

**İPEK MİKROTAŞIYICI DESTEKLİ
BİYOREAKTÖRLERDE GÖBEK KORDONU
MEZENKİMAL KÖK HÜCRE KÜLTÜRASYONU**

**UMBILICAL CORD MESENCHYMAL STEM CELL
CULTURE IN SILK MICROCARRIER
SUPPORTED BIOREACTORS**

GİZEM YOLALAN

PROF. DR MENEMŞE GÜMÜŞDERELİOĞLU

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Biyomühendislik Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2025

ÖZET

İPEK MİKROTAŞIYICI DESTEKLİ BİYOREAKTÖRLERDE GÖBEK KORDONU MEZENKİMAL KÖK HÜCRE KÜLTÜRASYONU

Gizem YOLALAN

Yüksek Lisans, Biyomühendislik Ana Bilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU

Nisan 2025, 75 sayfa

Mezenkimal kök hücreler (MKH), belirli çevresel koşullar altında osteoblast, kondrosit, miyosit ve adiposit gibi özelleşmiş hücre tiplerine farklılaşabilme yetenekleri sayesinde doku mühendisliği ve rejeneratif tıpta önemli bir yere sahiptir. MKH'ler, kemik iliği, adipoz doku ve göbek kordonu başta olmak üzere vücuttaki pek çok dokudan izole edilebilmektedir. İzole edildiği bölgeye göre karakteristik farklılıklar gösterebilen MKH'ler, temel olarak inflamasyon, yara iyileşmesi, enfeksiyon ve çeşitli organ ve dokulardaki dejenerasyon ile ilişkili hastalıkların klinik çalışmalarında kullanılmaktadır.

Göbek kordonu mezenkimal kök hücreleri (GKMKH), diğer yetişkin mezenkimal kök hücrelere kıyasla uzun süre *in vitro* farklılaşma potansiyelini koruyabilmesi, düşük immünojenik yanıt göstermesi ve tümörojenik olmaması nedeniyle doku mühendisliği alanında giderek daha yaygın bir şekilde kullanılmaktadır.

GKMKH'lerin klinik çalışmalarda kullanılabilmesi için büyük ölçekli hücre üretimine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu amaçla mikrotasıyıcı destekli biyoreaktör sistemleri geliştirilmiştir. Bu sistemlerde, kültürün gereksinimine göre uygun özelliklere sahip polimerler kullanılarak üretilmiş, olan mikrotasıyıcılar kullanılmaktadır.

Sunulan tez çalışması kapsamında, mikrotaşyıcı üretiminde kullanılmak üzere biyoyumlu ve biyobozunur olmasının yanısıra iyi mekanik özellikleri nedeniyle ipek fibroin (SF) polimeri seçilmiştir. Mikrotaşyıcıların üretimi için emülsiyon haline getirilmiş faz ayrımı yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntem ile %2,5, %3,5, %4,5 ve %5,5 olmak üzere 4 farklı ipek fibroin konsantrasyonuna sahip mikrotaşyıcı üretimi gerçekleştirilmiştir. Üretilen mikrotaşyıcıların karakterizasyonu kapsamında çap ölçümleri gerçekleştirildiğinde %2,5, %3,5, %4,5 ve %5,5 SF mikrotaşyıcıların çap boyutları sırası ile 277 µm, 213 µm, 226 µm ve 234 µm olarak ölçülmüştür. Pürüzlülük bakımından karşılaştırıldıklarında ise %2,5 SF mikrotaşyıcılarda pürüzlü bir yüzey gözlenmezken, %3,5 SF mikrotaşyıcıların son derece pürüzlü bir yüzeye sahip olduğu görülmüştür.

Üretilen mikrotaşyıcılar ile statik kültür gerçekleştirilmiştir. MTT analizlerinde %2,5, %3,5 ve %4,5 SF mikrotaşyıcıların 7. gün absorbans değerleri birbirine yakın bulunmuştur. En düşük absorbans değeri %5,5 SF mikrotaşyıcılar ile yapılan kültürde elde edilmiştir.

Dinamik kültür çalışmaları yüzey topografisinin GKMKH tutunma ve çoğalmasındaki etkisini belirlemek amacıyla %2,5 ve %3,5 SF mikrotaşyıcılar ile yapılmıştır. Dinamik kültürde, %3,5 SF mikrotaşyıcıların daha homojen bir hücre dağılımı sağladığı belirlenmiştir. MTT analizlerinde %3,5 SF mikrotaşyıcılar ile elde edilen absorbans değeri, 3. ve 7. günlerde %2,5 SF mikrotaşyıcılara kıyasla yaklaşık 6 kat daha yüksek bulunmuştur.

Statik ve dinamik kültürlerden sonra gerçekleştirilen akış sitometrisi analizleri, mikrotaşyıcıların yüzeyinde çoğalan hücrelerin yüzeyden kaldırıldıktan sonra kök hücre özelliklerini koruduklarını göstermiştir.

Bu araştırma, herhangi bir kaplama veya kolajen, jelatin gibi ek malzemeler kullanılmadan, tamamen doğal ipek fibroin polimeri ile üretilen mikrotaşyıcıların dinamik kültürde GKMKH'lerin çoğalması üzerindeki etkisini inceleyen ilk çalışma olma özelliği taşımaktadır.

Anahtar Kelimeler; İpek fibroin; Mikrotaşyıcı; Göbek kordonu mezenkimal kök hücreleri; Doku mühendisliği

ABSTRACT

UMBILICAL CORD MESENCHYMAL STEM CELL CULTURATION IN SILK MICRO CARRIER SUPPORTED BIOREACTORS

Gizem YOLALAN

Master's Degree, Department of Bioengineering

Thesis Advisor: Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU

Nisan 2025, 75 pages

Mesenchymal stem cells (MSCs) play a significant role in tissue engineering and regenerative medicine due to their ability to differentiate into specialized cell types such as osteoblasts, chondrocytes, myocytes, and adipocytes under specific environmental conditions. MSCs can be isolated from many tissues in the body, primarily bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord. Depending on their source of isolation, MSCs exhibit characteristic differences and are mainly used in clinical studies related to inflammation, wound healing, infection, and various degenerative diseases affecting organs and tissues.

Umbilical cord-derived mesenchymal stem cells (UC-MSCs) are increasingly used in the field of tissue engineering due to their ability to maintain in vitro differentiation potential over extended periods compared to other adult MSCs, their low immunogenic response, and non-tumorigenic nature.

Large-scale cell production is required for the clinical use of UC-MSCs. For this purpose, microcarrier-supported bioreactor systems have been developed. In these systems, microcarriers produced using polymers with appropriate properties based on the needs of the culture are utilized.

Within the scope of this thesis, silk fibroin (SF) polymer was selected for microcarrier production due to its biocompatibility, biodegradability, and favorable mechanical properties. The emulsified phase separation method was used for the production of

microcarriers. Using this method, four different SF concentrations—2.5%, 3.5%, 4.5%, and 5.5% (w/v) were used to fabricate the microcarriers. As part of the characterization, size measurements showed that the diameters of 2.5%, 3.5%, 4.5%, and 5.5% SF microcarriers were 277 μm , 213 μm , 226 μm , and 234 μm , respectively. In terms of surface roughness, no surface irregularities were observed in the 2.5% SF microcarriers, while the 3.5% SF group exhibited significantly rough surfaces.

Static culture was performed using the produced microcarriers. MTT analysis showed that the absorbance values on day 7 for 2.5%, 3.5%, and 4.5% SF microcarriers were similar, whereas the lowest absorbance value was recorded for the 5.5% SF group.

To evaluate the effect of surface topography on UC-MSC attachment and proliferation, dynamic culture studies were conducted using 2.5% and 3.5% SF microcarriers. The 3.5% SF microcarriers demonstrated more homogeneous cell distribution under dynamic conditions. MTT analysis revealed that absorbance values obtained with 3.5% SF microcarriers on days 3 and 7 were approximately six times higher than those of 2.5% SF microcarriers.

Flow cytometry analyses conducted following static and dynamic cultures confirmed that the cells proliferating on the surface of the microcarriers retained their stem cell characteristics after being removed from the surface.

This study is the first to investigate the effect of entirely natural silk fibroin-based microcarriers, produced without the use of any coating or additional materials such as collagen or gelatin, on the proliferation of UC-MSCs under dynamic culture conditions.

Keywords: Silk fibroin; Microcarrier; Umbilical cord-derived mesenchymal stem cells; Tissue engineering

TEŞEKKÜR

*Beni laboratuvarına kabul ederek yüksek lisans çalışmalarımı yapmama olanak sağlayan, verdiği tavsiyeler ve yönlendirmeleriyle beni akademik olarak daha ileriye taşıyan, hiç bitmeyen çalışma aşkını ve güçlü kişiliğini kendime örnek aldığım değerli hocam **Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU**'na en içten saygı, sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.*

*Tez çalışmalarım boyunca geç saatlere kadar benimle çalışan haftasonlarını feda eden, tüm bunlara rağmen gülen yüzü hiç solmayan ve tavsiyeleriyle tezimin bitmesine büyük rol oynayan sevgili süpervizörüm **Dr. Ülkü BOZOĞLU**'na, birlikte çalışmaktan çok keyif aldığım, dertleşebildiğim, tavsiyeleri ile bana yol gösteren **Arş. Gör. Demet ÇAKIR**'a teşekkürlerimi sunuyorum.*

*Tez çalışmalarım süresince işimden dolayı gelemediğim noktalarda bana yardım elini uzatan temiz kalpli **Tülay Selin ERKUT**'a ve tüm **Hücre ve Doku Mühendisliği Grubu**'ndaki değerli arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.*

*Samimiyetiyle, cana yakınlığıyla, zekasıyla her yönden çok sevdiğim, doyasıya eğlenip doyasıya dertleşebildiğim, bu hayatta her zaman en iyisi hakettiğine inandığım canım **Tuğçe GÜLTAN**'a, 3 yıldır benim nazımı çeken, kötü esprilerime maruz kalsa da bana olan sevgisini kaybetmeyen, benim için arkadaştan öte bir abi olan canım **Salih Berkay BERKCAN**'a, benim için hem bir hoca hem bir abi olan, boyumun kısalığıyla dalga geçmekten geri kalmayarak abiliğini konuşturan, samimiyetine ve bilgisine güvendiğim canım **Mertkaya ARAS**'a tezime olan katkıları, beni en zorlandığım noktalarda bile tekrar motive ettikleri için teşekkürlerimi sunarım.*

*Beni hep kızı gibi sevdiğini söyleyen, hep benim yanımda olan, içindeki çalışma aşkıyla bana ilham veren canım hocam **Dr. İsmail Selim YILDIRIM**'a, tez deneylerimin işimle çakıştığı zamanlarda beni hep anlayışla karşılayan ve okula gitmem için izin veren proje yürütücüm **Dr. Serkan YAMAN**'a teşekkürlerimi sunarım.*

*Bana hep güçlü bir kadın olmamı öğütleyen, beni bugün olduğum kişi yapan canım annem **Ayşen YOLALAN**'a, her zaman arkamda olduğunu bildiğim, bana cesaret veren canım babam **Ergün YOLALAN**'a ve çok ama çok sevdiğim canım kardeşim **Mehmet Mete YOLALAN**'a teşekkürlerimi ve sevgilerimi sunarım.*

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR	xiv
1 GİRİŞ	1
2 GENEL BİLGİLER	4
2.1 Doku Mühendisliğinde Kök Hücre Yaklaşımı	4
2.2 Mezenkimal Kök Hücreler (MKH)	6
2.3 Göbek Kordonu Mezenkimal Kök Hücreleri (GKMKH)	8
2.4 Kök Hücrelerin Büyük Ölçekte Üretimi.....	10
2.5 Mikrotaşıyıcılar	13
2.6 Mikrotaşıyıcı Üretiminde Kullanılan Malzemeler ve Üretim Yöntemleri	17
2.6.1 Sentetik Polimerlerden Üretilen Mikrotaşıyıcılar	19
2.6.2 Doğal Polimerlerden Üretilen Mikrotaşıyıcılar	19
2.7 İpek Fibroinin Yapısı ve Fiziksel Özellikleri	20
2.8 İpek Fibroin Mikrotaşıyıcı Üretimi	20
3 DENEYSEL ÇALIŞMALAR	24
3.1 Kullanılan Malzemeler	24
3.2 İpek Fibroin Mikrotaşıyıcıların Üretimi ve Karakterizasyonu	27
3.2.1 İpek Fibroin (SF) Çözeltisinin Hazırlanması	27
3.2.2 İpek Fibroin Mikrotaşıyıcıların Üretimi	28
3.2.3 İpek Fibroin Mikrotaşıyıcıların Stabilizasyonu	28
3.2.4 İpek Fibroin Mikrotaşıyıcıların Karakterizasyonu	29

3.3	Hücre Kültürü Çalışmaları.....	29
3.3.1	GKMKH Karakterizasyonu	29
3.3.1.1	Canlı/ölu Boyama	30
3.3.1.2	F aktin/DAPI Boyama	30
3.3.2	İpek Fibroin Mikrotasıyıcıların Sterilizasyonu ve Şartlandırılması	30
3.3.3	Statik Hücre Kültürü Çalışmaları	31
3.3.3.1	Optik Görüntüleme	31
3.3.3.2	MTT Analizi	31
3.3.3.3	Canlı/Ölü Boyama	32
3.3.3.4	F-aktin/DAPI Boyama	32
3.3.3.5	SEM Analizi	32
3.3.4	Dinamik Hücre Kültürü Çalışmaları.....	32
3.3.5	Hücrelerin Mikrotasıyıcı Yüzeyinden Kaldırılması	33
3.3.6	Akış Sitometrisi Analizi	34
3.4	İstatistiksel Analiz	34
4	SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	35
4.1	İpek Fibroin Mikrotasıyıcıların Üretimi ve Karakterizasyonu	35
4.2	Hücre Kültürü Çalışmaları.....	36
4.2.1	Göbek Kordonu Mezenkimal Kök Hücrelerin Karakterizasyonu	37
4.2.2	Statik Hücre Kültürü Çalışmaları	39
4.2.3	MTT Analizi	41
4.2.4	F aktin/DAPI Boyaması	42
4.2.5	Canlı/Ölü Hücrelerin Görüntülenmesi.....	45
4.2.6	SEM Analizi	46
4.3	Dinamik Hücre Kültürü Çalışmaları.....	47
4.3.1	MTT Analizi	49
4.3.2	F aktin/DAPI Boyaması	50

4.3.3	Canlı/Ölü Hücrelerin Görüntülenmesi.....	52
4.3.4	SEM Analizi	54
4.1.	Hücrelerin Mikrotaşyıcı Yüzeyinden Kaldırılması	55
4.2.	Akış Sitometrisi Analizi	56
5	YORUM.....	61
6	KAYNAKLAR.....	64
	EKLER	72
EK-1	Göbek Kordonu Mezenkimal Kök Hücrelerin;	72
<input type="checkbox"/>	Hücre Sayısı-Zaman Grafiği.....	72
<input type="checkbox"/>	Ln(x)-Zaman Grafiği	72
<input type="checkbox"/>	MTT-Zaman Grafiği.....	73
EK-2	Göbek Kordonu Mezenkimal Kök Hücrelerin Kristal Viyole Boyama Görüntüleri	
	74	
EK-3	Göbek Kordonu Mezenkimal Kök Hücrelere Ait Akış Sitometrisi Sonuçları ...	75

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Mezenkimal kök hücre temelli tedaviler kapsamında klinik çalışmalara konu olan bazı hastalıklar. ([26]'den değiştirilerek).	7
Şekil 2.2. Farklı biyoreaktör tipleri A) Karıştırmalı tank biyoreaktör, B) Çalkalamalı biyoreaktör, C) Hollow fiber biyoreaktör, D) Sabit yataklı biyoreaktör, E) Karıştırmalı kap biyoreaktör ([38]'den değiştirilerek)	12
Şekil 2.3. İpeğin yapısı [61].....	20
Şekil 3.1. İpek çözeltilisinin üretim şeması (Biorender.com ile çizilmiştir).	27
Şekil 3.2. İpek fibroin mikrotarıyıcıların üretim şeması (Biorender.com ile çizilmiştir).....	28
Şekil 3.3. Dinamik hücre kültürü çalışmalarında kullanılan karıştırmalı kap biyoreaktör şeması (Biorender.com ile çizilmiştir).	33
Şekil 4.1. Çeşitli SF konsantrasyonlarında üretilen mikrotarıyıcılara ait farklı büyütmelerdeki SEM görüntüleri	35
Şekil 4.2. Farklı konsantrasyonlarda üretilen mikrotarıyıcıların A) Çap değerleri, B) pürüz boyutları (%2,5 SF mikrotarıyıcılarda pürüzlü yüzey gözlenmediği için pürüz boyutlarını içeren grafikte yer almamıştır).	36
Şekil 4.3. GKMKH'ne ait 3. ve 7. günde farklı büyütmelerdeki ışık mikroskobu görüntüleri.	37
Şekil 4.4. GKMKH'lerin 3. ve 7. gün canlı/ölü ve F-aktin/DAPI boyama görüntüleri (Canlı/ölü boyamalarında yeşil ve kırmızı renkler sırasıyla canlı ve ölü hücreleri göstermektedir. F-aktin/DAPI boyamalarında yeşil ve mavi sırasıyla hücre iskeletini ve çekirdeğini göstermektedir).	38
Şekil 4.5. Çeşitli konsantrasyonlardaki ipek mikrotarıyıcılar üzerinde çoğalan GKMKH'lerin 3. ve 7. gün ışık mikroskobu görüntüleri (Sarı oklar tutunmuş ve yayılmış hücreleri işaret etmektedir).	40
Şekil 4.6. İpek mikrotarıyıcılarla gerçekleştirilen 7 günlük statik hücre kültürüne ait MTT analizi sonuçları (İstatistiksel anlamlı farklılıklar $n=3$, $**p<0,01$ ve $***p<0,001$, farklı konsantrasyonlardaki mikrotarıyıcılar karşılaştırıldığında). ...	42
Şekil 4.7. Çeşitli konsantrasyonlardaki ipek mikrotarıyıcılar üzerinde çoğalan GKMKH'lerin 3. ve 7. gün F aktin/DAPI boyama görüntüleri (Sarı oklar tutunmuş ve yayılmış hücreleri işaret etmektedir. Yeşil ve mavi sırasıyla hücre iskeletini ve çekirdeğini göstermektedir).	44

Şekil 4.8. %2,5 ve %3,5 SF (w/v) konsantrasyonuna sahip ipek mikrotarıyıcılar üzerinde çoğalan GKMKH'lerin 3. ve 7. gün canlı/ölü boyama görüntüleri (Yeşil ve kırmızı renkler sırasıyla canlı ve ölü hücreleri göstermektedir. Sarı oklar mikrotarıyıcılar üzerinde yayılma davranışı gösteren hücreleri işaret etmektedir)..	46
Şekil 4.9. Statik hücre kültürü koşullarında %2,5 ve %3,5 SF konsantrasyonuna sahip mikrotarıyıcılar üzerinde çoğalan GKMKH'lerin 3. ve 7. SEM görüntüleri (Mavi ile renklendirilmiş olanlar tutunmuş ve yayılmış hücreleri işaret etmektedir).	47
Şekil 4.10. Karıştırmalı biyoreaktörde 19 rpm karıştırma hızında morfolojisi bozulmuş %2,5 SF mikrotarıyıcıların ışık mikroskobu görüntüsü.	48
Şekil 4.11. Dinamik kültürde %2,5 SF ve %3,5 SF konsantrasyonlardaki ipek mikrotarıyıcılar üzerinde çoğalan GKMKH'lerin 3. ve 7. gün ışık mikroskobu görüntüleri (Sarı oklar tutunmuş ve yayılmış hücreleri işaret etmektedir).	49
Şekil 4.12 İpek mikrotarıyıcılarla gerçekleştirilen 7 günlük dinamik hücre kültürüne ait MTT analizi sonuçları (İstatistiksel anlamlı farklılıklar $n=3$, **** $p<0,001$, farklı konsantrasyonlardaki mikrotarıyıcılar karşılaştırıldığında).	50
Şekil 4.13. Dinamik kültürde, %3,5 SF ipek mikrotarıyıcılar üzerinde çoğalan GKMKH'lerin 3. ve 7. gün F aktin/DAPI görüntüsü (Yeşil ve mavi sırasıyla hücre iskeletini ve çekirdeğini işaret etmektedir).	51
Şekil 4.14. Dinamik kültürde %2,5 SF konsantrasyonundaki ipek mikrotarıyıcılar üzerinde çoğalan GKMKH'lerin 7. gün ve %3,5 SF konsantrasyonundaki ipek mikrotarıyıcılar üzerinde çoğalan GKMKH'lerin 3. ve 7. gün canlı/ölü boyama görüntüsü (Sarı oklar mikrotarıyıcıların üzerinde yayılma davranışı gösteren hücreleri işaret etmektedir. Yeşil ve kırmızı renkler sırasıyla canlı ve ölü hücreleri göstermektedir).	53
Şekil 4.15. Dinamik kültürde %3,5 SF konsantrasyonundaki ipek mikrotarıyıcılar üzerinde çoğalan GKMKH'lerin SEM görüntüsü (Mavi ile renklendirilmiş bölgeler tutunmuş ve yayılmış hücreleri işaret etmektedir).	54
Şekil 4.16. Dinamik kültürde 7. gün sonunda 2 farklı enzimle gerçekleştirilen yüzeyden kaldırma işlemi sonucunda ulaşılan hücre sayıları (İstatistiksel anlamlı farklılıklar $n=3$, *** $p<0,001$, farklı SF konsantrasyonu ve kaldırma yöntemi karşılaştırıldığında).	55
Şekil 4.17. Yüzeyden kaldırılmış hücrelerin ışık mikroskobundaki görüntüsü (Sarı oklar kaldırılmış olan hücreleri işaret etmektedir).	56

Şekil 4.18. Akış sitometrisi analizi öncesi A) %2,5 SF B) %3,5 SF mikrotarışıyıcılardan kaldırılan ve TCPS'e ekilen GKMKH'lerin 7. gün ışık mikroskobu görüntüleri. ...	57
Şekil 4.19. %2,5 SF mikrotarışıyıcılar ile yapılan statik kültür sonrası mikrotarışıyıcı yüzeyinden kaldırılmış hücrelere ait akış sitometrisi analizi (A: Kontrol grubu. B: CD34, CD45, CD73, CD90 ve CD105 belirteçleri ile boyanmış hücreler.)	58
Şekil 4.20. %3,5 SF mikrotarışıyıcılar ile yapılan dinamik kültür sonrası mikrotarışıyıcı yüzeyinden kaldırılmış hücrelere ait akış sitometrisi analizi (A: Kontrol grubu. B: CD34, CD45, CD73, CD90 ve CD105 belirteçleri ile boyanmış hücreler.)	59
Şekil 4.21. %2,5 SF mikrotarışıyıcılar ile gerçekleştirilen statik kültür ve %3,5 SF mikrotarışıyıcılar ile gerçekleştirilen dinamik kültür sonrası yapılan akış sitometrisi analiz sonuçları (A: Grafik, B: Tablo olarak gösterimi).....	60

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Bazı hastalıkların tedavisi için gerekli olan hücre sayıları ([34,38]'den değiştirilerek).....	10
Çizelge 2.2. Kök hücrelerin mikrotaşıyıcılar ile kültürasyonunun yapıldığı bazı çalışmalar ([45]'den değiştirilerek.)	14
Çizelge 2.3. Ticari mikrotaşıyıcılar ve fizikokimyasal özellikleri ([43]'den değiştirilerek).....	16
Çizelge 2.4. Gözenekli mikrotaşıyıcı üretim yöntemleri ([53,55]' den değiştirilerek).	18
Çizelge 2.5. İpek mikrotaşıyıcılarla yapılan bazı kök hücre çalışmaları [55].	22
Çizelge 3.1. Deneysel çalışmalarda kullanılan malzemeler.	24

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

μ	Mikro
LiBr	Lityum bromür
Na_2CO_3	Sodyum karbonat

Kısaltmalar

BSA	Sığır serum albümin
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DMEM	Dulbecco'nun modifiye ettiği Eagle ortamı
D-PBS	Dulbecco'nun fosfat tampon çözeltisi
DEAE	Dietilaminotetil
EthD-1	Etidyum homodimer-1
GA	Glutaraldehit
GKMKH	Göbek kordonu mezenkimal kök hücre
FBS	Fetal sığır serumu
HMDS	Hekzametildisilazan
Kalsein AM	Kalsein asetoksimetil
MTT	3-[4,5-dimetiltiazol-2]-difeniltetrazolyum bromür
NIPAAm	N- izopropilakrilamid
PBS	Fosfat tampon çözeltisi
PHEMA	Poli (hidroksietil metakrilat)
PLA	Poli(laktik asit)
PLGA	Poli(laktik-ko-glikolik asit)
RGD	Arginin-glisin-aspartik asit
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
TCPS	Polistiren doku kültür kabı (Tissue culture polystyrene)
SF	İpek fibroin (Silk Fibroin)
v/v	Hacim/hacim oranı
w/v	Kütle/hacim oranı

1 GİRİŞ

Doku mühendisliği, 1980'lerde I. V. Yannas ve John F. Burke'ün, geniş çaplı deri kayıplarının onarımına yönelik yapay deri geliştirme çalışmalarıyla temelleri atılan bir alandır. Günümüzde ise kök hücre temelli yaklaşımlar sayesinde rejeneratif tıpta önemli bir tedavi alternatifi sunmaktadır [1,2]. Kök hücrelerin belirli koşullar altında osteoblast, kondrosit, miyosit ve adiposit gibi belirli bir hücre tipine farklılaşabilme yeteneğine sahip olması hasar görmüş doku ve organların tedavisinde bu hücrelerin kullanılabilmesine olanak sağlamaktadır [3].

Embriyonik kök hücre (EKH), indüklenmiş pluripotent kök hücre (iPKH) ve mezenkimal kök hücre (MKH) olmak üzere üç ana tip kök hücre bulunmaktadır. Embriyonik ve indüklenmiş kök hücreler, tümör oluşumu (teratomlar gibi) ve genetik farklılıklar nedeniyle immün sistem tarafından reddedilme olasılığı gibi risk faktörleri barındırmaktadır. Ayrıca bazı etik kısıtlamalardan dolayı mezenkimal kök hücreler kadar yaygın bir kullanıma sahip değillerdir [4,5]. MKH'ler, multipotent özellik gösteren ve diğer iki tip kök hücreye kıyasla daha kolay izole edilebilen ve manipüle edilebilen hücrelerdir. Bu nedenle, en sık çalışılan kök hücre tipidir [6].

Kök hücrelerin doku mühendisliğinde kullanımı bu hücrelerin yüksek sayıda üretilebilmesi gerekliliğini de doğurmaktadır. Geleneksel tek tabakalı hücre üretim yöntemi bu konuda yetersiz kalmaktadır. Bunun en büyük sebebi yüzey alanının kısıtlı olmasıdır. Mikrotaşıyıcı biyoreaktör sistemleri bu problemi aşmak için etkili bir yaklaşım sunar.

Mikrotaşıyıcılar 3 boyutlu şekillerinin verdiği avantajla kök hücrelerin farklılaşmadan, doku mühendisliğinde gereksinim duyulan miktarlarda üretilmesi için gerekli yüzey alanını sağlar [7]. Sentetik veya doğal polimerlerden üretilebilen mikrotaşıyıcılar, üretim süreçlerindeki farklılıklar ile şekil, boyut ve yüzey kaplamaları gibi hücre tutunmasını ve çoğalmasını etkileyebilecek özellikler bakımından uygun hale getirilebilirler [8].

