

Kitosan Bazlı Yüzeylerin Mezenşimal Kök Hücrelerin Nöronal ve Glial Yönde Farklılaşmalarına Etkileri

Yaşar Mehmet ŞENSES¹, Aylin Şendemir ÜRKMEZ^{2,3}

Gönderim Tarihi / Received: 21.03.2017

Kabul Tarihi / Accepted: 29.03.2017

¹Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir, Türkiye

²Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyomedikal Teknolojiler Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

³Ege Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü, İzmir, Türkiye

*Sorumlu Yazar / Corresponding Author: Aylin Şendemir Ürkmez, e-mail: aylin.sendemir@ege.edu.tr

ÖZ

Doku mühendisliği, sinir sisteminin rejenerasyonu konusunda ümit vadeden yeni tekniklerden biridir. Biyoyumlu ve biyobozunur doku iskelelerinin kök hücreler için taşıyıcı olarak kullanıldığı bu yöntemde, seçilen doku iskelesinin kimyasal ve fiziksel özellikleri, üzerine ekilen hücrelerin davranışlarını yönlendirerek tedavi sürecine katkıda bulunabilmektedir.

Bu çalışmada biyoyumluluğu çok farklı dokular için gösterilmiş bir biyopolimer olan kitosan ile sülfat ve fosfat gruplarıyla fonksiyonelleştirilmiş türevlerinin sinir doku mühendisliği çalışmalarında kullanılma amacıyla sıçan kemik iliği kökenli mezenşimal kök hücrelerin (MKH) nöronal ve glial yönde farklılaşmalarına etkileri incelenmiştir.

Hücre kültürü çalışmaları için sıçan kemik iliğinden MKH'ler izole edilmiş, osteojenik ve kondrojenik hücrelere farklılaşmaları sağlanarak hücrelerin farklılaşma potansiyelleri kalitatif yöntemlerle gösterilmiştir. Yüzey kimyasına hassas olduğu bilinen MKH'lerin kitosan, kitosan fosfat ve kitosan sülfat yüzeyler üzerinde tutunma ve proliferasyon özellikleri incelenmiştir. Kitosan ve kitosan fosfat yüzeylerde hücre tutunması düşükken, sülfat fonksiyonel grubunun eklenmesinin hücre tutunmasını anlamlı şekilde arttırdığı belirlenmiştir. MKH'ler kitosan sülfat yüzeyler üzerinde hem nöronal hem de glial yönde farklılaştırılmışlardır. Bu çalışma, sinir doku rejenerasyonu ve doku mühendisliği amacıyla kitosan sülfat yüzey kimyasının kullanılabilmesini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Mezenşimal Kök Hücre, Kitosan, Kitosan Sülfat, Sinir Doku Mühendisliği

ABSTRACT

Tissue engineering is among promising methods for neuroregeneration. In this method, where biocompatible and biodegradable scaffolds are used as stem cell carriers, chemical and physical characteristics of the selected scaffold can modulate cell behaviour, and hence, contribute to the therapeutic process.

This work is intended to evaluate the effects of chitosan, a biopolymer, whose biocompatibility has been extensively shown for various tissues, and its sulfated and phosphorylated derivatives, on neuronal and glial differentiation of rat bone marrow derived mesenchymal stem cells (MSCs) for neural tissue engineering.

MSCs were isolated from rat bone marrow, and their differentiation potential was shown qualitatively by evaluating their osteogenic and chondrogenic differentiation. Attachment and proliferation properties of MSCs, which are known to be sensitive to surface chemistry, were evaluated. Cell attachment on chitosan and chitosan phosphate surfaces was low, while addition of sulfate functional group has improved cellular attachment. MSCs were differentiated toward both neuronal and glial like cells on chitosan sulfate surfaces. This work suggests the potential use of chitosan sulfate chemistry for neural tissue engineering and neuroregeneration purposes.

Keywords: Mesenchymal Stem Cells, Chitosan, Chitosan Sulfate, Neural Tissue Engineering

GİRİŞ

Mekanik, termal, kimyasal ya da iskemik etkenler sonucu sinir sisteminde oluşan hasarlar hafıza, öğrenme, konuşma ve istemli hareket yeteneği gibi pek çok fonksiyonun bozulmasına, hatta tamamen kaybolmasına yol açabilir. Özellikle merkezi sinir sistemi hasarları ölümcül olabilmektedir. Bu nedenle, sinir sisteminin rejenerasyonu konusunda ümit veren tekniklerden biri olan sinir doku mühendisliği çalışmaları, son yıllarda hız kazanmıştır (1). Sinir doku mühendisliği, hastanın kendisinden elde edilen kök hücrelerin laboratuvar ortamında, uygun bir doku iskelesi üzerinde çoğaltılıp çeşitli uyarılarla farklılaştırılarak hasarlı sinir dokusunun replasmanına olanak verecek bir doku haline dönüştürülmesi ve bu dokunun hasarlı bölgeye implantasyonu esasına dayanır (2). Fonksiyonel bir tedavi için hasar gören bölgede hem ilgili tip nöronların, hem de

bu nöronlara destek veren glia hücrelerinin işlevsel bir şekilde bir arada bulunması gerekmektedir.

Doku mühendisliği çalışmalarında, mezenşimal kök hücrelerin (MKH) diğer kök hücre tiplerine göre önemli üstünlükleri vardır (3, 4). Öncelikle, MKH'ler yetişkin bireyleri kemik iliği, periosteum, sinoviyum veya adipoz doku gibi farklı dokularından elde edilebildikleri için, hastanın kendi hücrelerinin tedavi amaçlı kullanımına olanak vermekte, dolayısıyla da immün reaksiyon riskini en aza indirmektedir (3, 5 - 7). Ayrıca, embriyonik kök hücreler ve fetal dokuların kullanımı konusunda süregelen etik tartışmaların kapsamı dışında kalmaktadırlar. Diğer kök hücre tiplerinin aksine, ameliyat gerektirmeden, görece olarak daha kolay ve ağrısız yöntemlerle elde edilebilmektedirler. Literatürde, MKH'lerin en yoğun olarak kemik (8 - 11), kırık (12) ve adipoz (13, 14) doku hücrelerine farklılaştırılması

çalışılmıştır. MKH'lerin nöral hücelere farklılaşma kapasiteleri halen tartışmalı bir konu olmakla beraber (15, 16), bu hücrelerin sinir hücrelerine de farklılaştırılabildiğini gösteren sınırlı sayıda kaynak mevcuttur (17 - 22). MKH'lerin nöronal farklılaşma potansiyellerine en büyük kanıt olarak, bu hücrelerin nöronal öncül gen olarak kabul edilen nestin ifade ediyor olmalarıdır (23). MKH'lerin geliştirilecek uygun substratlar üzerinde çoğaltılıp farklılaştırılarak sinir doku mühendisliği için kullanımı, bu alanda var olan kısıtlı hücre kaynaklarını zenginleştirecek, klinik olarak daha anlamlı ve tedaviye yönelik çalışmaların yapılmasını hızlandıracak bir seçenektir.

Kitosan, katyonik doğal bir polimerdir ve alkalik koşullarda kitinin deasetilasyonu ile elde edilir. Kitosan, glikozamin ve N-asetil glikozamin birimlerinden oluşan lineer bir polisakkarittir. Glikozamin içeriği deasetilasyon derecesini belirler. Kitinin deasetilasyon derecesi %50'ye ulaştıkça asidik koşullarda çözünür ve artık kitosan adını alır (24). Kaynağa ve hazırlama prosedürüne bağlı olarak kitosanın moleküler ağırlığı 300-1000 kD aralığında değişir ve deasetilasyon derecesi %95'e kadar çıkabilir (25). Kitosanın in vivo koşullarda, lizozim ile enzimatik hidrolize uğrayarak bozunabildiği gösterilmiştir (26). Kitosanın sahip olduğu biyobozunurluk, biyouyumluluk ve anyonik glukozaminglukan ve proteoglukanlar ile yüksek etkileşime girme potansiyeli gibi önemli özellikler doku mühendisliği açısından dikkat çekmektedir, çünkü sitokinlerin/büyüme faktörlerinin, heparin ve heparan sülfat gibi glukozaminglukanlara bağlanabildiği bilinmektedir (25, 27). Kitosan molekülünde 2. 3. ve 6. karbon pozisyonlarında yer alan bir adet amino ve iki adet hidroksil grubu olmak üzere üç tip reaktif fonksiyonel grup görülmektedir. Bu gruplar kitosanın biyolojik özelliklerini geliştiren kovalent ve iyonik modifikasyonlara imkan tanır (28).

Bu çalışmada, sülfat ve fosfat fonksiyonel grupları ile modifiye edilen kitosan üzerinde sıçan kemik iliği kökenli MKH'lerin nöronal ve glial yönde farklılaşma potansiyelleri incelenmiş ve özellikle sülfat fonksiyonel grubunun hücre farklılaşmasında önemli rol oynadığı ve dolayısıyla sülfatlanmış kitosanın sinir doku mühendisliği amaçlı kullanımının yüksek potansiyele sahip olduğu gösterilmiştir.

MATERYAL ve METOD

Kitosanın Deasetilasyonu

Ticari olarak satın alınan kitosanda (Sigma-Aldrich, 417963, USA) deasetilasyon derecesini artırmak için, küçük modifikasyonlarla daha önce tanımlanmış protokol kullanıldı (29, 30). Buna göre önceden hazırlanmış 30 mL %50'lik NaOH içerisine 2 gr kitosan ilave edildi ve bu karışıma sürekli N₂ gazı beslenerek karıştırıcı varlığında ve 100°C'de reaksiyon gerçekleştirildi.

Kitosan Sülfat Sentezi

Kitosandan kimyasal modifikasyonla kitosan sülfat (KS) sentezi için daha önce tanımlanmış protokol kullanıldı (31). 4.5 mL HClSO₃ (Merck, 845127, Almanya),

önceden -4°C'ye soğutulmuş 30 mL dimetilformamid (DMFA, Merck, 103053, Almanya) içerisine damlalar halinde karıştırılarak eklendi ve solüsyon oda sıcaklığına ulaşınca kadar karıştırma işlemi devam ettirildi. Sülfatlama kompleksine 10 mL %3 kitosan (susuz formamid-DCAA karışımında (40:1)) solüsyonu karıştırıcı varlığında eklendi ve oda sıcaklığında 50°C'de 60 dk reaksiyonun gerçekleşmesi beklendi. Reaksiyon sonunda oluşan jel su ile seyreltildi, %20'lik NaOH ile nötralize edildi, metanol ile çökeltilip suda çözdürüldü ve solüsyon demineralize suya karşı iki gün diyalize bırakıldı ve liyofilizasyon ile izole edildi.

Kitosan Fosfat Sentezi

Kitosandan kimyasal modifikasyonla kitosan fosfat (KF) sentezi için daha önce tanımlanmış protokol kullanıldı (32, 33). 100mL %2 kitosan solüsyonu (%2 asetik asit içerisindedir) içerisine 6 gr ortofosforik asit (85wt% lik solüsyondan) karıştırıcı varlığında eklendi. Karışım 80°C'de ve N₂ atmosferinde iki saat çözünmeye bırakıldı. Reaksiyon süresi sonunda solüsyon oda sıcaklığına soğutuldu ve metanol ile presipite edildi, suda çözdürüldü, filtrasyon ile kitosan fosfat pelleti elde edildi ve 60°C'de bir gün kurumaya bırakıldı.

Kitosan Fosfat ve Kitosan Sülfatın Karakterizasyonu

Elde edilen kitosan, kitosan fosfat ve kitosan sülfatın karakterizasyonu FTIR (Fourier Transform Infrared Spectroscopy) analizi ile yapıldı. Analiz için; %2 malzeme solüsyonu (%1 asetik asit içeren distile suda) hazırlandı. Lameller üzerine damlatılan çözümlen kurutulduktan sonra analize alındı.

Sıçan Kemik İliğinden Mezenşimal Kök Hücre (Kİ-MKH) İzolasyonu

Ege Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından verilen 2009-169 numaralı etik kurul izni ile Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Üretim Merkezi'nden temin edilen iki adet ergin sıçana (Sprague Dawley) etik kurul yönergesine uygun olarak intraperitoneal yoldan ketamin/ksilazin bileşimi verilerek servikal dislokasyonla ötenazi uygulandı. Vücudun dış yüzeyinin dezenfeksiyonundan sonra her iki arka bacak derisi steril makas, pens ve bisturi yardımıyla sıyrıldı, ayaklar kesilerek uzaklaştırıldı. Kesilen bacaklar PBS içeren (fosfat tuz solüsyonu, PBS-Dulbecco L1825, Biochrom AG, Almanya) steril bir petri kabına alındı. Kemikler üzerindeki kaslar uzaklaştırıldı, tibia ve femur kemikleri çıkartılarak yoğun antibiyotik-antimikotik içeren primer besi ortamı içine alındı. Kemiklerin metafizel uçları kesildikten sonra insülin enjektörü ile kemik iliği boşluğuna primer besi ortamı verilerek kemik iliği santrifüj tüpüne toplandı. Kemik iliği, primer besi ortamı (DMEM [FG0445, Biochrom AG, Almanya] + %10 FBS [Fötal sıgır serumu, S0115, Biochrom AG, Almanya] + penisilin/streptomisin [10000 U/mL / 10000 µg/mL, A2213, Biochrom AG, Almanya] + gentamisin [%1, SV30080, HyClone, USA] içinde 5 dk. süreyle 1000 rpm'de santrifüj edilerek iki kez yıkandı. Santrifüj sonunda üst sıvı dökülerek hücreler primer besi ortamı ile süspanse edildi ve ayrıştırılmayı takiben 25 cm² yüzeyli filtre kapaklı hücre kültür kabında (690175, Greiner Bio-One, Almanya) 37°C'de ve %5 CO₂'li etüvde (HERA

Cell, Heraeus, Almanya) inkübasyona bırakıldı. Bu primer kültürlerden hücrelerin üremesi, 24-48 saat aralıklarla ters faz ışık mikroskopunda gözlemlendi ve iki günde bir besi ortamı değiştirildi. Kültür kabının yüzeyine tutunan fibroblastik görünümüne hücreler kemik iliği stromal hücreleri olduğundan diğer kan hücreleri ve yüzeye tutunmayan hücreler (hematopoietik kök hücreler) besi ortamının alınmasıyla uzaklaştırıldı.

