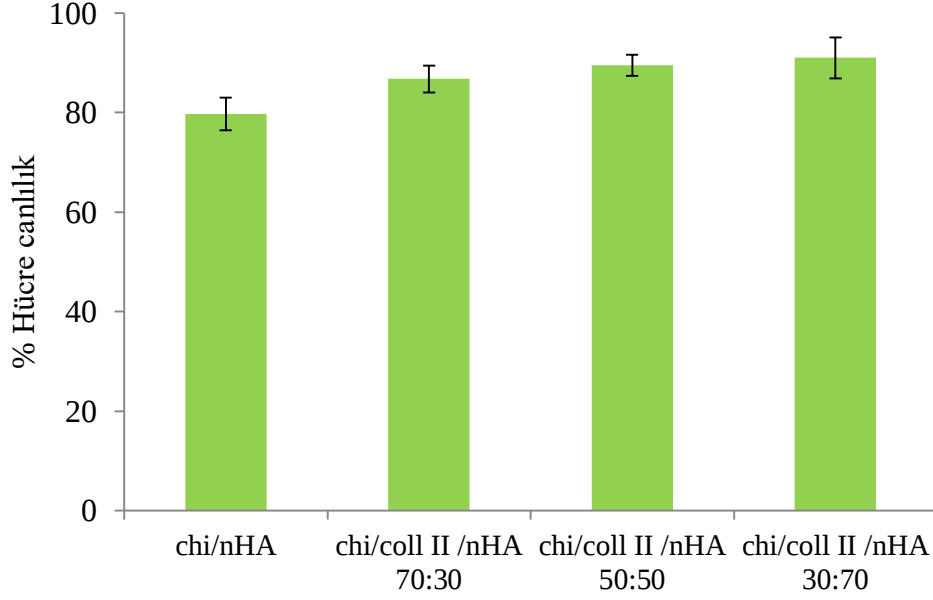
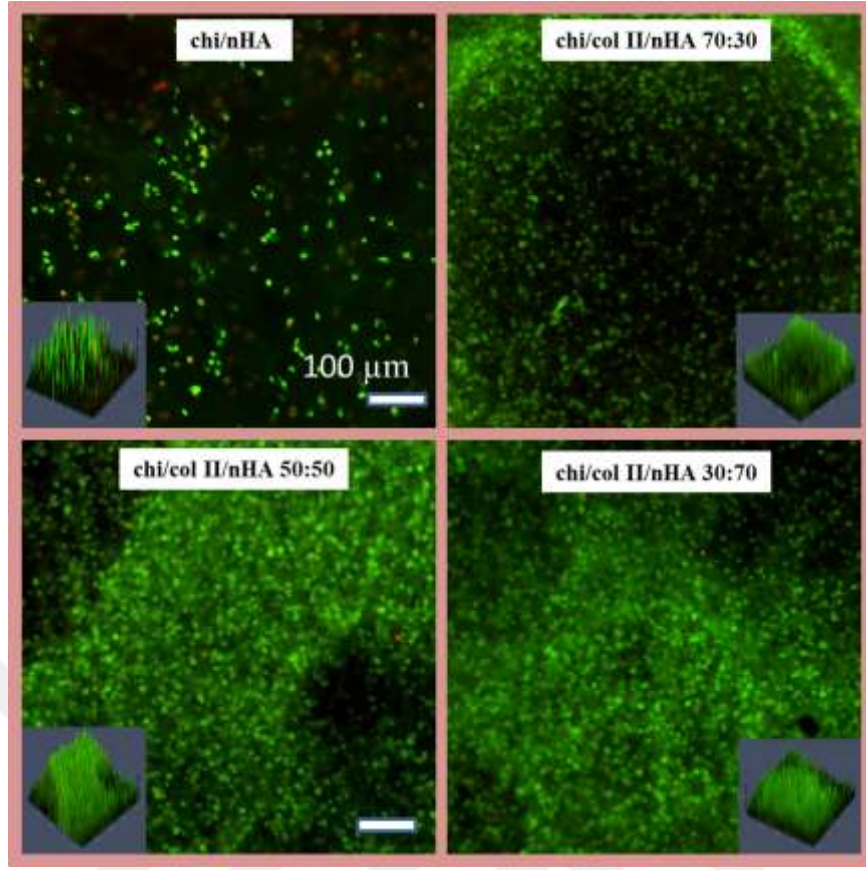
ATDC5 hücrelerin **chi/nHA**, **chi/coll II/nHA 70:30**, **chi/coll II/nHA 50:50** ve **chi/coll/nHA 30:70** jel yapılarındaki **üreme davranışı** ve mitokondriyal aktiviteleri kültürün belirli günlerinde (1., 5. 10. 14 ve 21.günler) **Presto Blue** analizi ile tayin edilmiş ve zamana bağlı olarak optik yoğunluk değerleri Şekil 5.31’de verilmiştir. Şekil 5.32’de görüldüğü gibi, ATDC5 hücreleri tüm jel grupları içerisinde canlılıklarını artarak devam ettirmişler ve 21 gün süre ile üremelerini sürdürmüşlerdir. Kültürün 14.gününde en yüksek hücre canlılığı chi/coll/nHA 30:70 jellerde elde edilmiştir (chi/nHA jeller kontrol grubu). Genel olarak, kollajen içeren hidrojeller içerisinde üreyen hücrelerden elde edilen optik yoğunluk değerleri, kültürün 1. gününden itibaren kontrol grubu olan chi/nHA jellerine göre daha yüksektir ($p<0,001$).



Şekil 5.31. Chi/nHA, chi/coll II/nHA 70:30, chi/coll II/nHA 50:50 ve chi/Coll/nHA 30:70 jel yapılarında çoğalan ATDC5 hücrelerine ait Presto-Blue grafiği (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık, n=3, kontrol grubu Chi/nHA iken *p<0,05, **p<0,01).

5.3.8. KALSİFİYE KIKIRDAK FAZINA AİT HÜCRE CANLILIK (LIVE/DEAD) ANALİZİ

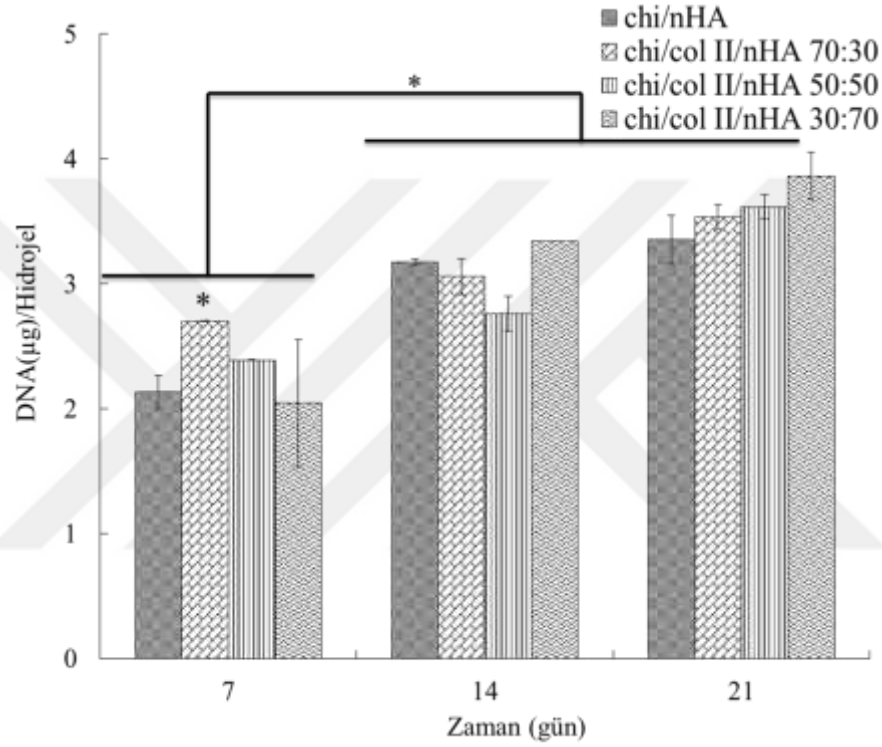
Chi/nHA, chi/coll II/nHA 70:30, chi/coll II/nHA 50:50 ve Chi/Coll/nHA 30:70 jeller içerisinde üremekte olan hücrelerden kültürün 7.gününde alınan konfokal mikroskobu görüntüleri Şekil 5.32’de sunulmuştur. Calcein AM ile boyanması sonucu yeşil ışımaya ile görüntülenen canlı hücreler yoğunluğunun, kollajen içeren jellerde daha fazla olduğu görülmektedir (Şekil 5.32). Chi/nHA, chi/coll II/nHA 70:30, chi/coll II/nHA 50:50 ve chi/coll/nHA 30:70 jellerine ait %hücre canlılık değerleri sırasıyla 79.75 ± 3.30 , 86.75 ± 2.75 , 89.5 ± 2.75 ve 91 ± 4.08 olarak saptanmış ve Şekil 5.32’de kıyaslamalı olarak verilmiştir.



Şekil 5.32. Chi/nHA, chi/coll II/nHA 70:30, chi/coll II/nHA 50:50 ve chi/coll/nHA 30:70 jel yapılarında kültürün 7. gününde üremekte olan ATDC5 hücrelerine ait konfokal görüntüleri. Yeşil ışımaya canlı hücreleri, kırmızı ise ölü hücreleri göstermektedir.

5.3.9. KALSİFİYE KIKIRDAK FAZINA AİT DNA MİKTAR ANALİZİ

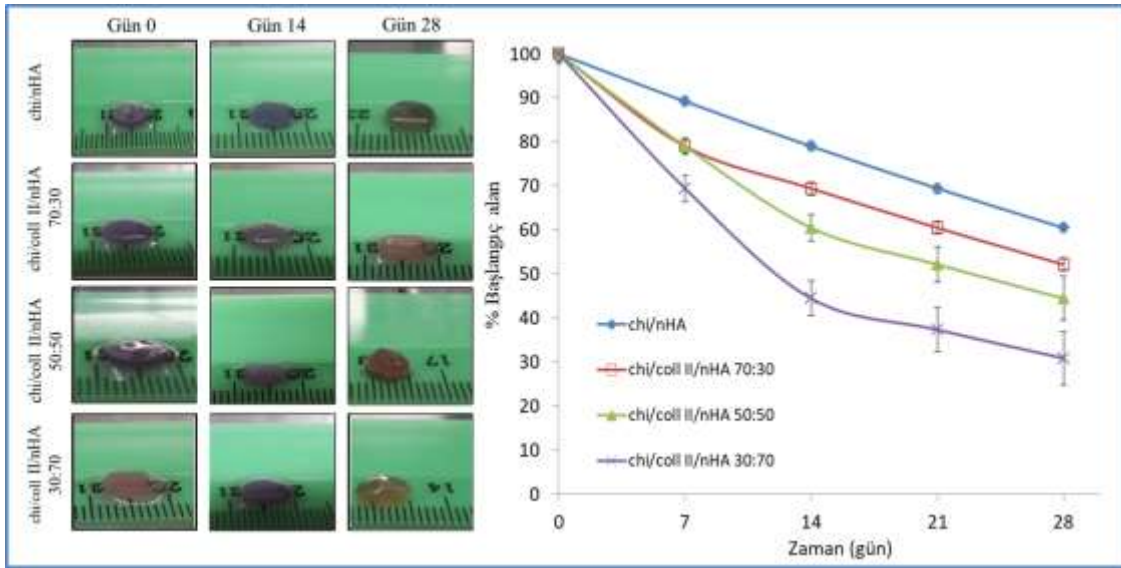
Prestoblue ile hücre üreme analizi ve hücre canlılık testine ek olarak jeller içindeki DNA içeriğinin kantitatif olarak değerlendirilmesiyle de doğrulanmıştır. Şekil 5.33, tüm gruplarda kültür süresince artmış olan hidrojel başına DNA içeriğini göstermektedir ($p<0.01$). Gruplar kendi içinde değerlendirildiklerinde önemli bir farklılık görülmemiştir.



Şekil 5.33. Hidrojel gruplarının DNA içerik analizi (* $p<0.05$, 7.gün hidrojeller kontrol olarak kabul edilmiştir).

5.3.10. HİDROJELLERDE KONTRAKSİYON

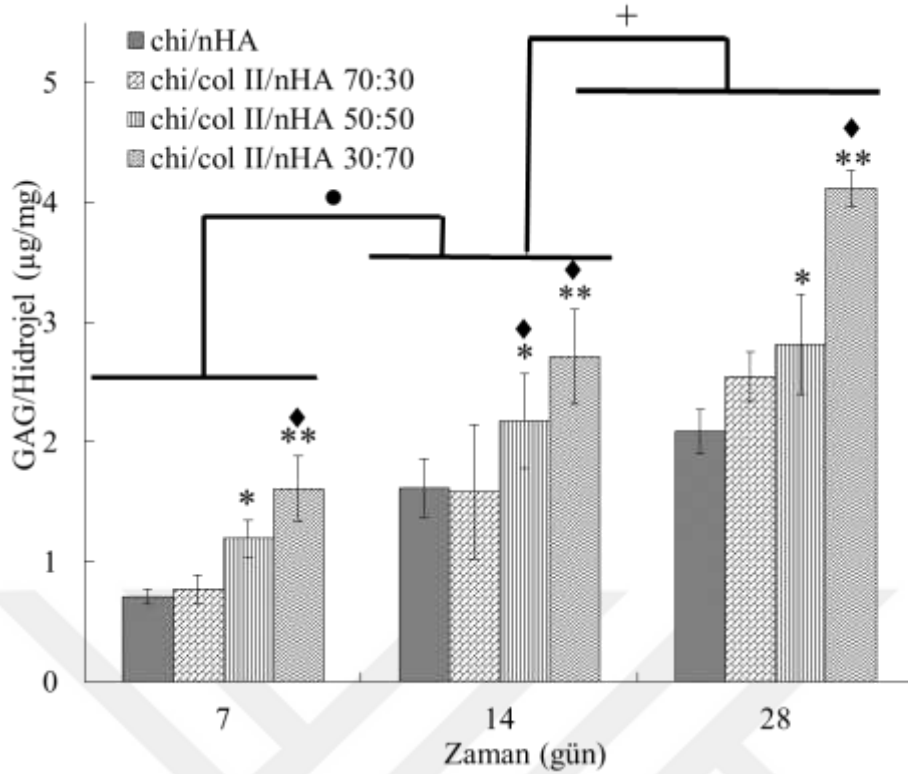
ATDC5 hücre enkapsüle edilmiş hidrojellerde kültürde zaman içinde jel alanındaki değişim incelenmiştir (Şekil 5.34). Kollajen içermeyen chi/nHA jelinde 4 haftalık kültür periyodu sonunda en az kontraksiyon (%39,5) görülmüştür. Yapı içerisindeki kollajen yüzdesi arttıkça hidrojel yapılarında kontraksiyon artmıştır. Dört haftalık kültür sonucunda en fazla kontraksiyon %70.6 değeri ile Chi/Coll/nHA 30:70 grubunda görülmüştür.



Şekil 5.34. ATDC5 hücre içeren hidrojellerin zamana bağlı kontraksiyonu.

5.3.11. KALSİFİYE KIKIRDAK FAZINA AİT GLİKOZAMİNOGLİKAN (GAG) ANALİZİ

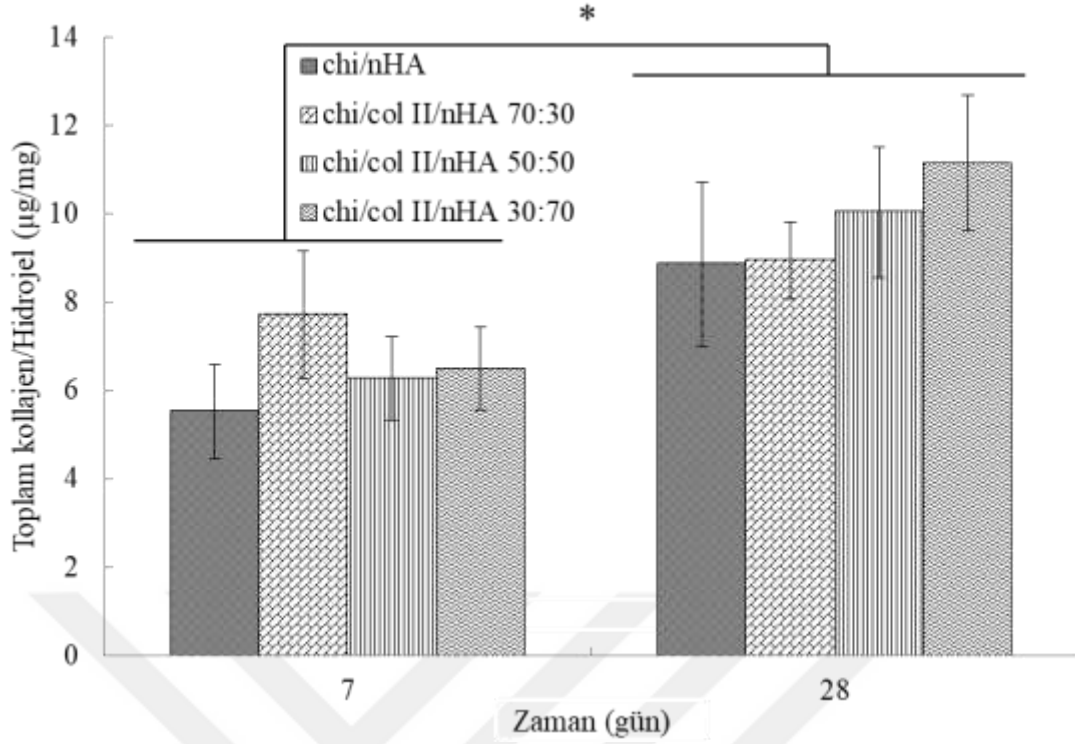
Kültürün 7., 14. ve 21. günlerinde hidrojellere enkapsüle edilmiş ATDC5 hücrelerinin hidrojel başına ortalama GAG üretimini göstermektedir (Şekil 5.35). Hücre içeren hidrojel grupları gün bazından biyokimyasal analiz sonucunda değerlendirildiklerinde 7.gün ve 14. ve 21. günler arasında istatistiksel olarak GAG artışı gözlenmiştir ($p < 0.01$). Hücre içeren Chi/Coll/nHA 50:50 ve Chi/Coll/nHA 30:70 hidrojellerinde 7., 14. ve 21. günlerde kontrol grubu olan Chi/nHA hidrojeline kıyasla istatistiksel olarak daha yüksek bir ortalama GAG miktarı belirlenmiştir ($p < 0.001$). Bu sonuçlar, ATDC5 hücre enkapsüle edilerek hazırlanan hidrojel gruplarının GAG üretimi üzerinde artan kollajen tip II oranının önemli bir etkisi olduğunu göstermiştir.



Şekil 5.35. Hidrojellere enkapsüle edilmiş ATDC5 hücrelerinin ürettiği GAG analizi (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ kontrol grubu chi/nHA, ♦ $p < 0.05$ chi/col II/nHA 70:30, ● $p < 0.05$ 7. gün ve + $p < 0.05$ 14.gün hidrojeller kontrol grubu olarak seçilmiştir).

5.3.12. KOLLAJEN İÇERİK ANALİZİ

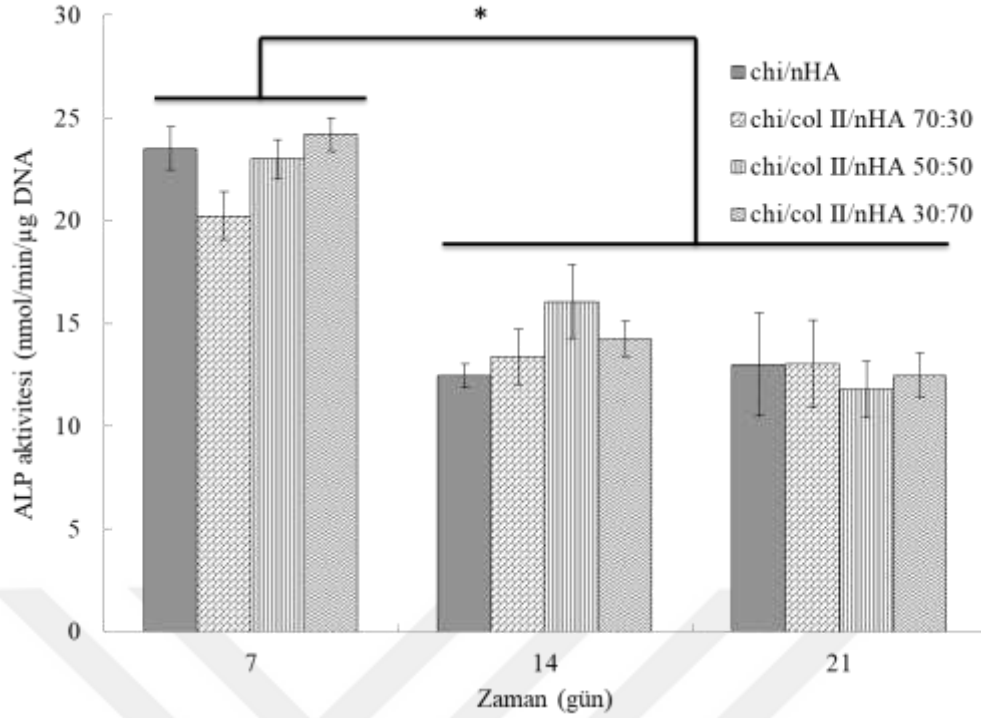
Şekil 5.36, hidrojel başına toplam kollajen içeriğinin sonuçlarını göstermektedir. Toplam kollajen içeriği, gün bazında değerlendirildiğinde kültürün 28. gününde elde edilen sonuçlar 7. gününe kıyasla istatistiksel olarak yüksek bulunmuştur. Gruplar kendi arasında kıyaslandığında kültürün 7. ve 28. gününde anlamlı artış gözlenmiştir. Hidrojel grupları arasında gün bazında anlamlı fark gözlenmemiştir.



Şekil 5.36. Hidrojellerin 7.ve 28. günlerde toplam kollajen içerik analizi (* $p<0.05$, 7.gün hidrojeller kontrol olarak kabul edilmiştir).

5.3.13. KALSİFİYE KIKIRDAK FAZINA AİT ALKALİN FOSFATAZ (ALP) AKTİVİTESİ

Kondrosit hipertrofisi ve endokondral ossifikasyon belirteci olan alkalın fosfataz (ALP) aktivite testi yapılmıştır (Şekil 5.37). Her dört jel grubu için de en yüksek ALP aktivite 7.günde görülmüştür. Kültürün 14. ve 21.gününde ise kültürün 7.gününe göre anlamlı azalma görülmüştür ($p<0.05$).



Şekil 5.37. Hidrojellerin 7., 14. ve 21. günlerdeki ALP aktivitesi (* $p < 0.05$, 7.gün hidrojeller kontrol olarak kabul edilmiştir).

5.3.14. RT-PCR ANALİZİ

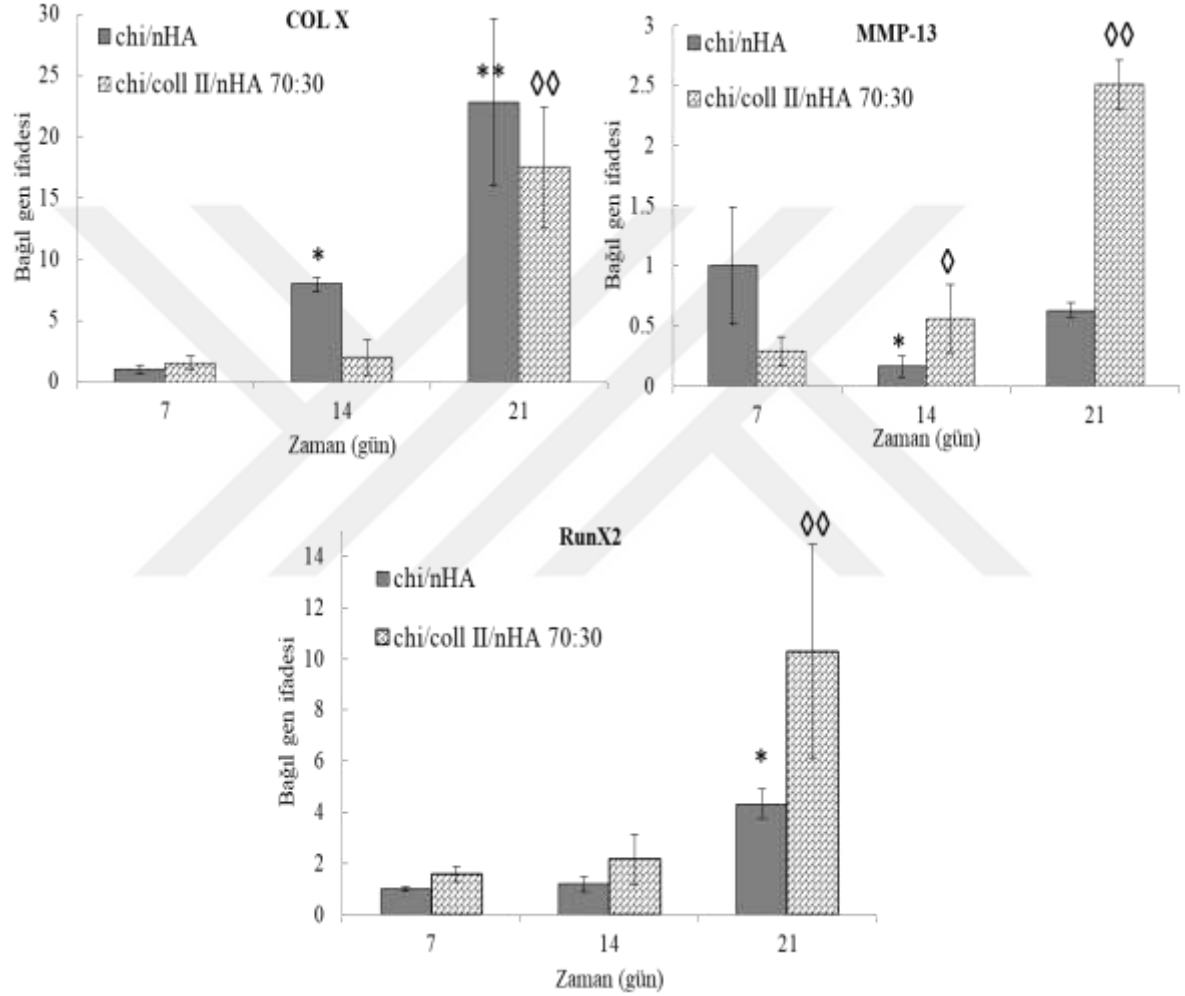
Kalsifiye kıkırdak fazının kalsifikasyon sürecinin ve hipertrofik hücreye farklılaşmasının önemli belirteçleri olan kalsifiye kıkırdağa özgü COL X, MMP-13 ve Runx2 genlerinin kültürün 7. , 14. ve 21.günlerinde chi/nHA, chi/coll II/nHA 70:30, chi/coll II/nHA 50:50 ve chi/coll/nHA 30:70 jeller için ekspresyon seviyelerine bakılmıştır (Şekil 5.38). Tüm genlerin ekspresyon seviyeleri kıyaslama amacıyla kontrol geni olarak ATDC5 hücrelerinde stabil gen olan PPIA'ya göre normalize edilmiştir (98).

COL X geni gruplardan chi/nHA, chi/coll II/nHA 70:30 jellerinde eksprese olurken, chi/coll II/nHA 50:50 ve chi/coll/nHA 30:70 ise ekspresyon görülmemiştir. Gün bazında değerlendirildiklerinde chi/nHA jellerinde kültürün 14. ve 21.günlerinde 7.gününe kıyasla önemli bir artış gözlenmiştir ($p < 0.01$ ve $p < 0.001$). Chi/coll II/nHA 70:30 jeli için ise COL X ekspresyonu kültürün 7.gününe kıyasla 14. gününde anlamlı fark görülmezken, 21.gününde ise ekspresyon seviyelerinde anlamlı artış gözlenmiştir ($p < 0.001$).

MMP-13 ekspresyonu aynı şekilde gruplardan chi/nHA, chi/coll II/nHA 70:30 jellerinde görülürken, chi/coll II/nHA 50:50 ve chi/coll/nHA 30:70 jellerinde görülmemiştir.

Chi/nHA jellerinde kültürün gün bazında önemli bir artış gözlenmemiştir ($p>0.001$). Chi/coll II/nHA 70:30 jellerinde ise MMP-13 ekspresyonu kültürün 14. ve 21.günlerinde 7.güne kıyasla anlamlı artış gözlenmiştir ($p<0.05$ ve $p<0.01$).

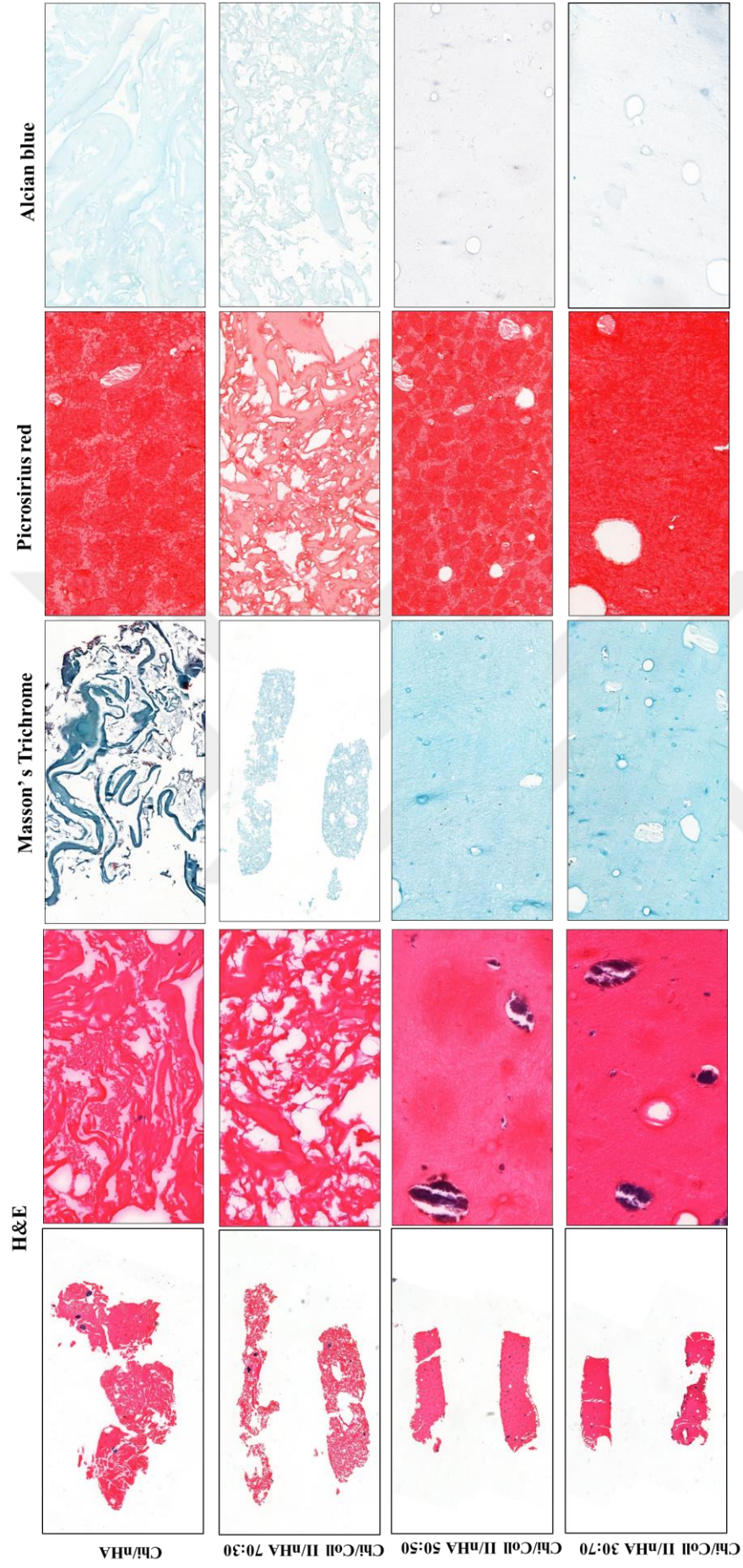
RunX2 ekspresyon seviyeleri hem chi/nHA hem de chi/coll II/nHA 50:50 jelleri için kültürün 7.gününe kıyasla 14.gününde anlamlı fark görülmezken 21. gününde ise her iki jeller için anlamlı bir fark görülmüştür ($p<0.05$ ve $p<0.01$).