Sunulan tez çalışmasında ucuz, biyobozunur ve biyoyumlu olması nedeniyle mikrotaşıyıcı üretiminde ipek fibroin polimeri tercih edilmiştir. Literatürde MKH'lerin ipek fibroin mikrotaşıyıcılar ile kültüre edildiği farklı çalışmalar bulunmaktadır. Fang ve

ark. stronsiyum içeren %2,5 (w/v) ipek fibroin mikrotarıyıcı ile kemik iliği kaynaklı MKH kùltürasyonunu gerçekteştirmiştir. Çalışma sonucunda hücrelerin mikrotarıyıcılara tutunup yayılmasının dışında mikrotarıyıcılarda bulunan stronsiyumun kök hücrelerin osteojenik farklılaşma kapasitesini artırdığı rapor edilmiştir [9]. Orfei ve ark. tarafından gerçekteştirilen başka bir çalışmada, %1 (w/v) sodyum aljinat/ %2 (w/v) ipek fibroin mikrotarıyıcılar kullanılmış ve bu mikrotarıyıcılarla adipoz doku ve kemik iliği MKH'ler çoğaltılmıştır. Çalışmada her iki hücre tipinin de mikrotarıyıcılara tutunduğu, çoğaldığı ve yüksek canlılık gösterdiği belirtilmiştir [10]. İpek fibroinin kaplama olarak kullanıldığı bir çalışmada ise Perteghella ve ark. insan adipoz kökenli MKH'leri ipek fibroin kaplı aljinat mikrotarıyıcılarda çoğaltmıştır. Kùltürün 7. gününde hücrelerin mikrotarıyıcıları tamamen kapladđı ve ölü hücre görülmeydiği belirtilmiştir [11].

Literatürde yapılan tüm bu çalışmalar, ipek fibroin bazlı mikrotarıyıcıların hücre tutunması, çoğalması ve farklılaşma potansiyelini destekleyerek MKH kùltür sistemlerinde kullanılmaya uygun olduğunu göstermektedir.

Tez çalışmasında kullanılan GKMKH'lerin ipek fibroin mikrotarıyıcılarda üretilmesine dair bir çalışma olmamasına karşın jelatin, dekstran, polistiren gibi farklı polimerlerden üretilmiş mikrotarıyıcılar ile büyük ölçekli GKMKH üretimine yönelik çalışmalar bulunmaktadır [12–14]. Zhao ve ark. tarafından yapılan çalışmada GKMKH'lerin jelatin yapılı CultiSpher-G mikrotarıyıcılar ile çoğaltılması amaçlanmıştır. Çalışmada karıştırmalı kap biyoreaktör kullanılmış ve 55 dakika 40 rpm'de karıştırma, 5 dakika durdurma periyodu ile çalışılmıştır. Kùltürün 7. gününde başlangıca göre 2,5 kat daha fazla hücre elde edilmiştir. Ayrıca hücrelerin köklülük özelliklerinin korunmaya devam ettiği belirtilmiştir [12]. Dimetilaminoetil grupları içeren dekstran yapılı bir mikrotarıyıcı olan Cytodex 1 ile yapılmış olan bir çalışmada Sion C. ve ark., GKMKH'leri 7 gün boyunca kùltüre etmişlerdir. Hücreler, mikrotarıyıcılar üzerinde başarılı bir şekilde çoğaltılmış ve artan hücre sayısına bağlı olarak agregasyon oluşmuştur. Bu durumu önlemek için hücrelerin mikrotarıyıcılar arasında göç etme yeteneğini kullanarak kùltürün 1. gününde ortama yeni mikrotarıyıcılar eklenmiş ve mikrotarıyıcı başına düşen hücre sayısının sabit kalması sağlanmıştır [13].

Sunulan tez çalışması GKMKH'lerin ipek fibroin mikrotarıyıcıları üzerinde kök hücre özelliklerini kaybetmeden yüksek kapasitede çoğaltılmasını amaçlamaktadır. Bu amaca yönelik olarak GKMKH'lerin dinamik kültüründe ipek fibroine daha etkili bir şekilde tutunabileceğine ve sağlıklı bir morfolojide yayılma gösterebileceğine dair bir hipotez oluşturulmuştur.

- (1) Hipotezimizi destekleyebilmek amacıyla; göbek kordonu mezenkimal kök hücrelerinin statik ve dinamik kültür ortamlarında ipek fibroin mikrotarıyıcıları üzerine tutunmaları ve yayılımları karşılaştırılmıştır.
- (2) Dinamik kültürde kullanılan ipek fibroin yoğunluğunun kök hücrelerin tutunması ve çoğalmasındaki etkileri değerlendirilmiştir.

2 GENEL BİLGİLER

Bu bölümde tez çalışmasına ait genel bilgiler özetlenerek sunulmuştur. İlk kısımda kök hücrelerin doku mühendisliğindeki kullanım alanları anlatılmıştır. Daha sonra mezenkimal kök hücreler (MKH) üzerine özelleştirilerek bu hücrelerin doku mühendisliğindeki önemi açıklanmıştır. Ardından tez çalışmasında göbek kordonu mezenkimal kök hücreleri ile ilgili literatür bilgisine yer verilmiştir. Daha sonra bu hücrelerin büyük ölçekte üretimi için kullanılan yöntemler ve tez çalışmasının da temelini oluşturan mikrotaşyıcılarından bahsedilmiştir. Mikrotaşyıcılar ile ilgili üretim yöntemleri, üretimde kullanılan sentetik ve doğal polimerlerin ardından tez çalışmasında kullanılan ipek fibroinden bahsedilmiştir. Son olarak ipek fibroin ile mikrotaşyıcı üretimi hakkında bilgi verilmiştir.

2.1 Doku Mühendisliğinde Kök Hücre Yaklaşımı

Doku mühendisliği; canlı ve fonksiyonel hücrelerin laboratuvar ortamında doğru malzemeler ile birleştirilerek, biyoloji, mühendislik, tıp bilimlerinin prensipleri ile hasar görmüş veya fonksiyonelliğini yitirmiş doku ve organların tedavi edilmesine olanak sağlayan çok disiplinli bir alandır [3]. Doku mühendisliğinin temelinde olan 3 ana element; hücre, doku iskelesi ve biyosinyaldir. Genel yaklaşımda, kök hücreler çoğaltıldıktan sonra ilgili dokuyu oluşturmasını sağlayacak koşullarda bir iskele üzerine ekilir ve hücreler kendi hücre dışı matrislerini (extracellular matrix, ECM) üretir ve sinyalizasyonu başlatarak hedef hücreye farklılaşır ve doku üretimi sağlanmış olur [2].

Kök hücre; farklı hücre tipine farklılaşabilen ve kendini yenileyebilen hücrelerdir [15]. Üç ana kök hücre çeşidi bulunmaktadır; embriyonik kök hücreler (EKH), mezenkimal kök hücreler (MKH) ve indüklenmiş pluripotent kök hücreler (iPKH). Bu hücreler elde edilme yöntemleri ve farklılaşma yetenekleri ile birbirinden ayrılmaktadır. Kök hücrelerin farklılaşma yeteneği doku mühendisliği ile tedavi edilebilen doku çeşidinin artmasında büyük rol oynamaktadır [16].

Embriyonik kök hücreler, 3 tip kök hücre arasında en fazla farklılaşma yeteneğine sahip olan pluripotent hücrelerdir. Bu hücreler 5-7 günlük blastokistlerin trofektoderm tabakasının ayrıştırılarak iç hücre kitlesinin izolasyonu ile elde edilir. Embriyonik kök hücrelerin, kaynağı dolayısıyla insan vücudundaki bütün hücrelere farklılaşma yeteneği bulunur. Ancak her ne kadar yüksek bir potansiyele sahip olsalar da bu hücreleri elde etmek için bir embriyonun kullanılıyor olması etik bir karmaşaya sebep olmaktadır [5,17]. Günümüzde embriyonik kök hücrelerin kullanıldığı yaklaşık 20 klinik çalışma bulunmaktadır. Bu klinik çalışmalar çoğunlukla göz hastalıkları üzerine olmakla birlikte nörolojik, kardiyolojik hastalıklar, diyabet vs. hastalıkları üzerine de çalışılmaktadır [18].

İderson ve ark. tarafından göz hastalıkları üzerine yapılan bir çalışmada, retinal epitelyum hücrelerinin fonksiyonunu kaybetmesi ile sonuçlanan yaşa bağlı makular dejenerasyon (sarı nokta) hastalığında insan embriyonik kök hücreleri retinal epitelyum hücrelerine farklılaştırılmış ve farelere transplante etmiştir. Çalışma sonucunda retinal epitelyumun iyileştiği ve hücrelerin immün yanıt geliştirmeden canlılıklarını devam ettirdiği belirtilmiştir [19].

İndüklenmiş pluripotent kök hücreler (İPKH), kısaca pluripotent hücrelere dönüştürülen somatik hücreler olarak açıklanabilir. Embriyonik kök hücrelerde pluripotent özelliğin korunmasını sağlayan genlerin (*Oct3/4*, *Sox2*, *Klf4* ve *c-Myc*) belirlenmesinden sonra somatik hücreler bu transkripsiyon faktörleri ile transdüksiyona uğratılmıştır. İPKH'ler hastalık modellemelerinde ve hastalıkla ilgili anormal fenotiplerin geri çevrilmesinde kullanışlıdır ancak pluripotent kök hücrelere transkripsiyon faktörlerini entegre etmek için en tercih edilen yöntem virüslerin kullanımınıdır. Bu yöntemin kullanılması tümör oluşturma riskini ortaya çıkardığından pluripotent kök hücrelerin doku mühendisliğinde kullanımı yaygın değildir [20,21].

İndüklenmiş pluripotent kök hücrelerle yapılan çalışmalar 2018 yılından itibaren artış göstermiştir. 2020 yılında Schweitzer ve ark. tarafından ilk defa idiyotik parkinson hastasının beynindeki putamen bölgesine otolog İPKH kökenli dopaminergik progenitör hücreler implante edilmiştir. Öncesinde farelerde yapılan çalışmada hücrelerin immün yanıt oluşturmadığı belirtilmiştir. İmplantasyondan sonra hastalığın semptomlarında iyileşme gözlenmiştir [22].

EKH ve iPKH hücrelerinin dışında doku mühendisliğinde en sık kullanılan hücreler mezenkimal kök hücrelerdir (MKH). Multipotent özellik gösteren bu hücreler izolasyonunun daha kolay olması, farklılaşma ve proliferasyon kapasitelerinin daha sınırlı olması nedeniyle tümör oluşturma riskinin daha az olması, immünmodülatör özelliklere sahip olduğu için bağışıklık sistemini baskılayarak allojenik nakillerde daha iyi tolere edilmesi ve etik açıdan daha kabul edilebilir olması sebepleriyle literatürde daha fazla çalışmada kullanılmaktadır [23].

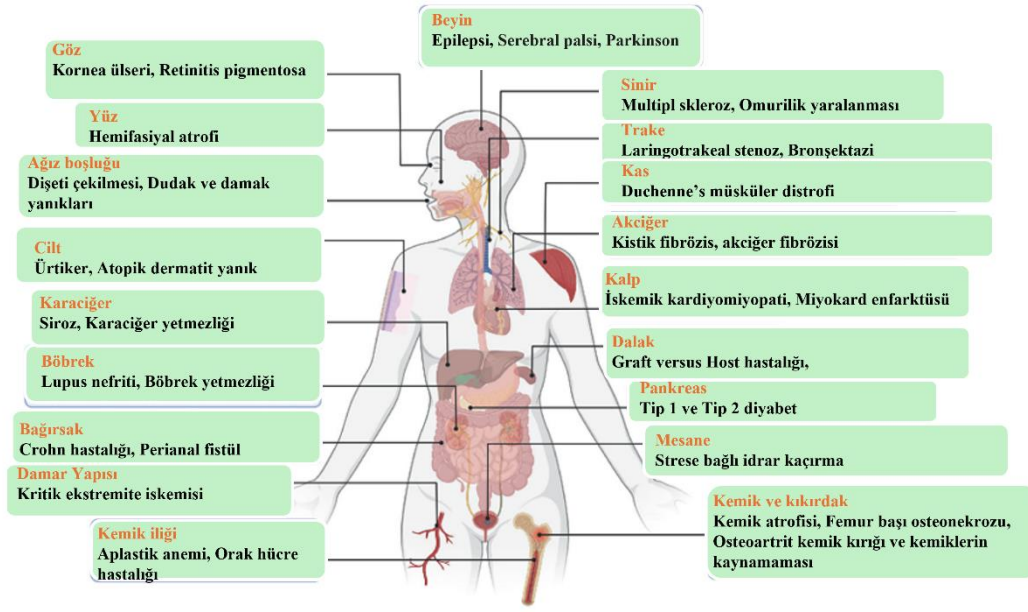
Sunulan tez çalışmasında da MKH'ler ile çalışıldığından aşağıda bu hücrelere ait daha detaylı açıklamalara yer verilmiştir.

2.2 Mezenkimal Kök Hücreler (MKH)

Mezenkimal kök hücreler; Farklı dokulardan izole edilebilen hematopoetik olmayan stromal hücrelerin alt grubudur. Multipotent özellik gösterdiği için EKH veya iPKH'lerin aksine elde edildiği kaynak dokunun aynı germ tabakasındaki özelleşmiş hücrelerine farklılaşabilir [24]. Uluslararası Hücresel Tedavi Derneği'nin multipotent mezenkimal kök hücrelerin tanımlanmasında belirli kriterleri bulunmaktadır. Buna göre;

- Standart kültür koşullarında hücreler yüzeye tutunmalıdır.
- Kök hücre yüzeyinde CD105, CD73 ve CD90 gibi yüzey belirteçlerine sahipken CD45, CD34, CD14 veya CD11b, CD79alfa veya CD19 ve HLA-DR gibi yüzey belirteçlerine sahip olmaması gerekmektedir.
- Osteoblastlara, adipositlere ve kondrositlere farklılaşabilmelidir [25].

Mezenkimal kök hücrelerin osteoblastlara, adipositlere ve kondrositlere farklılaşabilme yeteneği, çeşitli dokuları etkileyen hastalıkların klinik araştırmalarında yaygın olarak kullanılmasının en önemli nedenlerinden biridir. MKH tabanlı klinik çalışmalar, özellikle iltihaplanma, yara iyileşmesi, enfeksiyon ve dejenerasyon ile ilişkili hastalıklara odaklanmakta olup, kemik ve sinir sistemi gibi hastalıklarında yaygın olarak uygulanmaktadır (Şekil 2.1). GvHD ve Crohn hastalığı gibi otoimmün bozukluklarda bağışıklık tepkilerini düzenleme kapasitesine sahip olan MKH'ler, aynı zamanda rejeneratif tıpta yara iyileşmesini ve fonksiyonel düzelmeyi destekleyerek önemli bir rol üstlenmektedir [26].



Şekil 2.1. Mezenkimal kök hücre temelli tedaviler kapsamında klinik çalışmalara konu olan bazı hastalıklar. ([26]'den değiştirilerek).

Mezenkimal kök hücreler birçok farklı kaynaktan elde edilebilir. Kemik iliği, adipoz doku ve göbek kordonu en sık tercih edilen 3 kaynaktır. Kemik iliği mezenkimal kök hücreleri, kemik iliği biyopsisi yapıldıktan sonra hematopoetik kök hücrelerden ayrılarak izole edilir. Bu hücreler, ilk keşfedilen mezenkimal hücreler olmuştur. Alexander Friedenstein yaklaşık 140 yıl önce kemik iliği hücrelerini düşük yoğunlukta ve serum içeren ortamda kültüre ettikten iki hafta sonra fagositik olmayan, yüzeye bağlı fibroblast hücrelerin çoğalmaya başladığını gözlemlemiştir [27].

Adipoz doku mezenkimal kök hücreleri temelde beyaz yağ dokusundan veya kahverengi yağ dokusundan elde edilir. Kahverengi yağ dokusu vücutta beyaz yağ dokusundan çok daha az bulunur ancak miyojenik farklılaşmaya daha yatkındır. Beyaz yağ dokusundan izole edilen hücrelerin izole edildiği bölgeye göre özellikleri farklı olabilir [28].

Göbek kordonu mezenkimal kök hücreleri (GKMKH), Wharton jölesinden enzimatik veya doku eksplantı yöntemiyle izole edilir. Bu üç kaynak (kemik iliği, yağ doku, Wharton jölesi) arasından en fazla hücrenin elde edilebildiği kaynaktır. Çoğalma hızı ve immün yanıt düzenleme özellikleri bakımından da daha avantajlı hücrelerdir.

Bu bölgelerin dışında mezenkimal kök hücreler diş pulpasından, plasentadan, amniyotik sıvıdan, anne sütünden ve endometriyumdan elde edilebilir [29]. Bu farklı kaynaklardan elde edilen hücrelerin immünofenotip özellikleri birbirinden farklılık gösterebilir.

Sözü edilen kaynaklar arasında en sık çalışılan MKH, ilk keşfedilen ve en iyi karakterize edilen olduğu için, kemik iliği mezenkimal kök hücreleridir. Öte yandan, yapılan çalışmalardan kliniğe geçen çalışma sayısı oranına bakıldığında (terapötik yakınlık endeksi) göbek kordonu kök hücreleri ile yapılan çalışmaların daha hızlı ilerlediği görülmektedir. Göbek kordonu ve kemik iliği mezenkimal hücrelerinin morfoloji, farklılaşma potansiyeli ve immünofenotip bakımından benzerlik göstermesi ve göbek kordonu mezenkimal hücrelerin izolasyonunda invaziv yöntemlerin kullanımına gerek duyulmaması, dolayısıyla hücrenin izolasyonunun daha kolay olması bahsedilen terapötik yakınlık endeksinin daha yüksek olmasının nedenidir. [29].

2.3 Göbek Kordonu Mezenkimal Kök Hücreleri (GKMKH)

İnsan göbek kordonu, bebeğin gelişiminde annenin plasentasına bağlanarak embriyonun besin ve oksijen almasını sağlayan, 50 cm'e kadar uzayabilen bir dokudur. Göbek kordonundan mezenkimal kök hücre eldesi genellikle anne ve fetüs arasındaki iki yönlü besin ve oksijen akışını sağlayan mukuslu bağ dokusu olan Wharton jölesi bölgesinden yapılırsa da kordon astarı ve perivasküler bölgeden de mezenkimal kök hücre izolasyonu yapılabilmektedir [30].

Kemik iliği mezenkimal kök hücreleri ilk keşfedilen ve en iyi karakterize edilen hücre olması bakımından uzun yıllar altın standart olarak kabul edildi, göbek kordonu mezenkimal hücrelerinin doku mühendisliğindeki potansiyeli ve avantajları keşfedildikçe bu anlayış değişmeye başlamıştır [31]. Göbek kordonu kök hücreleri bebek doğduktan sonra kullanım dışı kalan yapıdan elde edildiği için embriyonik kök hücrelerdeki etik problemlerle karşılaşılmamaktadır. Ayrıca, kemik iliği hücrelerinin izolasyonunda olduğu gibi invaziv bir işlem gerektirmemesi nedeniyle, donör açısından ağırlı veya travmatik bir süreç söz konusu değildir [32].

GKMKH'lerin, diğer yetişkin mezenkimal kök hücrelere kıyasla *in vitro* farklılaşma potansiyelini daha uzun süre koruduğu bilinmektedir. Bunun dışında düşük immünojenik

cevap sağlaması, tümörojenik olmaması ve donör bulmanın daha kolay olması ile birlikte doku mühendisliğinde giderek daha fazla tercih edilmektedir[33]. GKMKH'lerin öne çıkan özelliklerinden biri de immün yanıtı düzenleyebilme yetenekleridir. Mekanizma hala tam olarak aydınlatılmamış olsa da İndolamin 2,3-dioksijenaz (IDO) salgılayarak T hücrelerinin apoptozunu ve hücre döngüsünün durmasını sağlayabildikleri ayrıca fenotiplerini değiştirerek T hücre aktivasyonunu baskılayabildikleri bilinmektedir [34].

Literatürde GKMKH'lerin nörolojik hastalıklarda, kardiyovasküler hastalıklarda, karaciğer kayıplarında, ortopedik hastalıklarda ve oküler hastalıklarda kullanımı üzerine çalışmalar bulunmaktadır.

Nörolojik alan için omurilik yaralanması örnek olarak verilebilir, Albu S. ve ark. tarafından 2021 yılında faz ½ aşaması tamamlanan çalışmada omurilik yaralanması olan 10 hastada nöroplastik ve nörorejeneratif süreçleri başlatarak yaralanmanın sebep olduğu motor ve duyu fonksiyonlarındaki kaybın azaltılması için 10×10^6 GKMKH intraretikal olarak hastalara transplante edilmiş ve 6 ay sonunda dermatom iğne batması hissiyatında, mesane maksimum kapasitesinde ve mesane hiperaktivitesinde artışlar gözlenmiştir [35].

Kardiyovasküler çalışmalara örnek olarak Wei Z. ve ark. tarafından yapılan çalışma örnek olarak verilebilir. Bu çalışmada mini domuzlarda akut miyokard enfarktüsü modeli oluşturulmuş ve iskemik bölgedeki 9-10 bölgeye direkt enjeksiyon ile GKMKH transplantasyonu gerçekleştirilmiştir. Altı hafta sonra hücrelerin hayatta kaldığı ve kardiyomiyositlere ve endotel hücrelere farklılaştığı gözlenmiştir. Bunun dışında transplantasyon sonrasında apoptozu ve fibrozu azaltarak ventriküller fonksiyonu iyileştirdiği gözlenmiştir [36].

GKMKH'lerin klinik uygulamalarda giderek daha fazla kullanılması, ihtiyaç duyulan hücre miktarında artışa neden olmaktadır. Bu doğrultuda, kök hücrelerin büyük ölçekli üretimini sağlamak amacıyla çeşitli üretim stratejileri geliştirilmektedir.

2.4 Kök Hücrelerin Büyük Ölçekte Üretimi

Kök hücreler üzerine yapılan çalışmaların artması, kullanım alanlarının genişlemesi ve onaylanmış tedavilerin artması ile daha fazla sayıda hücre üretimi gereksinimini beraberinde getirmektedir (Çizelge 2.1). Örneğin kalp yetmezliği hastalığı için hasta başına 10^9 hücre gereksinimi bulunmaktadır. Yıllık olarak alınması gereken dozlar da düşünüldüğünde tek bir hasta için yıllık toplamda 10^{11-12} hücre gerekmektedir[37]. Yüzey alanı kısıtının yanında ihtiyaç duyulan iş gücünün de önemli ölçüde fazla olduğu hücre kültürü flaskları, döner şişeler ve bölmeli flasklar gibi geleneksel yöntemler yeterli sayıda hücre üretimi için etkili olmamaktadır. Bu durum büyük ölçekte kök hücre üretimi çalışmalarının ana nedenini oluşturmaktadır.

Çizelge 2.1. Bazı hastalıkların tedavisi için gerekli olan hücre sayıları ([34,38]'den değiştirilerek).

Kullanılan hücre	Hastalık	Hücre sayısı
Kemik iliği mezenkimal kök hücresi	Graft-versus-konak hastalığı	$1-2 \times 10^6$ hücre/kg vücut ağırlığı
Göbek kordonu mezenkimal kök hücresi	Crohn hastalığı	1×10^6 hücre /kg vücut ağırlığı
Göbek kordonu mezenkimal kök hücresi	Şiddetli ve dirençli sistemik lupus eritematozus	1×10^6 hücre /kg vücut ağırlığı
Prochymal® (Kemik iliği mezenkimal kök hücresi)	Miyokard enfarktüsü	$0,5 \times 10^6$, $1,6 \times 10^6$ veya 5×10^6 hücre/kg vücut ağırlığı

Günümüzde, kök hücrelerin büyük ölçekli üretimi için mikrotarıyıcı tabanlı biyoreaktör sistemleri kullanılmaktadır. Mikrotarıyıcılar, hücreler için adezyon yüzeyi sağlarken aynı zamanda süspanse halde kültüre edilmelerine olanak tanımaktadır. Geleneksel kültür yöntemleriyle kıyaslandığında bu sistemler daha az alan gereksinimi ile daha yüksek hücre verimi sunarak üretim kapasitesini artırmaktadır. Ayrıca, pH, çözünmüş oksijen ve glikoz-laktat seviyeleri gibi kritik parametrelerin gerçek zamanlı izlenmesi ve kontrolü mümkün olmakta, otomasyona dayalı yapısı sayesinde iş gücü ihtiyacı azalmaktadır [7]. Kök hücrelerin biyoreaktör ortamında sürdürülebilirliğinin sağlanabilmesi için,

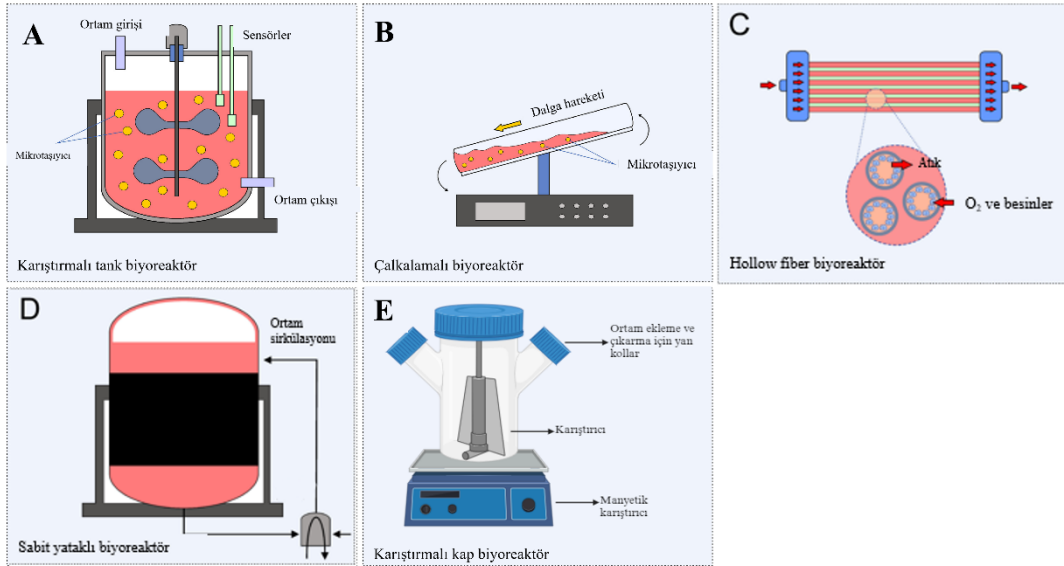
karıştırma hızı, karıştırıcı tipi ve kesme kuvveti gibi parametrelerin, hücrelerin istenmeyen farklılaşmasını tetiklemeyecek şekilde optimize edilmesi gerekmektedir [39].

Zhang ve arkadaşları, Cytodex 3 mikrotarıyıcıları kullanarak gerçekleştirdikleri GKMKH üretimini, hesaplamalara dayalı akış dinamiği analizleri ile 200 mL hacimli karıştırmalı kap biyoreaktörden 1.5 L hacimli biyoreaktöre ölçek büyütme yöntemiyle aktarmışlardır. Küçük ölçekli karıştırmalı kap biyoreaktör kültürasyonunda, 50 mm çapında büyük kanatlı çark tipi bir karıştırıcı kullanılarak 45 rpm hızında karıştırma sağlanmıştır. Yedi günlük kültürasyon sürecinin sonunda hücre yoğunluğu, başlangıçtaki $1,35 \times 10^5$ hücre/mL değerinden $8,76 \times 10^5$ hücre/mL'ye yükselmiştir. Hücre proliferasyonunun başarılı bir şekilde sağlandığı bu süreçte, kesme kuvveti ve akış karakteristiklerinin ölçek büyütülen 1.5 L biyoreaktörde de korunabilmesi amacıyla gerekli hesaplamalar gerçekleştirilmiştir. Bu doğrultuda, 600 mL çalışma hacmine sahip, eliptik tabanlı bir biyoreaktör ve 60 mm çapında, 45° açılı fil kulağı çark tipi bir karıştırıcı kullanılmıştır. Kesikli beslemeli bir strateji izlenen kültür sürecinin yedinci gününde $27,3 \times 10^5$ hücre/mL'lik hücre yoğunluğu elde edilerek, karıştırmalı kap biyoreaktör sistemine kıyasla 3,1 kat daha yüksek hücre verimi sağlanmıştır [37].

Çalkalamalı biyoreaktörlerde GKMKH'ler ile yapılan başka bir çalışmada, Silve ve ark. jelatin mikrotarıyıcılar olan Cultispher-S mikrotarıyıcılar kullanarak 2 L çalkalamalı biyoreaktörde kültürasyon gerçekleştirmişlerdir. Altıyüz mL çalışma hacminde çalışılan biyoreaktör 24 rpm'de 4° 'lik bir çalkalama ile kullanılmıştır. On günlük kültürasyon süresi sonunda $1,7 \times 10^4$ hücre/mL olan başlangıç hücre sayısı 25,6 kat artarak $4,3 \times 10^5$ hücre/mL olarak elde edilmiştir [40].

