

**ADİPOZ KÖKENLİ MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN
POLİETİLENGLİKOL DİMETAKRİLAT
HİDROJELLERDE KAHVERENGİ VE BEYAZ ADİPOZ
DOKUYA FARKLILAŞMALARININ İNCELENMESİ**

**INVESTIGATION OF BROWN AND WHITE ADIPOSE
TISSUE DIFFERENTIATION OF ADIPOSE DERIVED
MESENCHYMAL STEM CELLS ON
POLYETHYLENEGLYCOLE DIMETHACRYLATE
HYDROGELS**

ASLI SENA KARANFİL

PROF. DR. MENEMŞE GÜMÜŞDERELİOĞLU

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim – Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
BİYOMÜHENDİSLİK Anabilim Dalı İçin Öngördüğü
YÜKSEK LİSANS TEZİ
olarak hazırlanmıştır.

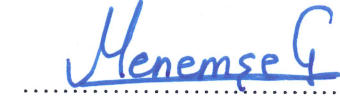
2019

ASLI SENA KARANFİL'in hazırladığı "Adipoz Kökenli Mezenkimal Kök Hücrelerin Polietilenglikol Dimetakrilat Hidrojellerde Kahverengi ve Beyaz Adipoz Dokuya Farklılaşmalarının İncelenmesi" adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

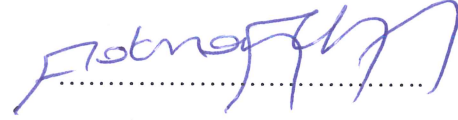
Prof. Dr. Mehlika PULAT
Başkan



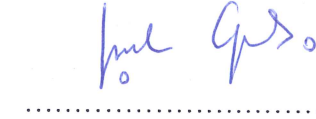
Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU
Danışman



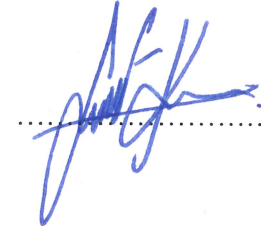
Prof. Dr. Lokman UZUN
Üye



Dr. Öğretim Üyesi Işıl GERÇEK BEŞKARDEŞ
Üye



Doç. Dr. İ. Çağatay KARAASLAN
Üye



Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak/...../..... tarihinde onaylanmıştır.

Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada,

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili esere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversitede veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

14/02/2019



Aslı Sena KARANFİL


YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarda kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesi'ne verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yüksek Öğretim Kurulu tarafından yayınlanan "*Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge*" kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricinde YÖK Ulusal Tez Merkezi / H. Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir.
- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren ay ertelenmiştir.
- Tezim ile ilgili gizlilik kararı verilmiştir.

14. / 02 / 2019


ASLI SENA KARANFİL

ÖZET

ADİPOZ KÖKENLİ MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN POLİETİLENGLİKOL DİMETAKRİLAT HİDROJELLERDE KAHVERENGİ VE BEYAZ ADİPOZ DOKUYA FARKLILAŞMALARININ İNCELENMESİ

Aslı Sena KARANFİL

Yüksek Lisans, Biyomühendislik Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU

Şubat 2019, 97 sayfa

Bu çalışma “Adipoz Kökenli Mezenkimal Kök Hücrelerin 3 Boyutlu Hidrojellerde Kahverengi ve Beyaz Adipoz Dokuya Farklılaşmalarının İncelenmesi” başlıklı Lisansüstü Tez Projesi (FYL-2018-17299) kapsamında Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir.

Sunulan çalışmada amaç; beyaz adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin (AKH), iki boyutlu (2B) ve üç boyutlu (3B) *in vitro* kültür koşullarında kahverengi yağ dokusuna farklılaşma potansiyellerinin incelenmesidir.

Çalışma kapsamında ilk olarak polietilen glikol (PEG) polimeri mikrodalga enerjisi (1100 Watt, 5 dk) kullanılarak, metakrilik anhidrit (MA) ile fonksiyonelleştirilip %99.4 metakrilatlanma derecesine sahip polietilen glikol dimetakrilat (PEGDM) sentezlenmiştir. Sentezlenen ve karakterize edilen PEGDM foto çapraz-bağlayıcı ajan

Irgacure2959 (%0.1, w/v) ile çözelti haline getirilip 150 sn UV ışığa maruz tutularak 3B hücre kültürleri için doku iskelesi olarak kullanılacak olan hidrojel yapıları elde edilmiştir.

Tezin sonraki aşamasında ise sıçan kaynaklı AKH'leri 35 gün boyunca, 2B ve 3B *in vitro* hücre kültür koşullarında, roziglitazone ve triiyodotironin (T3) içeren kahverengi adipogenik farklılaştırma ortamında kültüre edilmiştir. İki boyutlu kültürlerde hücreler çok gözlü hücre kültür kaplarında üretilirken, 3B kültür çalışmalarında PEGDM hidrojellere enkapsüle edilmiştir. Ayrıca kronik soğuk maruziyetinin (2B kültürler için, gün aşırı, 16°C, 15 dk; 3B kültürler için, gün aşırı, 16°C, 1 sa) AKH'lerin *in vitro* adipogenik farklılaşmalarına olan etkisi de incelenmiştir.

Her 2 kültür koşulunda da farklılaşan hücrelerdeki lipit vakuelleri Oil Red O ile boyanmış ve optik mikroskopla görüntülenmiştir. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) analizleriyle kahverengi adipositlere özgü olan UCP-1, Cidea genleri ve tüm adiposit türlerinden eksprese olan PPAR- γ geninin ekspresyon seviyeleri tespit edilmiştir. Ayrıca immünohistokimyasal ve immünohistokimyasal analizlerle farklılaşan hücrelerdeki UCP-1 ve PPAR- γ proteinlerinin varlıkları görüntülenmiştir. Ancak *in vitro* koşulda uygulanan soğuk indüksiyonunun AKH'lerin kahverengi adipositlere farklılaşmasında belirgin bir etkisinin olmadığı görülmüştür.

Sonuç olarak AKH'ler, 2B ve 3B *in vitro* hücre kültür koşullarında kahverengi adipositlere farklılaştırılmıştır. Ayrıca AKH'lerin PEGDM hidrojellere enkapsüle edilmesiyle elde edilen 3B hücre kültürleri, *in vitro* koşullarda kahverengi adiposit elde edilmesi için uygun bir sistem olarak önerilmektedir.

Anahtar Kelimeler: Kahverengi adipoz doku, PEGDM, Mezenkimal kök hücreler, Hidrojel.

ABSTRACT

INVESTIGATION OF BROWN AND WHITE ADIPOSE TISSUE DIFFERENTIATION OF ADIPOSE DERIVED MESENCHYMAL STEM CELLS ON POLYETHYLENEGLYCOLE DIMETHACRYLATE HYDROGELS

Aslı Sena KARANFİL

Master of Science, Department of Bioengineering

Supervisor: Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU

February 2019, 97 pages

This study was financially supported by Hacettepe University Scientific Research Projects Coordination Unit with a graduate project entitled “Investigation of Brown and White Adipose Tissue Differentiation of Adipose Derived Mesenchymal Stem Cells on 3 Dimensional Hydrogels” (FYL-2018-17299).

The aim of the present study is to investigate the differentiation potential of white adipose tissue derived mesenchymal stem cells (AdMSCs) to brown adipose tissue on 2 dimensional (2D) and 3 dimensional (3D) *in vitro* culture conditions.

In the first part of study, PEG polymer was functionalized with methacrylic anhydride (MA) by using microwave energy (1100 Watt, 5 min). Therefore, polyethylene glycole dimethacrylate (PEGDM) was synthesized with 99.4% methacrylation degree. Then, PEGDM was brought into solution with photo-cross-linking agent Irgacure2959 (0.1%,

w/v) and exposed to 150 s UV light to obtain hydrogel structures to be used as a tissue scaffold for 3D cell cultures.

In the next stage of the thesis, AdMSCs were cultured in brown adipogenic differentiation medium consisting of rosiglitazone and triiodothyronine (T3) for 35 days on 2D and 3D culture conditions. While in 2D cultures cells were culturing in multi-well culture dishes, in 3D cultures cells were encapsulated in PEGDM hydrogels. Additionally, the effect of chronic cold exposure (for 2D cultures, every other day, 16°C, 15 min; for 3D cultures, every other day, 16°C, 1h) on *in vitro* adipogenic differentiation of AdMSCs was also investigated.

In both culture conditions, 2D and 3D, lipid vacuoles in the differentiated cells were observed by optical microscope after staining with Oil Red O. The expression levels of UCP-1 and Cidea genes which are specific for brown adipocytes and PPAR- γ gene which is expressed from all adipocyte species were revealed by real time-polymerase chain reaction (RT-PCR). In addition, the presence of UCP-1 and PPAR- γ proteins in the differentiated cells was visualized with immunocytochemical and immunohistochemical analyzes. However, cold induction on *in vitro* cell culture conditions did not have a significant effect on the differentiation of AdMSCs to brown adipocytes.

As a result, AdMSCs were differentiated to brown adipocytes on both culture conditions, 2D and 3D. Moreover, 3D cell cultures which obtained by encapsulation of AdMSCs into PEGDM hydrogels are proposed as a suitable system for obtaining brown adipocytes *in vitro*.

Key Words: Brown adipose tissue, PEGDM, Mesenchymal stem cells, Hydrogel.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans hayatım boyunca benden desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, duruşu, karakteri ve eğitimci kişiliğiyle kendime hayatım boyunca örnek alacağım saygıdeğer danışmanım **Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU**'na,

FYL-2018-17299 numaralı Lisansüstü Tez Projesi kapsamında çalışmama maddi destek sağlayan **Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi**'ne,

Tez çalışmam süresince gerek bana öğretmen, gerekse gerçek bir abla olan, beni her daim motive eden ve birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum sevgili **Gökçe KAYNAK BAYRAK**'a ve Ankara'ya adımımı attığım andan itibaren bana kardeşlik eden **Şeyma BEKTAŞ TERCAN**'a,

Yüksek lisansın bana kattığı en güzel arkadaşlardan olan **Tülay Selin ERTEKİN**, ve **Hala JARRAR**'a, çalışmalarım boyunca desteklerini hissettiğim sevgili **Burcu SARIKAYA**, **Özge Ekin AKDERE**, **Elvan KONUK**, **Tuğçe Gültan**, **Dr. Işıl GERÇEK BEŞKARDEŞ**, **Dr. Damla ÇETİN ALTINDAL**, **Dr. Anıl Sera ÇAKMAK**, **Dr. Soner ÇAKMAK**, **Ülkü BOZOĞLU**, **Demet ÇAKIR** ve **Gülseren IRMAK**'a,

Arkadaşlıklarından keyif aldığım **Sümeysra Nur TURGUT**, **Sema COŞKUN**, **Ayfer KOYUNCU**, **Zeynep ALTINIŞIK**, **Caner KARAASLAN**, **Fayid PHURKAT**, **Gökçe MÜLAZIMOĞLU**, **Gülnihal TOK İLHAN** ve **Sena KOÇ** olmak üzere **Hacettepe Üniversitesi Hücre ve Doku Mühendisliği Araştırma Grubu**'nu oluşturan tüm çalışma arkadaşlarıma,

En önemlisi, sevgi ve desteklerini benden hiçbir zaman esirgemeyen, benim mutluluğum için ellerinden gelen her şeyi yapan ve evlatları olmaktan gurur duyduğum başta annem **Memduha KARANFİL**, canım babam **Ahmet Tarık KARANFİL**'e ve amcam **İsmail DURAN**'a,

En içten sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Aslı Sena KARANFİL

Şubat 2019, Ankara

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
ÇİZELGELER.....	ix
ŞEKİLLER	x
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Adipoz Dokunun Yapısı ve Özellikleri	3
2.1.1. Beyaz Adipoz Doku	4
2.1.2. Kahverengi Adipoz Doku	5
2.1.3. Bej Adipoz Doku	7
2.1.4. Kahverengi Adipoz Dokunun Oluşumu ve Gelişimi	10
2.1.5. Kahverengi Adipoz Dokunun Biyolojik Fonksiyonları	11
2.1.5.1. Termoregülasyon.....	12
2.1.5.2. Metabolizma Hızının Düzenlenmesi	12
2.2. Kahverengi Adipoz Doku Mühendisliği.....	14
2.2.1. Hücre Kaynakları	16
2.2.1.1. Kök Hücreler	17
2.2.1.2. Adipositler.....	18
2.2.2. Kahverengi Adipoz Doku Aktivitesinde Fiziksel ve Biyokimyasal Etkiler ..	19
2.2.3. Adipoz Doku Mühendisliğinde Kullanılan Hidrojeller	26
2.2.4. PEG, Metakrilatlanmış PEG (PEGDM) ve Özellikleri.....	30
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR	33
3.1. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Kimyasallar ve Biyolojik Malzemeler	33
3.1.1. PEGDM Üretimi ve Karakterizasyonu	35
3.1.2. Proton Nükleer Manyetik Rezonans (¹ H-NMR) Analizi	35
3.1.3. FTIR Analizi.....	35

3.2. PEGDM Hidrojel Üretimi ve Karakterizasyonu	36
3.2.1. Morfolojik Analizler.....	36
3.3.2. Su Tutma Kapasitesi Tayini	37
3.3.3. Mekanik Analizler	37
3.3.4. Biyobozunurluk Tayini.....	37
3.4. <i>In vitro</i> Hücre Kültür Çalışmaları	38
3.4.1. Hücre Stoklarının Hazırlanması	38
3.4.2. 2B Hücre Kültürü Çalışmaları.....	38
3.4.3. 3B Hücre Kültürü Çalışmaları.....	39
3.4.4. Hücre Kültürü Analizleri.....	41
3.4.4.1. Hücre Canlılık Analizleri.....	41
3.4.4.2. Morfolojik Analizler	43
3.4.4.3. Gen Ekspresyonu Analizleri	43
3.4.4.4. Oil Red O ile Lipit Damlacıklarının Boyanması	44
3.4.4.5. Hematoksilen-Eozin ile Boyama	45
3.4.4.6. İmmünohistokimyasal ve İmmünohistokimyasal Analizler	45
3.4.5. İstatistiksel Analizler	48
4. DENEYSEL SONUÇLAR ve TARTIŞMA	49
4.1. PEGDM Üretimi ve Karakterizasyonu	49
4.1.1. Proton Nükleer Manyetik Rezonans (¹ H-NMR) Analizi.....	51
4.1.2. FTIR Analizi.....	52
4.2. PEGDM Hidrojel Üretimi ve Karakterizasyonu	53
4.2.1. Morfolojik Analizler.....	54
4.3.2. Su Tutma Kapasitesi Tayini	55
4.3.3. Mekanik Analizler	57
4.3.4. Biyobozunurluk Tayini.....	58
4.4. <i>In vitro</i> Hücre Kültür Çalışmaları	59
4.4.1. Hücre Stoklarının Hazırlanması	60
4.4.2. 2B Hücre Kültürü Çalışmaları.....	60
4.4.3. 3B Hücre Kültürü Çalışmaları.....	63
4.4.4. Hücre Kültürlerindeki Analizler	65
4.4.4.1. Hücre Canlılık Analizleri	65
4.4.4.2. Morfolojik Analizler	70

4.4.4.3. Gen Ekspresyon Analizleri.....	72
4.4.4.4. Oil Red O ile Lipit Damlacıklarının Boyanması.....	77
4.4.4.5. İmmünohistokimyasal ve İmmünohistokimyasal Analizler.....	79
4.6.6.6. Histolojik Boyamalar	84
5. GENEL SONUÇLAR	86
6. KAYNAKLAR.....	89
7. EKLER	95
8. ÖZGEÇMİŞ	97

ÇİZELGELER

Çizelge 2.1.	Farklı adipoz doku türleri ve özellikleri.....	9
Çizelge 2.2.	Adipoz doku mühendisliğinde kullanılan hidrojeller.....	28
Çizelge 3.1.	Fotopolimerizasyon için en uygun UV maruziyeti süresinin belirlenmesi.....	36
Çizelge 3.2.	Hücrelerin kültüre edildiği besi ortamları ve bu ortamları oluşturan bileşenler	39
Çizelge 3.3.	<i>In vitro</i> hücre kültür çalışmalarının gerçekleştirildiği deney grupları.....	40
Çizelge 3.4.	2B ve 3B kahverengi adipogenez çalışmalarının RT-PCR analizlerinde kullanılan primer dizileri.....	44
Çizelge 3.5.	İmmünohistokimyasal ve immünohistokimyasal analizlerde kullanılan primer ve sekonder antikorlar	46
Çizelge 4.1.	PEG ve PEGDM'e spesifik FTIR spekturum verileri.....	53
Çizelge 4.2.	PEGDM hidrojellerinin gözenek boyutları ve gözenek boyut aralıkları	55
Çizelge 4.3.	PEGDM hidrojellerinde canlı-ölü boyama görüntülerinden “Image J” programı kullanılarak hesaplanan ortalama L929 hücre canlılığı sonuçları	69
Çizelge 4.4.	Kahverengi adipogenez çalışması için PEGDM hidrojelleri içine enkapsüle edilen AKH'lerin kültürün 7. gününde yapılan canlı-ölü boyama analizi sonucunda elde edilen görüntülerin “Image J” yazılımı kullanılarak hesaplanan % canlılık değerleri.....	70

ŞEKİLLER

Şekil 2.1. Kahverengi ve beyaz adipoz doku kesitlerinin H&E boyama sonrası görüntüleri.....	4
Şekil 2.2. İnsanlarda kahverengi ve beyaz adipoz dokuların bulunduğu bölgeler	5
Şekil 2.3. UCP-1 proteininin işlevleri için önerilen modeller	6
Şekil 2.4. Farklı adiposit türlerinin şematik gösterimi	8
Şekil 2.5. Beyaz, bej ve kahverengi adipositlerin kökenleri	10
Şekil 2.6. Beyaz, kahverengi ve bej adipositlerin gelişimsel kökenleri.	11
Şekil 2.7. Besin alımı ile adaptif termogenez arasındaki ilişki	13
Şekil 2.8. Sempatik sinir sistemi ve soğuk maruziyetinin kahverengi adiposit aktivitesi üzerindeki etkisi	21
Şekil 3.1. Tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen deneysel çalışmaların şematik gösterimi.....	34
Şekil 4.1. PEG'in metakrilik anhidrit ile mikrodalga enerjisi kullanılarak fonksiyonelleştirilmesiyle PEGDM sentezi.	50
Şekil 4.2. PEG (a) ve PEGDM'in (b) H-NMR spektrumları.	51
Şekil 4.3. PEG ve PEGDM'e spesifik FTIR spekturumları.	52
Şekil 4.4. Yüzde 20 (w/v) PEGDM, %0.1 (w/v) I2959 ile hazırlanarak fotopolimerize edilen hidrojenlerin farklı açılardan görünüşleri.	54
Şekil 4.5. PEGDM hidrojeline ait SEM fotoğrafları.	55
Şekil 4.6. (a) Yüzde 15 ve %20 polimer içeriğine sahip PEGDM hidrojenlerin karşılaştırmalı su alım kinetikleri. (b) PEGDM hidrojenlerin (%20, w/v) kuru haldeki (soldaki fotoğraf) ve denge şişme içeriğine ulaştıktan sonraki (sağdaki fotoğraf) görüntüleri.	56
Şekil 4.7. Sıkıştırma testi sonucunda PEGDM hidrojenlerinin gerilim-uzama eğrileri	58
Şekil 4.8. PEGDM hidrojenin zamana bağlı biyobozunurluk grafiği	59
Şekil 4.9. Hücre kültür kapları üzerinde çoğaltılan 6. pasajdaki AKH'lerin 7. günde, ışık mikroskobu altındaki görüntüleri. (a) 4X, (b) 10X, (c) 20X büyütme ...	60
Şekil 4.10. Üç farklı deneysel grupta, tek tabaka olarak kültüre edilen AKH'lerin 7., 14., 21., 28. ve 35. günlerde ışık mikroskobunda alınan, 20X büyütmedeki görüntüleri.	62

- Şekil 4.11. Fotopolimerizasyondan sonra elde edilen AKH enkapsüle edilmiş 3B hidrojel yapıları..... 63
- Şekil 4.12. Enkapsülasyon sonrasında PEGDM hidrojel içindeki AKH'lerin ışık mikroskobu ile alınan görüntüleri. (a) 10X, (b) 20X..... 64
- Şekil 4.13. Hidrojel içinde 35 gün boyunca kahverengi adipogenik farklılaştırma ortamında kültüre edilen AKH'lerin kültürün 1., 21. ve 35. günlerinde ışık mikroskobunda, 20X büyütmedeki görüntüleri. Oklar hidrojel içinde adipogenik farklılaşma gösteren hücreleri işaret etmektedir. 64
- Şekil 4.14. İki boyutlu farklılaştırma çalışması boyunca kültüre edilen AKH'lerin MTT grafiği (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık, n=3, kontrol grubu büyüme ortamı (kontrol) iken * $p<0.05$, ** $p<0.01$, **** $p<0.001$; kontrol grubu farklılaşma grubu iken ● $p<0.05$, ●● $p<0.01$, ●●● $p<0.001$) 66
- Şekil 4.15. Polimer konsantrasyonu %15 ve %20 (w/v) olan PEGDM hidrojellerine L929 hücrelerinin enkapsüle edilmesiyle elde edilen 3B kültürlerin MTT grafiği (İstatistiksel açıdan anlamlı farklılık, n=3, kontrol grubu %15 PEGDM (w/v) iken, *** $p<0.001$) 68
- Şekil 4.16. Üç gün boyunca gerçekleştirilen canlı-ölü boyama analizi sonucunda %15 ve %20 (w/v) polimer konsantrasyonundaki PEGDM hidrojellerine enkapsüle edilen L929 hücrelerine ait 20X büyütmedeki mikroskop görüntüleri..... 68
- Şekil 4.17. Üç boyutlu kahverengi adipogenik farklılaştırma çalışması için %20 (w/v) polimer konsantrasyonundaki PEGDM hidrojelini içine enkapsüle edilen AKH'lerin kültürün 7. günündeki canlı-ölü boyama analizi sonucundaki floresan görüntüleri. (a) 10X, (b) 20X, (c) 10X, (d) 20X. 69
- Şekil 4.18. PEGDM hidrojel içine enkapsüle edilip kahverengi adipogenik farklılaştırma ortamında kültüre edilen AKH'lerin SEM fotoğrafları. (a) 21. gün, büyük fotoğraf 1000X, küçük fotoğraf 5000X büyütme. (b) 35. gün, büyük fotoğraf 1000X, küçük fotoğraf 5000X büyütme. (c) 21. gün, 10.000 X büyütme. (d) 21. gün, büyük fotoğraf 1000X, küçük fotoğraf 5000X büyütme. (e) 35. gün, büyük fotoğraf 1000X, küçük fotoğraf 5000X büyütme. (f) 35. gün, 5000X büyütme..... 71
- Şekil 4.19. İki boyutlu kültürlerde çoğaltılan AKH'lere ait bağıl PPAR- γ gen ekspresyonu sonuçları. Kontrol grubunun temel büyüme ortamında çoğaltılarak kontrol grubunu oluşturan hücreler olduğu durum, n=4, * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$; kontrol grubu farklılaşma grubunda çoğaltılan hücreler olduğu durum, n=4, ● $p<0,05$, ●● $p<0,01$, ●●● $p<0,001$ 73
- Şekil 4.20. Üç boyutlu kültürlerde çoğaltılan AKH'lere ait bağıl PPAR- γ gen ekspresyonu sonuçları..... 74

- Şekil 4.21. İki boyutlu kültürlerde çoğaltılan AKH'lere ait bağıl Cidea gen ekspresyonu sonuçları. (Kontrol grubunun temel büyüme ortamında çoğaltılarak kontrol grubunu oluşturan hücrelerin olduğu durum, n=4, * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$).....76
- Şekil 4.22. Üç boyutlu kültürlerde çoğaltılan AKH'lere ait bağıl UCP-1 gen ekspresyonu sonuçları.76
- Şekil 4.23. İki boyutlu kültürde kahverengi adipositlere farklılaştırılan AKH'lerdeki lipid damlacıklarının ve kontrol grubundaki hücrelerin Oil Red O boyaması ile optik mikroskop altında 20X büyütmede görüntülenmesi78
- Şekil 4.24. Hidrojel içinde kahverengi adipositlere farklılaştırılan AKH'lerdeki lipid damlacıklarının Oil Red O boyaması ile optik mikroskop ile 40X büyütmede görüntülenmesi.79
- Şekil 4.25. İki boyutlu kültürde kahverengi adipogenik ortamda ve büyüme ortamında (kontrol grubu) kültüre edilen AKH'lerdeki UCP-1 proteininin 21 ve 35. günlerdeki immünofloresan görüntüleri. Primer antikor olarak anti-UCP-1 antikor, sekonder antikor olarak Alexa Fluor 488 kullanılmıştır. Hücre çekirdeği DAPI ile mavi renkte görüntülenmiştir.82
- Şekil 4.26. İki boyutlu kültürde kahverengi adipogenik ortamda ve büyüme ortamında (kontrol grubu) kültüre edilen AKH'lerdeki PPAR- γ proteininin 21. ve 35. günlerdeki immünofloresan görüntüleri. Primer antikor olarak anti-PPAR- γ antikor, sekonder antikor olarak Alexa Fluor 488 kullanılmıştır. Hücre çekirdeği DAPI ile mavi renkte görüntülenmiştir.....82
- Şekil 4.27. Hidrojel içine enkapsüle edilen AKH'lerde kahverengi adipogenik farklılaştırma sonrasında eksprese olan UCP-1 proteininin immünofloresan yöntemle görüntülenmesi. Primer antikor olarak anti-UCP-1 antikor kullanılırken, sekonder antikor olarak Alexa Fluor 488 kullanılmıştır (Büyütme: 20X)83
- Şekil 4.28. Hidrojel içine enkapsüle edilen AKH'lerde kahverengi adipogenik farklılaştırma sonrasında eksprese olan UCP-1preoteininin immünofloresan yöntemle görüntülenmesi. Primer antikor olarak anti-UCP-1 antikor kullanılırken, sekonder antikor olarak Alexa Fluor 488 kullanılmıştır (Büyütme: 20X).....84
- Şekil 4.29. PEGDM hidrojel içine enkapsüle edilip adipogenik farklılaşma gösteren AKH'lerin 21. gün, 40X büyütmedeki H&E boyama görüntüleri. (a) Farklılaşma grubu, (b) Soğuk indüksiyonu grubu.85

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

Ca	Kalsiyum
H ⁺	Proton
HCl	Hidroklorik asit
Mg	Magnezyum
OH ⁻	Hidroksil
dk	Dakika
n	Nano
sn	Saniye
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
μ	Mikro
v/v	Hacim/hacim oranı
w/v	Ağırlık/hacim oranı

Kısaltmalar

2B	İki boyutlu
3B	Üç boyutlu
α -MEM	Minimum esansiyel Eagle ortamı α modifikasyonu
AIBN	Azobisisobütironitril
AKH	Adipoz kökenli kök hücreler
ATP	Adenozin tri fosfat

BAD	Beyaz adipoz doku
BMI	Vücut kitle indeksi
BMP	Kemik morfogolik proteini
BSA	Sığır serum albümini
cAMP	Siklik adenzin monofosfat
cDNA	Tamamlayıcı deoksiribonükleik asit
DAPI	4',6-Diamidino- 2-Phenylindole
DMEM	Dulbecco Modifiye Eagle Ortamı
DNA	Deoksiribonükleik asit
DPBS	Dulbecco fosfat tampon çözeltisi
DCM	Diklorometan
ECM	Ekstraselüler matriks
FBS	Fetal sığır serumu
FGF	Fibroblast büyüme faktörü
H-NMR	Proton nükleer manyetik rezonans spektroskopisi
HIER	Isıyla indüklenmiş epitop gerialımı
IBMX	3-izobütil-1-metilksantin
I2959	2-hidroksi-1-(4-(hidroksietoksi)fenil)-2-metil-1propanon
Jel-MA	Metakrilatlanmış jelatin
KAD	Kahverengi adipoz doku
MA	Metakrilik anhidrit
MD	Metakrilatlanma derecesi
MKH	Mezenkimal kök hücre
MTT	3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-difeniltetrazolyum bromür
MW	Mikrodalga

PBS	Fosfat tampon çözeltisi
PEG	Poli(etilen glikol)
PEGDA	Poli(etilen glikol diakrilat)
PEGDM	Poli(etilen glikol dimetakrilat)
PGA	Poli(glikolik asit)
PLA	Poli(laktik asit)
PPAR- γ	Peroksizom proliferere aktive reseptör gama
RNA	Ribonükleik asit
RT-PCR	Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
SEM	Taramalı elektron mikroskopu
SVF	Stromal vasküler fraksiyon
T3	Triiyodotronin
T4	Tiroksin
UCP-1	Uncoupling protein 1
UV	Mor ötesi
VEGF	Vasküler endotelyal büyüme faktörü

1. GİRİŞ

Kahverengi adipoz doku (KAD), insan vücudunda kürek kemikleri, boyun ve omuzlar arası bölge gibi kısıtlı alanlarda bulunan, vaskülarizasyondan dolayı rengi kahverengiye yakın olan ve vücutta termoregülasyondan (ısı düzenleme) sorumlu yağ dokusu çeşitidir [1, 2]. Yaşlanma süreci gerçekleşirken kahverengi adipoz doku (KAD) zamanla yerini beyaz adipoz dokuya (BAD) bırakır. Kahverengi adipositler daha yüksek bir metabolik aktiviteye sahip olup beyaz adipositlerden farklı işlev görmektedirler. “Uncoupling protein-1” (UCP-1), kahverengi adipositlerde çok yüksek miktarda eksprese olan, oksijen alımında, kalori harcanmasında ve vücudun ısınmasında görevli bir proteindir [3-5]. UCP-1 proteininin bu aktiviteleri nedeniyle son yıllarda yapılan çalışmalarla birlikte KAD’ın, dünya genelindeki yaygın hastalıklar olan obezite ve tip 2 diyabet gibi metabolik bozuklukların tedavisi için terapötik potansiyele sahip olacağı düşünülmektedir [1, 6, 7]. Bu nedenle sunulan tez çalışması kapsamında doku mühendisliği yaklaşımı ile *in vitro*’da metabolik olarak aktif, üç boyutlu (3B) kahverengi adipoz doku elde edilmesi hedeflenmiştir.