Kİ-MKH'lerin Karakterizasyonu

Kİ-MKH'lerin karakterizasyonu için bir kök hücre belirteci olan MRC OX-7 (Anti-CD90 antikoru, ab225, Abcam, USA) ve bir hematopoietik hücre belirteci olan OX-42 (Anti-CD11b antikoru, ab78457, Abcam, USA) kullanıldı. Bu amaçla erken pasaj seviyesindeki Kİ-MKH'ler lameller üzerinde inkübe edildi. OX-42 antikoru için pozitif kontrol olarak sıçan intraperitoneal boşluğundan izole edilen ve CD11b (hücre membranında lokalize olur) proteinini eksprese ettiği bilinen intraperitoneal makrofajlar (34, 35) kullanıldı.

Lamel üzerine ekilen hücrelerde immünohistokimyasal (ICC) işaretleme

Üzerine kültür edilmiş hücreler (Kİ-MKH'ler, primer makrofajlar) bulunan lameller, ince uçlu bir pens yardımı ile önceden besi ortamı dağıtılmış 24-kuyucuklu plakaya alındı. PBS ile iki kez yıkama yapıldı. +4°C'de tutulan %4'lük paraformaldehit (PFA-PBS, 19943, Affymetrix/USB) lameller üzerine eklendi (1 mL/kuyucuk) ve oda sıcaklığında, çalkalayıcıda (300 rpm) 15 dk. fiksasyon yapıldı. Süre sonunda, kuyucuklardaki PFA çekildi ve PBS ile iki kez yıkama yapıldı. Kuyucuklara 50 mM NH₄Cl solüsyonu eklendi (1 mL/kuyucuk) ve oda sıcaklığında, çalkalayıcıda (300 rpm) 7 dk. inkübasyon yapıldı. PBS-Tween-20 (%0.1) ile çalkalayıcıda (300 rpm) 2 x 5 dk. yıkama yapıldı. %3 Sığır Serum Albumini (SSA) içeren %0.1 PBS-Tween-20 ile oda sıcaklığında, çalkalayıcıda (300 rpm) bir saat inkübasyon yapıldı. PBS ile yıkamadan sonra lameller üzerine seyreltilmiş primer antikorlar damlatıldı ve nemli odacık içerisinde +4°C'de gece boyu inkübe edildi. %0.1 PBS-Tween-20 ile çalkalayıcıda (300 rpm) 3 x 10 dk. yıkanan lameller üzerinde 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) içeren sekonder antikor kullanıldı ve karanlıkta oda sıcaklığında 45 dk. inkübe edildi. PBS ile yıkamadan sonra lameller, üzerlerine 7 µL Mowiol 4-88 damlatılan lameller üzerine hücreli yüzey Mowiol ile yüzleşecek şekilde kapatılarak görüntülendi (Nikon Eclipse E600 epifloresan mikroskop, Tokyo, Japonya).

Kİ-MKH'lerin Büyüme Kinetiğinin ve Kalibrasyon Eğrisinin Çıkarılması

Kİ-MKH'ler için optimal kültür koşullarının belirlenmesi amacıyla farklı konsantrasyonda hücreler %10 FBS (S0115, Biochrom AG, Almanya) ve %0.02 gentamisin (SV30080, HyClone USA) içeren DMEM (FG0415, Biochrom AG, Almanya) kültür ortamıyla inkübe edildi. Hücreler %80 konfluent olunca 12 adet 96-kuyucuklu plakaya 5000 hücre/cm² hücre yoğunluğuyla ekim yapıldı. Kültür ortamının hücre proliferasyonu üzerine etkisi 12 gün boyunca her gün MTT (3-(4,5-dimetiltiyazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum bromid) hücre canlılık testi ile belirlendi.

Kalibrasyon eğrisi için 15 adet 96-kuyucuklu plakaya farklı hücre konsantrasyonlarında (2500, 5000, 7500 ve 10000 hücre / cm²) ekim yapıldı. 15 gün boyunca her gün MTT canlılık testi yapıldı. Kalibrasyon eğrisi ve büyüme kinetiği verileri kullanılarak Kİ-MKH'lerin logaritmik fazda spesifik büyüme hızları hesaplandı.

Kİ-MKH'lerin Farklılaşma Potansiyellerinin İncelenmesi

Kök hücre karakterizasyonundan sonra, Kİ-MKH'lerin farklılaşma potansiyellerini değerlendirmek amacıyla osteojenik ve kondrojenik farklılaşma deney protokolleri tasarlandı.

Osteojenik farklılaşma

Osteojenik farklılaşma (36) için pasaj 2 seviyesindeki Kİ-MKH'ler 6-kuyucuklu plakalara 3000/cm² konsantrasyonunda ekildi ve 48 saat sonra hücre kültürü yüzeyinden büyüme ortamı çekildi, yerine %10 FBS, 100 nM deksametazon (D2915, Sigma-Aldrich, USA), 10 mM β-gliserolfosfat (G9891, Sigma-Aldrich USA), 200 µM L-askorbik asit 2-fosfat (A8960, Sigma-Aldrich, USA) ve %0.02 gentamisin (SV30080, HyClone USA) içeren DMEM osteojenik farklılaşma ortamı eklendi. Üç günde bir ortam değişimi yapıldı, bu şekilde kültür dört hafta devam ettirildi. Deney süresi sonunda osteojenik farklılaşmanın tespiti için Alizarin Red S ve Von Kossa boyama protokolleri uygulandı.

Alizarin Red S boyama protokolü

Hücreler 2 kez PBS ile yıkandıktan sonra 300 µL %4 PFA-PBS ile bir saat oda sıcaklığında fikse edildi (çalkalayıcı üzerine 300rpm'de). Distile su ile yıkamadan sonra %2 Alizarin Red S (pH 4.2, A5533, Sigma-Aldrich, USA) ile iki dk. boyama yapıldı. Distile su ile yıkama sonrası mikroskop altında gözlem yapıldı.

von Kossa boyama protokolü

Hücreler PBS ile yıkandıktan sonra 300 µL %4 PFA-PBS ile oda sıcaklığında bir saat fikse edildi (çalkalayıcıda 300rpm'de). %5 gümüş nitrat (A3944, Applichem, Almanya) ile karanlıkta 30 dk. inkübe edilen hücreler distile su ile yıkandıktan sonra UV altında bir saat inkübe edildi. %0,1 eosin (etanolde hazırlanmış) ile iki dk. inkübe edilip distile su ile yıkamadan sonra mikroskop altında gözlem yapıldı.

Kondrojenik farklılaşma

Hücreler 2x10⁷ hücre/mL konsantrasyonda, 1 mM sodyum pirüvat (11360-039, Gibco, USA), 10 ng/mL TGF-β1 (T5050, Sigma, USA), %0.125 ITS premix (354351, BD Biosciences, Almanya), 50 µg/mL L-askorbik asit 2-fosfat (A8960, Sigma-Aldrich, USA), 100 nM deksametazon (D2915, Sigma-Aldrich, USA), %0.02 gentamisin (SV30080, HyClone USA) içeren DMEM kondrojenik farklılaşma ortamı ile süspansiyon edildi. Hücre süspansiyonu 12,5 µL'lik damla halinde 24-kuyucuklu plakanın her gözüne damlatıldı. Tutunma için iki saat inkübe edildikten sonra her kuyucuğa 500 µL kondrojenik ortam ilave edildi. Üç günde bir ortam değişimi yapıldı ve mikrokütleler 21 gün sonra incelemeye alındı.

Alsıyan mavisi boyama protokolü

Kuyucuklardan besiyeri uzaklaştırıldıktan sonra hücreler D-PBS ile yıkanıp %4 PFA ile oda sıcaklığında 30 dk fikse edildi (çalkalayıcıda 300rpm'de). D-PBS ile yıkamadan sonra %1 alsıyan mavisi solüsyonu (%3 asetik asit içerisinde) ile 30dk boyama yapıldı (A5268, Sigma-Aldrich, USA). %3 asetik asit ile yıkamadan sonra kuyucuklar distile su ile yıkanıp mikroskopta incelendi.

Kİ-MKH'lerin Kitosan Bazlı Filmler Üzerinde Kültivasyonu

Üretilen kitosan bazlı materyallerin in vitro biyoyumluluk değerlendirmesi ISO 10993-5 standardı referans alınarak direkt temas testi ve ekstrakt testi ile, L929 fare fibroblastları ve KİMKH'ler kullanılarak daha önce ekibimiz tarafından yapılmıştı (37).

Hazırlanan kitosan, kitosan fosfat ve kitosan sülfat filmler üzerine Kİ-MKH'ler ekilerek hücrelerin substrat yüzeyine tutunma ve proliferasyon özellikleri değerlendirildi. Sterilizasyonu %70 etanol ile yapılan filmler üzerine hücre ekimi öncesi yüzeyler üç kez PBS'le yıkandı ve yüzey şartlandırması için bir gece serumlu kök hücre büyüme ortamı (%10 FBS ve %0.02 gentamisin içeren DMEM) kültür ortamıyla inkübe ile 37°C'de inkübe edildi. Çalışmanın başında yapılan büyüme kinetiği verileri doğrultusunda kitosan bazlı film yüzeyler üzerine ekilecek hücre konsantrasyonu olarak 8000 hücre/cm² seçildi ve hücreler film yüzeylerine ekildi.

Kİ-MKH'lerin Nöronal / Glial Hücrelere Farklılaştırılması

Çalışmada, kitosan bazlı yüzeylerin Kİ-MKH'lerin nöronal/gliyal farklılaşmasına etkisi incelendi. Kİ-MKH'lerin nöronal/gliyal farklılaşma için daha önceki çalışmalarda (38 - 42) tanımlanan farklı indüksiyon protokolleri bazı modifikasyonlarla kendi kültür sistemimize uyarlandı. Pasaj 3 seviyesindeki Kİ-MKH'ler kitosan bazlı filmler üzerine ekildi (8000 hücre/cm²) ve 48 saat DMEM + %10 FBS + %1 Na-pirüvat + %1 L-glutamin + %0,02 gentamisin içerikli kültür ortamı ile kültive edildi. Büyüme ortamı uzaklaştırıldıktan sonra farklı yüzeyler üzerindeki Kİ-MKH'ler DMEM + %10 FBS + 10 ng/mL FGFb içeren pre-indüksiyon ortamında 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda pre-indüksiyon ortamı çekildi, kültür yüzeyi bir kez PBS ile yıkandı. Kültür sistemleri DMEM + %1 Na-pirüvat + %1 L-glutamin + %0,02 gentamisin + 50µM β-merkaptetanol + %1 B27 + 10 ng/mL FGFb + 10 ng/mL PDGF + 10 mM KCl + %1 DMSO + 200 µM BHA içeren indüksiyon ortamı ile 10 gün boyunca inkübe edildi. Üç günde bir besiyeri değişimi yapıldı.

İmmunohistokimyasal karakterizasyon

Nöronal/gliyal farklılaşmanın karakterizasyonu için deney ve kontrol gruplarından 3. ve 6. günler örnekler toplandı. Kİ-MKH'lerin nöronal/gliyal farklılaşması immünotokiyasal işaretlemelerle gösterildi. Nöronal farklılaşmanın belirlenmesi için nestin ve β3-tübülin; gliyal karakterizasyon için gliyal fibriller asitik protein (GFAP) ve oligodentrosit belirteç-4 (O4) seçildi. Primer antikolların pozitif kontrolü olarak sıçan beyin preparatı hazırlandı ve β3-tübülin pozitif kontrolü olarak Neuro-2a hücre hattı kullanıldı.

Taramalı elektron mikroskopisi (SEM) ile morfolojik karakterizasyon

Kitosan bazlı filmler üzerinde hücre-materyal ilişkilerinin daha yakından incelenebilmesi için SEM takibi yapıldı. Örnekler fizyolojik serum ile yıkandıktan sonra +4°C'de %5 glutaraldehit (pH 7.2, G5882, Sigma-Aldrich, USA) içeren 0.1 M sodyum kakodilat trihidrat (C0250, Sigma-Aldrich, USA) içerisinde 30 dk. sabitlendi. Başka bir solüsyonla yıkama yapmadan %7 sakkaroz (g/mL) 0.1 M sodyum kakodilat trihidrat içerisinde 30 dk bekletildi. Post-fiksasyon için %2 ozmiyum tetroksit (0972B, Polysciences, USA) içeren 0.1 M sodyum kakodilat trihidrat içinde 30 dk bekletildi. Distile suda yıkanan örnekler artan derecelerdeki alkol serileri (%35, %50, %70, %85, %95, %100, %100) içerisinde her bir basamak 5 dk olacak şekilde dehidrasyona tabi tutuldu. Örnekler heksametildisilazan (HMDS, 8043240050, Merck, Almanya) solüsyonunda 5 dk bekletildikten sonra oda sıcaklığında kurutulup desikatörde saklandı. Özel kaplama cihazında (sputter-coater) 200 Å kalınlığında altın ile kaplanan örnekler JEOL-JSM-5200 taramalı elektron mikroskobunda incelendi.