Bahsedilen çalışmalarda olduğu gibi, ölçek büyütme sürecinde çalışılan hücre tipi ve araştırmanın amacına bağlı olarak farklı biyoreaktör ve karıştırıcı tipleri tercih edilebilmektedir. Karıştırmalı tank biyoreaktör ve çalkalamalı biyoreaktör dışında, hollow, sabit yataklı biyoreaktör gibi farklı biyoreaktör tipleri bulunmaktadır ve her birinin farklı avantajları vardır (Şekil 2.2).

Her bir sistemin kendine özgü çalışma prensipleri bulunmaktadır. Karıştırılmalı tank biyoreaktörlerde, hücreler büyüme yüzeyi sağlayan mikrotarıyıcılara tutunarak kültüre edilir ve homojen bir besin dağılımı sağlanır. Çalkalamalı biyoreaktörlerde ise dalgalı hareket, kültür sıvısında akışkanlık oluşturarak etkili besin ve gaz transferine katkıda bulunur. Hollow fiber biyoreaktörlerde, membran aracılığıyla gerçekleşen difüzyon süreci sayesinde hücre bölmesindeki atık moleküller sürekli olarak uzaklaştırılırken, besinler düzenli olarak sağlanır. Sabit yataklı biyoreaktörlerde ise kök hücreler, immobilize bir iskele yapı üzerine ekilir ve belirli aralıklarla besin ve havalandırmaya maruz bırakılarak kültüre edilir. Bu sistemler, hücre çoğalmasını optimize etmek ve hedeflenen üretim süreçlerine uygun koşulları sağlamak için tercih edilmektedir [38]. Optimizasyonları sağlamak için hücreler genellikle küçük hacimli karıştırılmalı kap biyoreaktörlerde çoğaltıldıktan sonra büyük ölçekli üretime geçilmektedir. Karıştırılmalı kap biyoreaktörlerin manipülasyonunun kolay olması, inkübatör içerisinde proses edilebildiği için çözünmüş oksijen ve pH gibi hücre ihtiyaçlarını gidermek için ekstra bir sisteme gerek duyulmaması ve ucuz bir yöntem olması dolayısıyla ile daha büyük hacimde bir biyoreaktöre geçilmeden önce kültür şartları karıştırılmalı kap biyoreaktörlerde optimize edilir (Şekil 2.2) [41].



Şekil 2.2. Farklı biyoreaktör tipleri A) Karıştırılmalı tank biyoreaktör, B) Çalkalamalı biyoreaktör, C) Hollow fiber biyoreaktör, D) Sabit yataklı biyoreaktör, E) Karıştırılmalı kap biyoreaktör ([38]'den değiştirilerek)

Biyoreaktörlerin tutunarak-çoğalan hücre üretiminde kullanılabilmesi için hücrelerin adezyon yüzeyi sağlayan mikrotaşyıcılar üzerinde kültüre edilmesi, biyoreaktör içindeki hücre büyümesi ve verimliliği açısından kritik bir rol oynamaktadır. Mikrotaşyıcı seçimi, hücrelerin tutunma kapasitesini, proliferasyon oranlarını ve kültür ortamındaki mekanik streslere dayanıklılığını doğrudan etkileyerek ölçek büyütme sürecinin başarısını belirlemektedir [42].

2.5 Mikrotaşyıcılar

Mikrotaşyıcılar, yüzeye tutunarak çoğalan hücrelerin biyoreaktörlerde süspanse ortamda kültüre edilebilmesini sağlayan 100-400 µm çapındaki ve karıştırma sırasında süspanse halde kalmalarını sağlayan yoğunluktaki mikrokürelerdir. Bir gram mikrotaşyıcı 15 adet T-75 flaskın sağladığı yüzey alanını sağlayabilmektedir. Pasaj sayısının azalması ile de hücrelerde pasaj arttıkça görülebilecek morfolojik bozuklukların önüne geçilebilmektedir. Bu sayede alan tasarrufunun yanında besiyeri, serum ve iş gücü gerekliliğini azaltarak üretim maliyetini de düşürmektedir [43].

İlk mikrotaşyıcı 1967 yılında A. L. van Wezel tarafından kullanılmıştır. Wezel, DEAE-Sephadex A50 mikrotaşyıcıları ile tavşan embriyonik deri hücrelerini ve insan embriyonik akciğer hücrelerini süspanse kültürde üretmeyi başarmıştır. Bu çalışma sonrasında mikrotaşyıcıların, viral aşı üretiminde ve memeli hücrelerinin biyolojik ürünlerin üretiminde kullanımı yaygınlaşmıştır [44]Mikrotaşyıcılar kök hücrelerin yüksek miktarda üretimi için elverişli bir sistemdir. Literatürde ticari veya ticari olmayan farklı mikrotaşyıcılar ile kök hücre kültürasyonunun yapıldığı birçok çalışma bulunmaktadır (Çizelge 2.2). Çizelge 2.3'te bu ticari mikrotaşyıcılar ve özellikleri listelenmiştir.

Çizelge 2.2. Kök hücrelerin mikrotaşyıcılar ile kültürasyonunun yapıldığı bazı çalışmalar ([45]'den değiştirilerek.).

Kullanılan hücre	Mikrotaşyıcı	Amaç	Besiyeri	Sonuç	
İnsan periosteumundan türetilen hücreler	Cultispher S	Kemik hücresine farklılaşma	High glucose DMEM + 10% FBS/HPL	Bu hücrelerin mikrotaşyıcıda üretimi çoğalma verimini artırmış ve kemiğe farklılaşma sağlanabilmiştir.	[46,47]
Kemik iliği mezenkimal kök hücreleri	PNIPAM aşılınmış mikrotaşyıcılar	Hücre çoğalması	MEM α + 10% FBS	Hücreler köklülük özellikleri korunarak çoğaltılmıştır.	[47]
Fare kemik iliği mezenkimal kök hücreleri	k-kazein konjuge agaroz mikroküreleri	Osteojenik farklılaşma	DMEM	Bu mikrotaşyıcılar ile hormonlar ve büyüme faktörlerine ihtiyaç duyulmadan hücrelerin osteojenik farklılaşması sağlanabilmiştir.	[48]
İnsan amniyotik mezenkimal kök hücresi	CultiSpher S	Önceden vaskülarize edilmiş modüler kemik dokusu üretimi	DMEM + 10% FBS	4 haftalık kültürden sonra yüksek canlılığa sahip hücreler, kemik dokusuna farklılaşarak mikro dokular oluşturmuştur.	[49]

Çizelge 2.2. Devamı

Kullanılan hücre	Mikrotaşıyıcı	Amaç	Besiyeri	Sonuç	Kaynak
HS2 keratinosit	PHEMA-g-PNIPAAm mikrotaşıyıcı	Hücre çoğalması	DMEM + 10% FBS	Çalışma hem 24 kuyucuklu plate ile hem de spinner flask ile yürütülmüştür ve dinamik kültürde hücre canlılığının 1,5 kat daha fazla olduğu görülmüştür. Morfolojik gözlem yapıldığında hücrelerin mikrotaşıyıcı yüzeyine etkili bir şekilde tutunduğu ve keratinosit hücre özelliklerini koruduğu gözlenmiştir.	[50]
Adipoz kökenli mezenkimal hücreler	Hücretsiz domuz dermal matrisi, ince bağırsak submukozası ve jelatin türevli mikrotaşıyıcılar	Yumuşak doku rejenerasyonu	DMEM + 10% FCS	Her mikrotaşıyıcı grubu hücre tutunması ve proliferasyonu konusunda başarılı olmuş ve %93 üzerinde canlılık göstermiştir. Enjeksiyon sonrası yara iyileşmesi sırasıyla hücretsiz domuz dermal matrisi, ince bağırsak submukozası ve jelatin mikrotaşıyıcılarda daha iyi seviyede görülmüştür.	[51]

Çizelge 2.3. Ticari mikrotarıyıcılar ve fizikokimyasal özellikleri ([43]’den değıştirilerek).

İsim	Üretici	Boyut (µm)	Yüzey alanı (cm ² g ⁻¹)	Mikrotarıyıcı sayısı (g ⁻¹)	Yoğunluk (g ml ⁻¹)	Gözeneklilik	Materyal
Cytodex 1	Amersham Biosciences, İsveç	147–248	4400	4.3x10 ⁶	1.03	-	İkame edilmiş N,N-dimetilaminoetil grupları içeren dekstran matrisi
Cytodex 2	Amersham Biosciences, İsveç	135-200	3300	4.1x10 ⁶	1.04	-	N,N,N trimetil-2 hidroksiaminopropil Dekstran matriksi
Hillex	SoloHill, ABD	150-210	350	5.0x10 ⁵	1.10	-	Modifiye edilmiş polistiren
Plastic coated	SoloHill, ABD	150-210	380	4.5x10 ⁶	1.02-1.04	-	Denatüre kolajen ile kaplanmış plastik
Biosilon	Nunc, Danimarka	160-300	255	5.1x10 ⁴	1.05	-	Polistiren
Glass-coated	SoloHill, ABD	150-210	380	4.5x10 ⁵	1.02-1.04	-	Cam kaplı plastik
Cytodex 3	Amersham Biosciences, İsveç	141-211	2700	3.0x10 ⁶	1.04	-	Dekstran

2.6 Mikrotaşyıcı Üretiminde Kullanılan Malzemeler ve Üretim Yöntemleri

Mikrotaşyıcıların tasarımında doğal hücre ortamını taklit edecek şekilde fiziksel ve kimyasal özellikler, boyutlar, dayanıklılık ve biyoyumluluk gibi özellikleri dikkate alınmalıdır. Bu tasarım süreci, polimer seçiminden başlar ve en uygun üretim yönteminin seçilmesi şeklinde ilerler [52].

Mikrotaşyıcılarda kullanılan malzemeye ve üretim yöntemine göre yüzey topografisi değişmektedir. Yüzey topografisi bakımından gözenekli ve gözeneksiz olarak iki tip mikrotaşyıcı üretilebilir. Gözeneksiz yapıya sahip mikrotaşyıcılarda hücreler sadece yüzeye tutunabildiği yüzey alanı sınırlı kalmaktadır ve hücre sayısındaki artış istenilen düzeyde olmamaktadır. Gözenekli mikrotaşyıcılarda ise hücreler hem iç kısma hem de yüzeye tutunabilmektedir. Bağlantılı açık gözenekler hücrelerin göç etmesi ve yüksek sayılara ulaşabilmeleri için tercih edilmektedir [53].

İnsan diş pulpası kök hücreleri ile yapılan çalışmada iki farklı yüzey topografisine sahip Poli(L-laktik asit)-blok-poli(L-lizin) yapılı mikrotaşyıcılar kullanılmıştır, bunlardan biri içten bağlantılı gözeneklere sahip süngerimsi yapıda iken diğeri gözeneksiz düz bir yüzeye sahip mikrotaşyıcı olmuştur. Dokuz günlük bir kültür sonucunda gözenekli mikrotaşyıcıda proliferasyonun daha hızlı olduğu ve odontojenik farklılaşmayı gösteren gen ekspresyon seviyelerinin daha yüksek olduğu görülmüştür [54].

Çizelge 2.5'te gözenekli mikrotaşyıcı üretiminde kullanılan yöntemler, avantajları ve dezavantajları ile birlikte verilmiştir.

Çizelge 2.4. Gözenekli mikrotasıyıcı üretim yöntemleri ([53,55]' den değiştirilerek).

Yöntem	Ölçeklendirilebilirlik	Gerekli Ekipman	Maliyet	Partikül Boyutu
Emülsiyon Oluşturma/Çözücü Buharlaştırma	Kolayca büyütülebilir, düşük viskoziteli çözeltiler ile sınırlı	Manyetik veya mekanik karıştırıcı	Düşük maliyetli	Geniş boyut aralığı
Emülsiyon Haline Getirilmiş Faz Ayrımı ile Dondurarak Kurutma	Kolayca büyütülebilir, düşük viskoziteli çözeltiler ile sınırlı	Manyetik veya mekanik karıştırıcı	Düşük maliyetli	Geniş boyut aralığı
Ekstrüzyon- Katılaştırma	Düşük viskoziteli çözeltiler ile sınırlı, üretim miktarı çok az	Şırınga	Düşük maliyetli	Büyük mikrotasıyıcı boyutunda dar aralık
Mikroakışkanlar	Üretim miktarı az	Örnek pompası, sıvı tespit ve kontrol sistemi, mikroakışkan çip sistemi	Yüksek maliyetli	Dar boyut aralığı
Püskürterek Kurutma	Kolayca büyütülebilir, sınırlı polimer grubuna uygulanabilir,	Sprey kurutucu	Yüksek maliyetli	Geniş boyut aralığı
Elektrostatik Püskürtme	Üretim miktarı az	Şırınga pompası, yüksek voltajlı elektrik alanı, topraklama ve mikrotasıyıcı toplama cihazı	Yüksek maliyetli	Küçük mikrotasıyıcı boyutunda dar aralık

2.6.1 Sentetik Polimerlerden Üretilen Mikrotaşıyıcılar

Mikrotaşıyıcı üretiminde sentetik polimer kullanımı ile istenilen mekanik özelliklere sahip daha kararlı mikrotaşıyıcılar üretilebilmektedir. Sentetik polimerlerin kimyasal yapı ve molekül ağırlığı gibi özelliklerinin ayarlanabilir olması mikrotaşıyıcı olarak kullanımında hücre tutunmasını, çoğalmasını ve biyobozunurluğunun hücrenin özelliğine uygun olarak değiştirebilmesini sağlar. Ayrıca mikrotaşıyıcıların yüzey topografisi ve hidrofobisitesi de hücre yapışması ve çoğalmasında kritik bir rol oynar. Sentetik polimerler genellikle hidrofobiktir ve uygun hücre yapışması için yapışkan ligandları konjuge etmek için işlevsel kimyasal gruplardan yoksundur. Bu nedenle, yüzey genellikle fibronektin veya kolajen gibi proteinlerle modifiye edilerek hidrofilik bir yüzey oluşturmaları sağlanır [56]. Poli(laktik-ko-glikolit asit) (PLGA), polistiren sülfonat, polialilamin, poli(hidroksietil metakrilat), poliakrilamid ve poliüretan, mikrotaşıyıcı üretiminde kullanılan sentetik polimerler grubundadır [57].

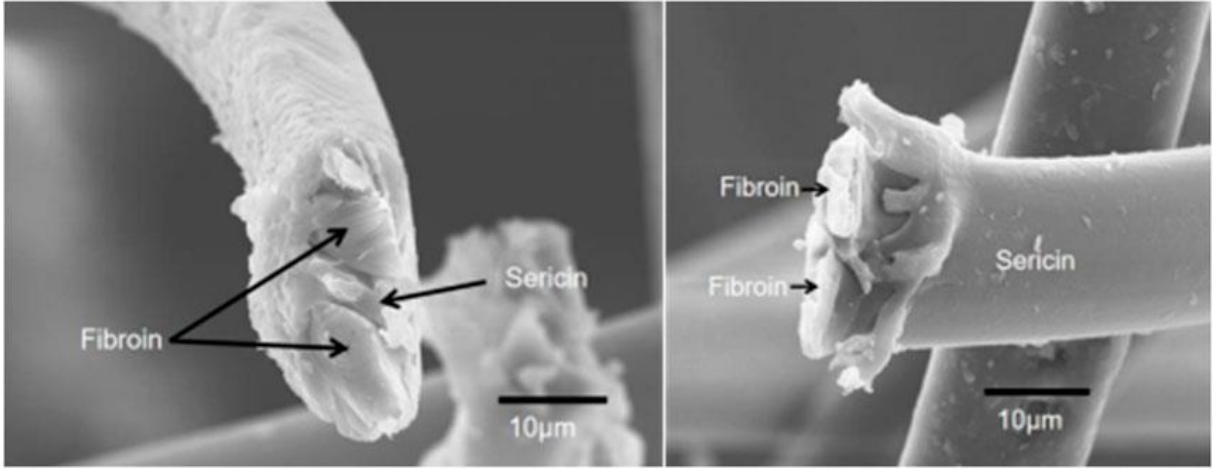
2.6.2 Doğal Polimerlerden Üretilen Mikrotaşıyıcılar

Sentetik polimerlerin üretim tekrarlığı ve belirlenebilir mekanik özellikleri açısından daha avantajlı olmasına karşın doğal polimerlerin elde edilmesi daha düşük maliyetlidir, biyoyumluluk seviyeleri daha yüksektir ve bu polimerler hücrelerin adezyonu ve proliferasyonunda daha iyi performans gösterirler [58]. Doğal polimerlerden kitosan, dekstran, aljinat, jelatin, kollajen, poli (L-lizin) ve ipek mikrotaşıyıcı üretiminde geniş bir uygulama alanına sahiptir.

Tez çalışmasında kullanılan ipek fibroin yine biyoyumlu ve biyobozunur bir yapı olarak hücre çoğalmasını ve kök hücrelerde hücre farklılaşmasını desteklemektedir. Ayrıca ipek fibroin vücut için önemli olan 18 aminoasit içerir. Bu durum ipek fibroin mikrotaşıyıcıların üzerinde çoğaltılan kök hücrelerin direk olarak hedef bölgeye enjekte edilebilmesinin önünü açmaktadır. İpek böceği kozasından elde edilebildiği için ucuz bir polimerdir. Bu avantajlarından dolayı tez çalışmasında GKMKH'lerin çoğaltılması için ipek fibroin mikrotaşıyıcılar tercih edilmiştir [9].

2.7 İpek Fibroinin Yapısı ve Fiziksel Özellikleri

İpek böceği, Kuzey Çin'e özgü bir böcektir ve şu anda ipek üretiminde en çok kullanılan türdür. Evcilleştirilmiş ipek böceğinin en yaygın türü *Bombyx mori*'dir. Literatürde ipek ile yapılan çalışmaların çoğunda *Bombyx mori* kozalarının kullanıldığı bildirilmektedir bu kozalardan elde edilen ipek, 1,3 g/mL yoğunluğa sahip olmakla birlikte 4,8 GPa mekanik dayanımı ile doğadaki en güçlü fiberdir. İpek, fibroin ve serisin olmak üzere iki ana yapıdan oluşmaktadır. Fibroin ipeğin %72-81'ini oluştururken kalan %19-28'lik yapı fibroini saran serisinden oluşmaktadır (Şekil 2.6) [59,60].



Şekil 2.3. İpeğin yapısı [61]

İpek, doku mühendisliğinde biyomalzeme olarak kullanılmak için kritik özelliklere sahiptir. Biyouyumludur, çok yavaş bozulur, kimyasal olarak modifiye edilebilir ve sterilizasyonu kolaydır. Ayrıca partikül, film ve membran gibi farklı yapılar oluşturabilir. Fiziksel olarak bakıldığında çok hafif bir materyal olmasına karşın oldukça güçlüdür, elastikliği ve termal stabilitesi yüksektir. Bu özellikleri mikrotasıyıcı olarak kullanımına olanak sağlamaktadır [62].

2.8 İpek Fibroin Mikrotasıyıcı Üretimi

Literatürde ipek fibroin ile farklı yöntemler kullanılarak mikrotasıyıcı üretimi gerçekleştirilmiştir ancak yalnızca ipeğin kullanıldığı çalışma sayısı oldukça azdır. Genellikle aljinat, jelatin, kalsiyum fosfat, kitosan ve pullulan ile birlikte kullanılarak üretimler gerçekleştirilmiştir [58].

Wang L, ve ark. tarafından yapılan çalışmada saf ipek kullanılarak elektrospreyleme ve dondurarak kurutma metodu kullanılarak mikrotaşyıcı üretimi gerçekleştirilmiştir. Kullanılan parametrelerin mikrotaşyıcı boyutunda nasıl bir farklılığa yol açtığını gözlemleyebilmek için deney, farklı ipek yoğunluklarında, farklı voltajlarda ve farklı akış hızlarında gerçekleştirilmiştir. Bunun sonucunda ipek yoğunluğu ve akış hızı arttıkça oluşan mikrotaşyıcı çapı artarken voltajın artmasıyla mikrotaşyıcı çapının küçüldüğü gözlenmiştir [63].

Literatürde ipek fibroin mikrotaşyıcılar farklı kök hücrelerin çoğaltılması için kullanılmıştır. Örneğin, insan adipoz kök hücrelerinin ipek fibroin kaplı aljinat mikrotaşyıcılar üzerinde kültüre edildiği bir çalışmada 3. günde hücrelerin mikrotaşyıcıların yüzeyini neredeyse tamamen kapladığı ve 14 günlük kültür süresi sonunda %90 hücre canlılığı elde edildiği görülmüştür. Üretim sırasında hücrelerin farklılaşma potansiyellerinin ve metabolik aktivitelerin korunduğu bildirilmiştir [64]. Fibroin kaplı aljinat mikrotaşyıcıların kullanıldığı bir başka çalışmada ise insan kemik iliği mezenkimal kök hücrelerinin, mikrotaşyıcı yüzeyini 3.günden itibaren kaplamaya başladıkları ve 8. günde düşük ölüm oranı ve korunmuş metabolik aktivite ile birlikte yüzeyi tamamen kapladığı gözlenmiştir [65].

Çizelge 2.5'te literatürde ipek kullanılarak üretilen mikrotaşyıcılarda kök hücre kültürasyonunun yapıldığı bazı çalışmalar verilmiştir.

Çizelge 2.5. İpek mikrotarıyıcılarla yapılan bazı kök hücre çalışmaları [55].

Hücre Kültürü	Polimer Matris	Metot	şekil	Boyut	Gözenek Oluşturma İşlemi	Gözenek Boyutu	Stabilizasyon
Sıçan kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücre	Sodyum aljinat (SA) / İpek fibroin (SF) mikrotarıyıcı	Yağda (petrol eteri) su (SA, SF 2:1) emülsiyonu ile birleştirilmiş faz ayrımı	Küresel	254,3 ± 50,0 µm	Buz kristali (-20°C) ve liyofilizasyon	42,0 ± 5,3 µm	Mutlak etanol (%99,5 v/v)
Kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücre	%2,5 (w/v) ipek fibroin mikrotarıyıcı	Yağda (petrol eteri) su (SF) emülsiyonu ile birleştirilmiş faz ayrımı	Küresel	-	Buz kristali (-20°C) ve liyofilizasyon	20 ± 5 µm	Mutlak etanol (%99,5 v/v)
Sıçan mezenkimal kök hücre	%5 (w/v) ipek fibroin / jelatin mikrotarıyıcı	Dış faz oleik asit/metanol/S-pan 80 (73:25:2) - İç faz SF/G solüsyonlarının akış odaklama cihazından geçirilmesi	Küre benzeri	342 ± 33 µm	Buz üzerinde bekletmek ve liyofilizasyon	2 µm	Metanol
Adipoz ve kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücre	%1 (w/v) sodyum aljinat/ %2 (w/v) İpek fibroin mikrotarıyıcı	Aljinat mikrotarıyıcıların SF çözeltilisinde karıştırılması	Küresel şekil, pürüzsüz yüzey	462,97 ± 160,25 µm	-	-	Etanol

Literatürde ipek fibroin mikrotarıyıcılar ile GKMKH hücrelerinin kültürasyonuna ait bir çalışma bulunmamaktadır. Buna karşı GKMKH'lerin ipek fibroin iskelelerde çoğaldığı bilinmektedir. Millán-Rivero ve ark. tarafından yapılan çalışmada elektro eğirme ile üretilmiş 1 cm çapındaki ipek fibroin iskelelerin üzerine 24 kuyucuklu hücre kültürü kabında 4×10^4 hücre/kuyucuk ekilmiştir. On gün sonunda hücrelerin iskele üzerinde yayıldığı, fibroblast morfolojilerini koruduğu ve gözeneklere doğru göç ettikleri belirtilmiştir. Üretilmiş olan GKMKH'ler ile kaplı ipek fibroin iskeleler, derilerinde 10 mm çapında tam kat deri yarası olan farelere transplante edilmiş ve 3 hafta sonunda yaranın tamamen iyileşerek yeni deri oluşumunun gerçekleştiği belirtilmiştir [66].

GKMKH'lerin ipek fibroin iskeleler üzerinde çoğalması büyük ölçekte ipek mikrotarıyıcılar üzerinde çoğalabileceğini de göstermektedir. Bu amaçla tez çalışmasında GKMKH'lerin ipek fibroin mikrotarıyıcılarda kültürasyonu gerçekleştirilmiştir.

3 DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Bu bölümde tez çalışması kapsamında kullanılan malzemeler ve deneysel çalışmaların yöntemleri hakkında bilgi verilmiştir. Tez çalışması iki ana kısımdan oluşmaktadır. İlk kısımda ipek fibroin mikrotarıyıcıların üretim yöntemi ve karakterizasyon çalışmalarına yer verilmiştir. Bu kısımda ipek fibroin (SF) konsantrasyonuna bağlı olarak mikrotarıyıcıların yüzey topoğrafiilerindeki değişim detaylı olarak incelenmiştir.

Tez çalışmasının ikinci kısımda ise GKMKH'ların farklı konsantrasyonlardaki mikrotarıyıcılar üzerinde *in-vitro* hücre kültürü çalışmaları statik ve dinamik koşullarda gerçekleştirilmiş, hücrelerin mikrotarıyıcılar üzerindeki tutunma, çoğalma ve köklülük özelliklerini koruma potansiyelleri incelenmiştir.

3.1 Kullanılan Malzemeler

Tez çalışmasında kullanılan malzemeler Çizelge 3.1' de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Deneysel çalışmalarda kullanılan malzemeler.

Malzeme	Firma	Katalog Numarası	Ülke
<i>Bombyx mori</i> kozaları	Koza Birlik A.Ş.	-	Türkiye
Sodyum karbonat (Na ₂ CO ₃)	Sigma-Aldrich	13418	Almanya
LiBr	Sigma-Aldrich	746479	Almanya
Yılan derisi diyaliz membranı (3.5 K MWCO)	Thermo Fisher	68035	A.B. D
Petrol Eteri	Tekkim Lab	TK.150370.01000	Türkiye
Span-80	Sigma-Aldrich	S6760	Almanya

Çizelge 3.1. Deneysel çalışmalarda kullanılan malzemeler (Devam).

Metanol (%99,9 v/v)	Iso-Lab	1.06009.2511	Türkiye
Mutlak etanol (%99.5 (v/v)	Iso-Lab	9200262500	Türkiye
DMEM/ F12	Multicell	319-085-CL	Kanada
Fetal Bovine Serum (FBS)	Cegrogen	A0500-3210	Almanya
L-glutamin	Cegrogen	K0100-670	Almanya
Penisilin/Streptomisin (P/S)	Cegrogen	P0100-790	Almanya
Trypsin/EDTA	Capricorn Scientific	TRY-3B	Almanya
TrypLe	Gibco Thermo Fisher Scientific	12604013	A.B.D
D-PBS	Capricorn Scientific	PBS-1A	Almanya
Bovin Serum Albumin (BSA)	Capricorn Scientific	BSA-1S	Almanya
MTT	Merck	298-93-1	Almanya
DMSO	Applichem	A3672	Almanya
Tripan mavisi	Sigma-Aldrich	T8154	Almanya
GA (%25 v/v)	Sigma-Aldrich	G-6257	Almanya
HMDS	Sigma-Aldrich	999-97-3	Almanya
70 µm hücre süzgeci (BD Falcon™)	Biosciences	352350	A.B.D.
Triton X-100	Acros Organics	215682500	Almanya

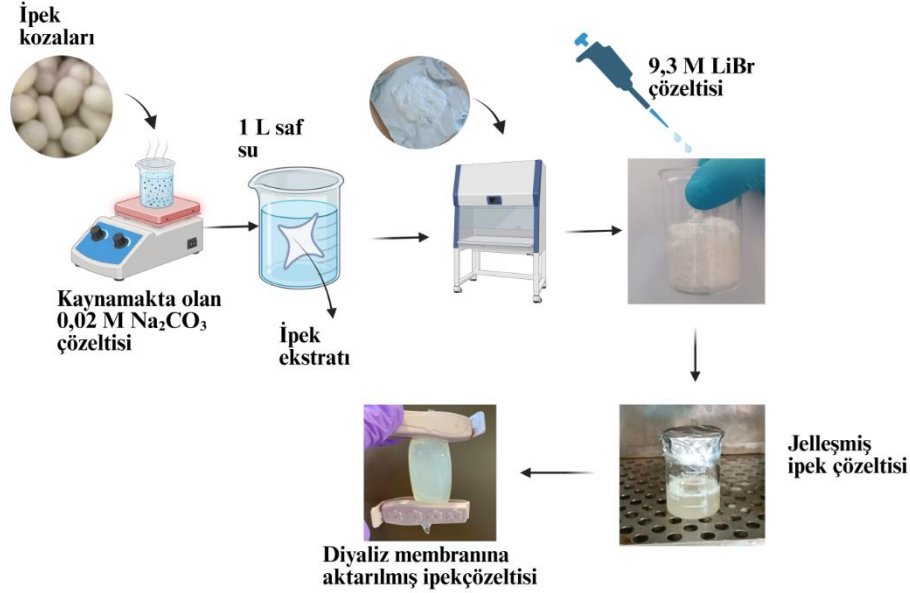
Çizelge 3.1. Deneysel çalışmalarda kullanılan malzemeler (Devam).