Adipoz doku mühendisliği çalışmalarında uygun mekanik özellikler ve biyouyumluluk gibi nedenlerle doku iskelesi olarak hidrojellerin kullanılması yaygındır [8]. Hidrojeller bünyelerinde yüksek miktarda su tutma özelliği göstererek şişen, ancak suda çözünmeyen, çok sayıda hidrofilik gruplar içeren, ağ yapılı polimerik malzemelerdir [9].

İnsan vücudundaki pek çok doku ve organ karmaşık 3B mimariye sahiptir. Bu nedenle hücrelerin *in vitro* koşulda 3B olarak hidrojel sistemleri ile kültüre edilmesi gerçek doku fizyolojisine daha yakın bir ürün sunar [10]. Bunun için son yıllarda 3B hücre kültürü çalışmaları önem kazanmaktadır. Transplantasyona uygun doku ve organlara olan ihtiyacı gidermek için 3B hücre kültürleri, uygun mekanik dayanıma, 3B ağ örgüsüne ve hücre yerleşimine izin verir. Bu amaçla hücreler, hidrojeller ve çeşitli biyoaktif moleküller ile bir araya getirilerek dokuları taklit eden yapılar oluşturulmaktadır [11, 12].

Sunulan tez kapsamında hidrojel olarak metakrilatlanmış polietilen glikol, yani polietilen glikol dimetakrilat (PEGDM) kullanılmıştır. Polietilen glikol (PEG)

biyomedikal uygulamalarda yaygın olarak kullanılan sentetik bir biyopolimerdir. Akrilat veya metakrilat grupları ile sonlanan PEG makromerlerinin sulu çözeltileri, kovalent olarak çapraz bağlanmış hidrojelere oluşturmak üzere sırasıyla uygun bir başlatıcı varlığında UV veya görünür ışık kullanarak foto-polimerize edilebilmektedir [13, 14].

Tez çalışması kapsamında ilk aşamada beyaz adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin iki boyutlu (2B) hücre kültüründe kahverengi adipositlere farklılaştırılması gerçekleştirilmiştir. Sonraki aşamada ise kök hücreler sentezlenen PEGDM hidrojelini içerisine enkapsüle edilerek üç boyutlu (3B) hücre kültürleri elde edilmiş ve kök hücrelerin KAD'a farklılaştırılması sağlanmıştır. *In vitro* hücre kültürü çalışmaları boyunca yapılan analizlerle (Oil Red O boyamalar, immünofloresan analizler, RT-PCR analizleri) kök hücrelerin hem 2B, hem de 3B hücre kültürlerinde kahverengi adipositlere farklılaştırılması değerlendirilmiştir. Konuyla ilgili literatür incelendiğinde bugüne dek PEGDM hidrojelini kullanılarak yapılan bir KAD doku mühendisliği çalışmasına rastlanmamıştır. Çalışma kapsamında kök hücrelerin kahverengi adipositlere farklılaştırılmasında kronik soğuk maruziyetinin etkisi de incelenmiştir. Sıcak kanlı hayvanlarda ısı düzenlemeden sorumlu olan KAD, özellikle soğuk ortam koşullarında bulunan hayvanlarda hipotermiye önüne geçilmesinde rol alır [5]. Literatürde KAD aktivitesinin artırılması için çeşitli *in vivo* deneysel çalışmalar yer almaktadır. Bu çalışmalarda karşılaştırmalı olarak sıcak ve soğuk ortam koşullarında tutulan veya egzersiz yaptırılan memelilerde KAD aktivasyonu, metabolik hız, oksijen tüketim oranı ve KAD'la ilişkili çeşitli genlerin ekspresyonunda artış gibi sonuçlar elde edilmiştir [15]. Bu verilerden yola çıkılarak önerilen tez çalışmasında 2B ve 3B ortamda kültüre edilen kök hücrelere *in vitro* koşulda soğuk indüksiyonu gerçekleştirilmiştir. Buna göre soğuk indüksiyonunun kök hücrelerin KAD'a farklılaşmasındaki etkinliği incelenmiştir. Kültüre edilen hücreler düzenli aralıklarla (günaşırı ve 2B kültürler için günde 15 dk, 3B kültürler için 1 saat) steril ortam koşulları sağlanarak soğuk ortamda (16°C) tutulmuş ve 37°C'deki standart *in vitro* hücre kültür koşullarında farklılaşma ajanlarıyla birlikte hem 2B, hem de 3B olarak kültüre edilen kök hücrelerle karşılaştırmalı olarak analiz edilmiştir. Yapılan, RT-PCR ve immünohistokimyasal ve immünohistokimyasal analizlerle soğuk indüksiyonunun kahverengi adiposit farklılaşmasındaki etkinliği incelenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

Çalışmanın bu bölümünde sunulan tezin temelini oluşturan literatür bilgisi üç ana başlık halinde özetlenmiştir. İlk olarak adipoz doku türleri ve kahverengi adipoz doku hakkında genel bilgilere yer verilmiş, adipoz dokunun genel özellikleri, adipoz doku türleri arasındaki farklılıklar ve kahverengi adipoz dokunun vücut metabolizması açısından önemi ve fonksiyonları ayrıntılı bir şekilde belirtilmiştir. Sonraki kısımda kahverengi adipoz doku mühendisliği için gerekli hücrel ve malzemeye yönelik bileşenlerle ilgili genel bilgiye yer verilmiştir. Son kısımda ise hidrojenlerin genel özellikleri, adipoz doku mühendisliğinde kullanılan hidrojenler ve sunulan tez çalışmasında kullanılan poli etilen glikol dimetakrilat (PEGDM) hidrojeninin özellikleri açıklanmıştır.

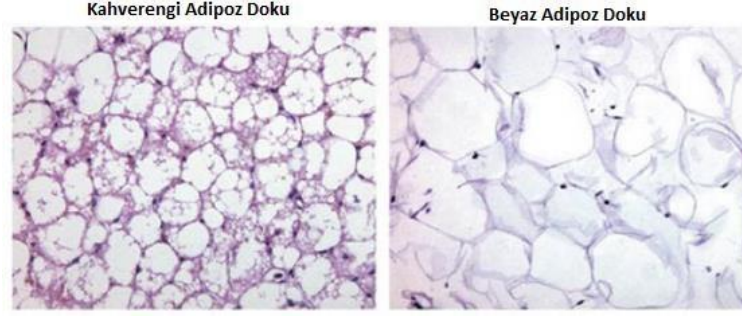
2.1. Adipoz Dokunun Yapısı ve Özellikleri

Adipoz doku vücudun derialtında ve iç organlara ait depolarında bulunan, toplam vücut ağırlığının %15-30'unu oluşturan, özelleşmiş bir doku çeşididir. Adipoz doku genel olarak beyaz ve kahverengi adipoz doku olmak üzere 2 çeşittir. Beyaz adipoz doku (BAD) vücuttaki enerji deposu olarak görev alan tek ve büyük yağ damlacıkları içeren adipositlerden oluşurken; kahverengi adipoz doku (KAD) çok sayıda, küçük lipit damlacıkları içeren adipositlerden oluşmaktadır ve vücuttaki termoregülasyondan (ısı düzenleme) sorumludur.

Yetişkin insanlarda adipoz dokunun büyük bir çoğunluğunu BAD oluştururken, KAD çoğunlukla vücutta sırt, boyun ve omuzlar arası bölgeler gibi kısıtlı alanlarda bulunmaktadır. İnsan perivasküler adipozu da ayrıca kahverengi adipositler içermektedir. Bütün adipoz türleri sistemik metabolizmaya hormon salgılayarak endokrin işlev görmektedir [16]. Şekil 2.1'de beyaz ve kahverengi adipositlerin hücrel yapıları gösterilmiştir.

Lipit taşıyan adipositler derialtı ve iç organlara ait adipoz depolarında, ikinci trimesterin sonuna kadar ortaya çıkar ve doğumdan itibaren 15 mikron çaplı preadipositten 80 mikrona kadar değişen aralıkta olacak biçimde genişler. Doğumdan yetişkinliğe kadar geçen sürede ise hem viseral (iç organlarda bulunan) hem de deri altı bölgelerdeki

adipoz doku depoları, cinsiyet hormonları ve beslenme gibi faktörlere bağılı olarak farklı oranlarda büyür [16].



Şekil 2.1. Kahverengi ve beyaz adipoz doku kesitlerinin H&E boyama sonrası görüntüleri [17].

2.1.1. Beyaz Adipoz Doku

Beyaz adipoz dokunun (BAD) temel hücresele bileşenleri adiposit adı verilen, kollajen fiberlerle desteklenen lipit dolu hücrelerdir. Olgun bir beyaz adipositin sitoplazmasının yaklaşık %90'ını lipit içeriği oluşturur. Adipoz dokunun diğere hücresele bileşenleri ise düz kas hücreleri, endotel hücreleri, fibroblastlar, kan hücreleri ve preadipositlerle birlikte stromal-vasküler hücrelerdir [17]. BAD, kahverengi muadili kadar çok vaskülarize olmamasına rağmen, BAD'da bulunan her bir yağ hücresi, dokunun devamlı büyümesine olanak tanıyan bir vasküler ağ sağlamaktadır ve en az bir kılcal damar ile temas halindedir [18].

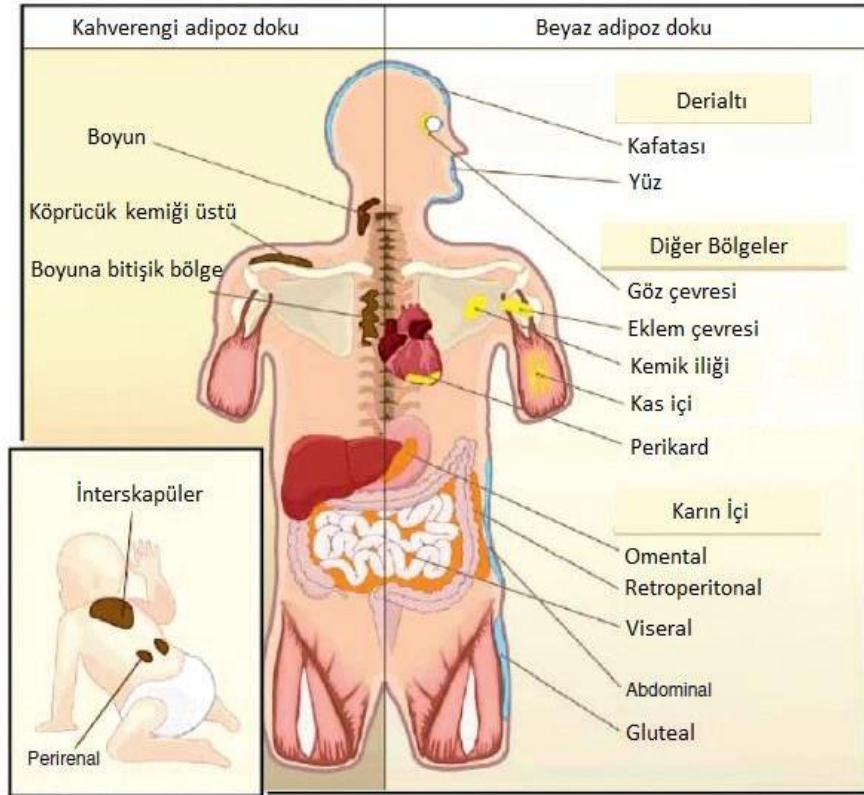
BAD organizmaya karşı uygulanan mekanik şokları absorbe ederek dokuları destekler ve vücut sıcaklığının korunmasında da rol alır. Adipoz doku mikroçevresi mekanik stimülasyon, hücre-hücre etkileşimleri, besin maddelerinin iletimi ve hücreleri düzenleyici işlev yaparak adipositleri desteklemekte ve düzenlemektedir [16].

BAD içerisinde bulunan olgun adipositler, geniş (290 μm 'ye varabilen hücre çapı), küresel formda, tipik olarak hegzagonal geometride, etrafı daha küçük preadipositler ve interstiyel boşlukları dolduran sinirler ve kılcal damarlarla çevrili bir vaziyette ve bal peteğine benzer bir geometride dizilmiş halde bulunurlar [16]. BAD'ın gelişmesi organizmadaki yüksek yoğunlukta, trigliserit formunda ve neredeyse sınırsız miktarda kalori depolamasına izin verir. Adipoz dokunun bu eşsiz özelliği, ilk insanların bol

miktarda besin maddelerini biriktirmelerini sağlayarak kıtlık zamanlarında hayatta kalma şanslarını arttırmıştır. Ancak günümüzde yüksek kalorili besinlere kolay ulaşılma imkanına sahip oluşumuz, modern toplumlarda obezite, tip II diyabet ve kardiyovasküler rahatsızlıklar gibi ciddi hastalıkların salgın oranlarında ortaya çıkmasına yol açmıştır [19].

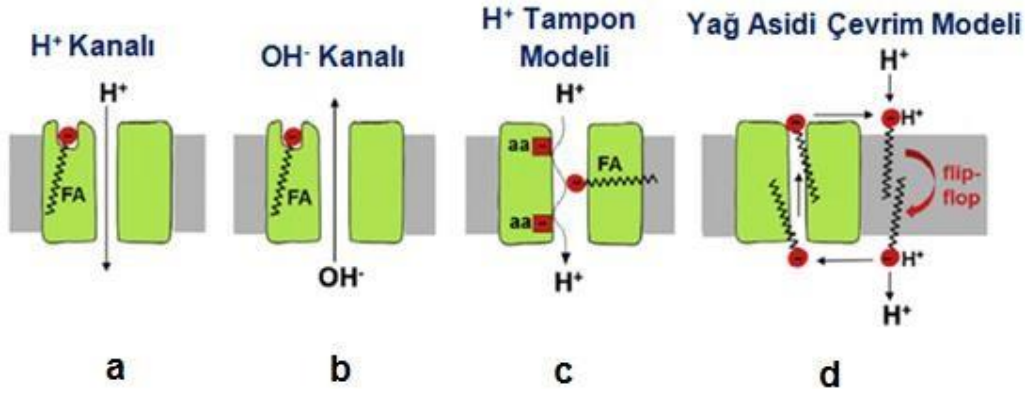
2.1.2. Kahverengi Adipoz Doku

Kahverengi adipoz doku (KAD) memelilerde anahtar termogenik doku olarak tanımlanmıştır [20]. KAD, daha yüksek miktarda mitokondriyal içerik, daha yüksek ekstraselüler matriks (ECM) oranı, çok sayıda küçük lipit vakuölü ve belirgin bir kahverengi renkte olması gibi özellikleri nedeniyle morfolojik olarak BAD'dan farklıdır [1]. İnsan vücudunda boyun bölgesi, köprücük kemikleri, kürek kemikleri ve omuzlararası bölge gibi kısıtlı alanlarda bulunan KAD, yüksek oranda vaskülarizasyon nedeniyle kahverengiye yakın bir renktedir. Yaşlanma ile birlikte insan vücudunda KAD miktarı azalırken BAD miktarı artar [1, 21, 22]. Şekil 2.2'de insanlarda kahverengi ve beyaz adipoz dokunun bulunduğu bölgeler şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 2.2. İnsanlarda kahverengi ve beyaz adipoz dokuların bulunduğu bölgeler [23].

Kahverengi adipositler “mitokondriyal ayrılma” (*mitochondrial uncoupling*) olarak karakterize edilen yüksek bir metabolik aktiviteye sahiptir [1, 2, 24]. Bu hücreler ısı üretimi için yağı ve karbonhidratları oksitleyen, özelleşmiş ve çok sayıda mitokondri içermektedir. Bu metabolik olay, ATP üretimi için elektrokimyasal gradyanı ayırıştıran kahverengi adipositlerin iç mitokondriyal membranındaki “uncoupling protein-1” (UCP-1) proteininin varlığına bağlıdır [20]. UCP-1, kahverengi adipositlerden yüksek miktarda eksprese olur ve oksijen alımında, kalori harcanmasında ve vücut ısısının düzenlenmesinde görev alır. UCP-1 mitokondriyal membran boyunca proton sızıntılarını katalizleyen ve böylece ATP üretiminde oksidatif fosforilasyondan ayrılmasını sağlayan, iç mitokondriyal zar içerisinde bulunan bir proton taşıyıcısıdır. KAD, termogenezi sağlamaktaki asıl işlevini termogenik faktör olan UCP-1 ile gerçekleştirmektedir [1, 25]. Şekil 2.3’te UCP-1 proteininin işleyişindeki önerilen modeller gösterilmektedir.



Şekil 2.3. UCP-1 proteininin işlevleri için önerilen modeller. a) Yağ asidinin (Fatty Acid, FA) bağlanmasıyla aktive edilen H⁺ kanalı, b) OH⁻ kanalı, c) H⁺ tampon modeli ve d) yağ asidi çevrim modelinin allosterik bağlanması ile aktive edilen OH⁻ kanalı şekilde gösterilmektedir [26].

KAD memelilerde soğuğa maruziyet karşısında canlının hipotermiye girmesinin önlenmesinde görev alır [20, 24, 25, 27]. Düzenli egzersizin, termoregülasyonda ve metabolizma hızında etkili bir protein olan UCP-1 ekspresyonunu indüklediğini gösteren çeşitli çalışmalar literatürde mevcuttur [15, 27, 28]. Ayrıca kahverengi adipositler, enerji tüketimini ATP üretiminden ayırarak şekilde kalori tüketme konusunda önemli bir kapasiteye sahiptir. Bu yüzden vücudun enerji dengesindeki bozulmaların yol açtığı, dünya genelindeki yaygın hastalıklar olan obezite ve tip II

diyabet gibi metabolik hastalıkların tedavisi için KAD'ın terapötik potansiyele sahip olacağı düşünülmektedir [1, 21, 24]. KAD'ı arttırmaya yönelik olarak gerçekleştirilen çalışmalarda küçük hayvan modellerinde otolog KAD transplantasyonu, metabolik olarak iyileşmeye katkı sağlasa da, insanlarda KAD kaynağı kısıtlı olduğundan transplantasyon işlemi için avantajlı değildir [6].

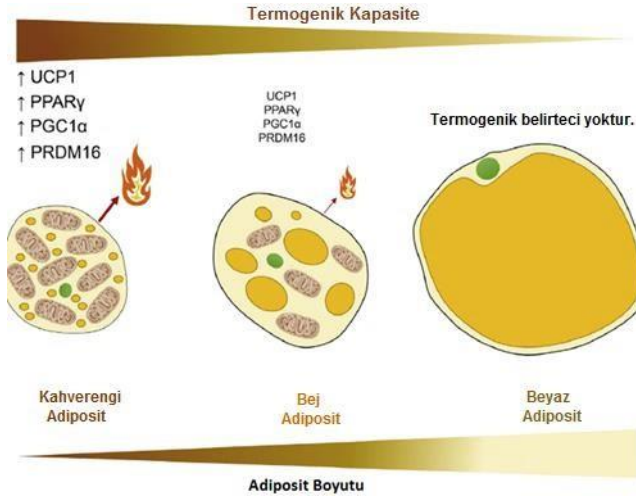
Yakın zamana kadar, yetişkinlerdeki KAD miktarının ihmal edilebilir derecede az olduğu düşünülmekteydi. Ancak son yıllarda yapılan çalışmalar bu görüşü çürütmüş ve yetişkin insanlarda aktif KAD'ın varlığını ortaya koymuştur. Özellikle, insanlarda aktif haldeki KAD miktarı ve şişmanlık arasında çok güçlü bir ters ilişki vardır. Dahası yaşlanma ile birlikte KAD miktarında azalma görülür, bu da kilo alma eğilimini artırır [20]. KAD, adaptif termogenez için memelilerdeki esas bölgedir. Kemirgenlerde yapılan çalışmalarda KAD'ın termogenik aktivitesinin obeziteye karşı koruyucu olabileceği ortaya konulmuştur. Son yıllarda radyodiyagnostik işlemler sonucu elde edilen bulgular KAD'ın yetişkin insanlarda da aktif bir doku olduğunu ortaya koymuştur [24].

2.1.3. Bej Adipoz Doku

Kahverengi adipositler anatomik KAD depolarında kümelenmiş halde bulunurlar ve miyojenik hücre soyu için ortak olan mezenkimal öncül hücrelerden köken alırlar. Bu hücreler “klasik” veya “gelişimsel olarak programlanmış” kahverengi adipositler olarak adlandırılırlar. Bununla birlikte BAD'ın anatomik bölgelerinde de termogenik uyarılardan sonra kahverengi adipositler ortaya çıkabilmektedir. Bu hücreler, “bej”, “brit” veya “indüklenebilir” adipositler olarak adlandırılır. Bu süreç BAD'da “kahverengileşme” olarak adlandırılır ve adipositlerin beyazdan kahverengiye transdiferansiyasyonunu içerir [24].

Deri altı ve iç organlara ait adipoz depoları, sinirlerle donatılmış, damarlanmış, multipotent projenitör hücreleri ve farklılaşmış adipositleri içeren endokrin organlardır. Kahverengi adipositler beyaz adipositlerden morfolojileri, fonksiyonel kapasiteleri ve vücuttaki depolanma yerleri bakımından farklıdır. Ancak “bej” adipositler, hem beyaz hem de kahverengi adipositlerin özelliklerini birarada gösterebilen ve beyaz adipoz doku içerisinde bulunan adiposit türüdür [16].

Bej adipositler BAD içinde yer alırlar. Beyaz adiposit benzeri fenotiptedirler, ancak indüklendiklerinde kahverengi-benzeri fenotip kazanarak termogenezin artmasına yol açarlar. Bu olay “kahverengileşme” olarak bilinir ve genel olarak deri altı yağ depolarında gerçekleşir. Kahverengileşme işlemi PRDM16, PPAR- γ ve UCP-1 gibi termogenezde görev alan pek çok transkripsiyon faktörünün ekspresyonunu gerektirir [29]. BAD içinde bulunan kahverengi adipositler, KAD’da bulunan klasik kahverengi adipositlerden farklıdır ve beyaz adiposit hücre soyuna daha yakındır. Bej adipositlerin nihai termogenik fonksiyonunun klasik kahverengi adipositlerden farklı olduğuna dair bir kanıt yoktur, ancak kemirgenlerdeki bazı genetik veriler obeziteye karşı tedavide bej adipositlerin de etkili olabileceğini düşündürmektedir [24, 29]. Şekil 2.4’te 3 farklı tür adiposit şematik olarak karşılaştırılmıştır.



Şekil 2.4. Farklı adiposit türlerinin şematik gösterimi [30].

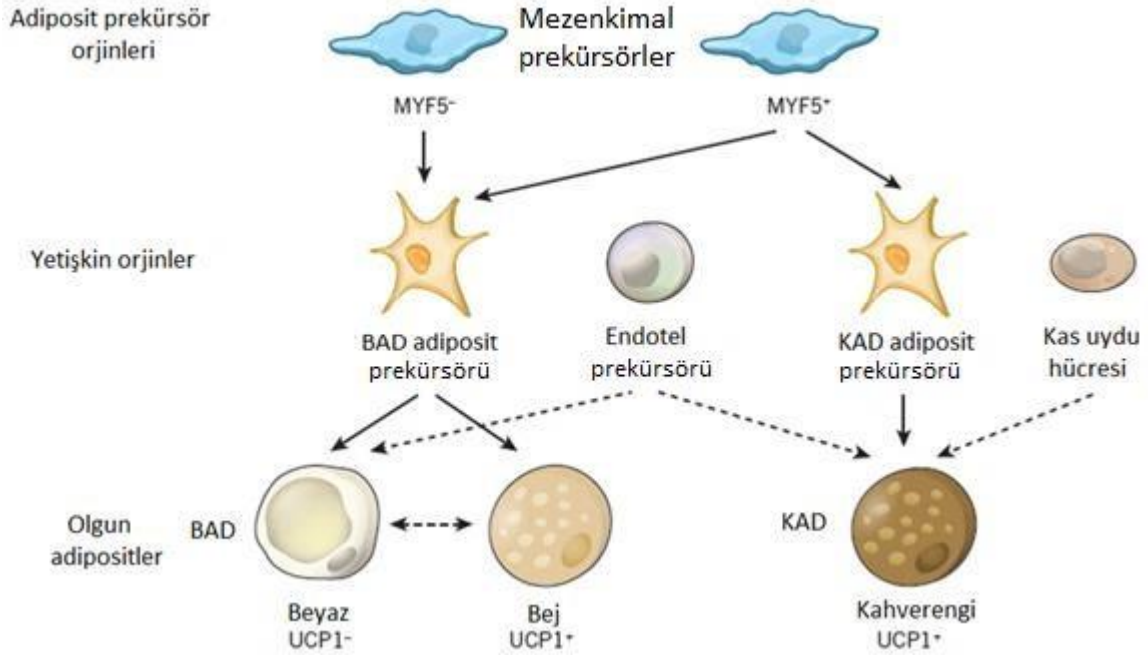
Bej adiposit oluşumu ile ilgili olarak iki genel kavram ortaya atılmıştır. Birincisi, bej adipositlerin soğuk maruziyeti veya beta adrenerjik uyarım gibi belirli uyarıcılar ile stimüle edilerek farklı progenitör hücrelerden türediğini öne süren teoridir. Diğer kavram, transdiferansiyasyon modelidir ve beyaz adipositlerin uygun koşullar sağlandığında bej adipositlere dönüşebileceğini öne sürmektedir. Genetik yatkınlık, çevre koşulları (örneğin; uygun ortam sıcaklığı) ve yağ depolarına özgü farklılıklar gibi ek faktörler, bej hücrelerin nihai formunu nasıl kazacağını da etkilemektedir. Adipoz doku kahverengileşmesinde genetik yatkınlığın da önemini belirten görüşe göre, farklı fare türleri arasında kahverengileşme kapasitesinde önemli farklılıklar bulunmuştur [5]. Çizelge 2.1’de beyaz, kahverengi ve bej adipoz dokuların özellikleri özetlenmiştir.

Çizelge 2.1. Farklı adipoz doku türleri ve özellikleri.