BULGULAR

Sıçan Kemik İliğinden Mezenşimal Kök Hücre İzolasyonu

Primer kemik iliği kültürünün 72. saatinde besiyeri değişimi öncesinde Kİ-MKH'lerin kültür kabı yüzeyine tutunduğu, hematopoitik hücrelerin ise yüzeyde süspanse halde bulunduğu görüldü. Pasaj 0 (P/0) seviyesindeki mezenşimal kök hücrelerin az yayılmış multipolar morfoloji gösterdiği belirlendi. Primer kültürü takiben bir hafta içerisinde Kİ-MKH'ler inkübe edildikleri kültür kabının yüzeyini kapladı (Şekil 1).

Artan pasaj seviyesi ile birlikte hücre morfolojisinde değişimler gözlemlendi. Primer kültürde yüzeye az yayılmış hücre morfolojisi gözlenirken, pasajlamayı takiben, hücrelerin substrat temas ara yüzeyinin arttığı belirlendi (Şekil 2).

Kİ-MKH'lerin Karakterizasyonu

MRC OX-7 (Anti-CD 90) ve OX-42 (Anti-CD11b) primer antikolları üzerinden karakterizasyon protokolü uygulanan Kİ-MKH'lerin, bir kök hücre membran belirteci olan CD-90 eksprese ettikleri, öte yandan immün hücre belirteci olan CD 11b antijeni yönünden negatif oldukları immüno Floresan yöntemlerle gösterildi. OX-42 primer antikoru için pozitif kontrol olarak seçilen intraperitoneal makrofajlarda CD11b ekspresyonu gösterildi (Şekil 3).

Kİ-MKH'lerin Kalibrasyon Eğrisi ve Büyüme Kinetiği

5000 hücre/cm² konsantrasyon için oluşturulan büyüme eğrisinde (Şekil 4), 2-6 gün aralığı logaritmik faz olarak kabul edildi ve buradan sistemin spesifik büyüme hızı, ikilenme süresi aşağıdaki şekilde hesaplandı (43):

$$\mu = \frac{\ln \frac{x_{son}}{x_{ilk}}}{(t_{son} - t_{ilk})} \quad t_d = \frac{\ln 2}{\mu}$$

$$\mu_{DMEM} = \frac{\ln \frac{3698}{1023}}{96 \text{ saat}} = 0,0133 \text{ sa}^{-1}$$

$$t_d(DMEM) = \frac{\ln 2}{0,0133} \cong 52 \text{ saat}$$

μ : spesifik büyüme hızı

x : hücre miktarı

Farklı başlangıç hücre konsantrasyonlarına sahip Kİ-MKH kültürlerine ait büyüme eğrileri elde edildi (Şekil 5). Elde edilen büyüme eğrileri başlangıç hücre konsantrasyonu ile paralel bir davranış sergiledi. Çalışılan tüm konsantrasyonlarda Kİ-MKH'lerin büyümesi 10.günden sonra azalan bir hızla devam etti ve 14. günden sonra kültürlerin ölüm fazına girdiği belirlendi. Kültürlerde, sınırları belirgin, durgun faza rastlanmadı.

Kİ-MKH'lerin Farklılaşma Potansiyellerinin İncelenmesi

Osteojenik farklılaşma

Kİ-MKH'lerin osteojenik farklılaşması için 4 haftalık bir deney protokolü tasarlandı. 4 hafta boyunca kültürler mikroskop altında takip edildi. Farklılaşma ortamının varlığında da hücre proliferasyonunun devam ettiği gözlemlendi. Osteojenik farklılaşma protokolünü takiben 7 gün içerisinde kültür yüzeyi tamamen hücrelerce kaplandı. 7. günden sonra deney grubu kuyucuklarında mineralizasyonla bağımlı depozit oluşumları gözlemlendi. Deney gruplarında fenotipik olarak kemik hücrelerine benzer hücre morfolojilerine rastlandı (Şekil 6).

28. günde deney grupları mineralize bölgelerin tespiti için Alizarin red ve von Kossa ile boyandı. Kontrol gruplarında herhangi bir mineralizasyon belirtisi gözlenmezken, deney gruplarında oldukça belirgin matris mineralizasyonu elde edildi. Deney gruplarında kalsiyum depozitleri Alizarin red ile kırmızıya boyanırken, kontrol grubunda herhangi bir boya tutunması olmadı; kalsiyum-fosfat depozitleri Von Kossa boyama ile siyaha boyanırken, kontrol grubunda açık kahve renkte arka plan gözlemlendi (Şekil 7).

Kondrojenik farklılaşma

Kİ-MKH'lerin mikrokütle yöntemiyle kondrojenik farklılaşma protokolü 21 gün süreyle uygulandı. Kondrojenik ortamla hücre ekimi yapılan gözlerde 24 saat sonunda mikro küreciklerin oluştuğu ve kültür süresi boyunca büyüdükleri, 21 gün sonunda 1 mm çapa ulaştıkları gözlemlendi. 21. günde deney grupları kondrojenik farklılaşmanın bir göstergesi olan proteoglikanların tespiti için alsiyan mavisi ile boyandı (Şekil 8).

Kitosan Bazlı Materyallerin Karakterizasyonu

Kitosandan, kitosan sülfat sentezinin karakterizasyonu FTIR analizi ile yapıldı. FTIR analizi ile elde edilen kitosan ve kitosan sülfat eğrileri karşılaştırıldığında, 1219 cm^{-1} ve 800 cm^{-1} de görülen S=O ve C-O-S bağlarına ait absorpsiyon pikleri kitosan içinde sülfat fonksiyonel gruplarının başarıyla bağlandığını göstermektedir (Şekil 9).

Kİ-MKH'lerin Kitosan Bazlı Yüzeyler Üzerine Tutunması

Farklı kalınlık ve yoğunlukta hazırlanan kitosan filmler üzerinde kültüve edilen Kİ-MKH'lerin, kitosan ve kitosan fosfat film yüzeyler üzerine fazla tutunmadığı ve süspanse şekilde kültür ortamında kaldığı belirlendi. Belli bir süre bu yüzeyler üzerinde tutulan hücreler toplanarak polistiren yüzeyler üzerine alındığında hücrelerin yüzeye tutunduğu tespit edildi. İnkübasyonu takiben kitosan ve kitosan fosfat yüzeylere düşük oranda tutunan hücre grubu yüzeye yayılım gösterebildi (Şekil 10). İnkübasyon süresine bağlı olarak yüzeye tutunan hücre miktarında anlamlı bir artış olmazken, tutunmuş hücrelerin zamana bağlı olarak belli oranda yüzeyde yayıldığı gözlemlendi. Farklı kütle oranlarında (4:1, 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3) kitosan sülfat içeren K/KS yüzeylerde, kitosan sülfat konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak hücre tutunma özelliklerinin iyileştiği gözlemlendi (Şekil 10). Bundan sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere K/KS (1:1) oranı referans olarak seçildi. 1:1 oranında hazırlanan K/KS film tabakası üzerinde inkübe edilen Kİ-MKH'lerin yüzeye transferden yaklaşık 2 saat sonra tutunmaya başladıkları ve 24 saat sonunda hücrelerin tamamının yüzeye tutunduğu belirlendi. 24 saat sonunda elde edilen tutunma ve proliferasyon verilerinin kontrol polistiren yüzeylerle çok benzer olduğu saptandı. Bununla birlikte K/KS yüzeylerde gelişen Kİ-MKH'lerin morfolojik yapılarının kontrol yüzeylerden oldukça farklı olduğu belirlendi. Kitosan sülfat yüzeylerde kontrole göre daha yüksek sayıda dendritik yapılara rastlandı.

Kİ-MKH'lerin Nöronal / Glial Hücrelere Farklılaşması

Nöral farklılaşma ortamında, kitosan, kitosan fosfat ve kitosan sülfat yüzeylerde kültüve edilen Kİ-MKH'lerin kültürdeki fenotipik değişimleri Şekil 11'de verilmiştir. Buna göre her üç yüzey üzerinde de hücrelerde sitoplazmik kontraksiyonlar gözlemlendi; akson ve dendrit benzeri morfolojiler tespit edildi.

Kitosan ve kitosan fosfat yüzeyler üzerinde kültüve edilebilen düşük yoğunlukta hücrelerin farklılaşma protokolleri sürecince yüzeyden ayrılmadığı gözlemlendi. Bu yüzeylerde, az sayıda hücrenin belli alanlarda lokalize olduğu, farklılaşma protokollerini takiben hücre sayısında artış gözlenmezken, hücrelerde sitoplazmik uzantıların varlığı saptandı. Hücre tutunmasının az olmasına bağlı olarak kitosan ve kitosan fosfat yüzeylerde SEM ve immunofloresan incelemeler yapılmadı.

Kitosan sülfat yüzeyler üzerinde nöral indüksiyon ortamında kültüve edilen Kİ-MKH'lerde yoğun sitoplazmik kontraksiyonlar saptandı. Multipolar karakteristiğe sahip olduğu bilinen Kİ-MKH'lerin büyük bölümünde aksonal uzantılar belirlendi. Bu yüzeyler üzerinde hücre proliferasyonu farklılaşma protokolü süresince devam etti. İnkübasyon protokolü süresince bu yüzeyler üzerinde yüksek hücre canlılığı korundu.

Kitosan sülfat yüzeyler üzerinde kontrol ve nöral indüksiyon ortamlarında 5 gün inkübasyon sonunda kültürlerden SEM için örnekler alındı. Yapılan SEM incelemelerinde nöral indüksiyon ortamına maruz kalan

kültürlerdeki Kİ-MKH'lerin büyük bölümünün nöronal morfoloji gösterdiği belirlendi. Hücrelerin filopodlar vasıtasıyla birbirleriyle temasa geçtikleri gözlemlendi (Şekil 12).

Kitosan sülfat ve polistren yüzeylerde nöral farklılaşma ortamına alınan Kİ-MKH'lerin farklılaşma potansiyeli immünohistokimyasal belirteçler ile değerlendirildi. Nöral indüksiyonun 6. gününde ne kontrol yüzeylerde ne de kitosan sülfat yüzeylerde nestin sinyali saptanmadı. Kitosan sülfat yüzeylerde inkübe edilen hücrelerde kaplamasız yüzeylere göre daha güçlü $\beta 3$ tübülün sinyalleri saptandı. Kitosan sülfat yüzeylerde bazı hücrelerde belirgin GFAP sinyali rastlanırken, kaplamasız yüzeylerde GFAP sinyali saptanmadı. Bir oligodentrosit belirteci olan O4 yönünden deney gruplarının hiçbirinde sinyal saptanmadı (Şekil 13).

4. TARTIŞMA

Bu çalışmada, yüzey kimyasına hassas olduğu bilinen MKH'lerin (8, 44 - 46) sinir hücrelerine farklılaştırılabileceği fikrinden yola çıkılarak, kitosan bazı yüzeyler üzerinde farklılaşma özellikleri incelendi ve tek bir kültür ortamı içerisinde, nöral/gliyal yönde farklılaşma potansiyelleri değerlendirildi. Bu amaç doğrultusunda, sıçan kemik iliğinden MKH izolasyonu yapılarak erken pasaj seviyesinde stoklar oluşturuldu. Birçok farklı erişkin doku tiplerinden yoğunluk gradienti ayırımı ile izole edilebilen MKH'ler, proliferasyon ve farklılaşma potansiyeli açısından heterojen bir hücre karışımı özelliği göstermektedir (47, 48). CD11b (bir immün hücre belirteci), glikoforin-A (bir akyuvar belirteci) veya CD45 (bir hematopoietik hücre belirteci) belirteçlerinin mezenşimal kök hücrelerde ifade olmadığı konusunda bir fikirbirliği vardır (49). Bu çalışmada da Kİ-MKH'lerin karakterizasyonu için 2006 yılında Uluslararası Hücresel Sağaltım Topluluğu tarafından yayınlanan bildirmede adı geçen CD 90 ve CD 11b antikoları kullanıldı (50). CD 90 antikoru MKH spesifik bir membran protein belirteci olarak kullanılırken CD 11b, izole edilen Kİ-MKH popülasyonunu kontamine etmesi en olası hematopoietik hücreleri ayırt etmek amacıyla seçildi. Elde edilen kültürlerde bu kriterleri karşılayacak şekilde CD 11b ekspresyonuna rastlanmazken, spesifik bir CD 90 boyaması gözlemlendi (Şekil 3).