Alexa Fluor® 488			
Phalloidin Konjuge F- Aktin Antikoru	Cell Signaling	CST 8878S	A.B.D.
DAPI	Invitrogen	D-1306	A.B.D.
Kalsein AM	Sigma-Aldrich	56496	Almanya
PE Fare Anti-İnsan CD73	BD Bioscience	550257	A.B. D
PE Fare Anti-İnsan CD90	BD Bioscience	555596	A.B. D
CD45 FITC	BD Bioscience	345808	A.B. D
APC Anti-İnsan CD105	Biologend	323208	A.B. D
APC Anti-İnsan CD34	Biologend	343510	A.B. D
PE Anti-İnsan human CD34	Biologend	33606	A.B. D
FITC Anti-İnsan CD105	Biologend	323203	A.B. D
FITC Fare Anti-İnsan CD73	BD Bioscience	561254	A.B. D
APC Fare Anti-İnsan CD45	BD Bioscience	555485	A.B. D

3.2 İpek Fibroin Mikrotaşıyıcıların Üretimi ve Karakterizasyonu

3.2.1 İpek Fibroin (SF) Çözeltisinin Hazırlanması

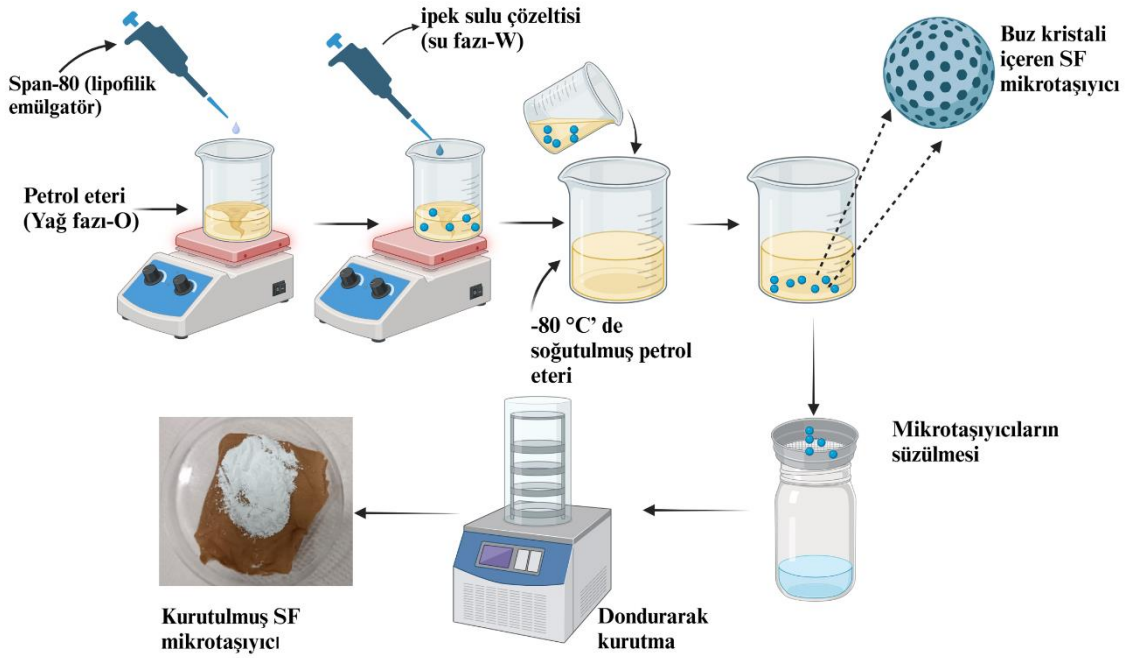
Tez çalışmalarında kullanılan ipek fibroin çözeltisinin eldesinde Rockwood ve ark. tarafından geliştirilen protokol izlenmiştir [67]. Özetle, *Bombyx mori* kozalarının içindeki ipek böceği çıkarıldıktan sonra kozanın temiz kısımları küçük parçalar halinde 5 g olacak şekilde kesilmiştir. Daha sonra bu parçalar kaynamakta olan 0,02 M Na_2CO_3 çözeltisine eklenerek 30 dakika süre ile kaynatılmıştır. Bu kaynama ile birlikte ipeğin yapısındaki serisin uzaklaştırılmış ve kozalar dağılmıştır. Süre sonunda kozalar 1 L ultra saf su içerisinde 20 dakikalık bekleme periyotları ile birlikte 3 kez yıkanmıştır. Elde edilen fibroin ekstraktı kuru ağırlık tartımı için bir gece çeker ocak içerisinde kurutulmuştur. Kuru ağırlık tartıldıktan sonra ekstrakt, ağırlığının 4 katı hacminde 9,3 M LiBr çözeltisi içerisinde 60°C 'de 4 saat boyunca jelleşmeye bırakılmıştır. Jelleşme tamamlandıktan sonra ipek çözeltisi diyaliz membranına aktarılmış ve 48 saat boyunca ultra saf suda diyalize tabi tutulmuştur (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. İpek çözeltisinin üretim şeması (Biorender.com ile çizilmiştir).

3.2.2 İpek Fibroin Mikrotaşıyıcıların Üretimi

İpek fibroin mikrotaşıyıcıların üretiminde laboratuvarımızda daha önceden yapılan bir tez çalışmasında optimize edilmiş olan emülsiyon faz ayrımı ile dondurarak kurutma yöntemi kullanılmıştır [57]. Bu yöntemde, 0,175 mL Span-80 (lipofilik emülgatör), 10 mL petrol eteri (yağ fazı-O) içerisinde manyetik karıştırma ile 20 dk boyunca 850 rpm’de karıştırılmıştır. Ağırlıkça %2,5, 3,5, 4,5 ve 5,5 (w/v) ipek sulu çözeltisi (su fazı-W) karıştırma devam ederken damla damla yağ fazına eklenmiştir. Bir gece önceden -80 °C’ de soğutulmuş 50 mL petrol eteri içerisine aktarılan bu karışım 1 gece -80 °C’ de bekletilmiştir. Sonrasında oluşmuş olan ipek fibroin mikrotaşıyıcılar süzülerek petrol eterinden uzaklaştırılmış ve liyofilizatörde (Christ, Germany) 1 gece kurutulmuştur (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. İpek fibroin mikrotaşıyıcıların üretim şeması (Biorender.com ile çizilmiştir).

3.2.3 İpek Fibroin Mikrotaşıyıcıların Stabilizasyonu

Mikrotaşıyıcıların stabilizasyonu için daha önceden laboratuvarımızda gerçekleştirilen protokol uygulanmıştır [55]. Liyofilizatörden alınan mikrotaşıyıcılar küçük parçalar şeklinde Falcon tüpe alındıktan sonra %90’lık (v/v) metanol çözeltisinde +4 °C’de 1 saat

bekletilmiş ve 3 kez PBS (pH:7.4) ile yıkanmıştır. Yıkama sonunda stabilizasyonu tamamlanan mikrotaşyıcılar liyofilizatöre alınarak 1 gece kurutulmuştur.

3.2.4 İpek Fibroin Mikrotaşyıcıların Karakterizasyonu

İpek fibroin mikrotaşyıcıların morfolojik özelliklerini incelemek için invert mikroskop (Olympus IX73, A.B.D.) ve taramalı elektron mikroskobu (SEM, GAIA3, Tescan, Czech Republic) kullanılmıştır. SEM analizi öncesi mikrotaşyıcılar elektriksel iletkenliği sağlamak amacıyla altın-paladyum karışımıyla kaplanmıştır. İntert mikroskopta elde edilen görüntüler kullanılarak Image J programında mikrotaşyıcı çapı ve pürüz boyutu ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Mikrotaşyıcı çapının ölçümü için 100 mikrotaşyıcı, pürüz boyutu için 20 mikrotaşyıcı değerlendirilmiştir.

3.3 Hücre Kültürü Çalışmaları

Tez çalışmasının bu kısmında SF mikrotaşyıcılar üzerinde çoğaltılan göbek kordonu mezenkimal kök hücrelere (GKMKH) ait statik ve dinamik hücre kültürü çalışmalarına yer verilmiştir.

3.3.1 GKMKH Karakterizasyonu

Tez çalışmasında kullanılan 3. pasajdaki göbek kordonu mezenkimal kök hücreleri (Doku Biyoteknoloji A.Ş.) ; %10 (v/v) FBS, %1 (v/v) antibiyotik karışımı (100 birim/mL penisilin–100 µg/mL streptomisin) ve %2 (v/v) L-glutamin içeren Dulbecco's Modified Eagle's Medium/F12 (DMEMF/12) besiyerinde %5 (v/v) CO₂ - %95 (v/v) hava karışımı inkübatör kullanılarak (Panasonic, Japonya) 37°C'de kültüre edilmiştir. İstenilen yoğunluğa ulaşan hücreler tripsinizasyonla yüzeyden kaldırılıp santrifüjlenmiş ve ekim öncesi hücre kültür ortamında tekrar süspanse edilmiştir. Ekim yoğunluğu 4x10³ hücre/cm² olarak belirlenmiş ve 7 gün boyunca devam ettirilen kültürde hücrelerin besiyeri her 3 günde bir tazelenmiştir. GKMKH'ne ait karakterizasyon çalışmaları daha önce laboratuvarımızda gerçekleştirildiği için tez çalışması kapsamında tekrarlanmamış olup, hücreler için canlı/ölü boyama ve hücre morfolojisinin takibi için ışık mikroskobu ile görüntüleme ve F-aktin/DAPI boyama analizleri gerçekleştirilmiştir [68].

3.3.1.1 Canlı/ölü Boyama

Canlı/ölü boyama analizi için Kalsein AM ve Etidyum Homodimer-1 (EthD-1) boyları kullanılmıştır. Hücreler, Ca^{+2} ve Mg^{+2} içeren DPBS (DPBS+) ile iki kez yıkandıktan sonra 1 μ M Kalsein AM ve 1 μ M EthD-1 boyları ile DPBS+ içerisinde karanlıkta 30 dk inkübe edilmiştir. Süre sonunda hücreler, DPBS+ ile iki kez daha yıkandıktan sonra Olympus IX73 floresan mikroskobu ile görüntülenmiştir.

3.3.1.2 F aktin/DAPI Boyama

İmmünofloresan görüntülemeler için F-aktin/DAPI boyama analizi gerçekleştirilmiştir. Yirmi dört gözlü kuyucukta bulunan hücreler, besiyeri uzaklaştırıldıktan sonra PBS ile iki kere yıkanmıştır. Daha sonra hücreler, kuyucuğu kaplayacak miktarda (350 μ L) %4 paraformaldehit (PFA) eklenerek 10 dakika $+4^{\circ}C$ 'de karanlıkta fikse edilmiştir. Fiksasyon sonrası PFA uzaklaştırılmış ve iki kere 1x PBS ile yıkama yapılmıştır. Ardından hücre zarı geçirgenliğini artırmak için kuyucuklara 300 μ L %0,1 (v/v) Triton-X-100 içeren PBS eklenerek 10 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası Triton-X-100 çözeltisi uzaklaştırılmış ve hücreler %1 (w/v) BSA içeren PBS (PBS/A) ile 3 kez yıkanmıştır. İçerisinde 1:100 Alexa Fluor 488 Phalloidin (v/v) / 1:1000 DAPI (v/v) boya karışımı bulunan çözelti karanlık bir ortamda kuyucuklara eklenmiş ve 30 dk inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası hücreler, PBS/A çözeltisi ile 3 kez yıkanarak görüntülenmeye hazır hale getirilmiştir. Örnekler, floresan mikroskop ile görüntülenmiştir.

3.3.2 İpek Fibroin Mikrotarıyıcıların Sterilizasyonu ve Şartlandırılması

SF mikrotarıyıcılar şartlama öncesi sterilizasyon için kuyucuk başına 1 mg olacak şekilde tartıldıktan sonra 50 mL'lik Falcon tüpe alınmış ve 1 saat boyunca %70 (v/v) etanolde çalkalayıcı üzerinde bekletilmiştir. Etanol uzaklaştırıldıktan sonra 3 kere steril DPBS çözeltisi ile yıkanan mikrotarıyıcılar 45 dakika boyunca UV altında bekletilmiştir. Sterilizasyon sonrası mikrotarıyıcılar %20 (v/v) serum içeren DMEM/F12 besiyerinde bir gece bekletilerek şartlanmıştır. Şartlamada serum proteinlerinin mikrotarıyıcı yüzeyine adsorplanması ile hücre tutunmasının artırılması amaçlanmıştır.

3.3.3 Statik Hücre Kültürü Çalışmaları

Göbek kordonu mezenkimal kök hücreleri P3'te açılarak bir pasaj iletildikten sonra (P4) mikrotarıyıcı kültüründe kullanıma hazır hale getirilmiştir. Kuyucuk başına (1,9 cm²) 1,6x10⁵ hücre kullanılmıştır. Hücre-mikrotarıyıcı etkileşimini artırmak için hücreler, 50 mL Falkon içerisindeki şartlanmış mikrotarıyıcıların üzerine eklenmiş ve çalkalamalı karıştırıcıda 6 saat boyunca 37°C'de 75 rpm'de çalkalanarak inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası besiyerinden 1 mL alınarak 24 gözlü kuyucuklara 1 mg/mL mikrotarıyıcı olacak şekilde ekim yapılmıştır.

3.3.3.1 Optik Görüntüleme

Mikrotarıyıcılar hücre kültürü çalışmasının 3. ve 7. gününde ışık mikroskobu ile görüntülenmiştir.

3.3.3.2 MTT Analizi

Hücrelerin mikrotarıyıcılar üzerindeki canlılıklarının kantitatif tayini için kültürün 3. ve 7. günlerinde 3-[4,5-dimetiltiazol-2]-difeniltetrazolyum bromür (MTT) analizi yapılmıştır. MTT hücrelerin mitokondriyal redüktör enzimleri ile tepkimeye girdiğinde mor formazan kristallerine dönüşmektedir. Oluşan formazan kristalleri çözdürülerek absorbans değeri ile canlılık belirlenmektedir [69]. MTT analizi için hücrelerin üzerindeki besiyeri uzaklaştırıldıktan sonra her bir göze 600 µL serumsuz besi ortamı ve 60 µL MTT çözeltisi (2,5 mg/mL PBS) eklenerek 37°C'deki CO₂ etüvünde 3 saat boyunca inkübe edilmiştir. Üç saat sonunda ortam tekrar uzaklaştırılmış ve oluşan formazan kristallerini çözmek için 400 µL DMSO ile pipetaj yapılmıştır. Daha iyi bir çözünme sağlamak için mikrotarıyıcılar 2 mL'lik Eppendorf tüplerine alınmış ve 2 dk boyunca vortekslenmiştir. Kristallerin çözünmesiyle ortaya çıkan mor renkli çözeltiden 200 µL alınarak 96 kuyucuklu kültür kaplarına aktarılmış ve 690 nm referans olmak üzere, 570 nm'de mikropilaka okuyucu (Asys UVM 340, Avusturya) ile spektrofotometrik olarak çözeltilerin optik yoğunlukları belirlenmiştir.

3.3.3.3 Canlı/Ölü Boyama

Mikrotaşıyıcı üzerindeki canlı ve ölü hücrelerin görüntülenmesi için kültürün 3. ve 7. gününde Bölüm 3.3.3.1’de detaylandırılan şekilde canlı/ölü boyaması gerçekleştirilmiştir.

3.3.3.4 F-aktin/DAPI Boyama

Mikrotaşıyıcı üzerindeki hücrelerin morfolojik tayini için Bölüm 3.3.3.2’de detaylandırılan şekilde F-aktin/DAPI boyaması gerçekleştirilmiştir.

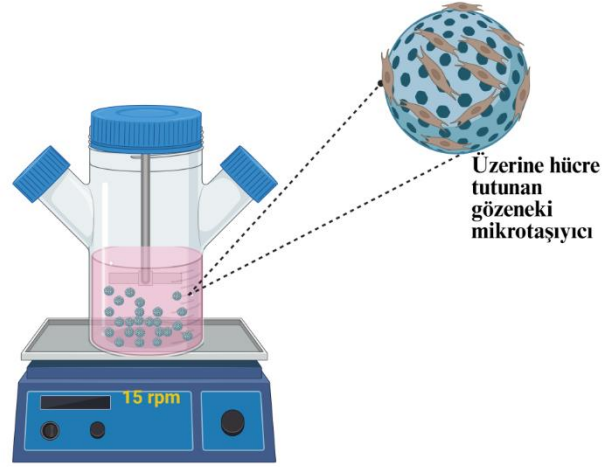
3.3.3.5 SEM Analizi

Çalışmanın 3. ve 7. gününde hücrelerin mikrotaşıyıcıya tutunma ve yayılma profilleri taramalı elektron mikroskobu analizi ile incelenmiştir. SEM analizi öncesi hücrelerin besiyeri uzaklaştırılmış ve PBS ile 3 kere yıkama yapılmıştır. Yıkama sonrası 350 µL %2,5 glutaraldehit (GA) eklenerek 20 dk karanlıkta ve +4°C’de inkübasyona bırakılarak fikse edilmiştir. Fiksasyon sonrası 3 kere PBS ile yıkanan örnekler analize kadar +4°C’de PBS içerisinde bekletilmiştir. SEM analizinden 24 saat önce fikse edilen örnekler sırasıyla %30 (v/v), %40 (v/v), %50 (v/v), %60 (v/v), %70 (v/v), %80 (v/v), %90 (v/v) ve %100 (v/v) etanol serilerinden geçirilerek susuzlaştırma işlemi gerçekleştirilmiştir. Son aşamada hücreli mikrotaşıyıcılar hekzametildisilazan (HMDS) ile 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Mikrotaşıyıcıların stampalara yerleştirilebilmesi için 70 µm hücre süzgeci kullanılmıştır. Mikrotaşıyıcılar altın-paladyum karışımı ile kaplanarak SEM analizi için hazır hale getirilmiştir. SEM analizi için GAIA3 (Tescan, Czech Republic) cihazı kullanılmıştır.

3.3.4 Dinamik Hücre Kültürü Çalışmaları

Dinamik hücre kültürü çalışmaları karıştırmalı kap biyoreaktör içerisinde gerçekleştirilmiştir. Dinamik kültür için 30 mg olarak tartılan mikrotaşıyıcılar, karıştırmalı kap biyoreaktör içerisinde Bölüm 3.3.2’de detaylandırıldığı gibi şartlandıktan sonra şartlama besiyeri uzaklaştırılmıştır. Bölüm 3.3.1’de bileşimi verilmiş taze besiyeri hücreler ile karıştırmalı kap biyoreaktöre eklenmiştir. Ekim sonrası 30 mL hacimde 4 saat boyunca 2 dakika karıştırma, 20 dakika durdurma periyodu ile hücre tutunmasının artırılması amaçlanmıştır. Uygulama sonrası biyoreaktörde hacim 100

mL'ye tamamlanarak 15 rpm karıştırma hızında karıştırılmıştır. Şekil 3.3'te dinamik hücre kültürü çalışmalarında kullanılan karıştırılmalı kap biyoreaktör şemasına yer verilmiştir.



Şekil 3.3. Dinamik hücre kültürü çalışmalarında kullanılan karıştırılmalı kap biyoreaktör şeması (Biorender.com ile çizilmiştir).

Karıştırılmalı kap biyoreaktöründe 7 gün kültüre edilen hücrelerle Bölüm 3.3.3'te detaylandırılan MTT ve SEM analizleri ile Bölüm 3.3.1'de açıklanan canlı/ölü boyama ve F-aktin/DAPI boyama analizleri gerçekleştirilmiştir.

3.3.5 Hücrelerin Mikrotaşyıcı Yüzeyinden Kaldırılması

Mikrotaşyıcılara tutunmuş olan hücrelerin yüzeyden kaldırılması için %0,25 tripsin/0,53 mM EDTA solüsyonu ve TripLe olmak üzere iki farklı enzim çözeltisi denenmiştir. Hücrelerin üzerindeki besiyeri uzaklaştırıldıktan sonra gruplardan birine 1 mL %0,25 tripsin/0.53 mM EDTA solüsyonu, diğerine 1 mL TripLe eklenerek 10 dakika 37°C'de inkübasyon gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon sonrası pipetajla birlikte hücrelerin yüzeyden kalkması desteklenmiştir. Yüzeyden ayrılan hücreler 70 µm'lik filtrelerden geçirilmiştir. Sayım için 1:1 oranında PBS içerisinde çözülmüş %0,4 (w/v) tripan mavisi çözeltisi ile seyreltilen hücreler Neubauer Lamı kullanılarak sayılmıştır.

3.3.6 Akış Sitometrisi Analizi

Mikrotaşıyıcı ile kültürasyonu yapılan GKMKH'nin köklülük özelliklerinin korunup korunmadığının belirlenmesi için dinamik kültür çalışmaları sonrası %2,5 SF ve %3,5 SF mikrotaşıyıcılar yüzeyinden kaldırılıp tekrar ekilen hücreler ile akış sitometrisi analizi gerçekleştirilmiştir.

Analiz için %2,5 SF mikrotaşıyıcılardan kaldırılan hücrelerde FITC anti-insan CD105, FITC anti-insan CD73, PE fare anti-insan CD90, APC fare anti-insan CD45 ve PE anti-insan CD34 antikorları kullanılmıştır. Yüzde 3,5 SF mikrotaşıyıcılar ile gerçekleştirilen kültürün akış sitometrisi analizi için PE fare anti-insan CD73, PE fare anti-insan CD90, APC anti-insan CD105, APC anti-insan CD34, CD45 FITC antikorları kullanılmıştır. Yüzeyden kaldırılan hücreler akış sitometrisi analizi için her bir tüpte 3×10^5 hücre olacak şekilde bölünmüştür. Hücreler, akış tamponu (%5 PBS+%0,1 sodyum azid) ile yıkanmıştır. Yıkama sonrası 2000 rpm'de santrifüjlenerek süpernatant uzaklaştırılmıştır. Daha sonra her bir antikordan 5 µL eklenmiş ve akış tamponu ile hacim 100 µL'ye tamamlanmıştır. Kontrol grubu hücreler 100 µL PBS ile tekrar süspansiyon edilmiştir. Karanlıkta 30 dk inkübe edilen hücreler akış sitometrisi cihazından (BD FACS ARIA 1, A.B.D.) geçirilerek analiz tamamlanmıştır.

3.4 İstatistiksel Analiz

DeneySEL çalışmalar kapsamında elde edilen veriler, GraphPad Prism v9.3.0 (GraphPad Software, A.B.D.) programı kullanılarak istatistiksel açıdan değerlendirilmiştir. Her deney grubu için 3 paralel örnek ile çalışılmış ve ortalama \pm standart sapma değerleri ile sunulmuştur. Gruplar arasındaki farklılıkların tespit edilebilmesi için iki yönlü varyans analizi (Two-way ANOVA) yöntemi kullanılmış ve *p* değerinin 0,05'ten küçük olduğu durumlar anlamlı kabul edilmiştir.

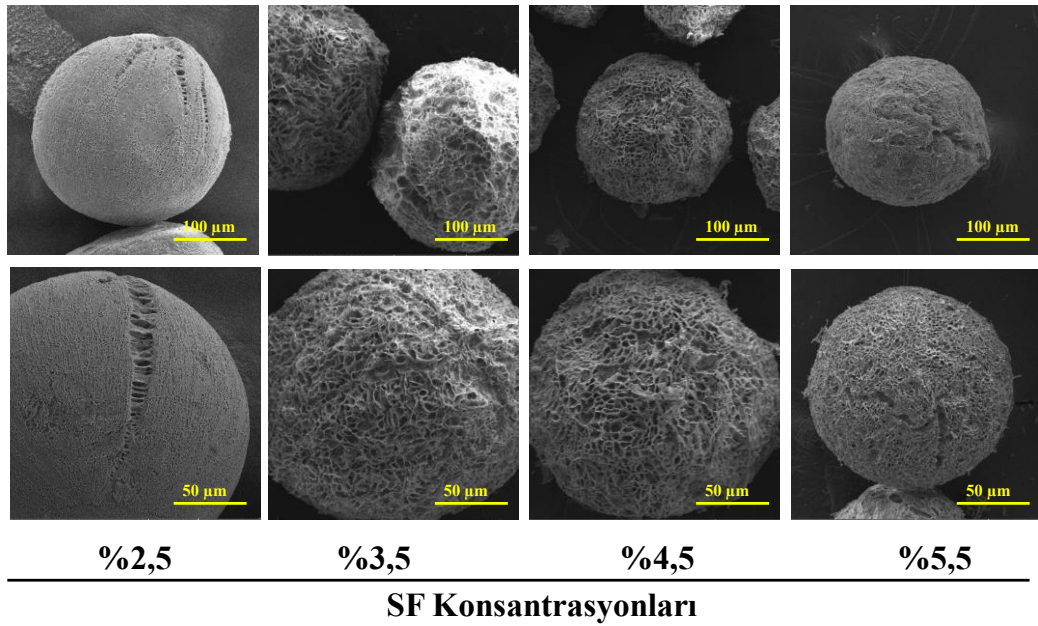
4 SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Sunulan tez çalışmasına ait tüm deneysel çalışmalara ait sonuçlara ve literatürle karşılaştırmalı olarak tartışmalara bu başlık altında yer verilmiştir.

4.1 İpek Fibroin Mikrotaşıyıcıların Üretimi ve Karakterizasyonu

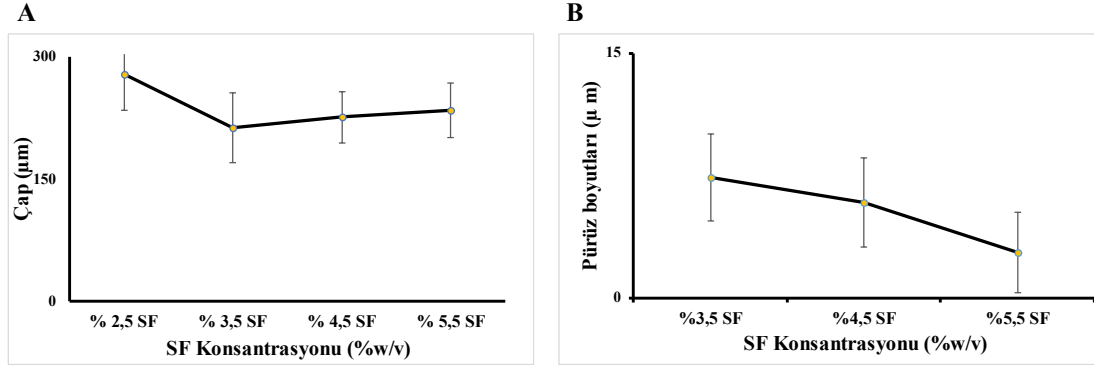
İpek fibroin mikrotasıyıcıların üretiminde kullanılan ipek konsantrasyonu, yüzey pürüzlülüğünü ve sayısını etkileyen bir etmendir [55]. Bu nedenle tez çalışmasında 4 farklı (%2,5 (w/v), %3,5 (w/v), %4,5 (w/v) ve %5,5 (w/v)) ipek konsantrasyonu (SF) denenmiştir. İlk olarak, sıcaklık, karıştırma hızı ve süresi sabit tutularak %2,5 (w/v) SF mikrotasıyıcılar üretilmiştir. Ancak alınan SEM görüntüleri incelendiğinde %2,5 SF konsantrasyona sahip mikrotasıyıcılarda yüzeyin oldukça pürüzsüz bir yapı sergilediği görülmüştür. Bunun üzerine SF konsantrasyonu değiştirilerek bu değişimin yüzey pürüzlülüğüne olan etkisi incelenmiştir. Şekil 4.1’de bu kapsamda çeşitli SF konsantrasyonunda üretilen mikrotasıyıcılara ait farklı büyütmedeki SEM görüntülerine yer verilmiştir.