Adipoz Doku Türü	Bulunduğu Bölgeler	Görevleri	Hüresel Kökeni	Hücre Karakteristiği
Beyaz	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Deri altı ➤ İç organların çevresi 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Organizmaya uygulanan mekanik şokları absorbe ederek iç organları korur. ➤ Vücut ısısının korunmasına destek olur. 	Myf5-	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Geniş (290 µm'ye varan hücre çapı) küresel form ➤ Hegzagonal geometri ➤ Etrafı daha küçük preadipositler ve interstiyel boşlukları dolduran sınırlar ve kılcal damarlarla çevrili hücreler
Kahverengi	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Boyun bölgesi ➤ Köprücük kemikleri ➤ Kürek kemikleri ➤ Omuzlararası bölge 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Vücut ısısının düzenlenler (termoregülasyon). ➤ Metabolizma hızını artırıcı etki gösterir. 	Myf5+	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Yüksek miktarda mitokondriyal içerik (UCP-1 proteinin ekspresyonu) ➤ Daha yüksek ECM oranı ➤ Çok sayıda ve küçük lipid vakuolu içerir.
Bej	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Beyaz adipoz doku depoları 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ İndüklendiğinde kahverengi adiposit görevi üstlenerek termoregülasyona katkıda bulunur. 	Myf5-	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Beyaz adiposit benzeri fenotip ➤ Ancak indüklendiklerinde kahverengi-benzeri fenotip kazanırlar.

2.1.4. Kahverengi Adipoz Dokunun Oluşumu ve Gelişimi

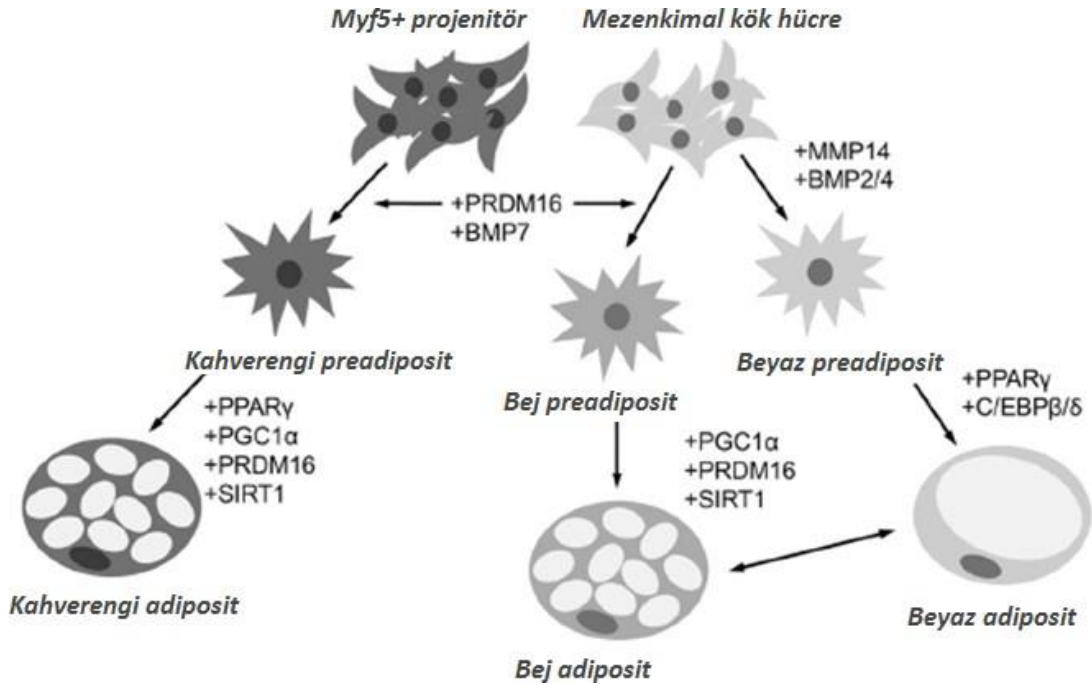
Bir adipositin yaşam döngüsü miyoblastlar ve adipositler de dahil olmak üzere, birçok hücre tipine farklılaşabilen multipotent kök hücre aşamasında başlar. Peroksizom proliferatör-aktive reseptör gama (PPAR- γ) gibi çeşitli transkripsiyonel regülatörlerin ekspresyonu adiposit farklılaşmasına yol açar. PPAR- γ , adipositlere özgü olan bir hormon reseptörüdür ve adipogenezin gerçekleşmesindeki anahtar faktördür. Preadipositlerin yaşam döngüsünün erken evrelerinde PPAR- γ aktivasyonu meydana gelir ve trigliseridler, esterler ve steroller gibi çeşitli lipitleri regüle eder. Beyaz adipositlerden farklı olarak, kahverengi adipositler Myf5⁺ soyundan köken alırlar ve bu yüzden iskelet kaslarıyla çeşitli ortak öncüllere sahiptirler [22]. Şekil 2.5'te farklı adiposit türlerinin kökenleri şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 2.5. Beyaz, bej ve kahverengi adipositlerin kökenleri [3].

PRDM16 (PR domain containing 16) temel visceral preadipositlerin kahverengileşmesinde görev alarak, KAD gelişimi ve aşırı ekspresyonundaki düzenleyici transkripsiyon faktörüdür. PRDM16, PPAR- γ koaktivatörü (PGC-1) α ve β ile birlikte çalışarak KAD genlerinin indüksiyonunu düzenler. PGC-1 α , PPAR- γ 'nın koaktivatörüdür ve öncelikli olarak UCP-1 gibi “uncoupling” proteinlerinin

indüksiyonu sırasında mitokondriyal biyogenezi kontrol eder. Sirtuin-1 (SIRT1) termogenez regülasyonundaki diğer bir önemli transkripsiyon faktörüdür ve temel görevi PPAR- γ 'nın deasetile edilmesidir. PPAR- γ 'nın deasetilasyonu KAD genlerinin indüksiyonu ve BAD genlerinin baskılanması için gereklidir. Şekil 2.6'da farklı adiposit türlerinin gelişimsel kökenleri gösterilmiştir. Bu önemli transkripsiyon faktörlerinin ortak çalışması, KAD gelişimine ve işlevlerinin regüle edilmesine yol açar. PRDM16 ayrıca, BAD gelişimini sağlayan genlerin baskılanması için gereklidir [22].



Şekil 2.6. Beyaz, kahverengi ve bej adipositlerin gelişimsel kökenleri. Bej adipositler Myf5- mezenkimal kök hücrelerden (Myf5-) türetilir ve beyaz adipositlerle yakından ilişkilidir. Kahverengi adipositler ise Myf5+ öncül hücrelerden türetilir ve kas soyu ile yakından ilişkilidir [22].

2.1.5. Kahverengi Adipoz Dokunun Biyolojik Fonksiyonları

Kahverengi adipoz dokunun temel biyolojik fonksiyonları; termoregülasyon ve metabolizma hızının düzenlenmesidir. Aşağıda bu özellikler ayrıntılı bir şekilde açıklanmıştır.

2.1.5.1. Termoregülasyon

İnsanlarda ve diğer memelilerde vücut sıcaklığı çoğu iklimlerde normal olarak karşılaşılan iklim sıcaklıklarının oldukça üzerinde bir sıcaklık olan 37°C’de sabit tutulmaktadır. Bu kadar yüksek bir vücut sıcaklığını desteklemek için gerekli olan enerji, vücuttaki çeşitli ekzotermik reaksiyonlarla üretilir. Vücut, özellikle ısı üretimi için termogenez mekanizmalarını kullanır [20].

Termogenez, kimyasal enerjiyi ısıya dönüştürme işlemidir. Vücutta titreme ile gerçekleşen termogenezde (shivering thermogenesis) hızlı kas kasılmaları ile ısı üretimi meydana gelirken, KAD’da titreme gerçekleşmeden ısıl düzenleme gerçekleşir (nonshivering thermogenesis). “*Titremesiz*” veya “*adaptif termogenez*” olarak adlandırılan bu işlem ile özellikle kış uykusuna yatan hayvanlarda vücutta fiziksel aktiviteye gerek duyulmaksızın ısı üretimi meydana gelir ve böylece hipotermi önlenmiş olur. Adaptif termogenez nedeniyle vücutta termoregülasyonu sağlayan KAD’ın özellikle henüz kas gelişimini tamamlamamış ve kısıtlı fiziksel aktivite gösterebilen yeni doğanlarda vücut sıcaklığının korunması açısından önemi büyüktür. Ayrıca yeni doğanların vücudundaki KAD oranı yetişkinlere kıyasla daha yüksektir [22].

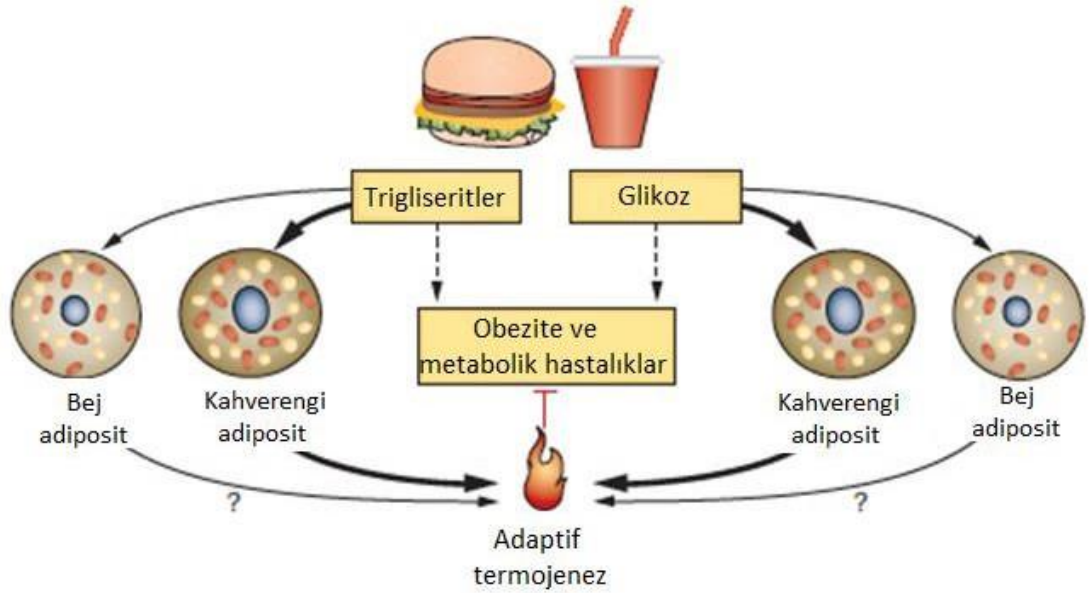
Termogenez, çok sayıdaki mitokondrinin UCP-1 proteinini eksprese etmesiyle gerçekleşir. Bu durumda substrat oksidasyonunun ATP üretiminden ayrılmasını sağlayarak ısı oluşur [31]. KAD, soğuğa maruziyet sırasında vücut sıcaklığının korunmasında görev alır ve katı organlarda biyokimyasal olayların gerçekleşebilmesi için optimum vücut sıcaklığının korunmasını sağlar [2]. Yapılan biyokimyasal çalışmalar adaptif termogenezin genel prensibini ortaya koymuştur. Uzun zincirli yağ asitleri varlığında UCP-1 iç mitokondriyal membranın H⁺ geçirgenliğini arttırmakta ve kahverengi adiposit mitokondrileri ATP enerjisi yerine ısı enerjisi üretmektedir [26].

2.1.5.2. Metabolizma Hızının Düzenlenmesi

Bazal metabolizmanın yapısı günümüzde halen tam olarak bilinmemektedir. Ancak, genel anlayış organizmada “her şeyin devam etmesini sağlamak” için gerekli olan metabolizma ve bunun sonucunda ortaya çıkan ısının yan ürün olmasıdır. Bununla

birlikte, memelilerin bazal metabolik hız oranı, aynı vücut sıcaklığına ve aynı vücut ağırlığına sahip sürüngenlerle kıyaslandığında en az üç kat daha yüksektir [32].

KAD'da gerçekleşen adaptif termogenez kemirgenlerde ve insanlarda enerji homeostazına etki eder. Kahverengi adipositlerdeki mitokondriyal UCP-1, yağ asidi ve glikoz oksidasyonunu sağlayarak ısı enerjisi üretir. Termogenik işleve ek olarak, sempatik sinir sistemi tarafından aktive edilen KAD ayrıca önemli bir glikoz, yağ asidi ve trigliserol temizleme organıdır ve bu işlevi yüzünden potansiyel olarak lipide mi, hiperglisemi ve insülin direnci gibi rahatsızlıkların tedavisi için kullanılabilir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda vücuttaki aktif KAD ile enerji tüketimi, vücut ağırlığı ve insülin duyarlılığı arasında önemli bir bağlantı olduğu ortaya konmuştur [19, 32]. Şekil 2.7'de besin alımı ve kahverengi adipogenez arasındaki ilişki özetlenmiştir.



Şekil 2.7. Besin alımı ile adaptif termogenez arasındaki ilişki [33].

Aşırı trigliserit ve glikoz alımı obezite ve metabolik hastalıklara neden olur. Kahverengi ve bej adipositler tarafından besinlerin kullanımıyla trigliserit ve glikoz miktarı azaltılabilir. Böylece obeziteye karşı terapötik bir etki sağlanabilir [33].

Son yıllarda yapılan çalışmalara göre, insanlarda aktif haldeki 50 gram KAD'ın günlük enerji tüketiminin %20'sini karşılayabileceği ortaya konulmuştur. Bu yüzden obezite ve buna bağlı hastalıklarda kahverengi adipositlerin yüksek bir terapötik potansiyeli

olacağı düşünülmektedir [4]. KAD, vücudun enerji homeostazındaki rolü nedeniyle obezite için umut verici bir karşı önlem olarak görülmektedir. İnsanlarda tam olarak aktive edilmiş KAD'ın, tüm vücut metabolizmasında ve dolayısıyla bazal metabolizma hızının %30'una kadar katkıda bulunabileceği tahmin edilmektedir. Dahası dinlenme halindeki enerji tüketiminin sağlıklı yetişkin erkeklerde KAD ile pozitif ilişki gösterdiği ortaya konulmuştur [25].

Kemirgenler üzerinde yapılan çalışmalarda, KAD'ın tüm vücut enerji homeostazı, substrat metabolizması ve glikoz homeostazında önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir. Termonötral koşullarda, UCP-1 geni nakavt edilmiş farelerde diyetle indüklenen termogenezin bozulduğu ve obezitenin geliştiği gözlenmiştir [7, 34]. KAD, toplam glikozun %75'ini ve trigliseritlerin %50'sini dolaşımdan temizler. Ayrıca soğukla indüklenen termoregülasyonda da KAD'ın aktivitesinde artış meydana gelmektedir. Yapılan çalışmalarda soğuğa maruziyetin bireylerdeki enerji harcamaları üzerindeki etkisi incelenmiş ve soğuğun enerji tüketimini %10 ile %27 oranında arttırdığı bulunmuştur [35]. Chondronikola ve arkadaşlarının KAD termogenezinin arttırmak için bireylerin titreme eşiğinin üzerinde uzun süreli (5 saat) bir soğuk maruziyeti protokolünü uyguladıkları çalışmaya göre, 50-100 mL'lik KAD'ın sağlıklı erkeklerde enerji tüketimini günde 150 ile 300 kcal kadar arttırabildiği bulunmuştur [36]. Buna ek olarak Lee ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, KAD'ın genç erkek bireylerde diyetle bağlı termogenezi %32 oranında arttırdığı ortaya konulmuştur [37]. Soğuğa maruziyet, KAD'daki glikoz alımını önemli ölçüde arttırmaktadır, ancak bu durum diğer dokularda gerçekleşmez. Ayrıca obezite hastalarında bu durum zayıf bireylere göre daha az belirgin bir şekilde gerçekleşir [7, 37].

2.2. Kahverengi Adipoz Doku Mühendisliği

Bugüne dek adipoz doku mühendisliği yaklaşımları çoğunlukla rekonstrüktif amaçlarla beyaz adipoz doku üretimine yönelik olup, “kahverengi adipoz doku mühendisliği” yeni ve güncel bir araştırma alanıdır. Günümüzde çeşitli adipoz doku mühendisliği stratejileri geliştirilmiştir.

Patrick ve arkadaşları tarafından rekonstrüktif amaçla gerçekleştirilen, geleneksel beyaz adipoz doku mühendisliği stratejisinde, preadipositler ve endotelial hücreler enzimatik

ayırıştırma ile hastanın liposakşın ve yağ doku biyopsisiyle alınan dokusundan izole edilir. Preadipositler uygun büyüme faktörleri ile uygun bir doku iskelesi üzerinde kültüre edilir [38, 39]. Genel strateji ise, yapay ECM görevi üstlenen bir yapıya yumuşak doku rejenerasyonuna uygun bir yanıt alacak şekilde hücre ekiminin gerçekleştirilmesini içerir [8]. Klinik olarak gerçekleştirilen KAD çalışmalarında ise mevcut stratejiler iki ana kategoriye ayrılmaktadır. İlki, endojen kahverengi veya bej adipoz depolarının farklılaşmasını indüklemek için farmasötik veya genetik müdahaleleri içerir. Diğeri ise, *ex vivo* otolog hücre veya doku transplantlarının üretilmesidir. Mevcut gen terapisi yaklaşımları, anti-obezite terapileri olarak uygulanmadan önce, hala açıklanmamış kısımları bulunması nedeniyle henüz klinikte uygulanamamaktadır. Ancak KAD biyolojisini araştırmak için önemli araçlar oldukları kanıtlanmıştır. Küçük hayvan modellerinde otolog KAD transplantasyonu, metabolik gelişmeler göstermiştir. Ancak bu yaklaşımın insanlar üzerinde uygulanma ihtimali düşüktür. Çünkü transplante edilebilir olgun insan KAD'nın miktarı azdır ve bireyler arası aktarımda immün reddin üstesinden gelinmesi gereklidir [6].

BAD'ın kahverengileşmesini indüklemek için küçük moleküllerin veya büyüme faktörlerinin kullanılması da umut verici bir yaklaşımdır. Ancak sistemik dozların istenmeyen sonuçlarla hedef dışı etkiler gösterme potansiyeli bulunmaktadır. Kahverengileştirme ajanları genellikle belirli sinyal yollarını hedefleyerek işlev görür. Önemli bir kahverengileştirme ajanı olan roziglitazon, diyabet tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak kalp yetmezliği gibi ciddi rahatsızlıkları içeren yan etkilere sahiptir. İstenilen anatomik bölgelere kahverengileştirme ajanlarının salım kinetiğini lokalize etmek ve kontrol etmek için biyomalzemeler kullanılabilir. Buna ek olarak, kahverengi adipositlerin sayısını artırırken, fonksiyonel bir doku üretmek için diğer destekleyici hücre tipleri de gerekmektedir. KAD için bu, UCP-1+ adipositler ile sinir, damar ve bağışıklık sistemleri arasındaki etkileşimleri içerir [6].

Adipogenez hücre içi lipit birikimi ve organizasyonuyla hücre şeklinin ve iskeletinin yeniden düzenlenmesine bağlıdır. KAD'ın kahverengileşme süreci sırasında dokunun ECM'sinde meydana gelen değişiklikler hakkında günümüzde nispeten az şey bilinmektedir. Ancak KAD ECM'sinden türetilen sinyaller ve adiposit-ECM etkileşimi anlaşıldığı takdirde kahverengi adiposit oluşumunu indükleyecek sistemlerin geliştirilmesi

sağlanabilecektir. Laminin veya kollajen gibi ECM bileşenlerini içeren biyomalzemeler hücre iskelelerinin biyoyumluluğunu ve etkinliğini arttırmaktadır. ECM bileşenlerinin spesifik karışımlarının preadipositlerle birleştirilerek kahverengi adiposit üretilip üretilmeyeceği henüz belirlenmemiştir, ancak bu yaklaşımın BAD'a uygulandığı çalışmalar mevcuttur [6].

İlgili literatür incelendiğinde metabolik olarak aktif ve fonksiyonel bir kahverengi adipoz dokunun üretildiği az sayıda çalışmaya rastlanılmıştır. Tharp ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, hiyaluronik asit hidrojeller ile *in vivo*'da ve *in vitro*'da KAD mühendisliği çalışması gerçekleştirmişlerdir. Yaptıkları çalışmada beyaz adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücreleri hiyaluronik asit hidrojellere enkapsüle etmişler ve bej adiposit farklılaşmasını sağlamışlardır [6]. Yang ve arkadaşları yaptıkları çalışmada hem kahverengi, hem de beyaz adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücreleri, 2B kültürde ve polietilen glikol diakrilat (PEGDA) hidrojeller ile gerçekleştirdikleri 3B hücre kültürlerinde beyaz ve kahverengi adipoz dokuya farklılaştırmışlardır. Oil red O boyamaları ile lipid damlacıklarını görüntülemiş, RT-PCR ve immünohistokimyasal analizlerle farklılaşmayla ilgili gen ve protein ekspresyonlarını göstermişlerdir [1]. Kuss ve arkadaşları ise yaptıkları çalışmada insan beyaz ve kahverengi preadipöz hücre hatlarını kullanarak kahverengi adipoz doku farklılaştırmasını gerçekleştirmişlerdir. Hücreleri foto-çapraz bağlanabilir hiyaluronik asit hidrojellerle enkapsüle edilip biyobaskılamışlar, RT-PCR ve Western blot analizleriyle ilgili hücresel belirteçlerin varlığını göstermişlerdir [40].

2.2.1. Hücre Kaynakları

Doku mühendisliği için her birinin kendi avantajı ve dezavantajı bulunan çeşitli hücre kaynakları kullanılmaktadır. En avantajlı metotlardan biri, doğrudan hastanın kendisinden alınan otolog hücrelerin elde edilmesidir, ancak bu hücreler *in vitro* şartlarda kısıtlı çoğalma kapasitesine sahiptir. Otolog hücrelerin kullanımı, herhangi bir immün cevaba neden olmadığı için en iyi seçenek kabul edilmektedir. Ancak bu hücrelerin *in vitro* koşulda kısıtlı çoğalma kapasitesi doku mühendisliği uygulamalarında kullanımlarını sınırlandırmaktadır. Hayvanlardan izole edilen hücrelerin klinik doku mühendisliği uygulamalarında kullanımı ise, virüs gibi enfeksiyöz ajanların taşınması veya etik kısıtlamalar gibi çeşitli ciddi sakıncalar

bulundurmaktadır. Bunlara ek olarak kök hücreler ve/veya projenitör hücreler doku mühendisliği uygulamalarında sıkça kullanılmaktadır [41].

KAD doku mühendisliği için ise kolay ve bol miktarda erişilebilen projenitör hücreler oldukça önemlidir. Çeşitli BAD depolarında bulunan UCP-1+ adipositler (bej adipositler) de önemli bir seçenektir. Ayrıca BAD kaynaklı multipotent kök hücrelerin, istenmeyen BAD depolarından izole edilmesi ve otolog olarak KAD doku üretiminde kullanılması da terapötik açıdan umut vaad edicidir [6].

2.2.1.1. Kök Hücreler

Kök hücreler, vücutta pek çok dokuda bulunabilen, kendini yenileyebilen, ve çeşitli farklı fenotipteki hücrelere farklılaşabilen (potansiyel olarak bütün vücut hücrelerine) hücrelerdir [8, 41]. Birçok doku türüne farklılaşabilme kabiliyeti olan bu hücreler adipoz doku mühendisliği için avantajlı bir hücre kaynağıdır. Kök hücreler üç yönden diğer hücre tiplerinden farklıdır. İlk olarak kendilerini uzun süre yenileyebilir, çoğalabilir ve proliferere olabilirler. İkincisi, kök hücreler farklılaşmamış ve henüz olgunlaşmamıştır. Yani herhangi bir doku özgülüğü yoktur ve dokuya özgü işlevleri yerine getirmek zorunda değildirler. Kök hücrelerin uygun uyaranları aldıktan sonra endotelial hücrelere ve adipositlere farklılaşma kapasitesi, onların rekonstrüktif amaçlar için vaskülarize bir yağ grefti geliştirilmesinde kullanılabilmelerini sağlar. Üçüncüsü ise kök hücreler özelleşmiş hücrelere farklılaştırılabilir. Kök hücreler totipotent, pluripotent veya multipotent olarak tanımlanabilir. Böylece kök hücre sırasıyla bir organizmanın tüm hücrelerini, çoğunu veya az sayıda hücreleri ve/veya dokuları oluşturabilir [38, 41].

KAD mühendisliği için BAD kaynaklı kök hücrelerin kullanılması da bir diğer önemli seçenektir. BAD kaynaklı kök hücrelerin temel kaynağı, T hücreleri, B hücreleri, adipoz doku makrofajları, preadipositleri, endotelial projenitör hücreleri ve kök hücreleri içeren stromal vasküler fraksiyondur (SVF). Bu hücreler fraksiyondan Pref-1+, Lin, CD29+, CD34+, Sca-1+, CD24+, CD45, Mac1 ve PDGFR α + hücre yüzey belirteçlerine sahip preadipositler saflaştırılır. Buna ek olarak, CD137- TMEM26, ASC-1, PAT2 ve P2RX5 belirteçlerine sahip preadipositlerin kahverengi ve bej adipositlere kolayca farklılaşabildiği bilinmektedir. Dolayısıyla bu hücrelerin KAD doku mühendisliği çalışmalarında kullanılabileceği düşünülmektedir [6, 42].

2.2.1.2. Adipositler

Adipoz doku mühendisliği stratejileri kaybolan doku fonksiyonunu yerine getirmek için preadipositlerin ve adipositlerin hasar görmüş doku bölgesine implantasyonunu içerir. Ancak, vakumla yağ alımı (liposuction) ve aspirasyon işlemleriyle elde edilen otolog yağ dokusunun kullanılması, nakledilen dokunun yetersiz anjiyogenezinden ötürü doku hacminin eski haline getirilmesinde büyük ölçüde başarısız olmaktadır. Adipositin lipit dolu sitoplazması, aspirasyon işlemleri sırasındaki hasara duyarlıdır. Bu işlem, *in vivo*'da istenen hücre hacmini muhafaza edemeyecek şekilde hücre popülasyonunda hasar meydana getirir [38, 39].

- **Olgun adipositler** tek tabakalı hücre kültüründe kısıtlı proliferatif kapasite göstermektedirler ve kolayca çoğaltılamamaktadırlar. Bu hücrelerin sınırlı büyüme kapasiteleri onların doku mühendisliğinde kullanımlarını kısıtlamaktadır [38].
- **Preadipositler**, adiposit soyuna bağlı öncül hücrelerdir ve enzimatik olarak sindirilmiş dokunun stromal vasküler fraksiyonunda bulunurlar. Bu hücreler farklılaşmadan önce fusiform veya fibroblast benzeri görünümündedirler. Preadipositler farklılaşmalarının sonucunda küresel bir yapı kazanırlar ve trigliseroller ile sitoplazmada lipit vakuollerinin oluşması gibi morfolojik ve biyokimyasal değişikliklere uğrarlar. Bu hücreler, kolay elde edilebilmeleri, kültüre edilebilmeleri ve çoğaltılabilmeleri gibi özellikleri nedeniyle olgun adipositlere göre hücre kültürü çalışmaları için daha avantajlı olarak kabul edilirler [16, 38].

Saflaştırılmış preadiposit veya adiposit popülasyonları biyolojik deneyler için daha kesin bilgiler sağlayabilirken, fonksiyonel bir KAD oluşturmak için yeterli değildir. Çünkü bağışıklık sistemi ve vasküler sistemler ile SVF bileşenleri fonksiyonel olarak aktif KAD üretimi için gereklidir. Örneğin, makrofajlar ve T hücreleri, kahverengileşme sürecinde etkisi olduğu bilinen bileşenlerdir. Bunlar arasındaki hücre-hücre etkileşimleri, sitokinler, IL-33 veya VEGF-A gibi büyüme faktörleri KAD oluşumunda rol alır. Bu yüzden KAD mühendisliği için biyolojik olarak saflaştırılmış KAD, çoklu saflaştırılmış hücre popülasyonları veya saflaştırılmamış SVF'nin kullanılması avantajlı olabilir [6].

222 Kahverengi Adipoz Doku Aktivitesinde Fiziksel ve Biyokimyasal Etkiler

Düzenli egzersizin, soğuk indüksiyonunun ve biyokimyasal faktörlerin termoregülasyonda ve metabolizma hızında etkili protein olan UCP-1 ekspresyonunu indüklediğini gösteren çeşitli çalışmalar literatürde mevcuttur [15, 25, 27, 37]. Ayrıca sıcak kanlı hayvanlarda ısıl düzenlemeden sorumlu olan KAD, özellikle soğuk ortam koşullarında bulunan hayvanlarda hipoterminin önüne geçilmesinde rol alır [15].