Bir sonraki aşamada, Kİ-MKH'lerin farklı deney tasarımlarında en uygun hücre konsantrasyonlarını belirlemek amacıyla yapılan büyüme kinetiği denemesinde, Kİ-MKH'lerin 5000 hücre/cm² konsantrasyonda ve DMEM büyüme ortamında ikilenme süreleri yaklaşık 52 saat olarak belirlendi. Peng, L. ve arkadaşları, farklı dokulardan izole edilen sıçan türevli MKH'lerin karşılaştırmalı analizini yaptıkları çalışmada Kİ-MKH'lerin 5100 hücre/cm² başlangıç yoğunluğu için ikilenme sürelerini 61,2 saat olarak rapor etmişlerdir (51). Danoviz M. ve arkadaşları farelerin yağ dokusundan izole edilen MKH'lerin ortalama ikilenme sürelerini 52,5 saat olarak bulmuşlardır (10). Sonuçlar belli oranda literatürle uyumla birlikte, MKH'lerin izole edildiği kaynağa, dokuya ve pasaj seviyesine bağlı olarak farklı büyüme hızlarına sahip olduğu görülmektedir.

Kİ-MKH'lerin farklılaşma potansiyellerinin değerlendirilmesinde, hücreler için osteojenik ve kondrojenik farklılaşma deney koşullarının tasarlanması yaygın bir yaklaşımdır (52 - 54). MKH'ler osteojenik farklılaşma sürecinde fibroblastik morfolojilerini kaybederek daha kübik bir şekil gösterir ve kollajen tip 1 ağırlıklı ekstraselüler matris (ESM) oluştururlar. Farklılaşmanın daha geç evrelerinde agregatlar ya da nodüller oluşur. Bu nodüller Alizarin red ve Von Kossa boyama yöntemleri ile tespit edilebilmektedir (55, 56). Osteojenik farklılaşma sırasında mezenşimal kök hücrelerde alkalen fosfataz (ALP) ekspresyonunda artış ve kalsiyum birikimi gözlenir (8, 57). Donzelli E. ve arkadaşları, MKH'lerin kolajen iskeleler üzerinde osteojenik farklılaşması üzerine yaptıkları çalışmada, nodüler agregatların oluşumunu 7. günden itibaren gözlemlenmiş ve en yüksek mineralizasyona 28. günde ulaşıldığını tespit etmişlerdir (55). Bu çalışmada ise 10. günden itibaren nodüler agregatların oluşumu mikroskobik düzeyde saptanmış ve 28 günlük inkübasyon sonunda deney gruplarında osteojenik farklılaşma ile bağlantılı, yüksek oranda mineralizasyonun varlığı tespit edilmiştir (Şekil 7).

MKH'lerde kondrojenik farklılaşmaya yönelik farklı deney tasarımlarını içeren çalışmalar mevcuttur (51, 53, 54, 58). Zhang, L. ve arkadaşları, insan türevli MKH'lerin kondrojenik farklılaşması için mikrokütle ve pellet kültür sistemleri arasında yaptıkları karşılaştırmalı analizde, mikrokütle kültüründe uyarılmış kıkırdak dokularının daha geniş ve homojen olduğunu ve sülfatlanmış glikozaminglikan birikiminin 7. günden 21. güne doğru arttığını saptamışlardır. Benzer şekilde, bu çalışmada 21 gün sonunda deney gruplarında, kondrojenik bir karakteristik olan yüksek oranda proteoglikan varlığı alsiyen mavisi boyama tekniğiyle kalitatif olarak gösterildi (Şekil 8).

Kitosanın fiziksel ve kimyasal yapısının film kaplamaların ve üç boyutlu iskelelerin hazırlanmasında önemli avantajlar sunduğu (59, 60) buna ek olarak, farklı çalışmalarda biyoyumluluğunun yüksek olduğu gösterilmiştir (61 - 64). Bu çalışmada kitosanın sülfat ve fosfat fonksiyonel gruplarıyla modifiye edilmiş türevlerinin sinir hücreleri ile olan etkileşimi incelendi. Fosfat fonksiyonel grubu (65), yüzey yük yoğunluğu açısından kitosan sülfata kontrol olarak seçildi.

Kitosan fosfat (32, 65, 66) ve kitosan sülfatın (31, 67, 68) sentezine yönelik literatürde farklı metotlar geliştirilmiştir. Bu tez çalışmasında Gamzazade ve arkadaşlarının geliştirdikleri metoda küçük modifikasyonlar yapılarak, oda sıcaklığında suda çözünebilen kitosan sülfat elde edildi. Üretilen kitosan sülfat, fiziksel ve kimyasal özellikleri ile değerlendirildiğinde literatürle paralellik göstermektedir. Kitosan fosfat sentezi için, suda ya da seyreltik asetik asit solüsyonunda çözünebilen bir substrat elde edebilmek amacıyla Pramanik ve arkadaşlarının çalışması referans alındı (32).

Xing, R. ve arkadaşları formik asit bazlı metotla ürettikleri düşük moleküler ağırlıklı kitosan sülfatın FTIR spekturumunda 1222 ve 806 cm^{-1} 'deki karakteristik absorpsiyondan sorumlu S=O ve C–O–S bağ esnemelerini göstermişlerdir (69). Zhou, H. ve arkadaşları da benzer protokol kullanarak sentezledikleri kitosan sülfatta 1230 ve 800 cm^{-1} 'deki S=O ve C–O–S bağ esnemelerine bağlı absorpsiyon piklerini göstermişlerdir (70). Literatürle paralel olarak bu çalışmada, FTIR spekturumunda 1219 ve 800 cm^{-1} 'deki absorpsiyon pikleriyle bağlantılı sülfat gruplarının yer aldığı S=O ve C–O–S bağları gösterildi (Şekil 9).

Amaral ve arkadaşları, fonksiyonize kitosan membranların hazırlanması üzerine çalışmalarında, üretilen kitosan filmlerin yüzey fosforilasyonunu $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{Et}_3\text{PO}_4/\text{P}_2\text{O}_5$ /bütanol reaksiyon sistemiyle gerçekleştirmişlerdir (71). Başka bir çalışmada, Wan ve arkadaşları hazırlanan kitosan filmlerin fosforilasyonu için ortofosforik asit/üre/DMF reaksiyon sistemini kullanmışlardır (72). Bu çalışmada deney tasarımlarına bağlı olarak kitosan bazlı filmlerin, kaplama şeklinde doku kültürü kaplarının yüzeyinde bulunması gerekliliği, literatürden farklı bir üretim metodunun tercihine neden olmuştur. Kitosan fosfat film kaplamaların üretim aşamasında kitosan ve kitosan fosfat solüsyonları eşit kütlede karıştırılarak yüzeye uygulanmıştır. Kitosan sülfat filmlerin üretimine yönelik olarak literatür bilgisi son derece kısıtlıdır. Xiang, Y. ve arkadaşları metanol bloklama polimer membranları tasarımı üzerine yaptıkları bir çalışmada, kitosan ve kitosan sülfatı aynı ortamda %1 asetik asit solüsyonunda çözerek cam plakalar üzerinde membran şeklinde ürettiklerini bildirmişlerdir (73). Bu bilgiden yola çıkılarak yapılan kitosan sülfat film üretim denemeleri başarısızlıkla sonuçlandı. İki substrat arasında sülfat ve amino gruplarının oluşturduğu hızla gelişen çapraz bağlar, doku mühendisliğinde kullanılabilecek homojen ve stabil filmlerin üretimini mümkün kılmadı. Bu nedenle, literatürden bağımsız olarak, kitosan sülfat film üretiminde kademeli kaplama yöntemi geliştirildi.

Kitosan bazlı yüzeyler üzerinde keratinositlerin ve fibroblastların tutunması üzerine literatürde yapılan bazı çalışmalar yüksek deasetilasyon derecesinin hücre tutunmasını teşvik ederken düşük deasetilasyon derecesinin tutunma üzerinde olumsuz etkisini saptamışlardır (74 - 76). Geçmiş çalışmalarda elde edilen bulgular doğrultusunda bu çalışmada satın alınan kitosanın deasetilasyon derecesi artırıldı. MKH'lerin kitosan yüzeye tutunmasında artan deasetilasyon derecesinin olumlu katkısı olsa da, tek başına kitosan yüzeylerin, Kİ-MKH'lerin yüksek düzeyde tutunması için yeterli olmadığı ortaya konuldu. Farklı oranlarda hazırlanan kitosan sülfat yüzeyler içerisinde 1:1 oranında hazırlanan yüzeylerde hücre tutunmasının, polistiren kontrol yüzeyler kadar başarılı olduğu saptanmıştır (Şekil 12). Bu durum kitosan sülfat yüzeylerin Kİ-MKH'lerin gelişimi için uygun olduğu fikrini güçlendirmiştir. Sülfat gruplarının bağlanması ile kitosan yüzeyindeki bazı amin grupları yerine anyonik merkezler eklenmiş olduğu için yüzey polielektrolit özellik göstermektedir (77). Bu da besi ortamı içindeki farklı proteinlerin ve diğer makromoleküllerin

adsorpsiyonu için daha tercih edilir bir yüzey yükü oluşturmaktadır. Kitosan sülfat yüzeylerde hücre tutunmasının artış göstermesi, sülfatlanmış kitosanın aynı zamanda heparin ve heparan sülfat ile benzer kimyasal yapı göstermesine bağlanabilir.

Kİ-MKH'lerin nöral/gliyal farklılaşmasına yönelik farklı protokollerin geliştirildiği çalışmalar mevcuttur (20, 40, 78, 79). MKH'lerin nöral farklılaşmalarına yönelik ilk delillerden sayılan Woodbury ve arkadaşlarının çalışması, DMEM / 2% DMSO / 200 μM BHA içeren nöral uyarılma ortamında, MKH'lerin nöron spesifik enolaz ve nörofilament-M ekspresyonu yönünden pozitif hücrelere farklılaştığını göstermişlerdir (20). Aynı dönemde Sanchez-Ramos ve ekibi, insan ve fare kaynaklı MKH'lerin tanımlanmış nöral farklılaşma ortamında nestin, GFAP ve nöron spesifik enolaz ekspresyonu gösteren nöral/gliyal hücrelere farklılaştığını göstermiştir (23). Sonraki dönemlerde yapılan farklı çalışmalarda bu referanslar baz alınarak yeni nöral/gliyal farklılaşma ortamları tasarlanmıştır (80, 81). Bu çalışmada da protokoller, önceki farklı çalışmalardan amaca yönelik olarak modifiye edilmiştir.

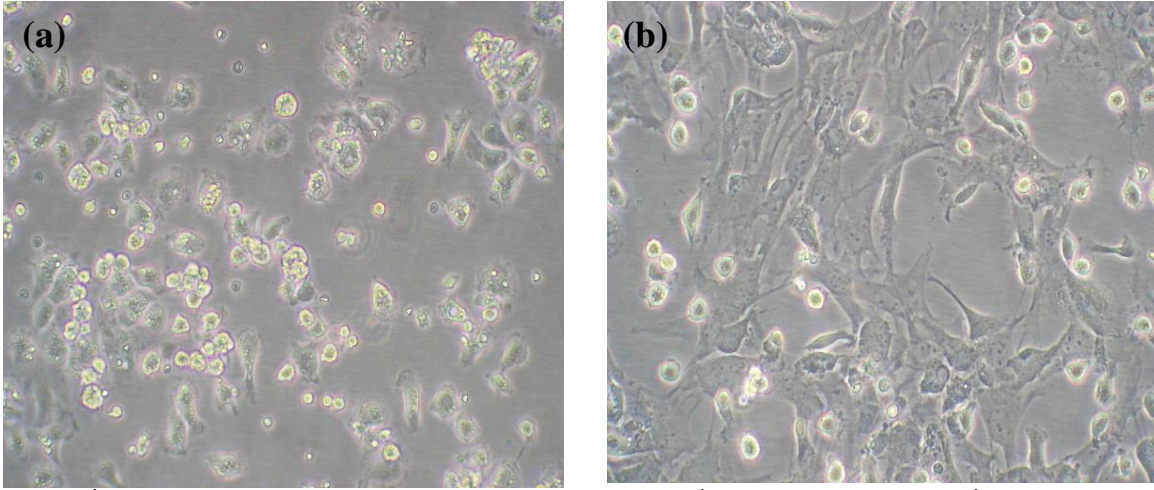
Kitosan sülfat kaplı ve kaplamasız yüzeylerde farklılaşma ortamlarına maruz bırakılan hücre gruplarında 6. günde nöral proteinlerin ekspresyonu incelendiğinde, tüm yüzeylerde β 3-tübülün ekspresyonu saptanırken, kitosan sülfat yüzeylerde çok daha güçlü β 3-tübülün ekspresyonu gözlemlendi. Kitosan sülfat yüzeylerde ayrıca indüksiyon ortamında inkübe edilen hücrelerde spesifik GFAP sinyalleri gözlemlenirken, kontrol yüzeylerde GFAP sinyali tespit edilmedi (Şekil 13). Nöral/gliyal farklılaşmaya yönelik bulgularda, nöral proteinlerin glial protein ekspresyonlarından daha yüksek olması, literatürle paralellik gösteren bir sonuçtur. Woodbury ve ark. kemirgen ve insan kaynaklı mezenşimal kök hücrelerin β -merkaptotanol, dimetilsülfoksit (DMSO) ve bütül hidroksianizol (BHA) gibi kimyasalların farklı kombinasyonlarını içeren indüksiyon ortamında nöronal karakteristik gösteren hücrelere farklılaştığını rapor etmiştir. Bu protokole göre indüksiyonu takiben birkaç saat içerisinde hücre popülasyonunun %80'i nöral morfoloji gösteren hücrelere dönüşmüştür. Nöro-epitelial nöral prekürsör kök hücreler tarafından eksprese edilen, nöronal olgunlaşmayı takiben ekspresyonu azalan ve bir yapısal filament proteini olan nestin ekspresyonunun mezenşimal kök hücrelerde nöral indüksiyonu takiben 5 saat sonra pozitif ve 6 gün sonra negatif olduğu immünohistokimyasal boyamalarla gösterilmiştir (20). Dolayısıyla, bizim örneklerimizde nestin boyamanın gözlenmemesi, bu çalışmaya paralel olarak, nöronal farklılaşmanın ilerlediği şeklinde yorumlanabilir. Literatürde heparin ve heparan sülfattaki sülfat gruplarının fare embriyonik kök hücrelerinin nöronal farklılaşmasını tetiklediği, sülfat gruplarının çıkarılmasının farklılaşmayı durdurduğu gösterilmiştir (82). Yakın tarihli bir çalışmada da kitosan sülfatın fare embriyonik kök hücrelerinde nöronal farklılaşmayı tetiklediği gösterilmiştir (83). Bu çalışmada görüldüğü gibi sülfat gruplarının benzer şekilde Kİ-MKH'lerde de nöronal farklılaşmayı tetikliyor olma