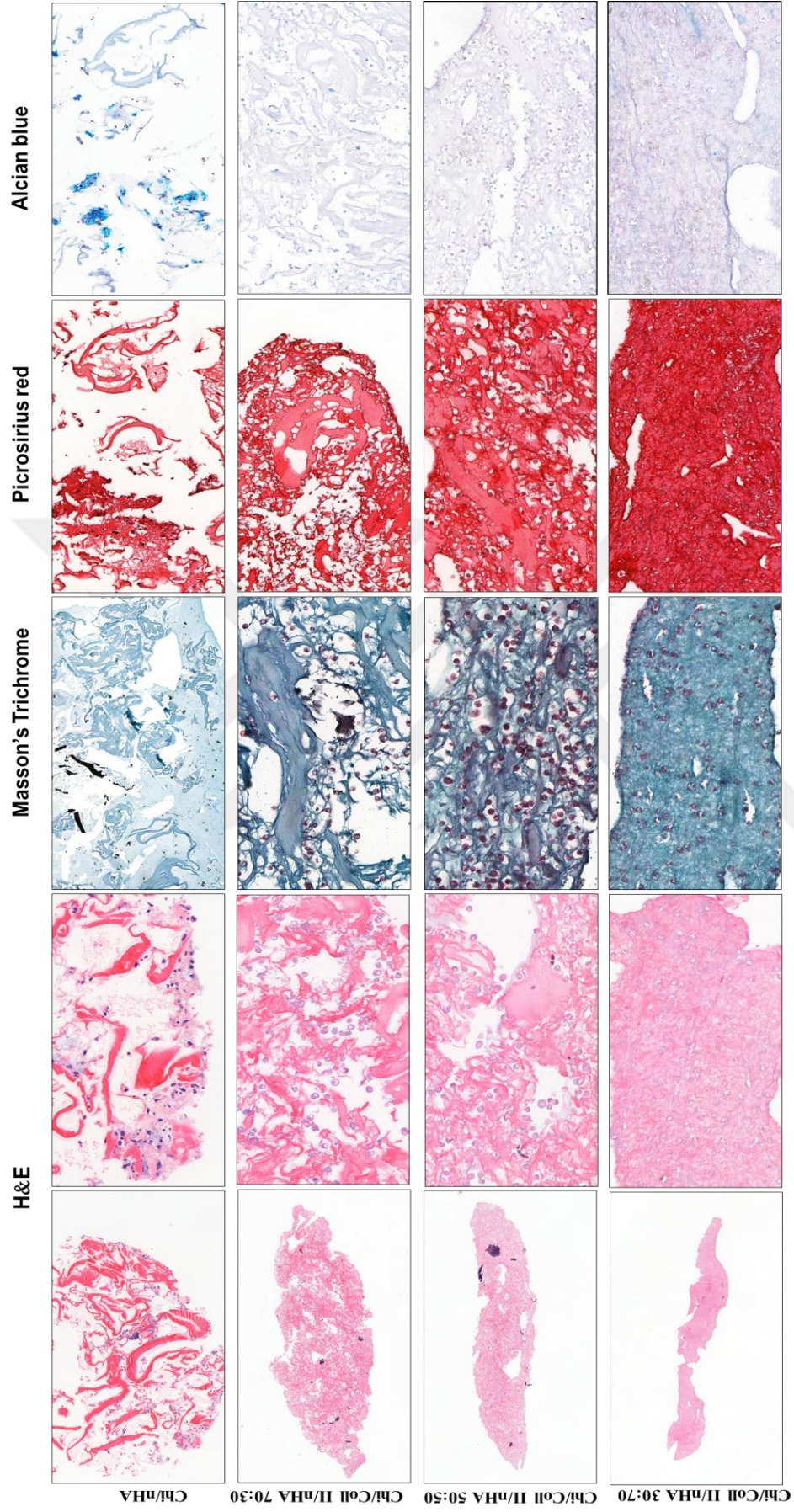
Şekil 5.38. Kalsifiye kıkırdak fazına ait ATDC5 enkapsüle edilerek hazırlanmış jellerde kültürün 7. 14. ve 21. günlerinde RT-PCR ile gerçekleştirilmiş gen (COL X, MMP-13 ve RunX2) ekspresyonları. (* $p<0.05$, * * $p<0.05$ 7.gün chi/nHA ve $\diamond$ $p<0.05$, $\diamond\diamond$ $p<0.01$ chi/coll II/nHA 70:30 hidrojelleri kontrol olarak kabul edilmiştir). Agaroz jelde yürütülmüş olan sonuçlar sağ alt köşede verilmiştir.

5.3.15. HİSTOLOJİK ANALİZLER

Kalsifiye kıkırdak fazına ait hidrojellerin (Chi/nHA, chi/coll II/nHA 70:30, chi/coll II/nHA 50:50 ve chi/coll/nHA 30:70) histolojik olarak H&E boyaması ile incelenmesi sonucunda, kültürün 28. gününde jellerle geniş hücre dağılımı ve geniş matriks birikimi (ECM) olduğunu göstermiştir (Şekil 5.39). Alcian blue ile jellerdeki glikozaminoglikanın (GAG) birikimi hücreli ve hücreli jellerde kıyaslamalı olarak incelenmiştir (Şekil. 5.35-36). Hücre içermeyen hidrojel gruplarında alcian boyaması (GAG birikimi) gözlenmemiştir (Şekil 5.35-36). Hücre enkapsülasyonu sonucunda kültürün 28.gününde GAG birikiminde önemli derecede artış gözlenmiştir (Şekil 5.40). En yüksek Alcian blue boyama sonuçları chi/nHA ve chi/coll II/nHA 70:30 jellerinde görülmüştür. Picrosirius red ve Masson's trichrome boyaması sırasıyla toplam ve olgun kollajeni karakterize etmek için kullanılan yöntemlerdir (99). Picrosirius red boyaması sonucunda hücre içermeyen jellerdeki toplam kollajen içeriğine kıyasla hücrelerin varlığı jellerdeki toplam kollajeni belirgin olarak arttırdığı görülmektedir. Picrosirius boyamaları ile küresel morfolojideki hücreler ve sentezledikleri ECM varlığı da görülmektedir. Masson trikrom boyaması sonucunda olgun kollajen birikimi hücreli jellerle kıyaslandığında jel içerisindeki hücrelerin olduğu bölgelerde daha da arttığı görülmektedir.



Şekil 5.39. Kalsifiye kırıldak fazına ait boş hidrojelilerin (3X) optik mikroskop ile alınmış H&E, Masson Trikom, Picrosirius red ve Alcian blue boyama görüntüleri.



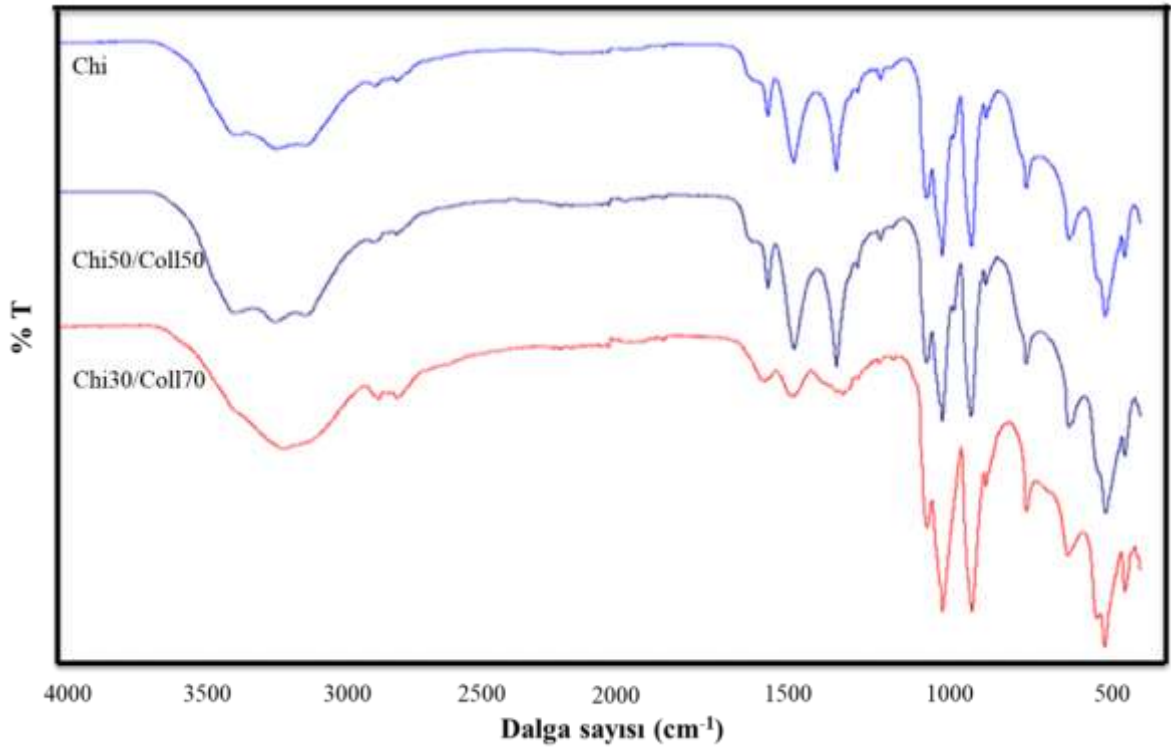
Şekil 5.40. Kalsifiye kıkırdak fazına ait ATDC5 hücresi enkapsüle edilmiş hidrojelilerin kültürün 28. günde (3X) optik mikroskop ile alınmış H&E, Masson's Trichrome, Picrosirius red ve Alcian blue boyama görüntüleri.

5.4. KIKIRDAK FAZINA AİT ÇALIŞMALAR

Kıkırdak fazını oluşturacak farklı bileşimlerde kollajen tip II içeren kitosan/kollajen tip II jellerin hazırlanması amacıyla Bölüm 4.5’de açıklanan termal jelleşme yöntemi kullanılmıştır. Kollajen tip II içermeyen jeller kontrol grubu olarak seçilmiştir. Farklı kollajen tip II miktarlarının hazırlanan jellerin kimyasal yapısı, morfolojik yapısı, mekanik dayanımı, reolojik özellikleri, şişme davranışına olan etkisi ve μ -CT ile gözeneklilik yapısı incelenmiştir. Kıkırdak fazının bileşiminin belirlenmesine yönelik yürütülen çalışmalarda; nHA içermeyen kitosan/kollajen tip II bileşimleri (100:0, 50:50 ve 30:70, w/w) olarak belirlenmiştir ve elde edilen sonuçlar açıklanmıştır.

5.4.1. KIKIRDAK FAZINA AİT FTIR İLE KİMYASAL YAPI ANALİZİ

Çalışma kapsamında kıkırdak yapısı için hazırlanan jellere ait FTIR-ATR spektrumları Şekil 5.41’de verilmiştir ve spektrumlardan elde edilen veriler Çizelge 5.13’de ayrıntılı olarak değerlendirilmiştir.



Şekil 5.41. Kıkırdak fazına ait jellerin (Chi, chi50/coll50, chi30/coll70) FTIR-ATR spektrumları.

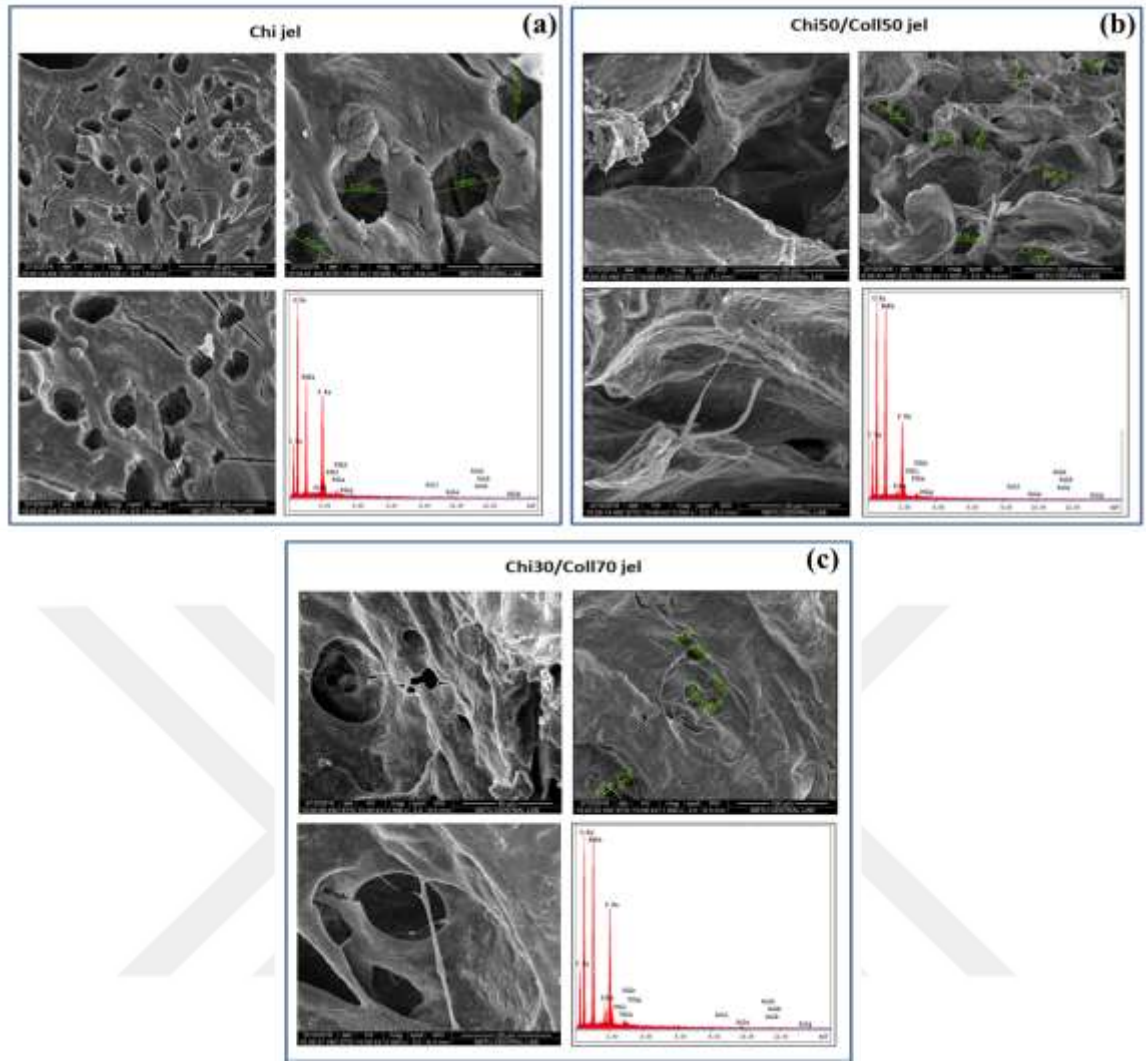
Kıkırdak fazı için hazırlanan jellerin (Chi, chi50/coll50, chi30/coll70) kimyasal yapıları FTIR-ATR ile analiz edildiğinde, yapıda bulunan tüm karakteristik piklerin varlığı belirlenmiştir. Bununla birlikte, kitosan ve kollajen tip II yapısında bulunan karakteristik yapılar birbirine benzerlik gösterdiğinden (amid I ve amid II grupları gibi), FTIR-ATR spekturumunda görülen pikler arasında farklılık gözlemlenememiştir.

Çizelge 5.13. Kıkırdak jel fazına ait FTIR-ATR spektrumlarının değerlendirilmesi ile elde edilen pikler ve açıklamaları.

Örnekler	IR absorpsiyon bantları (cm^{-1})	Açıklama
Kıkırdak fazına ait jeller	3270	N-H ve OH gerilme bandı
	1637	C=O gerilmesi (amid I)
	1549	NH ₂ deformasyonu (amid II bandı)
	1409	-CH ₂ - vibrasyonları
	1109	C-O titreşimleri
	1057	C-O-C vibrasyonları
	962	PO_4^{-3} 'den gelen P-O vibrasyonu (β -GP den kaynaklı)

5.4.2. KIKIRDAK FAZINA AİT SEM ANALİZİ

Farklı gruplardaki kıkırdak jel yapılar için Taramalı elektron mikroskopundan (SEM) elde edilen görüntüler ve EDAX analizinden elde edilen veriler Şekil 5.42'de verilmiştir. Kıkırdak fazı çalışmalarında, biyomimetik tasarım düşünülerek kıkırdak fazına nHA partikülleri ilave edilmemiştir. Kıkırdak faz için hazırlanan jel yapıların SEM analizinden elde edilen görüntüler incelendiğinde, chi/ coll II 50:50 jel yapılarda gözenekliliğin diğer yapılara kıyasla daha homojen olduğu ve içsel bağlantılı gözeneklerin yapıya hakim olduğu sonucuna varılmıştır.



Şekil 5.42. Kıkırdak fazı için hazırlanan hidrojel yapılarına ait (a) chi, (b) chi/ coll II 50:50 ve (c) chi/ coll II 30:70 SEM (1000 X, 2500 X ve 5000 X) görüntüleri ve EDAX verileri.

EDAX analizi sonucunda, kıkırdak fazına ait jeller nHA içermediğinden yapıda nHA kaynaklı Ca elementi görülmemiştir (Çizelge 5.14).

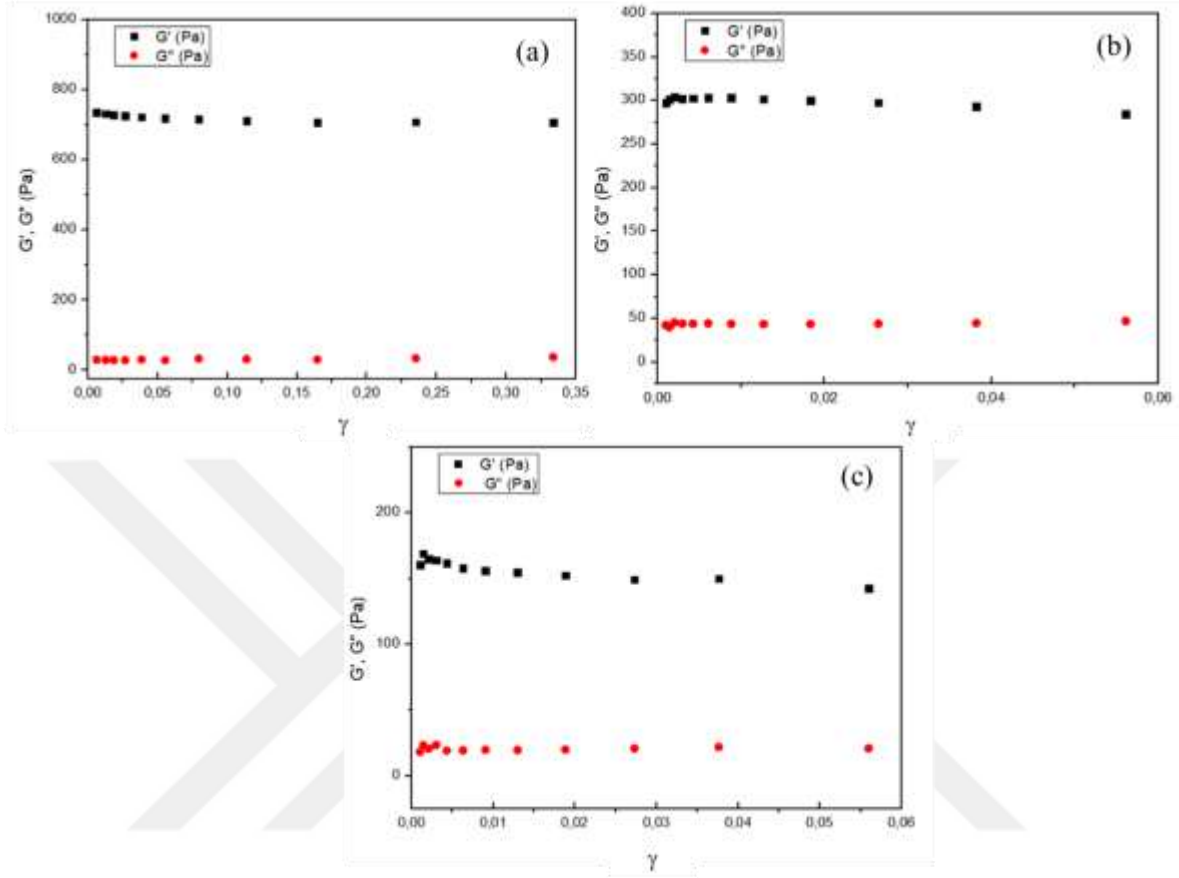
Çizelge 5.14. Kıkırdak fazına ait jel yapıların EDAX ile elemental analiz sonuçları.

Kıkırdak fazı					
Örnekler	C	O	Ca	P	N
Chi jel	31,80±2,085	40,5±2,24	-	9±0,09	-
Chi50/Coll50	30,02±0,6	38,27±0,86	-	6,34±0,007	-
Chi30/Coll70	30,99±0,98	34,89±1,68	-	4,65±4,78	-

5.4.3. KIKIRDAK FAZINA AİT REOLOJİK ANALİZLER

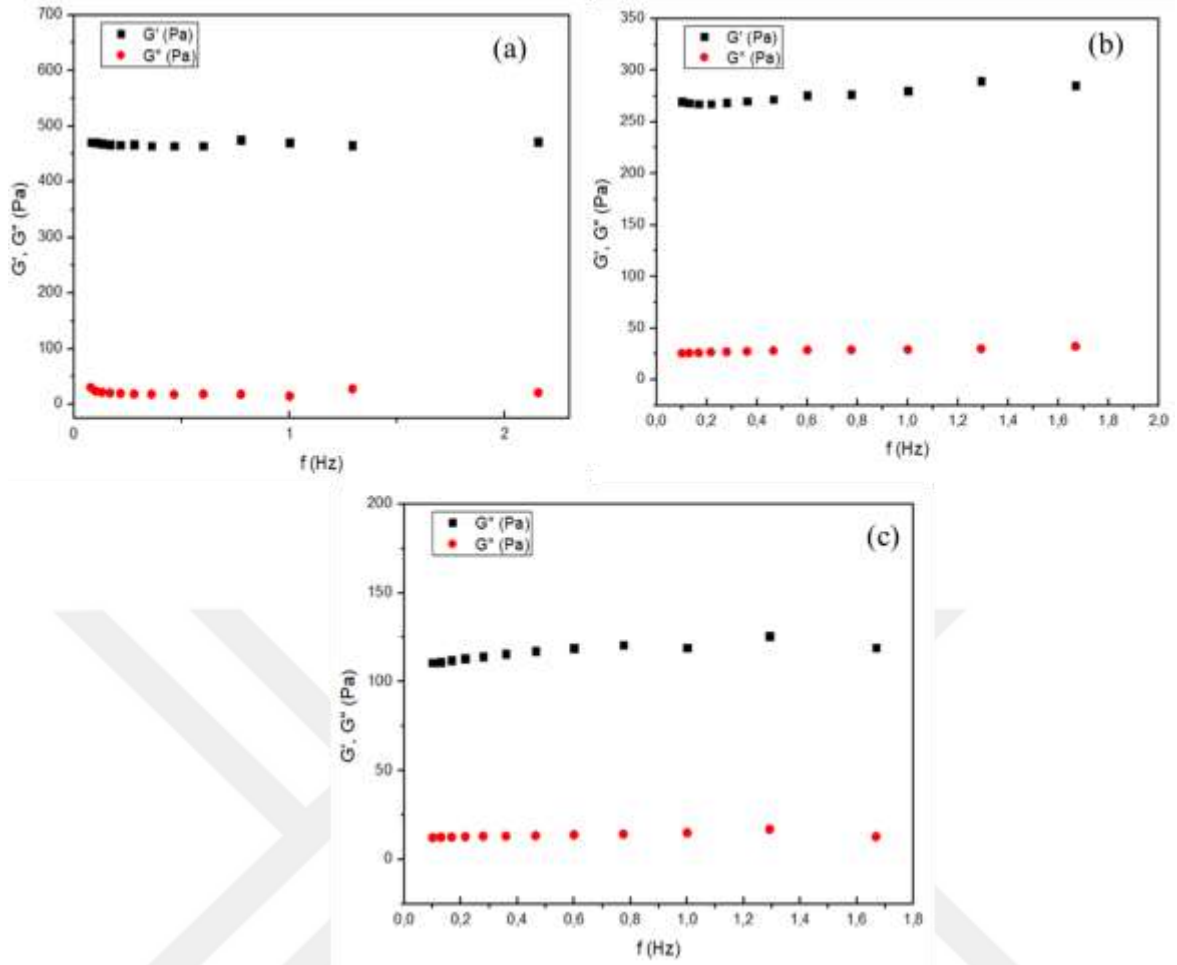
Kıkırdak fazın hazırlanmasında kullanılacak kitosan/kollajen tip II hidrojel bileşimlerine (Chi, chi50/coll50, chi30/coll70) ait reolojik analizlerden elde edilen sonuçlar Şekil 5.43

ve Şekil 5.44’de gösterilmiştir. Kıkırdak faz bileşimlerine ait gerçekleştirilen çalışmalarda gerinim taraması ile lineer viskoelastik bölge (LVR) %0,01 olarak belirlenmiştir.



Şekil 5.43. Kıkırdak fazına ait deformasyon (γ) değerlerine karşılık G' ve G'' (Pa) değerleri, a) Chi, b) Chi50/Coll150, c) Chi30/Coll170.

Lineer viskoelastik bölgede gerçekleştirilen salınımlı frekans taramalarında, G' değerlerinin tüm jel bileşimleri için plato davranışı gösterdiği, G' değerlerinin G'' değerlerine göre yüksek olduğu görülmektedir (Şekil 5.44). Bu sonuçlar, belirlenen sentez koşullarında ve jel bileşimlerinde stabil viskoelastik yapıda hidrojellerin oluştuğunu göstermektedir (Çizelge 5.15).



Şekil 5.44. Kıkırdak fazına ait salınımlı frekans değerlerine karşılık gelen G' ve G'' değerleri, a) Chi, b) Chi50/Coll50 c) Chi30/Coll70.

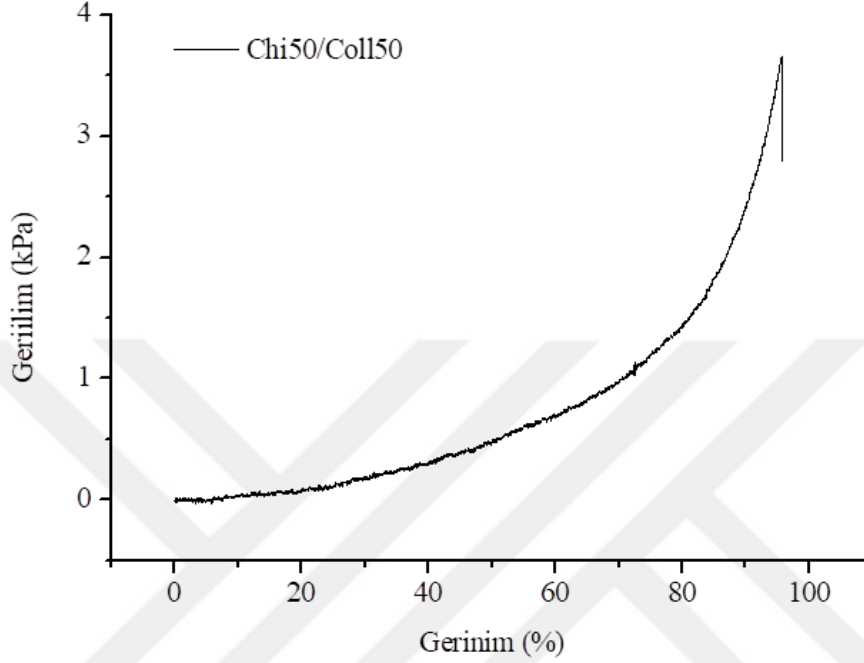
Çizelge 5.15. Kıkırdak fazına ait hidrojellerin reolojik verileri.

Hidrojeller	%Su tutma kapasitesi	G' (Pa)	G'' (Pa)	$\tan\delta$	Mc (kg/mol)	ξ (nm)
chi	73,60±0,21	476,1	18,4	0,038	17,13	20,54
Chi50/coll50	89,69±0,54	289,7	30,2	0,104	110,19	24,51
chi30/coll70	80,84±0,62	125,6	17,1	0,14	260,60	31,99

SEM çalışmalarından ve reolojik analizden elde edilen sonuçlar doğrultusunda, kıkırdak faz yapısında kullanılabilecek en uygun biyomimetik bileşimin chi/ coll II 50:50 bileşimindeki jeller olabileceği düşünülmüş ve mikro-CT analizi sadece bu jeller için yapılmıştır.

5.4.4. MEKANİK DAYANIM

Kıkırdak fazı için belirlenen chi50/coll50 jeline ait basma modül değeri $1,03 \pm 0,42$ olarak bulunmuştur (Şekil 5.45).



Şekil 5.45. Chi50/coll50 jeline ait gerilim-gerinim eğrileri.

5.4.5. KIKIRDAK FAZINA AİT JEL YAPININ MİKRO-CT (μ -CT) ANALİZİ

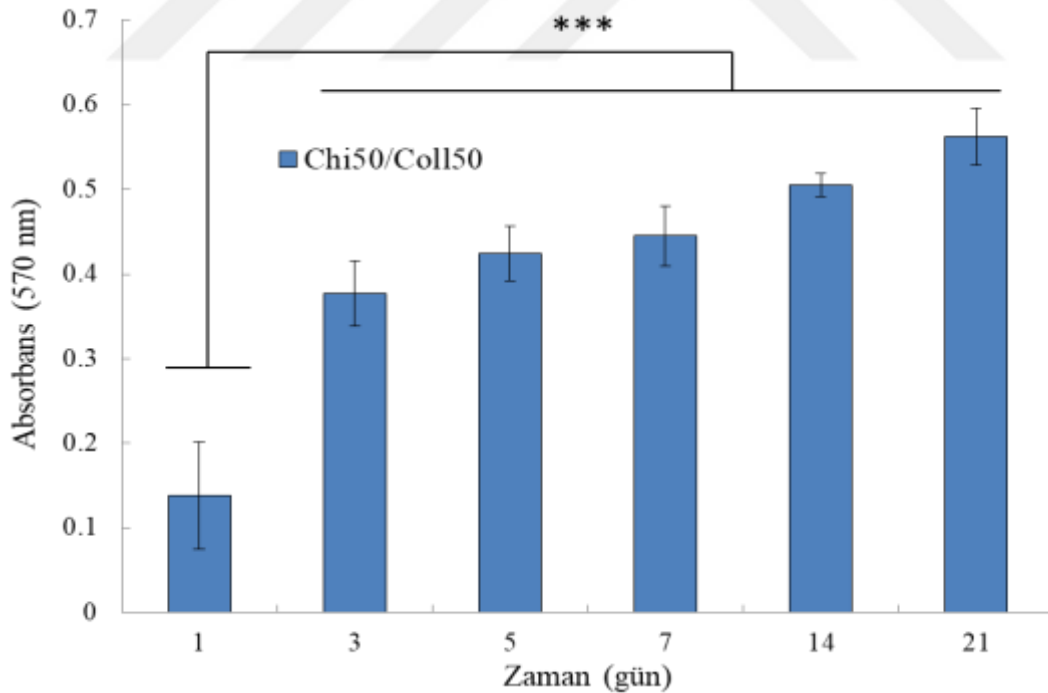
Kıkırdak fazına ait chi/ coll II 50:50 jeli ile gerçekleştirilen mikro-CT analizlerinden elde edilen sonuçlar Çizelge 5.16'da verilmiştir. Jellerin dondurarak kurutmadan sonra hazırlanan formları ile gerçekleştirilen analizlerinde, açık ve kapalı gözenekliliğe sahip içsel bağlantılı yapıların elde edildiği sonucuna varılmıştır. Kıkırdak fazına ait chi/ coll II 50:50 jeline ait %toplam gözeneklilik ve içsel bağlantı değerleri sırasıyla 94,31 ve 68589 olarak bulunmuştur.

Çizelge 5.16. Kıkırdak fazına ait jel yapıdaki Chi50/Coll50 örneklerinin mikro-CT analizinden elde edilen veriler.

