



## **Lif Kabağı Takviye Edilmiş Kitosan-İpek Hidrojel Kompozit Doku İskelelerinin Kıkırdak Doku Hasarı Tedavisinde Kullanımının Araştırılması**

### **Investigation of the Loofah Reinforced Chitosan-Silk Hydrogel Composite Scaffolds for Cartilage Tissue Regeneration**

**Oylum Çolpankan Güneş<sup>1</sup> , İbrahim Erkut Özer<sup>1</sup> , Aysin Kara<sup>2</sup> , Aysin Ziyilan Albayrak<sup>1\*</sup> , Hasan Havitçioğlu<sup>3</sup> **

<sup>1</sup> Dokuz Eylül Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Metalurji ve Malzeme Mühendisliği Bölümü, İzmir, TÜRKİYE

<sup>2</sup> İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Biyoteknoloji ve Biyomühendislik Programı, Urla, İzmir, TÜRKİYE

<sup>3</sup> Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı, İzmir, TÜRKİYE

Sorumlu Yazar / Corresponding Author \*: [aylin.albayrak@deu.edu.tr](mailto:aylin.albayrak@deu.edu.tr)

Geliş Tarihi / Received: 12.11.2020

Araştırma Makalesi/Research Article

Kabul Tarihi / Accepted: 22.04.2021

DOI:10.21205/deufmd.2021236921

*Atıf şekli/How to cite:* GÜNEŞ O.Ç., ÖZER İ.E., KARA A., ZIYILAN ALBAYRAK A., HAVİTÇİOĞLU H.(2021). Lif Kabağı Takviye Edilmiş Kitosan-İpek Hidrojel Kompozit Doku İskelelerinin Kıkırdak Doku Hasarı Tedavisinde Kullanımının Araştırılması. DEÜFMD 23(69), 937-950.

#### **Öz**

Kıkırdak doku hasarlarının onarılmasındaki mevcut tedaviler, kıkırdağın kendi kendini iyileştirme kapasitesinin düşük olması nedeniyle sınırlıdır. Son yıllarda doku mühendisliği, kıkırdak rejenerasyonu için umut verici bir yaklaşım olarak önerilmektedir. Bu çalışmada, kıkırdak doku hasarları için lif kabağı ile güçlendirilmiş ipek fibroin/kitosan hidrojeller hazırlanmıştır. Biyoyumlu, biyolojik olarak parçalanabilir ipek fibroin ve kitosan polimerleri, doğal ve toksik olmayan bir çapraz bağlama maddesi olan genipin ile çapraz bağlanmıştır. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve Fourier Dönüşümü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) sırasıyla morfoloji ve kimyasal yapı karakterizasyonu için kullanılmıştır. Viskoelastik özelliklerin belirlenmesi için dinamik mekanik analiz cihazı (DMA) kullanılırken, iskelelerin mekanik özelliklerini incelemek için basma testi kullanılmıştır. Doku iskelelerinin sitotoksitesi, hücre canlılığı ve çoğalması tavşan mezenkimal kök hücreleri kullanılarak LDH, WST ve kollajen testi ile araştırılmıştır. Üretilen hidrojel kompozit doku iskelelerinin tamamının birbirine bağlı mikro gözenekli bir yapıya sahip olduğu ve lif kabaklarının yapıya iyi entegre olduğu görülmektedir. Ağırlıkça %0,3 genipin ile çapraz bağlanan hidrojel kompozit doku iskelesi (L-CSG3), eklem kıkırdağıyla karşılaştırılabilir su içeriği (94,4±% 0,2), tan δ (1 Hz'de 0,18) ve basma modülü (5,5 MPa) değerleri göstermiştir. Ayrıca, *in-vitro* test sonuçlarına göre, bu hidrojel kompozit doku iskelesi, tavşan mezenkimal kök hücrelerinde gelişmiş canlılık göstermiştir. Sonuç olarak, bu hidrojel kompozit doku iskelesi, kıkırdak dokusu rejenerasyonu için umut vaat ettiği söylenebilir.

**Anahtar Kelimeler:** Lif kabağı, kitosan, ipek, hidrojel doku iskelesi, kıkırdak rejenerasyonu

#### **Abstract**

Current therapies for the treatment of cartilage defects are limited due to the low self-healing capacity of cartilage. In recent years, tissue engineering has been proposed as a promising approach for cartilage regeneration. In this study, silk fibroin/chitosan hydrogels reinforced with luffa cylindrica

were prepared for cartilage tissue defects. Biocompatible, biodegradable silk fibroin and chitosan polymers were cross-linked with genipin which is a natural and nontoxic cross-linking agent. Scanning electron microscopy (SEM) and Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) were used for the characterization of the morphology and chemical structures, respectively. Dynamic mechanical analysis was used to determine the viscoelastic properties, while compression test was applied to examine the mechanical properties of the scaffolds. The cytotoxicity, viability and proliferation of rabbit mesenchymal stem cells on the scaffolds were investigated by LDH, WST, and collagen assay. All of the produced hydrogel composite scaffolds had an interconnected microporous structure and loofah nanofibers were well-integrated within the structure. The hydrogel composite scaffold cross-linked with 0.3% wt. genipin (L-CSG3) demonstrated comparable water content (94.4±0.2%),  $\tan \delta$  (0,18 at 1 Hz) and compressive modulus (5,5 MPa) values to that of articular cartilage. Besides, based on the *in-vitro* test results, this hydrogel composite scaffold showed enhanced viability on rabbit mesenchymal stem cells. Consequently, this hydrogel composite scaffold presented a great promise for cartilage tissue regeneration.

**Keywords:** *Loofah, chitosan, silk, hydrogel scaffold, cartilage regeneration*

## 1. Giriş

Kollajen lifleri, proteoglikanlar ve sudan oluşan kırıkdağlı bir matristen (ECM) ve matris içinde dağılmış kondrositlerden oluşan eklem kırıkdağı; kemikleri bir arada tutma, tekrarlayan yüklemelere dayanma ve eklem kısmını darbeye dayanıklı hale getirme gibi işlevlere sahiptir. Ancak, doğrudan kan veya sinir kaynağının olmaması nedeniyle kendi kendini onarma yeteneği sınırlıdır [1,2]. Kırıkdağ hasarında kullanılan geleneksel teknikler, uzun ömürlü kırıkdağ dokusu oluşturmak için çok başarılı olmamakta ve ayrıca ağrı, donör bölge morbiditesi ve enfeksiyon riski gibi yan etkiler de göstermektedirler [3]. Son yıllarda doku mühendisliği, kırıkdağ rejenerasyonu için umut verici bir yaklaşım olarak önerilmektedir [4]. Hücre tutunması, çoğalması, farklılaşması ve yeni doku oluşumu için üç boyutlu bir mikro ortam sağlamayan doku iskelesi, biyoyumlu, biyolojik olarak parçalanabilir ve besinlerin ve oksijenin verimli bir şekilde taşınmasına izin vermek için gözenekli yapıda olmalıdır [5]. Doku iskelesi ayrıca kondrosit hücre davranışını modüle etmek için kırıkdağ hücre dışı matriksin bileşimini, yapısını, morfolojisini ve biyoaktivitesini taklit etmelidir [6]. Doğal bir polisakkarit olan kitosan, kırıkdağ ECM'indeki glikozaminoglikanlara yapısal benzerliği, biyobozunur ve biyoyumlu özellikleri nedeni ile büyük ilgi görmektedir [7]. Lifsi bir protein olarak tanımlanan ipek biyopolimeri, biyoyumluluğu, biyobozunurluğu ve fonksiyonel modifikasyonlar için kolayca erişilebilir kimyasal gruplarının varlığı nedeniyle biyomedikal uygulamalarda yaygın

olarak kullanılmaktadır [8]. Doğal biyopolimerler, her ne kadar yüksek biyoyumlulukları nedeni ile tercih edilseler de mekanik özellikleri yeterli değildir. Bu nedenle, kompozit doku iskeleleri, yüksek biyoyumluluğu korurken, istenen mekanik özellikleri sağlamak için önemli hale gelmiştir [9]. Kırıkdağlı ECM'nin kompozit yapısı, özellikle dinamik yükleme sırasında, yük taşıyan eklemlerde kritik bir rol oynamakta ve ayrıca, viskoelastisite ve gerilim gevşemesi gibi karmaşık mekanik özellikler sağlamaktadır. Bu nedenle, kırıkdağ doku mühendisliği için biyomimetik fiber takviyeli hidrojel doku iskelelerin geliştirilmesi büyük önem taşımaktadır [10,11]. Lif kabağı, Cucurbitaceae bitki ailesine ait olan ve ağırlıklı olarak selüloz/hemiselüloz ve ligninden oluşan bir bitkidir. Liflerin çok yönlü bir dizide yerleştirilerek doğal bir mat oluşturduğu odunsu bir ağ sistemine sahiptir [12]. Hidrojeller, hidratlı yapıları ile kırıkdağ ECM'nin hidrofilik ortamı arasındaki benzerlik nedeniyle kırıkdağ doku iskelesi olarak büyük ilgi görmektedir. Hidrojeller, şişmiş hallerinde büyük miktarda su ve biyolojik sıvıyı tutabilen hafif çapraz bağlı, üç boyutlu ve çözünmez polimer ağlarıdır [13]. Doğal organik bir bileşik olan genipin, düşük sitotoksitesinden dolayı yaygın bir çapraz bağlayıcı olarak kullanılmaktadır [14]. Bu çalışmada, lif kabağı takviye edilmiş genipin ile çapraz bağlanmış üç boyutlu ve gözenekli ipek fibroin/kitosan hidrojel kompozit doku iskeleleri üretilmiş ve yapılan morfoloji, viskoelastik özellik ve basma dayanımı, biyoyumluluk çalışmaları ile kırıkdağ doku hasarlarında kullanılabilirliği araştırılmıştır.