ihtimali yüksektir. Woodbury ve ark. kendi çalışmalarında (20) glial hücre belirteci (GFAP) ekspresyonunun olmadığını rapor etmişlerdir. Bizim örneklerimizde GFAP ifadesinin kitosan sülfat yüzeyler üzerinde gözlenmesi, kitosan kimyasının ve/veya sülfat fonksiyonel grubunun Kİ-MKH'lerde glial farklılaşmayı tetikleyici rol oynadığı şeklinde yorumlanabilir. Sülfat gruplarının glial farklılaşma üzerinde etkisi hakkında daha önce hiçbir literatür çalışmasında rastlanmamıştır, dolayısıyla eğer glial farklılaşmayı tetikleyen sülfat gruplarının varlığı ise, bu bulgu önemli bir potansiyele işaret etmektedir.

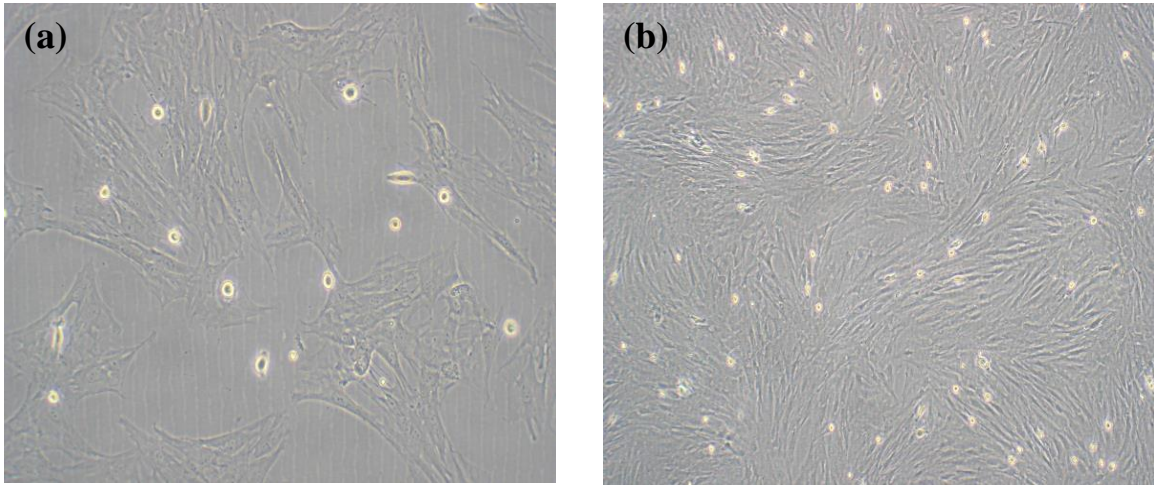
SONUÇ

Kİ-MKH'lerin kitosan bazlı yüzeyler üzerinde üretimine yönelik literatür ve çalışmaları sınırlı sayıda ve tartışmalıdır. Bu çalışmada, MKH'lerin kitosan film yüzeylerine düşük oranda tutunduğu gösterilmiştir. Farklı hücre tiplerinin kitosan üzerinde yüksek hücre tutunması gösterdiği bilinse de, bu çalışmada kullanılan Kİ-MKH'lerde aynı başarı görülmemiştir. Kitosanın kimyasal modifikasyonu sentezlenip ve karakterize edilen kitosan sülfat bazlı yüzeyler, öncelikle hücre tutunması açısından kitosan yüzeylerin iyileştirilmesini sağlamış ve bir sonraki adımda hücrelerin hem nöronal hem de glial yönde farklılaşma sürecini desteklemiştir. Aynı kültür ortamı kullanılarak kontrol polistren yüzeylerde kültüre edilen hücrelerde glial belirteç olan GFAP hiç ifade edilmezken nöronal belirteç olan $\beta 3$ tübülün de daha düşük seviyede ifade edilmiştir.

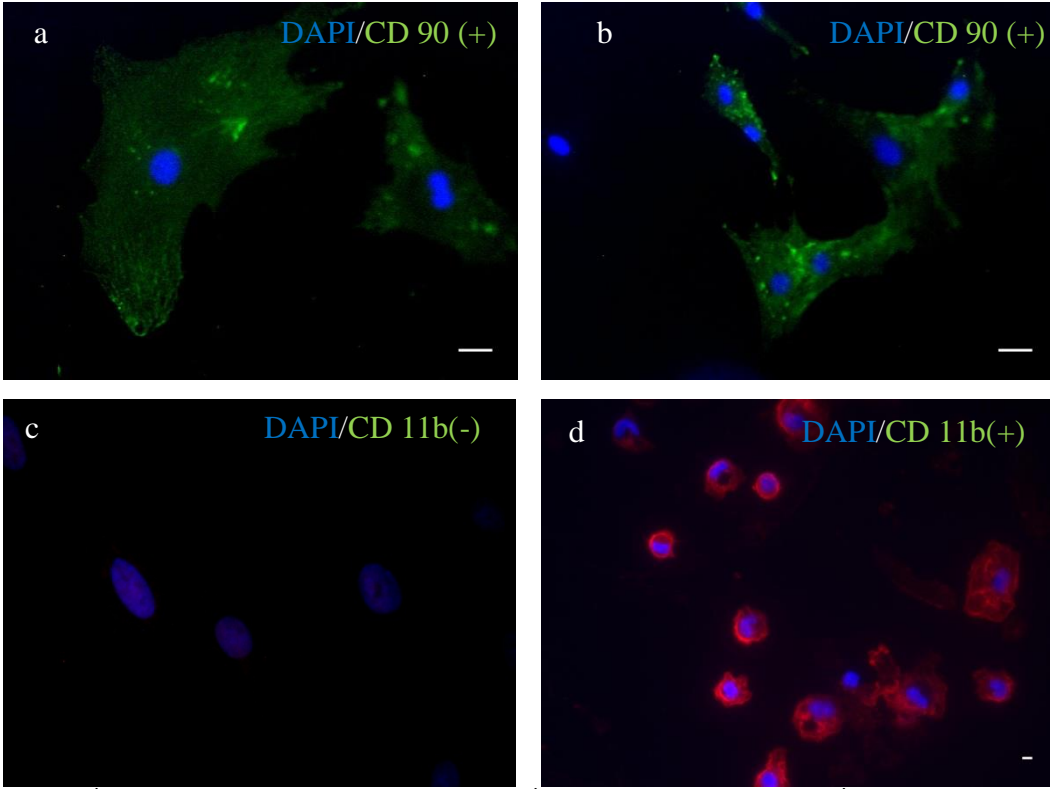
Çalışmanın sonunda elde edilen veriler, kitosan sülfat yüzeylerin insan sağlığı ve yaşam kalitesi adına önemli bir tehdit oluşturan sinir doku hasarlarında ve nörodejeneratif hastalıkların sağaltımında kullanılabilir, substrat kimyası kullanılarak daha kontrollü ve fonksiyonel doku mühendisliği ürünlerinin üretimine olanak verebileceğini göstermektedir.



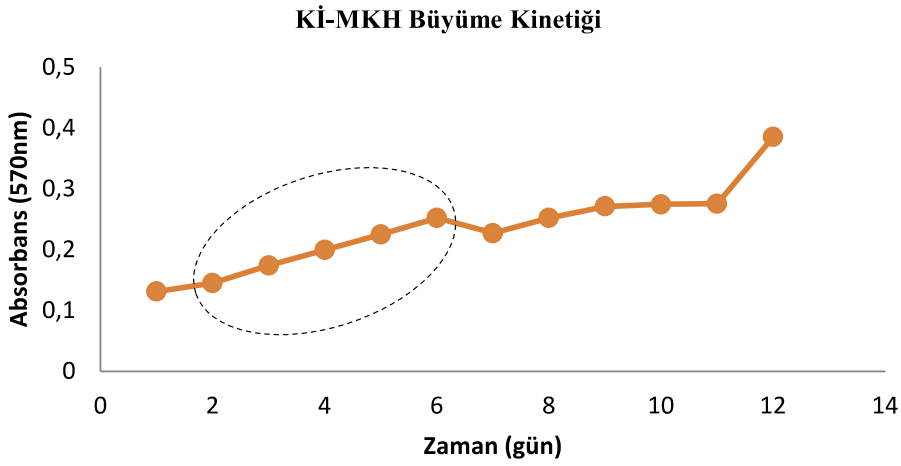
Şekil 1: KI-MKH'lerin ters faz ışık mikroskopunda morfolojik görünüşleri. a) KI-MKH, P/0 (3.gün, 200x); b) KI-MKH, P/0 (7.gün, 200x)



Şekil 2: Pasaj seviyesi ve kültür süresinin KI-MKH'lerin morfolojisi üzerine etkileri. a) KI-MKH, P/1 (2.gün, 100x); b) KI-MKH, P/1 (5.gün, 40x)

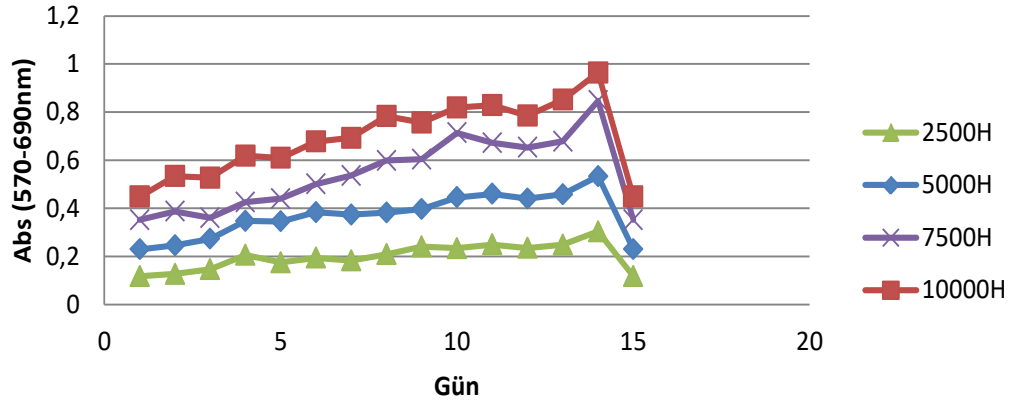


Şekil 3: KI-MKH'lerin karakterizasyonu a,b) CD90 pozitif KI-MKH (200x); c) CD11b negatif KI-MKH (200x). d) CD 11 pozitif primer intraperitoneal makrofaj hücreleri (200x).