Şekil 4.1. Çeşitli SF konsantrasyonlarında üretilen mikrotasıyıcılara ait farklı büyütmelerdeki SEM görüntüleri



Şekil 4.1’de sunulan mikrotasıyıcılara ait SEM görüntüleri incelendiğinde pürüzlülüğün, SF konsantrasyonu %3,5 (w/v) ve %4,5 (w/v)’a çıkarıldığında daha fazla olduğu

görülmektedir. SF konsantrasyonu ve pürüzlülük arasındaki bu doğru orantı %5,5 (w/v) SF mikrotarıyıcılarda da gözlenmiştir. Yüzde 2,5 (w/v) SF mikrotarıyıcılara kıyasla %3,5, %4,5 ve %5,5 SF mikrotarıyıcılarda homojen pürüzlülüğe sahip bir yapı gözlenmiştir.



Üretilen mikrotarıyıcıların çap ve ortalama pürüz boyutları Image J yazılımı ile ölçülmüş ve SF konsantrasyonu ile bu parametreler arasındaki ilişki Şekil 4.2’de verilmiştir.

Artan SF konsantrasyonlarında üretilen mikrotarıyıcılara ait ortalama çap değerleri yaklaşık olarak sırasıyla 277 µm, 213 µm, 226 µm ve 234 µm olarak ölçülmüştür. SF konsantrasyonu %3,5 (w/v) değerine çıkarıldığında mikrotarıyıcı çap değerinde yaklaşık %23 düşüş gözlenmiştir. Konsantrasyon %4,5 ve %5,5 (w/v) değerlerine yükseltildiğinde ise %2,5 (w/v) SF mikrotarıyıcılara kıyasla bu düşüş sırasıyla yaklaşık olarak %18 ve %15 olarak hesaplanmıştır. SF konsantrasyonu ile ortalama mikrotarıyıcı boyutları arasında doğrusal bir ilişki saptanmamıştır.

Şekil 4.2. Farklı konsantrasyonlarda üretilen mikrotarıyıcıların A) Çap değerleri, B) pürüz boyutları (%2,5 SF mikrotarıyıcılarda pürüzlü yüzey gözlenmediği için pürüz boyutlarını içeren grafikte yer almamıştır).

Mikrotarıyıcıların ortalama pürüz boyutları %3,5 (w/v), %4,5 (w/v) ve %5,5 (w/v) SF mikrotarıyıcılarda sırasıyla 7,39 µm, 5,82 µm ve 2,78 µm olarak ölçülmüştür.

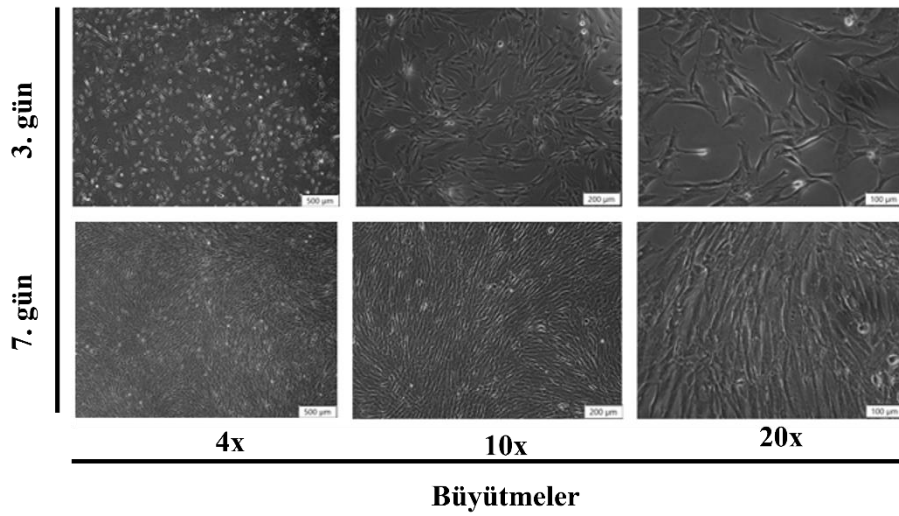
4.2 Hücre Kültürü Çalışmaları

Tez çalışmasının bu kısmında mikrotarıyıcılarla etkileştirilecek göbek kordonu mezenkimal kök hücrelerin (GKMH) morfolojik özelliklerinin incelendiği karakterizasyon çalışmalarına, pürüz boyutlarının hücre tutunma davranışına olan etkisini incelemek için 4 farklı SF konsantrasyonunda hazırlanan mikrotarıyıcılar ile

gerçekleştirilen statik hücre kültürü çalışmalarına ve statik hücre kültürü çalışması sonuçlarına göre belirlenen dinamik hücre kültürü çalışmaları ve ileri analiz sonuçlarına yer verilmiştir.

4.2.1 Göbek Kordonu Mezenkimal Kök Hücrelerin Karakterizasyonu

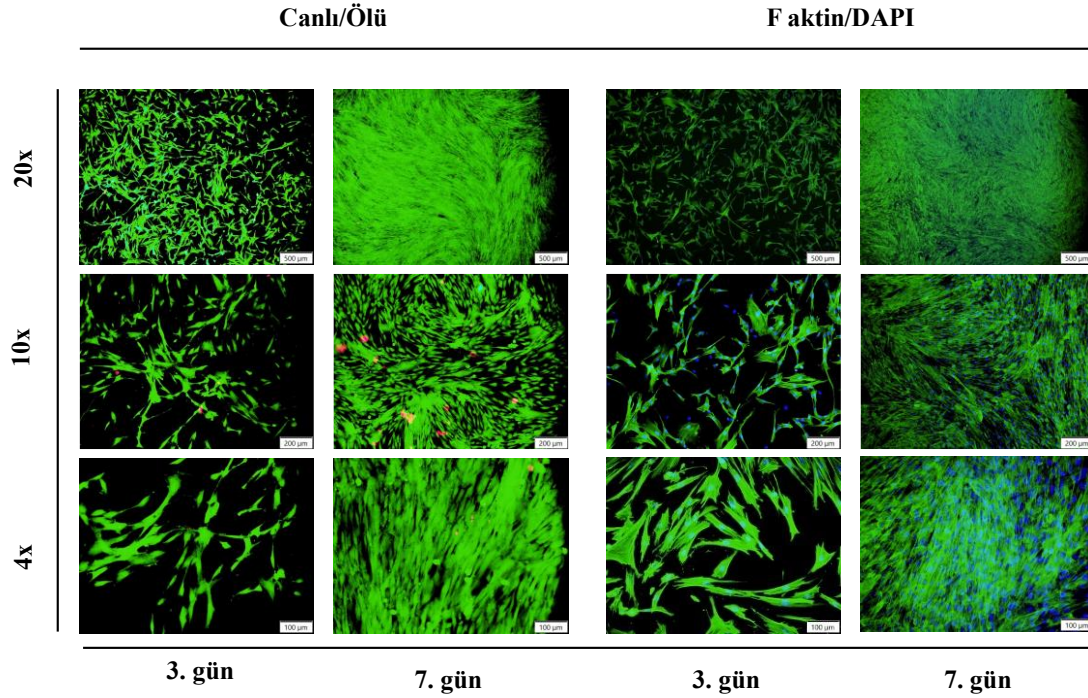
Göbek kordonu mezenkimal kök hücrelerinin morfolojilerini incelemek için ışık mikroskobu gözlemleri, canlı/ölü ve F aktin/DAPI boyamaları gerçekleştirilmiştir. Farklı büyütmelerde çekilen ışık mikroskobu görüntülerine Şekil 4.3'te yer verilmiştir.



Şekil 4.3. GKMKH'ne ait 3. ve 7. günde farklı büyütmelerdeki ışık mikroskobu görüntüleri.

Şekil 4.3'teki ışık mikroskobu görüntüleri ile GKMKH'nin literatür ile uyumlu bir şekilde fibroblast benzeri uzun, iğsi bir morfolojide olduğu saptanmıştır. Hücrelerin canlılıklarının belirlenmesi ve morfolojilerinin incelenmesi için kültürün 3. ve 7.

günlerinde canlı/ölü ve F aktin/DAPI boyama gerçekleştirilmiş ve boyama sonuçları Şekil 4.4'te sunulmuştur.



Şekil 4.4. GKMKH'lerin 3. ve 7. gün canlı/ölü ve F-aktin/DAPI boyama görüntüleri (Canlı/ölü boyamalarında yeşil ve kırmızı renkler sırasıyla canlı ve ölü hücreleri göstermektedir. F-aktin/DAPI boyamalarında yeşil ve mavi sırasıyla hücre iskeletini ve çekirdeğini göstermektedir).

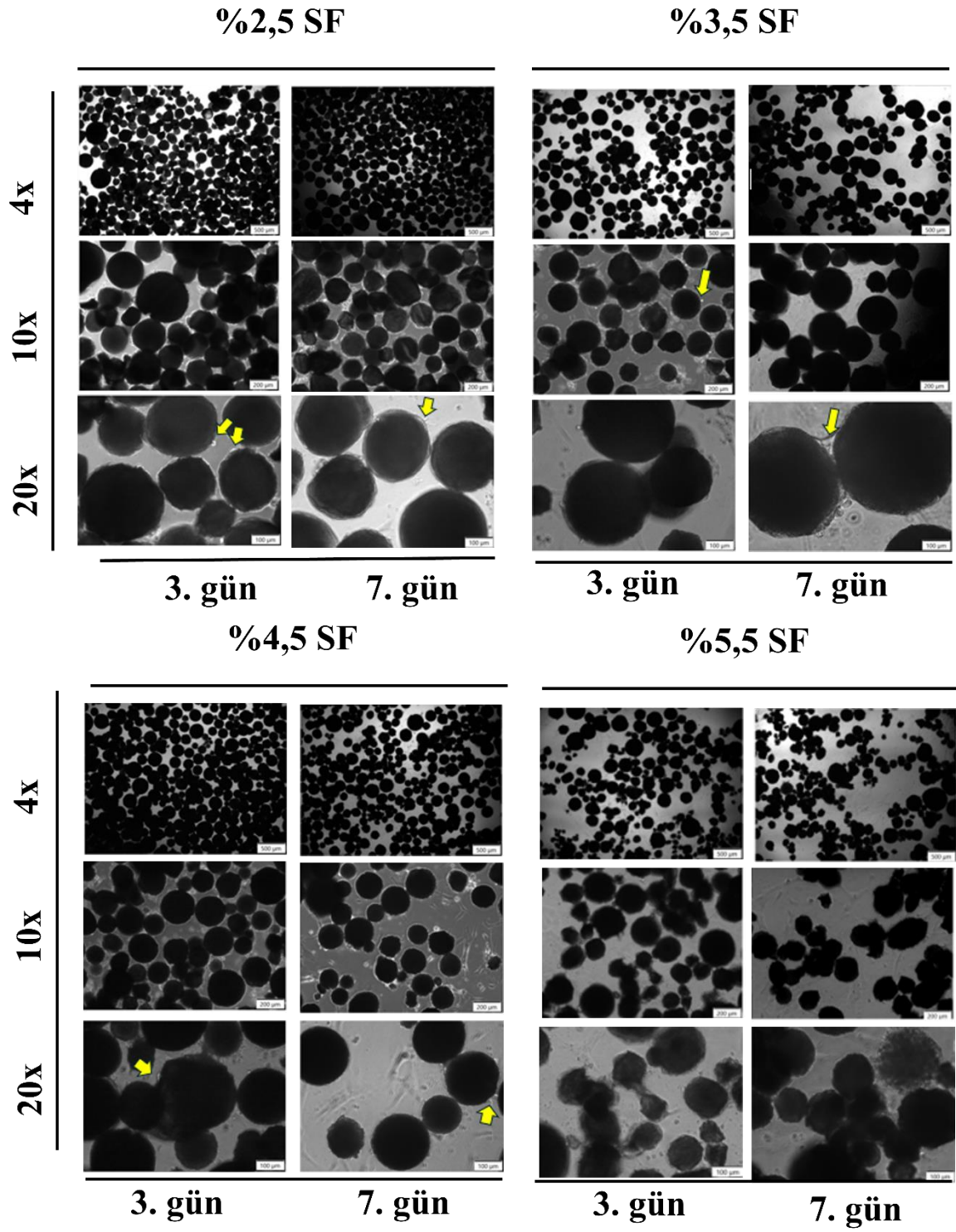
Şekil 4.4'te verilen canlı/ölü boyama görüntülerinde hücrelerin büyük çoğunluğunun canlı olduğu gözlenmiştir. Hücre iskeleti ve çekirdeğinin ikili boyamasının gerçekleştirildiği F-aktin/DAPI boyama analiz sonuçlarına göre hücrelerin sitoplazmik iskelet yapısının iyi organize olduğu ve aktin filamentlerinin sağlıklı hücre morfolojisinde olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca hücrelerin çekirdek bütünlüğünün korunduğu ve herhangi bir anormal çekirdek morfolojisinin oluşmadığı belirlenmiştir.

Hücrelerin ikilenme süreleri ve özgül üreme hızlarının tespit edilmesi için gerekli çalışmalar daha önce laboratuvarlarımızda gerçekleştirilen bir tez çalışmasında yürütüldüğü için analizler tekrarlanmamış ancak ilgili tez çalışmasında elde edilen GKMKH'ne ait hücre sayısı-zaman grafiği ve MTT- zaman grafiği Ek-1'de, kristal viyole boyama görüntüleri Ek-2'de sunulmuştur [68]. Yapılan çalışmada elde edilen veriler ışığında GK-MKH'lerin özgül üreme hızı $0,023 \text{ sa}^{-1}$, ikilenme süresi ise yaklaşık 32 sa olarak belirlenmiştir. Bu bulgular literatürde verilen değerler ile uyumludur [70,71].

Ek-1 ve Ek-2'deki analiz sonuçları göz önünde bulundurulduğunda bu tez çalışması kapsamında kullanılan GKMKH hücrelerinin literatüre sunulan hücrelerle benzer özelliklerde olduğu saptanmıştır.

4.2.2 Statik Hücre Kültürü Çalışmaları

Bölüm 3.3.2'de belirtilen yöntemlerle sterilizasyon ve şartlandırma işlemleri gerçekleştirilen mikrotarıyıcılarla Bölüm 3.3.3'te detaylandırılan yöntemle statik hücre kültürü koşullarında hücre ekimi gerçekleştirilmiştir. Ekim sonrası kültürün 3. ve 7. günlerinde ışık mikroskobunda alınan görüntülere Şekil 4.5'te yer verilmiştir.



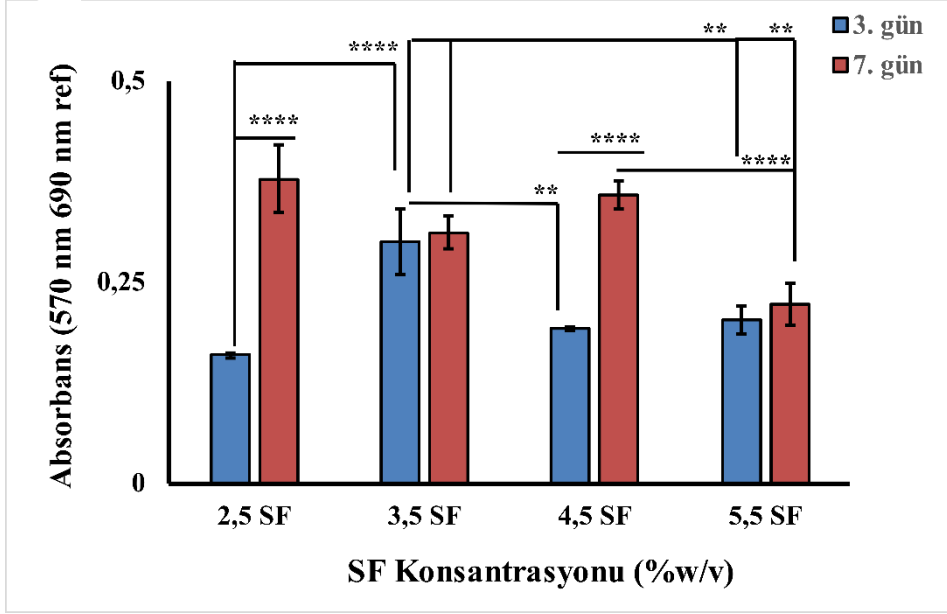
Şekil 4.5. Çeşitli konsantrasyonlardaki ipek mikrotarıyıcılar üzerinde çoğalan GKMKH'lerin 3. ve 7. gün ışık mikroskobu görüntüleri (Sarı oklar tutunmuş ve yayılmış hücreleri işaret etmektedir).

Şekil 4.5'te verilen ışık mikroskobu görüntüleri incelendiğinde mikrotarıyıcıların opak yapılarından dolayı 4x büyütmelede tutunan ve yayılan hücrelerin net bir şekilde gözlenemediği belirlenmiştir. Ancak 10x ve 20x büyütmede gerçekleştirilen görüntülemelerde tutunan hücreler gözlenebilmiştir. Sonuçlarda hücrelerin bütün mikrotarıyıcılara tutunmadığı ve tutunan hücrelerin mikrotarıyıcıları kaplamadığı söylenebilmektedir. Dinamik kültürde ortamın sürekli olarak karıştırılıyor olmasının hücre-mikrotarıyıcı etkileşimini artırarak tutunmayı artıracakđı öngörölmüştür.

Optik mikroskop görüntülemeleri GKMKH'lerin ipek mikrotarıyıcı yüzeyine yalnızca sınırlı düzeyde tutunduğunu göstermektedir. Bununla birlikte, mikrotarıyıcıların opak yapısı, ışık mikroskobu ile hücrelerin adezyon ve yayılımının belirlenmesini zorlaştırmaktadır. Ayrıca, statik kültür koşullarında 24 gözlü hücre kültürü kaplarında gerçekleştirilen deneylerde, hücrelerin büyük oranda kültür kabı yüzeyine tutunduğu tespit edilmiştir. GKMKH'lerin ipek mikrotarıyıcılarla etkileşimi değerlendirildiğinde, hücrelerin ipek fibroin yüzeylere tutunma ve yayılma yeteneklerinin bulunduğu gözlemlenmiştir.

4.2.3 MTT Analizi

Farklı SF konsantrasyonları ile elde edilen mikrotarıyıcıların yüzeyinde çoğalan hücrelerin canlılıklarının belirlendiği MTT analizi sonucu Şekil 4.6'da sunulmuştur. Başlangıç hücre yoğunluğu: $1,6 \times 10^5$ hücre/mL'dir. TCPS yüzeyinde çoğalan hücrelerin absorbansı 7. gün 1,78 olarak ölçölürken mikrotarıyıcı yüzeylerinde en yüksek değer %2,5 SF mikrotarıyıcılarda (0,378) görölmüştür.



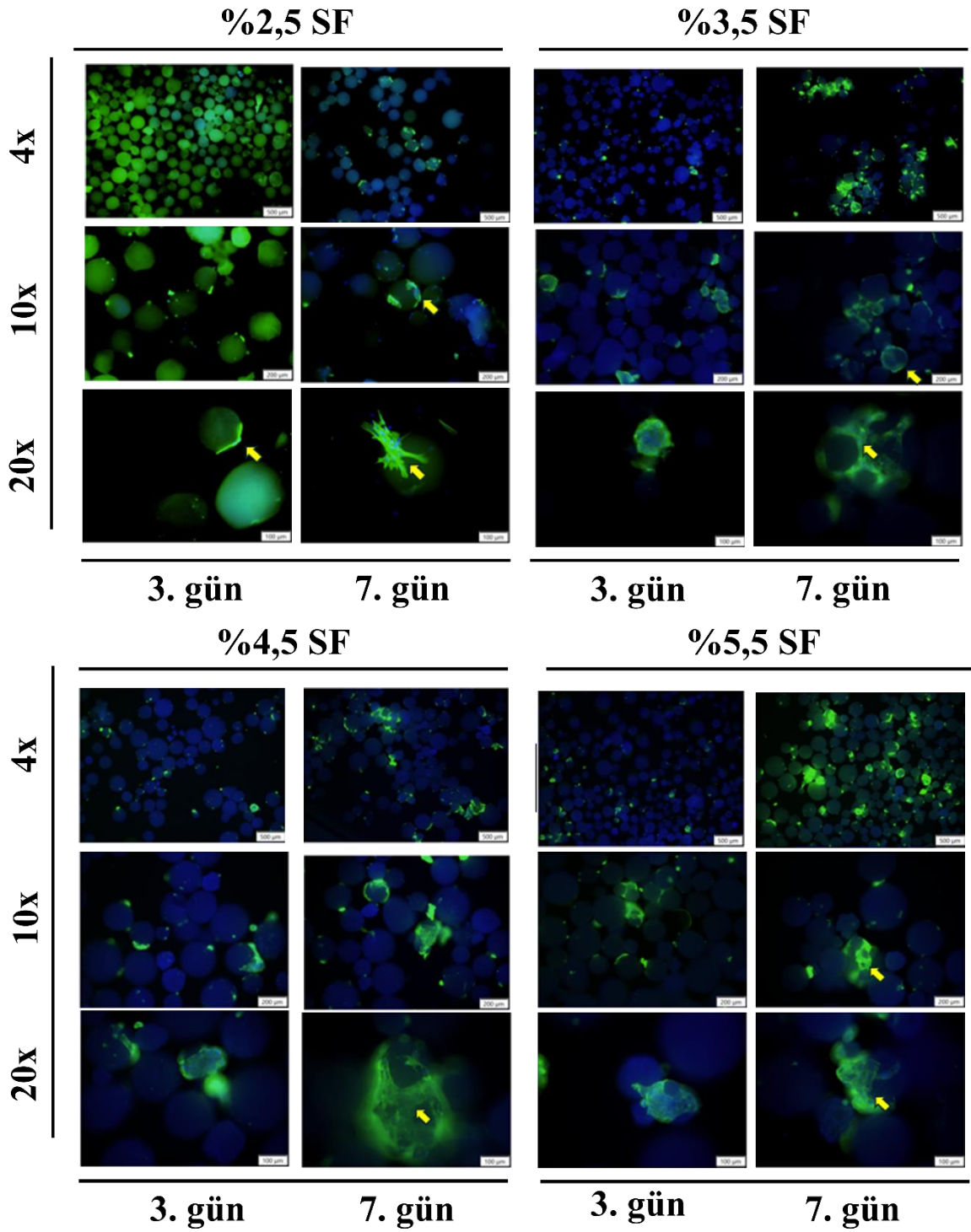
Şekil 4.6. İpek mikrotarıyıcılarla gerçekleştirilen 7 günlük statik hücre kültürüne ait MTT analizi sonuçları (İstatistiksel anlamlı farklılıklar $n=3$, $**p<0,01$ ve $****p<0,001$, farklı konsantrasyonlardaki mikrotarıyıcılar karşılaştırıldığında).

Şekil 4.6’da verilen MTT analizi sonuçlarına bakıldığında 3. günde %2,5 SF (w/v) mikrotarıyıcılarla karşılaştırıldığında $****p<0,001$ istatistiksel anlamlılığıyla en yüksek absorbans değerleri %3,5 SF (w/v) mikrotarıyıcılarda elde edilmiştir. Aynı gruplarda ilerleyen günlerde absorbansa bağlı canlılık artışında istatistiksel anlamlılık sadece %2,5 SF (w/v) ve %4,5 SF (w/v) gruplarında saptanmıştır ($****p<0,001$). Kültürün 7. gününde gruplar karşılaştırıldığında en yüksek canlılık değeri 3. güne kıyasla yaklaşık %136 artışla sadece %2,5 SF (w/v) mikrotarıyıcılarda tespit edilmiştir. Bu değeri %86’lık artışla %4,5 SF (w/v) grubu takip etmiş, %5,5 SF (w/v) grubunda %4,5 SF (w/v) grubuna kıyasla $****p<0,001$ istatistiksel anlamlılığıyla %38 azalma gözlenmiştir.

4.2.4 F aktin/DAPI Boyaması

Mikrotarıyıcılar üzerinde çoğalan hücrelerin, hücre iskeleti ve çekirdeklerindeki morfolojik değişimleri incelemek amacıyla F aktin/DAPI boyaması gerçekleştirilmiştir. Boyama sonuçlarına Şekil 4.13’te yer verilmiştir. Hücre iskeletinin görüntülenebilmesi için filamentöz aktin (F aktin) probu olan Alexa Fluor 488 Phalloidin kullanılmış ve hücre iskeletinde bulunan aktin filamentlerinin yeşil renkte floresan görüntülenmesi

sağlanmıştır. H¼cre çekirdeğindeki DNA ipliklerine bağlanarak mavi floresan g¼r¼nt¼leme DAPI ile gerçekleştirilmiştir.

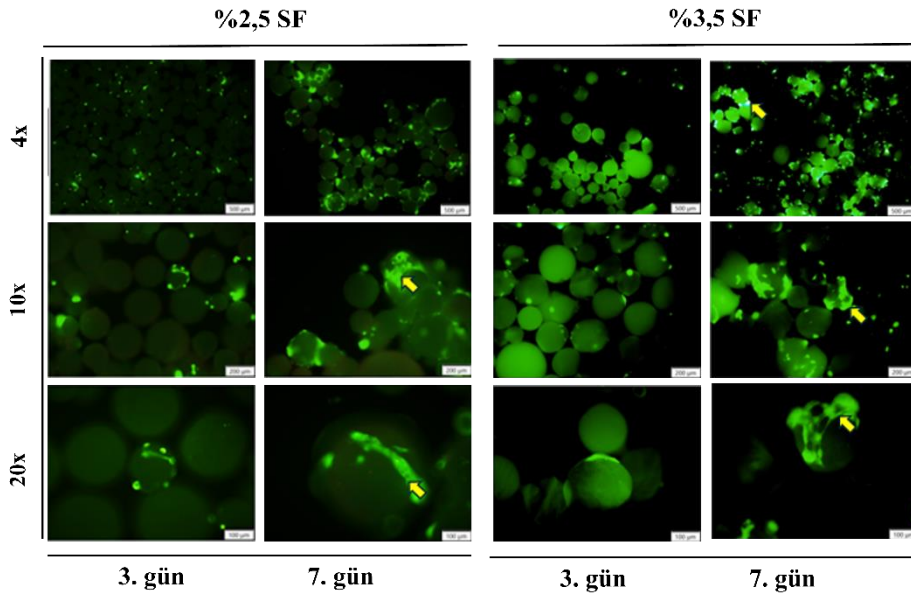


Şekil 4.7. Çeşitli konsantrasyonlardaki ipek mikrotarıyıcılar üzerinde çoğalan GKMKH'lerin 3. ve 7. gün F aktin/DAPI boyama görüntüleri (Sarı oklar tutunmuş ve yayılmış hücreleri işaret etmektedir. Yeşil ve mavi sırasıyla hücre iskeletini ve çekirdeğini göstermektedir).