## 2. Materyal ve Metot

### 2.1. Materyaller

Çalışmada kullanılan kitosan (yüksek moleküler ağırlıklı, deasetilasyon derecesi  $\geq 75$ ), asetik asit ve ipek çözeltisinin elde edilmesi sırasında kullanılan selüloz membran Sigma-Aldrich şirketinden satın alınmıştır. Bombyx mori ipek kozaları ve lif kabağı Kuzey Kıbrıs Türk Cumhuriyetinden tedarik edilmiştir. İpek çözeltisini hazırlamak için kullanılan, sodyum karbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), kalsiyum klorür ( $\text{CaCl}_2$ ) ve lif kabaklarının hazırlanmasında kullanılan sodyum hidroksit ( $\text{NaOH}$ ) Merck şirketinden satın alınmıştır. Doku iskelelerinin çapraz bağlanması işleminde kullanılan genipin ise Wako Chemicals şirketinden tedarik edilmiştir.

Hücre kültürü çalışmalarında, DMEM-HG ve MEM besi ortamları ve tamamlayıcı kimyasallar Biochrome şirketinden satın alınmıştır. Farklılaştırma ajanı olarak kullanılan transforme edici büyüme faktörü- $\beta$  (TGF $\beta$ ), insülin büyüme faktörü (IGF), ITS+Premiks, isobütil-metilksantin ve indometasin Cell Signaling firmasından; hücre farklılaşmasının tayini için kullanılan alizarin kırmızısı, alcian mavisi, Oil red O boyaları Sciencell firmasından temin edilmiştir. Akım sitometrik analizlerde kullanılan yüzey işaretleyiciler; CD 73 (APC anti-rabbit IgG1), CD 90 (FITC anti-rabbit IgG1), CD 34 (PE anti-rabbit IgG1), CD 45 (PerCP/Cy5.5 anti-rabbit IgG1) Abcam şirketinden satın alınmıştır. *In-vitro* analizlerde Laktat dehidrogenaz (LDH) Sitotoksizite Kit (Pierce LDH Cytotoxicity Assay Kit, Thermo Scientific), WST-1 Colorimetric Assay Kit (Biovision Inc.), Hidroksiprolin Colorimetric Assay Kit (Elabscience Biotechnology Inc.) kullanılmıştır. Mezenkimal kök hücrelerin elde edilmesi için Yeni Zellanda Beyaz tavşanlar (dişi, 3.5-4 kg, n=3) Dokuz Eylül Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Bilimi Anabilim Dalı'ndan temin edilmiştir. Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 49/2014 protokol numaralı izni ile uygun cerrahi ve post cerrahi işlemler kapsamında çalışmalar yürütülmüştür.

### 2.2. Hidrojel kompozit doku iskelesi üretimi

#### 2.2.1. Lif kabağının hazırlanması

Çekirdekleri temizlenip, kesilen lif kabakları, üzerindeki yapışkan kısmın giderilmesi için ağırlıkça %2'lik sodyum hidroksit ( $\text{NaOH}$ )

çözeltisi içerisinde 2 saat bekletilmiştir. Ardından, lif kabakları, nötral pH değeri elde edilene kadar saf su ile yıkanmış ve 60°C sıcaklıkta vakum etüvünde 24 saat boyunca kurutulmuştur. 3 cm çapında kesilerek hazırlanan lif kabakları, doku iskelesinde takviye malzemesi olarak kullanılmıştır.

#### 2.2.2. Çözeltilerin hazırlanması

Hacimde ağırlıkça %1'lik ipek çözeltisi elde etmek için ilk olarak, 1x1 cm boyutunda kesilen ham ipek kozaları, üzerindeki serisin adı verilen yapışkan maddenin giderilmesi için 0,01 M sodyum karbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) çözeltisi içerisinde 70°C'de 3 saat karıştırılarak "degumming" adı verilen bir işleme tabi tutulmuştur. Bu işlem, üç kez tekrarlanmış ve ardından saf su ile yıkama gerçekleştirilmiştir. Daha sonra, serisinden arındırılmış ipek lifleri  $\text{CaCl}_2/\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$  üçlü çözeltisi içerisinde (1/2/8 molar oranı) 70°C'de 6 saat boyunca çözündürülmüştür. Elde edilen ipek çözeltisi, filtreleme işlemi ardından saf su içerisinde selüloz membran yardımı ile 3 gün boyunca diyalize tabi tutulmuştur. Kitosan çözeltisi ise, %2'lik asetik asit çözeltisi içerisinde ağırlıkça %1 kitosan olacak şekilde 50°C sıcaklıkta 3 saat karıştırılarak hazırlanmıştır. Homojen bir çözelti elde etmek için karıştırma işlemi oda sıcaklığında gece boyunca devam ettirilmiştir.

#### 2.2.2. Hidrojel doku iskelesinin üretilmesi

Hidrojel doku iskeleleri elde etmek için ilk olarak gözenekli kitosan-ipek ve lif kabağı takviyeli kitosan-ipek süngerler üretilmiş ve daha sonra süngerler genipin ile kovalent olarak çapraz bağlanmıştır.

İlk olarak, hazırlanan kitosan ve ipek çözeltileri hacimce 1:1 oranında karıştırılmıştır. Ardından hazırlanan homojen karışımın 4 ml'si cam şişe içerisindeki lif kabaklarına ilave edilmiş ve gece boyunca bekletilmiştir. Süngerler, -60°C sıcaklık ve 0,1 mbar basınç altında 2 gün boyunca dondurarak kurutma işlemi sonucunda elde edilmiştir. Süngerlere ipeğin suda çözünmeyen  $\alpha$ -düzensiz sarmal yapısından suda çözünmeyen  $\beta$ -tabakalı yapısına dönüşmesinin sağlanması için 1 saatlik metanol işlemi uygulanmıştır. Daha sonra süngerler, asetik asidin ve metanolün giderilmesi amacı ile, giderek azalan etanol oranlı (%80, %60, %40, %20 ve %0 etanol) etanol-su karışımlarıyla yıkanmıştır. Kontrol grubu olarak lif kabağı takviye edilmemiş kitosan-ipek süngerler üretilmiştir.

Hidrojel yapıda doku iskelelerinin elde edilmesi için çapraz bağlayıcı olarak genipin kullanılmıştır. Farklı konsantrasyonlardaki genipin çözeltileri (%0,1, 0,3 ve 0,5 ağırlık/hacim oranlarında), genipinin fosfat tamponlu salin (PBS) çözeltisi içerisinde oda sıcaklığında çözünmesi ile elde edilmiştir. Kontrol grubuna ve hazırlanan lif kabağı takviyeli kompozit süngerlere 4 ml genipin çözeltisi ilave edilip, 48 saat gözlem sonucunda çapraz bağlanma süresi optimize edilmiştir.

### 2.3. Hidrojel doku iskelelerinin karakterizasyonu

Doku iskelelerinin morfoloji karakterizasyonları taramalı elektron mikroskobu (SEM, JEOL JSM-6060) kullanılmıştır. Görüntüleme öncesinde doku iskeleleri püskürtümlü kaplama cihazı (Quorum Technologies, SC7620) kullanılarak altın/paladyum ince film tabakasıyla kaplanmıştır.

Üretilen doku iskelelerinin kimyasal yapı analizleri ATR ünitesi eklentili Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (ATR-FTIR) (Perkin Elmer Spectrum BX) cihazı ile gerçekleştirilmiştir. FTIR analizleri her örnek için 4000-650 cm<sup>-1</sup> dalga boyu aralığında, 4 cm<sup>-1</sup> çözünürlükte ve 25 tarama ile yapılmıştır.