Kıkırdak fazı						
	Doku iskelesi hacmi (mm ³)	Kapalı gözenek sayısı	Açık gözeneklilik (%)	Kapalı gözeneklilik (%)	Toplam gözeneklilik (%)	İçsel bağlantı
Chi50/Coll50	1273,92	3963	94,30	0,209	94,31	68589

5.4.6. KIKIRDAK FAZINA AİT PRESTO BLUE İLE ÜREME ANALİZİ

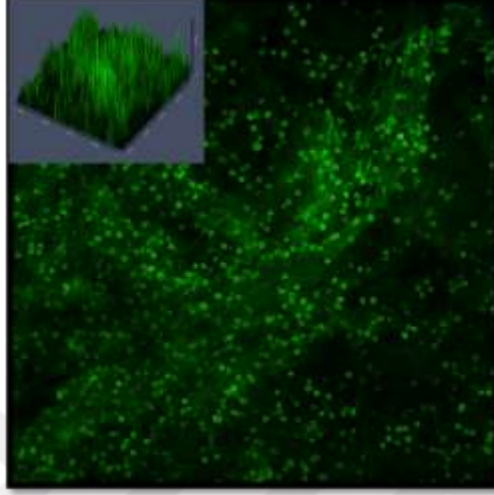
Kıkırdak faz olarak kullanılması planlanan Chi50/Coll50 jeli ile gerçekleştirilen çalışmalarda, enkapsüle edilmiş ATDC5 hücrelerinin jeller içerisindeki canlılığı Presto blue analizleri ile gerçekleştirilmiş ve hücrelerin 21 günlük kültür süresi boyunca üremeleri anlamlı olarak arttığı görülmüştür ($p < 0,05$) (Şekil 5.46).



Şekil 5.46. Chi50/Coll50 jel yapılarında çoğalan ATDC5 hücrelerine ait Presto-Blue grafiği (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık, $n=3$, kontrol grubu Chi/nHA iken $***p < 0,001$).

5.4.7. KIKIRDAK FAZINA AİT HÜCRE CANLILIK (LIVE/DEAD) ANALİZİ

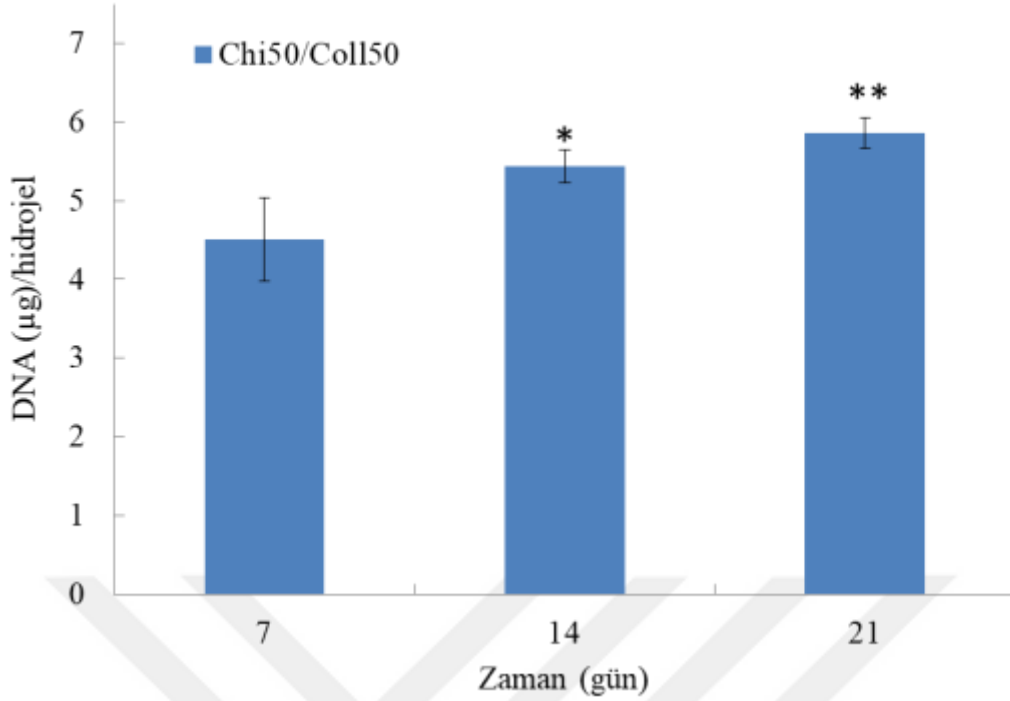
Kıkırdak fazına ait chi/ coll II 50:50 jeline ait konfokal mikroskobu ile %hücre canlılık analizi gerçekleştirilmiştir. Analiz sonucunda % hücre canlılık değeri 96.66 ± 1.52 olarak belirlenmiştir (Şekil 5.47).



Şekil 5.47. chi50/coll50 jel yapısında kültürün 7. gününde üremekte olan ATDC5 hücrelerine ait konfokal görüntüleri.

5.4.8. KIKIRDAK FAZINA AİT DNA ANALİZİ

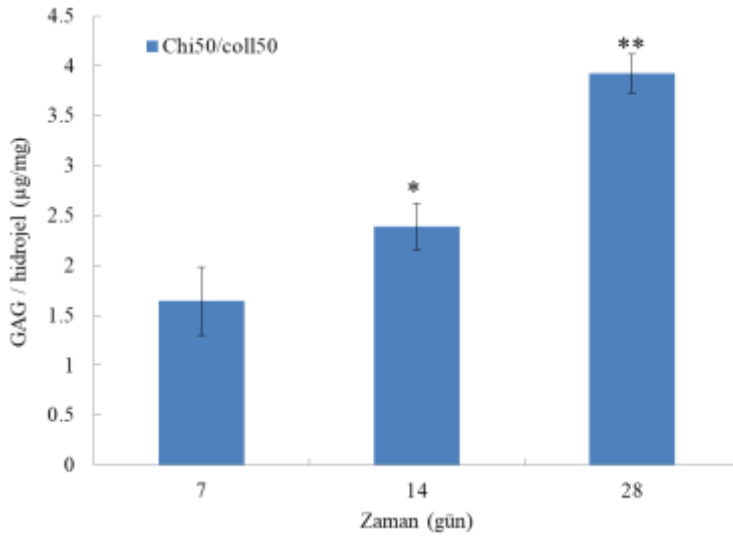
Kıkırdak fazı olarak belirlenen ATDC5 enkapsüle edilmiş chi50/coll50 jeline ait DNA miktar tayini gerçekleştirilmiştir. DNA miktarında artan günle birlikte anlamlı bir artış gözlenmiştir ($p < 0.05$) (Şekil 5.48).



Şekil 5.48. Chi50/50 jeline ait DNA içerik analizi (* $p<0.05$, ** $p<0.05$ 7.gün hidrojel olarak kabul edilmiştir).

5.4.9. KIKIRDAK FAZINA AİT GLİKOZAMİNOGLİKAN (GAG) ANALİZİ

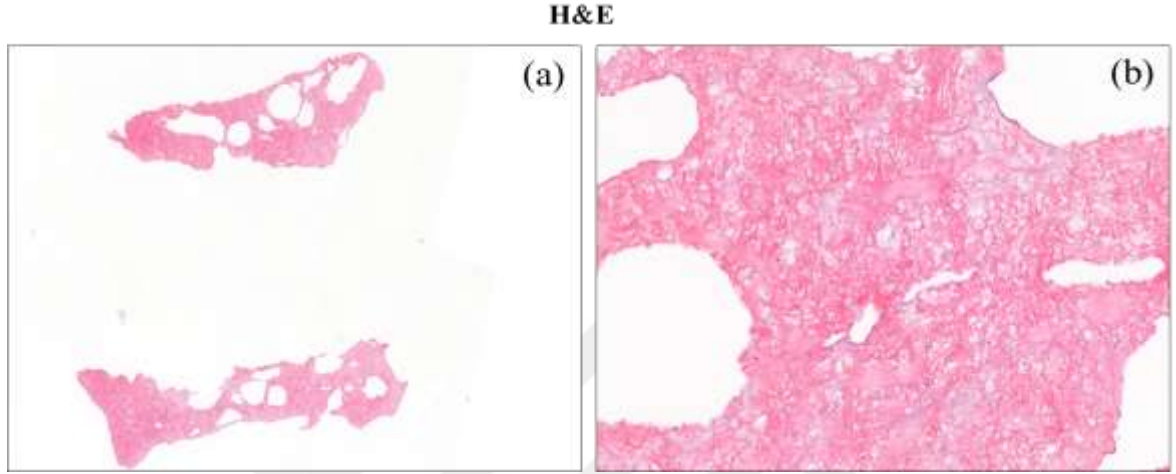
Kültürün 7. 14. ve 21. günlerinde chi50/coll50 jeline enkapsüle edilmiş ATDC5 hücrelerinin GAG üretimi tayin edilmiştir (Şekil 5.49). Kültürün 7. gününe kıyasla 14. ve 21. günlerinde GAG üretiminde önemli bir artış gözlenmiştir ($p<0.05$).



Şekil 5.49. Chi50/coll50 jeline enkapsüle edilmiş ATDC5 hücrelerinin ürettiği GAG analizi (* $p<0.05$, ** $p<0.05$ kontrol grubu olarak kültürün 7.günüdeki jel seçilmiştir).

5.4.10. HİSTOLOJİK ANALİZ

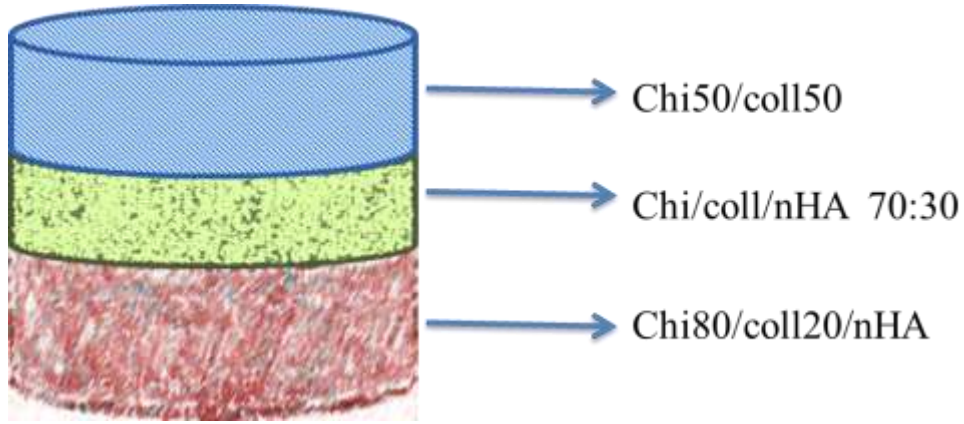
ATDC5 hücrelerin chi50/coll50 jellerindeki dağılımını belirlemek amacıyla H&E boyama gerçekleştirilmiş ve Şekil 5.50’de gösterilmiştir. Chi50/coll50 jellerinde kültüre edilen ATDC5 hücreler jeller içerisinde homojen olarak yoğunlaşmış olduğu ve hücrelerin kendi matris yapılarını oluşturmaya başladığı görülmüştür (Şekil 5.50).



Şekil 5.50. Enkapsüle ATDC5 hücrelerin kıkırdak fazına ait chi50/coll50 jellerindeki 28. gün H&E boyaması görüntüleri (2.1X ve 19.1 X).

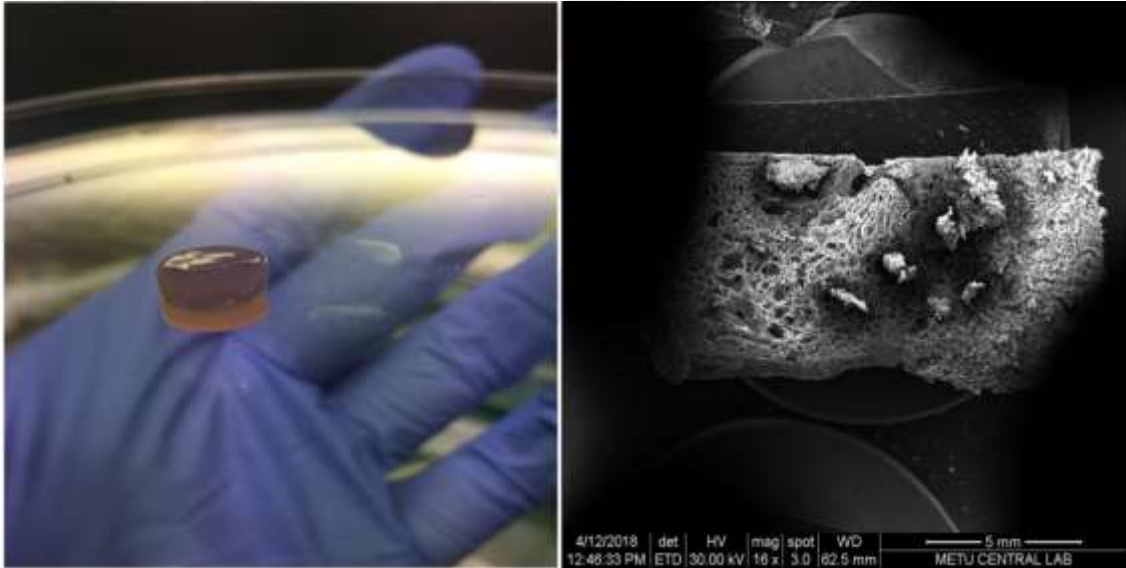
5.5. OSTEOKONDRAL DOKU ÜNİTESİNE AİT SONUÇLAR

Osteokondral doku ünitesini oluşturacak herbir faza ait doku iskelesi ve jel yapılar ile gerçekleştirilen hücre kültür çalışmalarında, hücre canlılığının kültür süresi boyunca arttığı görülmüş ve fazlara ait ECM’i taklit edebilme kapasiteleri belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda, karakterizasyon çalışmaları sonucunda planlanan biyomimetik üçlü faz yapısının osteokondral doku ünitesinin üretiminde kullanılabileceğine karar verilmiştir. Buna göre üçlü faz oluşturacak ünite yapısının bileşenleri: Chi80/Coll20/nHA bileşiminden oluşan subkondral kemik, Chi/Coll II/nHA 70:30 bileşiminden oluşan kalsifiye kıkırdak ve chi50/coll50 bileşiminden oluşan kıkırdak fazları belirlenmiştir (Şekil 5.51).



Şekil 5.51. Osteokondral doku ünitesini oluşturan biyomimetik ve gradyan bileşim.

Yapıya ait makroskobik ve kesiti alınarak uzaktan kuş bakışı yatay olarak çekilmiş SEM (16X) görüntüsü Şekil 5.52’de verilmiştir.

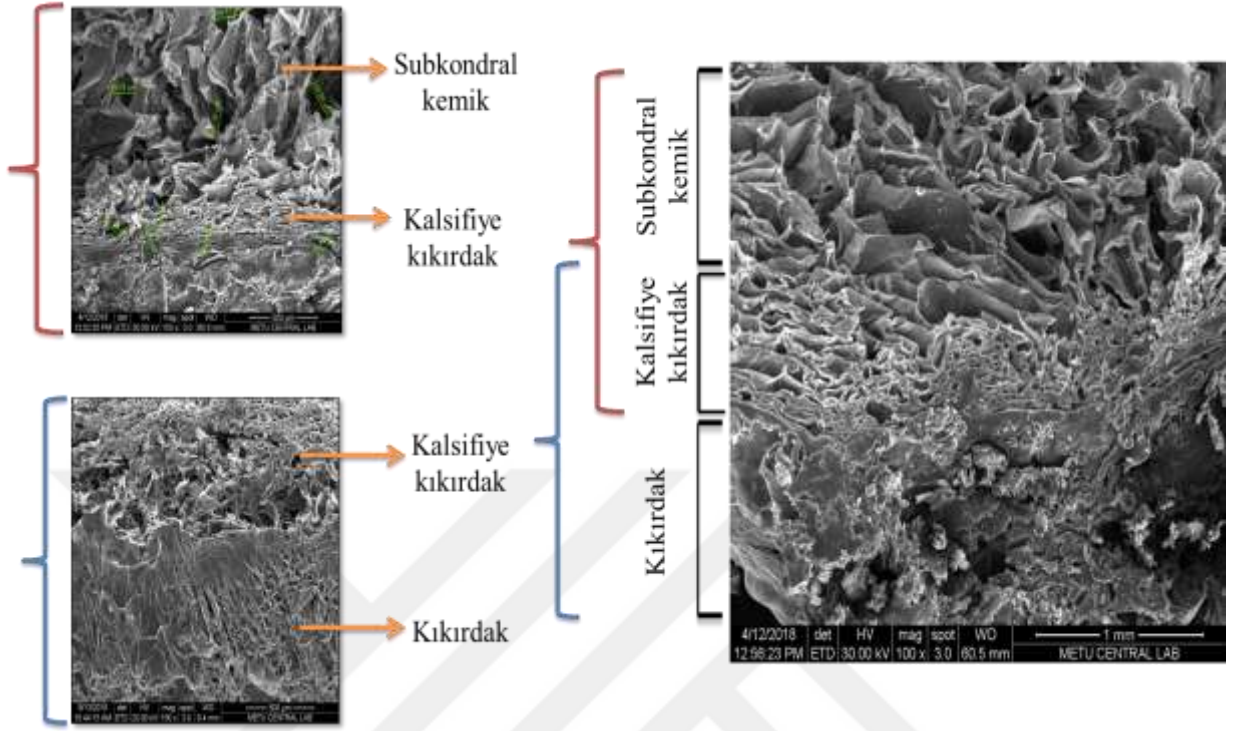


Şekil 5.52. Osteokondral doku ünitesinin makroskobik yapısı ve kesitin SEM (16 X) görüntüsü.

5.5.1. OSTEOKONDRAL DOKU ÜNİTESİNE AİT SEM ANALİZİ

Doğal osteokondral dokunun mikro mimarisi ve gözeneklilik değerleri önemli bir role sahiptir (100). Bu nedenle, osteokondral doku ünitesinin gözenek özellikleri, SEM analizi ile morfolojik olarak değerlendirilmiştir. Şekil 5.53, liyofilize osteokondral doku iskelesinin subkondral kemik, kalsifiye kıkırdak ve fazlarının kesit SEM görüntüsünü göstermektedir. Osteokondral doku ünitesinde, gözenek büyüklüğünde değişiklik gösteren

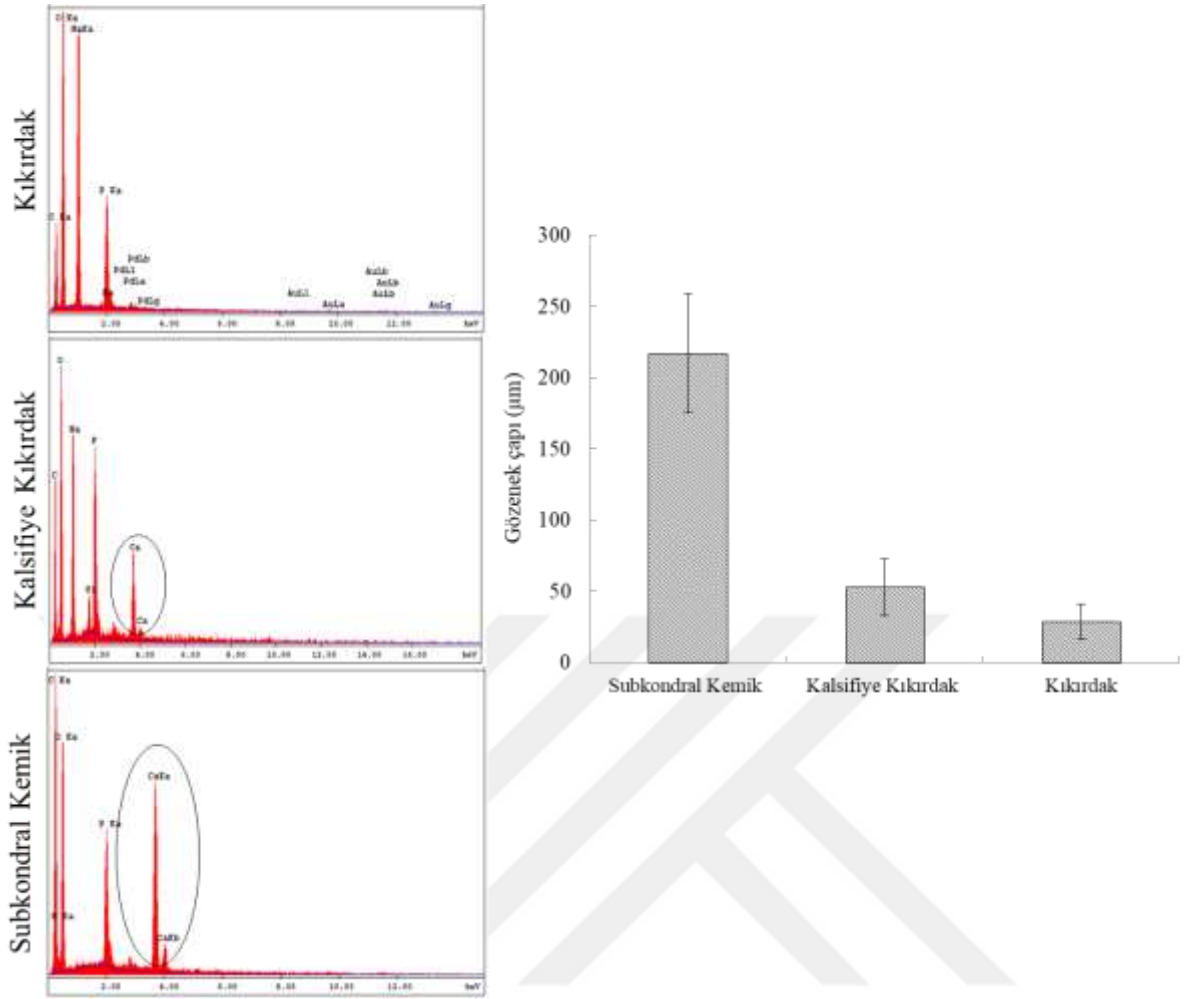
birbiri ile içsel bağlantılı gözenekli mimari gözlenmiştir. Gözenek büyüklüğünün subkondral bölgeden kıkırdak fazına doğru düştüğü gözlenmiştir.



Şekil 5.53. Osteokondral doku ünitesine ait SEM (100 X ve 150 X) görüntüleri.

SEM analizi sonrasında, subkondral kemik, kalsifiye kıkırdak ve kıkırdak fazlarına ait hazırlanan yapıların çapları sırasıyla $217,36 \pm 41,46$; $52,88 \pm 19,84$ ve $28,65 \pm 12,44$ olarak bulunmuştur (Şekil 5.54).

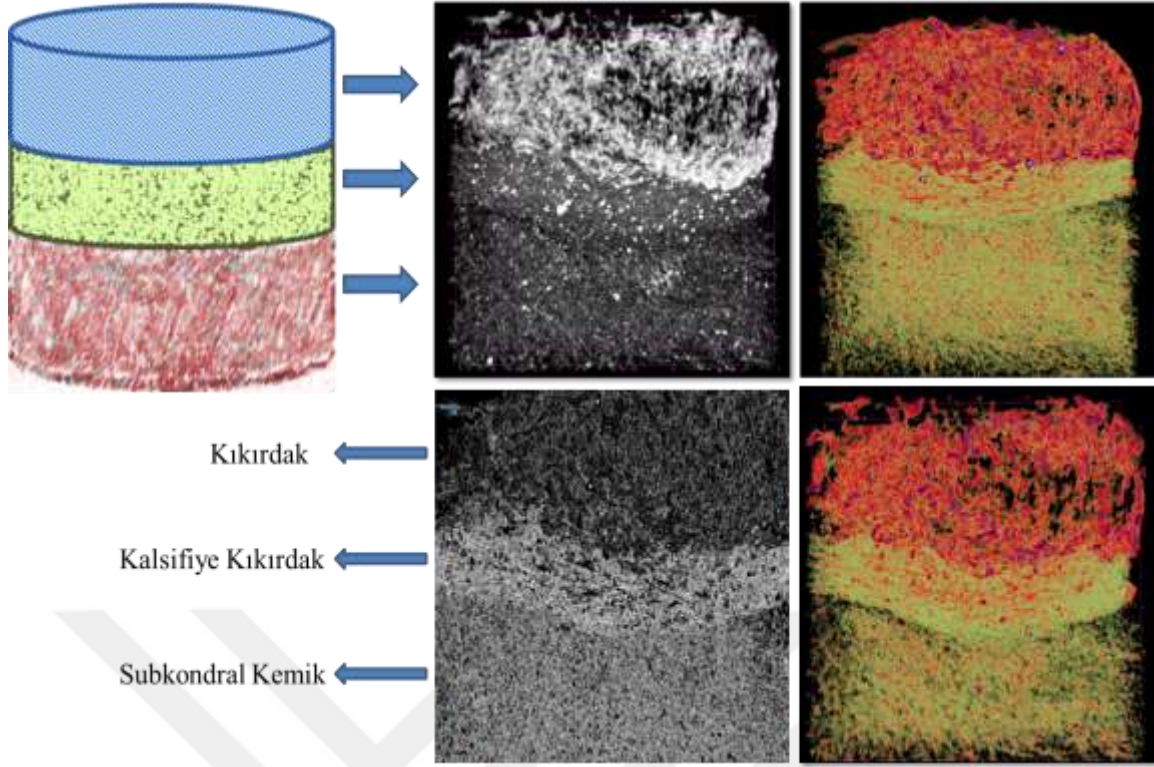
EDAX ile fazların elemental analiz sonucunda subkondral kemik ve kalsifiye kıkırdak fazlarında nHA kaynaklı kalsiyum (Ca) elementi görülürken, kıkırdak fazında Ca elementi görülmemiştir (Şekil 5.54).



Şekil 5.54. Osteokondral doku ünitesine ait fazların EDAX verileri ve gözenek çapları.

5.5.2. OSTEOKONDRAL DOKU ÜNİTESİNE AİT μ -CT ANALİZİ

Osteokondral doku ünitesine ait μ -CT görüntüler ve veriler sırasıyla Şekil 5.55 ve Çizelge. 5.17’de verilmiştir.



Şekil 5.55. Osteokondral doku ünitesine ait μ -CT görüntüsü.

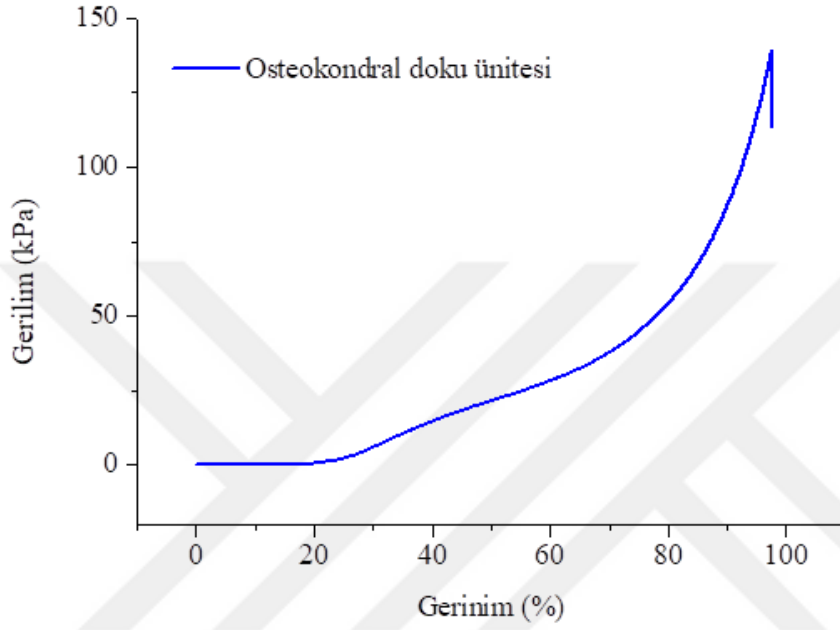
Osteokondral doku ünitesine ait tüm fazlar çok belirgin olarak Şekil 5.55’de görülmektedir ve gözeneklilik değerleri Çizelge 5.17’de sunulmuş olup ünitenin %toplam gözeneklilik değeri %90 üzerinde bulunmuştur.

Çizelge 5.17. Osteokondral doku ünitesinin mikro-CT analizinden elde edilen veriler.

Osteokondral doku ünitesi						
	Doku iskelesi hacmi (mm ³)	Kapalı gözenek sayısı	Açık gözeneklilik (%)	Kapalı gözeneklilik (%)	Toplam gözeneklilik (%)	İçsel bağlantı
Osteokondral doku ünitesi	910,87	19675	89,67	0,84	90,07	12758

5.5.3. MEKANİK DAYANIM

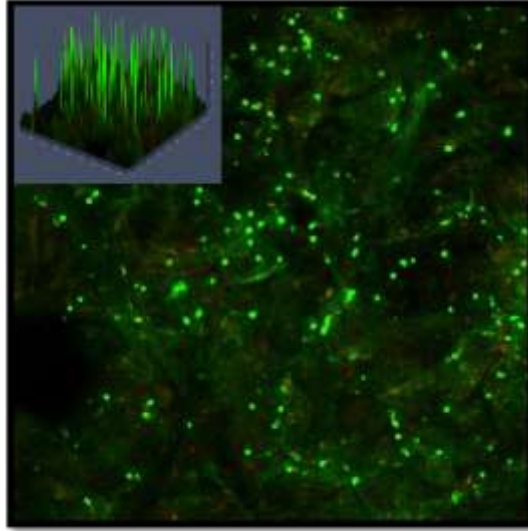
Osteokondral doku ünitesine uygulanan basma testi sonucunda gerilim-gerinim eğrilerinden elde edilen basma modül değeri $13,77 \pm 3,88$ kPa olarak bulunmuştur (Şekil 5.56).



Şekil 5.56. Osteokondral doku ünitesinin basma analizi sonucu elde edilen gerilim-gerinim eğrileri.

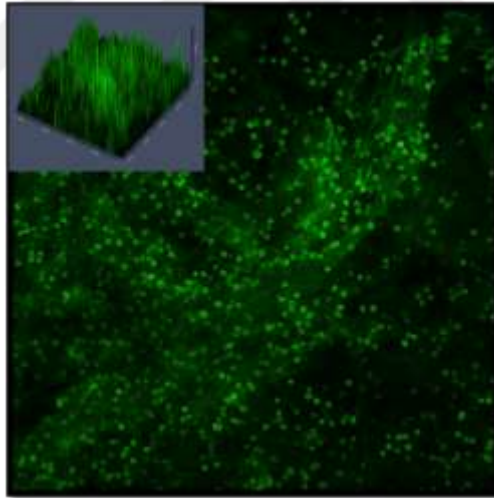
5.5.4. SEÇİLEN SUBKONDRAL KEMİK FAZINA AİT HÜCRE CANLILIK ANALİZİ

Subkondral kemik fazına ait olan chi80/coll20/nHA doku iskelesinde üreyen MC3T3-E1 hücrelerine ait ortalama %hücre canlılığı $85,33 \pm 2,03$ olarak bulunmuştur (Şekil 5.57).



Şekil 5.57. Chi80/coll20/nHA doku iskelelerinde kültürün 7. gününde üremekte olan MC3T3-E1 hücrelerine ait konfokal görüntüleri. Yeşil ışıma canlı hücreleri, kırmızı ise ölü hücreleri göstermektedir.

Kıkırdak fazına ait chi/ coll II 50:50 jeline ait konfokal mikroskobu ile %hücre canlılık analizi gerçekleştirilmiştir. Analiz sonucunda % hücre canlılık değeri 96.66 ± 1.52 olarak belirlenmiştir (Şekil 5.58).

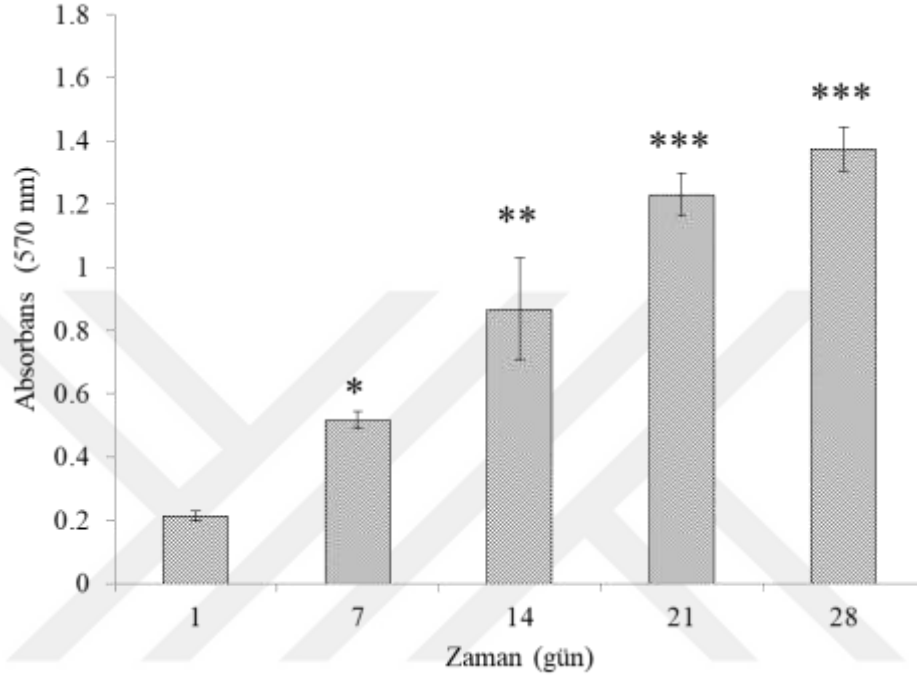


Şekil 5.58. chi50/coll50 jel yapısında kültürün 7. gününde üremekte olan ATDC5 hücrelerine ait konfokal görüntüleri.