Şekil 4.7’de verilen F-aktin/DAPI boyama sonuçları incelendiğinde mikrotaşyıcıların da boyayı alarak renklendiği görülmüştür. Ancak hücre iskeleti ve çekirdeği mikrotaşyıcıya oranla daha güçlü bir floresan yaymaktadır. Dolayısıyla daha parlak olan alanların hücre olduğu belirlenmiştir. Analiz sonrası farklı fotoğraflar üzerinden Image J yazılımı kullanılarak mikrotaşyıcı ve mikrotaşyıcıların üzerinde tutunan hücrelerin alanları ölçülmüştür. Yapılan ölçümler sonucu hücrelerin 3. günde artan konsantrasyondaki SF mikrotaşyıcılara sırasıyla yaklaşık %13, %50, %32 ve %30 tutunma davranışı gösterdiği bulunmuştur. Yapılan boyamalar sonucu hücrelerin, statik kültür koşullarında mikrotaşyıcılardan ziyade kültür kabı yüzeyine tutunma eğiliminde olduğu göz önüne alındığında, dinamik kültür koşullarında bu oranın artması beklenmektedir. Boyama görselleri MTT analiz sonuçlarıyla beraber değerlendirildiğinde tez çalışmasının bundan sonraki bölümlerinde %2,5 ve %3,5 (w/v) SF mikrotaşyıcılarla devam edilmesine karar verilmiştir.

4.2.5 Canlı/Ölü Hücrelerin Görüntülenmesi

İpek mikrotaşyıcı yüzeyindeki hücrelerin canlılık takibinin kontrolü için canlı/ölü hücre boyaması da gerçekleştirilmiştir. Bölüm 3.3.1’de detaylandırıldığı gibi gerçekleştirilen bu boyamada kullanılan EthD-1, DNA’ya bağlanmadan önce zayıf floresan özellik gösteren bir molekül olup, ölü hücrelerin zarar görmüş çekirdek zarından geçerek çift sarmallı DNA yapılarına bağlanmakta ve kırmızı floresan altında ışımaya vermektedir. Kalsein AM ise ester formunda, floresan olmayan bir boyadır. Hücre içine girdiğinde esterase enzimi tarafından hidrolize uğramakta ve yeşil floresan olan kalsein ürününü oluşturmaktadır. Böylece canlı hücreler yeşil floresan ile gözlemlenebilmektedir. Tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen canlı/ölü boyama sonuçları Şekil 4.8’de sunulmuştur.

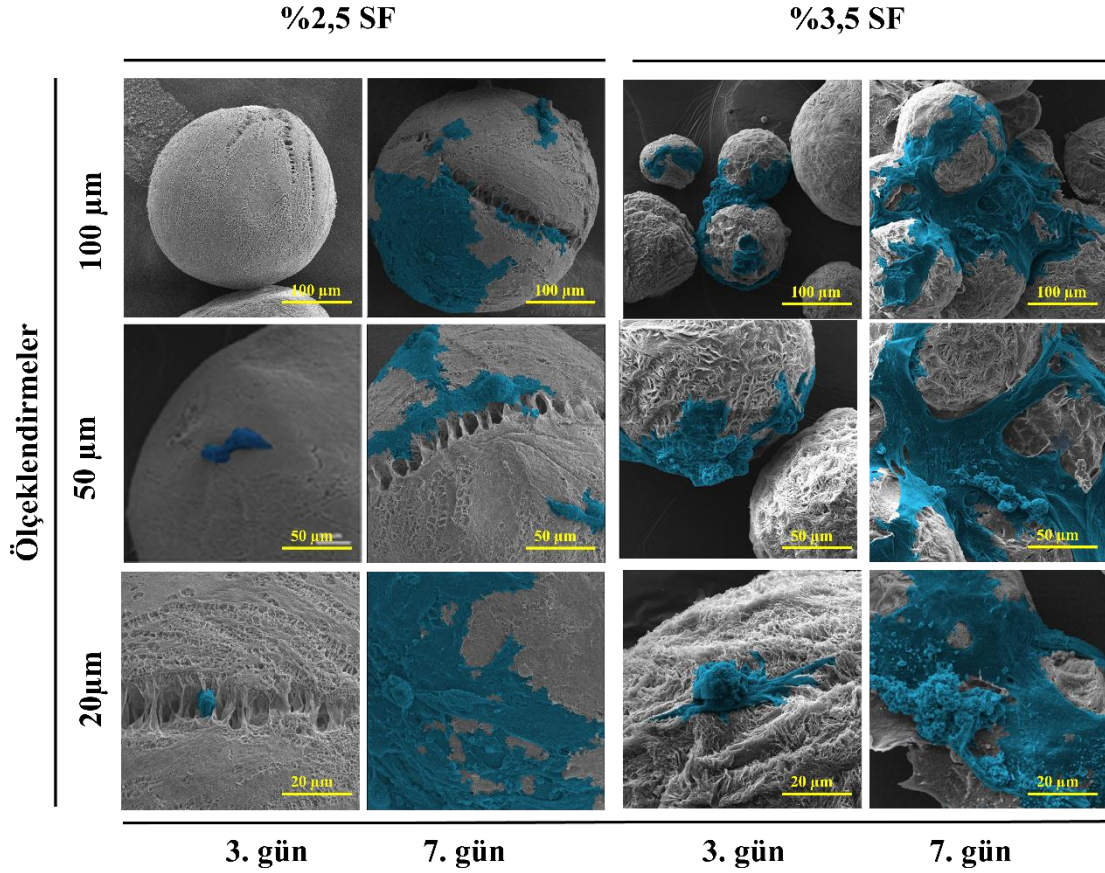


Şekil 4.8. %2,5 ve %3,5 SF (w/v) konsantrasyonuna sahip ipek mikrot taşıyıcılar üzerinde çoğalan GKMKH'lerin 3. ve 7. gün canlı/ölu boyama görüntüleri (Yeşil ve kırmızı renkler sırasıyla canlı ve ölu hücreleri göstermektedir. Sarı oklar mikrot taşıyıcılar üzerinde yayılma davranışı gösteren hücreleri işaret etmektedir).

Şekil 4.8'de verilen canlı/ölu boyama analizleri, GKMKH'lerin ipek mikrot taşıyıcı yüzeyine başarıyla tutunup yayılabildiğini ve büyük oranda canlılıklarını koruduklarını göstermiştir. Daha pürüzlü bir yüzey morfolojisine sahip %3,5 (w/v) SF mikrot taşıyıcıların hücrelerin tutunması için daha uygun bir yüzey topoğrafyası sağladığı belirlenmiştir.

4.2.6 SEM Analizi

Hücrelerin mikrot taşıyıcı yüzeyine tutunma davranışlarının daha detaylı incelenmesi amacıyla SEM analizi gerçekleştirilmiştir. Statik hücre kültürü çalışması sonucu alınan SEM görüntülerine Şekil 4.9'da yer verilmiştir.



Şekil 4.9. Statik hücre kültürü koşullarında %2,5 ve %3,5 SF konsantrasyonuna sahip mikrot taşıyıcılar üzerinde çoğalan GKM KH'lerin 3. ve 7. SEM görüntüleri (Mavi ile renklendirilmiş olanlar tutunmuş ve yayılmış hücreleri işaret etmektedir).

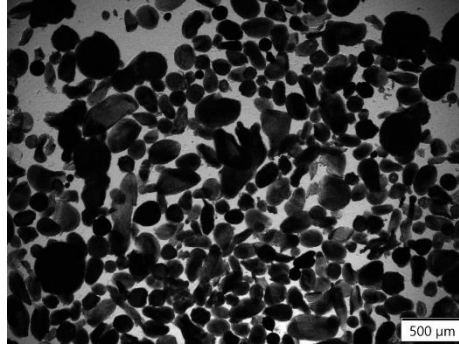
Alınan görüntülerden GKM KH'ların mikrot taşıyıcı yüzeyine tutunduktan sonra fibroblast benzeri yayılma davranışı sergileyerek kendi yayılma morfolojilerine sahip oldukları gözlenmiştir.

Statik hücre kültürü çalışma sonuçları göz önünde bulundurulduğunda dinamik hücre kültürü çalışmalarının da %2,5 ve %3,5 (w/v) SF konsantrasyonunda hazırlanan mikrot taşıyıcılarla gerçekleştirilmesine karar verilmiştir.

4.3 Dinamik Hücre Kültürü Çalışmaları

Dinamik hücre kültürü çalışmalarında %2,5 ve %3,5 SF konsantrasyonlu mikrot taşıyıcılar ile 100 mL hacimde, karıştırmalı kap biyoreaktör ile çalışılmıştır. %2,5 SF ile yapılan ilk

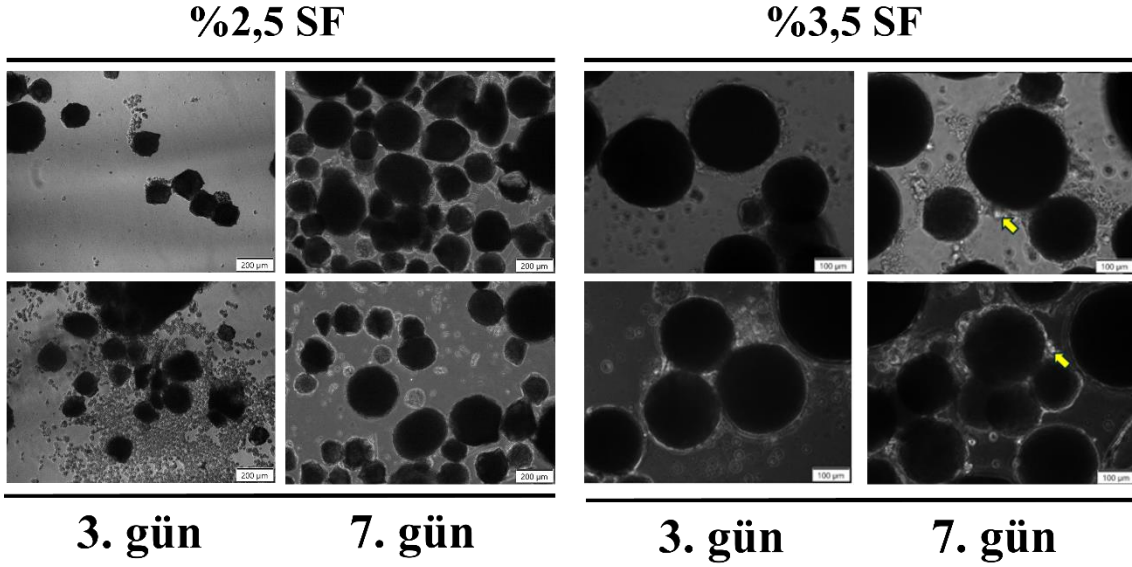
çalışmada karıştırma hızı, homojen bir karıştırmayı sağlaması açısından 19 rpm olarak belirlenmiştir. Ancak bu karıştırma hızında mikrotarıyıcıların morfolojik yapısının bozulduğu gözlenmiştir. Morfolojisi bozulan mikrotarıyıcıların ışık mikroskobundaki görüntüsü Şekil 4.10'da verilmiştir.



Şekil 4.10. Karıştırmalı biyoreaktörde 19 rpm karıştırma hızında morfolojisi bozulmuş %2,5 SF mikrotarıyıcıların ışık mikroskobu görüntüsü.

Mikrotarıyıcıların yapılarının bozulması hücre canlılığını da etkileyeceği için bu durumu engellemek amacıyla karıştırma hızı 15 rpm'e düşürülmüştür. Bu hızda, mikrotarıyıcılar morfolojik yapılarını korumuş ancak %2,5 SF mikrotarıyıcılar biyoreaktörün dibine çökmüş ve etkin bir homojen karıştırma sağlanamamıştır. %3,5 SF mikrotarıyıcılar ile gerçekleştirilen dinamik kültürde ise, yoğunluklarının %2,5 SF mikrotarıyıcılara kıyasla daha az olması ve %3,5 SF mikrotarıyıcıların yoğunluklarının kültür ortamının yoğunluğuna daha yakın olması nedeniyle mikrotarıyıcılar besiyeri içerisinde asılı kalmış ve homojen bir karıştırma sağlanmıştır.

Bölüm 3.3.2'de belirtilen yöntemlerle sterilizasyon ve şartlandırma işlemleri gerçekleştirilen mikrotarıyıcılarla Bölüm 3.3.4 detaylandırılan yöntemle dinamik hücre kültürü koşullarında hücre ekimi gerçekleştirilmiştir. Ekim sonrası kültürün 3. ve 7. günlerinde ışık mikroskobunda alınan görüntülere Şekil 4.5'te yer verilmiştir.



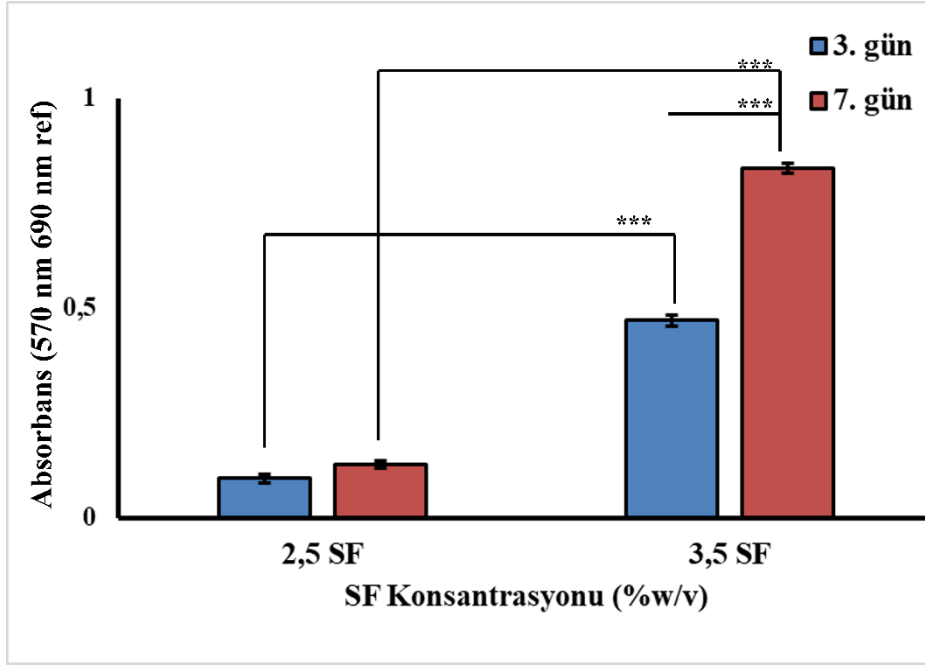
Şekil 4.11. Dinamik kültürde %2,5 SF ve %3,5 SF konsantrasyonlardaki ipek mikrot taşıyıcılar üzerinde çoğalan GKMKH'lerin 3. ve 7. gün ışık mikroskobu görüntüleri (Sarı oklar tutunmuş ve yayılmış hücreleri işaret etmektedir).

Şekil 4.11'de verilen görüntülerde GKMKH'lerin %2,5 SF mikrot taşıyıcılara etkin bir şekilde tutunamadığı gözlenmiştir. Kültürün 3. gününde hücrelerin mikrot taşıyıcılara tutunmak yerine besiyeri içerisinde yığın oluşturdukları görülebilmektedir. %3,5 SF mikrot taşıyıcılarda ise özellikle 7. günde mikrot taşıyıcılara tutunarak mikrot taşıyıcıların etrafını saran hücreler görülebilmektedir. Statik kültür ile karşılaştırıldığında hücrelerin daha iyi bir tutunma performansı sergilemesi karıştırmalı kap biyoreaktörde hücre-mikrot taşıyıcı etkileşiminin artması doğrultusundaki öngörüğü doğrulamaktadır.

Işık mikroskobu analizinde yapılan gözlemlerin kantitatif olarak doğrulanması amacıyla MTT analizleri gerçekleştirilmiştir.

4.3.1 MTT Analizi

%2,5 ve %3,5 SF konsantrasyonları ile elde edilen mikrot taşıyıcıların yüzeyinde çoğalan hücrelerin canlılıklarının belirlendiği MTT analiz sonucu Şekil 4.12'de sunulmuştur. Başlangıç hücre yoğunluğu: $1,6 \times 10^5$ hücre/mL'dir. %2,5 SF ve %3,5 SF mikrot taşıyıcıların yüzeyinde çoğalan hücrelerin absorbans değerleri ise sırası ile 0,124 ve 0,834 olarak elde edilmiştir.



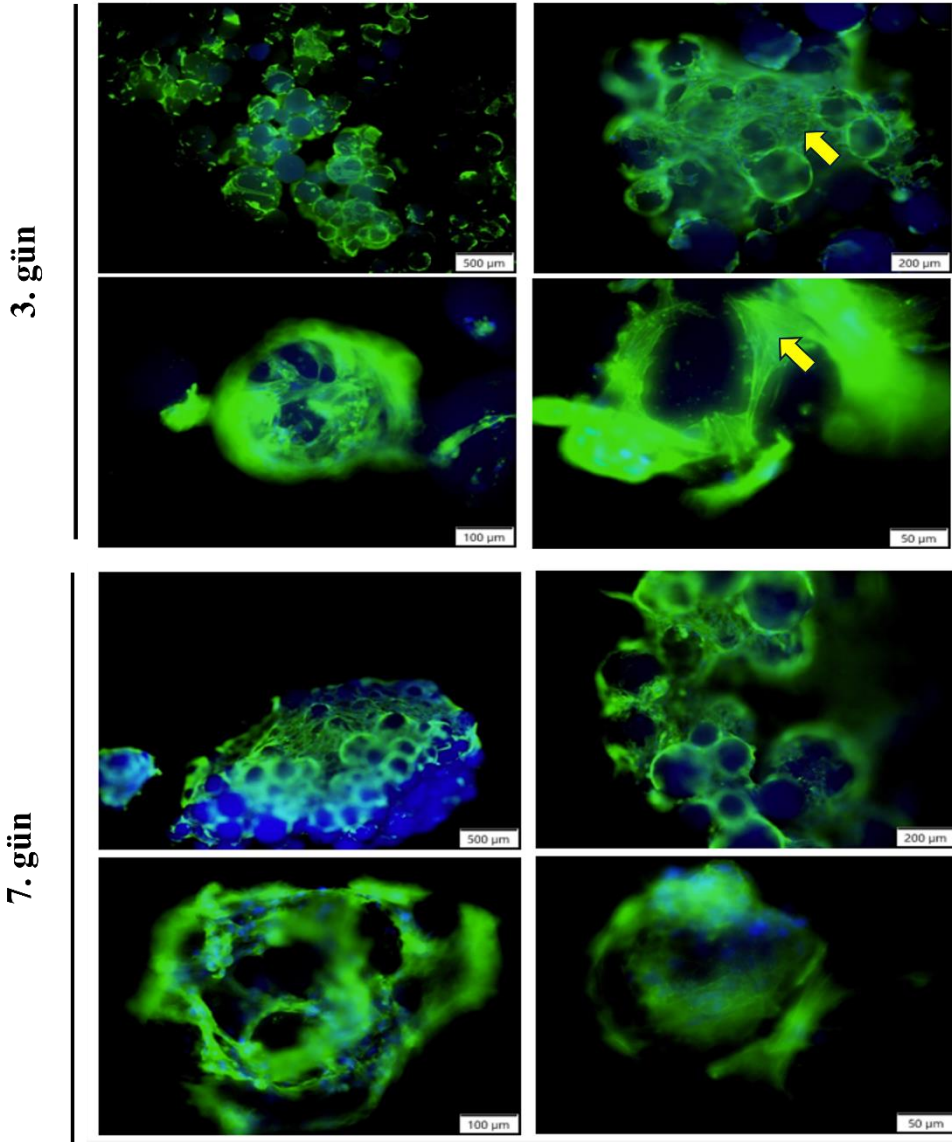
Şekil 4.12 İpek mikrotarıyıcılarla gerçekleştirilen 7 günlük dinamik hücre kültürüne ait MTT analizi sonuçları (İstatistiksel anlamlı farklılıklar $n=3$, **** $p<0,001$, farklı konsantrasyonlardaki mikrotarıyıcılar karşılaştırıldığında).

Şekil 4.12’de verilen MTT analizi sonuçlarına bakıldığında 3. günde %2,5 SF (w/v) mikrotarıyıcılarla karşılaştırıldığında **** $p<0,001$ istatistiksel anlamlılığıyla %3,5 SF mikrotarıyıcılarda ~5 kat daha yüksek absorbans elde edilmiştir. 7. gündeki MTT analiz sonuçlarında %2,5 SF (w/v) mikrotarıyıcılarla karşılaştırıldığında **** $p<0,001$ istatistiksel anlamlılığıyla %3,5 SF mikrotarıyıcılarda 3. gündeki absorbans değerleri ile doğru orantılı olarak ~7 kat daha yüksek absorbans elde edilmiştir. 3. ve 7. günlerde %2,5 SF mikrotarıyıcılarda çoğalan hücrelerin canlılık değerlerinde istatistiksel bir fark gözlenmezken %3,5 SF mikrotarıyıcılarda çoğalan hücrelerde 3. günden 7. güne %77 artış olduğu tespit edilmiştir.

4.3.2 F aktin/DAPI Boyaması

Dinamik kültürde mikrotarıyıcılar üzerinde çoğalan hücrelerin, hücre iskeleti ve çekirdeklerindeki morfolojik değişimleri incelemek amacıyla F aktin/DAPI boyaması gerçekleştirilmiştir. Boyama sonuçlarına Şekil 4.13’te yer verilmiştir

%3.5 SF

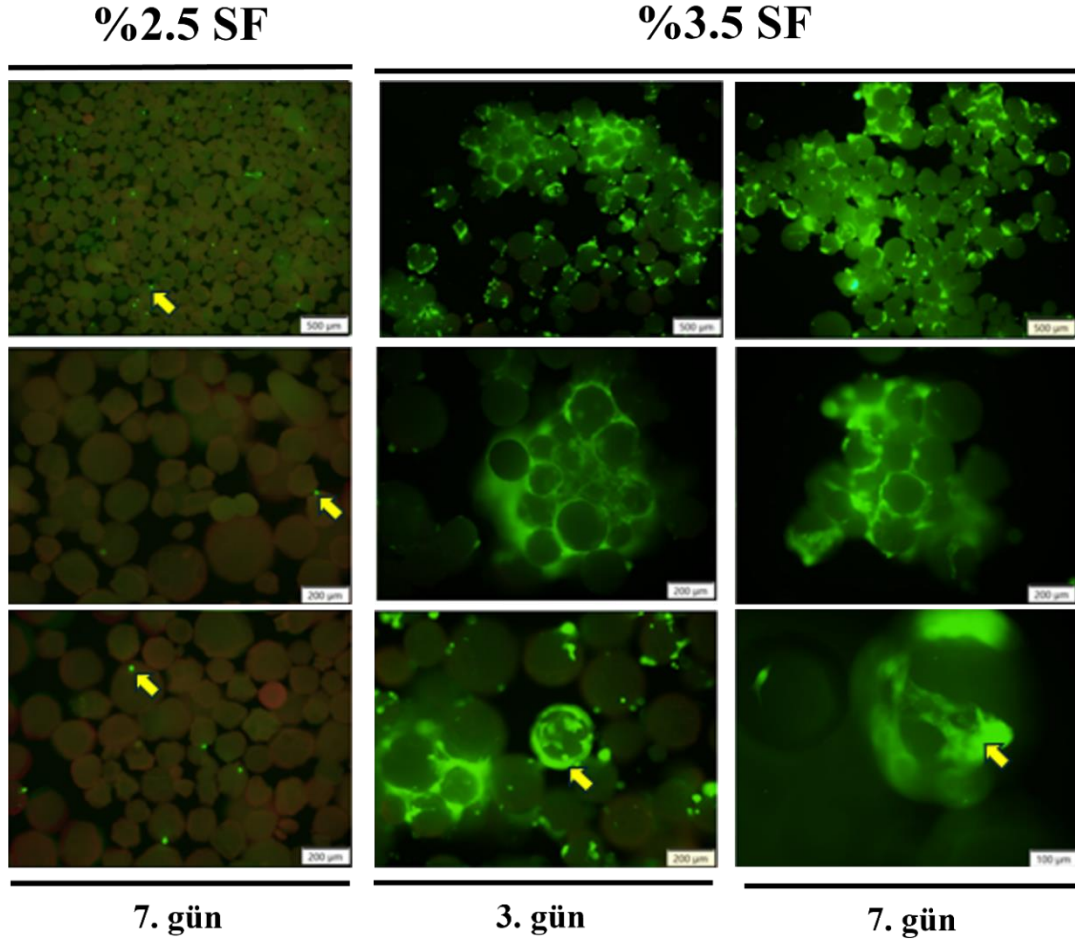


Şekil 4.13. Dinamik kültürde, %3,5 SF ipek mikrotarıyıcılar üzerinde çoğalan GKMKH'lerin 3. ve 7. gün F aktin/DAPI görüntüsü (Yeşil ve mavi sırasıyla hücre iskeletini ve çekirdeğini işaret etmektedir).

F aktin/DAPI boyama analizi, ışık mikroskobundan ve MTT analizlerinden alınan veriler doğrultusunda sadece %3,5 SF mikrotasıyıcılar için gerçekleştirilmiştir. Boyama analizi, GKMKH'lerin dinamik kültürde %3,5 SF mikrotasıyıcılar üzerinde mikrotasıyıcı yüzeyini kaplayacak şekilde proliferasyon gösterdiğini ortaya koymaktadır. Ayrıca da, hücrelerin mikrotasıyıcıları birbirine bağlayarak agregasyon oluşturduğu gözlemlenmiştir. Bu durum, mikrotasıyıcıların toplam yüzey alanını azaltarak hücrelerin daha homojen bir şekilde dağılmasını engelleyebilir. Ayrıca, agregasyon oluşumu hücre-hücre etkileşimlerini artırsa da besin ve oksijen difüzyonunu kısıtlayarak hücrelerin uzun vadeli canlılığını ve farklılaşma potansiyelini olumsuz yönde etkileyebilir. Bu nedenle, dinamik kültür koşullarında agregasyonun minimize edilmesi gerekir.

4.3.3 Canlı/Ölü Hücrelerin Görüntülenmesi

%2,5 SF mikrotasıyıcılarda çoğalan hücrelerin kültürün 7. gününde, %3,5 SF mikrotasıyıcılarda çoğalan hücrelerin kültürün 3. ve 7. gününde Bölüm 3.3.1'de detaylandırılan şekilde canlı/ölü boyamaları gerçekleştirilmiştir. Boyama sonuçları Şekil 4.14'te verilmiştir.

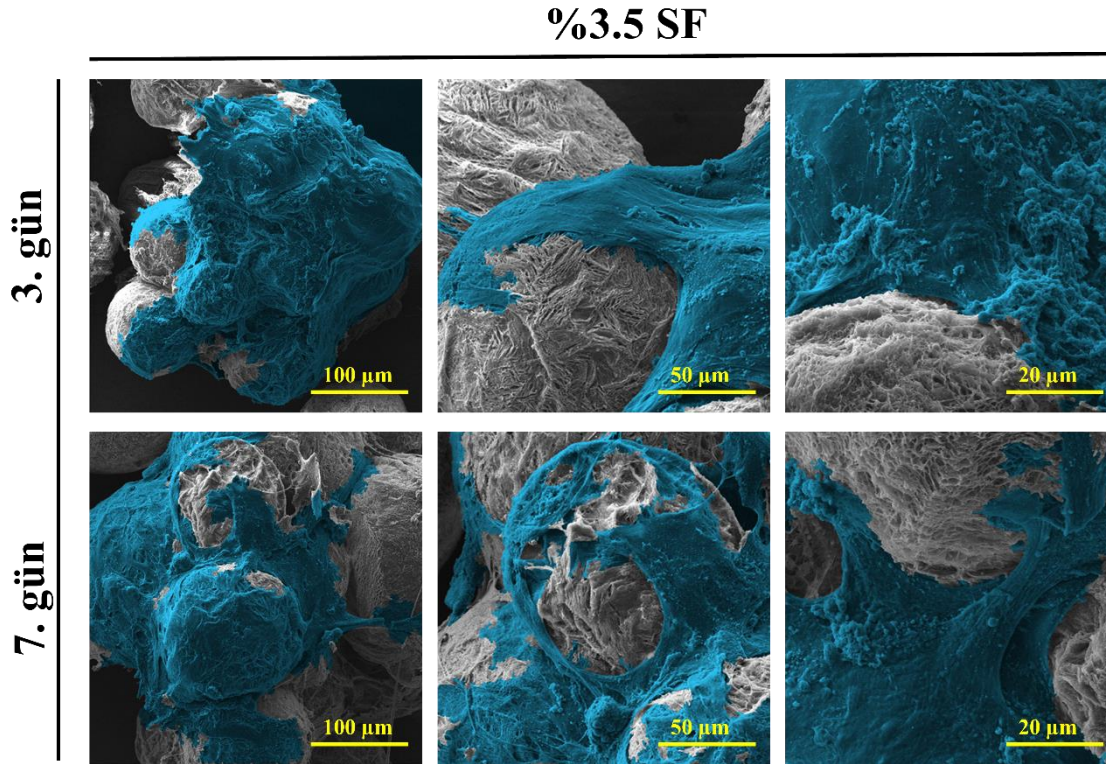


Şekil 4.14. Dinamik kültürde %2,5 SF konsantrasyonundaki ipek mikrotarıyıcılar üzerinde çoğalan GKMKH'lerin 7. gün ve %3,5 SF konsantrasyonundaki ipek mikrotarıyıcılar üzerinde çoğalan GKMKH'lerin 3. ve 7. gün canlı/ölü boyama görüntüsü (Sarı oklar mikrotarıyıcıların üzerinde yayılma davranışı gösteren hücreleri işaret etmektedir. Yeşil ve kırmızı renkler sırasıyla canlı ve ölü hücreleri göstermektedir).