Şişme testleri PBS çözeltisi içerisinde gerçekleştirilmiştir. Hazırlanmış olan doku iskelelerinin kuru ağırlıkları ( $w_0$ ) ölçüldükten sonra örnekler, 37°C'de 24 saat boyunca PBS çözeltisi içerisinde bekletilmiştir. Örnekler üzerindeki fazla sıvının filtre kağıdı yardımıyla alınmasının ardından örneklerin yaş ağırlıkları ( $w_s$ ) ölçülmüştür. Doku iskelelerinin şişme oranı ve su içerikleri sırası ile denklem 1 ve denklem 2 kullanılarak elde edilmiştir.

$$\text{Şişme oranı (\%)} = \frac{(w_s - w_0)}{w_0} \times 100 \quad (1)$$

$$\text{Su içeriği (\%)} = \frac{(w_s - w_0)}{w_s} \times 100 \quad (2)$$

Kompozit hidrojel doku iskelelerinin viskoelastik özellikleri, basma modunda vücut sıcaklığı olan 37°C'de ve yetişkin bir insanın yürüme ve koşma adım frekans değerlerini de içeren alan 0,1 Hz ile 100 Hz arasında dinamik frekans tarama modu kullanılarak dinamik mekanik analiz (DMA) cihazı (TA, Q800) ile

belirlenmiştir. Analiz sonunda örneklerin depolama (E') ile kayıp modülleri (E'') ölçülmüş ve sönümlenme kapasitesinin bir ölçüsü olan tan  $\delta$  (E''/E') değerleri hesaplanmıştır.

Doku iskelelerinin bası yüklemeleri altındaki mekanik özelliklerinin tayini için basma testi uygulanmıştır. Basma testinde, 10 mm çapında ve 5 mm kalınlığındaki silindirik numuneler, %80 deformasyona kadar 0,5 mm/s'lik sabit bir hız ile sıkıştırılmıştır. Bütün deneyler, oda sıcaklığında üç tekrarlı gerçekleştirilmiştir. Doku iskelelerin basma modülleri gerilim-gerinim eğrilerinin başlangıç doğrusal bölgesinin eğimi alınarak hesaplanmıştır.

### 2.4. *In-vitro* hücre kültürü çalışmaları

Elde edilen doku iskelelerinin hücre kültürü çalışmaları için tavşan mezenkimal kök hücreler (tMKH) kullanılmıştır. tMKH'leri Yeni Zelanda Beyaz tavşanlarının aksiyel iskeletinden elde edilmiştir. İlk olarak, tavşanlar steril koşullarda 5 mg/kg ksilazin ve 35 mg/kg ketamin ile anestezi altına alınmıştır. Deri dezenfekte edildikten sonra lomber bölgesinin arkasından sırasıyla cilt, cilt altı, kemik zarı ve kemiğe girilerek, kemik iliği 1,5 mm biyopsi iğnesi kullanılarak heparin içeren enjektörlere toplanmıştır. Tavşanlardan elde edilen kemik iliği aspirasyonu tMKH'lerin izolasyonu için hücre kültürü laboratuvarına transfer edilmiştir. Hücre kültürü çalışmaları Dokuz Eylül Üniversitesi, Biyomekanik Anabilim Dalı'nda bulunan GMP laboratuvarında aseptik koşullara uygun olarak gerçekleştirilmiştir.

#### 2.4.1. tMKH ların izolasyonu

Tavşanlardan elde edilen kemik iliği Biocool Separation kullanılarak densite gradient yöntemi ile tabakalandırılmış ve 3000 rpm'de santrifüj edilerek mononükleer tabaka toplanmıştır. Elde edilen hücreler %10 FBS (fetal sığır serumu), %1 penisilin- streptomisin ve 200 mM L-glutamin ile desteklenmiş DMEM-HG büyüme ortamı ile 37°C sıcaklıkta %5 CO<sub>2</sub> ve %95 nem içeren inkübatörde 14 gün boyunca kültüre edilmiştir. Hücre kültürünün devamlılığının sağlanması amacıyla büyüme ortamı haftada iki kez tazelenmiş ve kültür süresince hücreler inverted mikroskop ile gözlenmiştir.

#### 2.4.2. tMKH ların akım sitometrik analizi

tMKH'lerin akım sitometrik analizleri, 3. pasaj sonrasında, FACS AriaIII akım sitometri cihazı

kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Hücreler Tripsin/EDTA kullanılarak tripsinizasyon işlemi ile kaldırılıp, sayım yapılmış ve hücre sayısı belirlendikten sonra ( $\sim 7 \times 10^6$  hücre) PBS içinde homojenize edilmiştir. Ardından tMKH'ler, CD 73 (APC), CD 90 (FITC), CD 34 (PE), CD 45 (PerCP/Cy5.5) tavşan hücre yüzey belirteçlerine özel monoklonal antikolar ile işaretlenmiştir. 20 dakika boyunca oda sıcaklığında, karanlıkta inkübe edilen hücreler 1200 rpm'de 5 dakika santirüj edilerek yıkanmıştır. Hücreler FACS Aria III akım sitometri cihazı ile önce tanımlanmış ardından hücre ayırılma işlemi yapılarak ayrılmıştır. Ardından FaxDiva Software programı ile veriler elde edilmiştir.

#### 2.4.3. Tavşan mezenkimal kök hücrelerin farklılaştırılması

Farklılaşma kapasitelerinin belirlenmesi için hücreler osteojenik, kondrojenik ve adipojenik olarak farklılaştırılmıştır. Hücreler 3. pasaj sonrasında 6 kuyucuklu kültür kabına 3000 hücre/ml konsantrasyonda ekilmiş, osteojenik, kondrojenik ve adipojenik farklılaşma besi yerleri içerisinde  $37^\circ\text{C}$  ve %5  $\text{CO}_2$  içeren inkübatörde kültüre edilmiştir.

tMKH'lerin osteojenik farklılaşması için, hücreler 100 nM dexamethasone, 0.05  $\mu\text{M}$  askorbik asit, 10 mM  $\beta$ -gliserofosfat, %1 penisilin-streptomisin, 200mM L-glutamin ve %10 FBS içeren MEM kültür medyumunda inkübe edilmiştir. Kültürün 4. haftasında kalsifikasyon bölgelerinin incelenmesi amacıyla hücreler alizarin kırmızısı ile boyanarak osteojenik farklılaşma ışık mikroskopunda gözlenmiştir.

tMKH'lerin kondrojenik farklılaşması için, içerisinde %10 FBS, %1 penisilin-streptomisin, 100  $\mu\text{M}$  deksametazon, 10 ng/ml TGF $\beta$ , 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  askorbik asit ve 50 mg/ml ITS+Premiks bulunan DMEM-HG kırkırdaklaşma ortamı kullanılmıştır. Kültürün 4. haftası sonunda, kondrositler tarafından üretilen proteoglikanların varlığının belirlenmesi için alcian mavisi ile boyanarak ışık mikroskobu kullanılarak incelenmiştir.

tMKH'leri adipojenik farklılaşması için, %10 FBS, 200mM L-glutamin, 0.5mM isobutilmetilksantin, 10M deksametazon, 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  IGF, 200  $\mu\text{M}$  indometasin ve %1 penisilin-streptomisin eklenmiş MEM besi ortamı kullanılmıştır. Kültürün 4. haftası sonunda, intrasellüler yağ damlacıklarının varlığının

belirlenmesi için adipojenik farklılaşmayı gösteren Oil red O ile boyanmıştır.

#### 2.4.4. Doku iskelelerine tMKH'lerin ekimi

Hücre ekimi öncesinde elde edilen doku iskeleleri etilen oksit ile steril hale getirilmiştir. Hücre ekimi için tMKH'ler yukarıda verilen kondrojenik farklılaşma ortamında çoğaltılmış ve 4. hafta sonunda farklılaşmış kondrosit hücreleri kullanılmıştır. Hazırlanan doku iskeleleri ( $1 \times 1 \times 0,5 \text{ cm}^3$ ) üzerine,  $1 \times 10^6$  hücre/ml konsantrasyonda kondrosit hücreleri ekilmiştir. Doku iskeleleri kırkırdaklaşma ortamı içerisinde  $37^\circ\text{C}$ , %5  $\text{CO}_2$  içeren %95 nem içeren inkübatörde 14 gün boyunca inkübe edilmiştir.

#### 2.4.5. In-vitro sitotoksosite analizi

Doku iskelelerinin hücreler üzerindeki toksik etkisi hücre kültürün 3, 7 ve 14. günlerinde gerçekleştirilmiştir. İlk olarak Laktat dehidrojenaz (LDH) kiti içerisinde bulunan hücre lizis çözeltisi hücre medyumuna eklenmiş ve 45 dakika boyunca  $37^\circ\text{C}$ 'de inkübasyona bırakılmıştır. Ardından medyum içeriği 96 kuyucuklu plakalara alınarak içerisine reaksiyon karışımı eklenmiş ve 30 dakika boyunca inkübe edilmiştir. Inkübasyon sonunda ortama salınan LDH miktarı 490-680 nm dalga boyunda kolorimetrik olarak spektrofotometre (Sinergy HTX) ile ölçülmüştür.