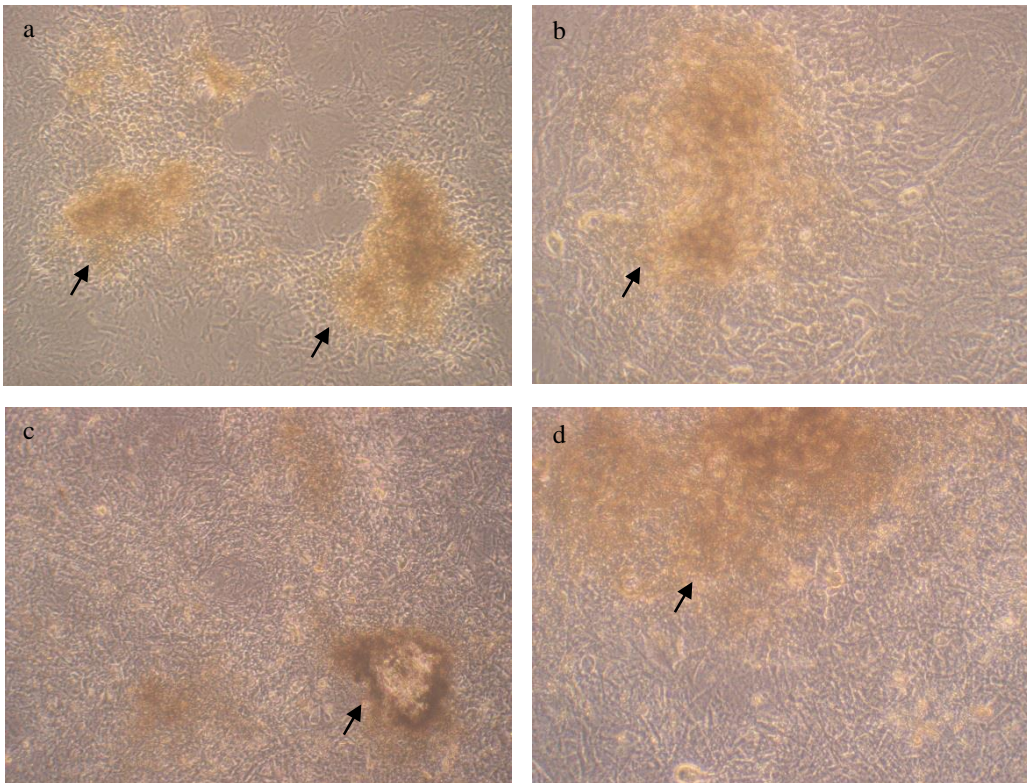


Şekil 4: 5000 hücre/cm² konsantrasyon için oluşturulan büyüme kinetiği eğrisi

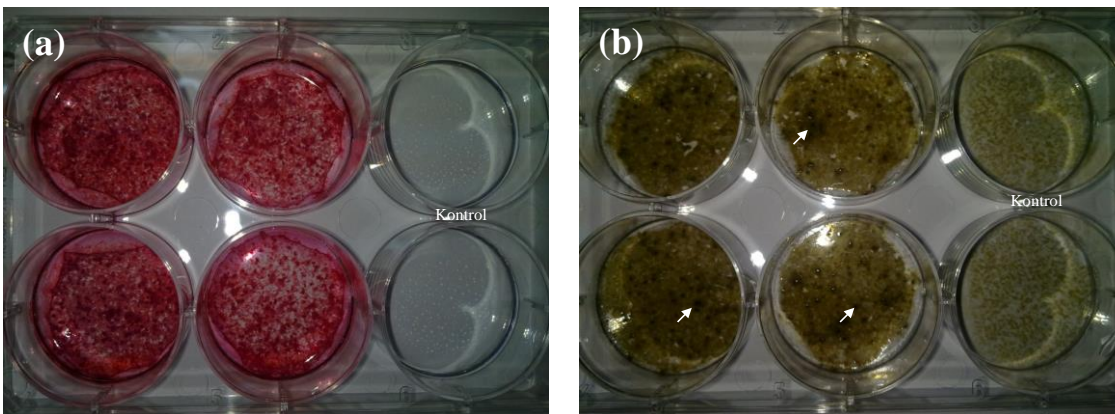
Kİ-MKH Büyüme Kinetiği (DMEM ortamında)



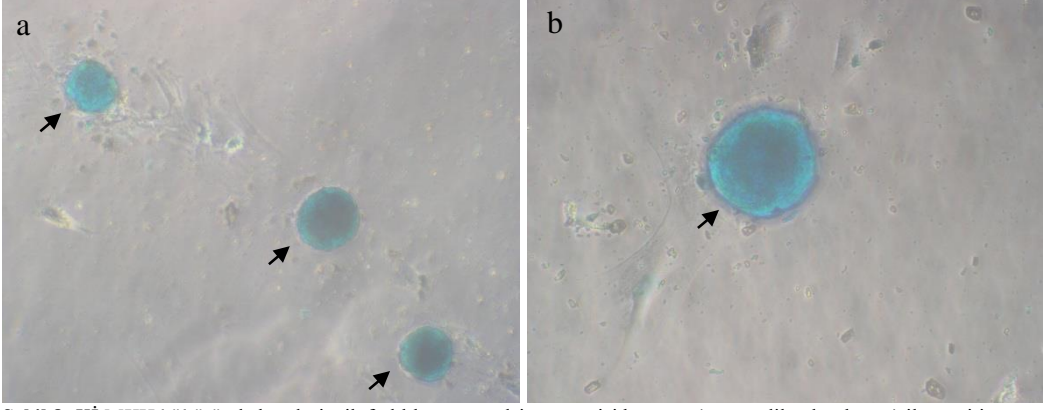
Şekil 5: DMEM büyüme ortamı ile kültüre edilen farklı başlangıç hücre konsantrasyonlarındaki Kİ-MKH'lerin (pasaj 3) proliferasyon hızlarının karşılaştırılması.



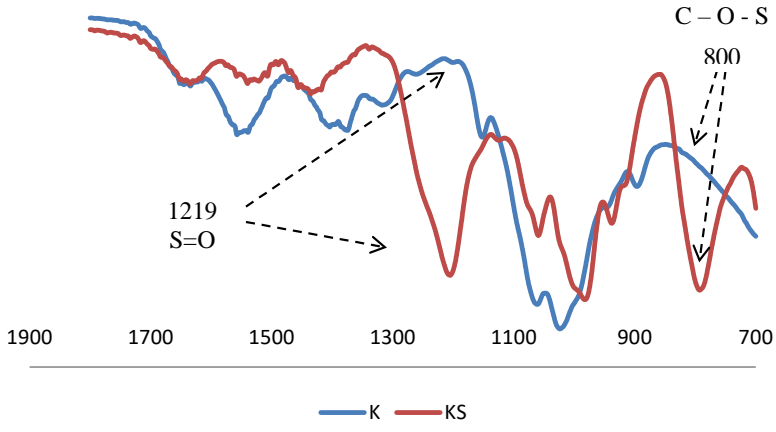
Şekil 6: Osteojenik farklılaşma ortamındaki Kİ-MKH'lerin ters faz ışık mikroskobu görüntüleri, a) t=10 gün (40x); b) t=10 gün (200x); c) t=28 gün (40x); d) t=28 gün (100x).



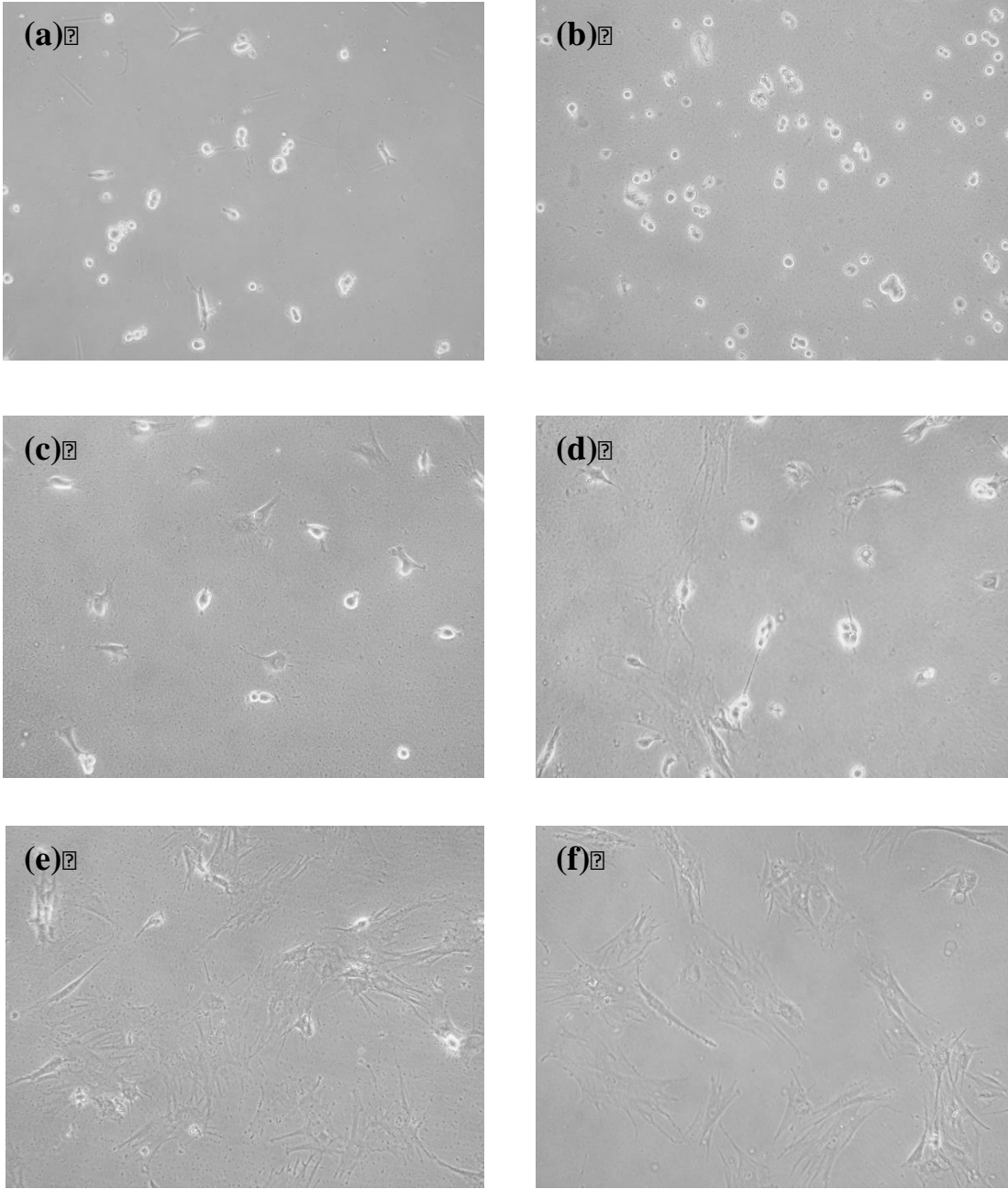
Şekil 7: Kİ-MKH kültüründe osteojenik farklılaşmanın a) Alizarin red boyama (kalsiyum depozitleri boyar) ile, b) von Kossa boyama (kalsiyum-fosfat depozitleri boyar) ile tespiti.



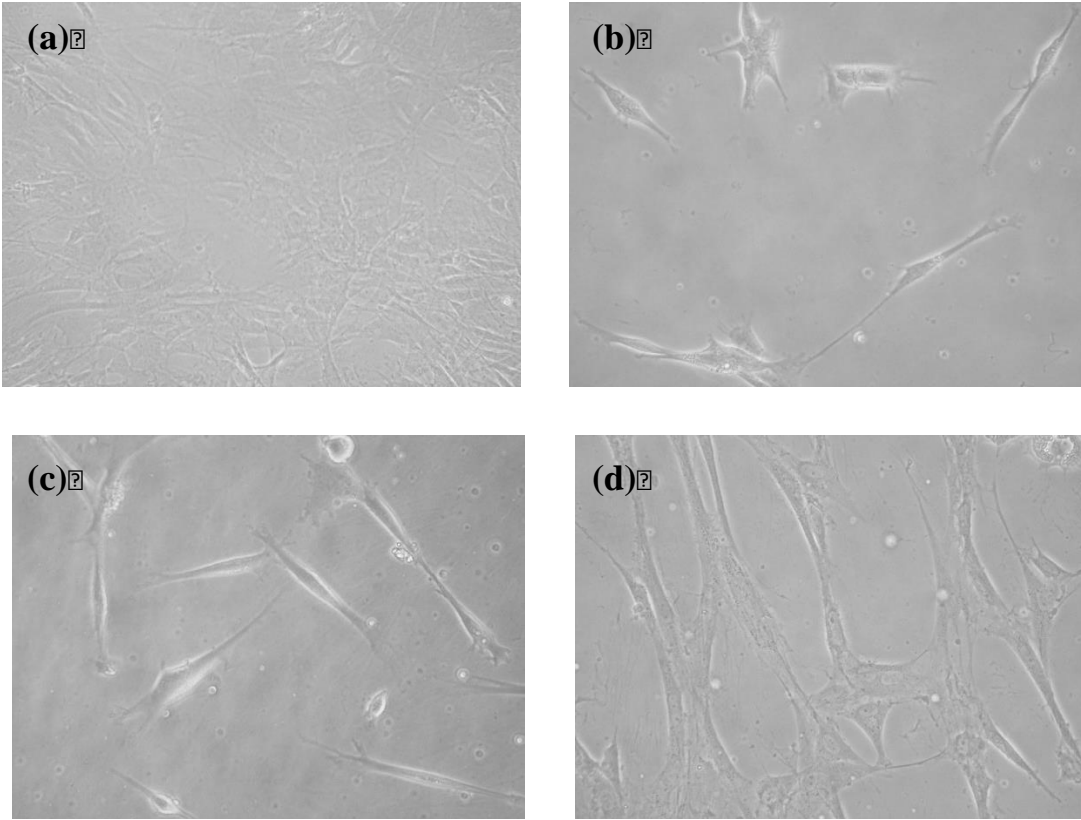
Şekil 8: Kİ-MKH kültüründe kondrojenik farklılaşmanın alsiyan mavisi boyama (proteoglikanları boyar) ile tespiti.