5.5.5. MTT İLE ÜREME ANALİZİ

Ko-kültür ortamında MC3T3-E1 ve ATDC-5 hücreleri içeren gradyan osteokondral doku iskelelerindeki hücre proliferasyon ve metabolik aktiviteleri kültürün 1., 7., 14. ve 28. günlerinde MTT analizi ile saptanmış ve optik yoğunlukları okunmuştur (Şekil 5.59). MTT

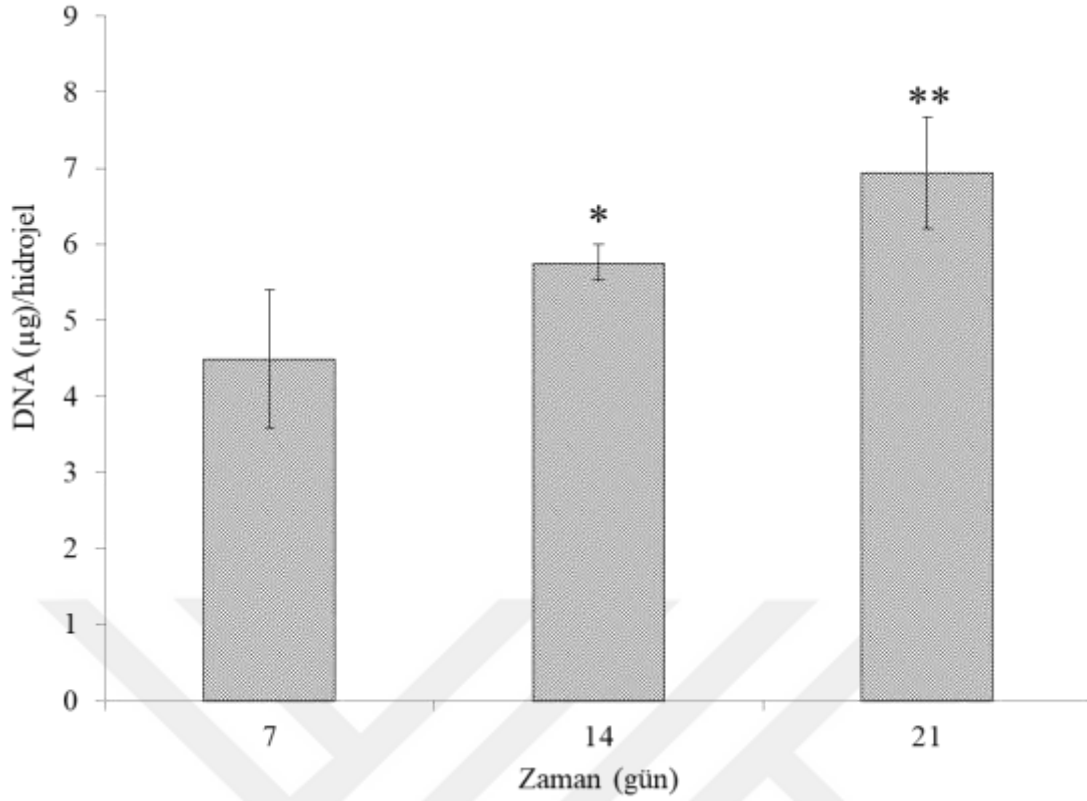
analiz sonuçları osteokondral doku iskelesinde MC3T3-E1 ve ATDC-5 hücrelerinin ko-kültür ortamında 28 gün boyunca çoğaldığını göstermektedir. Ko-kültürün 7.gününden itibaren kontrol grubu olan 1.güne kıyasla önemli bir artış gözlenmiştir ($p<0.05$). Ko-kültürün 28.gününde de MC3T3-E1 ve ATDC-5 hücrelerinin üremeye devam ettiği görülmüştür ($p<0.001$).



Şekil 5.59. MC3T3-E1 ve ATDC-5 hücre içeren gradyan osteokondral doku iskelesi üreme analizi (* $p<0.05$, ** $p<0.01$ ve *** $p<0.001$ 7.gün gradyan osteokondral doku iskelesi kontrol olarak kabul edilmiştir).

5.5.6. DNA ANALİZİ

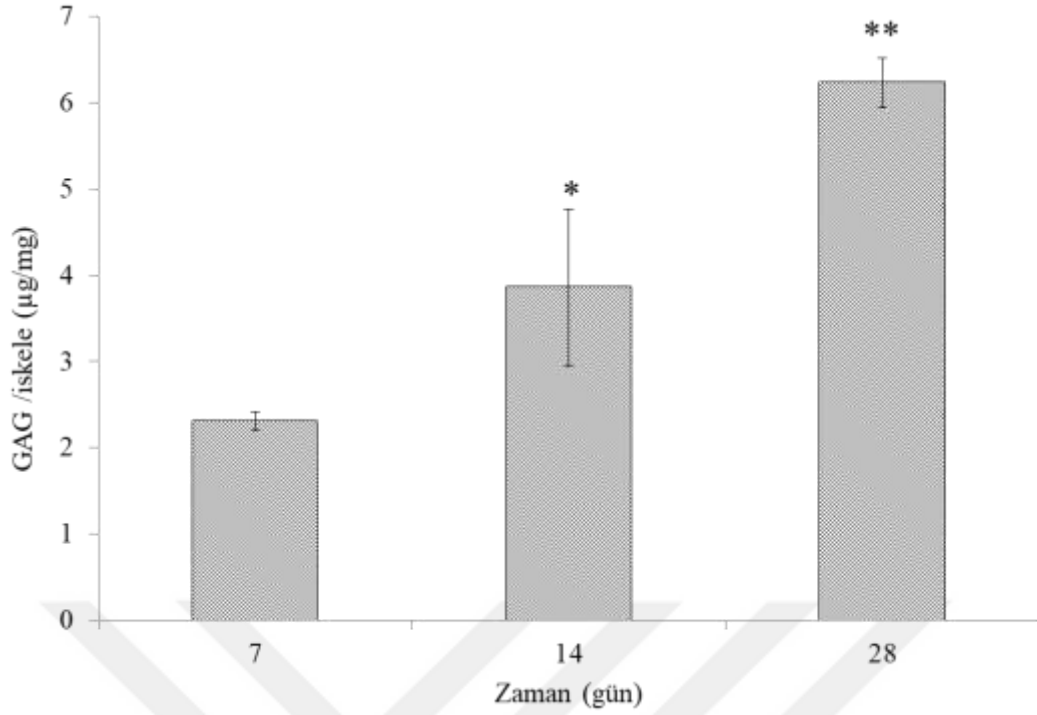
Hem MC3T3-E1 hem de ATDC-5 içeren osteokondral doku iskelesindeki DNA içeriği uzun süreli kültür ile birlikte artmıştır (Şekil 5.60). Kültürün 7.günü kontrol olarak seçildiğinde kültürün 14. ve 28. günlerinde anlamlı bir artış göstermiştir (* $p<0.05$ ve * $p<0.01$). ATDC-5 ve MC3T3-E1 birlikte ko-kültür ortamında çoğalabildiğini göstermektedir.



Şekil 5.60. MC3T3-E1 ve ATDC5 hücrelerini içeren osteokondral doku ünitesine ait DNA içerik analizi (* $p<0.05$, ** $p<0.05$ 7.gün osteokondral doku ünitesi kontrol olarak kabul edilmiştir).

5.5.7. GLİKOZAMİNOGLİKAN (GAG) TAYİNİ

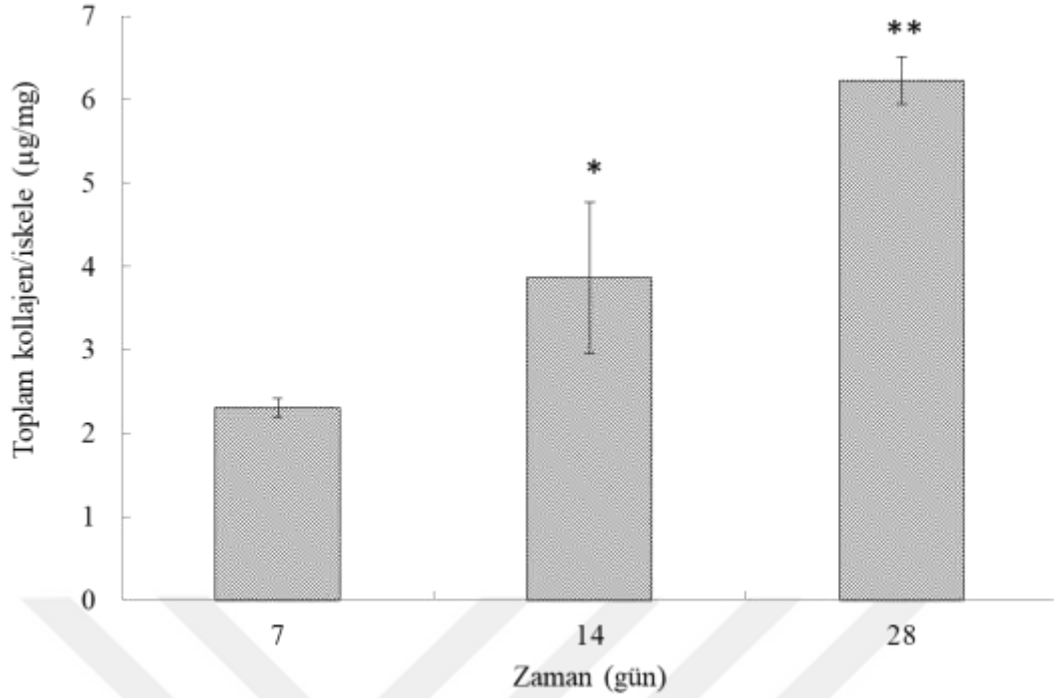
Hücre içeren hidrojel grupları gün bazından değerlendirildiklerinde 7.gün ve 14. ve 21. günler arasında istatistiksel olarak GAG artışı gözlenmiştir ($p<0.01$) (Şekil 5.61). Hücre içeren Chi/Coll/nHA 50:50 ve Chi/Coll/nHA 30:70 hidrojellerinde 7., 14. ve 21. günlerde kontrol grubu olan Chi/nHA hidrojeline kıyasla istatistiksel olarak daha yüksek bir ortalama GAG miktarı belirlenmiştir ($p<0.001$). ATDC5 hücre enkapsüle edilerek hazırlanan hidrojel grupları gün bazında kıyaslandığında artan kollajen içeriği ile birlikte GAG üretiminde anlamlı artış gözlenmiştir ($p<0.05$).



Şekil 5.61. MC3T3-E1 ve ATDC5 hücrelerini içeren gradyan osteokondral doku iskelesi tarafından üretilen GAG miktarı (* $p < 0.05$ 7.gün gradyan osteokondral doku iskelesi kontrol olarak seçilmiştir).

5.5.8. TOPLAM KOLLAJEN TAYİNİ

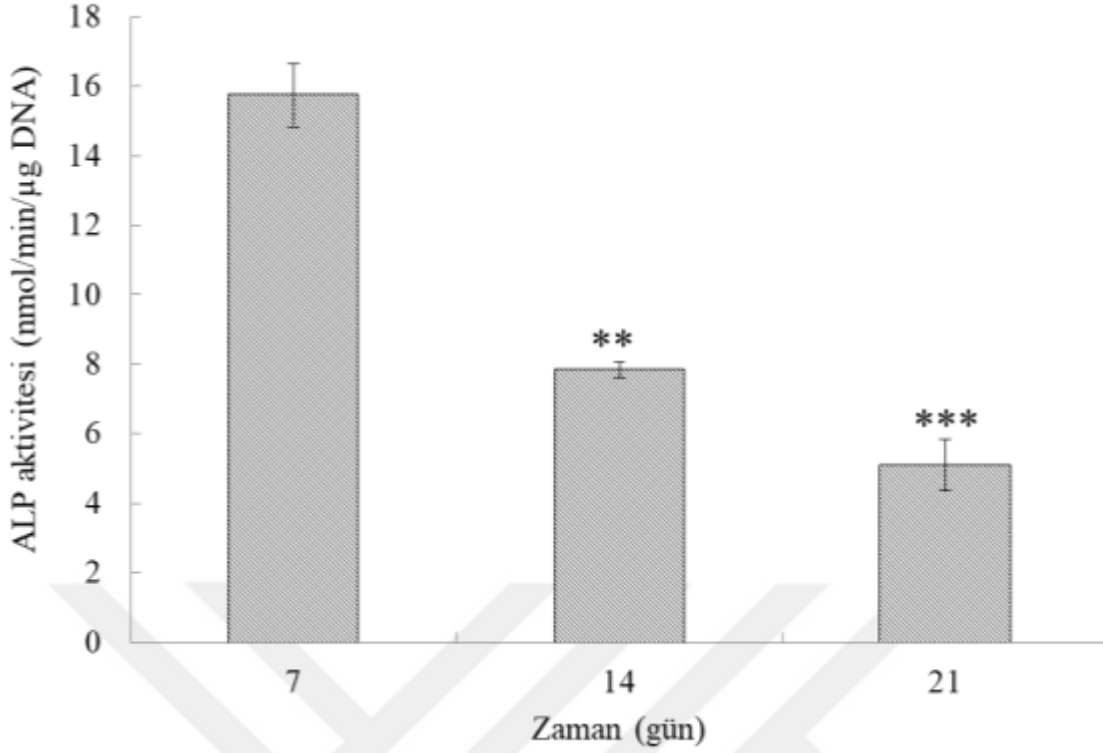
Hem MC3T3-E1 hem de ATDC-5 hücrelerinin osteokondral doku iskelesinde birlikte kültürlendiği ko-kültür ortamında ürettikleri kollajen miktarı belirlenmiştir. Kollajen miktarı hücre üreme testi, %hücre canlılık ve DNA içeriği analizlerinde olduğu gibi kollajen üretiminde de artış göstermiştir. Gün bazında kollajen üretimi kıyaslandığında kültürün 7.gününe (kontrol grubu) kıyasla kültürün 14. ve 28.günlerinde anlamlı bir artış gözlenmiştir (* $p < 0.05$ ve ** $p < 0.05$) (Şekil 5.62) .



Şekil 5.62. MC3T3-E1 ve ATDC5 hücrelerini içeren gradyan osteokondral doku iskelesi tarafından üretilen kollajen miktarı (* $p<0.05$ 7.gün gradyan osteokondral doku iskelesi kontrol olarak seçilmiştir).

5.5.9. ALP AKTİVİTESİ

MC3T3-E1 ve ATDC-5 hücrelerinin osteokondral doku iskelesindeki mineralizasyon davranışları ALP aktivitesi ile belirlenmiştir (Şekil 5.63). Kültürün 7., 14. ve 21.günlerinde ALP aktivitesi incelenmiş olup en yüksek değer kültürün 7.gününde görülmüştür. Kültürün 7.gününden (kontrol grubu) itibaren 14. ve 21.günlerde önemli bir düşüş gözlenmiştir (* $p<0.05$ ve * $p<0.01$). ALP aktivitesi açısından 14.gün (kontrol grubu) ve 21.gün kıyaslandığında da 21.günde önemli bir düşüş görülmüştür.



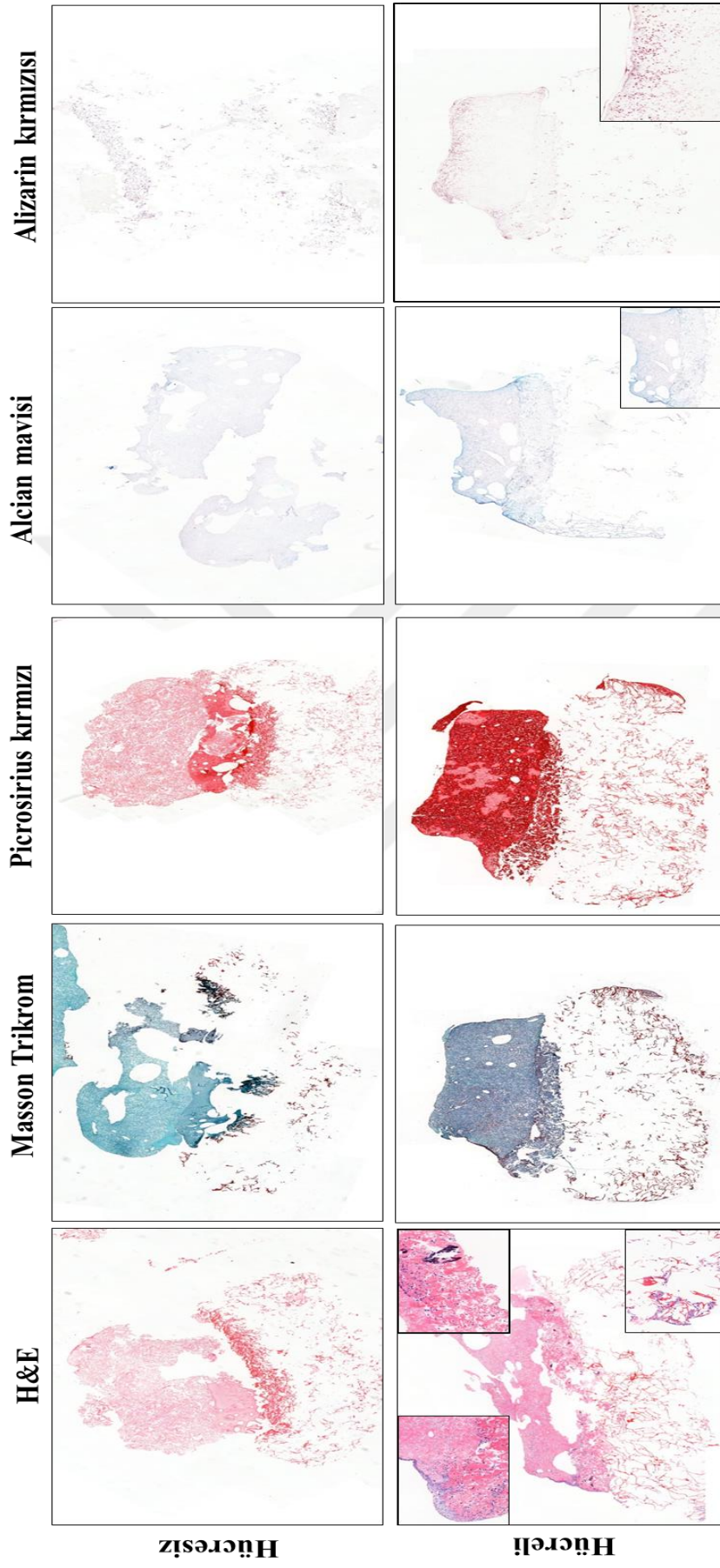
Şekil 5.63. Osteokondral doku ünitesinin 7., 14. ve 21. günlerdeki ALP aktivitesi (**p<0.01, ***p<0.001 kontrol grubu olarak 7.gün hidrojel kontrol olarak kabul edilmiştir).

5.5.10. HİSTOLOJİK ANALİZLER

Osteokondral doku ünitesinin histolojik olarak H&E boyaması ile incelenmesi sonucunda, kültürün 28. gününde osteokondral doku ünitesinde geniş bir hücre dağılımı ve matriks oluşumu gözlenmiştir. Osteokondral doku ünitesinin her fazında da aynı sonuçlar görülmüştür (Şekil 5.64). Alcian blue ile boyama sonucunda GAG birikimi hücre içermeyen osteokondral doku ünitesinde gözlenmemişken, hücre içeren üçlü faz yapıları arasında en yüksek GAG birikimi üst faz olan kıkırdak fazında görülmüştür (Şekil 5.64). Fazlardan subkondral kemik fazında GAG birikimi gözlenmemiştir. Bu sonuç, en yüksek GAG birikiminin ünitenin kıkırdak fazında olduğunu göstermiştir. Picrosirius red ile toplam kollajen analizine bakılmıştır. Picrosirius analizi sonucunda boş osteokondral doku ünitesine kıyasla hücre içeren osteokondral doku ünitesinin kalsifiye kıkırdak ve kıkırdak fazlarında yüksek miktarda toplam kollajen artışı gözlenmiştir. Masson's trichrome ile olgun kollajen boyaması sonucunda da benzer şekilde kalsifiye kıkırdak ve kıkırdak fazlarında hücrelerin olduğu bölgelerde yüksek miktarda kollajen artışı gözlenmiştir. Kemik ve kalsifiye kıkırdak fazlarına spesifik Alizarin red ile boyama sonucunda

hücrelerin olduğu bölgelerde kalsiyum nodülleri g r lm Ğt r. Bu da kemik ve kalsifiye kıkırdak fazlarının olduğu bölgelerde mineralizasyonun olduğunu göstermiştir.





Şekil 5.64. MC3T3-E1 ve ATDC5 hücrelerini içeren osteokondral doku ünitesinin kültürün 28.gününde kesitlerden alınan optik mikroskop ile H&E, picrosirius red, masson trikrom, Alcian blue ve Alizarin red boyama görüntüleri.

5.5.11. İMMÜNHİSTOKİMYASAL ANALİZ

Başlıca ECM'in proteinleri olan COL I, II ve X kültürün 28.gününde immünhistokimyasal boyama ile tayin edilmiştir. COL I boyaması, osteokondral doku ünitesinin kemik fazı ve kalsifiye kıkırdak fazlarında görülmüş ve zayıf boyanma sergilemiştir (Şekil 5.65). Belirgin COL I (fibrotik markör) boyamalar, kemik fazının kenarlarında görülmüştür. Col X (hipertrofik markör) sonuçlarında ise çok zayıf boyama gözlenmiştir. Buna karşılık, kültür zamanı boyunca ağırlıklı olarak hücrelerin olduğu bölgelerde daha yoğun pozitif kollajen tip II boyaması gözlenmiştir. En yüksek COL II (kondrojenik markör) boyaması kıkırdak fazının olduğu üst fazda gözlenmiştir. Bu sonuç, osteokondral doku ünitesinde, hücrelerin kondrosit fenotipini koruduğunu ve kıkırdak matrisini üretebildiğini net olarak ortaya koymuştur.

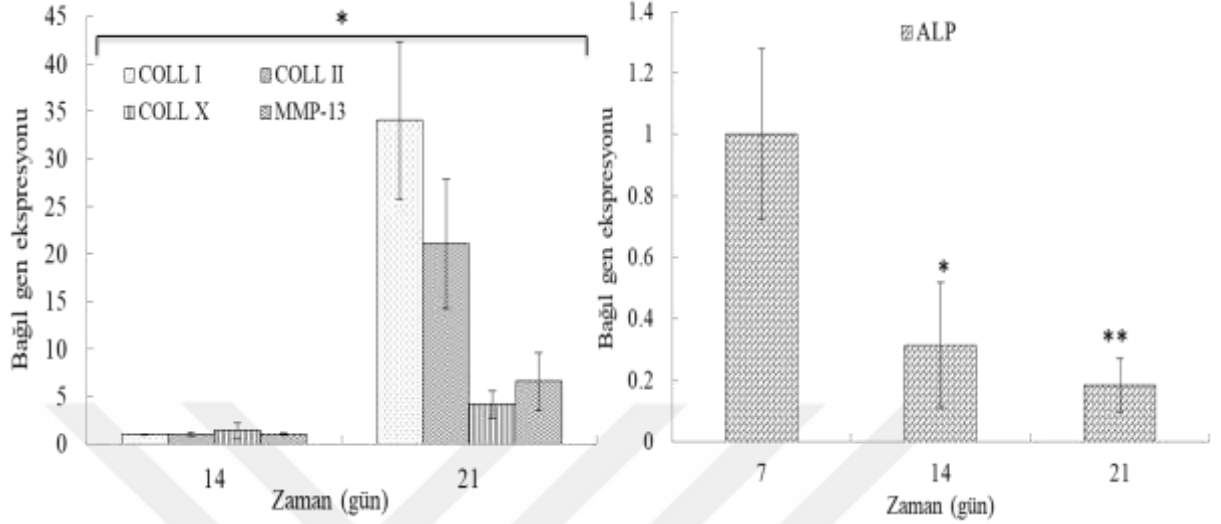


Şekil 5.65. Osteokondral doku ünitesinin kültürün 28. gününde COL I, COL I ve COL X immünhistokimyasal boyaması.

5.5.12. QRT-PCR ANALİZİ

Osteokondral doku ünitesindeki MC3T3-E1 ve ATDC5 hücrelerinin ko-kültür ortamında fazlara spesifik genlere farklılaşması QRT-PCR yöntemiyle incelenmiştir. Bu amaçla, kültürün 14. ve 21.günlerinde Col I (fibrotik markör), Col II (kondrojenik markör), Coll X (hipertrofik markör), MMP-13 (hipertrofik markör) ve ALP (osteojenik ve kalsifikasyon markör) genlerinin ekspresyon seviyelerine bakılmıştır (Şekil 5.66). Üç farklı Col I, Col II ve Col X genlerinde 14.güne kıyasla 21.gündeki ekspresyon seviyelerinde anlamlı artış gözlenmiştir ($p<0.05$). Bu genlerin ekspresyon seviyelerindeki en yüksek artış sırasıyla Col I, Coll II ve Col X genlerinde görülmüştür. Hipertrofik MMP-13 geninin ekspresyon

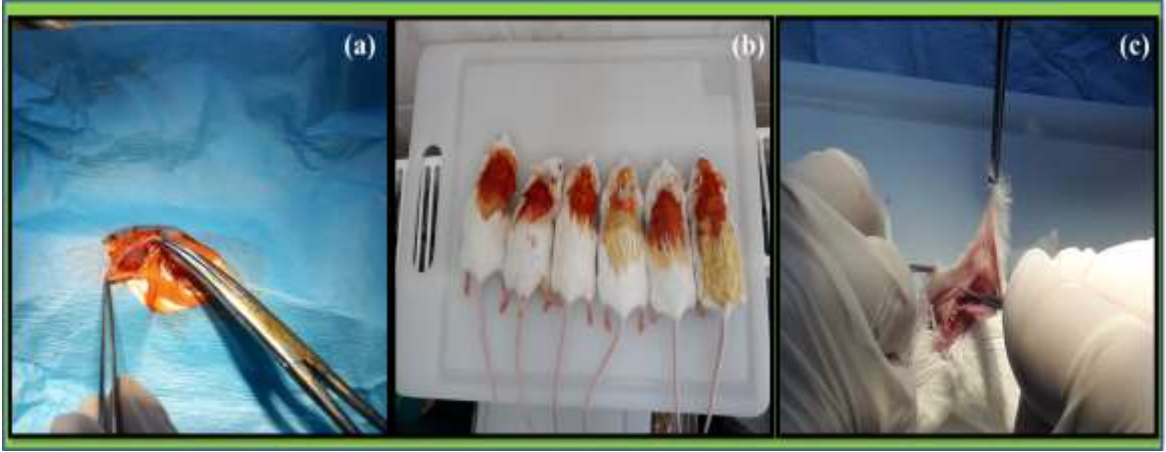
seviyeleri kültürün 21. günü sonuçları 14.gününe kıyasla önemli derecede artmıştır ($p<0.05$). ALP geninin ekspresyon seviyeleri kültürün 7.gününden itibaren düşmüştür ($p<0.05$).



Şekil 5.66. Osteokondral doku ünitesine ait Col I, Col II, Col X, MMP-13 ve ALP ekspresyon seviyeleri.(İstatistik analizi *, $p<0.05$, **, $p<0.01$, $n=3$).

5.6. *IN VIVO* BİYUYUMLULUK ANALİZİ

Osteokondral doku iskelesinin *in vivo* biyoyumluluğunun değerlendirilmesi amacıyla yetişkin BALB/c erkek fareler kullanılarak gerçekleştirilen *in vivo* deneyleri gerçekleştirilmiştir. Fareler gün bazında takip edilmiştir ve yara bölgesinde enflamasyon görülmemiş, artan günle birlikte yaraların iyileştiği ve tüy çıktığı görülmüştür (Şekil 5.67-68).

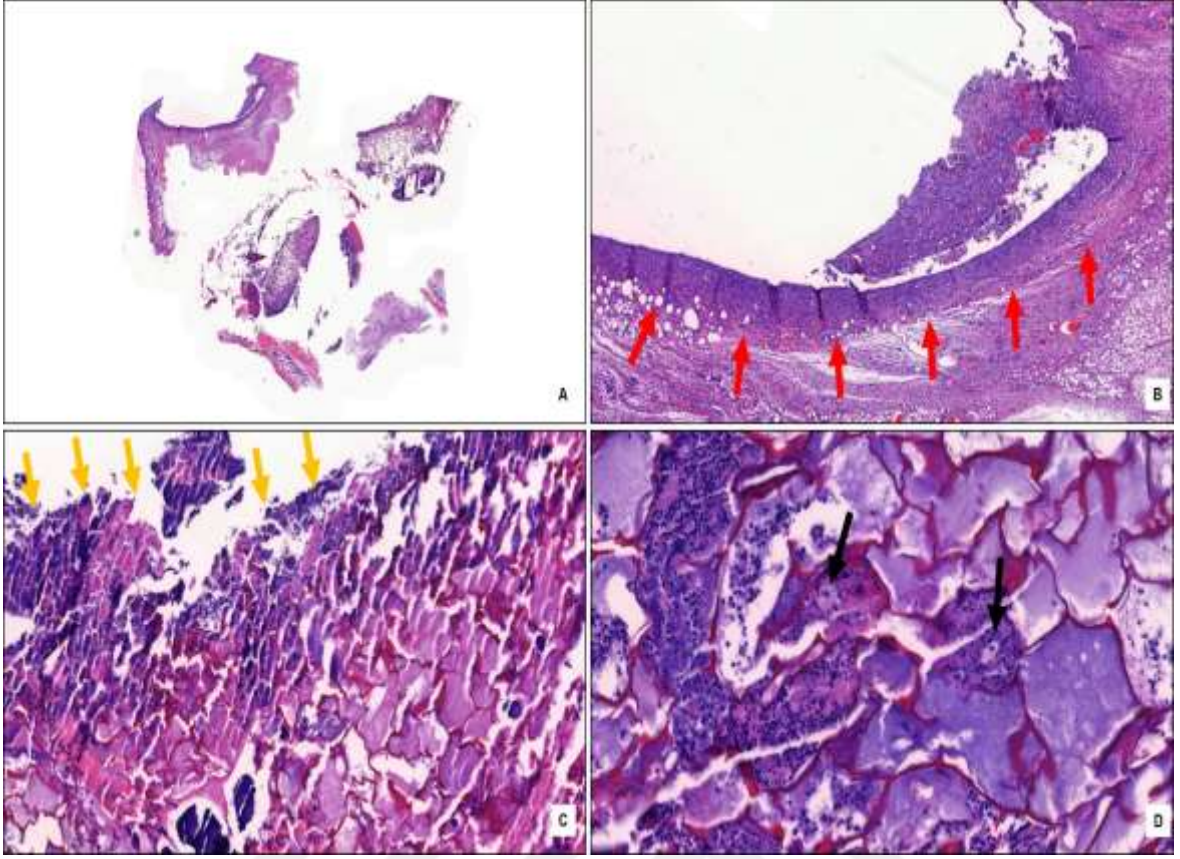


Şekil 5.67. Osteokondral doku ünitelerinin (a) Balb/C erkek farelerin subkutan bölgesine yerleştirme işlemi, (b) farelere dikiş atıldıktan sonra antibiyotik uygulanması ve (c) 14 gün sonunda biyopsi yoluyla deri altından alınarak histolojik incelemesi yapılan doku ünitesi örnekleri (n=6).



Şekil 5.68. Osteokondral doku ünitesi yerleştirilmiş olan farelerin izlenmesi ve (a) ve (b) farelerdeki 3 gün sonraki yara iyileşme görüntüleri ve (c) 10 gün sonrasında yara iyileşmesi resimleri.

Deneyler sonucunda eksizyonel biyopsi materyali olan kitosan bazlı osteokondral doku ünitesi, dermis içerisinde kaviter lezyon göstermiştir (Şekil 5.68). Kavite, çoğunlukla polimorfonükleer hücrelerden (PMNL) oluşan yoğun iltihaplı infiltrat ile çevrelenmiştir (Şekil 5.69B). Kitosan bazlı osteokondral doku ünitesinin PMNL'ler ve bazı makrofajlar tarafından parçalandığı görülmüştür (Şekil 5.69C ve Şekil 5.69D).