#### 2.4.6. In-vitro proliferasyon analizi

Hidrojel doku iskelelerine ekilen hücrelerin proliferasyonu kültürün 3, 7 ve 14. günlerinde WST-1 kiti kullanılarak araştırılmıştır. Doku iskeleleri üzerine WST-1 boyası eklenerek 4 saat boyunca  $37^\circ\text{C}$ , %5  $\text{CO}_2$  içeren %95 nem içeren inkübatörde inkübe edilmiştir. Inkübasyon sonunda 440 nm dalga boyunda absorban ölçümleri yapılarak metabolik aktiviteye bağlı olarak hücrelerin proliferasyon kapasiteleri belirlenmiştir.

#### 2.4.7. Kollajen analizi

Doku iskelelerinin üzerine ekilen hücrelerinin ürettiği kollajen miktarı hidroksiprolin miktarına bağlı olarak hücre kültürünün 14 ve 21. günlerinde analiz edilmiştir. İlk olarak hücreler  $95^\circ\text{C}$ 'de hidroliz edilmiştir. Ardından kit talimatları uygulanarak örnekler hazırlanmış ve 550 nm dalga boyunda kolorimetrik ölçüm yapılarak total kollajen miktarı belirlenmiştir.

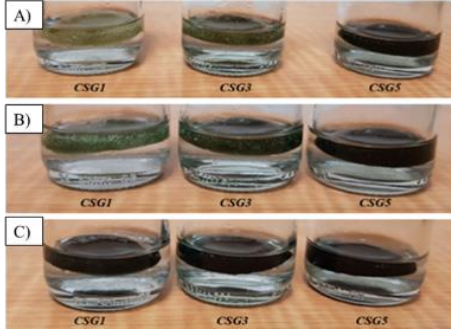
### 2.4.8. İstatistiksel analiz

*In-vitro* deneyler 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen deneysel veriler ortalama  $\pm$  standart sapma olarak gösterilmiştir. Gruplar arasındaki farklılıklar Tukey'in çoklu karşılaştırma testi ile tek yönlü varyans analizi (One-way Analysis of Variance (ANOVA) with Tukey's multiple comparison test) ile belirlenmiş ve  $p < 0,05$  anlamlılık düzeyi esas alınarak istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

### 3. Bulgular

#### 3.1. Hidrojel doku iskelelerinin karakterizasyonu

Doku iskeleleri kitosan-ipek polimerleri kullanılarak hazırlanmış, genipin çapraz bağlayıcısı kullanılarak hidrojel özellik kazandırılmıştır. Çalışmada ilk olarak çapraz bağlanma süresi optimize edilmiştir. Tablo 1'de doku iskelelerinin isimlendirilmeleri ve ilave edilen genipinin konsantrasyonları verilmektedir. Şekil 1A, B ve C'de ilave edilen genipin çözeltisi sonrasındaki kitosan-ipek süngerlerin sırası ile 12, 24 ve 48 saat sonundaki görüntüleri yer almaktadır. 48 saat sonunda tüm süngerlerde renk değişiminin gerçekleşmesiyle, kovalent çapraz bağlanmalar tamamlanmıştır.



**Şekil 1.** CS süngerlerin genipin ilavesi sonrası A) 12 saat, B) 24 saat, C) 48 saat sonraki görüntüleri

#### 3.1.1. Morfoloji karakterizasyonu

Çalışmada üretilen hidrojel doku iskelelerinin SEM analizi sonuçları incelendiğinde, bütün doku iskelelerinin açık gözenekli bir yapıya sahip olduğu görülmektedir (Şekil 2). Kontrol grubuna ait SEM görüntülerinde CSG3 doku iskelesinde göreceli olarak daha homojen bir gözenek yapısının elde edildiği görülmektedir. Üretilen kompozit doku iskelelerinde katkı

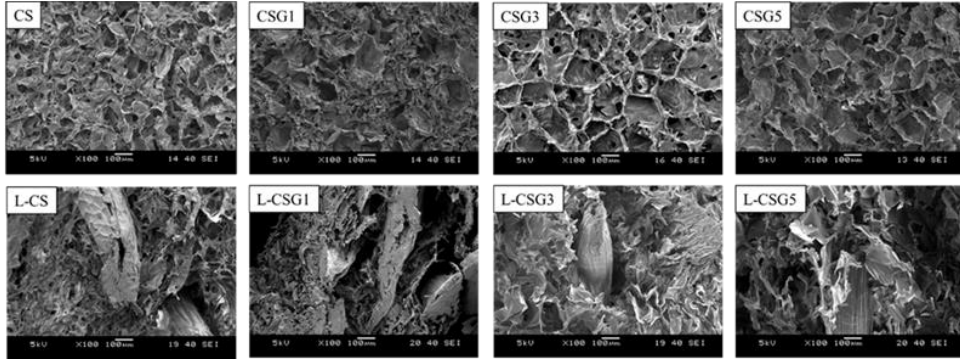
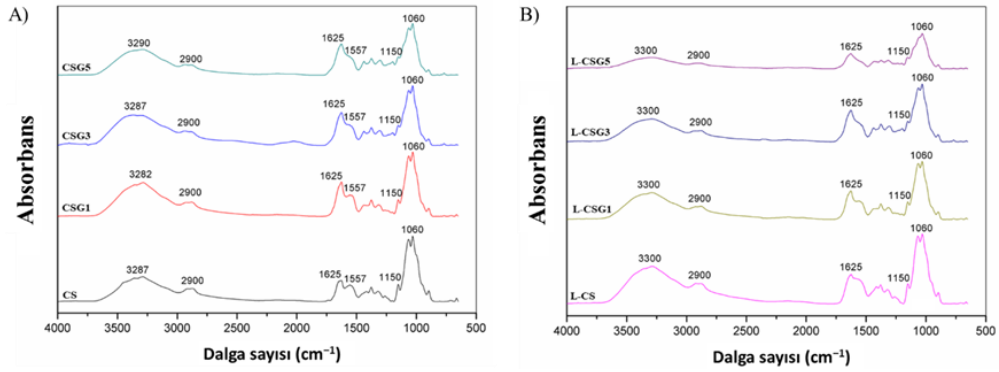
elemanı olarak kullanılan lif kabağının, kitosan-ipek matrisiyle entegrasyonu sağlamak en önemli unsurdur. Farklı genipin konsantrasyonlarında üretilen doku iskelelerinin SEM görüntüleri incelendiğinde, lif kabaklarının kitosan-ipek matrisi içerisine entegre olduğu gözlenmiştir.

#### 3.1.2. Kimyasal yapı karakterizasyonu

Kitosan-ipek ve lif kabağı katkılı kitosan-ipek hidrojel kompozit doku iskelelerine ait FTIR spektrumları sırası ile Şekil 3A ve B'de verilmektedir. 3400-3000  $\text{cm}^{-1}$  (O-H, N-H gerilme), ~1640  $\text{cm}^{-1}$  (amid, C=O gerilme), ~1560  $\text{cm}^{-1}$  (N-H gerilme) ve 1100-1000  $\text{cm}^{-1}$  (C-O gerilme) pikleri, kitosanın karakteristik pikleri olup literatürde yer almaktadır [15]. Genipine ait karakteristik pikler ise ~1680  $\text{cm}^{-1}$  (ester, C=O gerilme), ~1620  $\text{cm}^{-1}$  (C=C gerilme), ~1080  $\text{cm}^{-1}$  (C-O gerilme) olarak belirtilmektedir [16]. Ayrıca lif kabağının FTIR absorpsiyon pikleri ise 3400-3200  $\text{cm}^{-1}$  (O-H gerilme), 2928 ve 2845  $\text{cm}^{-1}$  (C-H gerilme), 1737  $\text{cm}^{-1}$  (hemiselülozların ksilan bileşenindeki karbonil ve asetil gruplarının C=O gerilme titreşimi), 1257  $\text{cm}^{-1}$  (= C-O-C asimetrik gerilmesi) ve 1047  $\text{cm}^{-1}$  (C-O-C piranoz halka iskelet titreşimi) olarak verilmektedir [17]. Üretilen hidrojel doku iskelelerinin FTIR spektrumlarında, çapraz bağlanma reaksiyonu, amid (~1625  $\text{cm}^{-1}$ ) ve amino (~1557  $\text{cm}^{-1}$ ) absorpsiyon bantlarının yükseklikleri arasındaki orandaki bir artışla doğrulanabilir ve ayrıca genipin konsantrasyonunun artmasıyla bu oranın arttığı da görülmüştür. Ayrıca genipin konsantrasyonu arttıkça, genipin yapısında bulunan C-O germe bandındaki artışa bağlı olarak 1060  $\text{cm}^{-1}$ 'deki tepe de genişlemiştir. FTIR analizinde yaklaşık 1625  $\text{cm}^{-1}$  dalga sayısında, ipek ve kitosana ait amid bantları çakışmakta, bu sebeple ipek konformasyonu net olarak gözlenmemektedir. Ayrıca, lif kabağındaki hemiselülözün C=O gerilme bandı ile ilişkilendirilen 1735  $\text{cm}^{-1}$ 'deki tepe görülmemiştir, bu nedenle lif kabaklarına uygulanan NaOH işleminin başarı ile tamamlandığı sonucu çıkarılmıştır [18].