Şekil 4.14'deki fotoğraflardan görüldüğü üzere, %2,5 SF konsantrasyonuna sahip mikrotarıyıcılarda hücre tutunma oranı oldukça düşük seviyede kalmıştır. Buna karşın, %3,5 SF mikrotarıyıcılarda F aktin/DAPI boyama sonuçlarını doğrular şekilde, hücrelerin mikrotarıyıcı yüzeyini büyük oranda kapladığı gözlemlenmiştir. Ayrıca, birbirine bağlanmış mikrotarıyıcıların bulunduğu bölgelerde dahi hücre canlılığının yüksek seviyede olduğu belirlenmiştir. Bu bulgular, GKMKH'lerin karıştırmalı kültür kabında yüksek canlılık oranlarını koruyabildiğini ve mikrotarıyıcı yüzeyinde etkin bir proliferasyon gösterdiğini ortaya koymaktadır.

4.3.4 SEM Analizi

%3,5 SF mikrotarıyıcılar ile gerçekleştirilen dinamik kültür sonrasında hücrelerin tutunma profillerini daha iyi incelemek için SEM analizi gerçekleştirilmiştir. Analiz sonuçları Şekil 4.15'te verilmiştir.



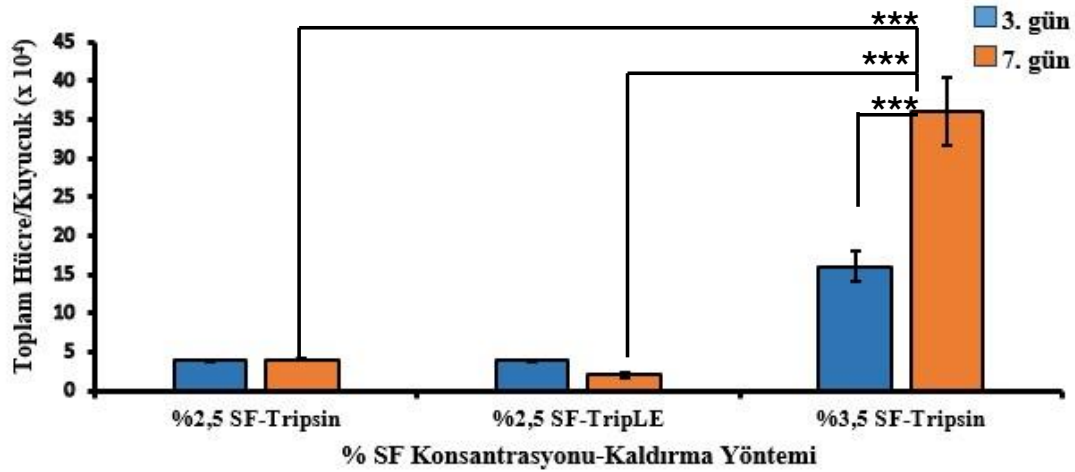
Şekil 4.15. Dinamik kültürde %3,5 SF konsantrasyonundaki ipek mikrotarıyıcılar üzerinde çoğalan GCMKH'lerin SEM görüntüsü (Mavi ile renklendirilmiş bölgeler tutunmuş ve yayılmış hücreleri işaret etmektedir).

Dinamik kültürde elde edilen SEM görüntüleri, önceki boyama sonuçlarını doğrulamakta olup, hücrelerin mikrotarıyıcılar aracılığıyla birbirine bağlanmasını ve mikrotarıyıcı yüzeyinde fibroblast benzeri morfolojide yayılım göstermesini ayrıntılı bir Şekilde ortaya koymaktadır. Yapılan analizler, GCMKH'lerin dinamik kültür koşullarında ipek mikrotarıyıcılar üzerinde başarıyla oğaltılabileceğini göstermektedir. Ancak, mikrotarıyıcı-hücre etkileşimi sonucunda meydana gelen agregasyon, besin ve oksijen difüzyonunu kısıtlayarak daha büyük ölçekli üretimler için potansiyel bir engel teşkil edebilir. Bu nedenle, büyük ölçekli uygulamalarda hücre dağılımını optimize etmek ve agregasyonu minimize etmek amacıyla kültür parametrelerinin dikkatlice optimize edilmesi gerekmektedir.

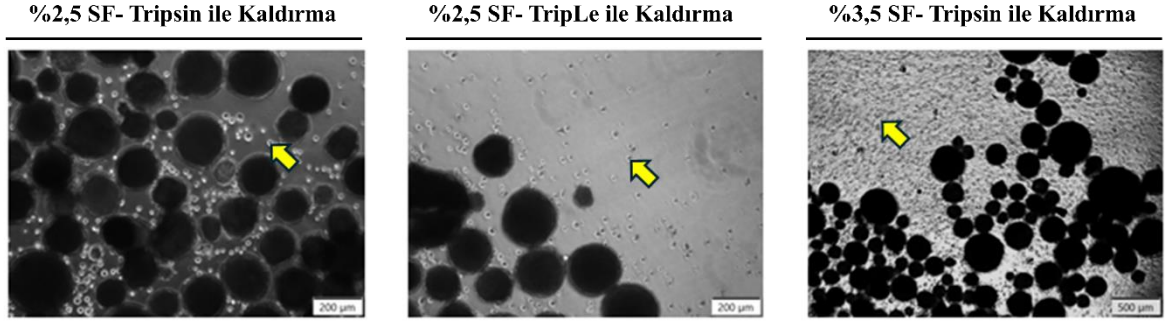
4.1. Hücrelerin Mikrotaşyıcı Yüzeyinden Kaldırılması

Hücrelerin mikrotaşyıcı yüzeyinden kaldırılması için iki enzim denenmiştir. Tripsin, hücre kültürlerinde sık tercih edilen ve hücrelerin yüzeyden ayrılmasını sağlayan proteolitik bir enzimdir. TripLe ise hayvansal bir bileşik içermemek üzere modifiye edilmiş ve hücreleri yüzeyden kaldırma aşamasında hücre yapısının korunmasını sağlayan bir enzimdir. Yüzeyden kaldırma işlemi hem %2,5 hem de %3,5 SF mikrotaşyıcıların dinamik kültürlerinden sonra gerçekleştirilmiştir.

Elde edilen hücre sayılarına ait grafik Şekil 4.16'da, yüzeyden kaldırılmış hücrelerin ışık mikroskobu görüntüleri ise Şekil 4.17'de verilmiştir.



Şekil 4.16. Dinamik kültürde 7. gün sonunda 2 farklı enzimle gerçekleştirilen yüzeyden kaldırma işlemi sonucunda ulaşılan hücre sayıları (İstatistiksel anlamlı farklılıklar $n=3$, $***p<0,001$, farklı SF konsantrasyonu ve kaldırma yöntemi karşılaştırıldığında)



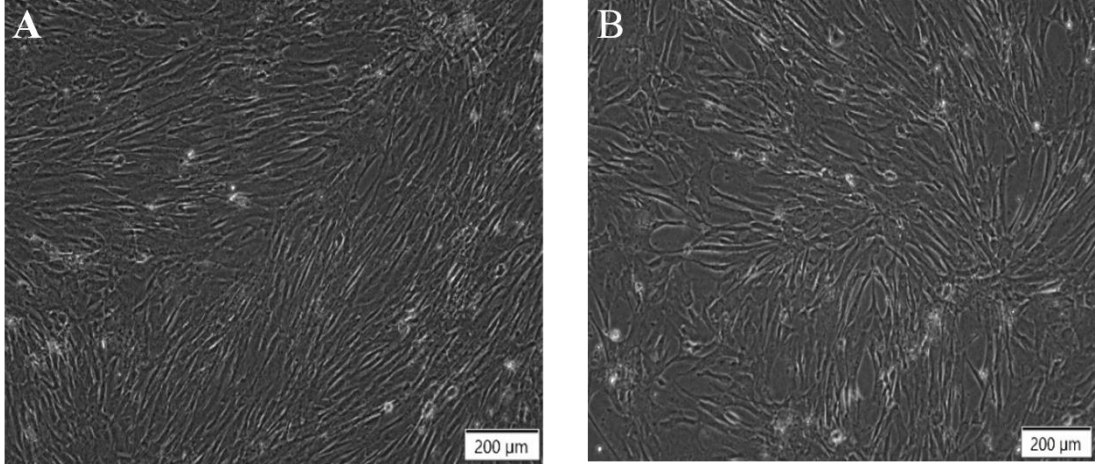
Şekil 4.17. Yüzeiden kaldırılmış hücrelerin ışık mikroskobundaki görüntüsü (Sarı oklar kaldırılmış olan hücreleri işaret etmektedir).

Elde edilen sonuçlar incelendiğinde, başlangıç olarak 40 000 hücre/kuyucuk kullanılan %2,5 SF mikrotarıyıcılarda tripsin ve TripLe ile hücre kaldırma sonrası sırasıyla 4×10^4 hücre/kuyucuk ve 2×10^4 hücre/kuyucuk sayılarına ulaşılmıştır. 7 günlük kültürasyon sonucunda tripsin ile kaldırma yönteminde hücre sayısının değişmemesi, TripLe ile kaldırma yönteminde ise %50 düşüş olması hücrelerin mikrotarıyıcılara etkin bir şekilde tutunmadığını göstermektedir. Ancak istatistiksel olarak %2,5 SF-Tripsin ve %2,5 SF Triple grupları arasında anlamlı bir fark görülmemiştir. Dinamik kültürde yapılmış olan boyama ve SEM analizleri de bu sonucu doğrulamaktadır. %3,5 SF mikrotarıyıcılarda ise başlangıç hücre sayısının fazla olması ile birlikte hücrelerin mikrotarıyıcılara tutunması sonucunda 7 günlük kültür süresince hücre sayısının 2 katın üzerinde arttığı görülmüştür.

4.2. Akış Sitometrisi Analizi

%2,5 SF mikrotarıyıcılar ile yapılan statik kültür sonrası ve %3,5 SF mikrotarıyıcılar ile yapılan dinamik kültür sonrası hücrelerin akış sitometrisi analizi, Bölüm 3.3.6'da detaylandırıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir. Mikrotarıyıcı yüzeyinden kaldırıldıktan sonra tekrar ekilen hücrelerin görüntüsü Şekil 4.18'de verilmiştir.

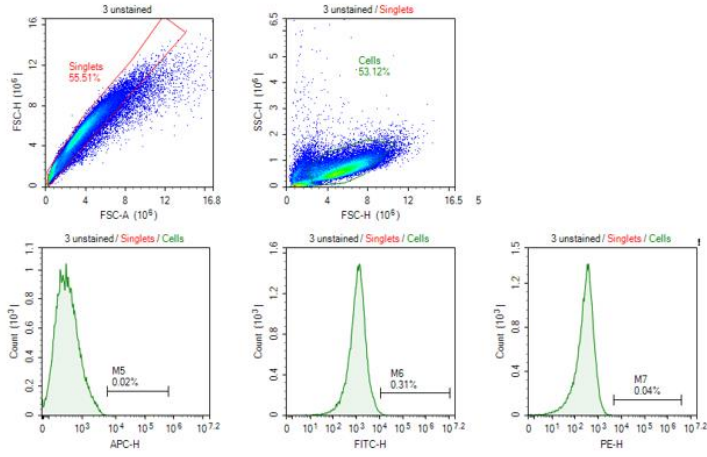
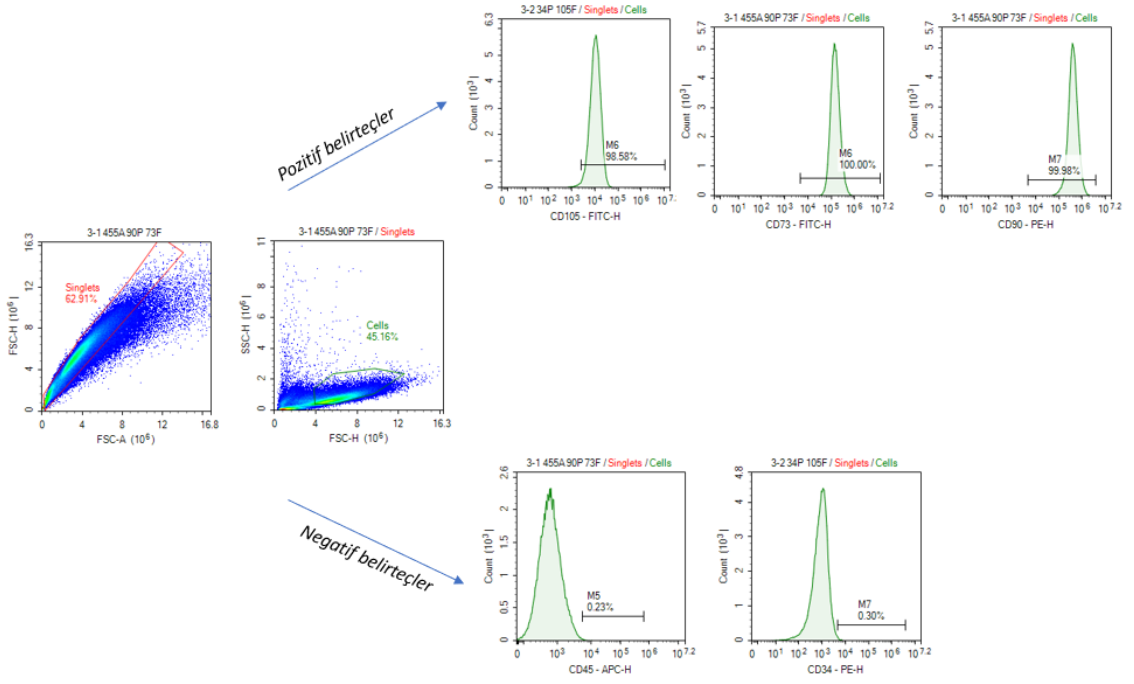
Kültür kabı yüzeyinde çoğaltılan GKMKH'lere ait akış sitometrisi analiz sonuçları Ek-3'te verilmiştir. Bu sonuçlar daha önce grubumuzda gerçekleştirilen "Biyofiziksel ve biyokimyasal uyarımlarla desteklenmiş doku iskeleleri ile mezenkimal kök hücrelerin osteojenik farklılaşmasının incelenmesi" tezinden alınmıştır [68].



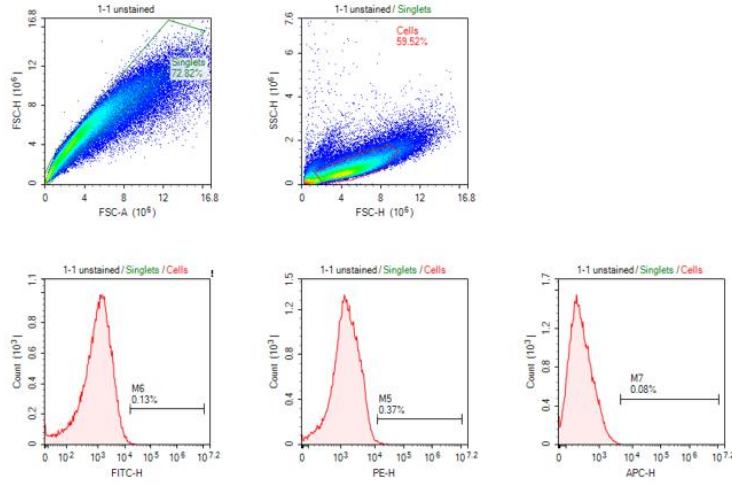
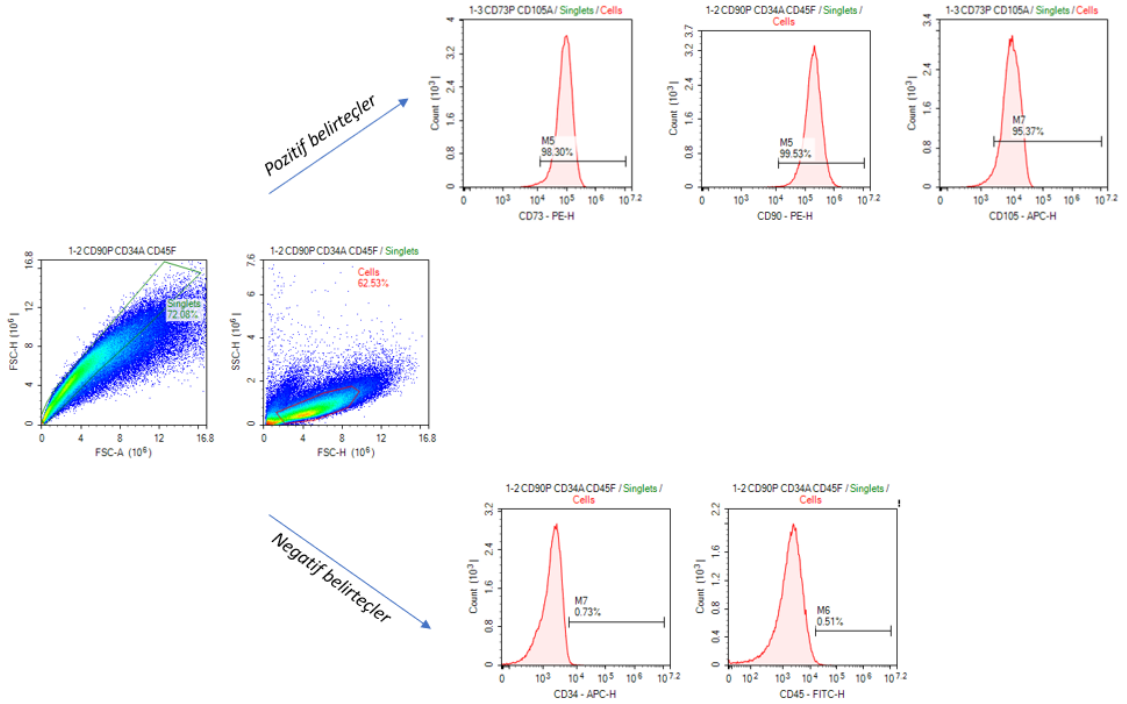
Şekil 4.18. Akış sitometrisi analizi öncesi A) %2,5 SF B) %3,5 SF mikrotasıyıcılardan kaldırılan ve TCPS'e ekilen GSKMKH'lerin 7. gün ışık mikroskobu görüntüleri.

Şekil 4.18'de verilen ışık mikroskobu görüntüleri incelendiğine hücrelerin fibroblast morfolojilerini göstermeye devam ettiği görülmektedir. Hücre yoğunluğuna bakıldığında çoğalmalarının da normal seyrinde devam ettiği tespit edilmiştir. Bu bulgular hücrelerde farklılaşma olmadığına dair bir öngörü yapılmasını sağlamaktadır. Akış sitometrisi analizi ile bu sonuçlar doğrulanmıştır.

Hücrelerin akış sitometrisi analiz sonuçları Şekil 4.19 ve 4.20'de, akış sitometrisi sonuçlarının tablo ve grafiğe dökülmüş hali ise Şekil 4.21'de verilmiştir.

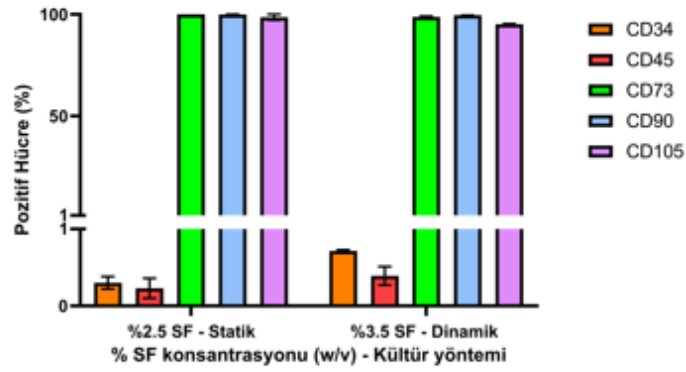
A**B**

Şekil 4.19. %2,5 SF mikrotasıyıcılar ile yapılan statik kültür sonrası mikrotasıyıcı yüzeyinden kaldırılmış hücrelere ait akış sitometrisi analizi (A: Kontrol grubu. B: CD34, CD45, CD73, CD90 ve CD105 belirteçleri ile boyanmış hücreler.)

A**B**

Şekil 4.20. %3,5 SF mikrotaşuyıcılar ile yapılan dinamik kültür sonrası mikrotaşuyıcı yüzeyinden kaldırılmış hücelere ait akış sitometrisi analizi (A: Kontrol grubu. B: CD34, CD45, CD73, CD90 ve CD105 belirteçleri ile boyanmış hücelere.)

A



B

Pozitif Hücre (%)	%2,5 SF- Statik	%3,5 SF- Dinamik
CD34	0,30	0,73
CD45	0,23	0,51
CD73	100	98,30
CD90	99,98	95,53
CD105	98,58	95,37

Şekil 4.21. %2,5 SF mikrotayıyıcılar ile gerçekleştirilen statik kültür ve %3,5 SF mikrotayıyıcılar ile gerçekleştirilen dinamik kültür sonrası yapılan akış sitometrisi analiz sonuçları (A: Grafik, B: Tablo olarak gösterimi)

Göbek kordonu mezenkimal kök hücrelerin köklülük özelliklerinin devam ettiğinin göstergesi olarak Uluslararası Hücresel Terapi Derneği (ISCT) kriterlerine göre CD34 ve CD45'in negatif veya düşük seviyede ekspresyona edilmesi gerekirken CD73, CD90 ve CD105 pozitif olmalıdır. Analiz sonuçlarına göre, %2,5 SF ve 3,5 SF grubu için CD34 ekspresyon oranı sırasıyla %0,30 ve %0,23 oranında iken, CD45 belirteçlerinin ekspresyon seviyesi sırasıyla %0,73 ve %0,51 olarak belirlenmiştir. CD73, CD90 ve CD105 belirteçlerinin ekspresyon seviyesi her iki grup için de %95 üzeridir. Akış sitometrisi analizlerinde elde edilen sonuçlarda hem statik hem de dinamik kültür sonrasında hücrelerin herhangi bir farklılaşma yolağına girmediği ve kök hücre özelliklerini koruduğu anlaşılmaktadır

5 YORUM

Sunulan tez çalışmasında göbek kordonu mezenkimal kök hücrelerinin ipek fibroin mikrotarıyıcılar ile kültürasyonu gerçekleştirilerek karıştırılmalı kap biyoreaktörlerde çoğaltılması amaçlanmıştır.

Bu tez çalışmasında, ipek fibroinin ucuz, kolay erişilebilir ve biyoyumlu bir malzeme olması, göbek kordonu kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin çoğaltılmasında kullanılmak üzere mikrotarıyıcı üretiminde tercih edilmesinde önemli bir rol oynamıştır. İpek fibroin kullanılarak üretilen mikrotarıyıcılarda ipek konsantrasyonu ile yüzey topoğrafisi değiştirilebilmektedir. Tez çalışmasında 4 farklı konsantrasyonda (%2,5, %3,5 %4,5, %5,5) ipek fibroin kullanılarak farklı yüzey pürüzlülüğüne sahip mikrotarıyıcılar üretilmiş ve bu farklılığın GKMKH'lerin çoğalmasına etkisi statik kültürde incelenmiştir.

Grubumuzda daha önce çalışmış ve karakterizasyonu yapılmış ipek mikrotarıyıcıların, kimyasal yapıları, termal özellikleri, yoğunluk değerleri ve enzim varlığında biyobozunurluk oranları belirlenmiştir [49]. Sunulan tez çalışması kapsamında ise daha önce yapılan bu çalışmayı tamamlayacak şekilde mikrotarıyıcı çap boyutları ile pürüzlülük boyutları yapılan SEM analizi ve ImageJ programı ile 20 adet mikrotarıyıcı kullanılarak hesaplanmıştır. Üretilen mikrotarıyıcıların SEM görüntüleri incelendiğinde %2,5 SF mikrotarıyıcılarda düşük yüzey pürüzlülüğü gözlenmiştir. Yüzde 3,5, 4,5 ve 5,5 SF mikrotarıyıcılardaki pürüz boyutları sırasıyla 7,39 µm, 5,82 µm ve 2,78 µm olarak ölçülmüştür. Yüzde 3,5, 4,5 ve 5,5 SF mikrotarıyıcılarda pürüz boyutunun azalması polimer konsantrasyonunun artırılarak çözücü oranı azaltılması ile ilişkilendirilmiştir.

Yüzde 2,5, 3,5, 4,5, ve 5,5 SF mikrotarıyıcılar ile gerçekleştirilen statik kültür süresince yapılan MTT analizinde 3. gün alınan en yüksek MTT değerinin %3,5 SF mikrotarıyıcılarda olması, hücrelerin %3,5 SF mikrotarıyıcılara tutunma oranının diğer mikrotarıyıcılara kıyasla daha fazla olduğu yönünde yorumlanmıştır. Yapılan boyamalar ile de en yüksek hücre canlılığı %3,5 SF mikrotarıyıcı grubunda görülmüş ve bu sonucun MTT analiz elde edilen absorbans değerlerini desteklediği belirlenmiştir.

Dinamik kültürde %3,5 SF konsantrasyonlu mikrotarıyıcılar ile gerçekleştirilen 7 günlük kültürasyonun 3. ve 7. günlerinde %2,5 SF mikrotarıyıcılarda çoğalan hücrelerin canlılık

değerlerinde %37 artış gözlenirken bu değer %3,5 SF mikrotaşyıcılarında çoğalan hücrelerde %77 olduğu tespit edilmiştir. Boyama ve SEM görüntülerine bakıldığında %2,5 SF mikrotaşyıcılarda hücrelerde tutunma ve yayılma davranışı gözlenmiş ancak etkin bir çoğalma gözlenememiştir. Yüzde 3,5 SF mikrotaşyıcılarda ise hücrelerin mikrotaşyıcıların yüzeyinin büyük bir çoğunluğunu kapladığı gözlenmiştir. Bu durum, yüzey pürüzlülüğünün karıştırılmalı ortamda hücrelerin çoğalmasına pozitif bir etkisi olduğunu kanıtlar niteliktedir. Dinamik kültür süresince yapılan boyama ve SEM sonuçlarına bakıldığında hücrelerin mikrotaşyıcılara bağlanarak agregasyon oluşturduğu gözlenmiştir. Mikrotaşyıcı agregasyonu, hücrelerin tutunabileceği yüzey alanını kısıtlamakla birlikte hücrelerin besin ve oksijen alımında olumsuz bir etkiye neden olmaktadır. Agresyonu önlemek için karıştırıcı hızı hücre tutunmasına ve mikrotaşyıcının bütüncül yapısına zarar vermeyecek seviyede artırılabilir. Tez çalışmasında 19 rpm'de gerçekleştirilen karıştırma hızının mikrotaşyıcı yapısını bozduğu tespit edildiği için hız 15 rpm'e düşürülmüştür. Daha yüksek hızlarda mikrotaşyıcının yapısının korumak için dikey tekerlek veya büyük kanatlı çark tipi karıştırıcılar kullanılabilir [37,72]. Literatürde, GKMKH'lerin mikrotaşyıcılar arasında göç edebildiğine dair çalışmalar bulunmaktadır. Oluşan agregasyonu minimum düzeyde tutmak için hücreler mikrotaşyıcılara tutunmaya başladıktan sonra ortama mikrotaşyıcı eklemesi yapılarak hücrelerin göç etmesi sağlanabilir. Böylelikle mikrotaşyıcı başına düşen hücre sayısı sabit tutulabilir [13].

