

**MEMELİ KIKIRDAK DOKUSUNDAN KONDROSİT VE
KONDROPROJENİTOR HÜCRELERİN ELDESİ VE BU
HÜCRELERİN MİKROTAŞIYICI POLİMERİK
MALZEMELERLE KÜLTÜRASYONU**

**DERIVATION OF CHONDROCYTE AND
CHONDROPROGENITOR CELLS FROM MAMMALIAN
CARTILAGE AND CULTIVATION ON DIFFERENT
POLYMERIC MICROCARRIERS**

GAYE ÇETİNKAYA

Hacettepe Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin

BİYOLOJİ Anabilim Dalı İçin Öngördüğü

DOKTORA TEZİ

olarak hazırlanmıştır.

2010

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

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

Başkan :.....
Prof. Dr. Aşkın Tümer

Üye (Danışman) :.....
Prof. Dr. Mehmet Ali Onur

Üye :.....
Prof. Dr. Menemşe Gümüşderelioğlu

Üye :.....
Yard. Doç. Dr. Aylin Gürpınar

Üye :.....
Yard. Doç. Dr. Hilal Şaşmazel Türkoğlu

ONAY

Bu tez/...../..... tarihinde Enstitü Yönetim Kurulunca kabul edilmiştir.

Prof.Dr. Adil Denizli
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ

MEMELİ KIKIRDAK DOKUSUNDAN KONDROSİT VE KONDROPROJENİTOR HÜCRELERİN ELDESİ VE BU HÜCRELERİN MİKROTAŞIYICI POLİMERİK MALZEMELERLE KÜLTÜRASYONU

Gaye Çetinkaya

ÖZ

Memeli hücre kültürlerinde uzun süredir kullanılan mikrotasıyıcılar ile birim hacimdeki yüzey alanı arttırılarak iki boyutlu hücre kültür kaplarına oranla daha az iş gücü ve maliyetle daha çok hücre üretmek mümkündür. Mikrotasıyıcı sistemlerdeki başlıca sorunlardan biri, fiziksel veya fizyolojik harabiyet verilmeden hücrelerin polimerik yüzeylerden ayrılmalarıdır. Kullanılan enzimatik yöntemlerin çoğu zaman ve kaynak israfına yol açarken hücrelere de zarar vermektedir.

Bu çalışmada üç aylık sığır fetusunun eklem kıkırdak dokusundan kollajen tip 2 ve vimentin pozitif kondroprojenitör hücreler ve bir yaşındaki sığırın eklem kıkırdak dokusundan kondrosit hücre hatları geliştirilmiştir. Populasyon katlanma süreleri ve üreme kinetikleri incelenen kondroprojenitör ve kondrosit hücrelerine onbeş farklı besiyeri uygulanmış ve bu hücrelerin üretilmeleri için en uygun mikroçevre tanımlanmıştır.

Çalışmanın ikinci kısmında kondroprojenitör ve kondrosit hücreleri mikrotasıyıcı sisteme adapte edilmiş ve Cytodex-1 mikrotasıyıcılarının üzerinde biyoreaktörlerde üreme kinetikleri incelenmiştir. Polimerik yüzeylere dört saat içinde tutunan kondroprojenitör hücrelerin mikrotasıyıcı sistemlerden ne kadar oranda sağlıklı bir şekilde geri kazanılabildiğinin araştırıldığı bu çalışmada farklı enzimatik yöntemler uygulanmış ve en iyi sonuç pronaz enzimiyle elde edilmiştir. Sonuçlar mikrotasıyıcı sistemlerden canlı ve fonksiyonel hücrelerin elde edilebilmesi için enzimatik yöntemlerin optimize edilmesi gerektiğini göstermiştir.