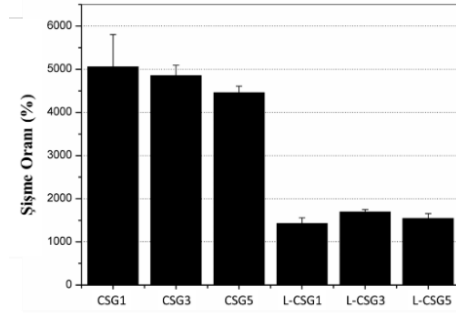
**Tablo 1.** Örnek isimlendirmeleri, içerikleri, genipin konsantrasyonları ve su içeriği

Örnek	İçerik	Genipin Konsantrasyonu (ağırlıkça % (w/v))	Su İçeriği (%)
CS	Kitosan-İpek	-	-
CSG1	Kitosan-İpek	0,1	98,0±0,3
CSG3	Kitosan-İpek	0,3	97,0±0,1
CSG5	Kitosan-İpek	0,5	97,8±0,1
L-CS	Lif kabağı- Kitosan-İpek	-	-
L-CSG1	Lif kabağı- Kitosan-İpek	0,1	93,4±0,6
L-CSG3	Lif kabağı- Kitosan-İpek	0,3	94,4±0,2
L-CSG5	Lif kabağı- Kitosan-İpek	0,5	93,9±0,4

**Şekil 2.** Kitosan-ipek ve lif kabağı katkıli kitosan-ipek hidrojel kompozit doku iskelelerinin SEM görüntüleri**Şekil 3.** A) Kitosan-ipek ve B) lif kabağı takviye edilmiş kitosan-ipek doku iskelelerinin FTIR spektrumları

### 3.1.3. Şişme testi

Tablo 1'den görüldüğü gibi, tüm hidrojel doku iskeleleri % 92 ile 98 su içeriğine sahiplerdir. Hidrojel doku iskelelerinin % şişme oranları incelendiğinde (Şekil 4), lif kabağı takviyesi olmayan kitosan-ipek hidrojel doku iskeleleri arasında genipin konsantrasyonun artması ile şişme oranlarında azalma gözlenmiştir. Kompozit hidrojel doku iskelelerinin şişme oranı değerleri arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Ancak, lif kabağı takviyesinin kompozit doku iskelelerinin şişme oranı değerlerini kontrol grubuna kıyasla yaklaşık üçte biri oranında düşürdüğü gözlenmiştir.



Şekil 4. Hidrojel doku iskelelerinin şişme oranları

### 3.1.4. Viskoelastik özellik karakterizasyonu

Şekil 5A ve B, sırası ile kitosan-ipek ve lif kabağı takviye edilmiş kitosan-ipek hidrojel doku iskelelerinin depolama ve kayıp modülü değerlerini göstermektedir. Analiz sonucunda elde edilen depolama modülü ( $E'$ ), malzemenin elastik tepkisini, enerji depolama kabiliyetini ifade ederken; kayıp modülü ( $E''$ ) malzemenin enerji dağıtma, yayma kabiliyetini ifade eder. Tüm doku iskelelerinin  $E'$  değerlerinin kayıp modül değerlerinden büyük olduğu görülmektedir. Lif kabağı takviyesi ile kompozit hidrojel doku iskelelerinin depolama modüllerinde düşüş gözlenirse dahi, bütün kompozit doku iskelelerinin depolama modül değerleri yükselen frekans ile artış göstermiştir (Şekil 5B). Bu da kompozit doku iskelelerinin viskoelastik davranış gösterdiğinin kanıtıdır. Viskoelastik bir malzemenin  $E''$  ile  $E'$  arasındaki oran  $\tan \delta$  değeri olarak tanımlanırken ve bu değer malzemenin enerji sönümlenme kapasitesi hakkında bilgi verir. Kontrol grubuna ve kompozit doku iskelelerine ait örneklerin  $\tan \delta$  -logaritma frekans eğrileri Şekil 6A'da

verilmektedir. Yetişkin bir insanın yürüme frekansı 0,6 ve 1,1 Hz değerlerinde iken koşma frekansı 1,5 Hz değerinin üzerine çıkar [19]. L-CSG3 doku iskelesi bu frekanslarda daha yüksek  $\tan \delta$  değerine sahiptir.

### 3.1.5. Mekanik test

Basma deneyleri sonucunda elde edilen gerilim-gerinim eğrilerinden her numune için %7 ve %15 birim şekil değiştirme aralığındaki lineer bölge kullanılarak basma modülleri hesaplanmıştır (Şekil 6B). Lif kabağı takviyesiz kontrol grubu numunelerinde genipin oranı değişimi ile basma modülünde anlamlı bir değişim gözlenmezken, lif kabağı takviyeli kompozit doku iskelelerinde genipin oranındaki artış ile basma modül değerleri artmaktadır. Kontrol grubu numunelerinin ortalama basma modül değerleri yaklaşık 1-2 MPa iken, lif kabaklı kompozit doku iskelelerinde ise yaklaşık 5-9 MPa değerlerindedir.

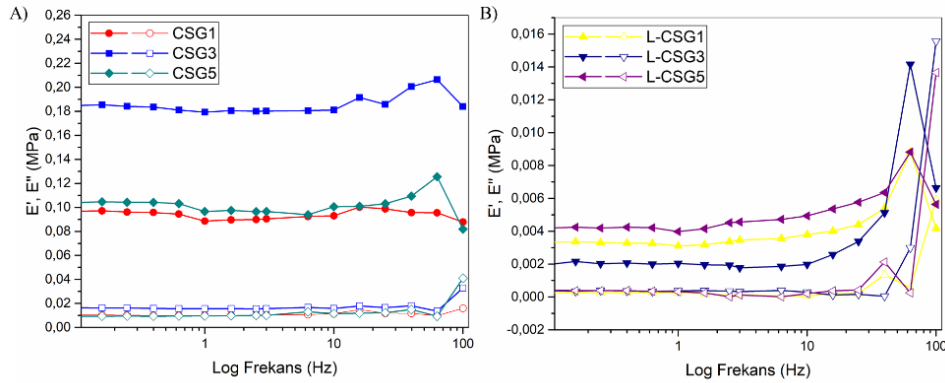
### 3.2. *In-vitro* biyoyumluluk çalışmaları

Gözenekli yapısı, yeterli su içeriği, viskoelastik özelliği, yüksek  $\tan \delta$  değeri ve yeterli basma modülü dolayısıyla ile L-CSG3 doku iskelesi optimum olarak seçilmiş ve *in-vitro* biyoyumluluk çalışmaları bu doku iskelesi ile gerçekleştirilmiştir. *In-vitro* analiz sonuçları kitosan (CG3), lif kabağı takviyeli kitosan (L-CSG3), ve kitosan-ipek (CSG3) doku iskeleleri ile karşılaştırılmıştır.

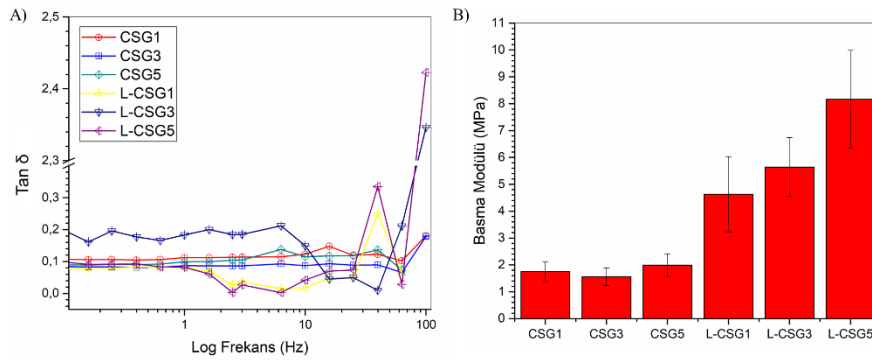
#### 3.2.1. tMKH ların akım sitometrik analizleri

Tavşan kemik iliğinden izole edilen tMKH'lerin 2. (Şekil 7a) ve 3. pasaj sonrasında (Şekil 7A, b) iğsi şeklinde ve fibroblast benzeri morfolojiye sahip olduğu gözlenmiştir. 3. Pasaj sonrasında  $\sim 7 \times 10^6$  hücre elde edildiği hücre sayımı ile belirlenmiş ve hücrelerin tanımlanması için akım sitometrik analizler gerçekleştirilmiştir. Analiz sonuçlarında belirtilen P1 bölgesi analiz edilen tüm hücreleri, P2, P3, P4 ve P5 ise sırasıyla CD45, CD90, CD34 ve CD73 yüzey belirteçleri ile analiz edilen hücreleri göstermektedir (Şekil 7B). Akım sitometrik analiz sonuçlarında, hücrelerin CD45 ve CD34 belirteçlerine göre negatif ve CD90 ve CD73 belirteçlerine pozitif ekspresyon gösterdiği saptanmıştır. Elde edilen verilere göre izole edilen hücrelerin %74,7'sinin pozitif tMKH belirteçlerini eksprese ettiği ve %2,8'inin negatif tMKH belirteçlerini eksprese ettiği belirlenmiş ve pozitif olan hücrelerin ayırtılma işlemi ile hücre kültürüne devam edilmiştir.