Literatürde KAD aktivitesinin artırılması için çeşitli *in vivo* deneysel çalışmalar yer almaktadır. Bu çalışmalardan karşılaştırmalı olarak sıcak ve soğuk ortam koşullarında tutulan veya egzersiz yaptırılan memelilerde KAD aktivasyonunda, metabolik hızda, oksijen tüketim oranında ve KAD ile alakalı çeşitli genlerin ekspresyonunda artış gibi sonuçlar elde edilmiştir [27, 28, 43-45].

Kronik Soğuk Maruziyeti:

Kronik soğuk maruziyetinin, hem insanlarda hem de küçük memelilerde yapılan çok sayıdaki araştırmayla, KAD'daki UCP-1 aktivitesiyle meydana gelen adaptif termogenezi uyardığı ortaya konulmuştur. Soğuk algısı, hipotalamusun ön optik alanındaki nöronlara sinyal gönderir, ayrıca UCP-1 ve KAD aktivitesini uyaran norepinefrini serbest bırakmak için sempatik sinir sistemini harekete geçirir. Bu aktivite mevsimsel değişimler nedeniyle kış aylarında artar [21].

Kahverengi ve bej adipoz dokunun soğuk maruziyetinde nasıl bir tepki verdiğini anlamaya yönelik çalışmalarda, KAD'ın termogenik tepkiyi başlatmak veya sürdürmek için sempatik sinir sistemine ve bağışıklık sistemine bağlı olduğu ortaya konulmuştur [6].

BAD'ın kahverengileşmesinde soğuğa maruz kalmaya tepki olarak, kahverengileşme makrofajlar ve eozinofiller tarafından düzenlenir. Bağışıklık hücreleri obezite ve inflamasyona yanıt olarak kahverengileşme sürecine etki eder [16].

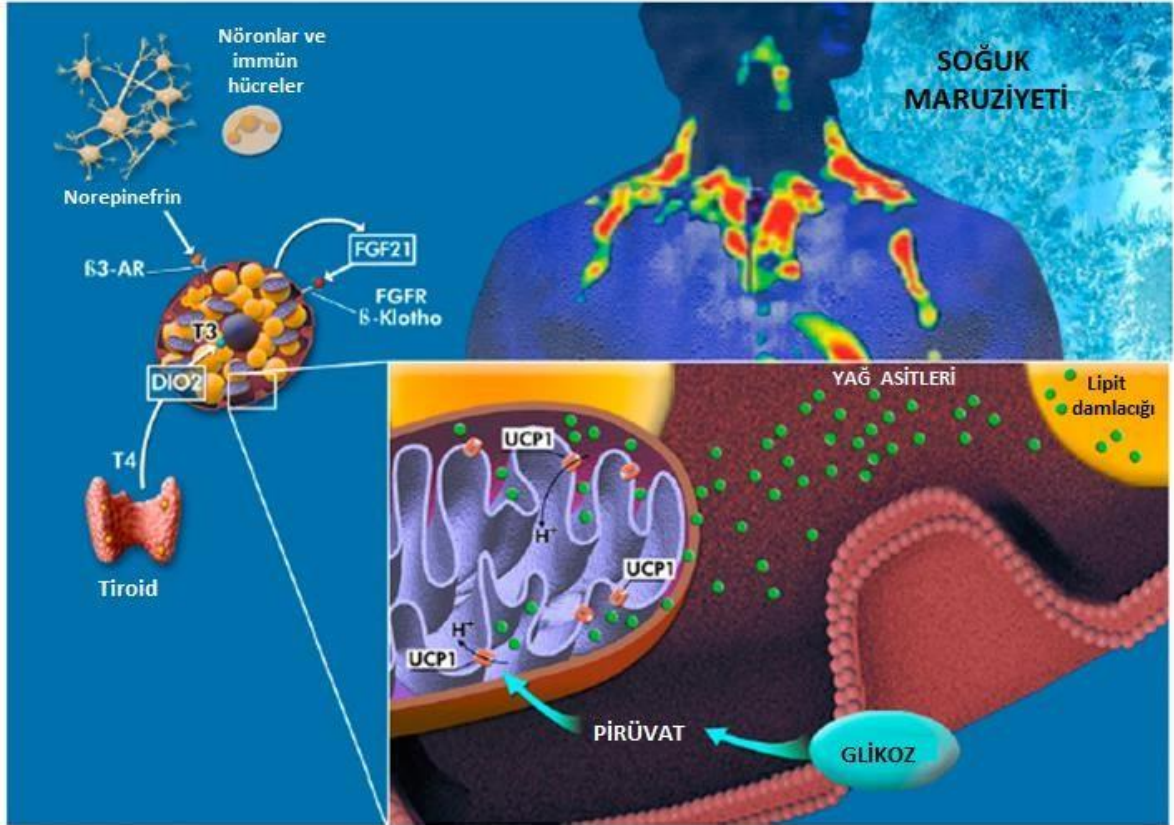
Sempatik sinir terminallerinden salınan norepinefrin, KAD'ın termogenik aktivitesini PKA ve p38-MAPK sinyal yollarıyla aktive eder. Ardından UCP-1 aracılığıyla proton ayrılması için lipoliz ile serbest yağ asidi üretimi gerçekleşir. Bu sinyaller ayrıca, PPAR- γ koaktivatörü 1 α (PGCA1 α), cAMP tepki elemanı-bağlama proteini (CREB) ve

aktive edici transkripsiyon faktörü 2 (ATF2) dahil olmak üzere anahtar transkripsiyonal aktivatörlerin fosforilasyonu yoluyla UCP-1 ekspresyonunu güçlü bir şekilde uyarır. KAD'ın fizyolojik düzenlenmesi, temel olarak kahverengi adipositlerde eksprese edilen β 3-adrenerjik reseptörlerin aktivasyonu aracılığında sempatik sinir sistemi yoluyla meydana gelir. Adrenerjik stimülasyon, protein kinaz A'yı aktive eden ve termogenik gen ekspresyonunun indüksiyonu için transkripsiyonel faktörlere aracılık eden siklik adenozin monofosfatın (cAMP) hücre içi seviyesini artırır. Adrenal bezin bir katekolamin üreten tümörü olan feokromositoma, KAD'ın termogenik aktivitesini belirgin bir şekilde arttırmakta, termogenezi ve azaltılmış vücut ağırlığını destekleyen uzun süreli bir sempatik düzenleme sunmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, sadece soğuğa maruziyetin değil, sinir sistemini uyarıcı bir madde olan efedrinle uyarılan sempatik sinir sistemi etkinliğinin de KAD'ı indüklediği gösterilmiştir. Bununla birlikte, daha yüksek dozda (2,5 mg/kg) akut oral efedrin uygulaması ile yapılan başka bir çalışmada da, aktivasyon derecesinin soğuk maruziyet için gözlemlenenen daha düşük olmasına rağmen, obez insanlarda KAD aktivasyonunu arttırdığı gösterilmiştir [21].

Nguyen ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, soğuk tepkisine aracılık eden yeni bir düzenleyici hücre popülasyonunu tanımlamışlardır. Bu hücre popülasyonu; alternatif olarak aktive edilen (tip2/M2) makrofajlar olarak isimlendirilmiştir. M2 makrofajları IL-4 ve IL-13 sinyalleriyle eozinofiller tarafından aktive edildiğinde, deri altı beyaz adipoz dokuya, bu dokunun kahverengileşmesini aktive eden katekolaminleri salgılamaktadır. Makrofajlarında seçici olarak IL-4 sinyalinden veya katekolamin üretiminden yoksun olan fareler üzerinde yaptıkları çalışmaya göre, soğukla uyarılan bej adipoz doku gelişiminde ciddi bir bozulma görülmüştür. Buna göre, IL-4 sinyalinin, BAD'ın kahverengileşmesini indüklemek ve diyetle ilgili olarak vücut ağırlığını azaltmak için gerekli olduğunu ortaya koymuşlardır [46].

Chondronikola ve arkadaşları insan KAD fizyolojisi üzerinde yaptıkları çalışmada, soğukla indüklenen KAD aktivasyonunun insanlardaki glikoz homeostazı ve insülin duyarlılığı üzerindeki etkisini araştırmışlardır. Buna göre, yedi adet orta yaşlı ve kilolu erkek birey üzerinde yapılan çalışmada, denekler uzun süre (5-8 saat) soğuğa maruz bırakılmışlardır. Deney sonuçlarına göre, soğuğa maruz bırakılan deneklerde, tüm

vücuttaki glikoz alımı, plazma glikoz oksidasyonu ve insülin duyarlılığı önemli ölçüde artmıştır. Kontrol grubunda ise bu adaptasyonlar gözlenmemiştir. Soğuk indüksiyonu dolaşımında daha yüksek serbest triiodotironin, norepinefrin ve fibroblast büyüme faktörü 21 (FGF21) seviyeleri ile ilişkilidir [36]. Şekil 2.8’de sempatik sinir sistemi ve soğuğa maruziyetin KAD aktivitesi üzerindeki etkisi gösterilmiştir.



Şekil 2.8. Sempatik sinir sistemi ve soğuk maruziyetin kahverengi adiposit aktivitesi üzerindeki etkisi [31].

Norepinefrin (nöronlar ve alternatif olarak aktive edilmiş makrofajlar tarafından salgılanır) ve tiroid hormon düzeylerinin yükselmesi bir termogenik programı tetikler. KAD aktivasyonu, iç mitokondriyal membrandan proton sızıntısına neden olan ve böylece enerjiyi dağıtan ve ısı üreten UCP-1 ifadesi ile gerçekleşir. Ardından Tiroksin'i (T4) Triiodotironin (T3)'e dönüştüren tip 2 deiyodinaz (DIO2), UCP-1 transkripsiyonunu indükler. Daha sonra FGF21 ve sistemik, otokrin ve parakrin mekanizmaları ile hareket ederek tüm vücut glikoz homeostazını ve insülin duyarlılığını iyileştirir. Soğuk kaynaklı KAD aktivasyonu ayrıca lipolizi de uyarır. Lipit

damlacıklarından salınan serbest yağ asitleri, mitokondriyal termogenezi besleyen UCP-1'e bağlanır ve aktive olur (β 3-AR, β 3-adrenerjik reseptör) [31].

Iwen ve arkadaşlarının on beş sağlıklı insan erkek denek üzerinde yaptıkları çalışmada, kontrollü olarak soğuğa maruz bırakılan insanlardaki KAD'ın insülin duyarlılığına ve sekresyonuna olan etkisi incelenmiştir. Bu çalışmaya göre yaş ortalamaları 27.1 ± 0.8 ve beden kitle indeks ortalamaları $23.2 \pm 0.2 \text{ kg/m}^2$ olan, kronik veya akut herhangi bir sağlık problemi bulunmayan denekler iki farklı sıcaklık koşuluna maruz bırakılmıştır. Denekler için termonötral koşul olarak 22°C ve soğuk koşul olarak 18.06°C seçilmiştir. Sıcaklık koşullarının uygulanması deneklere giydirilen su perfüzyon giysisi ile gerçekleştirilmiştir. Çalışmaya göre, yapılan CT-PET tarama, kan glikozu ve hormon seviyesi gibi analizlerle soğuğa maruziyetin termonötral koşulla kıyaslandığında KAD aktivitesini daha çok arttırdığı, kan plazmasındaki noradrenalin ve dopamin seviyelerini yükselttiği, periferik glikoz alımını arttırdığı ve insülin duyarlılığını önemli ölçüde iyileştirdiği gösterilmiştir [43].

Van Marken Lichtenbelt ve arkadaşlarının on dört adet obez (body mass index, BMI, ≥ 25) ve on adet zayıf insan erkek (BMI, < 25) denek üzerinde yaptıkları çalışmada denekler iki farklı sıcaklıkta tutulmuştur. Termonötral koşul olarak 22°C ve soğuk koşul olarak 16°C seçilmiştir. Deney sonuçlarına göre KAD aktivitesi tomografi analizleri ile test edilmiştir. Çalışmaya göre yirmi dört deneğin yirmi üçünde soğuk ortam koşullarında KAD aktivitesinin ve metabolizma hızının arttığı görülürken, termonötral koşulda söz konusu durumlar için bir değişiklik görülmemiştir. Ayrıca KAD aktivitesinin obez deneklerde zayıf deneklere göre önemli ölçüde daha az olduğu bulunmuştur. Denekler sırt üstü pozisyonda bir iklim çemberi içine alınarak 1 saat 22°C 'de, ardından 2 saat 16°C 'de tutulmuştur. Hem ılık hem de soğuk uygulamasından sonra yapılan analizlere göre KAD'ın sadece soğuk maruziyetinden sonra önemli ölçüde aktive olduğu görülmüştür [27].

Seebacher ve arkadaşlarının sıçanlar üzerinde yaptıkları çalışmada *Rattus fuscipes* türü sıçanlar 22°C ve 12°C olmak üzere iki farklı sıcaklık koşulunda bir ay boyunca haftada beş gün, günde otuz dakika olmak üzere koşturulmuştur. Soğuk ortamda egzersiz

yaptırılan sıçanlarda sıcak koşulda tutulan sıçanlara göre UCP-1 ekspresyonu ve KAD aktivitesinde önemli ölçüde artış gözlenmiştir [45].

Labbe ve arkadaşlarının sıçanlar üzerinde yaptıkları çalışmada ise 27°C ve 10°C olmak üzere iki farklı sıcaklık koşulunda tutulan erkek Wistar sıçanlardaki KAD aktivasyonu incelenmiştir. Yirmi bir gün boyunca 27°C’de günde 2 saat ve 10°C’de 6 saat tutulan sıçanlarla deney gerçekleştirilmiştir. Deney sonuçlarına göre soğuğa maruz bırakılan hayvanlarda KAD’ın oksidatif aktivitesinde ve glikoz tüketiminde 27°C’de tutulan hayvanlara göre daha çok artış görülmüştür [28].

Tsuboyama-Kasaoka ve arkadaşları yaptıkları çalışmada düzenli yüzme egzersizi yaptırılan dişi ve erkek C54BL/6J farelerin kahverengi adipositlerindeki UCP-1 mRNA ekspresyonlarını incelemişlerdir. Buna göre 2 hafta boyunca, 10 dakikalık dinlenme süreleriyle ayrılan, günde 4 adet 30 dakikalık yüzme seansları gerçekleştirilmiştir. Yapılan deneyde hayvanların vücut ısısını sınırlandırmak için suyun sıcaklığı 35°C’ye ayarlanmıştır. UCP-1 mRNA ekspresyonu analizi yüzme egzersizlerinden 3 ve 22 saat sonra test edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre düzenli yüzme egzersizi farelerde KAD kütlesini arttırırken, dokudaki UCP-1 mRNA seviyelerini etkilememiştir [47].

Oh ve arkadaşlarının yaptıkları benzer bir çalışmada ise, homozigot leptin reseptörü eksikliği bulunan db/db obez ve zayıf farelerde, 35°C su sıcaklığında, günde 2 saat süreyle 6 hafta boyunca yaptırılan yüzme egzersizinin UCP-1 ekspresyonuna olan etkisi incelenmiştir. Yapılan analizlere göre yüzme egzersizi, hem obez hem de zayıf farelerin vücut kütlelerinde önemli ölçüde azalmaya neden olmuştur. Ancak, yüzme egzersizi sadece obez dişi farelerin KAD’larındaki UCP-1 mRNA ekspresyonlarında %15.2’lik önemli bir artışa neden olmuştur. Zayıf olan grupta, UCP-1 mRNA ekspresyonu sadece erkek farelerde %40 oranında artış göstermiştir. Western Blot analizi sonuçlarına göre, egzersiz yaptırılan obez erkek farelerde UCP-1 protein ekspresyonunda %51,4’lük bir artış görülmüştür. Bu çalışmaya göre düzenli yüzme antrenmanının neden olduğu UCP-1 ekspresyonunda gözlenen artışların, enerji harcamasını teşvik edebileceği ve böylece, farelerin obez hale gelmesini önleyebileceği sonucuna varılmıştır [25].

Vargas ve arkadaşları ise yaptıkları çalışmada insan deri altı AKH’lerini *in vitro* koşulda PPAR γ agonistleri olan roziglitazone ve telmisatran maddeleri içeren besin

ortamında ayrı ayrı kültüre ederek soğuk indüksiyonu uygulamışlardır. Bunun için öncelikle hücreler temel adipojenik farklılaşma ortamında 10 gün boyunca kültüre edilmiş, bu kültür süresinin ardından 4 saat 31°C'de %5 CO₂ etüvünde tutularak kültürasyona devam edilmiştir. Kontrol grubunda ise hücreler 37°C sıcaklıktaki etüvde tutulmuştur. Buna göre elde edilen bulgularda soğuk indüksiyonu uygulanan grupta termogenik proteinler olan UCP-1, PGC1 α ve CITED1 ekspresyonlarında artış görülmüştür. Ayrıca roziglitazone ile kültüre edilen grupta telmisatran ile kültüre edilen gruba kıyasla termogenik gen ifadeleri daha yüksek bulunmuştur [48].

Egzersiz:

Egzersiz, kiloyu sabit tutup, obeziteyi engellemek için etkili bir yoldur. Fiziksel aktivite sempatik sinir sisteminin uyarımını artırır. Son yıllarda yapılan çalışmalar düzenli yapılan egzersizin kahverengi adipogenez için etkili bir uyarıcı olabileceğini göstermektedir. Bu çalışmalara göre, egzersizin adipoz depolarındaki mitokondri sayısını ve kahverengi adiposit gen ekspresyonlarını, kahverengi adiposit progenitör hücrelerinin sayısını ve kahverengi adipogenez popülasyonunu arttırdığını göstermiştir. Ayrıca egzersiz sırasında dolaşıma salgılanan bir miyokin olan Irisin, UCP-1 ekspresyonunu ve kahverengi adiposit gelişimini indüklemektedir [21]. Ek olarak, çeşitli egzersiz türlerinin kahverengi adipogenezini indükleyerek enerji tüketimini arttırdığı gösterilmiştir. PGC1 α , mitokondriyal biyogenez ve oksidatif fosforilasyon gen programının aktivasyonunu sağlayan, egzersiz sırasında iskelet kasındaki birçok fiziksel değişime aracılık eden bir anahtar transkripsiyonel çekirdek düzenleyicidir.

Irisin ve meteorin benzeri (MTRNL) miyokin, egzersize bağlı PGC1 α yoluyla upregüle edilir ve KAD gelişimi aktive olur. Ayrıca soğuk maruziyeti ile de yetişkin insanlarda Irisin dolaşımının upregüle olduğu da ortaya konulmuştur. Irisin bej adipositlere özgü genlerin ekspresyonunu indüklerken, METRNL M2 makrofajlarının eozinofil bağımlı aktivasyonunu ve hücrelerin kahverengileşmesini destekler. Buna ek olarak, ana miyokin IL-6, bej adiposit gelişimini aktive eder ve ayrıca farelerde egzersizle uyarılan KAD gelişimi için gerekli olduğu gösterilmiştir. Egzersiz sırasında iskelet kaslarındaki anaerobik glikolizinin bir ürünü olan laktatın da BAD kahverengileşmesini desteklediği gösterilmiştir. Laktat tarafından indüklenen kahverengi adipogenez, laktatı hücrelere

taşıyan monokarboksilat taşıyıcıları aracılığıyla hücre içi redoks durumununun değişimiyle (NADH/NAD + oranı) indüklenir [7].

Cevresel Etkiler:

Karmaşık fiziksel ve sosyal uyaranlarla zenginleştirilmiş bir yaşam ortamı canlıda enerji tüketimini artırır [7]. Cao ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmaya göre, besin ve çevre koşulları açısından zenginleştirilmiş bir ortamda fareler, göreceli olarak diyetle bağlı obeziteye daha dirençlidir. Hipotalamik beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF) sempatik sinir sisteminin çevreye bağlı aktivasyonuna aracılık eder ve bej adiposit farklılaşmasına neden olur. BDNF'nin hipotalamik aşırı ekspresyonu BAD'ın kahverengileşmesine katkıda bulunarak, bireyin daha zayıf bir fenotipe sahip olmasına yol açar [49].

Endokrin Hormonlar ve Metabolitler:

Kahverengi ve bej adipositler için bir dizi endokrin düzenleyici tanımlanmıştır. Bu faktörler; BMP4, BMP7, BMP8b, FGF19, FGF21, büyüme farklılaşma faktörü-5 (GDF5), natriüretik peptidler (kalp, beyin ve diğer organlardan sentezlenen nörohormonlar), prostaglandinler, VEGF ve P-aminoizobütirik asidi (BAIBA) içerir. Buna ek olarak bu faktörler tüm vücut enerji harcamalarını artırabilir, hayvanları diyetin yol açtığı kilo artışından koruyabilir ve sistemik glikoz homeostazına ve / veya insülin duyarlılığına olumlu yönde etki edebilir [7].

Proteinler:

Çeşitli proteinler, normal KAD gelişiminde ve BAD kahverengileşmesinde görev almaktadırlar. BMP-7, Myf5+ prekürsör hücrelerinin kahverengi adipositlere farklılaşmasındaki önemli bir faktördür. BMP-7 erken KAD regülatörü PRDM16 ve PGC-1 α 'nın ekspresyonunu ve dolayısıyla UCP-1'in sentezlenmesini stimüle eder. Son zamanlarda, kardiyak natriüretik peptitler, fiziksel egzersiz sırasında yağ mobilizasyonunun düzenlenmesinde, iskelet kaslarının yağ oksidasyonunda ve beyaz adipositlerin kahverengileşmesinde rol oynayan metabolik hormonlar olarak kabul edilmiştir. Bu aileye ait üç peptit: atrial natriüretik peptit, beyin natriüretik peptit (BNP) ve C-tip natriüretik peptittir. Soğuk maruziyeti BNP salgılanmasını ve natriüretik peptid

reseptör A sentezini destekler. Böylece, adipositlerdeki aktive edilmiş siklik guanosin monofosfatla düzenlenmiş protein kinaz, p38 MAPK yolağını uyarır, UCP-1'in sentezini arttırır ve bu sayede kahverengileşme sürecini tetikler [50].

Makrofajlar ve KAD:

Makrofaj yanıtları klasik (M1; proinflamatuvar) ve alternatif (M2; antiinflamatuvar) olmak üzere iki ayrı aktivasyon programı ile sınıflandırılmaktadır. Adipozite durumlarında M2'den M1'e karşı bir baskınlık meydana gelir, metabolik inflamasyon ve insülin direnci artar. Son yıllarda yapılan çalışmalar da makrofajların KAD regülatörü olduğunu desteklemektedir. M2 makrofajlarının doğrudan indükleyicisi olan interlökin-4, (IL-4) adaptif termogenez için gerekli olan alternatif makrofaj aktivasyonunu uyarır. IL-4, termogenik gen ekspresyonları ve enerji tüketimini arttırır. Soğuk ortam koşullarında noradrenalin sekresyonu tarafından koordine edilen termogenik yanıt oluşur ve M2 makrofajları tarafından salgılanan katekolaminler KAD aktivasyonunun sürdürülmesini sağlar [21].

223. Adipoz Doku Mühendisliğinde Kullanılan Hidrojeller

Hidrojeller bünyelerinde çok yüksek miktarda su tutma özelliği göstererek şişen, ancak suda çözünmeyen 3B, çok sayıda hidrofilik gruplar içeren, ağ yapılı polimerik malzemelerdir. Bir polimerin hidrojel özelliği gösterebilmesi için ana zincirinde ya da yan dallarında hidroksil, karboksil, karbonil, amin ve amid gibi hidrojen bağı oluşturabilme yeteneğine sahip hidrofilik grupların bulunması gerekmektedir. Üç boyutlu doku mühendisliği çalışmalarında biyolojik olarak aktif ve aynı zamanda fizikokimyasal özellikleri ayarlanabilen hidrojellere ihtiyaç duyulmaktadır [9, 51-53].

Hidrojeller zayıf biyoyumluluk gösteren, ancak mekanik özellikleri ayarlanabilen sentetik polimerler ile biyoyumluluğu yüksek, fakat mekanik özellikler bakımından güçsüz olan doğal kaynaklı polimerlerden elde edilebilmektedir [52, 54]. Biyoyumlulukları, gözeneklilikleri, işlenebilirlikleri ve hücre canlılığını destekleyici özellikleri nedeniyle hidrojeller yapay ECM doku mühendisliği uygulamalarında kullanılabilirler.

Hidrojeller çeşitli yollarla elde edilir. Bir hidrofilik monomer çok işlevli bir çapraz bağlama ajanı varlığındaki polimerizasyon sonucu hidrojel oluşturur. Diğer bir sentezde ise suda çözünebilir polimerler doğrudan çapraz bağlanarak hidrojeller üretilir. Polimerizasyon genellikle benzoil peroksit, 2,2-azo-izobütironitril (AIBN), amonyum peroksodisülfat gibi serbest radikal oluşturucu bileşikler veya UV, gama veya elektron ışını radyasyonu kullanılarak başlatılır. Ancak polimerizasyon sonrası genellikle önemli seviyelerde atık monomerler içeren malzemeler elde edilebilmektedir. Reaksiyona girmemiş monomerler genellikle toksik olduğundan, elde edilen ürünlerin saflaştırılması gerekir [55].

Doku mimarisinin hücre davranışı üzerinde güçlü etkileri olduğu bilinmektedir ve doğal ECM'yi taklit etmek için hidrojellerle oluşturulan 3B *in vitro* hücre kültürü modelleri başarıyla kullanılmaktadır. Su ile şişebilen polimerik 3B ağ yapıları olan hidrojellerin 3B organizasyonu sadece hücrelerin fonksiyonunu ve canlılığını desteklemekle kalmaz, aynı zamanda birçok hücre tipinin, özellikle de adipositlerin farklılaşmasına aracılık eder [6]. Bir doku mühendisliği uygulaması için kullanılacak doku mühendisliği ürünü olan yapı, tahmin edilebilir bir hacim ve destek sağlamalıdır. Bunun için istenen yapı, söz konusu dokunun hacmini tanımlayan ve koruyan 3B bir doku iskelesini içermelidir. Ayrıca üretilen doku mühendisliği ürününün klinikte kullanımı kolay olmalı ve ürün hastanın bireysel ihtiyaçlarına göre kolayca değiştirilebilmelidir [56]. Bunun için adipoz doku mühendisliğinde kullanılacak 3B doku iskelesi olarak yumuşak bir dokunun mekanik özelliklerine uygun olan hidrojellerin kullanılması avantajlıdır. Kullanılacak malzeme, normal hücresel organizasyonu, hücre davranışını ve hücre rejenerasyonunu desteklemelidir. Ayrıca, toksik olmayan bozunma ürünleri oluşturmalıdır [8]. Çizelge 2.2'de adipoz doku mühendisliğinde kullanılan hidrojeller ve özellikleri gösterilmiştir.

Çizelge 2.2. Adipoz doku mühendisliğinde kullanılan hidrojel.