Şekil 5.69. Hayvan deneylerine ait sonuçlar (A) Kitosan içeren eksizyonel biyopsi (H&Ex5). (B) Yoğun iltihaplı sızıntı ile çevrili boşluk (H&Ex38, kara ok). (C) Kitosan, PMNL'ler (H&Ex90, sarı ok) tarafından çoğunlukla sızmış ve parçalanmış görüntüleri. (D) Makrofajlar siyah okla gösterilmiştir (H&Ex238).

6. TARTIŞMA VE SONUÇ

Gerçekleştirilen tez çalışması kapsamında, osteokondral hasarların doku mühendisliği yaklaşımı ile onarımına yönelik çok fazlı gradyan doku ünitelerinin biyomimetik olarak üretimi, karakterizasyonu ve osteokondral doku mühendisliği uygulamalarında kullanılabilirliği araştırılmıştır. Çalışma kapsamında gradyan osteokondral doku ünitesini oluşturan fazların (subkondral kemik, kalsifiye kıkırdak ve kıkırdak) doğal yapısı ve bileşenleri göz önünde bulundurularak üç fazlı yapılar tasarlanmış ve üretilmiştir.

6.1. SUBKONDRAL KEMİK FAZINA AİT SONUÇLAR

Tez çalışması kapsamında, öncelikle en alt faz olan subkondral kemik fazın üretimine yönelik çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Bunun için doğal kemik yapısının özellikleri ve bileşenleri göz önünde bulundurularak kemik dokusunun tasarımı ve üretimine yönelik çalışmalar yürütülmüştür. Doğal kemik yapısı, kemiğe sertliğini veren inorganik hidroksiapatit kristalleri, tip I ağırlıklı kollajen, glikozaminoglikan ve proteoglikan bileşenlerinden oluşur (101,102). Kemiğin doğal hücre dışı matris bileşenleri göz önünde bulundurularak, subkondral kemik fazını oluşturacak yapının kitosan, kollajen tip I ve nanohidroksiapatit kullanılarak üretilmesine karar verilmiştir.

Kitosan, glikozaminoglikan yapıları benzerliği nedeniyle kemik doku mühendisliği çalışmalarında sıklıkla kullanılan bir doğal polimerdir (49,92). Tez çalışmasında kitosana belirli oranlarda tip I kollajen ilave edilmiş [kitosan/kollajen (w/w) 100/0, 80/20, 50/50] ve ardından %1'lik (w/v) nanohidroksiapatit (nHA) partikülleri eklenerek dondurarak kurutma yöntemiyle gözenekli yapıda doku iskeleleri üretilmiştir.

Kitosan, ucuz, biyouyumlu, biyobozunur ve antimikrobiyal özelliklerden dolayı doku mühendisliği çalışmalarında sıklıkla tercih edilmektedir (103). Ayrıca, hücre dışı matris yapısında bulunan glikozaminoglikan yapısına benzerlik göstermesi, 3 boyutlu yapıda üretilebilir olması, hücre üremesi ve farklılaşmasına uygun ortam sağlaması gibi özellikleri kitosan kullanımını ön plana çıkarmaktadır (92,104–106).

Kemik fazı üretiminde, kitosana birlikte kompozit oluşturan diğer bileşen kollajen tip I'tir. Kollajen tip I, kemik hücre dışı matris (ECM) yapısında en bol bulunan hücre dışı matris proteindir ve hücre yapışmasını ve çoğalmasını desteklediğinden yaygın olarak

kullanılmaktadır (107). Literatürde, daha önce Wang ve ark. (2010) tarafından gerçekleştirilen çalışmada kitosana belirli oranlarda kollajen tip I ilave edilerek kompozit oluşturulmuş ve mezenkimal kök hücrelerinin (MKH) osteoblastik farklılaşması incelenmiştir (57). Kitosan/kollajen kompozitinde MKH'lerin osteoblastik farklılaşmasında önemli artışı gözlenmiştir. Literatürde daha önce yapılan benzer çalışmalarda, tip I kollajenin pre-osteoblastik MC3T3-E1 hücre üremesini ve osteoblastik farklılaşmayı da anlamlı olarak artırdığı gösterilmiştir (108,109). Kollajen tip I'in osteoblastik farklılaşma üzerindeki etkisi ve mekanizmasının açıklandığı ilk çalışmalardan biri Mizino ve ark. (2000) tarafından gerçekleştirilmiştir (54). Çalışmada, kemik iliği stromal hücreleri, tip I kollajen matrisi üzerinde kültürlendiğinde osteoblastik hücrelere farklılaştığı bulunmuştur. Tip I kollajen, hücre zarı üzerindeki $\alpha 2 \beta 1$ integrin reseptörü ile etkileşime girer ve hücre dışı sinyalleri hücrelere yönlendirir. Kollajen- $\alpha 2 \beta 1$ integrin etkileşimi kök hücrelerin osteoblastik farklılaşmasında ve ALP aktivitesinin artmasında önemli bir rol oynamaktadır (54). Çalışmada subkondral kemik fazın üretiminde yapıya katılan nanohidroksiapatit, doğal kemiğin önemli bir inorganik bileşeni olup, kemik doku mühendisliğinde sıklıkla kullanılan biyouyumlu, biyoaktif ve osteoindüktif bir malzemedir (110,111). Bu inorganik malzeme aynı zamanda kemik dolgu malzemesi olarak da kullanılmaktadır. Fakat, nanohidroksiapatitin kırılğan yapıya sahip olması nedeniyle kullanımı zordur. Bu durumda, nanohidroksiapatit, kitosan veya diğer biyouyumlu polimerler ile birlikte kullanılarak kompozit yapıda nHA içeren gözenekli yapılar elde edilebilir (112). Hidroksiapatitin biyouyumlu polimerlere ilave edilmesi sonucu yapının mekanik dayanımı ve hücre üremesini arttırdığı bilinmektedir (113,114). Thein-Han ve ark. (2008) tarafından gerçekleştirilen çalışmada yüksek ve orta molekül ağırlıktaki kitosanlara farklı oranlarında (%0.5, 1 ve 2 w/v) nHA ilave edilerek dondurarak kurutma yöntemiyle kompozit yapıda gözenekli kitosan/nanohidroksiapatit doku iskeleleri hazırlanmıştır (45). MC3T3-E1 preosteoblast hücreleri ile yürütülen *in vitro* hücre kültür çalışmaları sonucunda kitosan/nanohidroksiapatit doku iskelelerinde hücre yapışması ve üremesinin arttığı gözlenmiştir. Tez çalışması kapsamında, kemik fazının üretimi amacıyla farklı oranlardaki kitosan/kollajen tip I karışımlarına %1'lik (w/v) derişimde nHA eklenerek hazırlanan süspansiyonlar, dondurarak kurutma yöntemi ile hazırlanmış ve gözenekli yapıda doku iskeleleri elde edilmiştir.

Hazırlanan kompozit yapıdaki doku iskelelerin stabilizasyonunu artırmak amacıyla çapraz bağlama işlemleri uygulanmıştır. Kitosan ve kollajen içeren yapıların çapraz bağlanmasında yaygın olarak kullanılan başlıca çapraz bağlayıcılar sırasıyla N-hidroksisüksinimid (NHS) varlığında 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil] karbodiimid hidroklorür (EDAC), sodyum tripolifosfat (TPP) ve glioksaldır (62,85,115). NHS/EDAC karboksilik asit ve primer amin grupları arasında kimyasal bağ oluştururken, TPP amin grupları üzerinden iyonik etkileşimler aracılığıyla çapraz bağlanmayı sağlamaktadır (62,115). Glioksal ise aldehit grubu bir molekül olup ancak belirli derişimlerde kullanıldığı zaman toksik etkisi göstermemektedir (85). Glioksalın kitosan veya kollajende bulunan amin grupları ile etkileşmesi sonucu kimyasal çapraz bağlı yapılar elde edilmektedir. Tez çalışması kapsamında hazırlanan **chi80/coll20/nHA** ve **chi50/coll50/nHA** doku iskelelerinin çapraz bağlanmasında NHS/EDAC ve glioksal kullanılırken, TPP yalnızca kollajen tip I içermeyen **chi/nHA-kf** doku iskelelerinin çapraz bağlanmasında kullanılmıştır. Martinez ve ark. (2015) tarafından yapılan çalışmalarda kitosan/kollajen karışımlarında TPP çapraz bağlayıcı ajanın tek başına kullanılması durumunda mekanik dayanımda önemli bir artışın meydana gelmediği vurgulandığından, karışım halinde hazırlanan yapılarda TPP çapraz bağlayıcısı kullanılmamıştır (62). Uygun subkondral kemik bileşiminin ve çapraz bağlayıcı ajanların belirlenmesinde doku iskelelerinin karakterizasyonundan elde edilen sonuçlar, farklı çapraz bağlayıcı ajanların ve yapıya eklenen farklı kollajen tip I miktarlarının, morfoloji, gözeneklilik, mekanik dayanım, stabilite veya kararlılık gibi özellikler üzerindeki etkileri göz önünde bulundurularak değerlendirilmiştir.

Çapraz bağlama işleminin ardından yapıda meydana gelen kimyasal değişimler ATR-FTIR analizleri ile incelenmiştir. Elde edilen yapıların çapraz bağlanmadan ve çapraz bağlanması sonucunda piklerdeki kaymalar doku iskelelerindeki çapraz bağlama hakkında bilgi vermektedir. Şekil 5.1 (a), (b) ve (c)'de ve Çizelge 5.1 ve 5.2'de açıklandığı şekilde çapraz bağlama işlemi sonrasında bazı yeni pikler görülmüş, bazı piklerde de çapraz bağlanmadan kaynaklı kaymalar saptanmıştır. Özellikle, amin grupları veya primer amin ve karboksilik asit gruplarına spesifik piklerde kaymalar gözlenmiştir.

Öncelikle, **chi/nHA-kf** doku iskelelerinin TPP ile çapraz bağlama sonucunda kimyasal değişimler incelenmiştir. Negatif yüklü TPP molekülleri, genellikle toksik olmayan ve

biyo-uyumlu polielektrolit kompleksleri oluşturan, kitosan moleküllerinin pozitif yüklü serbest amin grupları (NH_2) ile iyonik olarak çapraz bağlayan fosfat grubuna (PO_4^{3-}) sahiptir (116). Kitosanın amin gruplarına karşılık gelen 1558 cm^{-1} 'de görülen pik TPP ile çapraz bağlanması sonucunda 1540 cm^{-1} 'ye kaymıştır. **chi/nHA-kf** doku iskelesinde 3280 cm^{-1} 'de $-\text{NH}_2$ ve $-\text{OH}$ gruplarına karşılık gelen bandlar TPP ile çapraz bağlanması sonrasında 3258 cm^{-1} 'ye kaydığı görülmüştür (117). **Chi/nHA-kf** doku iskelesinde 955 cm^{-1} 'de görülen nHA kaynaklı P-O piki (germe titreşimi) TPP ile çapraz bağlanması sonrası 892 cm^{-1} 'ye kaymış ve daha da belirgin hale gelmiştir. Bu pikin varlığı TPP'nin fosfat grubunun kitosanın protonlanmış amin grupları ile etkileşimini göstermektedir. Benzer sonuç, Bhumkar ve ark. (2006) tarafından gerçekleştirilen çalışmada TPP kullanılarak hazırlanan kitosan partiküllerinde de görülmüştür (117). EDAC, karboksilik asit gruplarını aktive ederek yapıdaki amino-grupları ile çapraz bağ oluşturur (62). Yapıların NHS/EDAC ile çapraz bağlanması sonucunda **chi80/coll20/nHA** doku iskelesine ait $-\text{NH}_2$ ve $-\text{OH}$ gruplarına karşılık gelen pik 3279 cm^{-1} 'den 3265 cm^{-1} 'ye kaymıştır. Amid I piklerinde NHS/EDAC ile çapraz bağlanması sonrasında azalma meydana gelmiştir. **Chi/nHA-kf** ve **chi50/coll50/nHA** doku iskelelerinde de NHS/EDAC ile çapraz bağlanması sonucu benzer kaymalar gözlenmiştir. **Chi/nHA-kf**, **chi80/coll20/nHA** ve **chi50/coll50/nHA** doku iskelelerinin glioksal ile çapraz bağlanması sonucunda da kimyasal değişimler belirlenmiştir. Kitosan iki hidroksil grubu ve bir glukozamin halkasında bir amino grubu olan bir yapıya sahiptir. Glioksal molekülü iki karbonil grubuna sahiptir. Glioksalin karbonil grupları ile kitosanın amin grupları *Schiff bazları* yolu ile çapraz bağ oluştururlar (118). **Chi/nHA-kf** ve **chi80/coll20/nHA** doku iskelelerinde 1654 cm^{-1} dalga boyunda görülen amid I bandları glioksal ile çapraz bağlanması sonucunda sırasıyla 1636 ve 1644 cm^{-1} dalga boylarına kaymıştır. Elde edilen sonuçlar, **chi/nHA-kf**, **chi80/coll20/nHA** ve **chi50/coll50/nHA** doku iskelelerinin başarılı bir şekilde TPP, NHS/EDAC ve glioksal kullanılarak çapraz bağlandığını göstermiştir.

Kemik fazına ait doku iskelelerinin gözenekliliğini, gözenek çapı ve içsel bağlantılılık değerlerini saptamak amacıyla SEM analizi gerçekleştirilmiştir. Bu parametreler homojen bir hücre ekimi ve dağılımının sağlanması, hücre göçünün iskelenin iç kısımlarına kolaylıkla ulaşabilmesi, oksijen ve besin alış-verişinin dış ortam ile sağlıklı olabilmesi için oldukça kritiktir (119). Doku iskelelerine ait optimum gözenek çapı, hücreye özgü bir parametre olmakla beraber, kemik doku mühendisliği için değerler $200\text{--}400\text{ }\mu\text{m}$ olarak

rapor edilmiştir (120). Bu sebeple, tüm doku iskelelerinin SEM ile gözeneklilik, içsel bağlantılık sonuçları ve nHA'nın yapı içerisindeki dağılımı incelenmiştir. Tüm doku iskelelerinde nHA dağılımının homojen olarak sağlandığı ve gözenekli yapının korunduğu görülmüştür. **Chi/nHA-kf**, **chi80/coll20/nHA** ve **chi50/coll50/nHA** doku iskelelerinin ortalama gözenek çapları sırasıyla $115,08 \pm 39,38$; $204,41 \pm 20,09$ ve $134,46 \pm 39,92$ μm olarak bulunmuştur. Yapıya kollajen eklenmesiyle birlikte gözenek çaplarında artış gözlenmiştir (Şekil 5.2). Benzer bir sonuç, Martinez ve ark. (2015) tarafından gerçekleştirilen çalışmalarda da elde edilmiştir (62). TPP ile chi/nHA-kf doku iskelesinin çapraz bağlanması sonucunda gözenek çaplarındaki değerler $74,83 \pm 20,09$ μm ile 100 μm altına inmiştir. Goh ve ark. (2018) tarafından yapılan çalışmada, TPP ile çapraz bağlı kitosan-nanohidroksiapatit doku iskeleleri üretilmiştir (121). Artan TPP oranı ile birlikte kitosan-nanohidroksiapatit gözenek çaplarında ve %gözeneklilik değerlerinde düşüş gözlenmiştir. Tez çalışması kapsamında, TPP ile chi/nHA-kf doku iskelesinin çapraz bağlanması ve kollajen kaplanması sonucunda gözenek çapı $142,56 \pm 32,47$ μm olarak bulunmuştur. Elde edilen bu sonuç iki farklı şekilde açıklanabilir. İlk olarak kollajen kaplama ortamında ve vakum etüvünde kollajenin içeriye düfüzlenmesi esnasında gözeneklerin açılmasından kaynaklanmış olabileceği sonucuna varılabilir. Diğer yandan, çapraz bağlanmış doku iskelesinin çapraz bağları asidik kollajen kaplama ortamında kırılarak gözeneklilik yapısını etkileyen sekonder gözeneklilik oluşumuna neden olabilmektedir. NHS/EDAC ile çapraz bağlanma sonucunda kollajen içeren doku iskelelerinde gözeneklilik değerlerinde önemli bir düşüş gözlenirken kollajen içermeyen kitosan doku iskelelerinde önemli bir değişim görülmemiştir (Şekil 5.3). Glioksal ile çapraz bağlanma sonucunda tüm doku iskelelerinin gözenek çap değerleri 200 μm 'den yüksek olarak elde edilmiştir (Şekil 5.4). Sonuçlar, gözeneklilik ve gözenek çapı açısından en uygun çapraz bağlayıcı ajanın glioksal olduğunu göstermektedir.

Subkondral kemik, osteokondral doku ünitesinin en alt fazı olduğundan doku iskelesinin mekanik dayanımı önemlidir. Uygun mekanik özelliklere sahip iskelelerinin geliştirilmesi, doku mühendisliği yapılarının tasarımında en büyük zorluklardan biridir. Basma modülünün ve basınç dayanımının kültürleme sırasında hücresel aktivite üzerinde etkisi olduğu literatürde mevcuttur (122). Hücreleri yeni dokular üretmeye teşvik etmek amacıyla dokuya özgü hücre dışı matrislerin mekanik özelliklerine yakın olacak şekilde dayanımın

ayarlanması gerekmektedir (122,123). Tez çalışması kapsamında, subkondral kemik fazını oluşturacak farklı kitosan/kollajen I bileşimine sahip doku iskelelerinin mekanik dayanımını araştırmak amacıyla basma testleri uygulanmış ve sonuçlar çapraz bağlayıcı ajan ve kollajen tip I miktarı açısından değerlendirilmiştir. İlk olarak farklı oranlardaki kollajen tip I içeriğinin basma modülü üzerindeki etkisi belirlenmiştir. Çapraz bağlı olmayan örneklerde kollajenin yapıya eklenmesi sonucu basma modül değerlerinde önemli ölçüde azalma görülmüştür (Şekil 5.6-5.8). Bu durumun nedeni olarak, kollajenin düşük mekanik mukavemete sahip olması gösterilebilir (124). Literatürde, kollajen içeren yapılar doğal veya sentetik polimerle birlikte kullanılarak kompozit yapılar oluşturulmakta ve yapı mukavemeti arttırılmaktadır (125,126). Bununla birlikte, çapraz bağlama işlemlerinin de kollajen içeren yapıların mekanik özelliklerinin iyileştirilmesinde olumlu etkileri mevcuttur (85). Chi/nHA-kf doku iskelesinin NHS/EDAC ile çapraz bağlanması sonucunda basma modülü $8,59 \pm 1,89$ kPa değerinden $13,1 \pm 2,26$ kPa değerine yükselerek yaklaşık %50'lik artış göstermiştir. Kollajen içeren chi80/coll20/nHA ve chi50/coll50/nHA doku iskelelerine ait değerler sırasıyla $3,21 \pm 0,82$ ve $6,095 \pm 0,84$ kPa değerlerinden $5,43 \pm 0,73$ ve $6,88 \pm 1,94$ kPa değerlerine yükselmiştir. TPP ile chi/nHA-kf doku iskelesinin çapraz bağlanması sonrasında $8,59 \pm 1,89$ kPa değerinden $14,55 \pm 1,06$ kPa değerine yükselmiş ve ~ %70'lik artış gözlenmiştir. Kollajen kaplama işleminin basma modülü üzerinde çok önemli bir etkisi olmadığı sonucuna varılmıştır (Şekil 5.9). TPP ile çapraz bağlama ile benzer sonuçlar, Martinez ve ark. (2015) ve Sierra ve ark. (2015), tarafından yapılan çalışmalarda da görülmüştür (62,127). Tez çalışmasında, doku iskelelerinin (**chi/nHA-kf**, **chi80/coll20/nHA** ve **chi50/coll50/nHA**) glioksal ile çapraz bağlanması sonucunda diğer çapraz bağlayıcılara oranla mekanik dayanımda önemli derecede artış gözlenmiştir. **Chi/nHA-kf** doku iskelesinin glioksal ile çapraz bağlanması sonucunda $92,00 \pm 15,24$ kPa ile en yüksek basma modül değeri elde edilmiştir. Fakat, elde edilen doku iskelesinin sert ve kırılğan yapıda olduğu görülmüştür. Yapıya kollajen ilave edilmesi ile birlikte glioksal ile çapraz bağlanmış **chi80/coll20/nHA** ve **chi50/coll50/nHA** doku iskelelerine ait basma modül değerleri sırasıyla $42,95 \pm 4,31$ ve $34,65 \pm 3,32$ kPa olarak bulunmuştur. Sonuç olarak, en yüksek basma modül değerleri glioksal ile çapraz bağlı **chi/nHA-kf**, **chi80/coll20/nHA** ve **chi50/coll50/nHA** doku iskelelerinde görülmüştür. Elde edilen yapıların morfolojisi ve mekanik dayanımı göz önünde bulundurularak **TPP-chi/nHA-kf**, **TPP-chi/nHA-kf+Coll**, **glioksal-chi80/coll20/nHA** ve **glioksal-**

chi50/coll50/nHA doku iskeleleri seçilmiş ve bu yapılar ile diğer karakterizasyon çalışmalarına devam edilmiştir.

Mikro-bilgisayarlı tomografi (μ -CT), doku iskelelerinin gözeneklilik özelliklerini belirlemede klasik hacimsel yöntemlere göre daha güvenilir sonuçlar vermektedir (128,129). Doku iskelelerin yüksek %gözeneklilik ve % içsel bağlantılığa sahip olmaları kemik doku mühendisliği uygulamaları açısından önemli parametrelerdir (130). Çizelge 5.6, iskelelerin μ -CT ile alınmış 3 boyutlu görüntülerini ve gözeneklilik dağılımını vermektedir. Tez çalışmasında, TPP-chi/nHA-kf, TPP-chi/nHA-kf+Coll, glioksal-chi80/coll20/nHA ve glioksal-chi50/coll50/nHA doku iskeleleri için elde edilen toplam gözeneklilik ve içsel bağlantılılık değerleri ~%60 değerinin üzerinde bulunmuştur. Saravanan ve ark (2017) tarafından yapılan çalışmada kitosan/jelatin-grafen (CS/Gel/GO) doku iskeleleri üretilmiş ve MKH hücrelerinin üremesi için ~%56 gözeneklilik değeri yeterli bulunmuştur (131). Park ve ark (2001) tarafından üretilen EDAC çapraz bağlı gözenekli kollajen/hyaluronik asit doku iskelelerinde de μ -CT ile alınmış gözenek değerlerinde benzer sonuç elde edilmiştir (132). Literatürde, kemik doku mühendisliği uygulamalarında osteojenik farklılaşma için gerekli optimal %toplam gözeneklilik değeri %75 olarak belirtilmiştir (133). Tez çalışmasından elde edilen ~%60 gözeneklilik değeri literatürdeki osteojenik farklılaşma için gerekli olan değere (%75) yakındır.

Poliyonik kompleks oluşumu ile elde edilen chi80/coll20/nHA ve chi50/coll50/nHA doku iskelelerinin çapraz bağlanmasının ardından kollajen salımı analizi ile yapı içerisindeki kollajen stabilitesi incelenmiştir. Kollajen tip I'in osteojenik farklılaşmada etkisi olduğundan, yapı içerisinde kararlı olarak kalması gerekmektedir. Glioksal-chi50/coll50/nHA doku iskelesinde birinci günden itibaren kollajen salımı gözlenmiştir. Glioksal-Chi50/coll50/nHA doku iskelesinden 28 gün sonra ~ %50 kollajen salımı gözlenmiştir (Çizelge 5.4). Glioksal-chi80/coll20/nHA doku iskelesinden kollajen salımı 7 gün boyunca gözlenmemiştir (Çizelge 5.5). Glioksal-chi80/coll20/nHA doku iskelesinden 28.gündeki toplam %kollajen salımı ~ %50 olarak belirlenmiştir. TPP-Chi/nHA-kf+Coll doku iskelesinden ise ani kollajen salımı (*burst release*) gözlenmiştir. TPP-Chi/nHA-kf+Coll doku iskelesinden 7.günde en yüksek salım gözlenmiştir. Glioksal-chi80/coll20/nHA bileşiminden minimum kollajen salımı gözlenmiş ve bu yapıda en

yüksek kollajen kararlılığı görülmüştür. Tez çalışması kapsamında subkondral kemik fazına ait doku iskelelerinin belirlenmesine yönelik yapılan karakterizasyon çalışmaları sonucunda doğal kemik bileşenleri, gözeneklilik, morfoloji, mekanik dayanım ve kollajen kararlılığı değerlendirilerek *in vitro* hücre kültürü çalışmalarında kullanılmak üzere **chi/nHA-kf** (kontrol), **glioksal-chi80/coll20/nHA** ve **glioksal-chi50/coll50/nHA** doku iskeleleri seçilmiştir.

Subkondral kemik fazına ait *in-vitro* hücre kültür çalışmaları pre-osteoblastik MC3T3-E1 hücreleri ile yürütülmüştür. MC3T3-E1 hücreleri durgun koşullarda **chi/nHA-kf** (kontrol), **glioksal-chi80/coll20/nHA** ve **glioksal-chi50/coll50/nHA** doku iskelelerinin üzerine ekilerek Prestoblue ve DNA miktar tayini ile hücre üremesi izlenmiştir. Hücre üremesinin kültür süresi boyunca hem Prestoblue analizi hem de DNA miktar tayini ile arttığı bulunmuştur (Şekil 5.12 ve 5.13). Kollajen içeriğinin artması ile birlikte hücre üremesi kontrol grubu olan chi/nHA-kf doku iskelesine göre 5. günden itibaren anlamlı olarak artmıştır ($p<0.05$). Bunun sebebi olarak yapıya ilave edilen kollajen tip I bileşeninin üremeye olan pozitif etkisi gösterilebilir. Literatürde de kollajenin tip I'in hücre yapışmasını, üremesini önemli ölçüde arttığı ve hücre canlılığını koruduğu görülmüştür (57,134). Buna ek olarak kitosan/kollajen süspansiyonuna eklenen nanohidroksiapatitin MC3T3-E1 hücrelerinin üremesi ve farklılaşması üzerinde olumlu etkileri mevcuttur (45). Thein-Han ve arkadaşları (2008) tarafından kitosan-nanohidroksiapatit doku iskeleleri ile yapılan çalışmalarda nanohidroksiapatitin osteoblast hücrelerinin üremesi üzerindeki etkisi açıklanmıştır (45). Nanohidroksiapatit partiküllerin kitosan yapısına ilave edilmesi ile birlikte yapının yüzey pürüzlülüğünün arttığı ve nanohidroksiapatit içermeyen kitosana kıyasla 20 kat daha fazla yüzey alanında sahip olduğu gözlenmiştir. Yüzey alanının artmasının sırasıyla fibronektin adsorpsiyonunu ve hücre tutunmasını arttırdığı belirtilmiştir (135). Ayrıca, farklı bir çalışmada MC3T3-E1 pre-osteoblastik hücrelerinin, taşıdıkları kalsiyum algılayıcı reseptör sayesinde, üremeleri sırasında hücre dışı kalsiyuma cevap verdikleri rapor edilmiştir (136). MC3T3-E1 hücreleri, kalsiyum mineralleri içeren yapıya doğru göç etmektedir. Beşkardeş ve ark (2015) tarafından gerçekleştirilen farklı bir çalışmada mikrodalga kaynağı kullanılarak süpergözenekli kitosan ve kitosan-hidroksiapatit doku iskeleleri üretilmiştir (48). Bu çalışmada hücrelerin her iki doku iskelesinde de tutunduğu ve çoğaldığı görülmüş fakat, hücre üremesi en yüksek oranda HA varlığında görülmüştür. Sonuç olarak **chi/nHA-kf** (kontrol), **glioksal-chi80/coll20/nHA** ve

glioksal-chi50/coll50/nHA doku iskeleleri hücre üremesi açısından değerlendirildiğinde tüm doku iskeleleri sabit nHA içerdiğinden kollajen içeriği belirleyici olmuştur. Kollajen içeriği arttıkça kontrol grubu olan **chi/nHA-kf** iskelesine göre anlamlı olarak daha yüksek MC3T3-E1 hücre üremesi görülmüştür.

MC3T3-E1 hücrelerin doku iskeleleri üzerine yapışması, üremesi ve yayılması, canlılığının korunması ve farklılaşması açısından önemlidir. Tez çalışmasında, MC3T3-E1 hücrelerin yapısında kollajen içeren **glioksal-chi80/coll20/nHA** ve **glioksal-chi50/coll50/nHA** doku iskelelerindeki yapışma ve yayılmaları SEM ile görüntülenmiştir. SEM görüntüleri incelendiğinde kültürün 7. ve 14.günlerinde MC3T3-E1 hücrelerin **chi/nHA-kf** (kontrol), **glioksal-chi80/coll20/nHA** ve **glioksal-chi50/coll50/nHA** doku iskelelerinin yüzeyine yapıştıkları ve yayıldıkları belirgin olarak görülmektedir (Şekil 5.16-5.21). Doku iskelelerinin gözenekli ve içsel bağlantılı yapıya sahip olması ile hücrelerin doku iskelesinin iç bölgelerine doğru yöneldikleri görülmüştür. MC3T3-E1 hücrelerinin nano boyutlardaki uzantılar ile gözenek duvarları arasında köprüler oluşturarak üç boyutlu yapıda üredikleri görülmektedir. SEM görüntülerinden, Prestoblue ve DNA miktar tayini sonuçları ile paralel olarak, kültürün 14. gününde hücre yoğunluğunun, 7. gününe oranla arttığı ve doku iskelesini kapladığı anlaşılmaktadır (Şekil 5.16-5.21).

Kemik mineralizasyonun belirlenmesinde Ca^{+2} analizi, ALP aktivitesi tayini ve histolojik analizler kullanılmıştır. Pre-osteoblastik MC3T3-E1 hücrelerinin zamanla mineralleşme fazına girdiği, mineralize hücre dışı matris ürettiği ve kemik hücrelerine farklılaştığı belirlenmiştir (93). Hücre içermeyen doku iskeleleri kontrol olarak kabul edilmiştir. Doku iskelelerine hücre ekimi sonrasında kültür süresindeki artışla birlikte kemik mineralizasyonunda anlamlı olarak artış gözlenmiştir (Şekil.5.15). Literatürde, hidroksiapatit içeren doku iskelelerinde üreyen kök hücrelerin osteoblastik farklılaşma ortamında kültürlendikten sonra belirli günlerde Ca^{+2} mineralizasyonu incelenmiştir ve artan günle birlikte Ca^{+2} mineralizasyonunda artış olduğu bildirilmiştir (93,137). Tez çalışması kapsamında, kültürün 21.gününde parafine gömülü doku iskelelerinden histolojik kesitler alınarak H&E ve alizarin kırmısı (ARS) boyaması gerçekleştirilmiştir. H&E boyaması sonrasında MC3T3-E1 hücrelerinin doku iskelelerinde gözenekler içerisinde ürediği görülmüştür. Alizarin kırmısı boyaması sonrasında hücre yoğunluğunun olduğu bölgelerde kahverengimsi-siyah renkte dağılmış kalsiyum nodülleri görülmüştür (41).

Kemik farklılaşmasının belirlenmesindeki diğer biyokimyasal yöntemlerden biri de ALP aktivitesidir. ALP, kemik metabolizmasıyla ve osteoblastların farklılaşmasıyla ilişkili olan bir kemik matris enzimidir. Bu nedenle ALP aktivitesi, osteoblast farklılaşmasının belirlenmesinde en sık incelenen parametrelerdendir (138). ALP aktivitesi, erken dönem farklılaşması veya mineralizasyonu olup en yüksek değerine erken dönemde ulaşmaktadır (94). Tez çalışmasında, ALP aktivitesi değerleri DNA miktarına bölünerek normalize edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre ALP aktivitesinin chi/nHA-kf doku iskelesi için en yüksek olduğu gün 7.gün iken glioksal-chi80/coll20/nHA ve glioksal-chi50/coll50/nHA doku iskeleleri için ise 14. gün olarak bulunmuştur. Kültürün 21.günde ise ALP aktivitesi anlamlı olarak düşüş göstermiştir (Şekil 5.14).