**Şekil 5.** A) Kitosan-ipek ve B) Lif kabağı takviyeli kitosan-ipek hidrojel doku iskelelerinin depolama ( $E'$ , içi dolu sembol) ve kayıp modülleri ( $E''$ , içi boş sembol)

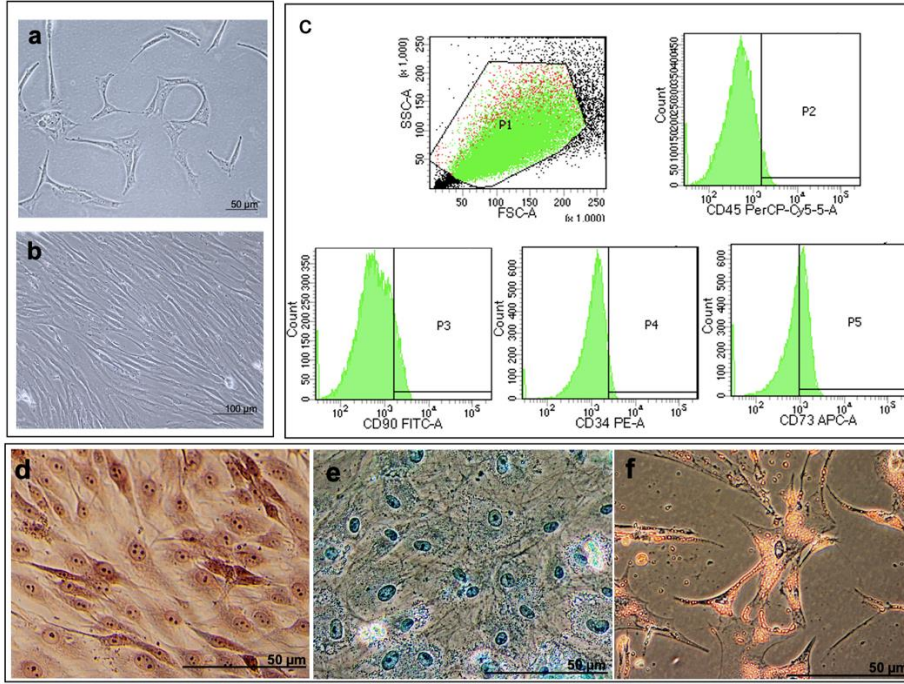


**Şekil 6.** Hidrojel doku iskelelerinin A) tan delta ve B) basma modülü değerleri

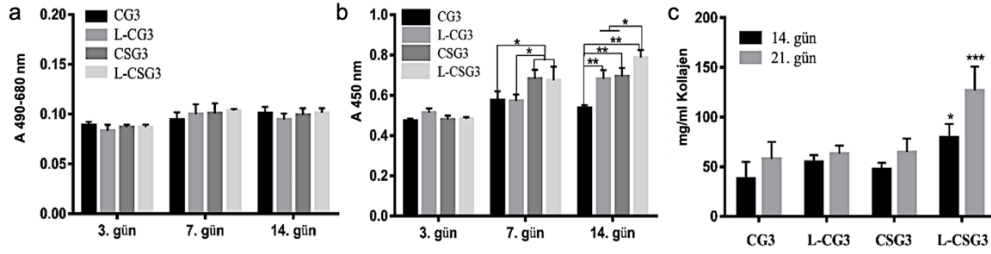
### 3.2.2. tMKH'lerin Farklılaşma Kapasiteleri

Osteoblast, kondrosit ve adiposit farklılaşma için tMKH'leri 4 hafta boyunca sırasıyla osteojenik, kondrojenik ve adipojenik besiyerleri ile kültüre edilmiştir. Osteojenik farklılaşmayı belirlemek amacıyla Alizarin kırmızısı ile boyanan oval şekilli hücrelerin mineralizasyon birikimleri kırmızı renkte gözlenmiş ve osteoblast benzeri hücrelere farklılaştıkları belirlenmiştir (Şekil 7d). Kondrojenik farklılaşmayı incelemek için hücreler Alcian mavisi ile boyanmıştır ve

kondrojenik farklılaşmayı işaret eden, kondrositler tarafından üretilen proteoglikanlar mavi renkte gözlenmiştir (Şekil 7e). Adipojenik farklılaşmada ise Oil red O boyaması sonrasında hücrelerde oluşan yağ damlacıkları hücre sitoplazmasında parlak kırmızı renkte gözlemlenmiş ve adiposit benzeri hücrelere farklılaştıkları belirlenmiştir (Şekil 7f). Farklılaşma kapasiteleri belirlenen tMKH'ler, doku iskelelerine ekilmek üzere kondrojenik farklılaştırılmış hücreler kullanılarak hücre kültürüne devam edilmiştir.



**Şekil 7.** Tavşan kemik iliklerinden izole edilen tMKH'lerin ( a ) 2. ve ( b ) 3. pasaj sonrasındaki görünümleri, c) akım sitometrik analiz sonuçları, d) osteojenik, e) kondrojenik ve f) adipojenik farklılaştırılmış hücrelerin görüntüleri



**Şekil 8.** Doku iskelelerine ekilmiş hücrelerin LDH sitotoksikite, WST-1 proliferasyon ve kollajen analiz sonuçları

### 3.2.3. Sitotoksikite analizi

Doku iskelelerinin sitotoksik etkisi hücre kültürünün 3, 7 ve 14. günlerinde gerçekleştirilmiştir. LDH analizi sonuçlarına göre, tüm doku iskelesi gruplarında LDH seviyeleri oldukça düşük ve benzer oranda görülmektedir (Şekil 8a). Tüm gruplardaki LDH seviyeleri 7. ve 14. günlerde 3. güne göre nispeten yüksek görülse de istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır.

### 3.2.4. Proliferasyon analizi

Doku iskeleleri üzerine ekilen hücrelerin proliferasyonu 3, 7 ve 14. günlerde WST-1 analizi ile incelenmiştir (Şekil 8b). 3. günde tüm doku iskelesi gruplarında hücre benzer oranda çoğaldığı belirlenmiş ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Kültürün 7. ve 14. günlerinde gruplar arasında farklılıklar gözlenmiştir. 7. günde tüm gruplarda artış gözlenmiş olup CSG3 ve L-CSG3 doku iskelelerinde diğer gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı artış saptanmıştır. Kültürün 14.

gününde CG3 doku iskelesi üzerindeki hücrelerin diğer gruplara göre daha az çoğaldığı görülmektedir. L-CSG3 doku iskelesine bakıldığında ise diğer gruplardan daha yüksek oranda çoğalma kapasitene sahip olduğu ve diğer gruplar ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu görülmektedir. Aynı zamanda CSG3 ve L-CSG3 doku iskeleleri arasında anlamlı bir fark saptanmamış fakat her iki doku iskelesinin L-CSG3 ile arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu bulunmuştur. L-CSG3 hidrojel kompozit doku iskelesi içeriğindeki ipeğin hücrelerin çoğalmasında etkili olduğu görülmektedir. 14 günlük kültür sürecinde L-CSG3 doku iskelesindeki kondrojenik hücrelerin düzenli artan bir trende sahip olduğu ve diğer gruplar ile karşılaştırıldığında hücrelerin proliferasyonunu arttırdığı gösterilmiştir.

### 3.2.5. Kollajen analizi

Doku iskelelerine ekilen kondrojenik hücreler tarafından üretilen kollajen miktarları hücre kültürünün 14. ve 21. günlerinde ölçülmüştür (Şekil 8c). Kollajen miktarlarının tüm doku iskelesi gruplarında 21. günde arttığı görülmektedir. L-CSG3 doku iskelesindeki kondrojenik hücrelerin ürettiği kollajen miktarı diğer gruplar ile karşılaştırıldığında hem 14. günde hem de 21. günde istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu saptanmıştır.

### 4. Tartışma ve Sonuç

Hidrojel oluşumu, zincirler arasında ikincil kimyasal etkileşimler ya da iyonik etkileşimler ile gerçekleşen fiziksel çapraz bağlanma veya kovalent bağların oluştuğu kimyasal çapraz bağlanma ile gerçekleşmektedir. Çalışmada, kitosanın ve ipeğin amino grupları ile genipin arasında gerçekleşen kovalent çapraz bağlanma reaksiyonu sonucunda doku iskeleleri koyu mavi bir renk almaktadır. FTIR analizi ile de gerçekleşen bu reaksiyon kanıtlanmıştır. Ayrıca, çapraz bağlayıcı konsantrasyonun artması ile çapraz bağlanma süresi azalmaktadır.