Hidrojel Türü	Polimerin Özellikleri	Örnek Çalışmalar
Hiyaluronik Asit (HyA)	<p>β-1,4-glukuronik asit- β-1,3-<i>N</i>-asetil-glikozamin zincirlerinden oluşan, ECM'nin bileşenlerinden biri olan glikoz amino glikandır.</p> <p>HyA temelli hidrojel, biyouyumlu, modifiye edilebilir, enjekte edilebilir, biyobozunurdur.</p> <p>FDA onaylıdır.</p> <p>Doku iskeleleri ve hidrojel, otolog adipoz kök hücresi implantlarında kullanılmakta ve adipoz doku üretiminde kullanılmaktadır.</p>	<p>Tharp ve arkadaşları HyA hidrojel AKH'ler ile biyobaskılamış ve hücreleri kahverengi adipoziteye farklılaştırmıştır [6].</p> <p>Kuss ve arkadaşları ise beyaz ve kahverengi adipoz dokudan izole edilen SVF hücrelerini HyA hidrojel ile biyobaskılamışlar ve hücreleri kahverengi adipoziteye farklılaştırmışlardır [40].</p>
Kollajen	<p>Düşük maliyetli, biyobozunur ve biyouyumlu olan doğal bir polimerdir.</p> <p>Kollajen doku iskeleleri ve hidrojel doku mühendisliği uygulamalarında hücre yapıştırıcı malzeme olarak kullanılmaktadır.</p>	<p>Von Heimburg ve arkadaşları AKH ektikleri kollajen doku iskelelerini tüysüz farelere implante ederek adipoz doku oluşumunu sağlamış ve yeni kan damarlarının varlığını göstermişlerdir [57].</p> <p>Gentlemen ve arkadaşları kollajen fiberleri ve kollajen hidrojel birlikte kullandıkları <i>in vitro</i> çalışmada 3T3-L1 hücrelerini jellere enkapsüle etmişler ve çalışma sonucunda hücre içi lipit damlacıklarının varlığını göstermişlerdir [58].</p>
Fibrin	<p>Biyobozunur, biyouyumlu ve doğal kaynaklı bir polimerdir.</p> <p>Hücre adezyonunu, göçünü ve proliferasyonunu destekleyen bağlanma bölgeleri içerir.</p> <p>Modifiye edilmiş ve fonksiyonelleştirilmiş fibrin matrisler doku mühendisliği uygulamalarında ve genlerin veya büyüme faktörlerinin kontrollü salım çalışmalarında kullanılmaktadır.</p>	<p>Cho ve arkadaşları AKH enkapsüle edilmiş, bFGF içeren enjekte edilebilir fibrin matrisler geliştirmişler ve bu yapıyı PLA ile güçlendirilmiş PGA fiberlerine enjekte etmişlerdir.</p> <p>Elde edilen yapıdaki hücreler adipoziteye farklılaştırılmış ve hücre içi lipit damlacıkları görüntülenmiştir [59].</p>

Çizelge 2.2. (Devam)

Jelatin	<p>Kollajenden elde edilen, biyouyumlu, biyobozunur doğal kaynaklı bir polimerdir.</p> <p>Jelatin kollajen kaynaklı olduğu için, hücre yapışması ve yeniden modellenmesi için önemli olan arjinin-glisinn-aspartik asit (RGD) içerir.</p> <p>Hücre yapışmasını, canlılığını, proliferasyonunu ve göçünü destekler.</p>	<p>Huber ve arkadaşları beyaz adipositleri Gel-MA hidrojellere enkapsüle etmişler ve 14 günlük kültürasyon sonunda enkapsüle edilmiş hücrelerdeki yağ damlacıklarını makroskopik olarak görüntülemişlerdir [60]</p>
Matrigel™	<p>Fare sarkomunun bazal membranından elde edilen ticari bir üründür.</p> <p>İçeriğinde, kollajen tip IV, laminin, çeşitli büyüme faktörleri ve protein karışımlarını barındırır.</p> <p>3B hücre kültürlerinde hücresel cevapları ve hücre büyümesini ve canlılığını destekler.</p>	<p>Kawaguchi ve arkadaşları 3T3-F442A hücreleri içeren Matrigel yapılarını bFGF ile birlikte tüysüz farelere implante etmişlerdir. İmplantasyondan 1 hafta sonra damarlanmanın ve 3 hafta sonra ise yağ damlacıklarının varlığını gözlemlemişlerdir. İmplant edilen yapılar 10 hafta boyunca hacimlerini korumuştur [61].</p>
PEGDA	<p>Biyouyumludur, sentetik bir polimerdir.</p> <p>Protein adsorpsiyonuna ve hücre yapışmasına karşı kendinden dirençlidir.</p> <p>Fotopolimerleşebilir.</p> <p>Hücre proliferasyonunu, canlılığını ve göçünü destekler.</p>	<p>Yang ve arkadaşları BAD ve KAD kaynaklı AKH'leri PEGDA hidrojellere enkapsüle ederek hücreleri <i>in vitro</i>'da kahverengi adipositlere farklılaştırmıştır [1].</p> <p>Alhadlaq ve arkadaşları PEGDA hidrojellerine kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücreleri enkapsüle etmişler ve bu yapıları <i>in vitro</i>'da adipoz dokuya farklılaştırmışlardır. Ayrıca <i>in vivo</i>'da da bu yapıları fare modeline implante ederek adipoz doku oluşumunun gerçekleştiğini göstermişlerdir [62].</p>

224. PEG, Metakrilatlanmış PEG (PEGDM) ve Özellikleri

Polietilen glikol (PEG) biyomedikal uygulamalarda yaygın olarak kullanılan sentetik bir biyopolimerdir. Akriyat veya metakrilat gruplarıyla sonlanan PEG makromonomerlerinin sulu çözeltileri, kovalent olarak çapraz bağlanmış hidrojel oluşturmak üzere UV veya görünür ışık kullanılarak hücrelerin varlığında fotopolimerizasyonla çapraz bağlanabilmektedir [12, 14, 63]. Zincir polimerizasyonu yoluyla çapraz bağlanan işlevler, ek bir çapraz bağlayıcı varlığını gerektirmez. Bununla birlikte, oluşan hidrojel, yoğun çapraz bağlama bölgeleri içeren heterojen ağ yapıları içerir [13].

PEG hidrojel, biyomoleküllerin kontrollü salımı için taşıyıcı olarak ve rejeneratif tıp için doku iskelesi olarak yaygın biçimde kullanılmaktadır. Uygun polimerizasyon koşullarında hücrelerle biyolojik olarak oldukça uyumlu olduklarından hücre enkapsülasyonu için avantajlı bir ortam sağlamaktadırlar. Geçirgenlik, difüzyonel kütle aktarımı, denge su içeriği, uygun elastisite modülü ve bozunma oranı gibi ayarlanabilir fizikokimyasal özellikleri ile PEG hidrojel yapıları, yüzeye bağımlı hücreler olan insan mezenkimal kök hücrelerinin (MKH) ve embriyonik kök hücrelerin çeşitli hücre tiplerine farklılaşmasını da destekler niteliktedir. Fonksiyonel grupların uygun tasarımı ve seçimi ile insan MKH'lerinin kondrojenik ve adipojenik farklılaşmasını indüklemek için PEG hidrojel kullanılabilmektedir [14, 52, 64]. PEG hidrojel biyolojik yanıtı yönlendirmek için tek tek veya birlikte çok çeşitli kimyasal, biyolojik ve fiziksel ajanlarla modifiye edilebilirler [65].

PEG hidrojel sentezinde fotopolimerizasyonla çapraz-bağlanma işlemi yaygın olarak kullanılmaktadır. Fotopolimerizasyon işlemi, hidrojel *in vivo* veya *in vitro* olarak, düşük viskoziteli bir monomer, oligomer veya makromer çözeltisinden, minimal invaziv bir şekilde serbest radikalik yoldan üretilmesini sağlar [65]. Fotopolimerizasyon ayrıca *in vivo* çalışmalarda hidrojel üretilmesinde de kullanılabilmektedir. Düşük viskoziteli oligomer çözeltileri, hedeflenen bölgeye enjekte edilebilmekte ve hasar görmüş dokunun şekline uygun olarak deri altından polimerize edilebilmektedir. Ağ yapısı hidrojel kayma gerilimini etkiler. Mekanik testler PEGDM hidrojel, çapraz bağ kümelerini içeren jel yapıları ile tutarlı ve mekanik olarak sağlam olduklarını göstermektedir [14, 64]. Fotopolimerize edilebilir PEG, enjekte edilebilir özelliktedir ve

doku rejenerasyonu için *in situ* olarak da kullanılabilir [51]. Basit bir tek adımlı mikrodalga destekli reaksiyon ile PEG'den polietilen glikol dimetakrilat (PEGDM) sentezlenebilmektedir. Mikrodalga enerjisi kullanılarak yapılan metakrilatlama işlemi, geleneksel yöntemlere kıyasla daha az miktarda reaktif ve çözücü kullanımına gerek olması, daha hızlı, basit ve ekonomik olması gibi özellikleri nedeniyle daha üstündür. Yapısında bulunan dipolar momente sahip hidroksil (OH⁻) grupları nedeniyle metakrilik anhidrit, mikrodalga enerjisini absorblar [10, 13].

PEGDM geleneksel yöntemle, PEG'in diklorometan içinde çözdürülüp metakriloil klorür ve trietilamin ile reaksiyona sokulmasıyla üretilir. Reaksiyon oda sıcaklığında 24 saat süreyle gerçekleşir. Diyetiler içinde çökeltme, filtrasyon ve toplama adımlarıyla reaksiyon süresi 4 güne kadar uzayabilir. Bu yaklaşımların çeşitli varyasyonları olmasına rağmen hepsi zaman alıcıdır. Ayrıca görece yüksek miktarda ve saflıkta reaktif ve çözücü kullanımını gerektirdiklerinden çevre dostu değildirler [13].

Bu kısıtlamaları aşmak için Lin-Gibson ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, PEG'i mikrodalga destekli bir yöntemle çözücü kullanmadan metakrilat gruplarıyla işlevselleştirecek bir yöntem geliştirmiştir. Bu reaksiyonda PEG'in terminal alkol grupları, bir karboksil oluşturmak üzere metakrilik anhidritin karbonil atomlarından biriyle reaksiyona girer. Reaksiyon sonucunda PEGDM ile yan ürün olarak metakrilik asit ortaya çıkar. Bu sentez yöntemi, kısaltılmış reaksiyon süresi ve çözücsüz bir sentez işlemi olduğundan geleneksel yöntemle kıyasla avantajlıdır [14].

Dimektakrilat grubu ile fonksiyonelleştirilmiş PEG (PEGDM) zincir polimerizasyonu ile çapraz bağlanabilir hale gelir. PEGDM hidrojelleri akrilat ile işlevselleştirilmiş PEGDA hidrojelleri ile kıyaslandığında çeşitli avantajlara sahiptir. PEGDA geleneksel yöntemler kullanılarak PEGDM'den daha hızlı sentezlenebilir. Ancak mikrodalga ile gerçekleştirilen yöntemde, PEGDM sentezinin reaksiyon verimi yüksektir. PEGDA sentezi geleneksel yöntemle yaklaşık 24 saatlik bir reaksiyon ile gerçekleştirilebilirken, PEGDM mikrodalga yöntemi kullanılarak 5 dakikalık bir reaksiyonla üretilebilmektedir. PEGDM'nin PEGDA'ya göre daha yavaş reaksiyon kinetiği bulunurken, PEGDM için çapraz bağlanma reaksiyonu daha hızlıdır ve PEGDA'ya göre daha büyük bir makromer dönüşümü sağlar. Ayrıca PEGDM hidrojelleri PEGDA

hidrojellerine kıyasla hücre canlılığını ve proliferasyonunu daha çok destekler niteliktedir [13].

PEGDM ve benzer türevlerinden elde edilen fotopolimerize hidrojeller doku rejenerasyonu çalışmalarında ve diğer biyolojik uygulamalarda doku iskelesi olarak yaygın olarak kullanılmaktadır [66].

Benoit ve arkadaşları yaptıkları çalışmada insan mezenkimal kök hücrelerini PEGDM hidrojellerine enkapsüle ederek osteojenik ve beyaz adipojenik farklılaştırmayı gerçekleştirmişlerdir. Oil red O boyamaları ile lipid damlacıklarını görüntülemiş ve gen ekspresyon analizleriyle PPAR- γ 'nın ekspresyonunu göstererek adipojenik farklılaşmayı kanıtlamışlardır. Osteojenik farklılaşma için ise Masson's trichrome ile kollajen liflerini boyamış ve osteopontinin ekspresyonunu göstermişlerdir [11].

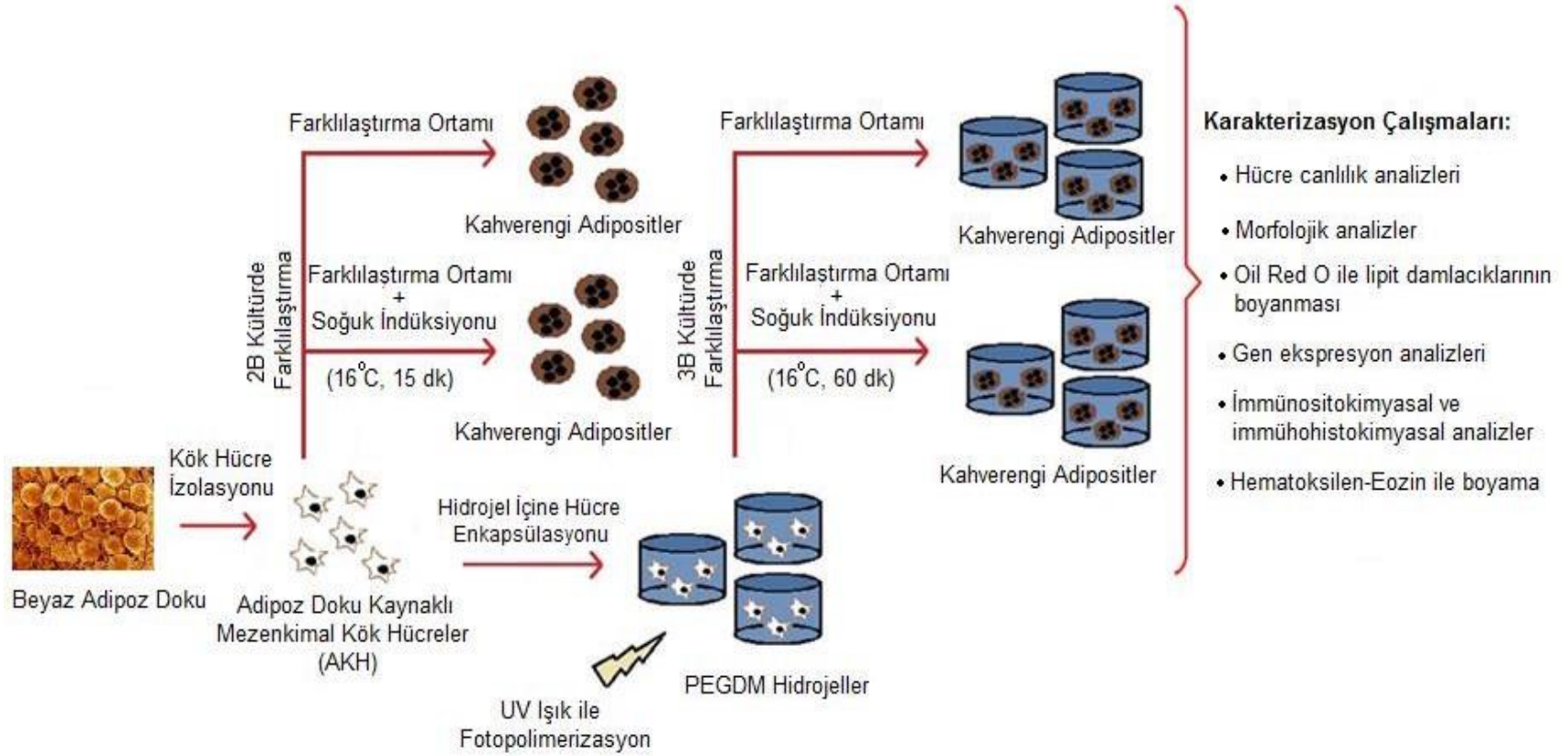
Bryant ve arkadaşları buzağı femurundan elde edilmiş kondrosit fotoenkapsüle ettikleri PEGDM ve poli(laktik asit)-b-poli(etilen glikol)-b-poli(laktik asit) (PEG-LA-DA) hidrojelleri ile 6 haftalık *in vitro* hücre kültür çalışması gerçekleştirmişlerdir. Hidrojelin mekanik açıdan güçlü ve hücre canlılığını destekleyici olduğu belirtilmiştir [67].

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Bu bölümde tez çalışması kapsamında yürütülen deneysel çalışmalar hakkında ayrıntılı bilgiler yer almaktadır. İlk olarak hidrojel olarak kullanılan PEG polimerinin mikrodalga enerjisi yardımıyla metakrilik anhidrit ile fonksiyonelleştirilmesi ve elde edilen poli(etilen glikol) dimetakrilat (PEGDM) hidrojelinin karakterizasyon çalışmaları hakkında bilgi verilmiştir. Daha sonra ise adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücreler (AKH) ile yürütülen, 2 boyutlu (2B) ve 3 boyutlu (3B) kahverengi adipogenez çalışmaları ayrıntılı bir şekilde anlatılmıştır. Tez kapsamı doğrultusunda yürütülen deneysel çalışmalar Şekil 3.1'deki şematik gösterimde özetlenmiştir.

3.1. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Kimyasallar ve Biyolojik Malzemeler

Tez çalışması kapsamında poli(etilen glikol) (PEG) polimerinin fonksiyonelleştirilmesinde ve *in vitro* hücre kültürü çalışmalarında kullanılan kimyasallar ve biyolojik malzemeler ile bu malzemelerin satın alındığı firmalar şu şekildedir: PEG polimeri (molar kütle: 4000 g/mol) Merck (Almanya) firmasından, fonksiyonelleştirici ajan olarak kullanılan metakrilik anhidrit (MA) ve fotoçapraz bağlayıcı ajan olarak kullanılan Irgacure 2959[®] Sigma-Aldrich (Almanya) firmasından temin edilmiştir. PEGDM'in üretim sürecinde yıkama adımlarında kullanılan diklorometan (DCM) ve dietil eter, Sigma-Aldrich (Almanya) firmasından satın alınmıştır. *In vitro* hücre kültürü çalışmalarında kullanılan Minimum Essential Medium Alpha Modification (α -MEM) ve Dulbecco's Modified Eagle Medium-High glikoz (DMEM-High glucose), Biowest (Fransa) firmasından, penisilin-streptomisin, fosfat tampon çözeltisi (PBS), gentamisin, amfoterisin-B ve fetal sıgır serumu (FBS) Capricorn Scientific (Almanya) firmasından ve Tripsin/EDTA (%0.01 Tripsin/10 mM EDTA) çözeltisi Sigma-Aldrich (Almanya) firmasından satın alınmıştır. Hücre canlılığının belirlenmesi için kullanılan Thizolyl Blue Tetrazolium Bromide-(MTT) tuzu AppliChem (İspanya) firmasından ve Live&Dead analiz kiti Life Technologies (A.B.D.) firmasından satın alınmıştır. Ayrıca kahverengi adipogenik farklılaştırma ortamına eklenen deksametazon, indometazin, 3-izobütil-1-metilksantin (IBMX), insulin ve 3,3',5-triiodo-L-tironin (T3) Sigma (Almanya) firmasından, roziglitazone ise Cayman Chemical (A.B.D.) firmasından temin edilmiştir. Çok gözlü polistiren hücre kültür kapları (TCPS) ise Orange Scientific (Belçika) firmasından satın alınmıştır.



Şekil 3.1. Tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen deneysel çalışmaların şematik gösterimi.

3.1.1. PEGDM Üretimi ve Karakterizasyonu

Sunulan çalışma kapsamında PEG polimeri MA kullanılarak mikrodalga enerjisi yardımıyla fonksiyonelleştirilmiştir. Metakrilatlama işlemi 3B hücre kültür ortamı için yapay bir ekstraselüler matriks (ECM) olarak kullanılacak olan PEG polimerinin kararlılığının arttırılması, polimerik yapının mekanik açıdan güçlendirilmesi ve hücre enkapsülasyonu için uygun hale getirilmesi amacıyla gerçekleştirilmiştir [13]. Bunun için ilk olarak 5 g PEG tartılarak cam vial içine alınmıştır. Üzerine 2.5 mL MA eklenmiştir ve mikrodalga cihazında (Milestone, ABD) 5 dk boyunca 1100 Watt enerji uygulanarak reaksiyon gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon boyunca sıcaklığın aşırı yükselmesini önlemek amacıyla, reaksiyon tüpü 30 sn mikrodalga cihazında tutulup 30 sn vorteks ile karıştırılmış ve bu işlem 10 kez tekrarlı bir şekilde uygulanmıştır. Böylece toplam reaksiyon süresinin 5 dk olması sağlanmıştır. Reaksiyon sonucunda elde edilen PEGDM oda sıcaklığında 5 dk soğumaya bırakılmış ve ardından 15 mL DCM içinde çözdürülmüştür. Daha sonra çözünen PEGDM içerisindeki reaksiyona girmeyen MA'ın uzaklaştırılması için -20°C'de soğutulmuş 10 M 150 mL dietil eter içinde 20 dk bekletilmiştir. Eterin uzaklaştırılması için karışım çeker ocakta (Hedlab, Türkiye) vakum uygulanarak filtre edilmiş ve 1 gece vakum etüvünde (Nüve, Türkiye) bekletilmiştir. Ardından elde edilen toz karışım tekrar 15 mL DCM ile yıkanmış, sonrasında tekrar dietil eter ile yıkanıp vakum filtrasyondan geçirilmiştir. Daha sonra vakum etüvünde 1 gece tutularak kurutulmuştur.

3.1.2. Proton Nükleer Manyetik Rezonans (¹H-NMR) Analizi

Proton nükleer manyetik rezonans (¹H-NMR) spektroskopisi (Bruker, Almanya) PEG'in metakrilatlanması ile PEGDM'nin üretiminin gerçekleştiğini kanıtlamak amacıyla kullanılmıştır. Analiz, PEG ve PEGDM kloroform içinde 10 mg/mL konsantrasyonda çözüldükten sonra gerçekleştirilmiştir.

3.1.3. FTIR Analizi

Üretilen PEGDM'in kimyasal yapısı ve içerdiği fonksiyonel grupların varlığı 400-4000 cm⁻¹ dalga boyu aralığında toplam reflektansı azaltılmış Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi ile (ATR-FTIR) (Thermo Scientific Nicolet iS10, A.B.D.) belirlenmiştir.

3.2. PEGDM Hidrojel Üretimi ve Karakterizasyonu

PEGDM hidrojellerin elde edilmesi için gerçekleştirilen işlemler şu şekildedir: İlk olarak foto çapraz-bağlayıcı ajan olan Irgacure 2959[®], PBS (pH:7.4) içinde 55°C'de çözündürülerek (5 saatte) %0.1'lik (w/v) bir çözelti hazırlanmıştır. İnkübatörden çıkarılan karışım 5 dk vortekslenerek homojenize edilmiştir. Tüm bu işlemler gerçekleştirilirken çözeltinin ışığa maruz bırakılmamasına dikkat edilmiştir. Ardından PEGDM eklenerek %10, %15 ve %20 (w/v) olmak üzere 3 farklı polimer konsantrasyonunda çözeltiler elde edilmiştir. Elde edilen çözeltiler ayrı ayrı, 4 gözlü petri kaplarına her bir göze 80 µL gelecek şekilde aktarılmıştır. Daha sonra kültür kabı 5 cm mesafe ile 250 Watt güçteki UV cihazı (Tanses Technologies, UVT-200, Canada) kullanılarak UV ışığa maruz bırakılmıştır. Böylece çapraz bağlanma gerçekleşerek hidrojel yapıları elde edilmiştir. Çizelge 3.1'de hidrojel hazırlamak için uygun koşulları saptamak amacıyla yapılan çalışmalar listelenmiştir. Çizelgedeki değerler incelendiğinde %15 ve %20 (w/v) konsantrasyon ve 150 sn sürenin hidrojel eldesi için uygun olduğu bulunmuştur.

Çizelge 3.1. Fotopolimerizasyon için en uygun UV maruziyeti süresinin belirlenmesi.

Zaman (sn)	Polimer Konsantrasyonu (% w/v)		
	%10	%15	%20
30	Jel oluşumu gerçekleşmedi.	Jel oluşumu gerçekleşmedi.	Jel oluşumu gerçekleşmedi.
45	Jel oluşumu gerçekleşmedi.	Jel oluşumu gerçekleşmedi.	Jel oluşumu gerçekleşmedi.
60	Jel oluşumu gerçekleşmedi.	Jel oluşumu gerçekleşmedi.	Jel oluşumu gerçekleşmedi.
75	Jel oluşumu gerçekleşmedi.	Jel oluşumu gerçekleşmedi.	Jel oluşumu gerçekleşmedi.
90	Jel oluşumu gerçekleşmedi.	Jel oluşumu gerçekleşmedi.	Jel oluşumu gerçekleşmedi.
105	Jel oluşumu gerçekleşmedi.	Jel oluşumu gerçekleşmedi.	Jel oluşumu gerçekleşmedi.
120	Jel oluşumu gerçekleşmedi.	Jel oluşumu gerçekleşmedi.	Jel oluşumu gerçekleşmedi.
135	Jel oluşumu gerçekleşmedi.	Jel oluşumu gerçekleşmedi.	Jel oluşumu gerçekleşmedi.
150	Jel oluşumu gerçekleşmedi.	Jel oluştu.	Jel oluştu.
180	Jel oluşumu gerçekleşmedi.	Jel oluştu.	Jel oluştu.

3.2.1. Morfolojik Analizler

Taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile görüntülenecek hidrojeller, ilk olarak -20°C'de 1 gece dondurulmuş, ardından liyofilizatör (Christ, Almanya) ile -80°C'de kurutulmuştur. Daha sonra dondurularak kurutulmuş örneklerden bir bisturi yardımıyla uygun kesitler alınarak, kuru hidrojellerin yüzey ve gözenek yapıları taramalı elektron mikroskobu (SEM, FEI Quanta 200F, ABD) ile incelenmiştir. Bunun için örnekler, altın-paladyum ile kaplanarak iletken hale getirilmiştir. SEM görüntülerinin elde

edilmesinin ardından Image J yazılımı kullanılarak liyofilize edilmiş hidrojellerin ortalama gözenek boyutları hesaplanmıştır.

3.3.2. Su Tutma Kapasitesi Tayini

Tez çalışması kapsamında üretilen PEGDM hidrojellerinin dinamik su tutma kapasitelerinin ölçümleri, pH değeri 7.4 olan PBS ortamında gravimetrik tayin yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Yüzde 15 ve %20 (w/v) konsantrasyonda hazırlanan örnekler (n=3) belirli zaman aralıklarında şişme ortamdan uzaklaştırılmış, nemleri alınmış ve hassas terazide (Precisa 205 A SCS; ± 0.0001 g duyarlılık, İsviçre) ağırlık ölçümleri yapılmıştır. Ardından tekrar şişme ortamına konulmuştur. Ölçülen yaş ağırlık değerleri ve hidrojel kuru haldeki başlangıç ağırlığı Eşitlik 3.1’de yerlerine konularak “şişme oranı” hesaplanmıştır

$$\text{Şişme Oranı (Q)} = (\text{Şişmiş Ağırlık} - \text{Kuru Ağırlık}) / \text{Kuru Ağırlık} \quad (\text{Eşitlik 3.1})$$

3.3.3. Mekanik Analizler

Hidrojellerin sıkıştırma modülünün belirlenmesi için Texture Analizer (Stable Microsystems, İngiltere) mekanik test cihazının mukoadesyon probu ile her bir örneğe tek eksenli sıkıştırma kuvveti uygulanmıştır. Çapı 10.7 mm, yüksekliği 10 mm olan her bir örnek (n=3) için uygulanan sıkıştırma kuvveti 0.049 N yük ve 0.01 mm/sn sabit hızdaki başlıkla gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan hidrojeller analizden önce PBS (pH:7.4) içerisinde saklanmıştır.

3.3.4. Biyobozunurluk Tayini

Yürütülen tez çalışması kapsamında %15 ve %20 (w/v) konsantrasyonda hazırlanan PEGDM hidrojelleri PBS (pH:7.4) içinde 37°C’deki inkübatörde (Nüve EN 500, Türkiye) bekletilmiş ve belirli zaman aralıklarında ağırlıkları hassas terazi ile ölçülmüştür. Elde edilen ağırlık verilerinden bozunan hidrojel miktarı ve bozunma oranı hesaplanmıştır. Yüzde ağırlık kaybı ise Eşitlik 3.2’de verilen formül yardımıyla hesaplanmıştır. Burada, W_0 hidrojel örneğinin başlangıç ağırlığını ifade ederken, W_n belirli günlerde ölçülen ağırlıkları ifade etmektedir.

$$(\%)\text{Ağırlık Kaybı} = [(W_0 - W_n) / W_0] \times 100 \quad (\text{Eşitlik 3.2})$$

3.4. *In vitro* Hücre Kültür Çalışmaları

Tez çalışmasının bu bölümünde beyaz adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin (AKH), 2B ve 3B hücre kültürlerinde kahverengi adipoz dokuya farklılaştırılması amacıyla gerçekleştirilen çalışmalar ayrıntılarıyla açıklanmıştır. Bunun için 2B kültürlerde mezenkimal kök hücreler çok gözlü hücre kültür kaplarında, kahverengi adipoz doku farklılaşması için hazırlanan ortamda kültüre edilmiştir. Üç boyutlu hücre kültürlerinde ise kök hücreler, üretilen PEGDM hidrojelleri içine foto çapraz-bağlanma prosesi uygulanarak enkapsüle edilip farklılaştırma ortamında kültüre edilmiştir. Hem 2B hem de 3B kültürlerde yapılan analizlerle hücrelerin farklılaşma durumları belirlenmiştir.