Kemik fazına ait doku iskelelerinde (**chi/nHA-kf** (kontrol), **glioksal-chi80/coll20/nHA** ve **glioksal-chi50/coll50/nHA**) MC3T3-E1 hücre ekimi sonrası osteoblastik farklılaşmayı incelemek amacıyla kültürün 14.gününde RT-PCR analizi ile OCN, OPN, RunX2 ve Col I genlerinin ekspresyon seviyelerine bakılmıştır (48,139). Sabit nHA varlığında yapıya belli oranlarda tip I kollajenin eklenmesiyle gen ekspresyon seviyelerindeki değişim incelenmiştir (Şekil 5.23). Literatürde, Ignatius (2004) ve Mizino (2000) tarafından yürütülen benzer çalışmalarda kollajen tip I'nin kullanıldığı doku iskelelerine ait kemiğe spesifik genlerin ekspresyon seviyelerine etkileri rapor edilmiştir (54,140). Kollajen oranının artması ile birlikte genlerin ekspresyon seviyelerinde artış meydana gelmiştir. Bu sonuç kollajen tip I'in osteoblastik farklılaşmada önemli rolü olduğunu göstermiştir (54,141). Subkondral kemik fazı için gerçekleştirilen karakterizasyon ve *in vitro* hücre kültürü çalışmaları sonucunda osteokondral doku ünitesinin doğal gradyan yapısı da göz önünde bulundurularak subkondral kemik fazı olarak ağırlıkça %80 kitosan, %20 kollajen tip I ve %1 (w/v) içeren çapraz bağlı (glioksal) yapıların (**glioksal-chi80/coll20/nHA**) kullanılmasına karar verilmiştir.

6.2. KALSİFİYE KIKIRDAK (GEÇİŞ BÖLGESİ) FAZINA AİT SONUÇLAR

Kalsifiye kıkırdak, eklem kıkırdak ve subkondral kemik arasındaki yapısal sürekliliği sağlamaya yarayan osteokondral doku ünitesine ait kritik bir arayüzdür. Başka bir deyişle, doğal kıkırdak ve subkondral kemik arasında bir bariyer görevi gören, osteokondral dokunun ara katmanıdır (13). Kemikten kıkırdak fazına kadar vasküler invazyonun önlenmesi için de çok önemlidir. Kalsifiye kıkırdak bileşenleri tip II kollajen,

glikosaminoglikan ve hidroksiapatit bileşenlerinden oluşur (142). Doğal osteokondral doku yapısı kollajen tip II içerikleri bakımından kıyaslandığında en yüksek yüzdeye kıkırdak (% 61,39 $\pm$ % 0,38) ve ardından kalsifiye kıkırdak (% 20,16 $\pm$ % 0,96) fazında rastlanmaktadır. Aynı şekilde, osteokondral doku yapısına ait fazlar hidroksiapatit içerikleri bakımından kıyaslandığında en yüksek yüzdeye subkondral kemik (% 85,78 $\pm$ % 3,42) ve ardından kalsifiye kıkırdak (% 65,09 $\pm$ 2,31) sahiptir (15). Yapıda bulunan kollajen, kalsiyum fosfat minerallerinin birikmesi için üçlü sarmalları oluşturarak iskele görevini görür. Yapıda bulunan diğer bileşen olan glikosaminoglikanlar genellikle uzun şeker zincirlerinin bir protein çekirdeğine kovalent olarak bağlandığı proteoglikan bileşenleridir (143). Mineralize bir kıkırdak matrisine gömülü hipertrofik kondrositlerden oluşan bu ince tabaka, kıkırdaktan kemiğe mekanik stres iletilmesinden sorumludur (14,15). Tez çalışması kapsamında, kalsifiye kıkırdak fazın doğal hücre dışı matris bileşenleri göz önüne alınarak kalsifiye kıkırdak fazının üretilmesinde glikosaminoglikan benzeri kitosan, kollajen tip II ve nanohidroksiapatit kullanılmıştır. Bu bileşenlerin varlığında sabit nHA oranı %0,5 (w/v) ile farklı oranlara sahip kitosan/kollajen tip II/nHA jellerin (100/0, 70/30, 50/50 ve 30/70, w/w) hazırlanmasında Bölüm 4.4'de açıklanan termal jelleşme yöntemi kullanılmıştır. Termal jelleşme işleminde, hücre enkapsüle edilmiş jel süspansiyonlarının jelleşme süresi, hücre canlılığının korunması açısından öne çıkmaktadır. Çalışmalarda kitosan derişimi %2,5 (%w/v) olarak belirlenmiş ve bu kitosan derişimi kitosan/kollajen tip II/nHA jellerinin hazırlanmasında kullanılmıştır. Bu şekilde hazırlanan kitosan/kollajen tip II/nHA jellerin akışkan halden beyaz hareketsiz hale geldiği andaki jelleşme süreleri 30 dakikayı geçmemiştir. Bu sonuçlar zamanla vizkozite değişiminden belirlenen jelleşme süreleri ile de örtüşmektedir (Şekil 5.29). Elde edilen chi/nHA, chi/Coll II/nHA 70: 30, chi/coll II/nHA 50:50 ve chi/coll II/nHA 30:70 jellerin karakterizasyonuna ATR-FTIR ile başlanmış olup tüm jellerde karakteristik kitosan ve kollajen pikleri görülmüş ve jellerin hazırlanmasında aynı bileşenler kullanıldığından gruplar arasındaki piklerde belirgin fark görülmemiştir (Şekil 5.24).

Kalsifiye kıkırdak fazına ait jellerin dondurarak kurutma yöntemi sonrası SEM ile morfolojik analizleri gerçekleştirilmiştir. Matris yapısının kollajen II miktarına bağlı olduğu açıkça görülmektedir (Şekil 5.25). Kollajen tip II içermeyen chi/nHA jel matrisi açık gözenekli birbirine bağlı bir yapı sergilemiştir. Kalsifiye kıkırdak fazlarına ait jellerin kollajen miktarı arttıkça fiberlerin ağ görüntüsü belirgin olarak ortaya çıkmıştır. Kollajen

liflerinin oranı, kollajen tip II miktarı ile artış göstermiştir. Chi/col II/nHA 70:30 hidrojellerinde, kollajen lifleri matris içinde yayılmış ve ağ benzeri bir yapı oluşturmuştur (Şekil 5.25). Benzer morfoloji, Stegemann ve ark. (2014), tarafından hazırlanan kitosan/kollajen tip I jel yapılarında da gözlenmiştir (57). Chi/col II / nHA 50:50 jelinde ise belirli bölgelerde uzun fiber yapılar ayırt edilmektedir. Chi/coll II/nHA 30:70 jel yapısında ise, açık gözenekler arasında köprü oluşturan, kitosan yapısını kaplayan kollajen fiberler görülmektedir (Şekil 5.25).

Tüm jel yapıların gözenekli ve içsel bağlantılı morfolojileri SEM analizi ile belirlenmiştir. EDAX analizinde jel yapılara eklenen %0,5'lik (w/v) nHA kaynaklı kalsiyum (Ca) ve fosfat (P) elementleri saptanmıştır. Sonuç olarak, EDAX verileri tüm jel yapılar içerisinde görülen Ca ve P elementlerinden nHA varlığını doğrulamaktadır.

Hidrojel, hücre dışı matris (ECM) ile benzerlikleri, mükemmel biyolojik performansı ve doğal hücre etkileşimi kabiliyetleri nedeniyle doku mühendisliği uygulamaları için iskele olarak kullanılmaktadır (144). Jellerin doku iskelesi rolünü üstlenmesi için gözenekli ve içsel bağlantılı yapıda olması gerekmektedir. Çoğu jel yapıdaki doku iskelelerinde, iskele gözenekliliği doku oluşumuna ve fonksiyonuna önemli katkı sağlamaktadır (145). Tez çalışmasında, kalsifiye kıkırdak fazına ait jellerin gözeneklilik ve içsel bağlantılılık değerleri μ -CT ile belirlenmiştir. Jellere ait %toplam ve %açık gözeneklilik değerleri sırasıyla ~%82 ve ~%80'nin üzerinde bulunmuştur. Kalsifiye kıkırdak fazına ait tüm jellerde yüksek içsel bağlantılılık değerleri elde edilmiş ve verilerden en yüksek içsel bağlantılılığa sahip jel bileşeni chi/coll II/nHA 70: 30 olarak bulunmuştur. Sonuç olarak, hazırlanan jel formlarının dondurarak kurutma işleminden sonra μ -CT analizleri ile açık gözenekliliğe ve içsel bağlantılılığa sahip yapılar olduğu sonucuna varılmıştır (Çizelge 5.11).

Kompozit jellerin şişme davranışları araştırılmış ve Çizelge 5.10'da su tutma kapasiteleri sunulmuştur. Fizyolojik ortamı sağlamak amacıyla şişme deneyi pH 7,4 ve 37 °C'deki PBS ortamında gerçekleştirilmiştir. Tüm kompozit yapıdaki jeller, % 95'in üzerinde %su tutma değerlerine sahiptir. Bu sonuç, kitosan ve kollajenin hidrofilitesine, benzer gözeneklilik ve su bağlama kabiliyetlerine bağlanmıştır (146). Yüksek %su tutma değerleri, jellerin etkili besin aktarımını destekleyebileceğini göstermektedir (147).

Kalsifiye kıkırdak fazına ait jellerin viskoelastik davranışları gerçekleştirilen reolojik analizlerle belirlenmiştir. Öncelikle, jellere ait gerilim (deformasyon) tarama testi ile lineer viskoelastik bölge (LVR) belirlenmiştir. Bunun için, elastik modülün veya depolama modülün (G') gerinim genliğinden (*strain amplitude*) bağımsız olduğu genellikle lineer viskoelastik bölge (LVR) olarak bilinen kusursuz elastik davranışın gözlemlendiği bölgenin belirlenmesi amacıyla ($\omega_0 = 1$ Hz) ve % 0,001–1 deformasyon aralığında gerinim tarama testi uygulanmıştır. Dinamik frekans tarama testi için LVR bölgesi % 0,01 olarak seçilmiştir. Jellere ait jelleşme sıcaklığını ve süresini belirlemek amacıyla chi/coll II/nHA 50:50 bileşeni seçilmiş ve viskozite ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Chi/coll II/nHA 50:50 süspansiyonuna ait viskozitede ani artış 37°C'de görülmüştür (Şekil 5.25). Jel viskozitesindeki ani artış süspansiyon halden jel haline geçişin başladığını göstermektedir. Bu sonuç, fizyolojik sıcaklıkta (37°C) termal jelleşmenin gerçekleştiğini göstermiştir. Jelleşme süresi viskozitedeki değişim değerlendirilerek 24 dakika olarak belirlenmiştir. Frekans tarama analizlerinden elde edilen sonuçlar, chi/nHA ve chi / col II / nHA jelleri için Şekil 5.27'de ve Çizelge 5.10'da gösterilmiştir. Depo modülü (G'), jellerin elastik özelliği ve yapısında ne kadar enerji depolandığı hakkında bilgi verirken, kayıp modül (G'') malzemenin viskoz özellikleri ile bir döngü boyunca yapılardan kaybedilen enerji hakkında bilgi verir. Şekil 5.27'den elde edilen sonuçlar tüm hidrojel bileşimlerinde G' değerinin G'' değerlerinden büyük olduğunu göstermektedir. Bu durum tüm jel yapıların, yüksek elastisite ve düşük viskozite ile tanımlanan viskoelastik davranışa sahip oldukları sonucunu ortaya koymaktadır. Kayıp modül değerinin $\tan \delta < 1$ olması malzemenin viskoz özellikten çok elastik özelliğe sahip olduğunu gösterir (148). Jellere ait hesaplanan değer $\tan \delta < 1$ olması viskoelastik ve ideal jel özelliklerine sahip olduğunu göstermektedir. Polimer hidrojellerin göz boyutu (*mesh size*, ξ) ve çapraz bağlar arası ortalama molekül ağırlığı (M_c) önemlidir. Bu bağlamda, ξ ve M_c değerleri kauçuk esneklik teorisi (*rubber elastic theory*) kullanılarak hesaplanmıştır (149). Gözenek boyutu (*mesh size*), çapraz bağlı jel yapılarda makromolekül zincirleri arasındaki mesafenin bir ölçüsüdür, kısaca iki karşılıklı çapraz bağ noktası arasındaki mesafedir (150). Kollajen tip II'nin yapıya eklenmesi çapraz bağ yoğunluğu ve ortalama gözenek boyutu üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Chi/nHA jellerinde, en düşük M_c ve ξ ile mekanik olarak en sağlam jeller elde edilmiştir. Kollajen tip II içeren jeller hemen hemen aynı ξ (24-27 nm) ve M_c (91,61-94,39 kg/mol) değerlerine sahiptir.

Jellerin reolojik davranışlarının yanısıra mekanik dayanımı da önemli parametrelerdendir. Tez çalışması kapsamında hazırlanan ve farklı bileşenlere sahip jellerin gerilim-gerinim eğrileri Şekil 5.24'te gösterilmiş ve bu eğrilerin doğrusal bölgesinden basma modül değerleri hesaplanmıştır. Mekanik test çalışmaları sonucunda sabit nHA varlığında artan kollajen oranı ile birlikte jellerin mekanik dayanımında düşüş gözlenmiştir (Şekil 5.30). Minimum basma modülü kollajen içeriği bakımından en zengin olan chi/col II/ nHA 30:70 jel bileşeminde gözlenmiştir. Benzer sonuçlar literatürde, Chicatun ve ark. (2011) tarafından üretilen kitosan/kollajen tip I jel çalışmalarında da görülmüştür (151). Kitosan, hücre dışı matrisinde bulunan glikoazminoglikanlara (GAG) benzerliği ile GAG yapısını simüle ederek yapıdaki kollajen ağına bağlanır ve artan mukavemet sağlar.

Kalsifiye kıkırdak fazına ait jellere enkapsüle edilmiş ATDC5 hücrelerinin üremeleri üç farklı yöntemle (Prestoblue, %hücre canlılık ve DNA miktar tayini) incelenmiştir. Prestoblue analizi sonucunda üremeye doğru orantılı olarak absorbans değerlerinde artış gözlenmiştir (Şekil 5.31). ATDC5 enkapsüle edilmiş jellere ait %hücre canlılığı konfokal mikroskobu ile belirlenmiş olup, kültürün 7.gününde jel içerisinde homojen dağılmış canlı hücreler görüntülenmiştir. Yüksek yeşil floresan, artan kollajen tip II içeriği ile artan hücre yoğunluğunu gösterir. Kültür süresince DNA miktarındaki artış kantatif olarak Picogreen ile belirlenmiştir (Şekil 5.32). Tüm üç yöntemde de kollajen içeriğinin artışıyla birlikte hücre üremesinde artış saptanmıştır. En yüksek kollajen II içeriğine sahip olan **chi/col II/nHA 30:70** jellerde, 21 gün sonunda en yüksek hücre üremesi görülmüştür (Şekil 5.33). Literatürde de görüldüğü gibi, kollajen tip II'nin yapıya girmesiyle birlikte hücre canlılığının korunmasında ve hücre üremesinde oldukça önemli artış gözlenmiştir (152). Kollajen tip II yapısındaki amino asit dizilerinde bulunan RGD gibi hücre bağlama bölgelerinin varlığı integrin aracılığı ile hücre etkileşimini ve hücre çoğalmasını tetiklemektedir (61).

Kalsifiye kıkırdak fazlarına ait GAG ve toplam kollajen miktar tayini kültürün 7., 14. ve 28.günlerinde belirlenmiş olup her iki analiz sonucunda da yapıdaki kollajen içeriğinin artışıyla birlikte hem GAG hem de toplam kollajen miktarlarında artış meydana gelmiştir (Şekil 5.35-5.36). Kondrojenik fenotipin önemli bir belirtici olan GAG birikimi, jellerin kollajen II içeriğinden etkilenmiştir (91). Özellikle, en yüksek kollajen II içeriğine sahip olan **chi/col II /nHA 30:70** jellerindeki ATDC5 hücreleri, 28 gün sonunda istatistiksel

olarak anlamlı derecede daha yüksek GAG birikimi sergilemiştir ($p < 0.001$). Kollajen tip II içeriğinin artmasının, ATDC5 hücrelerini kondrojenik farklılaşmaya yönlendiren uyarıcı bir etki oluşturduğu söylenebilir. Sonuçlar, jel bileşimindeki daha yüksek kollajen tip II içeriğinin kıkırdak benzeri matris oluşumu için faydalı olabileceken, düşük kollajen II içeriğinin kalsifiye-kıkırdak benzeri bir matris oluşumu için destek sağlayacağını göstermektedir.

Kondrosit hipertrofisi ve kalsifikasyonun önemli belirteçlerinden olan ALP aktivitesi kültürün 7., 14. ve 21. günlerinde incelenmiş ve artan günle beraber düşüş göstermiştir. En yüksek ALP aktivitesi, tüm hidrojel grupları için kültürün 7. gününde gözlenmiştir. Kalsifiye kıkırdak yapısında, ALP erken dönemde eksprese olmakta ve kalsifikasyon sürecinin ilk evresinde yer almaktadır. Diğer genlerin (COL X, RunX2 ve Mmp-13) ekspresyon seviyelerindeki artış ile birlikte ALP aktivitesinin azaldığı bildirilmiştir (94). Tez çalışması kapsamında, kültürün 14. ve 21. günlerinde, tüm hidrojel grupları (chi/nHA, chi/coll II/nHA 70: 30, chi/coll II/nHA 50:50 ve chi/coll II/nHA 30:70) için ALP aktivitesi azalmıştır ($p < 0.05$). Kültürün 7. ve 14. ve 21. günlerinde gruplar arasında anlamlı fark bulunmamıştır. Bu durum, tüm hidrojel gruplarına eşit miktarda nanohidroksiapatit eklenmesi ile açıklanabilir (14,27,93,153,154) (Şekil 5.37-38).

ATDC5 hücrelerin, kalsifiye kıkırdak oluşumundan sorumlu hipertrofik hücrelere farklılaşma potansiyeli RT-PCR ile analiz edilmiştir. Çalışmalarda, kollajen tip II oranının hipertrofik hücre farklılaşmasına olan etkisi incelenmiştir. Bunun için, fare kökenli pre-kondrojenik ATDC5 hücrelerinde hipertrofiye özgü olan ve kalsifikasyonda görev alan Col X, RunX2 ve Mmp-13 genlerinin kültürün 7., 14., ve 21.günlerinde ekspresyon seviyelerindeki değişim incelenmiştir (155–157). Col X geninin kondrosit hipertrofisi ile ilişkili olduğu bilinmektedir (14,158). Kültürün 21. günlerinde **chi/nHA** ve **chi /col II/nHA 70:30** hidrojelleri için yüksek düzeyde Col X ekspresyonu tespit edilmiştir. **Chi/col II/nHA 50:50** ve chi/col II/nHA 30:70 jelleri için ise Col X ile ilgili herhangi bir ekspresyon seviyesi gözlenmemiştir. Runt transkripsiyon faktör ailesinin bir üyesi olan RunX2'nin hipertrofik kondrosit farklılaşmasına neden olduğu bilinmekte ve RunX2 ekspresyonunun hipertrofik ATDC5 hücrelerinde artan kültür süresi ile arttığı bildirilmektedir (157). RunX2'nin, chi/nHA ve chi /col II/nHA 70:30 jellerine enkapsüle edilmiş ATDC5 hücrelerinin 21 günlük kültürü sonrasında ekspresyon seviyelerinde artış

gözlenmiştir. Chi/col II/nHA 70:30 jeline ait RunX2 genindeki ekspresyon seviyesi, chi/nHA jeline kıyasla anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). Mmp-13'ün hipertrofik kondrositlerde eksprese olduğu bilinmektedir (157).

Chi/nHA jeline kıyasla, chi/col II/nHA 70:30 jelinde daha yüksek MMP-13 gen ekspresyon seviyesi gözlenmiştir. Khanarian ve arkadaşları (2012) tarafından yapılan çalışmada aljinat-hidroksiapatit jelleri içerisinde kültürlen birincil eklem kondrositlerinin COLX ve MMP-13 genlerinin ekspresyon seviyelerinde yükselme gözlenmiş, fakat RunX2 ekspresyonuna rastlanmadığı rapor edilmiştir (14). Tez çalışmasında ATDC5 hücrelerinin hipertrofik farklılaşması, Col X, Mmp-13 ve RunX2 belirteçlerinin ekspresyonu ile doğrulanmıştır. Bununla birlikte, ATDC5 hücrelerinin hipertrofik farklılaşma eğiliminin, hidrojjellerin bileşimine bağlı olduğu bulunmuştur. Kollajen tip II içeren jeller grupları içinden sadece chi /col II/ nHA 70:30 bileşeminde hipertrofik genler (Col X, Mmp-13 ve RunX2) tespit edilmiştir (Şekil 5.32). Tip II kollajen içeriği (chi/coll II/nHA 50:50 ve chi/coll II/nHA 30:70) arttıkça, hipertrofik markörlerin hiç biri ATDC5 hücreleri tarafından eksprese edilmemiştir. Ayrıca, chi/coll II/nHA 50:50 ve chi/coll II/nHA 30:70 jel bileşenleri için GAG analizinden yüksek GAG miktarı elde edilmiştir. Bu sonuçlar, daha yüksek kollajen tip II içeriğinin ATDC5 hücrelerinin hipertrofik farklılaşması için faydalı olmadığını göstermektedir. Bununla birlikte, belirli miktarda kollajen tip II'nin dahil edilmesi, Mmp-13 ve RunX2'nin ekspresyonunu tetiklemek için önemli bir role sahiptir. Chi/col II/nHA 70:30 jellerinde kültürlen ATDC5 hücrelerine ait hipertrofik ekspresyon seviyeleri Chi/nHA (kontrol) grubuna kıyasla istatistiksel olarak daha yüksek bulunmuştur ($p<0.05$) (Şekil 5.38).

Tez çalışması kapsamında kalsifiye kıkırdak fazına ait jeller ile histolojik analizler gerçekleştirilmiştir. Hücre içermeyen jel yapılar (**chi/nHA**, **chi/coll II/nHA 70: 30**, **chi/coll II/nHA 50:50** ve **chi/coll II/nHA 30:70**) H&E, Picrosirius red, Masson's trichrome ve Alcian blue boyaması ile incelenmiştir (Şekil 5.39-40). H&E boyaması sonucu jel derinliği boyunca düzgün hücre dağılımı ve matris benzeri birikim gözlenmiştir (Şekil 5.39-40). Kültürün 28.gününde ATDC5 hücreleri ile gerçekleştirilen Picrosirius red ve Masson's trichrome boyaması sonucunda kollajen üretimi artmış ve her jel grubunda da anlamlı derecede daha yüksek kollajen içeriği görülmüştür. Alcian blue ile histolojik

boyamalar sonucu GAG birikimi tüm jel gruplarında görülmüş olup en belirgin boyama chi/nHA, chi/coll II/nHA 70:30 bileşenlerinde görülmüştür.

6.3. KIKIRDAK FAZINA AİT SONUÇLAR

Osteokondral doku ünitesine ait kıkırdak fazının doğal yapısı göz önünde bulundurularak kıkırdak fazının bileşenlerinin belirlenmesine yönelik çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Osteokondral doku ünitesine ait kıkırdak fazında kollajen fiberlerinin varlığı, yapısal ve elastik mukavemetin artmasını sağlar (3,159). Bu nedenle, kıkırdak fazının yapısını taklit etmek amacıyla GAG benzeri kitosan ve doğal kıkırdak yapısında bulunan kollajen tip II kullanılmıştır. Kollajen tip II'nin kondrojenik farklılaşması üzerindeki önemli etkisi bilinmektedir (58,61,152). Optimum bileşimin belirlenmesine yönelik olarak β -GP ve genipin çapraz bağlayıcıları ile çapraz bağlanmış üç farklı bileşimde (**chi100/coll0 (kontrol)**, **chi50/coll50** ve **chi30/coll70**) jel ile çalışmalar yürütülmüştür. Jelleşme parametreleri kalsifiye kıkırdak fazın bileşenlerine benzediğinden jelleşme aynı şartlar altında gerçekleştirilmiştir. Kıkırdak fazına ait jel yapılarına kalsifiye kıkırdak fazından farklı olarak nHA ilave edilmemiştir. Öncelikle, ATR-FTIR ile yapıların kimyasal analizi gerçekleştirilmiştir. Kitosan ve kollajen yapıları benzer pikler içerdiğinden pikler arasında önemli kimyasal fark görülmemiştir (Şekil 5.41). SEM analizi ile kıkırdak fazına ait üç farklı jel yapısında da gözeneklilik ve içsel bağlantılılık görülmüştür (Şekil 5.42). Bu sonuç kıkırdağa ait bileşenler olarak üretilen jel gruplarının besin ve oksijen alış verişi gibi önemli özelliklere sahip olduğunu göstermektedir. Reolojik analizler sonrasında %0,01 gerinim (*strain*) değerinde en yüksek depo modülüne sahip jeller sırasıyla chi (476,16 Pa), chi50/coll50 (289,68 Pa) ve chi30/coll70 (125,62 Pa) yapıları olarak bulunmuştur (Şekil 5.43-5.44). Kalsifiye kıkırdak fazında gerçekleştirilen çalışmalarda olduğu gibi kıkırdak fazına ait olan jellerde de kayıp tanjant modülü $\tan \delta < 1$ olarak bulunmuş ve jellerin viskoelastik özelliklere sahip olduğu belirlenmiştir. Gözenek boyutu (*mesh size*, ξ) ve çapraz bağlar arası ortalama molekül ağırlığı (M_c) gibi ağ parametreleri kıkırdak fazı için de hesaplanmıştır. En düşük M_c ve ξ ile mekanik olarak en sağlam yapı chi100/coll0 jellerinde elde edilmiştir. Ardından en sağlam jel yapıları sırasıyla chi50/coll50 ve chi30/coll70 jelleri olarak bulunmuştur. Kıkırdak fazına ait jellerin %su tutma kapasiteleri sırasıyla $73,60 \pm 0,2$; $89,69 \pm 0,5$ ve $80,84 \pm 0,6$ olarak belirlenmiştir (Çizelge 5.15). Kollajen içeren yapılardan en yüksek depo modülüne ve %su tutma kapasitesine sahip olan

chi50/coll50 bileşimindeki jel kıkırdak faz yapısı olarak seçilmiştir. Bu sonuçların yanısıra, **chi50/coll50** seçilmesinde doğal kıkırdak yapısı da belirleyici olmuştur. Kıkırdak fazı olarak seçilmiş olan chi50/coll50 jeline ait μ -CT sonuçları jel yapıdaki %açık ve toplam gözeneklilikliğin ~%90 değerinin üzerinde olduğunu göstermektedir (Şekil 5.16).

Kıkırdak faza ait chi50/coll50 jelleri ile *in vitro* hücre kültürü çalışmaları gerçekleştirilmiş, ATDC5 hücre üremesi ve GAG miktarı tayin edilmiştir (Şekil 5.49). Prestoblue ve DNA miktar tayini ile üreme değerlerinde gün bazında artan günle birlikte 21.güne kadar artış gözlenmiştir (Şekil 5.46-5.48). Kültürün 7. gününde konfokal mikroskobu ile yüksek %hücre canlılığı saptanmıştır (~%90) (Şekil 5.47). Kıkırdak dokusuna spesifik olan GAG birikimi artan günle birlikte artış göstermiştir (Şekil 5.49). H&E boyaması ile homojen hücre dağılımı gözlenmiştir. Gerçekleştirilen *in vitro* hücre kültürü çalışmaları sonucunda osteokondral doku ünitesine ait kıkırdak yapısı olarak **chi50/coll50** bileşiminin uygun olduğuna karar verilmiştir (Şekil 5.50).

6.4. OSTEOKONDRAL DOKU ÜNİTESİNE AİT SONUÇLAR

Tez kapsamında üretimi gerçekleştirilen doku iskelesi ve jel yapılar, doğal osteokondral dokunun yapısı, bileşenleri ve özellikleri gözönünde bulundurularak tasarlanmıştır. Bunun için, osteokondral doku ünitesi bileşimi, her bir faza ait çalışmalardan elde edilen yapısal karakterizasyon ve *in vitro* hücre kültür sonuçları değerlendirilerek belirlenmiştir. Doğal osteokondral dokunun bileşenleri göz önünde bulundurularak gerçekleştirilen tasarımda, kıkırdak fazın glikozaminoglikan ve kollajen II içeriklerini taklit etmek amacıyla kitosan/kollajen tip II hidrojeller, kalsifiye kıkırdak fazın organik ve inorganik bileşenlerini taklit etmek amacıyla hidroksiapatit içeren kitosan/kollajen tip II jellerin sentezi gerçekleştirilmiştir. Subkondral kemik fazının oluşturulması amacıyla GAG benzeri yapıya sahip doğal kitosan polimeri, ve doğal kemik hücre dışı matrisinde bulunan kollajen tip I, nanohidroksiapatit ile katkılandırılarak dondurarak kurutma yöntemiyle gözenekli yapıda doku iskeleleri üretilmiştir. Osteokondral dokuyu biyomimetik olarak taklit edebilmek amacıyla kalsifiye kıkırdak fazda bulunan hidroksiapatit içeriği kemik fazına göre daha düşük oranda kullanılmıştır. Kollajen tip II içeriği bakımından kalsifiye kıkırdakta, kollajen tip II içeriği kıkırdak faza oranla daha düşük yüzdede jel bileşimine eklenmiştir. Bu bağlamda, gradyan yapıdaki osteokondral doku ünitesinin fazlarına ait bileşenler; gliksal-chi80/coll20/nHA bileşiminden oluşan subkondral kemik, Chi/Coll II/nHA 70:30

bileşiminden oluşan kalsifiye kıkırdak ve chi50/coll50 bileşiminden oluşan kıkırdak fazları olacak şekilde belirlenmiştir.

Osteokondral doku mühendisliğinde üç fazlı ve gradyan yapıda fazların bir araya getirilerek üretiminde yapı bütünlüğü açısından zorluklar bulunmaktadır (3). Literatürde, gerçekleştirilen osteokondral doku mühendisliği çalışmalarında genel olarak tek fazlı (*monophasic*) veya iki fazlı (*biphasic*) yapılara rastlanmaktadır (3). Bu yaklaşımlarla üretilen yapay doku iskelelerinde subkondral kemik ve kıkırdak arasında yer alan arayüzey (kalsifiye kıkırdak) genellikle ihmal edilmiştir. Kalsifiye kıkırdak fazı subkondral kemik ve kıkırdak arasında bariyer oluşturarak sert geçişleri ve kemikten gelen damarlaşmayı engelleme gibi önemli bir role sahiptir. Son zamanlarda, birçok araştırmacı ara faz ile (kalsifiye kıkırdak fazı) birlikte gradyan yapıda doku iskeleleri geliştirilmesi üzerine araştırma yapmakta ve osteokondral doku iskelelerinin çok fazlı (*multiphasic*) olarak üretimine yönelik gerçekleştirilen çalışmalar öne çıkmaktadır (160).

Tez çalışmasında, osteokondral doku ünitesinin morfolojik yapısı Taramalı elektron mikroskopu (SEM) ile incelenmiştir (Şekil 5.52-5.53). Osteokondral doku ünitesinin kesitinden alınan SEM görüntülerinde, birbirine içsel bağlantılı gözenekli ve gözenek büyüklüğünde değişiklik gösteren yapı açıkça görülmektedir (Şekil 5.53). Gözenek büyüklüğünün subkondral bölgeden kondral bölgeye doğru gidildikçe düştüğü görülmektedir. Benzer sonuç Radhakrishnan ve ark. (2018) tarafından yapılan çalışmada farklı oran HA içeren aljinat/poli (vinil alkol) (PVA) polimerik karışımı ile hazırlanan osteokondral doku iskesinin karakterizasyon çalışmalarında da görülmüştür (100). Doku ünitesinin SEM analizine ek olarak %gözeneklilik ve içsel bağlantılılık değerleri μ -CT analizi ile de doğrulanmıştır. Osteokondral doku ünitesinin 3 boyutlu μ -CT görüntülerinde fazlar arasındaki ayırım net olarak görülmektedir (Şekil 5.55 ve Çizelge 5.17). Aynı zamanda fazların kesintisiz olarak birbirleri üzerinde istiflendiği ve entegrasyonun sağlandığı görülmüştür. Gradyan osteokondral doku yapısındaki doku iskelesine ait farklı fazlardaki değişen gözeneklilik ve morfolojik yapı açıkça ayırt edilebilmektedir. Osteokondral doku ünitesine ait %toplam gözeneklilik $\sim$ %90,07 olarak bulunmuştur.