Biyomedikal alanında kullanılacak polimerik malzemeler için yüzey özellikleri büyük önem taşır. Hücre tutunması ve büyümesi açısından üretilmiş olan gözenekli doku iskelelerinde gözenek boyutu ve yapısı önem taşımaktadır.

Uygulama alanı ve hedef hücre tipine göre istenilen gözenek boyutu büyüklüğü değişkenlik gösterebilirken, gözenek yapısının açık gözenekli olması gerekmektedir. Çalışmada

üretilen kompozit doku iskeleleri ve kontrol grubunun SEM analizi sonuçları incelendiğinde, bütün doku iskelelerinin açık gözenekli bir yapıya sahip olduğu görülmektedir. Ayrıca SEM görüntüleri, Image J program kullanılarak incelenmiş ve gözenek boyutunun 150-200 µm aralığında değiştiği belirlenmiştir. Yan ve arkadaşlarının 2010 yılında yaptıkları çalışmada, eklem kıkırdağı hasarını gidermek için geliştirdikleri kitosan-kolajen doku iskelelerinin gözenek boyutlarının 100-200 µm aralığında olduğu belirtilmiştir [20].

Kıkırdak ekstrasellüler matrisi hidrofilik bir ortam olduğu için doku iskelesinin şişme davranışı değerlendirilmesi gereken önemli bir husustur. Literatürde kıkırdağın ıslak ağırlığının yaklaşık %80'ine kadar su içerdiği belirtilmiştir [21]. Üretilen hidrojel kompozit doku iskeleleri % 92-94 su içerikleri ile, besin maddelerine karşı iyi geçirgenlik, hücrelerin kolay büyümesi, uygun şişme kinetiği ve doğal ekstrasellüler matrise benzer hidratlı bir ortam sağlarlar [22,23].

Eklem kıkırdağı, kıkırdağa sürekli karmaşık mekanik yüklemeye dayanma yeteneği kazandıran viskoelastisiteye sahip yük taşıyıcı bir dokudur. Bu nedenle, kıkırdak rejenerasyonunda kullanılacak doku iskelelerinin viskoelastik özellikte olması önem arz etmektedir [24]. Bütün kompozit doku iskelelerinin E' değerleri yükselen frekans ile artış göstermiştir. Bu da kompozit doku iskelelerinin viskoelastik davranış gösterdiğinin bir kanıtıdır. Literatürde insan eklem kıkırdağının 1 Hz frekanstaki tan δ değeri 0,266 olarak belirtilmiştir. Kontrol grubuna ait tan δ değerleri bu değer altında kalmaktadır. Lif kabağı takviyeli kompozit doku iskelelerinde bu değere en çok yaklaşan örnek L-CSG3 olmuştur [25].

Kompozit doku iskelelerinin basma modül değerlerinde diğer doku iskelesine göre artış gözlenmiştir. Bu da lif kabağının doku iskelesinde takviye malzemesi olarak görev aldığı bir kanıttır. Ayrıca, üretilen doku iskelelerinin basma modül değerleri, literatürde belirtilen insan eklem kıkırdağının basma modül değeri ile (~1,75 MPa) uyumludur [26].

LDH, pek çok hücre tipinde bulunan sitoplazmik bir enzimdir. Hücrelerin plazma zarında oluşturulan hasar ile LDH enzimi hücre kültürü ortamına salınır. Böylece ortamdaki LDH,

laktatın pirüvata dönüşümünü kataliz eden enzimatik reaksiyon sonucunda ölçülebilmektedir. Ölçülen seviye, sitotoksisitenin göstergesi olan ortama salınan LDH miktarı ile doğru orantılıdır [27,28]. LDH analizi sonuçlarına göre, tüm doku iskelesi gruplarında LDH seviyelerinin oldukça düşük seviyelerde görülmektedir. Hücre kültürü süresince LDH seviyesinin düşük seviyelerde seyretmesi ve artış göstermemesi, doku iskelelerinin herhangi bir toksik etki göstermediğini belirtmektedir.

Hücrelerin üç boyutlu yapılar üzerinde canlılığını devam ettirmesi, çoğalması ve uygun biyokimyasal ortam oluşturması doku yenilenmesi ve hazırlanan malzemenin doku tamirindeki işlevselliğini arttırmaktadır [29]. Doku iskelelerine ekilen kondrojenik hücrelerin proliferasyon analiz sonuçlarına göre en yüksek L-CSG3 doku iskelesi üzerinde hücrelerin çoğaldığı ve kültür günlerine göre artan bir proliferasyon kapasitesi gösterdiği saptanmıştır. Doku iskelesinde bulunan hem kitosan, hem de ipek bileşiminin yanı sıra lif kabağı takviyesinin hücre proliferasyon kapasitesini arttırdığı düşünülmektedir. Daha önceden rapor edilen çalışmalara göre lif kabağının kırık doku hücreleri için uygun bir üç boyutlu yapı sağladığı ve hücre çoğalmasını tetiklediği gösterilmiştir [12]. Çalışmamızda elde edilen sonuçlarda, literatür ile uyumlu olarak, L-CSG3 doku iskelesindeki lif kabağı katkısının kondrojenik hücrelerin çoğalması için uygun bir ortam sağladığı görülmektedir.

Kırık doku dokunun en önemli ve en yoğun bulunan matris proteini kollajendir ve doku yenilenmesinde önemli bir role sahiptir [30]. Kırık doku yenilenmesi için tasarlanan doku iskelesinin kırık doku dokuyu taklit edebilmesi ve hem fizyolojik hem de biyokimyasal olarak kırık doku özelliklerini göstermesi gerekir [31]. Doku iskeleleri üzerindeki hücrelerin kollajen üretimi dokuyu taklit etmesi açısından önemli bir faktördür [32]. Doku iskelelerine ekilen kondrojenik hücreler tarafından üretilen kollajen miktarları tüm doku iskelesi gruplarında 21. günde arttığı görülmektedir. L-CSG3 doku iskelesindeki kondrojenik hücrelerin ürettiği kollajen miktarı diğer gruplar ile karşılaştırıldığında daha fazla olduğu görülmüştür. L-CSG3 hidrojel doku iskelesinin, proliferasyon sonuçlarına benzer olarak, kondrojenik hücreler için daha uygun bir ortam

sağladığını, L-CSG3 doku iskelesinde hücrelerin daha fazla çoğaldığı ve daha fazla miktarda kollajen ürettiği belirlenmiştir. Böylelikle, kompozit LCS-G3 hidrojel doku iskelesine ekilen kondrojenik hücrelerin proliferasyon sonuçlarına benzer şekilde, kondrojenik hücrelerin daha fazla çoğaldığı ve daha fazla miktarda kollajen ürettiği belirlenmiştir.

Sonuç olarak, tüm bu bulgular doğrultusunda L-CSG3 hidrojel kompozit doku iskelesinin kırık doku hasarında kullanılabilme potansiyeli olduğu söylenebilir.

### Teşekkür

Bu çalışma Dokuz Eylül Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından, 2016.KB.MLT.002 proje numarası ile desteklenmiştir. Yazarlar akım sitometrik analizler için İzmir Biyotıp ve Genom Merkezi'ne, dinamik mekanik analiz için Prof. Dr. Metin TANOĞLU ve Mehmet Deniz GÜNEŞ'e teşekkür etmektedirler.

### Kaynakça

- [1] Ahmadi, F., Giti, R., Mohammadi-Samani, S., Mohammadi, F. 2017. Biodegradable Scaffolds for Cartilage Tissue Engineering. *Galen Medical Journal*, Cilt. 6 (2), s. 70-80. DOI: 10.22086/GMJ.V6I2.696
- [2] Armiento, A., Stoddart, M., Alini, M., Eglin, D. 2017. Biomaterials for articular cartilage tissue engineering: Learning from biology. *Acta Biomaterialia*, Cilt. 65, s. 1-20. DOI: 10.1016/j.actbio.2017.11.021
- [3] Seol, Y.J., Park, J.Y., Jeong, W., Kim, T.H., Kim, S.Y., Cho, D.W. 2015. Development of Hybrid Scaffolds Using Ceramic and Hydrogel for Articular Cartilage Tissue Regeneration. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, Cilt. 103 (4), s. 1404-1413. DOI: 10.1002/jbma.a.35276
- [4] Saladino, S., Di Leonardo, E., Salamone, M., Mercuri, D., Segatti, F., Gherzi, G. 2014. Formulation of Different Chitosan Hydrogels for Cartilage Tissue Repair. *Chemical Engineering Transactions*, Cilt. 38, s. 505-510. DOI: 10.3303/CET1438085
- [5] O'Brien, F.J. 2011. Biomaterials & Scaffolds for Tissue Engineering. *Materials Today*, Cilt. 14 (3) s. 88-95. DOI: 10.1016/S1369-7021(11)70058-X
- [6] Puppi, D., Chiellini, F., Piras, A., Chiellini, E. 2010. Polymeric Materials for Bone and Cartilage Repair. *Progress in Polymer Science*, Cilt. 35 (4), s. 403-440. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2010.01.006
- [7] Yang, J., Zhang, Y.S., Yue, K., Khademhosseini, A. 2017. Cell-Laden Hydrogels for Osteochondral and Cartilage Tissue Engineering. *Acta Biomaterialia*, Cilt. 57, s. 1-25. DOI: 10.1016/j.actbio.2017.01.036
- [8] Vepari, C., Kaplan, D.L. 2007. Silk as a Biomaterial. *Progress in Polymer Science*, Cilt. 32 (8), s. 991-1007. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2007.05.013