3.4.1. Hücre Stoklarının Hazırlanması

In vitro hücre kültürü çalışmalarında kullanılan AKH'ler 8 aylık, *Wistar albino* sıçanların derialtı beyaz adipoz dokularından izole edilen hücrelerdir. Tez kapsamında hücre izolasyonu yapılmamış, hücre bankamızdaki mevcut stoklar kullanılmıştır. Kullanılan hücreler Hacettepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 52338575-59 sayılı kararı ile izole edilip hücre bankamızda saklanan hücrelerdir. Çalışma kapsamında 6. pasaja kadar %15 (v/v) FBS, %1 L-glutamin (w/v), %0.4 penisilin-streptomisin, %0.2 (v/v) amfoterisin-b ve %0.2 (v/v) gentamisin (v/v) içeren α -MEM'den oluşan büyüme ortamında çoğaltılan hücreler kullanılmıştır.

3.4.2. 2B Hücre Kültürü Çalışmaları

İki boyutlu hücre kültürü çalışmaları kapsamında AKH'ler kahverengi adipoz dokuya farklılaştırma ortamında, çok gözlü hücre kültür kaplarında kültüre edilmiştir. Kontrol grubu olarak ise %15 (v/v) FBS, %1 L-glutamin, (v/v) %0.4 penisilin-streptomisin (v/v), %0.2 gentamisin (v/v) ve %0.2 amfoterisin-B içeren DMEM-High glikoz besi ortamı kullanılmıştır. Farklılaştırma ortamı ise kontrol kültür ortamı içerisinde 0.5 M deksametazon, 125 nM indometazin, 250 μ M IBMX, 850 nM sığır insülini, 1 μ M roziglitazone, 1 nM tiriyodotironin (T3), %1 (v/v) L-glutamin (v/v) %0.4 penisilin-streptomisin (v/v), %0.2 gentamisin (v/v) ve %0.2 amfoterisin-B'den oluşturmaktadır. Tez çalışması kapsamında hücrelerin kültüre edildiği besi ortamları ve bu ortamları oluşturan bileşenler Çizelge 3.2'de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Hücrelerin kültüre edildiği besi ortamları ve bu ortamları oluşturan bileşenler.

Büyüme Ortamı	%15 FBS, %1 L-glutamin, %0.4 penisilin-streptomisin, %0.2 amfoterisin-b ve %0.2 gentamisin içeren α -MEM besi ortamı
Kontrol Ortamı	%15 FBS, %1 L-glutamin, %0.4 penisilin-streptomisin, %0.2 amfoterisin-b ve %0.2 gentamisin içeren DMEM-high glikoz besi ortamı
Farklılaştırma Ortamı	%15 FBS, %1 L-glutamin, %0.4 penisilin-streptomisin, %0.2 gentamisin, %0.2 amfoterisin-b, 0.5 M deksametazon, 125 nM indometazin, 250 μ M IBMX, 850 nM sığır insülini, 1 μ M rozigitazone, 1 nM tiriiyodotironin (T3) içeren DMEM-high glikoz besi ortamı

Soğuğa maruziyetin AKH'lerin kahverengi adipositlere farklılaşması üzerine etkisini incelemek amacıyla gün aşırı, 15 dk soğuk indüksiyonu (16°C) uygulanan bir deney grubu daha oluşturulmuştur. Soğuğa maruz bırakılan bu gruptaki hücreler de farklılaşma ortamında kültüre edilmiştir. TCPS üzerindeki hücre kültür çalışmaları için hücre ekim yoğunluğu 12,000 hücre/cm² olacak şekilde ayarlanmıştır. MTT analizleri ve RT-PCR analizleri için 24 gözlü kültür kapları, Oil Red O boyamaları için 12 gözlü kültür kapları ve immünohistokimyasal analizler için 4 gözlü petri kapları kullanılmıştır. Stok haline getirilerek hazırlanan hücreler ekim öncesinde hemositometre yardımıyla sayılmış ve ardından ekim gerçekleştirilmiştir. Kahverengi adipogenik farklılaşma için kök hücreler hücre kültür kabı üzerinde %90-100 yoğunluğa ulaştığında besi ortamları farklılaşma ortamı ile değiştirilmiştir. Kahverengi adipogenik farklılaşma çalışması 35 gün boyunca sürdürülmüştür. Kök hücreler kahverengi adipositlere farklılaşırken sitoplazmalarında küçük ve çok sayıda yağ damlacıkları oluşmaktadır. Oluşan yağ damlacıkları kültürün belirli günlerinde hem optik mikroskopta, hem de Oil Red O boyaması yapılarak 7., 14., 21., 28. ve 35. günlerde görüntülenmiştir. Ayrıca 21. ve 35. günlerde toplanan örneklerle gerçekleştirilen RT-PCR, immünohistokimyasal ve immünohistokimyasal analizlerle kahverengi adiposit farklılaşması analiz edilmiştir.

3.4.3. 3B Hücre Kültürü Çalışmaları

Tek tabaka olarak polistiren hücre kültür kaplarında çoğaltılan AKH'ler tripsinizasyon işlemi ile yüzeyden kaldırılmıştır. Ardından hücreler FBS içeren α -MEM besi ortamı ile

toplanmış ve 5 dk 1,000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Santrifüj işleminden sonra süpernatant atılmış, kalan hücre pelleti hidrojel çözeltisi ile tekrar süspansiyon edilmiştir. Hemositometre ile sayılan hücrelerin konsantrasyonu 10^4 hücre/ μ L hidrojel çözeltisi olacak şekilde ayarlanmıştır. Hidrojel çözeltileri %0.1 Irgacure 2959[®] içeren steril fosfat tamponu (PBS, pH:7.4) içinde PEGDM polimeri çözülürken %20 (w/v) konsantrasyonda hazırlanmıştır. Polimer konsantrasyonunun %20 olarak seçilmesinin nedeni yapılan canlılık analizlerine göre, %20 konsantrasyonun %15 konsantrasyona göre hücre canlılığını daha çok desteklediğinin görülmesidir. Hücreler hazırlanan hidrojel çözeltisi içerisinde homojen bir şekilde süspansiyon edilmiştir. Ardından hücre-hidrojel çözeltisinden vakit kaybetmeden 80'er μ L alınarak 4 gözlü polistiren petri kaplarına aktarılmış ve 5 cm mesafe ile 150 sn boyunca UV ışığa maruz bırakılarak foto çapraz-bağlanmayla jelleşme sağlanmıştır. Böylece hücreler hidrojel içine enkapsüle edilmiştir. Ardından jelleşen hidrojel-hücre yapıları steril bir spatül yardımıyla 4 gözlü petri kaplarından alınıp 12 gözlü hücre kültür kaplarına aktarılmıştır. Üzerlerine 2'şer mL kahverengi adipogenik farklılaşma ortamı eklenmiştir. Enkapsüle edilen hücreler 5 hafta boyunca farklılaşma ortamında kültüre edilmiştir. Buna ek olarak soğuk indüksiyonunun 3B hücre kültürlerindeki kök hücrelerin farklılaşmasına olan etkisinin incelenmesi için, gün aşırı 1 saat soğuk indüksiyonu (16°C) uygulanan bir deney grubu daha oluşturulmuştur. Tüm grupların farklılaşma ortamları gün aşırı yarı yarıya olacak şekilde değiştirilmiştir. Çizelge 3.3'te 2B ve 3B hücre kültürlerindeki deney grupları gösterilmektedir.

Çizelge 3.3. *In vitro* hücre kültür çalışmalarının gerçekleştirildiği deney grupları.

	2B Hücre Kültürü	3B Hücre Kültürü
Grup 1	Farklılaştırma ortamında 35 gün kültüre edilmiştir.	Farklılaştırma ortamında 35 gün kültüre edilmiştir. Üç boyutlu kültür için kontrol grubudur.
Grup 2	Farklılaştırma ortamında kültüre edilirken soğuk indüksiyonu (gün aşırı, 16°C'de 15 dk) uygulanmıştır. Kültür süresi 35 gündür.	Farklılaştırma ortamında kültüre edilirken soğuk indüksiyonu (gün aşırı, 16°C'de 1 sa) uygulanmıştır. Kültür süresi 35 gündür.
Grup 3	Büyüme ortamında kültüre edilen 2B kültür için kontrol grubudur. Kültür süresi 35 gündür.	—————

3.4.4. Hücre Kültürü Analizleri

Bu bölümde 2B ve 3B hücre kültürlerinde gerçekleştirilen hücre canlılık analizleri (canlı-ölü boyama, MTT analizleri), taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizi, gen ekspresyonu (RT-PCR) analizleri, Oil red O boyama analizleri ile immünohistokimyasal ve immünohistokimyasal analizler ayrıntılı bir şekilde açıklanmıştır.

3.4.4.1. Hücre Canlılık Analizleri

Canlı-Ölü Boyama

Canlı hücreler yaygın olarak hücre içi esteraz aktivitesi göstermektedir. Esteraz aktivitesi sonucunda floresan özellik göstermeyen ve hücre zarından geçebilen Calcein AM, Calcein'e dönüşür ve floresan özellikte yeşil renk gösterir. Ethidium homodimer-1 (Ethd-1) ise ölü hücrelerin hücre zarındaki hasar sonucunda hücre içine girerek hücre çekirdeğindeki DNA'ya bağlanır. Böylece ölü hücrelerin kırmızı renkte görüntülenmesine neden olur [68].

PEGDM hidrojellerinin hücre canlılığı üzerindeki etkisini incelemek için 3B kahverengi adipogenez çalışmasına başlamadan önce, canlı-ölü boyama analizleri gerçekleştirilmiştir. Bunun için canlı-ölü analiz kiti kullanılmıştır. Hücre yoğunluğu 10^4 hücre/ μ L hidrojel olmak üzere %15 ve %20 (w/v) konsantrasyondaki PEGDM hidrojel çözeltileri ile hücre bankamızdan temin edilen L929 fibroblastik hücreleri süspanse edilmiştir. Hücre-hidrojel çözeltileri 4 gözlü petri kabına her göze 80'er μ L olacak şekilde aktarılmış, ardından 150 sn UV ışığa (Tanses Technologies, UVT-200, Canada) maruz bırakılarak jelleştirilmiştir.

Canlı-ölü boyama enkapsülasyondan sonraki 1., 2. ve 3. günlerde gerçekleştirilmiştir. Bunun için ilk olarak L929 hücreleri ile yüklü %15 ve %20 (w/v) konsantrasyondaki hidrojeller Ca^{+2} ve Mg^{+2} içeren fosfat tuzu tamponu (DPBS+, pH:7.4) ile 3 kez 5'er dk yıkanmıştır. Daha sonra 2 μ M Calcein AM ve 4 μ M Ethd-1 çözeltileri içinde 30 dk $37^\circ C$ 'deki etüvde inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra 3 kere DPBS+'te 5'er dk yıkanmıştır. Görüntüleme için hidrojellerin üzerine steril DPBS+ eklenmiş ve floresan ataçmanlı mikroskopta (Olympus IX71, Japonya) görüntülenmiştir. Alınan floresan görüntülerinden Image J programı kullanılarak, her iki grup için de "% canlılık" hesaplanmıştır. Bu veriler yardımıyla hücre canlılığı için en uygun polimer

konsantrasyonu seçilerek (%20 (w/v)) AKH'ler ile 3B kahverengi adipogenez çalışması gerçekleştirilmiştir.

MTT Analizleri

Hem 2B hem 3B kültürlerdeki hücrelerin canlılıklarının ve mitokondriyal aktivitelerinin belirlenmesi için kültür sürelerinin belirli zamanlarında MTT analizleri gerçekleştirilmiştir. Canlı hücrelerin mitokondriyal aktivitesi sonucunda sarı renkli MTT çözeltisi suda çözünmeyen mor renkli formazan kristallerine dönüşmektedir. Formazan kristalleri çözüldüğünde elde edilen mor renkli çözeltinin absorbansı hücre canlılığıyla doğru orantılıdır. Kahverengi adipogenez çalışmasında, 2B hücre kültüründeki MTT analizi için öncelikle hücrelerin yüzeyindeki besin ortamı uzaklaştırılmış ve yerine her bir göz için 600 µL serumsuz besin ortamı ve 60 µL MTT (2.5 mg/mL steril PBS, pH:7.4) çözeltisi eklenmiştir. Hücreler 37°C'deki CO₂ etüvünde 3 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra her bir göze 400 µL 0.04 M HCl içeren izopropanol çözeltisi eklenerek formazan kristalleri çözdürülmüştür. Oluşan mor renkli çözeltiden 200'er µL alınmış ve mikropilaya okuyucuya aktarılmıştır. Referans 690 nm iken, 570 nm'de mikropilaya okuyucu kullanılarak (Asys UVM 340, Avusturya) optik yoğunluk değerleri belirlenmiştir.

Üç boyutlu hücre kültürleri için ise ilk olarak %15 ve %20 (w/v) konsantrasyonlarda hazırlanan PEGDM hidrojellerinin hücre canlılığına olan etkisinin incelenmesi için L929 hücreleri enkapsüle edilerek 3 gün boyunca MTT analizleri gerçekleştirilmiştir. Bu analiz sonuçlarına göre en uygun polimer konsantrasyonu seçilmiş ve 3B kahverengi adipogenez çalışması buna göre yürütülmüştür. Hem sitotoksikite hem de sonrasında gerçekleştirilen kahverengi adipogenez çalışması için hücre enkapsüle edilmiş hidrojel örneklerinin besin ortamları uzaklaştırılmış ve 800 µL serumsuz besin ortamı ile 80 µL MTT çözeltisi eklenip 37°C'deki CO₂ etüvünde 3 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından her bir hidrojelin üzerine 535 µL 0.04 M HCl içeren izopropanol çözeltisi eklenerek formazan kristalleri çözdürülmüştür. Ardından 2B kültürde olduğu gibi 200'er µL alınarak 690 nm referans iken, 570 nm'de mikropilaya okuyucu kullanılarak optik yoğunluk değerleri belirlenmiştir.

3.4.4.2. Morfolojik Analizler

Üç boyutlu kahverengi adipogenez çalışması için PEGDM hidrojelini içine enkasüle edilen AKH'lerin jel içindeki morfolojilerinin belirlenebilmesi için kültürün 21. ve 35. günlerinde SEM analizi yapılmıştır. Örnekler hazırlanırken ilk olarak hücre enkasüle edilmiş hidrojellerin üzerlerindeki besi ortamı uzaklaştırılmıştır. Ardından örnekler 2 defa 5'er dk DPBS+ (pH:7.4) ile yıkanmıştır ve sonrasında fiksasyon işlemine geçilmiştir. Bunun için hidrojellerin üzerine 1'er mL %2.5'lik (v/v) glutaraldehit çözeltisi eklenmiş ve 30 dk karanlıkta bekletilmiştir. Fikse edilen örnekler analiz edilene kadar DPBS+ içinde +4°C'de saklanmıştır. Analiz öncesinde örnekler -20°C'de dondurulmuş ve ardından -80°C'de 1 gece liyofilizatörde kurutulmuştur. SEM analizi için örnekler altın-paladyum ile kaplanarak görüntülenmiştir.

3.4.4.3. Gen Ekspresyonu Analizleri

Hem 2B hem de 3B kültürde üreyen ve farklılaşan hücrelerin PPAR- γ , UCP-1 ve CIDEA genlerinin bağıl gen ifadeleri gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) analizi ile belirlenmiştir.

İki boyutlu kültürlerdeki RT-PCR aktivitesi için kültürün belirli günlerinde örnekler toplanmış ve steril mikrotüpler içine aktararak -80°C'de muhafaza edilmiştir. Daha sonra örnekler analiz öncesinde oda sıcaklığında çözdürülmüş ve üzerlerine 200 μ L Trizol (Invitrogen, ABD) eklenmiştir. Trizol ile muamale edilen örnekler vektorslenmiş ve RNEasy kit, (Qiagen, ABD) kullanılarak RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. İzolasyon işleminden sonra elde edilen RNA'nın saflaştırılma oranı ve konsantrasyonu Nanodrop (Thermoscientific 2000c, ABD) ile analiz edilmiştir. Daha sonra kit için üretici firma tarafından önerilen protokol doğrultusunda, programlanabilir termal dengeleyici cihazında (Life Technologies, ABD) yüksek kapasite cDNA reverse transkripsiyon kiti kullanılarak cDNA sentezlenmiş ve ardından RT-PCR analizleri gerçekleştirilmiştir. Analiz SolisBioDyne 5 Hot FirePol[®], qPCR Mix Plus ve EvaGreen[®] kitleri kullanılarak, LightCycler[®] NanoInstrument (Roche, Almanya) cihazında yürütülmüştür. Analiz için "housekeeping gen" olarak GAPDH kullanılmıştır. PPAR- γ , UCP-1 ve CIDEA genleri için primer dizileri (Oligomer, Türkiye) firmasından temin edilmiştir. Çizelge 3.4'te kullanılan primer dizileri verilmiştir.

Çizelge 3.4. 2B ve 3B kahverengi adipogenez çalışmalarının RT-PCR analizlerinde kullanılan primer dizileri.

Gen	Forward Primer	Reverse Primer
GAPDH	GTGCTGAGTATGTCGTGG	GGGAGTTGTCATATTTCTCGT
UCP-1	GTGAAGGTCAGAATGCAAGC	AGGGCCCCCTTCATGAGGTC
CIDEA	TTAAGGAGTCTGCTGCGGTT	ACATAAGCGCCCGCATAAAC
PPAR- γ	TCAAAAGCCTGCGGAAGCCC	TGGGCGGTCTCCACTGAGAATAA

3.4.4.4. Oil Red O ile Lipit Damlacıklarının Boyanması

Oil Red O, trigliseritlerin ve lipitlerin boyanmasında kullanılan bir diazo boya olan lizokromdur. Oil Red O ile boyamanın ardından lipid damlacıkları kırmızı renkte görüntülenir.

Stok çözelti: İki yüz mL izopropanole 0.7 gram Oil Red O eklenerek hazırlanmıştır. Hazırlanan çözelti gözenek boyutu 0.22 μ m olan filtreden geçirilmiş ve 4°C’de muhafaza edilmiştir.

Çalışma çözeltisi: İki mL distile su ve 3 mL Oil red O stok çözeltisi karıştırılıp, oda sıcaklığında 20 dk bekletilmiş ve ardından gözenek boyutu 0.22 μ m olan filtreden geçirilerek hazırlanmıştır.

Fiksasyon: Boyama yapılacak örnekler üzerindeki ortam tamamen uzaklaştırılmıştır. 2B kültür için; hücrelerin yüzeyi 2 dk PBS ile yıkanmıştır. PBS içinde hazırlanmış %10 (v/v) formalin hücrelerin yüzeyini kaplayacak kadar eklenmiş ve 30 dk oda sıcaklığında bekletilmiştir. Fiksasyon işleminden sonra, formalin uzaklaştırılmış ve hücreler distile su ile 3 kez 2’şer dk yıkanmıştır. Üç boyutlu kültür için ise; besi ortamı hidrojel örneklerinden uzaklaştırılmıştır ve örnekler 2 dk PBS ile yıkanmıştır. Ardından örneklerin üzerini kaplayacak kadar %4 (w/v) paraformaldehit eklenmiş ve +4°C’de 16 saat tutularak hücreler fikse edilmiştir. Daha sonra paraformaldehit örneklerin üzerinden uzaklaştırılmış ve örnekler 3 kez 2’şer dk distile su ile yıkanmıştır.

Oil Red O ile boyama: İki boyutlu kültür için; distile su içerisinde hazırlanmış %60 (v/v) izopropanol yıkama işleminden sonra örneklerin üzerine eklenmiştir ve örnekler

oda sıcaklığında 5 dk bekletilmiştir. Daha sonra izopropanol çekilmiş ve hazırlanan Oil red O çözeltisi örneklerin üzerine eklenip 7 dk inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra Oil red O çözeltisi çekilmiş ve örnekler 3 kez 5 dk distile su ile yıkanmıştır. Ardından örneklerin üzerine tekrar 1'er mL distile su eklenmiş ve optik mikroskop altında boyanan lipid damlacıkları görüntülenmiştir. Üç boyutlu kültür için ise, fikse edilen hidrojel örneklerinden kriyostat (Leica CM 3050, Almanya) kullanılarak 20 µm kalınlığında kesitler alınmıştır. Lamel üzerine aktarılan kesitler 2B kültürlerine uygulanan protokoldeki gibi Oil red O ile boyanmıştır. Boyanan örnekler optik mikroskop yardımıyla görüntülenmiştir.

3.4.4.5. Hematoksilen-Eozin ile Boyama

Hidrojel içine enkapsüle edilerek 3B ortamda kültüre edilen AKH'lerin hidrojel içindeki yoğunluğunun ve dağılımının görüntülenmesi amacıyla Hematoksilen-Eozin (H&E) ile histolojik boyama yapılmıştır. Bunun için 3B kültürlerin 21. gününde alınan örnekler kullanılmıştır. Örnekler ilk olarak %4 paraformaldehit (w/v) çözeltisi içinde 4°C'de 16 saat bekletilerek fikse edilmiştir. Fiksasyonun ardından örnekler alkol tespiti ile dehidre edilmiştir. Dehidrasyon işlemi için ise örnekler histolojik kasetler içine yerleştirilmiş ve 30'ar dk sırasıyla %70, iki kez %95 ve iki kez %100 (v/v) etanol serilerinden geçirilmiştir. Ardından iki kez ksilen içerisinde 30 dk bekletilmiştir. Dehidrasyon basamağının ardından örnekler parafine gömülmüştür. Ardından -20°C'de parafin sertleştikten sonra mikrotom (Leica Biosystems, Almanya) kullanılarak 8 µm kalınlığında kesitler alınmıştır. Kesitler su banyosuna alınarak lamellerin üzerinde aktarılmıştır. Kesitleri içeren lameller deparafinize edilmiş ve ardından örneklerle H&E boyama protokolü uygulanmıştır. Hematoksilen, nükleik asitleri ve pH değeri yüksek olan hücre çekirdeğini koyu mavi-mor renkte boyar. Eozin ise pembe renklidir ve non-spesifik olarak proteinleri boyamaktadır. H&E boyama protokolü uygulanmış tipik bir dokuda hücre çekirdekleri mavi tonlarda görüntülenirken, sitoplazma ve hücre dışı maddeler pembenin farklı tonlarında görüntülenir [69].

3.4.4.6. İmmünohistokimyasal ve İmmünohistokimyasal Analizler

Hücrelerin 35 gün boyunca 2B ve 3B koşullarda kahverengi adipogenik ortamda kültüre edilmesinin ardından, 21. ve 35. günlerde toplanan örneklerin farklılaşma durumları immünohistokimyasal ve immünohistokimyasal analizlerle gösterilmiştir. Bunun için

UCP-1 ve PPAR- γ proteinleri floresan mikroskop altında görüntülenmiştir. 2B kültür çalışmasında immünohistokimyasal analiz için hücreler, her bir gözü 1 cm çapında olan 4 gözlü petri kaplarına ekilmiştir. 3B kültür için ise her bir örnek 8×10^5 hücrenin 80 μ L PEGDM hidrojel içine enkapsüle edilmesiyle oluşturulmuştur. Analizde kullanılan primer ve sekonder antikorlar Çizelge 3.5'te verilmiştir.

Çizelge 3.5. İmmünohistokimyasal ve immünohistokimyasal analizlerde kullanılan primer ve sekonder antikorlar.

Birincil Antikor	Üretildiği Canlı	Spesifik Olduğu Canlılar	Seyreltme Oranı	İkincil Antikor	Seyreltme Oranı
Anti-UCP1 (Abcam, ab10983)	Tavşan	Fare, sıçan, tavşan, sincap,	1:500	Anti-tavşan IgG (H+L), Alexa Fluor 488 (Thermo Fisher, A27034)	1:1000
Anti-PPAR γ (Thermo Fisher, PA3-821A)	Tavşan	İnsan, fare, sıçan	1:200	Anti-tavşan IgG (H+L), Alexa Fluor 488 (Thermo Fisher, A27034)	1:1000

2B Kültür: Örnekler üzerinden hücre kültür ortamı çekilmiş ve örnekler 3 defa PBS ile yıkanmıştır. Daha sonra her bir örneğe %10 formalin eklenmiş ve 15 dk oda sıcaklığında bekletilerek örnekler fikse edilmiştir. Fiksasyon işleminden sonra tekrar 3 defa PBS ile yıkama gerçekleştirilmiştir. Ardından her bir göze 100 μ L PBS ile hazırlanmış %1 Triton-X eklenip 10 dk oda sıcaklığında bekletilerek geçirgenlik sağlanmıştır. Daha sonra gözler üzerine 100'er μ L PBS ile hazırlanmış %3 (w/v) sığır serum albümini (BSA) çözeltisi eklenip 30 dk bekletilerek bloklama işlemi gerçekleştirilmiştir. PPAR- γ antikorunu 1:200 oranında seyreltilmiş ve her bir örnek üzerine 100 μ L olacak şekilde eklenerek 1 sa oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. UCP-1 antikorunu ise 1:500 oranında seyreltilmiş ve örnekler üzerine 100'er μ L olacak şekilde eklenip 4°C'de, kurumalarını önlemek için nemli ortamda 16 sa inkübasyona bırakılmıştır. Primer antikorlarla inkübasyonun ardından örnekler 3 defa PBS ile yıkanmıştır. Daha sonra 1:1000 oranında DAPI ve Alexa Fluor 488 konjuge anti Rabbit IgG ikincil antikor 1:1000 oranında PBS içinde hazırlanmış ve örnekler üzerine eklenmiştir. Ardından 2 saat oda sıcaklığında, ışıktan korunarak inkübe edilmiştir.

İnkübasyonun ardından örnekler 3 kez PBS ile yıkanmıştır. Sonrasında örnekler üzerine kapatma ortamı (Fluoromount medium, Sigma, Almanya) eklenmiş ve üzerleri 10 mm çaplı lameller ile kapatılmıştır. Floresan ataçmanlı Olympus IX71 mikroskobu ile immünofloresan görüntüler elde edilmiştir.

3B Kültür: Hidrojel örneklerinin üzerinden hücre kültür ortamları uzaklaştırılmış ve 3 defa 5 dk PBS (pH:7.4) ile yıkanmıştır. Yıkama işleminin ardından fiksasyon için örnekler %4 paraformaldehit ile +4°C'de 16 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra örnekler tekrar 3 defa 5 dk PBS (pH:7.4) ile yıkanmıştır. Fikse edilen örnekler daha sonra antijen geri alımı işlemi uygulanmıştır. Fikse edilmiş pek çok dokuda immünohistokimyasal boyamalardan önce bir antijen geri alımı aşaması gereklidir. Fiksasyon sırasında çapraz bağlantı proteinleri ve antijenik bölgeler arasında metilen köprüler oluşur. Antijen geri alımı işlemi ile bu metilen köprüler kırılır ve antijenik bölgeler açığa çıkar. Böylece antikorların bağlanmasına izin verilir. Antijen geri alımı için sıklıkla iki yöntem uygulanmaktadır. Bunlardan biri ısıyla indüklenmiş epitop gerilimi (heat induced epitope retrieval, HIER) iken, diğeri enzimatik gerilim yöntemidir. Enzimatik antijen geri alımı yönteminde kesitin morfolojisinin zarar görebilme riski vardır. Bu yüzden enzim konsantrasyonu ve muamelesi önceden test edilmelidir. Isıyla indüklenmiş epitop geri alımı yöntemi ise genellikle basınçlı pişirici veya mikrodalga enerjisi gibi yöntemler kullanılarak gerçekleştirilir. Bu yöntem için sıklıkla kullanılan 3 farklı tampon çözelti vardır. Bunlar 10 mM sodyum sitrat tamponu (pH:6), Tris-EDTA (pH:9) veya EDTA (pH:8) olabilmektedir.