Çalışmanın üçüncü kısmında Cytodex-1 ve Biosilon ticari mikrotasıyıcıları ile Gümüşderelioğlu ve ekibi tarafından sentezlenen sıcaklık duyarlı PHEMA-PNIPAAm kürelerinde hücrelerin karşılaştırmalı olarak tutunma başarıları ve üreme eğrileri incelenmiştir. Sonuçlar sıcaklık duyarlı PHEMA-PNIPAAm kürelerinin hücre tutunması ve gelişimini desteklediğini, yüzey modifikasyonlarıyla ticari polimerler kadar başarılı olabileceğini ortaya koymuştur.

Bu alışmada PHEMA-PNIPAAm polimerleri 'sıcaklık duyarlı mikrotasıyıcı modeli' olarak kullanılmış ve biyouyumluluk özellikleri incelenmiştir. Sonuçlar ticari sıcaklık duyarlı bir mikrotasıyıcının hücre üretiminin hedeflendiği sistemlerde oldukça faydalı olacağını ortaya koymuştur.

Anahtar kelimeler: Kondroprojenitr, mikrotasıyıcılar, sıcaklık duyarlı polimerler, PNIPAAm, Cytodex-1, biyoreaktörler.

Danışman: Prof. Dr. Mehmet Ali Onur, Hacettepe Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, Genel Biyoloji Anabilim Dalı.

Eř Danışman: Do. Dr. Sezen Arat, Gen Mhendisliėi ve Biyoteknoloji Enstitüsü, Marmara Araştırma Merkezi, TUBİTAK.

DERIVATION OF CHONDROCYTE AND CHONDROPROGENITOR CELLS FROM MAMMALIAN CARTILAGE AND CULTIVATION ON DIFFERENT POLYMERIC MICROCARRIERS

ABSTRACT

Gaye Çetinkaya

For the continuous and fast expansion of chondrocytes microcarriers have gained increasing interest. The principal obstacle of microcarriers has been the difficulty in detaching cells from the microcarriers in a viable and functional condition which is a prerequisite if the culture is to serve as an inoculum for a larger scale batch. Traditional enzymatic methods for cell recovery from microcarriers are often time- and labor-consuming and cause physiological damage to cells.

In this study collagen type 2 and vimentin positive chondroprogenitor cells were isolated from the articular cartilage of three month old bovine fetus. Also vimentin positive chondrocytes were isolated from articular cartilage of one year old adult bovine. After evaluation of population doubling duration and cell growth kinetics at monolayer, cells were exposed to 15 different medium combinations to identify the most suitable microenvironment for their growth.

In the second part of the study growth kinetics of chondrocytes and chondroprogenitors on Cytodex-1 commercial microcarriers were investigated in bioreactor systems. Chondroprogenitors completed attachment to surfaces in four hours and showed an effective growth on microcarriers. Pronase application gave the best amount of cells among different enzymatic methods which were applied to harvest cells from microcarriers. Results showed that enzymatic cell harvesting techniques should be optimised in microcarrier systems to obtain a viable and functional cell population with less physiological damage.

In the third part, chondroprogenitors were inoculated on three different microcarriers: Cytodex-1, Biosilon and thermoresponsive PHEMA-PNIPAAm microcarriers produced by Gümüşderelioğlu et al. Attachment rates and cell growth were analysed comparatively. Results showed that HEMA-PNIPAAm spheres supported cell

attachment and growth as good as commercial microcarriers but surface properties should be improved.

In this study biocompatibility of PHEMA-PNIPAAm spheres were investigated as a 'thermosensitive microcarrier model'. Results showed that 'a commercial thermosensitive microcarrier' may provide an attractive solution to the cell scale up process.

Keywords: Chondroprogenitor, microcarrier, thermoresponsive biomaterials, PNIPAAm, Cytodex-1, bioreactors.

Advisor: Prof. Dr. Mehmet Ali Onur, Hacettepe University, Department of Biology, General Biology Section.

Coadvisor: Assoc. Prof. Dr. Sezen Arat, Genetic Engineering and Biotechnology Institute, Marmara Research Center, TUBITAK