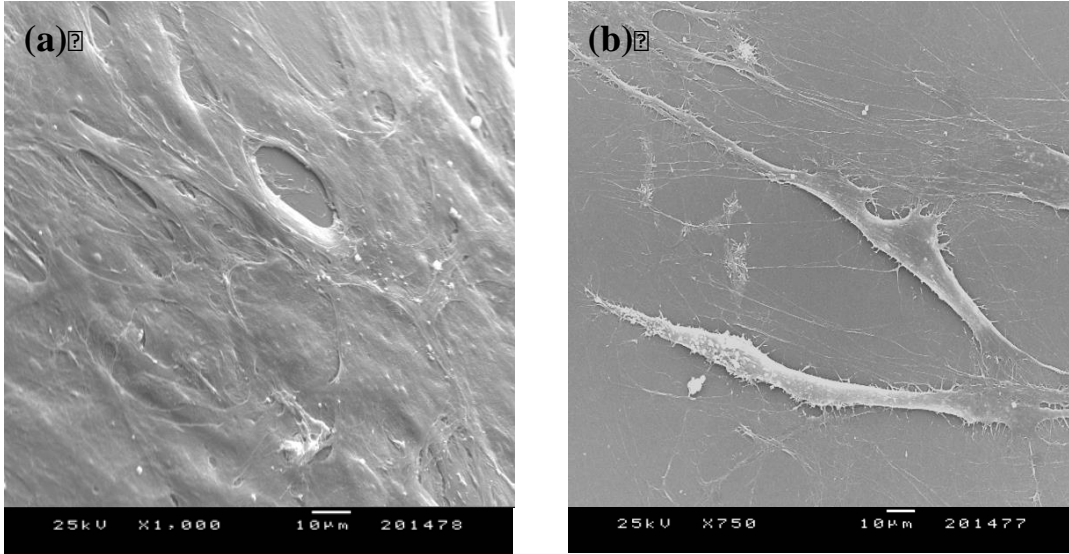
Şekil 9: %2 kitosan ve kitosan sülfat filmlerin FTIR analiz sonuçları.



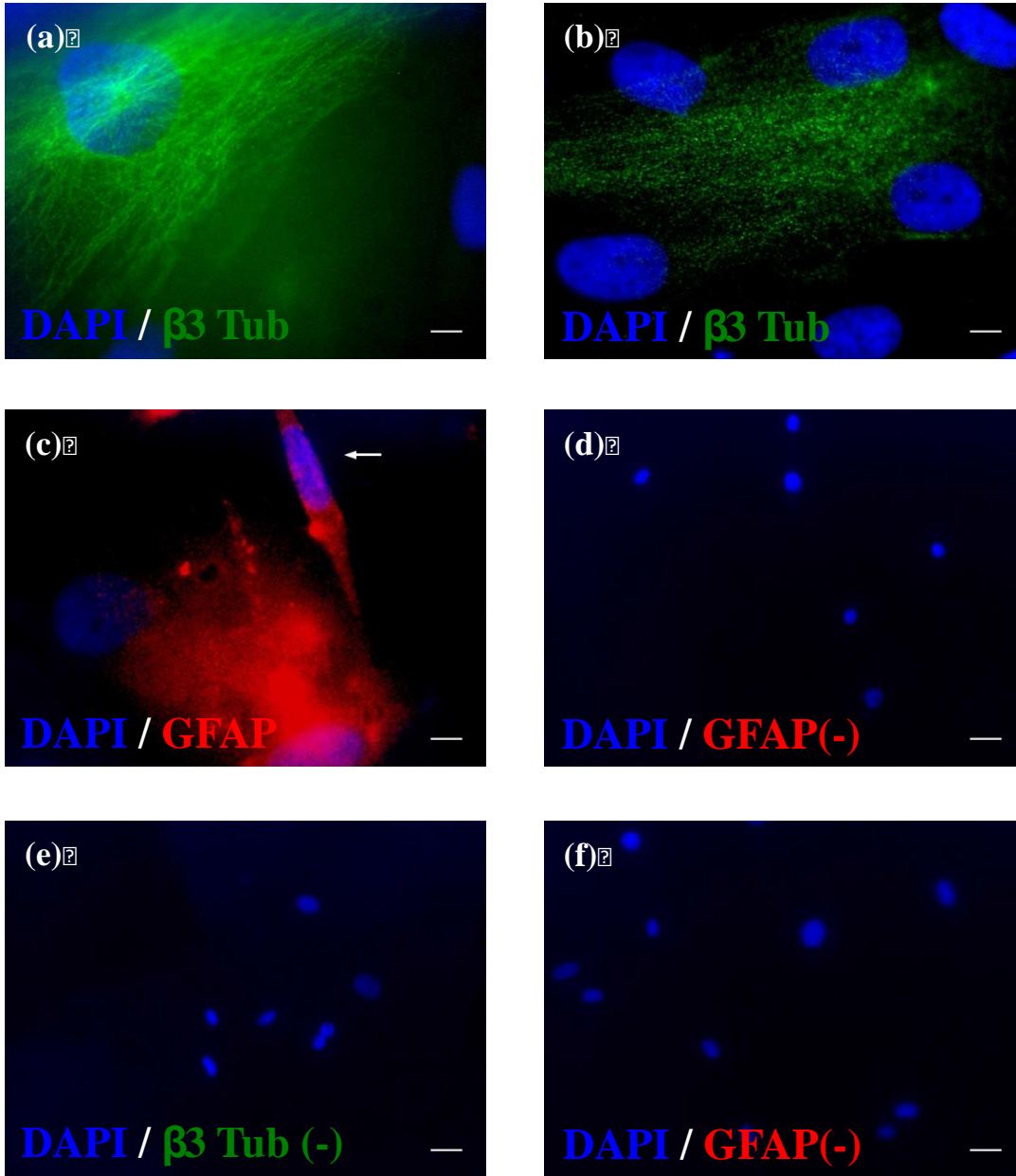
Şekil 10: K1-MKH'lerin 24. saatte yüzeylere tutunma özellikleri (100x). a) kitosan, b) kitosan fosfat, c-f) kitosan sülfat: c) K/KS oranı 4/1, d) K/KS oranı 2/1, e) K/KS oranı 1/1, f) K/KS oranı 1/2.



Şekil 11: KI-MKH'lerin farklı yüzeyler üzerinde nöral indüksiyon ortamında 6 gün inkübasyondan sonra ışık mikroskobu ile elde edilen morfolojileri (200x) a) polistren kontrol, b) kitosan, c) kitosan fosfat, d) kitosan sülfat.



Şekil 12: Kitosan sülfat yüzeylerde kültüve edilen KI-MKH'lerin (pasaj 3) SEM ile elde edilen morfolojileri a) kontrol büyüme ortamı (1000x), b) nöral indüksiyon ortamı (750x).



Şekil 13: Farklı yüzeyler üzerinde nöronal/glial farklılaşmanın immunofloresan incelemesi. a) kitosan sülfat yüzey, nöral indüksiyon (1000x), b) polistren yüzey, nöral indüksiyon (1000x), c) kitosan sülfat yüzey, nöral indüksiyon (1000x), d) polistren yüzey, nöral indüksiyon (400x), e) kitosan sülfat yüzey, kontrol büyüme ortamı (400x), f) kitosan sülfat yüzey, kontrol büyüme ortamı (400x)

Teşekkür:

Bu çalışma Ege Üniversitesi tarafından 09 MÜH 077 no'lu BAP projesi aracılığıyla maddi olarak desteklenmiştir. Makalenin yazımındaki yardımlarından ötürü Aslı Aybike Doğan ve Hakan Gürbüz'e teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

- Schmidt, C.E., and Leach, J.B. Neural Tissue Engineering: Strategies for Repair and Regeneratio. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 2003;5:293-347.
- Keirstead, H.S. Stem cell transplantation into the central nervous system and the control of differentiation. *Journal of Neuroscience Research*. 2001;63:233-236.
- Caplan, A. I. Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *Journal of Cellular Physiology*. 2007 Volume: 213 Issue: 2 Pages: 341-347.
- Pountos, I., Corscadden, D., Emery, P., and Giannoudis, P.V. Mesenchymal stem cell tissue engineering: Techniques for isolation, expansion and application. *Injury-Int. J. Care Inj.* 2007;38:S23-S33.
- Barry, F.P., and Murphy, J.M., Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2004;36:568-584.
- Uccelli, A., Moretta, L., Pistoia, V. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nature Reviews Immunology*. 2008;Volume: 8 Issue: 9 Pages: 726-736.
- Kivanc, M., Ozturk, S., Gokalp, S., Ozdemir, I., Tuglu, I., Adipose-Derived Stem Cells and Application Areas. *Cukurova Medical Journal*. 2015;Volume: 40 Issue: 3 Pages: 399-408.
- Sendemir-Urkmez, A. and Jamison, R. D. The addition of biphasic calcium phosphate to porous chitosan scaffolds enhances bone tissue development in vitro. *Journal of Biomedical Materials Research*. 2007; Part A, 81A (3): p. 624-633.
- Singh, S., Jones, B.J., Crawford, R., and Xiao, Y. Characterization of a Mesenchymal-Like Stem Cell Population from Osteophyte Tissue. *Stem Cells Dev*. 2008;17:245-254.
- Danoviz, M.E., Bassaneze, V., Nakamuta, J.S., dos Santos-Junior, G.R., Saint-Clair, D., Bajgelman, M.C. Adipose Tissue-Derived Stem Cells from Humans and Mice Differ in Proliferative Capacity and Genome Stability in Long-Term Cultures. *Stem Cells Dev*. 2011;20:661-670.
- Yang, L., Wang, N.-L., and Cai, G.-P. Maohuoside A promotes osteogenesis of rat mesenchymal stem cells via BMP and MAPK signaling pathways. *Molecular and cellular biochemistry*. 2011;1-8.
- Gimble, J.M., Guilak, F., Nuttall, M.E., Sathishkumar, S., Vidal, M., and Bunnell, B.A. In vitro Differentiation Potential of Mesenchymal Stem Cells. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*. 2008;35:228-238.
- Pittenger, M.F., Mackay, A.M., Beck, S.C., Jaiswal, R.K., Douglas, R., Mosca, J.D., Moorman, M.A. Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. *Science*. 1999;284:143-147.
- Nonomiya, Y., Sugahara-Yamashita, Y., Nakachi, Y., Tokuzawa, Y., Okazaki, Y., and Nishiyama, M. Development of a rapid culture method to induce adipocyte differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2010;394:303-308.
- Chen, Y., Teng, F. Y. H. and Tang, B. L. Coaxing bone marrow stromal mesenchymal stem cells towards neuronal differentiation: progress and uncertainties. *Cell. Mol. Life Sci*. 2006;63:1649-1657.
- Neuherber, B., Gallo, G., Howard, L., Kostura, L., Mackay, A. and Fischer I. Reevaluation of In Vitro Differentiation Protocols for Bone Marrow Stromal Cells: Disruption of Actin Cytoskeleton Induces Rapid Morphological Changes and Mimics Neuronal Phenotype. *Journal of Neuroscience Research*. 2004;77:192-204.
- Zhang, H., Liu, Z., Yao, X., Yang, Z. and Xu, R. Neural Differentiation Ability of Mesenchymal Stromal Cells from Bone Marrow And Adipose Tissue: A Comparative Study. *Cytotherapy*. 2012;14: 1203-1214.
- Montzka, K., Lassonczyk, N., Tschoke, B., Neuss, S., Fuhrmann, T., Franzen, R. Neural differentiation potential of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells: misleading marker gene expression. *BMC Neurosci*. 2009;10:1- 12.
- Bossolasco, P., Cova, L., Calzarossa, C., Rimoldi, S.G., Borsotti, C., Lambertenghi-Delilieri. Neuro-glial differentiation of human bone marrow stem cells in vitro, *Experimental Neurology*. 2005;193: 312-325.
- Woodbury, D., Schwarz, E.J., Prockop, D.J., and Black, I.B. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *Journal of Neuroscience Research*. 2000;61:364-370.
- Deng, W., Obrocka, M., Fischer, I., and Prockop, D.J. In Vitro Differentiation of Human Marrow Stromal Cells into Early Progenitors of Neural Cells by Conditions That Increase Intracellular Cyclic AMP. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2001;282:148-152.
- Zhang, J., Lu, X., Feng, G., Gu, Z., Sun, Y., Bao, G. Chitosan scaffolds induce human dental pulp stem cells to neural differentiation: potential roles for spinal cord injury therapy. *Cell Tissue Res*, 2016;366:129-142.
- Sanchez-Ramos, J., Song, S., Cardozo-Pelaez, F., Hazzi, C., Stedeford, T., Willing, A. Adult Bone Marrow Stromal Cells Differentiate into Neural Cells In Vitro. *Experimental Neurology*. 2000;164:247-256.
- Pillai, C.K.S., Paul, W., and Sharma, C.P. Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. *Prog. Polym. Sci.* 2009;34:641-678.
- Kim, I.Y., Seo, S.J., Moon, H.S., Yoo, M.K., Park, I.Y., Kim, B.C. Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications, *Biotechnol. Adv.* 2008;26:1-21.
- Lim, S. M., Song, D.K., Oh, S. H., Lee-Yoon, D. S. Bae, E. H., Lee, J. H. In vitro and in vivo degradation behavior of acetylated chitosan porous beads. *Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition*. 2008;Volume: 19 Issue: 4 Pages: 453-466.
- Kumar, M., Muzzarelli, R.A.A., Muzzarelli, C., Sashiwa, H., and Domb, A.J. Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives. *Chemical Reviews*. 2004;104:6017-6084.
- Alves, N.M., and Mano, J.F. Chitosan derivatives obtained by chemical modifications for biomedical and environmental applications. *Int. J. Biol. Macromol.* 2008;43:401-414.
- Galed, G., Miralles, B., Paños, I., Santiago, A., and Heras, Á., N-Deacetylation and depolymerization reactions of chitin/chitosan: Influence of the source of chitin. *Carbohydr. Polym.* 2005;62:316-320.
- Sjoholm, K.H., Cooney, M., and Minter, S.D., Effects of degree of deacetylation on enzyme immobilization in hydrophobically modified chitosan. *Carbohydr. Polym.* 2009;77:420-424.
- Gamzazade, A., Sklyar, A., Nasibov, S., Sushkov, I., Shashkov, A., and Knirel, Y. Structural features of sulfated chitosans, *Carbohydr. Polym.* 1997;34:113-116.
- Pramanik, N., Mishra, D., and Banerjee, I. Chemical Synthesis, Characterization, and Biocompatibility Study of Hydroxyapatite/Chitosan Phosphate, *International Journal of Biomaterials*, 2009;1-8.
- Li, B., Huang, L., Wang, X., Ma, J., and Xie, F. Biodegradation and compressive strength of phosphorylated chitosan/chitosan/hydroxyapatite bio-composites. *Materials & Design*. 2011;32:4543-4547.
- Zhang, X., Goncalves, R., and Mosser, D.M. The Isolation and Characterization of Murine Macrophages, *Current Protocols in Immunology*. John Wiley & Sons, Inc., Chapter. 2008;14:Unit 14.1.
- Davies, J.Q., and Gordon, S. Isolation and Culture of Murine Macrophages, *Methods Mol Biol*. 2005;290:91-103.
- Gregory, C.A., Grady Gunn, W., Peister, A., and Prockop, D.J. An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction, *Analytical Biochemistry*. 2004;329:77-84.
- Şenses, Y. M. Mezenşimal Kök Hücrelerin Kitosan Bazlı Yüzeylerde Nöronal ve Glial Yönde Farklılaşmalarının İncelenmesi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Bornova-İzmir (Yüksek Lisans Tezi). 2011.
- Mareschi, K., Novara, M., Rustichelli, D., Ferrero, I., Guido, D., Carbone, E., Medico, E., Madon, E., Vercelli, A., and Fagioli, F. Neural differentiation of human mesenchymal stem cells: evidence for expression of neural markers and eag K+ channel types, *Exp. Hematol*. 2006;34:1563- 1572.
- Marcoli, M., Candiani, S., Tonachini, L., Monticone, M., Mastrogiacono, M., Ottonello, A. In vitro modulation of gamma amino butyric acid (GABA) receptor expression by bone marrow stromal cells. *Pharmacol. Res.* 2008;57:374-382.
- Woodbury, D., Reynolds, K., and Black, I.B. Adult bone marrow stromal stem cells express germline, ectodermal, endodermal, and mesodermal genes prior to neurogenesis, *Journal of Neuroscience Research*, 2002;69:908- 917.
- Jori, F.P., Melone, M.A.B., Napolitano, M.A., Cipollaro, M., Cascino, A., Giordano, A., and Galderisi, U. RB and RB2/p130 genes demonstrate both specific and overlapping functions during the early steps of in vitro neural differentiation of marrow stromal stem cells, *Cell Death Differ.* 2004;12:65-77.
- Bi, Y., Gong, M., Zhang, X., Zhang, X., Jiang, W., Zhang, Y., Chen, J., Liu, Y., He, T.-C., and Li, T. Pre-activation of retinoid signaling