Ostekondral doku ünitesi ile yürütülen **hücre kültür çalışmalarında**, kıkırdak ve kalsifiye kıkırdak jel fazlarına ATDC5 enkapsüle edilmiş, kemik doku iskelesine ise MC3T3-E1

hücreleri ekilmiştir. Hücrelerin bulundukları ortama ve doku iskelesine uyum sağlamaları amacıyla bir hafta süreyle fazlar ayrı ayrı kültürlenmiştir. Sonrasında üç faz biraraya getirilerek doku üniteleri hazırlanmıştır. Hazırlanan doku üniteleri her iki hücre tipini de içerdiğinden (MC3T3-E1 ve ATDC5) *in-vitro* hücre kültürü ko-kültür besi ortamı içerisinde gerçekleştirilmiştir. 21 gün devam eden kültür boyunca hücre canlılığı MTT analizi ile gösterilmiş, kültür süresi boyunca DNA miktarı artmıştır (5.59-5.60). Kültür sonunda alınan örneklerin histokimya ve immünohistokimya boyamalarını incelendiğinde, Picrosirius-red boyamasının en fazla kalsifiye kıkırdak ve kıkırdak fazlarında gözlemlendiği sonucuna varılmıştır. Kollajence zengin olan fazlar için bu sonuç beklenen bir durumdur (Şekil 5.64). Kıkırdak dokuya spesifik alcian blue boyaması ise en yoğun olarak kıkırdak faz bölgesinde görülmüştür. Kemik fazdaki hücre mineralizasyonunun desteklemek amacıyla gerçekleştirilen Alizarin red boyaması ise beklenenden daha zayıf bir boyama ile sonuçlanmıştır. Kemik fazı doku iskelesi yapısı olarak diğer fazlardan farklıdır. Kıkırdak ve kalsifiye kıkırdak fazları jel yapıda hücreleri enkapsüle etmektedir. Kemik fazda ise hücreler üç boyutlu doku iskelesi üzerine ekilmektedir. Hücre dağılımı jel matris yapılarına göre daha lokalizedir. Bu sebeple yoğun mineral boyamasının gözlenemediği düşünülmüştür. Osteokondral doku ünitesinin *in-vitro* kültürü sonrasında yapılar aynı zamanda immünohistokimyasal boyama işlemine tabi tutulmuştur. Her faza spesifik olan Col I, Col II ve Col X için uygun antikorlar kullanılarak boyama işlemleri gerçekleştirilmiştir (Şekil 5.65). Bu boyamalar sonucunda en kuvvetli boyanma, kıkırdak fazındaki Col II boyamasıdır. Kıkırdak doğal ECM yapısının iyi taklit edildiği ve ATDC5 hücrelerinin kondrosit karakteri geliştirerek farklılaştıkları sonucuna varılmıştır. Kemik fazına özgü Col I boyamalarında ise, en altta bulunan kemik fazının özellikle kenar bölgelerinde boyamanın etkin olduğu görülmektedir. H&E boyamalarda da hücrelerin yoğun olarak doku iskelesi kenarlarına yerleştiği görülmüştür. Kalsifiye kıkırdak faza ait Col X boyaması en zayıf boyamanın elde edildiği katmandır. Hücrelerin doku ünitesi içerisinde ara fazda bulunan kalsifiye kıkırdak yapısında sürdürülen kültür boyunca Col X sentezi düşük bulunmuştur. Her doku tabakasına ait spesifik boyamalardan elde edilen sonuçlar, RT-PCR analizi yapılarak desteklenmiştir. MC3T3-E1 ve ATDC5 için ortak bağıl genin tespitinin ardından gerçekleştirilen çalışmalarda Col I, Col II, Col X, MMP 13 genleri analiz edilmiştir (Şekil 5.66). Elde edilen sonuçlar her doku katmanına spesifik genlerin tamamının eksprese olduğunu göstermektedir. Bu sonuç, osteokondral doku

ünitesi bileşiminde ve ko-kültür ortamında kıkırdak, kalsifiye kıkırdak ve kemik dokularına spesifik farklılaşmanın gerçekleşebildiği sonucunu doğrulamaktadır.

Osteokondral doku ünitesinin *in-vivo* şartlarda biyouyumluluğunun incelenmesi amacıyla gerçekleştirilen çalışmalar sonucunda, doku ünitesinin 14 gün sonunda yapısal bütünlüğünü koruyarak subkutan bölgeden alındığı sonucuna varılmıştır. Kitosan içeren doku iskeleleri ve jel yapılar da karşılaşılan yoğun nötrofil reaksiyonu bu çalışmada da görülmüştür. Kitosanın nötrofiller için doğal bir kemoatraktan olması bu yoğun enflamutuar cevabı oluşturmuştur. H&E boyamalar incelendiğinde, nötrofillerin yanı sıra makrofajlar da görülmüştür (Şekil 5.67).

Tez çalışması kapsamında, elde edilen sonuçlar değerlendirildiklerinde, tasarımı ve üretimi gerçekleştirilen osteokondral doku ünitesinin doğal hücre dışı matris (ECM) yapısına benzer biyomimetik gradyan yapıda olduğu ve hem osteoblastik hem de kondrosit hücreleri desteklediği sonucuna varmak mümkündür. Hücre farklılaşmasını önemli ölçüde etkileyen büyüme faktörleri kullanılmadan sentezlenen osteokondral doku ünitesinde, pre-osteoblastik (MC3T3-E1) ve pre-kondrojenik (ATDC5) hücre hatları ile yürütülen *in-vitro* ko-kültür çalışmaları, elde edilen yapının hücre üremesi ve farklılaşmasını desteklediği yönünde sonuçlar sunmaktadır. Tez çalışması kapsamında elde edilen bu yapıların her bir fazına dokuya spesifik büyüme faktörleri ilave edilerek, aynı bileşimdeki yapı kök hücreler için de bir niş görevi görebilir. Tez çalışması kapsamında biyouyumluluğun değerlendirilmesi amacıyla BALB/c fareleri kullanılmış olup, doku ünitesinin *in-vitro* ortamda etkinliğinin netleştirilmesi amacıyla tavşan gibi daha büyük hayvan modellerinde osteokondral defektlere direk olarak uygulanması gereklidir.

7. KAYNAKLAR

1. Nöth U, Steinert AF TR. Technology insight: adult mesenchymal stem cells for osteoarthritis therapy. *Nat Clin Pract Rheumatol*. 2008;4:371–80.
2. Veronesi F, Giavaresi G, Tschon M, Borsari V, Nicoli Aldini N FM. Clinical use of bone marrow, bone marrow concentrate, and expanded bone marrow mesenchymal stem cells in cartilage disease. *Stem Cells Dev*. 2013;22:181–92.
3. DLD SPN. Osteochondral tissue engineering: Current strategies and challenges. *Biotechnol Adv*. 2012;31:706–721.
4. Fuentes-Mera L, Camacho A, Engel E, Pérez-Silos V, Lara-Arias J, Marino-Martínez I, et al. Therapeutic Potential of Articular Cartilage Regeneration using Tissue Engineering Based on Multiphase Designs. In: *Cartilage Tissue Engineering and Regeneration Techniques*. 2019. p. IntechOpen.
5. Sophia Fox AJ, Bedi A, Rodeo SA. The basic science of articular cartilage: structure, composition, and function. *Sports health*. 2009;1(6):461–8.
6. Ansari S, Khorshidi S, Karkhaneh A. Engineering of gradient osteochondral tissue: From nature to lab. *Acta Biomaterialia*. 2019;87:41–54.
7. Maroudas A. PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES OF HUMAN ARTICULAR CARTILAGE. *Journal of Bone & Joint Surgery, British Volume* . 2002;84–B(SUPP III):309–10.
8. Ng HY, Lee AA, Shen KX. Articular Cartilage: Structure, Composition, Injuries and Repair. Vol. 1, *JSM Bone and Joint Dis*. 2017.
9. Athanasiou KA, Darling EM HJ. Articular cartilage tissue engineering. *Morgan & Claypool*. 2009;1(1):1–182.
10. Beck EC, Detamore MS. Nanomaterials for hard-soft tissue interfaces. In: *Nanomaterials in Tissue Engineering: Fabrication and Applications*. 2013. p. 363–86.

11. Nooeaid P, Salih V, Beier JP, Boccaccini AR. Osteochondral tissue engineering: Scaffolds, stem cells and applications. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2012;16(10):2247–70.
12. Quinn TM, Häuselmann HJ, Shintani N, Hunziker EB. Cell and matrix morphology in articular cartilage from adult human knee and ankle joints suggests depth-associated adaptations to biomechanical and anatomical roles. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2013;21(12):1904–12.
13. Gadjanski I. Challenges in engineering osteochondral tissue grafts with hierarchical structures Ivana Gadjanski, Gordana Vunjak Novakovic HHS Public Access. *Expert Opin Biol Ther*. 2015;15(11):1583–99.
14. Khanarian NT, Jiang J, Wan LQ, Mow VC, Lu HH. A Hydrogel-Mineral Composite Scaffold for Osteochondral Interface Tissue Engineering. *Tissue Engineering Part A*. 2012;18(5–6):533–45.
15. Zhang Y, Wang F, Tan H, Chen G, Guo L, Yang L. Analysis of the mineral composition of the human calcified cartilage zone. *International Journal of Medical Sciences*. 2012;9(5):353–60.
16. Khanarian NT, Haney NM, Burga RA, Lu HH. Interface Regeneration. 2013;33(21):5247–58.
17. van der Harst MR, Brama PAJ, van de Lest CHA, Kiers GH, DeGroot J, van Weeren PR. An integral biochemical analysis of the main constituents of articular cartilage, subchondral and trabecular bone. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2004;12(9):752–61.
18. Stewart HL, Kawcak CE. The Importance of Subchondral Bone in the Pathophysiology of Osteoarthritis. *Frontiers in Veterinary Science*. 2018;5.
19. Castro NJ, Hacking SA ZL. Recent progress in interfacial tissue engineering approaches for osteochondral defects. *Ann Biomed Eng*. 2012;40:1628–1640.
20. Vashishth D, Gibson G, Kimura J, Schaffler MB, Fyhrie DP. Determination of bone

- volume by osteocyte population. *Anatomical Record*. 2002;267(4):292–5.
21. Florencio-Silva R, Sasso GRDS, Sasso-Cerri E, Simões MJ, Cerri PS. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. Vol. 2015, BioMed Research International. 2015.
 22. Huey DJ, Hu JC, Athanasiou KA. Unlike bone, cartilage regeneration remains elusive. Vol. 338, *Science*. 2012. p. 917–21.
 23. Chen H, Sun J, Hoemann CD, Lascau-Coman V, Ouyang W, McKee MD, et al. Drilling and microfracture lead to different bone structure and necrosis during bone-marrow stimulation for cartilage repair. *Journal of Orthopaedic Research*. 2009;27(11):1432–8.
 24. Yousefi AM, Hoque ME, Prasad RGSV, Uth N. Current strategies in multiphasic scaffold design for osteochondral tissue engineering: A review. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*. 2015;103(7):2460–81.
 25. Yang J, Zhang YS, Yue K, Khademhosseini A. Cell-laden hydrogels for osteochondral and cartilage tissue engineering. Vol. 57, *Acta Biomaterialia*. 2017. p. 1–25.
 26. Nukavarapu SP AA. Optimal scaffold design and effective progenitor cell identification for the regeneration of vascularized bone. Conference proceedings: Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society IEEE Engineering in Medicine and Biology Society Conference. 2011;
 27. Jiang J, Tang A, Ateshian GA, Guo XE, Hung CT LH. Bioactive stratified polymer ceramic-hydrogel scaffold for integrative osteochondral repair. *Ann Biomed Eng*. 2010;38(6):2183–96.
 28. Noeaid P, Salih V, Beier JP, Boccaccini AR. Osteochondral tissue engineering: Scaffolds, stem cells and applications. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2012;16(10):2247–70.
 29. Levingstone TJ, Matsiko A, Dickson GR, O'Brien FJ, Gleeson JP. A biomimetic

- multi-layered collagen-based scaffold for osteochondral repair. *Acta Biomaterialia*. 2014;10(5):1996–2004.
30. Levingstone TJ, Thompson E, Matsiko A, Schepens A, Gleeson JP, O’Brien FJ. Multi-layered collagen-based scaffolds for osteochondral defect repair in rabbits. *Acta Biomaterialia*. 2016;32:149–60.
 31. Liu M, Zeng X, Ma C, Yi H, Ali Z, Mou X, et al. Injectable hydrogels for cartilage and bone tissue engineering. Vol. 5, *Bone Research*. 2017.
 32. Spiller KL, Maher SA, Lowman AM. Hydrogels for the Repair of Articular Cartilage Defects. *Tissue Engineering Part B: Reviews*. 2011;17(4):281–99.
 33. Soltz MA. Functional Tissue Engineering of Articular Cartilage Through Dynamic Loading of Chondrocyte-Seeded Agarose Gels. *Journal of Biomechanical Engineering*. 2000;122(3):252.
 34. Yamaoka H, Asato H, Ogasawara T, Nishizawa S, Takahashi T, Nakatsuka T, et al. Cartilage tissue engineering using human auricular chondrocytes embedded in different hydrogel materials. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*. 2006;78(1):1–11.
 35. Naghizadeh Z, Karkhaneh A, Khojasteh A. Self-crosslinking effect of chitosan and gelatin on alginate based hydrogels: Injectable in situ forming scaffolds. *Materials Science and Engineering C*. 2018;89:256–64.
 36. Khorshidi S, Karkhaneh A. A review on gradient hydrogel/fiber scaffolds for osteochondral regeneration. Vol. 12, *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. 2018. p. e1974–90.
 37. Alexander PG, Gottardi R, Lin H, Lozito TP, Tuan RS. Three-dimensional osteogenic and chondrogenic systems to model osteochondral physiology and degenerative joint diseases. *Experimental Biology and Medicine*. 2014;239(9):1080–95.
 38. Nie T, Xue L, Ge M, Ma H, Zhang J. Fabrication of poly(L-lactic acid) tissue

- engineering scaffolds with precisely controlled gradient structure. *Materials Letters*. 2016;176:25–8.
39. Seo SJ, Mahapatra C, Singh RK, Knowles JC, Kim HW. Strategies for osteochondral repair: Focus on scaffolds. Vol. 5, *Journal of Tissue Engineering*. 2014.
 40. Yodmuang S, McNamara SL, Nover AB, Mandal BB, Agarwal M, Kelly TAN, et al. Silk microfiber-reinforced silk hydrogel composites for functional cartilage tissue repair. *Acta Biomaterialia*. 2015;11(1):27–36.
 41. Çakmak S, Çakmak AS, Kaplan DL, Gümüşderelioğlu M. A Silk Fibroin and Peptide Amphiphile-Based Co-Culture Model for Osteochondral Tissue Engineering. *Macromolecular Bioscience*. 2016;1212–26.
 42. Jeon JE, Vaquette C, Theodoropoulos C, Klein TJ, Hutmacher DW. Multiphasic construct studied in an ectopic osteochondral defect model. *Journal of the Royal Society Interface*. 2014;11(95).
 43. Schaefer D, Martin I, Shastri P, Padera RF, Langer R, Freed LE, et al. In vitro generation of osteochondral composites. *Biomaterials*. 2000;21(24):2599–606.
 44. Muzzarelli RAA. Chitins and chitosans for the repair of wounded skin, nerve, cartilage and bone. Vol. 76, *Carbohydrate Polymers*. 2009. p. 167–82.
 45. Thein-Han WW, Misra RDK. Biomimetic chitosan–nanohydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering. *Acta Biomaterialia*. 2008;5(4):1182–97.
 46. Seda Tiğli R, Karakeçili A, Gumusderelioglu M. In vitro characterization of chitosan scaffolds: Influence of composition and deacetylation degree. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2007;18(9):1665–74.
 47. Irmak G, Demirtaş TT, Altındal DÇ, Çalış M, Gumusderelioglu M. Sustained release of 17 β -estradiol stimulates osteogenic differentiation of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells on chitosan-hydroxyapatite scaffolds. *Cells Tissues Organs*. 2014;199(1):37–50.

48. Beşkardeş IG, Demirtaş TT, Durukan MD, Gümüşderelioğlu M. Microwave-assisted fabrication of chitosan-hydroxyapatite superporous hydrogel composites as bone scaffolds. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. 2015;9(11):1233–46.
49. Karakeçili A, Arian A. Preparation of chitosan-nanohydroxyapatite composite scaffolds by a supercritical CO₂ assisted process. *Polymer Composites*. 2012;33(7):1215–23.
50. Francis Suh JK, Matthew HWT. Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: A review. *Biomaterials*. 2000;21(24):2589–98.
51. Ragety GR, Griffon DJ, Lee HB, Chung YS. Effect of collagen II coating on mesenchymal stem cell adhesion on chitosan and on reacylated chitosan fibrous scaffolds. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2010;21(8):2479–90.
52. Zhang BGX, Myers DE, Wallace GG, Brandt M, Choong PFM. Bioactive coatings for orthopaedic implants-recent trends in development of implant coatings. Vol. 15, *International Journal of Molecular Sciences*. 2014. p. 11878–921.
53. Kim HL, Jung GY, Yoon JH, Han JS, Park YJ, Kim DG, et al. Preparation and characterization of nano-sized hydroxyapatite/alginate/chitosan composite scaffolds for bone tissue engineering. *Materials Science and Engineering C*. 2015;54:20–5.
54. Mizuno M, Fujisawa R, Kuboki Y. Type I collagen-induced osteoblastic differentiation of bone-marrow cells mediated by collagen- $\alpha 2\beta 1$ integrin interaction. *Journal of Cellular Physiology*. 2000;184(2):207–13.
55. Ferreira AM, Gentile P, Chiono V, Ciardelli G. Collagen for bone tissue regeneration. Vol. 8, *Acta Biomaterialia*. 2012. p. 3191–200.
56. Murphy CM, Haugh MG, O'Brien FJ. The effect of mean pore size on cell attachment, proliferation and migration in collagen-glycosaminoglycan scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*. 2010;31(3):461–6.

57. Wang L, Stegemann JP. Thermogelling chitosan and collagen composite hydrogels initiated with β -glycerophosphate for bone tissue engineering. *Biomaterials*. 2010;31(14):3976–85.
58. Lu Z, Doulabi BZ, Huang C, Bank RA, Helder MN. Collagen type II enhances chondrogenesis in adipose tissue-derived stem cells by affecting cell shape. *Tissue engineering Part A* . 2010;16(1):81–90.
59. Nehrer S, Breinan HA, Ramappa A, Shortkroff S, Young G, Minas T, et al. Canine chondrocytes seeded in type I and type II collagen implants investigated in vitro. *Journal of Biomedical Materials Research*. 1997;38(2):95–104.
60. Buma P, Pieper JS, Van Tienen T, Van Susante JLC, Van Der Kraan PM, Veerkamp JH, et al. Cross-linked type I and type II collagenous matrices for the repair of full-thickness articular cartilage defects - A study in rabbits. *Biomaterials*. 2003;24(19):3255–63.
61. Ragetly G, Griffon DJ, Chung YS. The effect of type II collagen coating of chitosan fibrous scaffolds on mesenchymal stem cell adhesion and chondrogenesis. *Acta Biomaterialia*. 2010;6(10):3988–97.
62. Martínez A, Blanco MD, Davidenko N, Cameron RE. Tailoring chitosan/collagen scaffolds for tissue engineering: Effect of composition and different crosslinking agents on scaffold properties. *Carbohydrate Polymers*. 2015;132:606–19.
63. Park YM, Ryu SC, Yoon SY, Stevens R, Park HC. Preparation of whisker-shaped hydroxyapatite/ β -tricalcium phosphate composite. *Materials Chemistry and Physics*. 2008;109(2–3):440–7.
64. Saravanan S, Leena RS, Selvamurugan N. Chitosan based biocomposite scaffolds for bone tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2016;93:1354–65.
65. Chenite A, Chaput C, Wang D, Combes C, Buschmann MD, Hoemann CD, et al. Novel injectable neutral solutions of chitosan form biodegradable gels in situ. *Biomaterials*. 2000;21(21):2155–61.

66. Liu L, Gao Q, Lu X, Zhou H. In situ forming hydrogels based on chitosan for. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2016;11:1–11.
67. Zhou HY, Jiang LJ, Cao PP, Li JB, Chen XG. Glycerophosphate-based chitosan thermosensitive hydrogels and their biomedical applications. *Carbohydrate polymers*. 2015;117:524–36.
68. Supper S, Anton N, Seidel N, Riemenschnitter M, Curdy C, Vandamme T. Thermosensitive chitosan/glycerophosphate-based hydrogel and its derivatives in pharmaceutical and biomedical applications. *Expert opinion on drug delivery*. 2014;11(2):249–67.
69. Supper S, Anton N, Seidel N, Riemenschnitter M, Schoch C, Vandamme T. Rheological study of chitosan/polyol-phosphate systems: Influence of the polyol part on the thermo-induced gelation mechanism. *Langmuir*. 2013;29(32):10229–37.
70. Jalani G, Rosenzweig DH, Makhoul G, Abdalla S, Cecere R, Vetrone F, et al. Tough, in-situ thermogelling, injectable hydrogels for biomedical applications. *Macromolecular Bioscience*. 2015;15(4):473–80.
71. Songkroh T, Xie H, Yu W, Lv G, Liu X, Wang L, et al. In situ forming chitosan-based hydrogel as a lung sealant for biological lung volume reduction. *Science Bulletin*. 2015;60(2):235–40.
72. Muzzarelli RAA. Genipin-crosslinked chitosan hydrogels as biomedical and pharmaceutical aids. Vol. 77, *Carbohydrate Polymers*. 2009. p. 1–9.
73. Tampieri A, Sandri M, Landi E, Pressato D, Francioli S, Quarto R, et al. Design of graded biomimetic osteochondral composite scaffolds. *Biomaterials*. 2008;29(26):3539–46.
74. Galperin A, Oldinski RA, Florczyk SJ, Bryers JD, Zhang M, Ratner BD. Integrated bi-layered scaffold for osteochondral tissue engineering. *Advanced Healthcare Materials*. 2013;2(6):872–83.
75. Yan LP, Silva-Correia J, Oliveira MB, Vilela C, Pereira H, Sousa RA, et al.

- Bilayered silk/silk-nanoCaP scaffolds for osteochondral tissue engineering: In vitro and in vivo assessment of biological performance. *Acta Biomaterialia*. 2015;12(1):227–41.
76. Li JJ, Kim K, Roohani-Esfahani SI, Guo J, Kaplan DL, Zreiqat H. A biphasic scaffold based on silk and bioactive ceramic with stratified properties for osteochondral tissue regeneration. *Journal of Materials Chemistry B*. 2015;3(26):5361–76.
 77. Nover AB, Lee SL, Georgescu MS, Howard DR, Saunders RA, Yu WT, et al. Porous titanium bases for osteochondral tissue engineering. *Acta Biomaterialia*. 2015;27:286–93.
 78. Stack JD, Levingstone TJ, Lalor W, Sanders R, Kearney C, O'Brien FJ, et al. Repair of large osteochondritis dissecans lesions using a novel multilayered tissue engineered construct in an equine athlete. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. 2017;11(10):2785–95.
 79. Marquass B, Somerson JS, Hepp P, Aigner T, Schwan S, Bader A, et al. A novel MSC-seeded triphasic construct for the repair of osteochondral defects. *Journal of Orthopaedic Research*. 2010;28(12):1586–99.
 80. Scotti C, Wirz D, Wolf F, Schaefer DJ, Bürgin V, Daniels AU, et al. Engineering human cell-based, functionally integrated osteochondral grafts by biological bonding of engineered cartilage tissues to bony scaffolds. *Biomaterials*. 2010;31(8):2252–9.
 81. E. K, G. F, G. V, F. P, M. M. Tibial plateau lesions. Surface reconstruction with a biomimetic osteochondral scaffold: Results at 2 years of follow-up. *Injury*. 2014;45(S6):S121–5.
 82. Wang X, Grogan SP, Rieser F, Winkelmann V, Maquet V, La Berge M, et al. Tissue engineering of biphasic cartilage constructs using various biodegradable scaffolds: An in vitro study. *Biomaterials*. 2004;25(17):3681–8.
 83. Schaefer D, Martin I, Jundt G, Seidel J, Heberer M, Grodzinsky A, et al. Tissue-

- engineered composites for the repair of large osteochondral defects. *Arthritis and Rheumatism*. 2002;46(9):2524–34.
84. Kang HW, Tabata Y, Ikada Y. Fabrication of porous gelatin scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials*. 1999;20(14):1339–44.
 85. Wang L, Stegemann JP. Glyoxal crosslinking of cell-seeded chitosan/collagen hydrogels for bone regeneration. *Acta Biomaterialia*. 2011;7(6):2410–7.
 86. Oommen OP, Wang S, Kisiel M, Sloff M, Hilborn J, Varghese OP. Smart design of stable extracellular matrix mimetic hydrogel: Synthesis, characterization, and in vitro and in vivo evaluation for tissue engineering. *Advanced Functional Materials*. 2013;23(10):1273–80.
 87. Im O, Li J, Wang M, Zhang LG, Keidar M. Biomimetic three-dimensional nanocrystalline hydroxyapatite and magnetically synthesized single-walled carbon nanotube chitosan nanocomposite for bone regeneration. *International Journal of Nanomedicine*. 2012;7:2087–99.
 88. López J, Imperial S, Valderrama R, Navarro S. An improved bradford protein assay for collagen proteins. *Clinica Chimica Acta*. 1993;220(1):91–100.
 89. Demirtaş TT, Irmak G, Gümüşderelioğlu M. A bioprintable form of chitosan hydrogel for bone tissue engineering. *Biofabrication*. 2017;9(3).
 90. Lee H, Yang GH, Kim M, Lee JY, Huh JT, Kim GH. Fabrication of micro/nanoporous collagen/dECM/silk-fibroin biocomposite scaffolds using a low temperature 3D printing process for bone tissue regeneration. *Materials Science and Engineering C*. 2017;84:140–7.
 91. Liang X, Wang X, Xu Q, Lu Y, Zhang Y, Xia H, et al. Rubbery Chitosan/Carrageenan Hydrogels Constructed through an Electroneutrality System and Their Potential Application as Cartilage Scaffolds. *Biomacromolecules*. 2018;19(2):340–52.
 92. Demirtaş TT, Göz E, Karakeçili A, Gümüşderelioğlu M. Combined delivery of

- PDGF-BB and BMP-6 for enhanced osteoblastic differentiation. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2016;27(1):1–11.
93. Chen L, Wu Z, Zhou Y, Li L, Wang Y, Wang Z, et al. Biomimetic porous collagen/hydroxyapatite scaffold for bone tissue engineering. *Journal of Applied Polymer Science*. 2017;134(37):1–8.
 94. Golub EE, Boesze-Battaglia K. The role of alkaline phosphatase in mineralization. *Current Opinion in Orthopaedics*. 2007;18(5):444–8.
 95. Poveda-Reyes S, Moulisova V, Sanmartín-Masiá E, Quintanilla-Sierra L, Salmerón-Sánchez M, Ferrer GG. Gelatin—Hyaluronic Acid Hydrogels with Tuned Stiffness to Counterbalance Cellular Forces and Promote Cell Differentiation. *Macromolecular Bioscience*. 2016;1311–24.
 96. Yu C, Young S, Russo V, Amsden BG, Flynn LE. Techniques for the Isolation of High-Quality RNA from Cells Encapsulated in Chitosan Hydrogels. *Tissue Engineering Part C: Methods*. 2013;19(11):829–38.
 97. Welzel PB, Prokoph S, Zieris A, Grimmer M, Zschoche S, Freudenberg U, et al. Modulating Biofunctional starPEG Heparin Hydrogels by Varying Size and Ratio of the Constituents. *Polymers*. 2011;3(1):602–20.
 98. Zhai Z, Yao Y, Wang Y. Importance of Suitable Reference Gene Selection for Quantitative RT-PCR during ATDC5 Cells Chondrocyte Differentiation. *PLoS ONE*. 2013;8(5).
 99. Arslan E, Sardan Ekiz M, Eren Cimenci C, Can N, Gemci MH, Ozkan H, et al. Protective therapeutic effects of peptide nanofiber and hyaluronic acid hybrid membrane in in vivo osteoarthritis model. *Acta Biomaterialia*. 2018;73:263–74.
 100. Radhakrishnan J, Manigandan A, Chinnaswamy P, Subramanian A, Sethuraman S. Gradient nano-engineered in situ forming composite hydrogel for osteochondral regeneration. *Biomaterials*. 2018;162:82–98.
 101. Coulson-Thomas YM, Coulson-Thomas VJ, Norton AL, Gesteira TF, Cavaleiro

- RP, Meneghetti MCZ, et al. The identification of proteoglycans and glycosaminoglycans in archaeological human bones and teeth. *PLoS ONE*. 2015;10(6).
102. Sroga GE, Vashishth D. Effects of bone matrix proteins on fracture and fragility in osteoporosis. *Current Osteoporosis Reports*. 2012;10(2):141–50.
 103. Gao W, Lai JCK, Leung SW. Functional enhancement of chitosan and nanoparticles in cell culture, tissue engineering, and pharmaceutical applications. Vol. 3 AUG, *Frontiers in Physiology*. 2012.
 104. Nwe N, Furuie T, Tamura H. The mechanical and biological properties of chitosan scaffolds for tissue regeneration templates are significantly enhanced by chitosan from *Gongronella butleri*. *Materials*. 2009;2(2):374–98.
 105. Wang M. Developing bioactive composite materials for tissue replacement. *Biomaterials*. 2003;24(13):2133–51.
 106. Venkatesan J, Kim SK. Chitosan composites for bone tissue engineering - An overview. *Marine Drugs*. 2010;8(8):2252–66.
 107. Glowacki J, Mizuno S. Collagen scaffolds for tissue engineering. *Biopolymers*. 2008;89(5):338–44.
 108. Andrianarivo AG, Robinson JA, Mann KG, Tracy RP. Growth on type I collagen promotes expression of the osteoblastic phenotype in human osteosarcoma MG-63 cells. *Journal of Cellular Physiology*. 1992;153(2):256–65.
 109. Lynch MP, Stein JL, Stein GS, Lian JB. The influence of type i collagen on the development and maintenance of the osteoblast phenotype in primary and passaged rat calvarial osteoblasts: Modification of expression of genes supporting cell growth, adhesion, and extracellular matrix mineralizatio. *Experimental Cell Research*. 1995;216(1):35–45.
 110. Kong L, Gao Y, Lu G, Gong Y, Zhao N, Zhang X. A study on the bioactivity of chitosan/nano-hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering.

European Polymer Journal. 2006;42(12):3171–9.

111. Barradas AMC, Yuan H, van Blitterswijk CA, Habibovic P. Osteoinductive biomaterials: current knowledge of properties, experimental models and biological mechanisms. *European cells & materials*. 2011;21:407–29; 429.
112. Di Martino A, Sittinger M, Risbud M V. Chitosan: A versatile biopolymer for orthopaedic tissue-engineering. Vol. 26, *Biomaterials*. 2005. p. 5983–90.
113. Lin HR, Yen YJ. Porous alginate/hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering: Preparation, characterization, and in vitro studies. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*. 2004;71(1):52–65.
114. Rizzi SC, Heath DJ, Coombes AGA, Bock N, Textor M, Downes S. Biodegradable polymer/hydroxyapatite composites: Surface analysis and initial attachment of human osteoblasts. *Journal of Biomedical Materials Research*. 2001;55(4):475–86.
115. Davidenko N, Schuster CF, Bax D V., Raynal N, Farndale RW, Best SM, et al. Control of crosslinking for tailoring collagen-based scaffolds stability and mechanics. *Acta Biomaterialia*. 2015;25:131–42.
116. Servat-Medina L, González-Gómez A, Reyes-Ortega F, Sousa IMO, Queiroz N de CA, Zago PMW, et al. Chitosan–tripolyphosphate nanoparticles as *Arrabidaea chica* standardized extract carrier: Synthesis, characterization, biocompatibility, and antiulcerogenic activity. *International Journal of Nanomedicine*. 2015;10:3897–909.
117. Bhumkar DR, Pokharkar VB. Studies on effect of pH on cross-linking of chitosan with sodium tripolyphosphate: A technical note. *AAPS PharmSciTech*. 2006;7(2):E138–43.
118. Yang Q, Dou F, Liang B, Shen Q. Studies of cross-linking reaction on chitosan fiber with glyoxal. *Carbohydrate Polymers*. 2005;59(2):205–10.
119. Freyman TM, Yannas I V., Gibson LJ. Cellular materials as porous scaffolds for tissue engineering. Vol. 46, *Progress in Materials Science*. 2001. p. 273–82.