Tez kapsamında yapılan çalışma için 10 mM trisodyum sitrat tamponu ile mikrodalga enerjisinden yararlanılmıştır. İlk olarak 2.94 g trisodyum sitrat (dihidrat) tartılıp 1 L distile su içinde çözdürülmüş, ardından 1 N HCl ile pH 6'ya ayarlanmış ve 0.5 mL Tween 20 eklenerek çözelti hazırlanmıştır. Fikse edilen örnekler bu çözelti içine aktarılmış ve örnekler mikrodalga cihazı içinde 20 dk boyunca 98°C'de 850 Watt enerji uygulanmıştır. Mikrodalga işleminin ardından örnekler çözeltilerden çıkarılmış ve distile suyla yıkanmıştır. Böylece antijen geri alımı işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu işlemin ardından 2B kültürde uygulanan işlemler 3B kültürler için de tekrarlanarak immünohistokimyasal boyamalar gerçekleştirilmiştir. UCP-1 ve PPAR- γ antikorlarının varlığı lazer taramalı konfokal mikroskop kullanılarak görüntülenmiştir.

3.4.5. İstatistiksel Analizler

Tez çalışması kapsamında elde edilen veriler Graph-Pad Software InStat yazılımı kullanılarak istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Deneysel veriler üç paralel şekilde elde edilmiş ve \pm standart sapma değerleriyle birlikte sunulmuştur. Deney gruplarının istatistiksel olarak karşılaştırılması tek yönlü varyans analizi (ANOVA) yöntemiyle *Tukey-Kramer Multiple Comparison Test* kullanılarak gerçekleştirilmiştir ve *p*-değerinin 0.05'den az olduğu veriler anlamlı kabul edilmiştir.

4. DENEYSEL SONUÇLAR ve TARTIŞMA

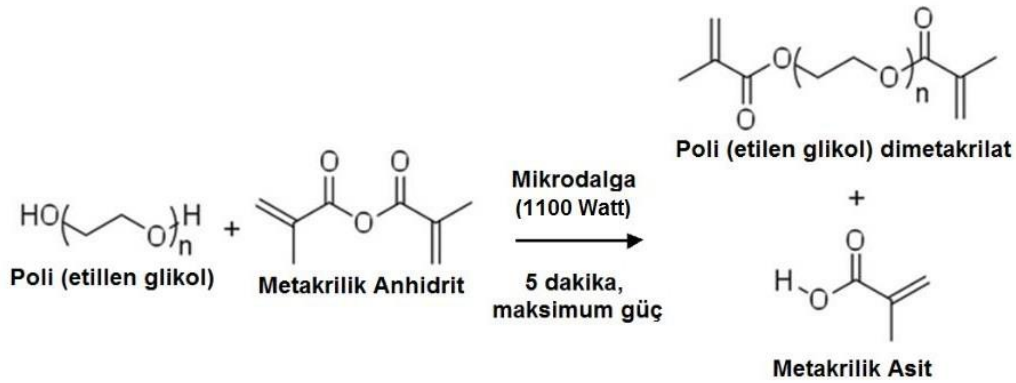
Tez çalışmasının bu bölümünde ilk olarak kahverengi adipoz doku mühendisliği çalışmaları için sentezlenen PEGDM hidrojellerinin üretimi ve karakterizasyonuna ait sonuçlar sunulmuş ve tartışılmıştır. Ardından, hücre kültür kapları üzerinde gerçekleştirilen 2 boyutlu ve PEGDM hidrojel ile gerçekleştirilen 3 boyutlu hücre kültürü çalışmalarında AKH'lerin kahverengi adipogenik farklılaşmasıyla elde edilen deneysel bulgulara yer verilmiştir. Hücre kültür çalışmalarında hücrelerin canlılık analizleri, farklılaşma davranışları ve soğuk indüksiyonunun 2B ve 3B hücre kültürlerinde kök hücrelerin kahverengi adipositlere farklılaşmalarına olan etkisi değerlendirilmiştir.

4.1. PEGDM Üretimi ve Karakterizasyonu

PEG biyo inert özellikte bir biyopolimerdir. Ancak biyoaktif hale getirilmesi için kolaylıkla modifiye edilebilmektedir. Metakrilat gruplarıyla fonksiyonelleştirilen PEG'den elde edilen hidrojel doku iskeleleri daha dayanıklı ve kararlı yapıdadır. Fonksiyonel poli(etilen glikol dimetakrilat) (PEGDM) hidrojeli uzun süreli doku mühendisliği uygulamaları için avantajlı olup çeşitli araştırma grupları tarafından başarıyla kullanılmıştır [13, 14, 63, 67, 70]. Sunulan tez çalışması kapsamında hızlı ve çevre dostu bir yöntem olan mikrodalga enerjisi kullanılarak PEGDM sentezlenmiştir. Geleneksel yöntemle sentezlenen PEGDM, PEG'in diklorometan içinde metakriloil klorür ve trietilamin ile reaksiyona sokulmasıyla üretilir [71, 72]. Reaksiyon, gece boyunca veya 24 saat süresince oda sıcaklığında gerçekleşir. Dietil eter içinde çöktürme ve ardından toplama basamakları reaksiyon süresini 4 güne kadar uzatabilir. Bu sentez yöntemi fazla sayıda kimyasal sentez ekipmanı gerektirmektedir. Ayrıca nispeten yüksek miktarlarda ve saflıkta reaktif ve çözücü kullanımına ihtiyaç duyulduğundan çevre dostu değildir. Geleneksel olarak gerçekleşen termal reaksiyonda enerji; konveksiyon, iletim veya radyasyon yoluyla malzemeye aktarılır. Bu şekilde enerji transferleri, malzemenin yüzeyinden ısının aktarılmasına dayanır, bu da homojen olmayan ısı aktarımına yol açar. Homojen olmayan ısı aktarımı malzeme üzerinde yan reaksiyonların gerçekleşmesine neden olabilir. Ancak geleneksel yöntem alternatif olarak gerçekleştirilen mikrodalga enerjisi ile PEG'in metakrilatlanmasında enerji, moleküler etkileşim yoluyla elektromanyetik alanda doğrudan malzemeye iletilir ve

bölgesel reaksiyon kinetiğini artırır. Bu da reaksiyon süresinin önemli ölçüde kısalmasına neden olur [13, 14].

PEG'in mikrodalga desteği ile fonksiyonelleştirilmesi işleminde polimer zincirlerinin terminal grupları metakrilat gruplarına bağlanır. Bu reaksiyonda, PEG'in terminal alkol grupları, karboksil grubu oluşturmak üzere metakrilik anhidridin karbonil atomlarından biriyle reaksiyona girer. Bu metot daha kısa reaksiyon süresi ve sadece yan ürün artımı için görece az miktarda çözücü kullanımı gerektirdiği için çevre dostu ve ekonomik kabul edilir [14]. Şekil 4.1'de PEG'in metakrilatlanması sırasında gerçekleşen kimyasal reaksiyon gösterilmiştir. Reaksiyon sonucunda ana ürün olarak PEGDM ve yan ürün olarak metakrilik asit ortaya çıkar. Çalışma kapsamında sentezlenen PEGDM için yukarıda bahsedilen avantajları barındırması bakımından mikrodalga destekli sentez reaksiyonu tercih edilmiştir.



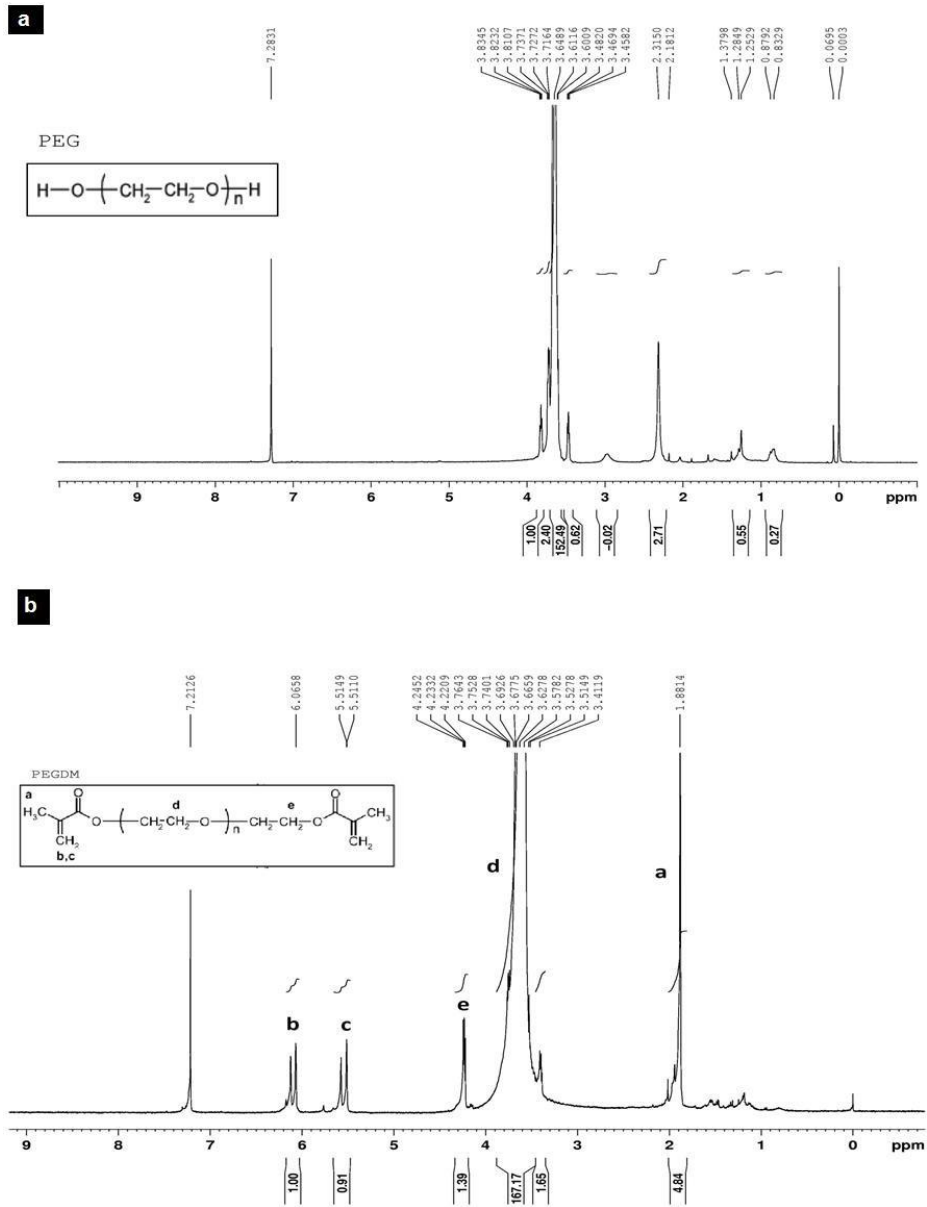
Şekil 4.1. PEG'in metakrilik anhidrit ile mikrodalga enerjisi kullanılarak fonksiyonelleştirilmesiyle PEGDM sentezi.

Tez kapsamında PEGDM sentezinde Van Hove ve arkadaşlarının geliştirdiği sentez yöntemi [13] kullanılmış olup reaksiyon basamaklarında herhangi bir değişiklik yapılmamıştır. Mikrodalga cihazında (1100 Watt güç, 5 dk) gerçekleştirilen reaksiyonda kullanılan PEG oranı %28.5 (w/v) iken MA oranı %14.29 (v/v)'dur.

Sentezlenen PEGDM'in metakrilatlanma derecesinin belirlenmesi için ¹H-NMR analizi, içeriğindeki fonksiyonel grupların belirlenmesi için ise FTIR analizleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen bulguların sentezlenen PEG'in literatüre uygun şekilde fonksiyonelleştirildiğini destekler nitelikte olup olmadığı aşağıda tartışılmıştır.

4.1.1. Proton Nükleer Manyetik Rezonans ($^1\text{H-NMR}$) Analizi

Proton nükleer manyetik rezonans analizi ($^1\text{H-NMR}$), bir kimyasal reaksiyonun verimliliğini ve doğruluğunu değerlendiren en yaygın analitik tekniklerden biridir. Spekturumdaki her bir pikin altındaki alan, numunedeki o protonun bağıl seviyeleri ile orantılıdır ve örnekteki ürün ve reaktant oranlarının belirlenmesine izin verir [14]. Şekil 4.2’de PEG’in ve ardından metakrilatlanarak fonksiyonelleştirilmiş olan PEGDM’in $^1\text{H-NMR}$ analizlerinden elde edilen spektrumlar verilmiştir.



Şekil 4.2. PEG (a) ve PEGDM'in (b) $^1\text{H-NMR}$ spektrumları.

Metakrilat grubundaki metil protonları (3H) $^1\text{H-NMR}$ spektrogramunda $\delta=1.8-2.1$ ppm aralığında; metil grubunun protonları (2H) ise $\delta=5.4-6.4$ ppm aralığında sinyal vermektedir [73]. Şekil 4.2b incelendiğinde çalışma kapsamında sentezlenen PEGDM'in spektrogramunda metil protonlarına ait pikin, a, $\delta=1.88$ ppm değerinde; metil grubu protonlarına ait olan piklerin ise, b ve c, $\delta=6.06$ ve $\delta=5.51$ ppm değerlerinde olduğu görülmektedir. Şekil 4.2b'de görülen d piki ($\delta=3.69$ ppm) merkezi PEG protonları; e piki ($\delta=4.23$ ppm) ise yapıdaki karboksi grubu nedeniyle ortaya çıkmıştır.

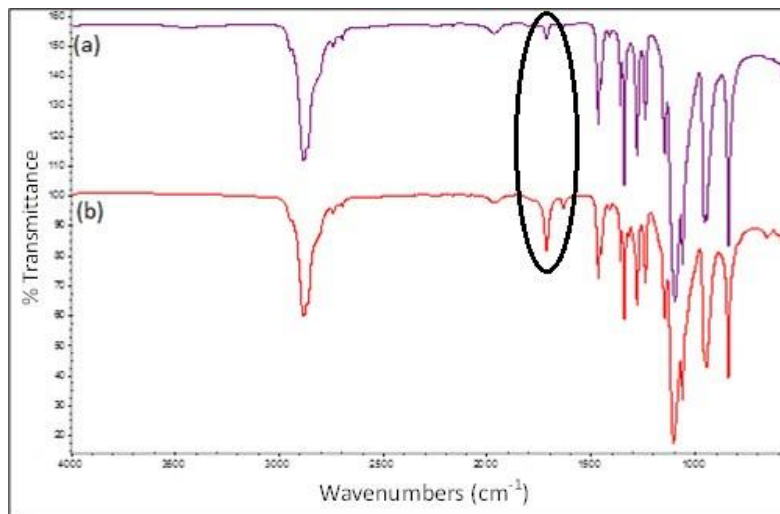
Metakrilatlanma derecesi (MD); terminal metakrilat protonlarının pik alanının, merkezi PEG protonlarının pik alanına oranı hesaplanarak Eşitlik 4.1 yardımıyla bulunmuştur [13].

$$\%MD = 1 - \left[\frac{\text{PEGDM'in terminal protonlarının pik alanı}}{\text{PEG'in merkezi protonlarının pik alanı}} \right] * 100 \quad (\text{Eşitlik 4.1})$$

Buna göre PEGDM spektrogramundaki pik b ve c'nin altında kalan alanlar ile PEG spektrogramunda yer alan merkezi PEG protonunun alanı oranlandığında metakrilatlanma derecesi %99.4 olarak bulunmuştur.

4.1.2. FTIR Analizi

PEG ve PEG'in MA ile fonksiyonelleştirilmesi sonucu elde edilen PEGDM'in ATR-FTIR spektrogramları Şekil 4.3'te verilmiştir. Çizelge 4.1'de ise spektrogramlarda yer alan karakteristik pikler gösterilmiştir.



Şekil 4.3. PEG ve PEGDM'e spesifik FTIR spektrogramları.

Çizelge 4.1. PEG ve PEGDM'e spesifik FTIR spektrum verileri.

PEG (cm ⁻¹)	PEGDM (cm ⁻¹)	Titreşim Türü	Referans
3600-3450	3600-3450	O-H gerilimi	[74-76]
2881	2881	C-H simetrik gerilimi	[74, 76]
1716 (zayıf)	1716 (güçlü)	C=O gerilimi	[64]
-	1635	C-O gerilimi	[64, 75]
1466	1466	C-H gerilimi	[74, 75]
1096	1096	-O-R simetrik gerilimi	[74]

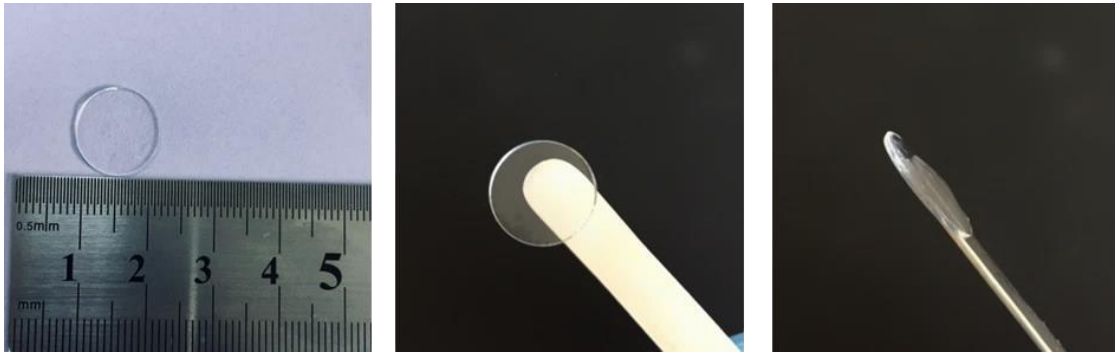
Spektrumlar incelendiğinde hem PEG hem de PEGDM'de 2881 cm⁻¹'de gözlemlenen pikler -CH₃ gruplarındaki C-H simetrik gerilimini ifade eder. Ayrıca 3600-3450 cm⁻¹ aralığında ortaya çıkan band O-H geriliminden kaynaklanmıştır [74-76]. Metakrilik gruplarının PEG yapısına katılmasıyla ortaya çıkan pikler Şekil 4.3b'de görülmektedir. PEGDM spektrumunda PEG spektrumundan farklı olarak 1716 cm⁻¹'de C=O gerilimi nedeniyle pik şiddeti artmıştır. Ayrıca 1635 cm⁻¹'de C-O gerilimi nedeniyle ortaya çıkan pik metakrilat grubunun karakteristik absorpsiyon pikidir [64,75]. PEG ve PEGDM spektrumlarında görülen 1466 cm⁻¹'deki pikler -CH₂ gruplarındaki asimetrik C-H makaslanmasına aittir [74, 75]. Her iki spektrumda da görülen 1096 cm⁻¹'deki pikler ise etilen glikol gruplarındaki -O-R simetrik gerilimi sonucunda ortaya çıkmaktadır [74]. Bu verilere göre FTIR analizinden elde edilen sonuçlar PEG'in başarılı bir şekilde metakrilatlanmasıyla PEGDM'in sentezlendiğini göstermektedir.

4.2. PEGDM Hidrojel Üretimi ve Karakterizasyonu

PEG hidrojelleri, uygun polimerizasyon koşulları altında hücreler için yüksek oranda biyolojik olarak uyumlu olduklarından hücre enkapsülasyonu için avantajlı bir ortam sağlar [12]. Yürütülen tez çalışması kapsamında sentezlenen PEGDM, literatüre göre hücre canlılığını en iyi destekleyici fotobaşlatıcı olan Irgacure 2959[®] (I2959) [77] kullanılarak UV ışık ile fotopolimerize edilmiştir. Bunun için %10, %15 ve %20 (w/v) konsantrasyonlarda polimer çözeltileri hazırlanarak uygun hidrojel konsantrasyonu için optimizasyon çalışması yapılmıştır. Yüzde 10 polimer konsantrasyonunda hazırlanan örneklerde jelleşme sağlanamazken, %15 ve %20 konsantrasyonlarda hazırlanan örneklerle hidrojel oluşumu gerçekleşmiştir (Çizelge 3.1). Optimum UV süresinin

belirlenmesi için 3 farklı konsantrasyonda hazırlanan hidrojel çözeltileri, farklı sürelerde 5 cm mesafe ile UV ışığa maruz bırakılmış ve jelleşmenin sağlandığı en kısa süre (150 sn) deneysel çalışmaların yürütülmesi için optimum UV süresi olarak seçilmiştir.

Hidrojeller, PBS (pH:7.4) içinde hazırlanan PEGDM çözeltilerinin %0.1 (w/v) I2959 ile fotopolimerizasyonu sonucu oluşturulmuştur. Bunun için hazırlanan makromer çözeltileri 4 gözlü petri kaplarına her bir göze 80 µL hacimde çözelti olacak şekilde aktarılmış, sonrasında fotopolimerizasyon gerçekleştirilmiştir. Elde edilen hidrojeller Şekil 4.4'te görülmektedir.



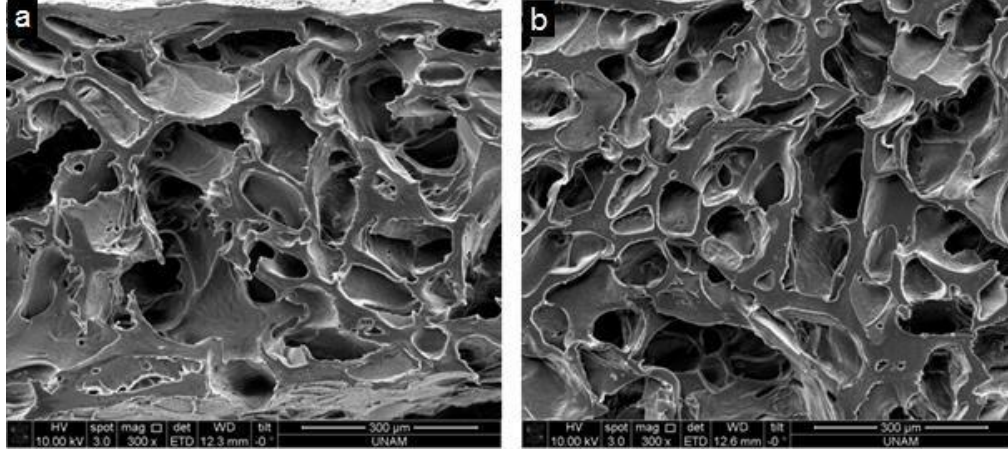
Şekil 4.4. Yüzde 20 (w/v) PEGDM, %0.1 (w/v) I2959 ile hazırlanarak fotopolimerize edilen hidrojellerin farklı açılardan görünüşleri.

Fotopolimerizasyon işlemi düşük viskoziteli bir monomer, oligomer veya makromer çözeltisinden, minimal invaziv bir şekilde hidrojel üretilmesini sağlar [77]. Kimyasal olarak çapraz bağlama, yüksek su içeriğine sahip olan hidrojellerde hidrojin yumuşak dokularınkine benzer mekanik özelliklere sahip olmasına neden olur [14]. Bu yüzden çalışma kapsamında fotopolimerizasyonun kullanımı avantajlıdır.

4.2.1. Morfolojik Analizler

Tez çalışması kapsamında üretilen PEGDM hidrojellerin taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile alınan kesit ve yüzey görüntüleri incelenmiştir. Buna göre sentezlenen hidrojel örnekleri analiz için Bölüm 3.2.1'de sunulan yöntemle hazırlanmış ve SEM ile görüntülenmiştir. Şekil 4.5a ve b'de liyofilize edilen hidrojellerin kesit ve yüzey görüntülerinde içsel bağlantılı gözenek yapıları görülmektedir. SEM fotoğrafları ile

PEGDM hidrojjelerin ortalama gözenek boyutu ve boyut aralığı Image J programından yararlanılarak belirlenmiş ve Çizelge 4.2’de bu değerler gösterilmiştir.



Şekil 4.5. Yüzde 20 (w/v) polimer içeriğine sahip PEGDM hidrojeline ait SEM fotoğrafları.
(a) Kesit görüntüsü (300X büyütme).
(b) Yüzey görüntüsü (300X büyütme).

Çizelge 4. 2. Yüzde 20 (w/v) polimer içeriğine PEGDM hidrojjelerinin gözenek boyutları ve gözenek boyut aralıkları.

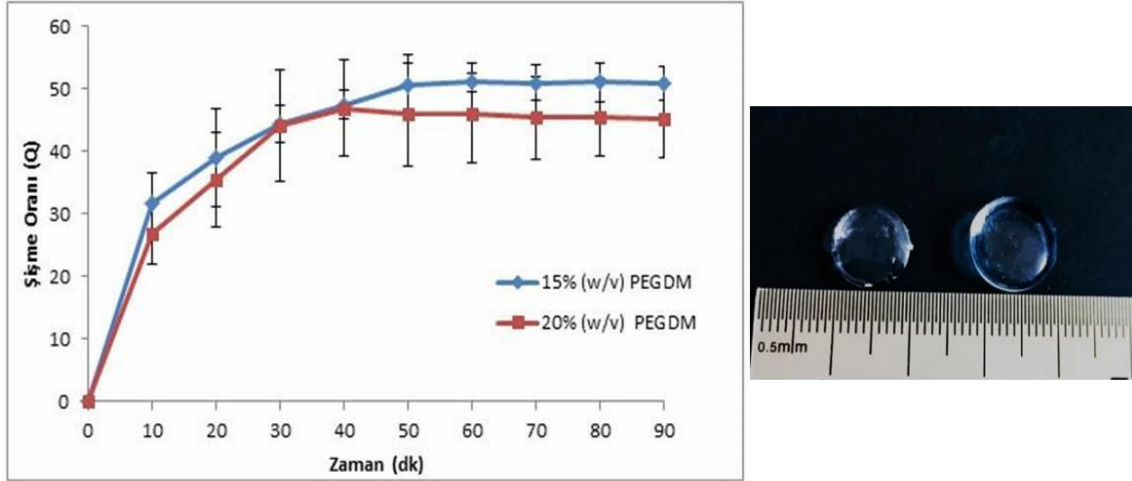
Ortalama Gözenek Boyutu (μm)	Gözenek Boyut Aralığı (μm)
93.8 ± 29.6	34.1 – 173.2

4.3.2. Su Tutma Kapasitesi Tayini

Bir hidrojinin yapısı içine aldığı su veya tampon çözelti miktarı olarak tanımlanan “su tutma veya şişme kapasitesi”, hidrojel karakterizasyonu için önemli bir özelliktir. Hidrojinin su tutma kapasitesi, mekanik özelliklerinin zaman içinde değişip değişmediğinin anlaşılmasına yardımcı olduğu için önemlidir [78]. Ayrıca, su tutma kapasitesi hidrojinin yüzey özelliklerini, çözünen maddelerin difüzyonunu ve hidrojinin kararlılığını etkiler [79].

Tez çalışması kapsamında üretilen PEGDM hidrojjelere ait su tutma kapasitesi tayini 4 gözlü petri kaplarında 80 μL hidrojel çözeltisinin fotopolimerizasyonundan sonra elde edilen hidrojjelerin PBS’te (pH:7.4) bekletilmesiyle gerçekleştirilmiştir. Belirli zaman aralıklarında hidrojjeler ortamdan uzaklaştırılmış ve gravimetrik ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Belirli zaman aralıklarında PBS ortamından uzaklaştırılan

hidrojellerin şişme oranları (Q), gravimetrik yöntemle, Eşitlik 3.3 kullanılarak hesaplanmış ve buna göre elde edilen bulgular Şekil 4.6a'da sunulmuştur. Su tutma analizine ilişkin veriler Ek. 1'de yer almaktadır. Kuru halde ve denge su içeriğine ulaştıktan sonraki hidrojellerin görüntüsü Şekil 4.6b'de verilmiştir.



Şekil 4.6. (a) Yüzde 15 ve %20 polimer içeriğine sahip PEGDM hidrojellerin karşılaştırmalı su alım kinetikleri. (b) PEGDM hidrojellerin (%20, w/v) kuru haldeki (soldaki fotoğraf) ve denge şişme içeriğine ulaştıktan sonraki (sağdaki fotoğraf) görüntüleri.