- [9] Mirahmadi, F., Tafazzoli-Shadpour, M., Shokrgozar, M.A., Bonakdar, S. 2013. Enhanced Mechanical Properties of Thermosensitive Chitosan Hydrogel by Silk Fibers for Cartilage Tissue Engineering. *Materials Science and Engineering: C*, Cilt. 33 (8), s. 4786-4794. DOI: 10.1016/j.msec.2013.07.043
- [10] Bas, O., De-Juan-Pardo, E.M., Meinert, C., D'Angella, D., Baldwin, J.G., Bray, L.J., Wellard, R.M., Kollmannsberger, S., Rank, E., Werner, C. 2017. Biofabricated Soft Network Composites for Cartilage Tissue Engineering. *Biofabrication*, Cilt. 9 (2), s. 025014. DOI: 1088/1758-5090/aa6b15
- [11] Butcher, A.L., Offeddu, G.S., Oyen, M.L. 2014. Nanofibrous Hydrogel Composites as Mechanically Robust Tissue Engineering Scaffolds. *Trends in Biotechnology*, Cilt. 32 (11), s. 564-570. DOI: 10.1016/j.tibtech.2014.09.001
- [12] Cecen, B., Kozaci, L.D., Yuksel, M., Ustun, O., Ergur, B.U., Havitcioglu, H. 2016. Biocompatibility and Biomechanical Characteristics of Loofah Based Scaffolds Combined with Hydroxyapatite, Cellulose, Poly-l-lactic acid with Chondrocyte-like Cells. *Materials Science and Engineering: C*, Cilt. 69, s. 437-446. DOI: 10.1016/j.msec.2016.07.007
- [13] Varaprasad, K., Raghavendra, G.M., Jayaramudu, T., Yallapu, M.M., Sadiku, R. 2017. A Mini Review on Hydrogels Classification and Recent Developments in Miscellaneous Applications. *Materials Science and Engineering: C*, Cilt. 79, s. 958-971. DOI: 10.1016/j.msec.2017.05.096
- [14] Dimida, S., Barca, A., Cancelli, N., De Benedictis, V., Raucci, M.G., Demitri, C. 2017. Effects of Genipin Concentration on Cross-Linked Chitosan Scaffolds for Bone Tissue Engineering: Structural Characterization and Evidence of Biocompatibility Features. *International Journal of Polymer Science*, Cilt. 2017, s. 1-8. DOI: /10.1155/2017/8410750
- [15] Li, Q., Wang, X., Lou, X., Yuan, H., Tu, H., Li, B., Zhang, Y. 2015. Genipin-crosslinked Electrospun Chitosan Nanofibers: Determination of Crosslinking Conditions and Evaluation of Cytocompatibility. *Carbohydrate Polymers*, Cilt. 130, s. 166-174. DOI: 10.1016/j.carbpol.2015.05.039
- [16] Delgadillo-Armendariz, N.L., Rangel-Vazquez, N.A., Marquez-Brazon, E.A., Gascue, R-D. 2014. Interactions of Chitosan/Genipin Hydrogels During Drug Delivery: A QSPR Approach. *Química Nova*, Cilt. 37 (9), s. 1503-1509. DOI: 10.5935/0100-4042.20140243
- [17] Abdelwahab, O. 2014. Assessment of Raw Luffa as a Natural Hollow Oleophilic Fibrous Sorbent for Oil Spill Cleanup. *Alexandria Engineering Journal*, Cilt. 53 (1), s. 213-218. DOI: 10.1016/j.aej.2013.11.001
- [18] Botaro, V.R., Novack, K.M., Siqueira, E.J. 2012. Dynamic Mechanical Behavior of Vinylester Matrix Composites Reinforced by Luffa *Cylindrica* Modified Fibers. *Journal of Applied Polymer Science*, Cilt. 124 (3), s.1967-1975. DOI: 10.1002/app.35019
- [19] Vacanti, C. 2008. *Musculoskeletal Tissue Regeneration: Biological Materials and Methods*. Humana Press, 670s.
- [20] Yan, L.P., Wang, Y.J., Ren, L., Wu, G., Caridade, S.G., Fan, J.B., Wang, L.Y., Ji, P.H., Oliveira, J.M., Oliveira, J.T. 2010. Genipin-cross-linked Collagen/Chitosan Biomimetic Scaffolds for Articular Cartilage Tissue Engineering Applications. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, Cilt. 95 (2), s. 465-475. DOI: 10.1002/jbma.32869
- [21] Sophia Fox, A.J., Bedi, A., Rodeo, S.A. 2009. The Basic Science of Articular Cartilage: Structure, Composition, and Function. *Sports Health*, Cilt. 1 (6), s. 461-468. DOI: 10.1177/1941738109350438
- [22] Yodmuang, S., McNamara, S.L., Nover, A.B., Mandal, B.B., Agarwal, M., Kelly, T-AN., Chao, P-hG., Hung, C., Kaplan, D.L., Vunjak-Novakovic, G. 2015. Silk Microfiber-reinforced Silk Hydrogel Composites for Functional Cartilage Tissue Repair. *Acta Biomaterialia*, Cilt. 11, s. 27-36. DOI: 10.1016/j.actbio.2014.09.032
- [23] Lee, C-T., Kung, P-H., Lee, Y-D. 2005. Preparation of Poly (vinyl alcohol)-chondroitin Sulfate Hydrogel as Matrices in Tissue Engineering. *Carbohydrate Polymers*, 61 (3), s. 348-354. DOI: 10.1016/j.carbpol.2005.06.018
- [24] Chen, K., Zhang, D., Yang, X., Zhang, X., Wang, Q. 2016. Research on Viscoelastic Behavior and Mechanism of Hydrogel Grafted with UHMWPE. *Soft Materials*, 14 (4), s. 244-252. DOI: 10.1080/1539445X.2016.1195408
- [25] Temple, D.K., Cederlund, A.A., Lawless, B.M., Aspden, R.M., Espino, D.M. 2016. Viscoelastic Properties of Human and Bovine Articular Cartilage: A Comparison of Frequency-Dependent Trends. *BMC Musculoskeletal Disorders*, Cilt. 17 (1), s. 419. DOI: 10.1186/s12891-016-1279-1
- [26] Bartnikowski, M., Wellard, R., Woodruff, M., Klein, T. 2015. Tailoring Hydrogel Viscoelasticity with Physical and Chemical Crosslinking. *Polymers*, Cilt. 7 (12), s. 2650-2669. DOI: 10.3390/polym7121539
- [27] Dinescu, S., Gălățeanu, B., Albu, M., Lungu, A., Radu, E., Hermenean, A., Costache, M. 2013. Biocompatibility Assessment of Novel Collagen-Sericin Scaffolds Improved with Hyaluronic Acid and Chondroitin Sulfate for Cartilage Regeneration. *BioMed Research International* 2013. DOI: 10.1155/2013/598056
- [28] Kumar, P., Nagarajan, A., Uchil, P.D. 2018. Analysis of Cell Viability by the Lactate Dehydrogenase Assay. *Cold Spring Harbor Protocols*, Cilt. 2018 (6), s. prot095497. DOI:10.1101/pdb.prot095497
- [29] Mabrouk, M., Beherei, H.H., Das, D.B. 2020. Recent Progress in the Fabrication Techniques of 3D Scaffolds for Tissue Engineering. *Materials Science and Engineering: C*, Cilt. 110, s. 110716. DOI: 10.1016/j.msec.2020.110716
- [30] Chen, J-L., Duan, L., Zhu, W., Xiong, J., Wang, D. 2014. Extracellular Matrix Production In Vitro in Cartilage

Tissue Engineering, Journal of Translational Medicine, Cilt. 12 (1), s. 88. DOI:10.1186/1479-5876-12-88

- [31] Francis, S.L., Di Bella, C., Wallace, G.G., Choong, P.F. 2018. Cartilage Tissue Engineering Using Stem Cells and Bioprinting Technology—Barriers to Clinical Translation. *Frontiers in Surgery*, Cilt. 5, s. 70. DOI: 10.3389/fsurg.2018.00070
- [32] Irawan, V., Sung, T-C., Higuchi, A., Ikoma, T. 2018. Collagen Scaffolds in Cartilage Tissue Engineering and Relevant Approaches for Future Development. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, Cilt. 15 (6), s. 673-697. DOI: 10.1007/s13770-018-0135-9