Mikrotaşyıcı yüzeyinden kaldırılan hücreler ile gerçekleştirilen akış sitometrisi analizlerinde, Uluslararası Hücresel Terapi Derneği (ISCT) kriterlerine uygun şekilde CD34 ve CD45 belirteçleri düşük seviyelerde ifade edilirken, CD73, CD90 ve CD105 belirteçleri yüksek seviyede ifade edilmiştir. Bu sonuçlarla birlikte yapılan morfolojik gözlem hücrelerin köklülük özelliklerini korumaya devam ettiğini göstermektedir.

Göbek kordonu kök hücrelerinin klinikte kullanımının yaygınlaşması ile birlikte hücrelerin büyük ölçekte üretilmesine dair yapılan çalışmalar da artmaktadır [37,40]. Bu çalışmalarda dekstran, polistiren, jelatin gibi polimerlerden üretilmiş çeşitli mikrotaşyıcılar kullanılmaktadır. İpek fibroin, diğer polimerlerle karşılaştırıldığında yüksek mekanik dayanım ve termal stabiliteye sahip olmasının yanı sıra, hücre tipine özgü proteinlerle modifiye edilebilmesi ve kontrollü şekilde bozunabilmesi gibi kritik

özellikleri bir arada sunan, kolay erişilebilir bir polimerdir. Ayrıca, ipek fibroin mikrotarıyıcıların toksik etki oluşturmayan ve vücuda enjekte edilebilecek şekilde biyobozunur yapıda olmaları, özellikle doku mühendisliği uygulamaları açısından önemli bir avantaj sağlamaktadır [60].

Gelecekte, bu çalışmada kullanılan ipek fibroin mikrotarıyıcıların farklı yüzey modifikasyonlarıyla zenginleştirilerek hücre etkileşiminin artırılması ve çeşitli biyoreaktör sistemlerinde üretimlerinin karşılaştırmalı olarak değerlendirilmesi, bu alanda ilerlemeye katkı sağlayabilecek önemli araştırma konuları arasında yer almaktadır. Ayrıca, elde edilen mikrotarıyıcı sistemlerin prelinik düzeyde test edilmesi ve klinik uygulamalara yönelik deneysel çalışmalara dönüştürülmesi, bu alandaki ilerlemeyi destekleyecektir.

6 KAYNAKLAR

- [1] I. V Yannas, J.F. Burke, Design of an artificial skin. I. Basic design principles", **1980**
- [2] J.M. Polak, A.E. Bishop, Stem cells and tissue engineering: Past, present, and future, in: Ann N Y Acad Sci, Blackwell Publishing Inc., **2006**: pp. 352–366.
- [3] N.W. Marion, J.J. Mao, Mesenchymal Stem Cells and Tissue Engineering, Methods Enzymol 420 (**2006**) 339–361.
- [4] H. Wegmeyer, A.M. Bröske, M. Leddin, K. Kuentzer, A.K. Nisslbeck, J. Hupfeld, K. Wiechmann, J. Kuhlen, C. Von Schwerin, C. Stein, S. Knothe, J. Funk, R. Huss, M. Neubauer, Mesenchymal stromal cell characteristics vary depending on their origin, Stem Cells Dev 22 (**2013**) 2606–2618.
- [5] B. Lo, L. Parham, Ethical issues in stem cell research, Endocr Rev 30 (**2009**) 204–213.
- [6] D.C. Ding, W.C. Shyu, S.Z. Lin, Mesenchymal stem cells, Cell Transplant 20 (**2011**) 5–14.
- [7] H. Tavassoli, S.N. Alhosseini, A. Tay, P.P.Y. Chan, S.K. Weng Oh, M.E. Warkiani, Large-scale production of stem cells utilizing microcarriers: A biomaterials engineering perspective from academic research to commercialized products, Biomaterials 181 (**2018**) 333–346.
- [8] Y.-C. Ng, J.M. Berry, M. Butler, Optimization of Physical Parameters for Cell Attachment and Growth on Macroporous Microcarriers, n.d.
- [9] J. Fang, D. Wang, F.F. Hu, X. Li, X. Zou, J. Xie, Z. Zhou, Strontium mineralized silk fibroin porous microcarriers with enhanced osteogenesis as injectable bone tissue engineering vehicles, Mater Sci Eng C Mater Biol Appl 128 (**2021**).
- [10] C.P. Orfei, G. Talò, M. Viganò, S. Perteghella, G. Lugano, F.F. Fontana, E. Ragni, A. Colombini, P. De Luca, M. Moretti, M.L. Torre, L. de Girolamo, Silk/Fibroin Microcarriers for Mesenchymal Stem Cell Delivery: Optimization of Cell Seeding by the Design of Experiment, Pharmaceutics 2018, Vol. 10, Page 200 10 (**2018**) 200.

- [11] S. Perteghella, E. Martella, L. De Girolamo, C.P. Orfei, M. Pierini, V. Fumagalli, D.V. Pintacuda, T. Chlapanidas, M. Viganò, S. Faragò, M.L. Torre, E. Lucarelli, Fabrication of Innovative Silk/Alginate Microcarriers for Mesenchymal Stem Cell Delivery and Tissue Regeneration, *International Journal of Molecular Sciences* 2017, Vol. 18, Page 1829 18 (2017) 1829.
- [12] G. Zhao, F. Liu, S. Lan, P. Li, L. Wang, J. Kou, X. Qi, R. Fan, D. Hao, C. Wu, T. Bai, Y. Li, J.Y. Liu, Large-scale expansion of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells on gelatin microbeads, with retention of self-renewal and multipotency characteristics and the capacity for enhancing skin wound healing, *Stem Cell Res Ther* 6 (2015) 1–16.
- [13] C. Sion, C. Loubière, M.K. Wlodarczyk-Biegun, N. Davoudi, C. Müller-Renno, E. Guedon, I. Chevalot, E. Olmos, Effects of microcarriers addition and mixing on WJ-MSC culture in bioreactors, *Biochem Eng J* 157 (2020) 107521.
- [14] A. López-Fernández, V. Garcia-Gragera, M. Lecina, J. Vives, S. de Teràpia Cel·lular Avançada, B. de Sang Teixits, E. Frederic Duran Jordà, Identification of critical process parameters for expansion of clinical grade human Wharton's jelly-derived mesenchymal stromal cells in stirred-tank bioreactors, *Biotechnol J* 19 (2024)
- [15] C.S.. Potten, *Stem cells*, (1997) 474.
- [16] P. Bianco, P.G. Robey, *Stem cells in tissue engineering*, *Nature* 414 (2001) 118–121.
- [17] J.C. Mountford, *Human embryonic stem cells: origins, characteristics and potential for regenerative therapy*, *Transfus Med* 18 (2008) 1–12.
- [18] S.J. Park, Y.Y. Kim, J.Y. Han, S.W. Kim, H. Kim, S.Y. Ku, *Advancements in Human Embryonic Stem Cell Research: Clinical Applications and Ethical Issues*, *Tissue Eng Regen Med* 21 (2024) 379–394.
- [19] M. Idelson, R. Alper, A. Obolensky, N. Yachimovich-Cohen, J. Rachmilewitz, A. Ejzenberg, E. Beider, E. Banin, B. Reubinoff, *Immunological Properties of Human Embryonic Stem Cell-Derived Retinal Pigment Epithelial Cells*, *Stem Cell Reports* 11 (2018) 681–695.

- [20] K. Okita, S. Yamanaka, Induced pluripotent stem cells: opportunities and challenges, *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 366 (2011) 2198–2207.
- [21] M. Bellin, M.C. Marchetto, F.H. Gage, C.L. Mummery, Induced pluripotent stem cells: the new patient?, *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2012 13:11 13 (2012) 713–726.
- [22] J.S. Schweitzer, B. Song, T.M. Herrington, T.-Y. Park, N. Lee, S. Ko, J. Jeon, Y. Cha, K. Kim, Q. Li, C. Henchcliffe, M. Kaplitt, C. Neff, O. Rapalino, H. Seo, I.-H. Lee, J. Kim, T. Kim, G.A. Petsko, J. Ritz, B.M. Cohen, S.-W. Kong, P. Leblanc, B.S. Carter, K.-S. Kim, Personalized iPSC-Derived Dopamine Progenitor Cells for Parkinson’s Disease, *N Engl J Med* 382 (2020) 1926–1932.
- [23] P. Díez Villanueva, R. Sanz-Ruiz, A. Núñez García, M.E. Fernández Santos, P.L. Sánchez, F. Fernández-Avilés, Functional multipotency of stem cells: what do we need from them in the heart? *Stem Cells Int* 2012 (2012).
- [24] A. Uccelli, L. Moretta, V. Pistoia, Mesenchymal stem cells in health and disease, *Nature Reviews Immunology* 2008 8:9 8 (2008) 726–736.
- [25] M. Dominici, K. Le Blanc, I. Mueller, I. Slaper-Cortenbach, F.C. Marini, D.S. Krause, R.J. Deans, A. Keating, D.J. Prockop, E.M. Horwitz, Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement, *Cytotherapy* 8 (2006) 315–317.
- [26] Y. Han, J. Yang, J. Fang, Y. Zhou, E. Candi, J. Wang, D. Hua, C. Shao, Y. Shi, The secretion profile of mesenchymal stem cells and potential applications in treating human diseases, *Signal Transduction and Targeted Therapy* 2022 7:1 7 (2022) 1–19.
- [27] Y. Miura, Human bone marrow mesenchymal stromal/stem cells: current clinical applications and potential for hematology, *Int J Hematol* 103 (2016) 122–128.
- [28] Z. Si, X. Wang, C. Sun, Y. Kang, J. Xu, X. Wang, Y. Hui, Adipose-derived stem cells: Sources, potency, and implications for regenerative therapies, *Biomed Pharmacother* 114 (2019).

- [29] D. Macrin, J.P. Joseph, A.A. Pillai, A. Devi, Eminent Sources of Adult Mesenchymal Stem Cells and Their Therapeutic Imminence, *Stem Cell Rev Rep* 13 (2017) 741–756.
- [30] D.C. Ding, Y.H. Chang, W.C. Shyu, S.Z. Lin, Human umbilical cord mesenchymal stem cells: a new era for stem cell therapy, *Cell Transplant* 24 (2015) 339–347.
- [31] R. El Omar, J. Beroud, J.F. Stoltz, P. Menu, E. Velot, V. Decot, Umbilical cord mesenchymal stem cells: the new gold standard for mesenchymal stem cell-based therapies? *Tissue Eng Part B Rev* 20 (2014) 523–544.
- [32] Y.A. Romanov, V.A. Svintsitskaya, V.N. Smirnov, Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like cells from umbilical cord, *Stem Cells* 21 (2003) 105–110.
- [33] S. Ma, N. Xie, W. Li, B. Yuan, Y. Shi, Y. Wang, Immunobiology of mesenchymal stem cells, *Cell Death Differ* 21 (2014) 216–225.
- [34] M. Mebarki, C. Abadie, J. Larghero, A. Cras, Human umbilical cord-derived mesenchymal stem/stromal cells: a promising candidate for the development of advanced therapy medicinal products, *Stem Cell Res Ther* 12 (2021) 1–10.
- [35] S. Albu, H. Kumru, R. Coll, J. Vives, M. Vallés, J. Benito-Penalva, L. Rodríguez, M. Codinach, J. Hernández, X. Navarro, J. Vidal, Clinical effects of intrathecal administration of expanded Wharton jelly mesenchymal stromal cells in patients with chronic complete spinal cord injury: a randomized controlled study, *Cytotherapy* 23 (2021) 146–156.
- [36] W. Zhang, X.C. Liu, L. Yang, D.L. Zhu, Y.D. Zhang, Y. Chen, H.Y. Zhang, Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells promote myocardial regeneration and cardiac repair after miniswine acute myocardial infarction, *Coron Artery Dis* 24 (2013) 549–558.
- [37] J. Zhang, Y. Peng, M. Guo, C. Li, Large-Scale Expansion of Human Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stem Cells in a Stirred Suspension Bioreactor Enabled by Computational Fluid Dynamics Modeling, *Bioengineering* 2022, Vol. 9, Page 274 9 (2022)

- [38] M.G. Jankovic, M. Stojkovic, S. Bojic, N. Jovicic, M.M. Kovacevic, Z. Ivosevic, A. Juskovic, V. Kovacevic, B. Ljubic, Scaling up human mesenchymal stem cell manufacturing using bioreactors for clinical uses, *Curr Res Transl Med* 71 (2023).
- [39] F. Petry, D. Salzig, Impact of Bioreactor Geometry on Mesenchymal Stem Cell Production in Stirred-Tank Bioreactors, *Chemie Ingenieur Technik* 93 (2021) 1537–1554.
- [40] J. de Sá da Silva, A. Mizukami, L. V. Gonzalez Gil, J. Valeria de Campos, O. B.G. Assis, D. Tadeu Covas, K. Swiech, C.A. Torres Suazo, Improving wave-induced motion bioreactor performance for human mesenchymal stromal cell expansion, *Process Biochemistry* 84 (2019) 143–152.
- [41] M.P. Hanga, J. Ali, P. Moutsatsou, F.A. de la Raga, C.J. Hewitt, A. Nienow, I. Wall, Bioprocess development for scalable production of cultivated meat, *Biotechnol Bioeng* 117 (2020) 3029–3039.
- [42] R.E. Rogers, A. Haskell, B.P. White, S. Dalal, M. Lopez, D. Tahan, S. Pan, G. Kaur, H. Kim, H. Barreda, S.L. Woodard, O.R. Benavides, J. Dai, Q. Zhao, K.C. Maitland, A. Han, Z.L. Nikolov, F. Liu, R.H. Lee, C.A. Gregory, R. Kaunas, A scalable system for generation of mesenchymal stem cells derived from induced pluripotent cells employing bioreactors and degradable microcarriers, *Stem Cells Transl Med* 10 (2021) 1650.
- [43] J. Malda, C.G. Frondoza, Microcarriers in the engineering of cartilage and bone, *Trends Biotechnol* 24 (2006) 299–304.
- [44] A.L. Van Wezel, Growth of cell-strains and primary cells on micro-carriers in homogeneous culture, *Nature* 216 (1967) 64–65.
- [45] Y. Zhou, Z. Yan, H. Zhang, W. Lu, S. Liu, X. Huang, H. Luo, Y. Jin, Expansion and delivery of adipose-derived mesenchymal stem cells on three microcarriers for soft tissue regeneration, *Tissue Eng Part A* 17 (2011) 2981–2997.
- [46] B. Koh, N. Sulaiman, M.B. Fauzi, J.X. Law, M.H. Ng, R.B.H. Idrus, M.D. Yazid, Three dimensional microcarrier system in mesenchymal stem cell culture: a systematic review, *Cell Biosci* 10 (2020) 75.

- [47] P. Gupta, G.N. Hall, L. Geris, F.P. Luyten, I. Papantoniou, Human Platelet Lysate Improves Bone Forming Potential of Human Progenitor Cells Expanded in Microcarrier-Based Dynamic Culture, *Stem Cells Transl Med* 8 (2019) 810–821.
- [48] J.D. Krutty, A.D. Dias, J. Yun, W.L. Murphy, P. Gopalan, Synthetic, Chemically Defined Polymer-Coated Microcarriers for the Expansion of Human Mesenchymal Stem Cells, *Macromol Biosci* 19 (2019).
- [49] H. Tanimowo Aiyelabegan, M. Ebadi, G. Ali Kardar, N. Lotfibakhshaiesh, F. Abedin Dorkoosh, S. Ebrahimi_Barough, E. Sadroddiny, k-Casein upregulates osteogenic differentiation on bone marrow mesenchymal stem cells cultured on agarose microcarriers, *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials* 69 (2020) 373–380.
- [50] S. Zhang, M. Zhou, Z. Ye, Y. Zhou, W.S. Tan, Fabrication of viable and functional pre-vascularized modular bone tissues by coculturing MSCs and HUVECs on microcarriers in spinner flasks, *Biotechnol J* 12 (2017).
- [51] M. Gümüşderelioglu, S. Çakmak, H.Ö. Timuçin, A.S. Çakmak, Thermosensitive PHEMA microcarriers: ATRP synthesis, characterization, and usabilities in cell cultures, *J Biomater Sci Polym Ed* 24 (2013) 2110–2125.
- [52] S.L. Ding, X. Liu, X.Y. Zhao, K.T. Wang, W. Xiong, Z.L. Gao, C.Y. Sun, M.X. Jia, C. Li, Q. Gu, M.Z. Zhang, Microcarriers in application for cartilage tissue engineering: Recent progress and challenges, *Bioact Mater* 17 (2022) 81–108.
- [53] Z. Zhou, W. Wu, J. Fang, J. Yin, Polymer-based porous microcarriers as cell delivery systems for applications in bone and cartilage tissue engineering, *International Materials Reviews* 66 (2021) 77–113.
- [54] R. Kuang, Z. Zhang, X. Jin, J. Hu, M.J. Gupte, L. Ni, P.X. Ma, Nanofibrous spongy microspheres enhance odontogenic differentiation of human dental pulp stem cells, *Adv Healthc Mater* 4 (2015) 1993–2000.
- [55] Sargon B, Hasarlı Omurilik Onarımı İçin Hücre Destekli Enjekte Edilebilir İpek Fibroin Mikrotaşıyıcıların Geliştirilmesi, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2023.

- [56] B. Li, X. Wang, Y. Wang, W. Gou, X. Yuan, J. Peng, Q. Guo, S. Lu, Past, present, and future of microcarrier-based tissue engineering, *J Orthop Translat* 3 (2015) 51–57.
- [57] N. Aware, T. Pant, R. Jain, P. Dandekar, Polymethylmethacrylate Copolymer-Based Microcarriers for Culturing Mammalian Cells, *J Pharm Innov* 17 (2021) 1–11.
- [58] A. Veiga, F. Castro, F. Rocha, A. Oliveira, Silk-based microcarriers: current developments and future perspectives, *IET Nanobiotechnol* 14 (2020)
- [59] A.S. Çakmak, *Biyofiziksel ve Biyokimyasal Uyarımlarla Desteklenmiş Doku İskeleleri ile Mezenkimal Kök Hücrelerin Osteojenik Farklılaşmasının İncelenmesi*, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2014.
- [60] P.J. Babu, L. Suamte, Applications of silk-based biomaterials in biomedicine and biotechnology, *Engineered Regeneration* 5 (2024) 56–69.
- [61] L. Ma, W. Dong, E. Lai, J. Wang, Silk fibroin-based scaffolds for tissue engineering, *Front Bioeng Biotechnol* 12 (2024).
- [62] K.A. Luetchford, J.B. Chaudhuri, P.A. De Bank, Silk fibroin/gelatin microcarriers as scaffolds for bone tissue engineering, *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 106 (2020).
- [63] J. Qu, L. Wang, Y. Hu, L. Wang, R. You, M. Li, Preparation of Silk Fibroin Microspheres and Its Cytocompatibility, *J Biomater Nanobiotechnol* 04 (2013) 84–90.
- [64] S. Perteghella, E. Martella, L. De Girolamo, C.P. Orfei, M. Pierini, V. Fumagalli, D.V. Pintacuda, T. Chlapanidas, M. Viganò, S. Faragò, M.L. Torre, E. Lucarelli, Fabrication of Innovative Silk/Alginate Microcarriers for Mesenchymal Stem Cell Delivery and Tissue Regeneration, *Int J Mol Sci* 18 (2017).
- [65] S. Duchi, F. Piccinini, M. Pierini, A. Bevilacqua, M.L. Torre, E. Lucarelli, S. Santi, A new holistic 3D non-invasive analysis of cellular distribution and motility on fibroin-alginate microcarriers using light sheet fluorescent microscopy, *PLoS One* 12 (2017).

- [66] J.E. Millán-Rivero, C.M. Martínez, P.A. Romecín, S.D. Aznar-Cervantes, M. Carpes-Ruiz, J.L. Cenis, J.M. Moraleda, N.M. Atucha, D. García-Bernal, Silk fibroin scaffolds seeded with Wharton's jelly mesenchymal stem cells enhance re-epithelialization and reduce formation of scar tissue after cutaneous wound healing, *Stem Cell Res Ther* 10 (2019) 1–14.
- [67] D.N. Rockwood, R.C. Preda, T. Yücel, X. Wang, M.L. Lovett, D.L. Kaplan, Materials fabrication from *Bombyx mori* silk fibroin, *Nat Protoc* 6 (2011) 1612–1631.
- [68] Demir H., Biyofiziksel ve biyokimyasal uyarımlarla desteklenmiş doku iskeleleri ile mezenkimal kök hücrelerin osteojenik farklılaşmasının incelenmesi, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2014.
- [69] M. Ghasemi, T. Turnbull, S. Sebastian, I. Kempson, The mtt assay: Utility, limitations, pitfalls, and interpretation in bulk and single-cell analysis, *Int J Mol Sci* 22 (2021) 12827.
- [70] X.S. Zhan, S. El-Ashram, D.Z. Luo, H.N. Luo, B.Y. Wang, S.F. Chen, Y.S. Bai, Z.S. Chen, C.Y. Liu, H.Q. Ji, A Comparative Study of Biological Characteristics and Transcriptome Profiles of Mesenchymal Stem Cells from Different Canine Tissues, *Int J Mol Sci* 20 (2019).
- [71] J.R. Smith, K. Pfeifer, F. Petry, N. Powell, J. Delzeit, M.L. Weiss, Standardizing Umbilical Cord Mesenchymal Stromal Cells for Translation to Clinical Use: Selection of GMP-Compliant Medium and a Simplified Isolation Method, *Stem Cells Int* 2016 (2016).
- [72] E.L. Roberts, S.I.M. Lepage, T.G. Koch, M.S. Kallos, Bioprocess development for cord blood mesenchymal stromal cells on microcarriers in Vertical-Wheel bioreactors, *Biotechnol Bioeng* 121 (2024) 192–205.

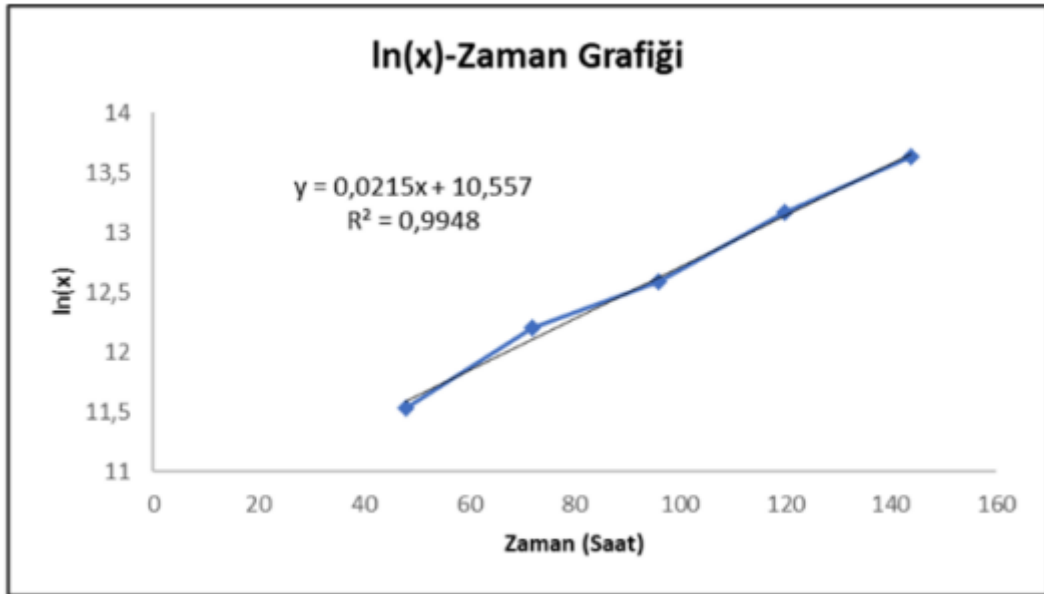
EKLER

EK-1 Göbek Kordonu Mezenkimal Kök Hücrelerin;

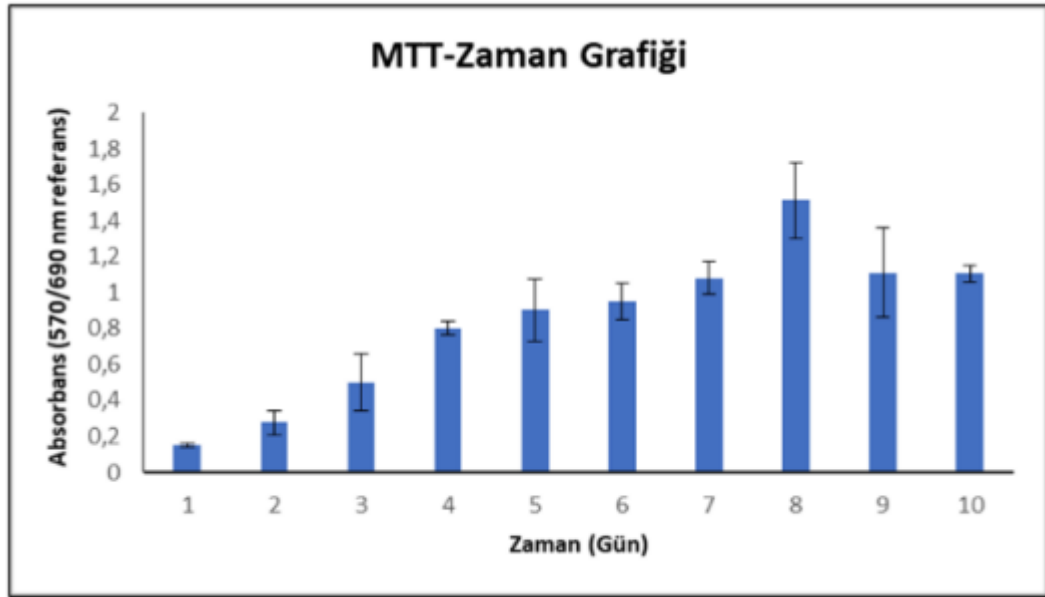
- Hücre Sayısı-Zaman Grafiği



- Ln(x)-Zaman Grafiği

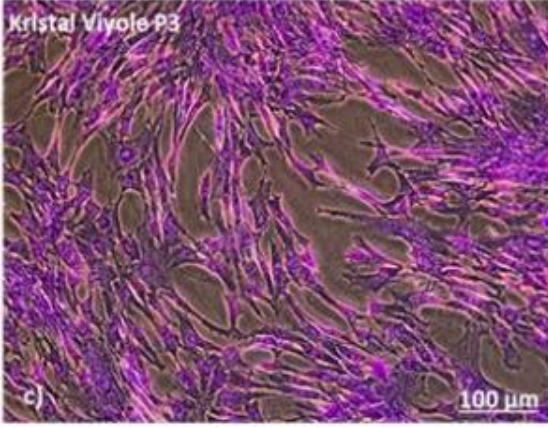


- MTT-Zaman Grafiği

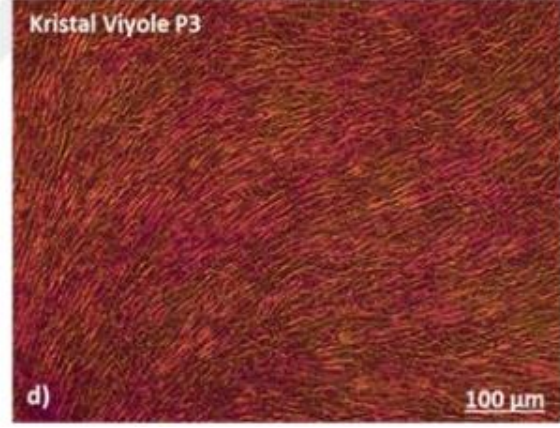


EK-2 Göbek Kordonu Mezenkimal Kök Hücrelerin Kristal Viyole Boyama Görüntüleri

1.Gün



7.Gün



EK-3 Göbek Kordonu Mezenkimal Kök Hücrelere Ait Akış Sitometrisi Sonuçları