- facilitates neuronal differentiation of mesenchymal stem cells, *Development, Growth & Differentiation*. 2010;52:419-431.
43. Tıǧlı, S. R., Karakeçili, A., Gümüşdereliolu, M., In vitro characterization of chitosan scaffolds: influence of composition and deacetylation degree, *J Mater Sci Mater Med*. 2007;18(9):1665-74.
 44. Lanniel, M., Huq, E., Allen, S., Buttery, L., Williams, P.M., Alexander, M.R., Substrate induced differentiation of human mesenchymal stem cells on hydrogels with modified surface chemistry and controlled modulus, *Soft Matter*. 2011;Volume: 7 Issue: 14 Pages: 6501-6514.
 45. Dulgar-Tulloch, A. J., Bizios, R., Siegel, R.W. Human mesenchymal stem cell adhesion and proliferation in response to ceramic chemistry and nanoscale topography, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2009;Volume: 90A Issue: 2 Pages: 586-594.
 46. Ozdal-Kurt, F., Tuglu, I., Vatansver, H. S., Tong, S., Sen, B. H., Deliloglu-Gurhan, S. I., 2016, The effect of different implant biomaterials on the behavior of canine bone marrow stromal cells during their differentiation into osteoblasts, *Biotechnic & Histochemistry*, Volume: 91 Issue: 6, Pages: 412-422.
 47. English, K., French, A., and Wood, K.J. Mesenchymal Stromal Cells: Facilitators of Successful Transplantation?. *Cell stem cell*. 2010;7:431-442.
 48. Si, Y.L., Zhao, Y.L., Hao, H.J., Fu, X.B., and Han, W.D. MSCs: Biological characteristics, clinical applications and their outstanding concerns, *Ageing Res. Rev*. 2011;10:93-103.
 49. Kolf, C.M., Cho, E., and Tuan, R.S., Mesenchymal stromal cells - Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation, *Arthritis Res. Ther*. 2007;9(1):204.
 50. Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D., and Horwitz, E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement, *Cytotherapy*. 2006;8:315-317.
 51. Peng, L., Jia, Z., Yin, X., Zhang, X., Liu, Y., Chen, P., Ma, K., and Zhou, C., Comparative Analysis of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow, Cartilage, and Adipose Tissue, *Stem Cells Dev*. 2008;17:761-774.
 52. Karaoz, E., Aksoy, A., Ayhan, S., Sarıboyacı, A., Kaymaz, F., and Kasap, M., Characterization of mesenchymal stem cells from rat bone marrow: ultrastructural properties, differentiation potential and immunophenotypic markers, *Histochemistry and Cell Biology*. 2009;132:533-546.
 53. Khatri, M., O'Brien, T.D., and Sharma, J.M. Isolation and Differentiation of Chicken Mesenchymal Stem Cells From Bone Marrow, *Stem Cells Dev.*, 2009;18:1485-1492.
 54. Solchaga, L.A., Penick, K.J., and Welter, J.F., Chondrogenic Differentiation of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells: Tips and Tricks, *Mesenchymal Stem Cell Assays and Applications*, Humana Press, 2011;698:253-278.
 55. Donzelli, E., Salvadè, A., Mimeo, P., Viganò, M., Morrone, M., Papagna, R., Carini, F., Zaopo, A., Miloso, M., Baldoni, M., and Tredici, G. Mesenchymal stem cells cultured on a collagen scaffold: In vitro osteogenic differentiation, *Archives of Oral Biology*, 2007;52:64-73.
 56. Koch, T., Heerkens, T., Thomsen, P., and Betts, D. Isolation of mesenchymal stem cells from equine umbilical cord blood, *BMC Biotechnology*. 2007;7:26.
 57. Hong, D., Chen, H. X., Xue, Y., Li, D.-M., Wan, X. C., Ge, R., and Li, J. C. Osteoblastogenic effects of dexamethasone through upregulation of TAZ expression in rat mesenchymal stem cells, *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 2009;116:86-92.
 58. Zhang, L., Su, P., Xu, C., Yang, J., Yu, W., and Huang, D. Chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells: a comparison between micromass and pellet culture systems, *Biotechnology Letters*. 2010;32:1339-1346.
 59. Muzzarelli, R., and Muzzarelli, C. Chitosan Chemistry: Relevance to the Biomedical Sciences, *Polysaccharides I*, Springer Berlin / Heidelberg. 2005;186:151-209.
 60. Pavinatto, F.J., Caseli, L., and Oliveira, O.N. Chitosan in Nanostructured Thin Films, *Biomacromolecules*, 2010;11:1897-1908.
 61. Ozdemir E., Sendemir-Urkmez A., Yesil Celiktas O. Supercritical CO2 processing of a chitosan-based scaffold: Can implantation of osteoblastic cells be enhanced?, *The Journal of Supercritical Fluids*. 2013;27: 120 – 127.
 62. Mi, F. L., Tan, Y. C., Liang, H. F., and Sung, H. W. In vivo biocompatibility and degradability of a novel injectable-chitosan based implant, *Biomaterials*. 2002;23:181-191.
 63. VandeVord, P.J., Matthew, H.W.T., DeSilva, S.P., Mayton, L., Wu, B., and Wooley, P.H. Evaluation of the biocompatibility of a chitosan scaffold in mice, *Journal of Biomedical Materials Research*. 2002;59:585-590.
 64. Yang, B., Li, X.Y., Shi, S.A., Kong, X.Y., Guo, G., Huang, M.J. Preparation and characterization of a novel chitosan scaffold, *Carbohydr. Polym*. 2010;80:860-865.
 65. Jayakumar, R., Selvamurugan, N., Nair, S.V., Tokura, S., and Tamura, H. Preparative methods of phosphorylated chitin and chitosan—An overview, *Int. J. Biol. Macromol*. 2008;43:221-225.
 66. Varma, H.K., Yokogawa, Y., Espinosa, F.F., Kawamoto, Y., Nishizawa, K., Nagata, F. Porous calcium phosphate coating over phosphorylated chitosan film by a biomimetic method, *Biomaterials*. 1999;20:879-884.
 67. Mariappan, M.R., Alas, E.A., Williams, J.G., and Prager, M.D. Chitosan and chitosan sulfate have opposing effects on collagen-fibroblast interactions, *Wound Repair and Regeneration*, 1999;7:400-406.
 68. Zhang, K., Helm, J., Peschel, D., Gruner, M., Groth, T., and Fischer, S. NMR and FT Raman characterisation of regioselectively sulfated chitosan regarding the distribution of sulfate groups and the degree of substitution, *Polymer*. 2010;51:4698-4705.
 69. Xing, R.E., Liu, S., Yu, H.H., Zhang, Q.B., Li, Z., and Li, P.C. Preparation of low-molecular-weight and high-sulfate-content chitosans under microwave radiation and their potential antioxidant activity in vitro, *Carbohydr. Res*. 2004;339:2515-2519.
 70. Zhou, H., Qian, J., Wang, J., Yao, W., Liu, C., Chen, J. Enhanced bioactivity of bone morphogenetic protein-2 with low dose of 2- N, 6-O-sulfated chitosan in vitro and in vivo, *Biomaterials*. 2009;30:1715-1724.
 71. Amaral, I.F., Granja, P.L., Melo, L.V., Saramago, B., and Barbosa, M.A. Functionalization of chitosan membranes through phosphorylation: Atomic force microscopy, wettability, and cytotoxicity studies, *Journal of Applied Polymer Science*. 2006;102:276-284.
 72. Wan, Y., Creber, K.A.M., Peppley, B., and Bui, V.T. Synthesis, Characterization and Ionic Conductive Properties of Phosphorylated Chitosan Membranes, *Macromolecular Chemistry and Physics*. 2003;204:850- 858.
 73. Xiang, Y., Yang, M., Guo, Z.B., and Cui, Z. Alternatively chitosan sulfate blending membrane as methanol-blocking polymer electrolyte membrane for direct methanol fuel cell, *J. Membr. Sci*. 2009;337:318-323.
 74. Prasitsilp, M., Jenwithisuk, R., Kongsuwan, K., Damrongchai, N., and Watts, P. Cellular responses to chitosan in vitro: The importance of deacetylation, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2000;11:773-778.
 75. Freier, T., Koh, H.S., Kazazian, K., and Shoichet, M.S. Controlling cell adhesion and degradation of chitosan films by N-acetylation, *Biomaterials*. 2005;26:5872-5878.
 76. Chatelet, C., Damour, O., ve Domard, A. Influence of the degree of acetylation on some biological properties of chitosan films, *Biomaterials*. 2001;22:261-268.
 77. Mourya, V.K., Inamdar, N. N. Chitosan-modifications and applications: Opportunities galore, *Reactive & Functional Polymers*. 2008;68:1013-1051.
 78. Tropel, P., Platet, N., Platel, J. C., Noël, D., Albrieux, M., Benabid. Functional Neuronal Differentiation of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells, *Stem Cells*. 2006;24:2868-2876.
 79. Bae, K.S., Park, J.B., Kim, H.S., Kim, D.S., Park, D.J., and Kang, S.J. Neuron-like Differentiation of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells, *Yonsei Med. J*. 2011;52:401-412.
 80. Mammadov, B., Karakas, N., and Isik, S. Comparison of long-term retinoic acid-based neural induction methods of bone marrow human mesenchymal stem cells, *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Animal*. 2011;47:484-491.
 81. Romero-Ramos, M., Vourc'h, P., Young, H. E., Lucas, P.A., Wu, Y., Chivatakarn, O. Neuronal differentiation of stem cells isolated from adult muscle, *Journal of Neuroscience Research*. 2002; 69:894-907.

82. Forsberg, M., Holmborn, K., Kundu, S., Dagaly, A., Kjellen, L. ve Forsberg-Nilsson, K. Undersulfation of Heparan Sulfate Restricts Differentiation Potential of Mouse Embryonic Stem Cells. *J. Biol. Chem.* 2012;287: 10853–10862.
83. Ding, K., Wang, Y., Wang, H., Yuan, L., Tan, M., Shi, X. 6-O-Sulfated Chitosan Promoting the Neural Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells, *ACS Appl. Mater. Interface.* 2014;6, 20043–20050.

<http://edergi.cbu.edu.tr/ojs/index.php/cbusbed> isimli yazarın CBU-SBED başlıklı eseri bu Creative Commons Atıf-Gayriticari 4.0 Uluslararası Lisansı ile lisanslanmıştır.