120. Burg KJL, Porter S, Kellam JF. Biomaterial developments for bone tissue engineering. *Biomaterials*. 2000;21(23):2347–59.
121. Goh CY, Lim SS, Tshai KY, El Azab AWZZ, Loh HS. Fabrication and in vitro biocompatibility of sodium tripolyphosphate-crosslinked chitosan–hydroxyapatite scaffolds for bone regeneration. *Journal of Materials Science*. 2019;54(4):3403–20.
122. Harley BA, Leung JH, Silva ECCM, Gibson LJ. Mechanical characterization of collagen-glycosaminoglycan scaffolds. *Acta Biomaterialia*. 2007;3(4):463–74.
123. Horan RL, Antle K, Collette AL, Wang Y, Huang J, Moreau JE, et al. In vitro degradation of silk fibroin. *Biomaterials*. 2005;26(17):3385–93.
124. Raftery RM, Woods B, Marques ALP, Moreira-Silva J, Silva TH, Cryan SA, et al. Multifunctional biomaterials from the sea: Assessing the effects of chitosan incorporation into collagen scaffolds on mechanical and biological functionality. *Acta Biomaterialia*. 2016;43:160–9.
125. Gleeson JP, Plunkett NA, O'Brien FJ. Addition of hydroxyapatite improves stiffness, interconnectivity and osteogenic potential of a highly porous collagen-based scaffold for bone tissue regeneration. *European Cells and Materials*. 2010;20:218–30.
126. Ryan AJ, Gleeson JP, Matsiko A, Thompson EM, O'Brien FJ. Effect of different hydroxyapatite incorporation methods on the structural and biological properties of porous collagen scaffolds for bone repair. *Journal of Anatomy*. 2015;227(6):732–45.
127. Escobar-Sierra DM, Posada-Carvajal JS, Atehortúa-Soto DL. Fabrication of chitosan/bioactive glass composite scaffolds for medical applications. *Revista Facultad de Ingeniería Universidad de Antioquia*. 2016;(80).
128. de Waard EAC, Driessen JHM, de Jong JJA, van Geel TACM, Henry RMA, van Onzenoort HAW, et al. The association between insulin use and volumetric bone mineral density, bone micro-architecture and bone strength of the distal radius in patients with type 2 diabetes – The Maastricht study. *Bone*. 2017;101:156–61.

129. Moreau F, Kolokolov DI, Stepanov AG, Easun TL, Dailly A, Lewis W, et al. Tailoring porosity and rotational dynamics in a series of octacarboxylate metal-organic frameworks. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2017;114(12):3056–61.
130. Berce C, Muresan MS, Soritau O, Petrushev B, Tefas L, Rigo I, et al. Cutaneous wound healing using polymeric surgical dressings based on chitosan, sodium hyaluronate and resveratrol. A preclinical experimental study. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2018;163:155–66.
131. Saravanan S, Chawla A, Vairamani M, Sastry TP, Subramanian KS, Selvamurugan N. Scaffolds containing chitosan, gelatin and graphene oxide for bone tissue regeneration in vitro and in vivo. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2017;104:1975–85.
132. Park SN, Park JC, Kim HO, Song MJ, Suh H. Characterization of porous collagen/hyaluronic acid scaffold modified by 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide cross-linking. *Biomaterials*. 2002;23(4):1205–12.
133. Loh QL, Choong C. Three-Dimensional Scaffolds for Tissue Engineering Applications: Role of Porosity and Pore Size. *Tissue Engineering Part B: Reviews*. 2013;19(6):485–502.
134. Somaiah C, Kumar A, Mawrie D, Sharma A, Patil SD, Bhattacharyya J, et al. Collagen promotes higher adhesion, survival and proliferation of mesenchymal stem cells. *PLoS ONE*. 2015;10(12).
135. Chesnutt BM, Viano AM, Yuan Y, Yang Y, Guda T, Appleford MR, et al. Design and characterization of a novel chitosan/nanocrystalline calcium phosphate composite scaffold for bone regeneration. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*. 2009;88(2):491–502.
136. Ye CP, Yamaguchi T, Chattopadhyay N, Sanders JL, Vassilev PM, Brown EM. Extracellular calcium-sensing-receptor (CaR)-mediated opening of an outward K +

- channel in murine MC3T3-E1 osteoblastic cells: Evidence for expression of a functional CaR. *Bone*. 2000;27(1):21–7.
137. Zhang Y, Venugopal JR, El-Turki A, Ramakrishna S, Su B, Lim CT. Electrospun biomimetic nanocomposite nanofibers of hydroxyapatite/chitosan for bone tissue engineering. *Biomaterials*. 2008;29(32):4314–22.
 138. Ohbayashi E, Matsushima K, Hosoya S, Abiko Y, Yamazaki M. Stimulatory effect of laser irradiation on calcified nodule formation in human dental pulp fibroblasts. *Journal of Endodontics*. 1999;25(1):30–3.
 139. Mygind T, Stiehler M, Baatrup A, Li H, Zou X, Flyvbjerg A, et al. Mesenchymal stem cell ingrowth and differentiation on coralline hydroxyapatite scaffolds. *Biomaterials*. 2007;28(6):1036–47.
 140. Ignatius A, Blessing H, Liedert A, Schmidt C, Neidlinger-Wilke C, Kaspar D, et al. Tissue engineering of bone: Effects of mechanical strain on osteoblastic cells in type I collagen matrices. *Biomaterials*. 2005;26(3):311–8.
 141. Mizuno M, Kuboki Y. Osteoblast-related gene expression of bone marrow cells during the osteoblastic differentiation induced by type I collagen. *Journal of Biochemistry*. 2001;129(1):133–8.
 142. Khanarian NT, Boushell MK, Spalazzi JP, Pleshko N, Boskey AL, Lu HH. FTIR-I compositional mapping of the cartilage-to-bone interface as a function of tissue region and age. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2014;29(12):2643–52.
 143. Duer MJ, Friščić T, Murray RC, Reid DG, Wise ER. The mineral phase of calcified cartilage: Its molecular structure and interface with the organic matrix. *Biophysical Journal*. 2009;96(8):3372–8.
 144. Annabi N, Nichol JW, Zhong X, Ji C, Koshy S, Khademhosseini A, et al. Controlling the Porosity and Microarchitecture of Hydrogels for Tissue Engineering. *Tissue Engineering Part B: Reviews*. 2010;16(4):371–83.
 145. Khademhosseini A, Langer R. Microengineered hydrogels for tissue engineering.

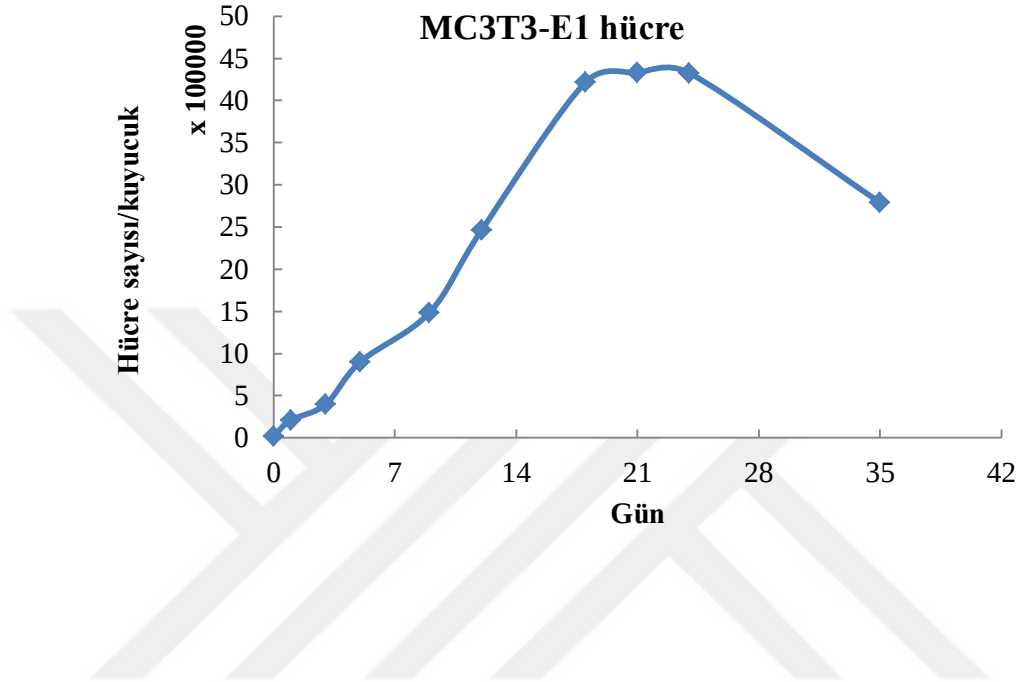
Vol. 28, Biomaterials. 2007. p. 5087–92.

146. Ma L, Gao C, Mao Z, Zhou J, Shen J, Hu X, et al. Collagen/chitosan porous scaffolds with improved biostability for skin tissue engineering. *Biomaterials*. 2003;24(26):4833–41.
147. Shanmugasundaram N, Ravichandran P, Neelakanta Reddy P, Ramamurty N, Pal S, Panduranga Rao K. Collagen-chitosan polymeric scaffolds for the in vitro culture of human epidermoid carcinoma cells. *Biomaterials*. 2001;22(14):1943–51.
148. Fairclough JPA, Norman AI. Structure and rheology of aqueous gels. Vol. 99, *Annual Reports on the Progress of Chemistry - Section C*. 2003. p. 243–76.
149. Rubinstein M, Colby RH. Polymer physics. *Polymer International*. 2003. p. 440.
150. Şen M, Hayrabolulu H. Radiation synthesis and characterisation of the network structure of natural/synthetic double-network superabsorbent polymers. *Radiation Physics and Chemistry*. 2012;81(9):1378–82.
151. Chicatun F, Pedraza CE, Ghezzi CE, Marelli B, Kaartinen MT, McKee MD, et al. Osteoid-mimicking dense collagen/chitosan hybrid gels. *Biomacromolecules*. 2011;12(8):2946–56.
152. Annamalai RT, Mertz DR, Daley ELH, Stegemann JP. Collagen Type II enhances chondrogenic differentiation in agarose-based modular microtissues. *Cytotherapy*. 2016;18(2):263–77.
153. Teng SH, Lee EJ, Wang P, Shin DS, Kim HE. Three-layered membranes of collagen/hydroxyapatite and chitosan for guided bone regeneration. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*. 2008;87(1):132–8.
154. Xavier JR, Thakur T, Desai P, Jaiswal MK, Sears N, Cosgriff-Hernandez E, et al. Bioactive nanoengineered hydrogels for bone tissue engineering: A growth-factor-free approach. *ACS Nano*. 2015;9(3):3109–18.
155. Zhong L, Huang X, Karperien M, Post JN. The regulatory role of signaling crosstalk

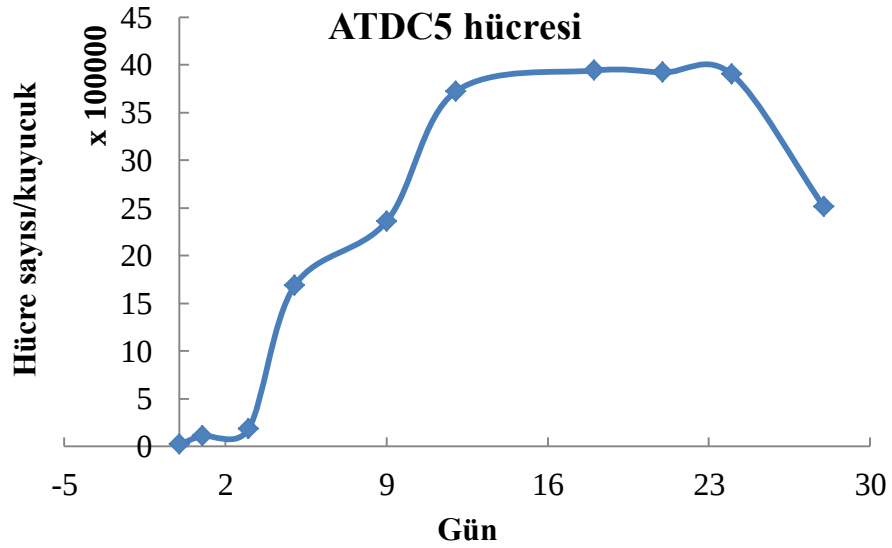
- in hypertrophy of MSCs and human articular chondrocytes. Vol. 16, International Journal of Molecular Sciences. 2015. p. 19225–47.
156. Lu H, Lin Z, Yang Z, Chen M, Zhang K. Inhibition of RUNX2 expression promotes differentiation of MSCs correlated with SDF-1 up-regulation in rats. International Journal of Clinical and Experimental Pathology. 2016;9(11):11388–95.
 157. Altaf FM, Hering TM, Kazmi NH, Yoo JU, Johnstone B. Ascorbate-enhanced chondrogenesis of ATDC5 cells. European Cells and Materials. 2006;12:64–9.
 158. Wang L, Jie Q, Yang L. Chondrocytes-osteoblast transition in endochondral ossification. Annals of Joint. 2017;2:4–4.
 159. Eyre DR WJ. Collagen structure and cartilage matrix integrity. Rheumatol Suppl. 1995;43:82–5.
 160. Mohan N, Dormer NH, Caldwell KL, Key VH, Berkland CJ DM. Continuous gradients of material composition and growth factors for effective regeneration of the osteochondral interface. Tissue Eng Part A. 2011;17(21–22):2845–55.

8. EKLER

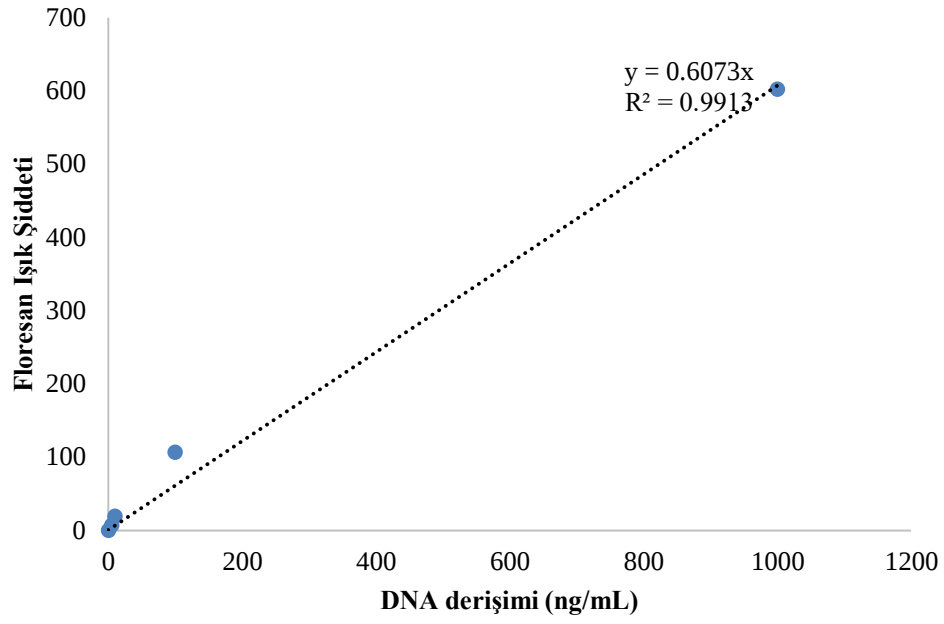
EK 1: MC3T3-E1 HÜCRESİNE AİT ÜREME EĞRİSİ



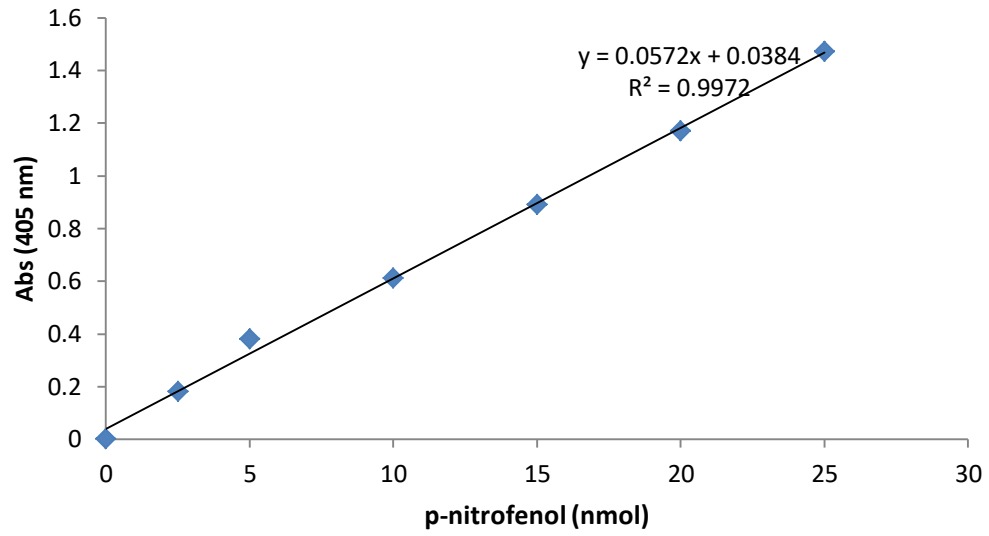
EK 2: ATDC5 HÜCRESİNE AİT ÜREME EĞRİSİ



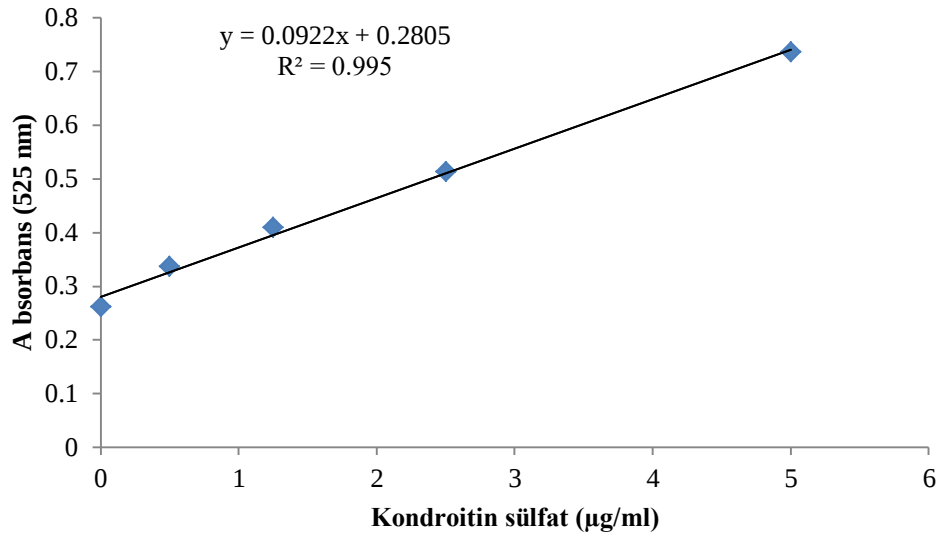
EK 3: DNA KALİBRASYON GRAFİĞİ



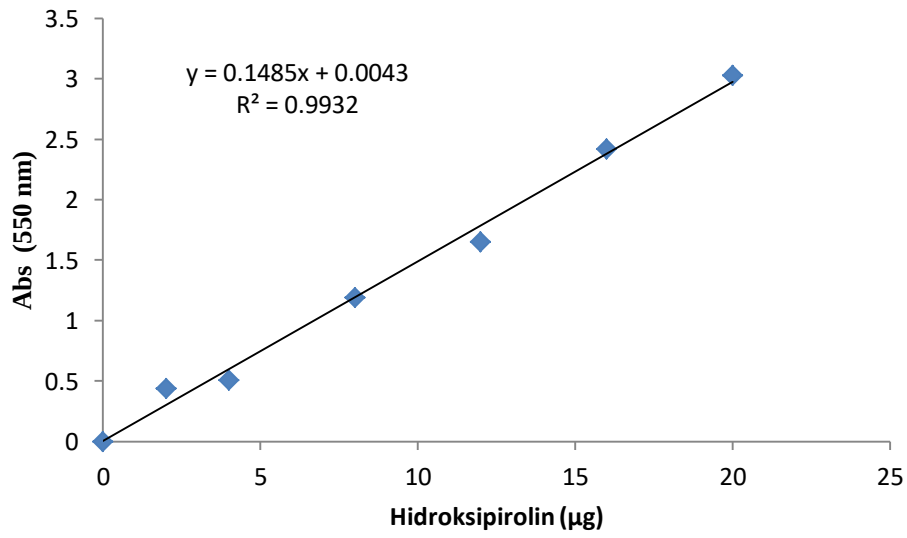
EK 4: ALP KALİBRASYON GRAFİĞİ



EK 5: GAG KALİBRASYON GRAFİĞİ



EK 6: KOLLAJEN KALİBRASYON GRAFİĞİ



EK7: KAÜÇUK ESNEKLİK TEORİSİ (*RUBBER ELASTIC THEORY*) İLE ÇAPRAZ BAĞLAR ARASI ORTALAMA MOLEKÜL AĞIRLIĞI (M_c) VE GÖZ BOYUTU (*MESH SIZE*) HESAPLANMASI

$$M_c = \frac{c\rho RT}{G'_p} \quad (4.3)$$

$$\xi = \left(\frac{G' N_A}{RT} \right)^{-1/3} \quad (4.4)$$

C= %polimer konsantrasyonunun hesaplanması

$$\% c = \frac{\text{katı (g)}}{\text{çözücü (ml)}} \times 100 \quad (\%w/v)$$

ρ ortalama polimer yoğunluğu

$$R=8,314 \text{ J/mol}$$

$$T=298 \text{ K (25 °C)}$$

G' depo modülünün en yüksek değeri (reolojik verilerden).

$$N_A=6.02 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$$

EK 8: HİSTOLOJİK BOYAMA PROTOKOLÜ

Fiksasyon Protokolü

- %10 (v/v) formalin ile doku iskelelerinin fiksasyon işlemi
- Formalinle fikslenmiş olan doku iskeleleri, histolojik kasetler içerisine yerleştirilir.
- Doku iskelelerini içeren kasetler %70'lik (v/v) etanol içerisinde 30 dk bekletilir.
- Kasetler, daha sonra %95'lik (v/v) etanol içerisine alınır ve 30 dk bekletilir.
- %95'lik (v/v) etanol yenisiyle değiştirilir ve kasetler bir 30 dk daha bekletilir.
- Kasetler, %100'lük etanol içerisine alınır ve 30 dk bekletilir. Bu basamak %100'lük yeni etanol çözeltisiyle iki kere daha tekrarlanır.
- Kasetler, etanol basamaklarından sonra ksilen içerisine transfer edilir ve ksilen içerisinde 30 dk bekletilir. Bu basamak yeni ksilen çözeltisiyle bir kez daha tekrarlanır.
- Kasetler, ksilen basamağından sonra parafin içerisine koyulur ve bir gece bekletilir.

Üstteki anlatılan prosedür tüm boyamalar için uygulanmıştır.

Alizarin red boyaması

Kesit: 8 µm parafin kesit

Alizarin red çözeltisinin hazırlanması:

Alizarin red (2 gr) 100 ml distile suda çözünür.

Aseton-ksilen çözeltisinin hazırlanması:

Aseton (50ml) ve ksilen (50ml) karıştırılır.

Prosedür

- Deparaffinize olmuş kesitler distile sudan geçirilir.
- Alizarin red çözeltisinde 5 dk bekletilir.
- Aseton-ksilen çözeltisinde (2 ayrı kapta) kesitler temizlenene kadar durulanır.
- Kurutulduktan sonra lamelle kapatılır.

Alcian blue

KESİT: 8 µm parafin kesit

%3 (v/v) asetik asit çözeltisi hazırlanır.

Alcian blue çözeltisinin hazırlanması:

1 gr Alcian blue (8GX), 100ml %3 asetik asit çözeltisinde çözünür.

Prosedür

- Deparafinize olmuş kesitler distile suda geçirilir.
- %3'lik asetik asit çözeltisinde 3 dakika bekletilir.
- Alcian blue çözeltisine alınır ve 30 dakika bekletilir.
- 5 dk süre ile çeşme suyunda yıkanır.
- Distile suda durulanır.
- 5 dakika nuclear fast red (NFR) çözeltisinde bekletilir.
- 1 dakika akar suda yıkanır ve distile suda durulanır.
- %95'lik etil alkolde 2 dk bekletilir, kurutulur, 2dk ksilende bekletilir ve kapatma işlemi gerçekleştirilir.

Masson's Trichrome

KESİT: 8 µm parafin kesit

Biebrich scarlet için %1'lik 90ml asit fuchsin ve %1'lik 10ml glacial asetik asit karıştırılır.

Phosphomolybdic-phosphotungstic Asit çözeltisi:

5 gr Phosphomolybdic acid ve 5 gr phosphotungstic acid 200ml distile suda çözünür.

Light green hazırlanması:

5 gr light green, 2ml glacial asetik asit ve 250ml distile suda çözünür.

%1'lik asetik asit çözeltisi.

Prosedür

- Deparafinize edilen kesitler distile suda geçirilir.
- Bouin's çözeltisinde 56 °C'de etüvde 1 saat bekletilir.
- Sıcak çözelti oda sıcaklığında 10 dakika daha bekletilir.
- Akar suda temizlenene kadar yıkanır ve distile suda geçirilir.
- Harris hematoksilende 5 dakika bekletilir.
- 10 dakika akar suda yıkanır ve distile suda geçirilir.
- Biebrich scarlet-asit çözeltisinde 15 dakika bekletilir.
- Distile suda durulanır.
- Phospmolybdic-phosphotungstic asit çözeltisinde 15 dk bekletilir.
- Light green solüsyonunda 30 saniye bekletilir.
- %95'lik etil alkolde yıkanır ,kurutulur ve kapatılır.

Picrosirius red boyaması

KESİT: 8 µm parafin kesit

%1'lik sodyum hidroksit çözeltisinin hazırlanması

1 gr sodyum hidroksit 100 ml distile suda çözünür.

Alkalın alkol çözeltisi

100 ml 80%'lik etil alkol,1 ml sodyum hidroksit ile karıştırılır.

Picrosirius red çözeltisinin hazırlanması

1gr Picrosirius red (F3BA) 100ml distile suda çözünür.

0,1 M Borat tampon çözeltisi, ph 9.0

0,1 Sodyum borat 38.1gr,1000ml distile su ile çözünür

Mayers hematoksilen uygulanır.

Prosedür

- Deparafinize yapılan kesitler distile suda geçirilir.
- Akar suda 5 dk durulanır.
- 1 gece %10'lik formalinde bekletilir.
- 15 dk akarsuda yıkanır ve distile suda durulanır.
- Alkalın alkolde 1 saat bekletilir.
- 10 saniye distile suda durulanır.
- *Picrosirius red* çözeltisinde 60 °C'lik etüvde 70 dakika bekletilir.
- 2 ayrı tampon çözeltisinde durulanır.
- 5 dk akar suda yıkanır ve distile suda durulanır.
- 5 dk Mayer's hematoksilende bekletilir.
- 10 dk akarsuda yıkanır ve distile suda durulanır.
- 2 dk etil alkolde bekletilir ve kurutulup kapatılır.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Serdar Korpayev

Doğum Yeri: Turkmenistan

Doğum Tarihi: 09.04.1988

Medeni Hali: Evli

Yabancı Dili: İngilizce, Rusça

Eğitim Durumu

Lisans: Orta Doğu Teknik Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya (2006-2012)

Yüksek Lisans: Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Temel Biyoteknoloji (2014-2015)

Doktora: Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Temel Biyoteknoloji (2015-2019)

İş Tecrübesi

TÜBİTAK destekli 113Z837 no’lu CNR projesi ve adı: “Chemical and Ecological Study of Some Turkish Coasts Benthic Invertebrates”, 2014-2015.

TÜBİTAK destekli 116M437 no’lu proje ve adı: “Osteokondral rejenerasyon için biyomimetik gradyan doku iskelelerinin geliştirilmesi”, 2017-2019.

SCI yayınlar

Korpayev S, Kavaklı C, Çolak Ş, Kavaklı PA. Preparation and characterization of ethylenediamine modified glycidyl methacrylate-grafted nonwoven cotton fabric adsorbent. Cellulose. 2018;25(1):813-828. doi:10.1007/s10570-017-1558-5

Korpayev S., Kavaklı, C., Tilki, S., & Kavaklı, P. A. (2018). Novel cotton fabric adsorbent for efficient As (V) adsorption. Environmental Science and Pollution Research, 25(34), 34610-34622. doi:10.1007/s11356-018-3407-y

Korpayev S., Heydari H., Koç A., Gözcelioğlu B., Konuklugil B., (2019) Additional screening of bioactivities in the Turkish gorgonian *Paramuricea clavata* (Risso, 1826) with isolation of secondary, Cah. Biol. Mar. (Basım aşamasında).

Karakeçili A., **Korpayev S.**, Alizadeh S., Dumanoglu H. (2019), Synthesis of Indole-3-acetic acid and Indole-3-butyric acid Loaded Zinc Oxide Nanoparticles: Effects on Rhizogenesis, Journal of biotechnology (Basım aşamasında).

Ulusal/ Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitabında Basılan

Bildiriler

Seçil Sarıkaya Aydın, Yasin Genc, Melek Sertdemir, **Serdar Korpayev**, Bülent Gözcelioglu, Belma Konuklugil, U. Sebnem Harput , Superoxide Radical Scavenging and Cytotoxic Effects of Different Marine Species from Turkey's Coasts , Good Practice in Traditional Chinese Medicine Research Association, The Fourth Annual Meeting in Mons in Belgium 2015. 13-15 July 2015.

Serdar Korpayev, Honglei Li, Belma Konuklugil, Isolation of bioactive secondary metabolites from Cnidaria *Paramuricea clavata* Third International Conference on New Trends in Chemometrics and Applications (NTCA-2016), Side-Antalya, 23 - 24 May 2016.

Serdar Korpayev, Cengiz Kavaklı, Pınar Akkaş Kavaklı, Plazma Tekniği Kullanılarak PE/PP Dokumasız Kumaş Yüzeylerinin Aşl Polimerizasyonu İle GMA Aşılması ve Karakterizasyonu, VI. Ulusal Polimer Bilim ve Teknoloji Kongresi, Ankara, Türkiye 4-7 Eylül 2016.

Serdar Korpayev, Pınar Akkaş Kavaklı, Cengiz Kavaklı, Nonwoven cotton fabric adsorbent for As(V) removal, 2nd IWA Regional Symposium on Water, Wastewater and Environment. The Past, Present and Future of World's Water Resources, Cesme-Izmir, 22-24 March 2017.

Pınar Akkaş Kavaklı , **Serdar Korpayev** , Serhad Tilki , Cengiz Kavaklı, Plasma Induced ethylenediamine modified glycidyl methacrylate grafted nonwoven cotton fabric adsorbent, XIX Euroanalysis 2017 Europe's Analytical Chemistry Meeting, Stockholm, Sweden, 28 August-1 September 2017.

Serdar Korpayev, Shabnam Alizadeh, Ayşe Karakeçili, Hatice Dumanoglu, The Effects of Silver Nanoparticles Stabilized with Auxins on In Vitro Rooting of Microcuttings in Pyrus Rootstocks, International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences (EurasianBioChem 2018), 26-27 April 2018, Ankara, Turkey (Sözlü sunum).

Cengiz Kavaklı, Pınar Akkaş Kavaklı, **Serdar Korpayev**, Preparation of Cotton Based Adsorbent Material for As(V) Adsorption from Aqueous Solutions, VII. Polymer Science and Technology Congress with International Participation, 09-12 September 2018, Eskişehir, Türkiye

Fulya Özmen, **Serdar Korpayev**, Cengiz Kavaklı, Pınar Akkaş Kavaklı, Preparation of grafted Nonwoven Fabric Adsorbents by Plasma Method and Use in the Removal of Heavy Metal Ions from Aqueous Solutions, VII. Polymer Science and Technology Congress with International Participation, 09-12 September 2018, Eskişehir, Türkiye.

Serdar Korpayev, Shabnam Alizadeh, Ayşe Karakeçili, Hatice Dumanoglu, The Effects of Zinc Oxide Nanoparticles Loaded with IAA and IBA on in Vitro Rooting of Pear (Pyrus communis L.) Micro Cuttings, 14th Nanoscience and nanotechnology conference (NANOTR-14) 22-25 September 2018, Çeşme, İzmir (Sözlü sunum).

Patent

Bir Arsenik Adsorbent ve Elde Edilmesi İçin Bir Yöntem (An arsenic adsorbent and an obtention method thereof) (WO2018056927A3).

TEZDEN ÇIKAN YAYINLAR

Ayşe Karakeçili, Berna Topuz, **Serdar Korpayev**, Ali Mert Erdek, Metal-organic frameworks for on-demand pH controlled delivery of vancomycin from chitosan scaffolds, Materials science and engineering C, 2019 (Şubatta yayına yollandı).

Serdar Korpayev, Özge Toprak, Gülşah Kaygusuz, Murat Şen, Kaan Orhan, Ayşe Karakeçili, Regulation of ATDC5 Hypertrophy in a Chitosan/collagen II/nanohydroxyapatite Osteochondral Interface Mimicking Gel Matrix, *Carbohydrate Polymers* , 2019 (Yayına yollandı).