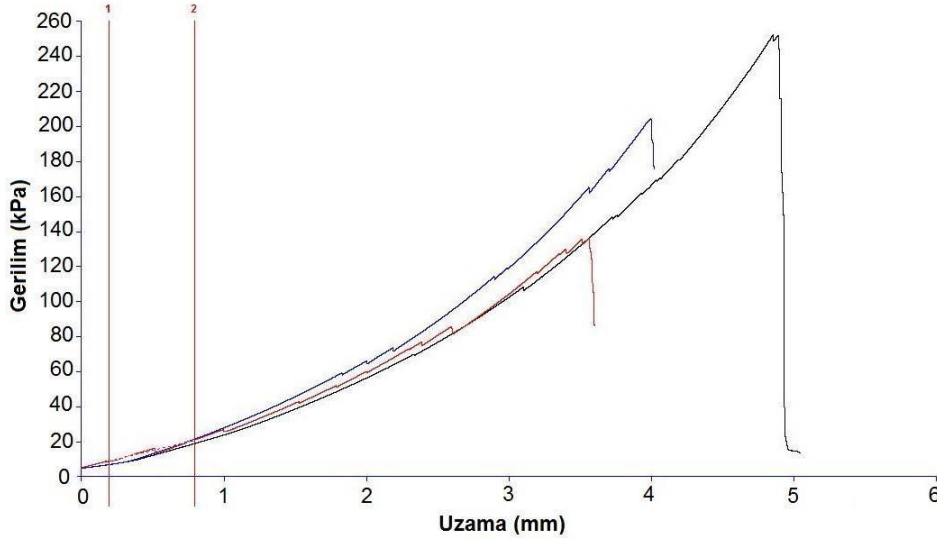
Şekil 4.6a'daki grafikten de görüldüğü gibi hem %15 (w/v), hem de %20 (w/v) konsantrasyonlarda hazırlanan PEGDM hidrojeller yaklaşık 60 dakikada şişme dengesine ulaşmıştır. İki farklı konsantrasyondaki PEGDM hidrojellerin denge şişme oranlarında önemli ölçüde bir farklılık gözlenmemiştir. Ancak deneyin ilk 20 dakikalık süresi dikkate alınığında %20 (w/v) polimer içeriğine sahip hidrojellerin %15 (w/v) polimer içeriğine sahip hidrojellerle kıyaslandığında başlangıç şişme hızının daha yavaş olduğu görülmektedir. Hidrojellerde makromer konsantrasyonu arttıkça çapraz bağ yoğunluğu artar, böylece hidrojeller daha yavaş denge şişme değerine ulaşır [80]. Bu nedenle %20 (w/v) polimer içeriğine sahip hidrojellerde başlangıç şişme hızının düşük olması beklenen bir durumdur.

4.3.3. Mekanik Analizler

Tez çalışması kapsamında sentezlenen ve 3B kültürlerde doku iskelesi olarak kullanılan PEGDM hidrojinin mekanik özelliklerinin belirlenebilmesi için hidrojellere sıkıştırma testi uygulanmış (n=3 paralel) ve elastik modülleri hesaplanmıştır. Temel olarak bir hidrojinin elastik modülü, hidrojele uygulanan bir kuvvet ile bu kuvvet sonucunda ortaya çıkan deformasyon arasındaki ilişkiden hesaplanır. Elastik modül genellikle bir hidrojel örneğinin gerilim-gerinim eğrilerinin sıkıştırma (basma) veya çekme deneyi sonucu elde edilen verilerinin grafiğe geçirilmesi ve elde edilen eğrinin doğrusal kısmının eğiminin bulunması suretiyle elde edilir [81]. Sıkıştırma testi hidrojel örneklerinin şekli üzerinde herhangi bir sınırlamaya ihtiyaç duyulmaması nedeniyle avantajlıdır. Ancak bu yöntemde genellikle silindirik veya disk benzeri şekilde hidrojel örnekleri kullanılır. İlgili literatürde doku mühendisliğinde kullanılmak amacıyla sentezlenen PEGDM hidrojellerin elastik modüllerinin raporlandığı için çeşitli çalışmalar yer almaktadır. Kullanılan çapraz bağlayıcı sistemleri ve polimer konsantrasyonu gibi etkenler hidrojinin mekanik özelliklerini önemli ölçüde etkilemekte ve elastik modül değerlerinin geniş bir aralıkta yer almasına neden olmaktadır. Callahan ve arkadaşları PEGDM hidrojeller üzerinde yaptıkları çalışmada makromer konsantrasyonları %5 ve %50 (w/v) olan hidrojellerin elastik modüllerinin 2050 ± 420 Pa ile 6110 ± 1140 Pa olduğu sonucunu ortaya koymuşlardır [70]. Killion ve arkadaşlarının PEGDM'den elde edilen hidrojellerin fiziksel ve mekanik özelliklerini belirlemek için yaptıkları çalışmada ise %100, %75, %50 ve %25 polimer konsantrasyonundaki hidrojellerin elastik modüllerinin sırasıyla 26.38 ± 4.48 , 15.79 ± 0.96 , 5.62 ± 0.78 ve 1.96 ± 0.29 MPa olduğunu bulmuşlardır [79]. Patel ve arkadaşları PEGDM'in doku mühendisliğine yönelik olarak mekanik özelliklerini belirlemek için yaptıkları çalışmada ise %20 (w/v) polimer konsantrasyonunda EDC/NHS kullanılarak kimyasal çapraz bağlanma ile hazırlanan PEGDM hidrojinin elastik modülünün 388-390 kPa aralığında olduğu sonucuna ulaşmışlardır [82].

Tez çalışması kapsamında mekanik sıkıştırma testi için hazırlanan örnekler 1.0 cm yükseklik ve 1.7 cm çapında silindirik şekilde hazırlanmış ve PBS (pH:7.4) içinde bekletilip şişme dengesine ulaştıktan sonra deney gerçekleştirilmiştir. Buna göre test sonucunda uygulanan gerilime bağlı olarak 3 örnekte meydana gelen kopma noktalarının gösterildiği uzama grafiği Şekil 4.7'de verilmiştir. Bu eğrilerden elde

edilen elastik modül değeri ise 286.37 (± 13.4) kPa olarak bulunmuştur. Bu değerin literatürde elde edilen verilerden farklı olmasının nedeni, hidrojenlerin sitotoksik etki göstermemeleri için kullanılan fotoçapraz bağlayıcı konsantrasyonunun ve UV maruziyeti süresinin minimum düzeylerde tutulmasıdır.



Şekil 4.7. Sıkıştırma testi sonucunda %20 (w/v) polimer içeriğine sahip PEGDM hidrojenlerinin gerilim-uzama eğrileri.

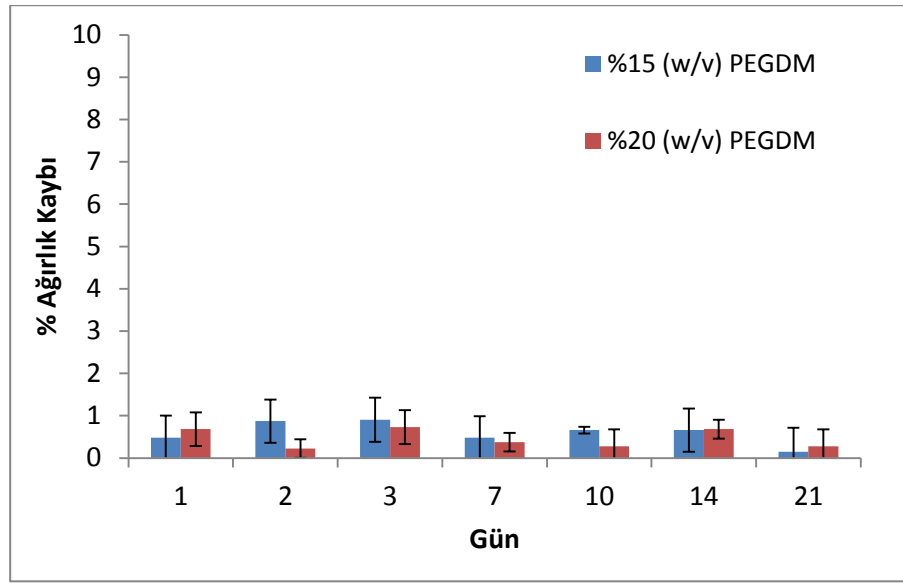
Şekil 4.7 incelendiğinde %20 (w/v) polimer içeriğine sahip 3 paralel örneğin kopmadaki ortalama uzama değeri 4.22 (± 0.72) mm olarak bulunmuştur.

4.3.4. Biyobozunurluk Tayini

Hidrojenler tipik olarak hidrolizin tüm hidrojel boyunca meydana geldiği “hidrolitik bozunma” veya kullanılan enzime göre bozunmanın lokal olduğu “enzimatik bozunma” olmak üzere iki tür mekanizma ile bozunur. Hidroliz; hidrolitik olarak kararsız kimyasal bağların kırılmasıyla meydana gelir ve hidroliz hızı, polimer konsantrasyonu veya malzeme imalatı sırasında çapraz bağlanma derecesi ile kontrol edilen çapraz bağlanma yoğunluğu gibi parametreler değiştirilerek ayarlanabilir. Fotopolimerizasyonla elde edilen PEG hidrojenlerinin belirli zaman dilimlerinde gerçekleştirilen hücre kültürü çalışmaları için genel olarak kararlı olduğu ve biyobozunur özellik göstermediği kabul edilir. Bu yüzden fotopolimerize PEG hidrojenlerinin kararlı ve biyo inert oluşları, onları uzun süreli hücre kültür çalışmaları için cazip kılar [78, 83]. Ancak biyobozunur

olmadığı kabul edilen hidrojellerin bile belirli bir zaman aralığı sonunda eser miktarda dahi olsa bozunabileceğini dikkate almak gerekmektedir [78].

Fotopolimerize edilebilen PEG hidrojel *in vitro* koşullarda biyobozunur özellik göstermemektedir [84]. Tez çalışması kapsamında, PBS (pH:7.4) içinde hidrojellerin 21 gün boyunca bekletilmesiyle gerçekleştirilen biyobozunurluk çalışmasına göre, üretilen PEGDM hidrojellerin % ağırlık kaybında anlamlı bir azalmanın olmadığı ve bu yönüyle literatürle uyumlu olduğu görülmüştür (Şekil 4.8). Yapılan biyobozunurluk çalışması sonucunda elde edilen veriler çizelge halinde Ek. 2’de sunulmuştur.



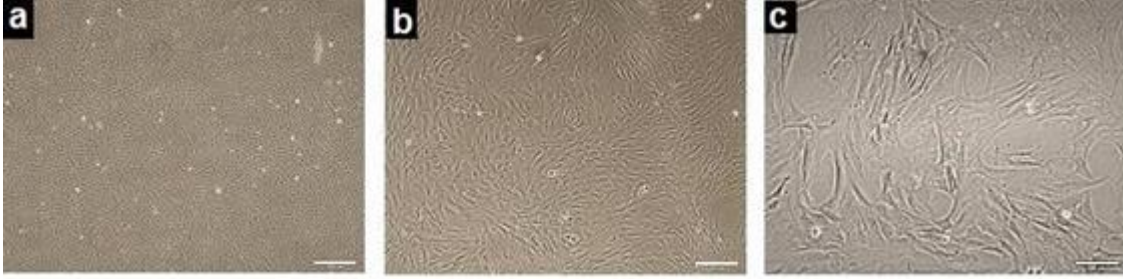
Şekil 4.8. PEGDM hidrojelinde zamana bağlı biyobozunurluk grafiği.

4.4. *In vitro* Hücre Kültür Çalışmaları

In vitro hücre kültür çalışmaları için hücre bankamızda bulunan, Wistar albino sıçanların derialtı beyaz adipoz dokularından izole edilmiş mezenkimal kök hücrelerle (AKH) kültürasyon gerçekleştirilmiştir. Sentezlenen PEGDM hidrojellerin hücre canlılığı üzerindeki etkilerinin incelenmesi için gerçekleştirilen canlı-ölü boyama analizlerinde ise L929 fibroblastları kullanılmıştır. Hem 2B hem de 3B kahverengi adipogenez çalışması için hücreler önce DMEM-high glikoz içeren temel büyüme ortamında 6. pasaja kadar çoğaltılmış, daha sonra farklılaştırma ortamına alınmıştır. Hücrelerin farklılaşma davranışları ise belirli günlerde gerçekleştirilen immünohistokimyasal ve immünohistokimyasal analizler, Oil red O boyamalar ve RT-PCR analizleri ile ortaya konulmuştur.

4.4.1. Hücre Stoklarının Hazırlanması

Hücreler istenen sayıya ve 6. pasaja ulaşana kadar polistren hücre kültür kapları üzerinde DMEM-high glikoz içeren temel büyüme ortamında çoğaltılmıştır. Hücreler standart tripsinizasyon protokolü kullanılarak pasajlanmış ve farklılaşma çalışmaları için gerçekleştirilen ekim öncesinde ise hücre sayısı hemositometrik olarak belirlenmiştir. Çalışma kapsamında tek tabaka olarak çoğaltılan AKH'lerin iğsi ve fibroblastik morfolojileri Şekil 4.9'da farklı büyütmelelerde görülmektedir.



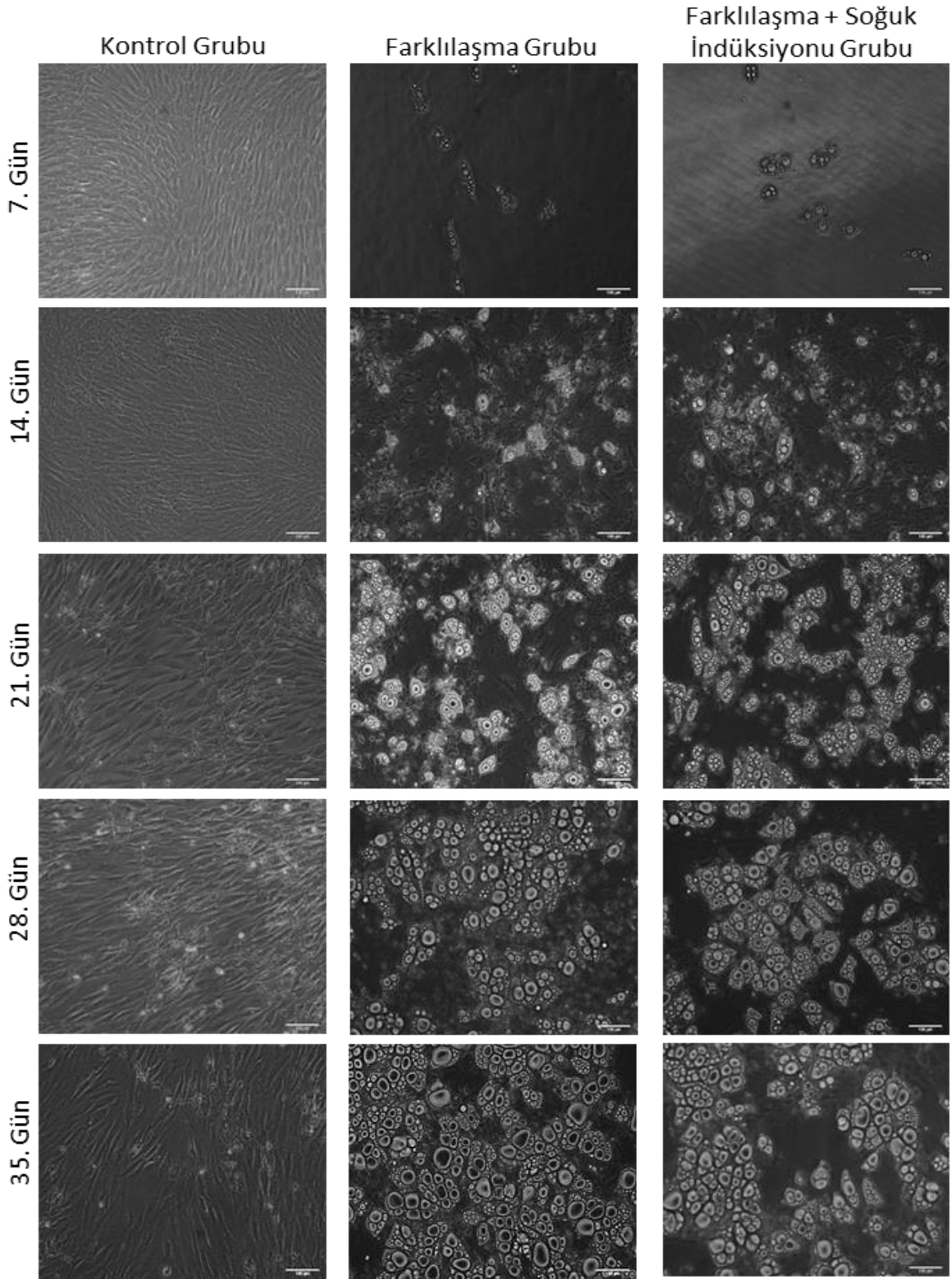
Şekil 4.9. Hücre kültür kapları üzerinde çoğaltılan 6. pasajdaki AKH'lerin 7. günde, ışık mikroskobu altındaki görüntüleri. (a) 4X, (b) 10X, (c) 20X büyütme.

Grubumuzca izole edilmiş ve hücre bankamıza eklenmiş olan AKH'lerin ikilenme süresi 44 saat, özgül üreme hızları ise 0.0157 sa^{-1} olarak belirlenmiştir [85]. Çalışma kapsamında ise daha önceden karakterizasyon çalışmaları tamamlanmış olan bu hücreler kullanılmıştır.

4.4.2. 2B Hücre Kültürü Çalışmaları

İki boyutlu kahverengi adipogenez çalışması için hücre ekim yoğunluğu literatüre uygun olarak $12,000 \text{ hücre/cm}^2$ [1], olarak belirlenmiştir. Çalışmanın bu bölümünde AKH'ler 3 deneysel gruba ayrılarak 35 gün boyunca tek tabaka olarak kültür çalışması gerçekleştirilmiştir. Bu deneysel gruplardan birinde hücreler sadece kahverengi adipogenik farklılaştırma ortamında kültüre edilmiş, diğer grupta ise hücreler farklılaştırma ortamında kültüre edilirken soğuk indüksiyonu (gün aşırı, 15 dk boyunca 16°C) da uygulanmıştır. Kontrol grubu olarak ise AKH'ler sadece büyüme ortamında kültüre edilmiştir. Tüm gruplarda hücre besisi ortamı gün aşırı, yarı yarıya olacak şekilde değiştirilmiştir.

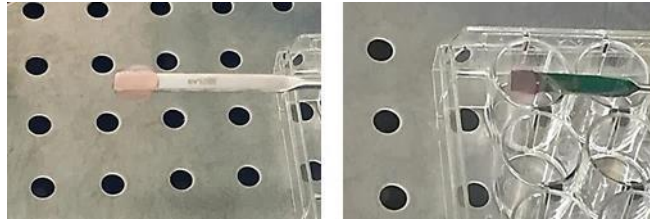
İki boyutlu farklılaştırma çalışması boyunca hücrelerin farklılaşma durumları Oil red O boyamalar, RT-PCR analizleri ve immünohistokimyasal analizlerle gösterilmiştir. Ayrıca optik mikroskop kullanılarak hücrelerin kahverengi adipositlere farklılaşması esnasındaki morfolojik değişimler de görüntülenmiştir (Şekil 4.10). Kök hücreler kahverengi adipositlere farklılaşırken sitoplazmalarında lipit damlacıklarının birikmesinden dolayı fibroblastik morfoloji yerini daha küresel bir hücre morfolojisine bırakır. Hücreler ağsı özelliklerini kültürün ilerlemesiyle beraber kaybetmeye başlar. Kültür ilerledikçe kök hücreden adipositlere farklılaşmış hücrelerin çapında artma görülmüştür. Kontrol grubunda ise hücreler kültür kabı yüzeyini tamamen kaplayacak duruma gelmiş olmalarına rağmen, iğsi görünümünü korumaya devam etmiştir.



Şekil 4.10. Üç farklı deneysel grupta, tek tabaka olarak kültüre edilen AKH'lerin 7., 14., 21., 28. ve 35. günlerde ışık mikroskopunda alınan, 20X büyütmedeki görüntüleri.

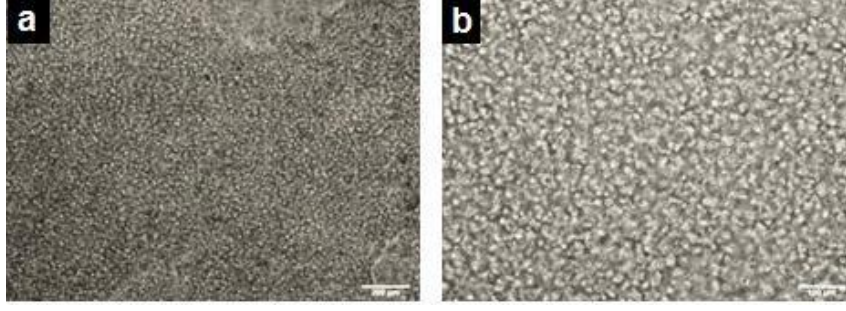
4.4.3. 3B Hücre Kültürü Çalışmaları

Hücre kapları üzerinde 6. pasaja kadar çoğaltılan AKH'ler tripsinizasyon ile yüzeyden kaldırılmış, hemositometre ile sayılmış ve PEGDM hidrojel çözeltisi ile karıştırılarak fotopolimerizasyon işlemiyle hücre-hidrojel yapıları oluşturulmuştur. Bunun için hücreler PBS (pH:7.4) ile hazırlanmış %0.1 (w/v) foto çapraz-bağlayıcı I2959 içeren, %20 (w/v) konsantrasyondaki PEGDM hidrojel çözeltisiyle hücre yoğunluğu 10^4 hücre/ μ L hidrojel olacak şekilde karıştırılmıştır. Ardından homojenize edilen hücre-hidrojel çözeltisinden 80'er μ L alınarak 4 gözlü petri kaplarına aktarılmış ve sonrasında 5 cm mesafe ile 150 sn UV ışığa maruz bırakılarak fotopolimerizasyonla 3B hücre kültür örnekleri elde edilmiştir (Şekil 4.11). Jelleşme sağlandıktan sonra örnekler steril bir spatül yardımıyla petrilere alınıp 12 gözlü hücre kültür kaplarına aktarılmıştır. Her bir gözde bulunan hücre enkapsüle edilmiş hidrojel örneği için gözlere 2'şer mL ortam eklenmiştir. Ortam değişimi 2B kültürlerde olduğu gibi gün aşırı, yarı yarıya olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

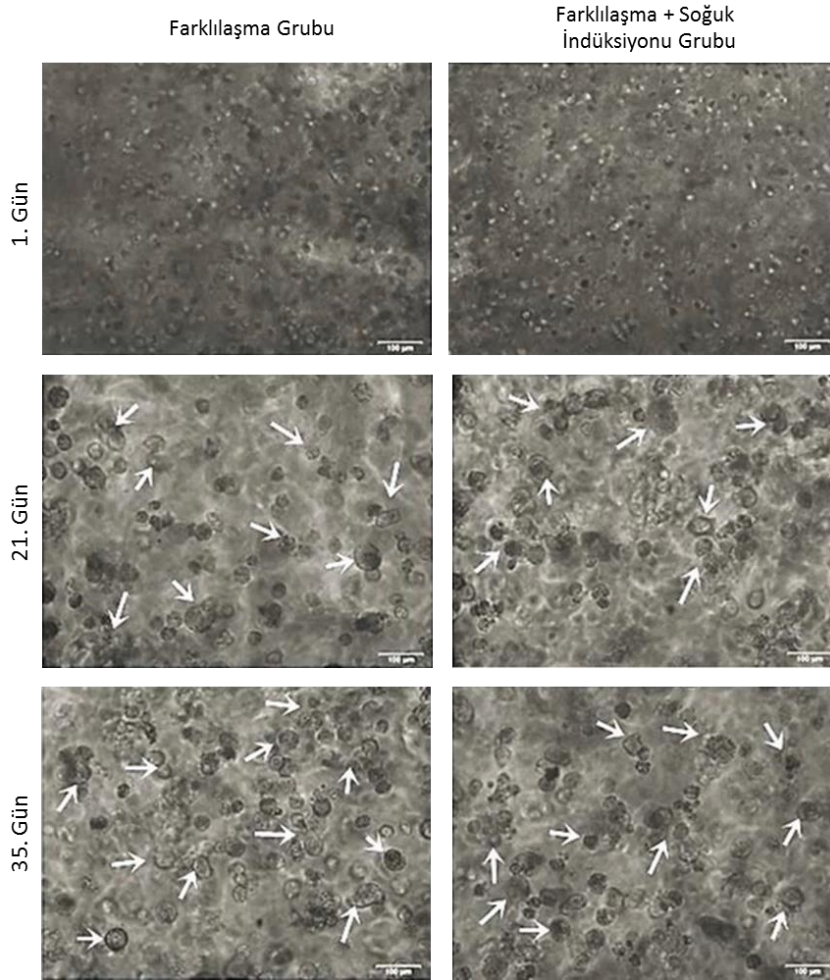


Şekil 4.11. Fotopolimerizasyondan sonra elde edilen AKH enkapsüle edilmiş 3B hidrojel yapıları.

Üç boyutlu hücre kültürü için iki farklı deneysel grup oluşturulmuştur. Farklılaşma ortamında kültüre edilen 2 gruptan birine soğuk induksiyonu (gün aşırı, 1 saat, 16°C) uygulanırken, diğer gruba bu işlem yapılmamıştır. PEGDM hidrojel içine hücre enkapsülasyonundan sonra ve 35 günlük kültür süresi boyunca düzenli aralıklarla ışık mikroskobu ile 3B hücre kültür örneklerinin fotoğrafları çekilmiştir (Şekil 4.12). Fotopolimerizasyonun hemen ardından alınan ışık mikroskobu görüntülerinde hücreler jel içinde belirgin, düzenli ve homojen dağılmış bir halde görülmektedir. Ancak kültürün ilerleyen günlerinde hidrojel içinde kahverengi adipsitlere farklılaşan hücreler yapı içine yayılmış, böylece jel içinde sıkı ve düzenli halde görünen hücre görüntüsü kaybolmuştur. Hücrelerin boyutlarında sitoplazmalarındaki lipit birikiminden dolayı artış görülmüştür (Şekil 4.13).



Şekil 4.12. Enkapsülasyon sonrasında PEGDM hidrojel içindeki AKH'lerin ışık mikroskobu ile alınan görüntüleri. (a) 10X, (b) 20X.



Şekil 4.13. Hidrojel içinde 35 gün boyunca kahverengi adipogenik farklılaştırma ortamında kültüre edilen AKH'lerin kültürün 1., 21. ve 35. günlerinde ışık mikroskobunda, 20X büyütmedeki görüntüleri. Oklar hidrojel içinde adipogenik farklılaşma gösteren hücreleri işaret etmektedir.

4.4.4. Hücre Kültürlerindeki Analizler

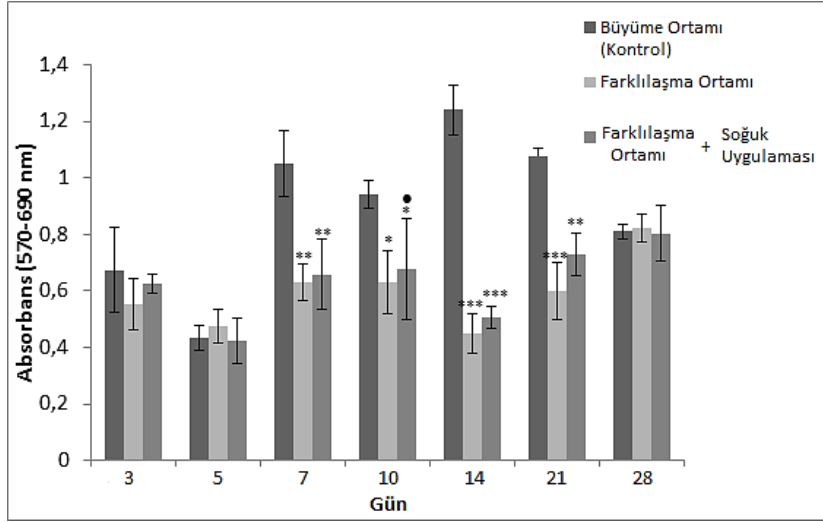
Bu bölümde 2B ve 3B *in vitro* kahverengi adipogenez çalışması süresince gerçekleştirilen analiz sonuçlarına yer verilmiştir. Bu çalışmalar; canlılık analizleri (MTT analizi ve canlı-ölü boyamalar), Oil Red O ile farklılaşan hücrelerdeki lipit damlacıklarının boyanması, immünohistokimyasal ve immünohistokimyasal boyamalar ile farklılaşan hücrelerdeki kahverengi adipositlere özgü proteinlerin boyanarak görüntülenmesi, RT-PCR analizleri ile hücrelerdeki gen ekspresyonlarının ortaya konulması ve histolojik boyamalarla 3B hücre kültür örneklerinde hidrojel içindeki hücre dağılımının gösterilmesi şeklindedir. Gerçekleştirilen her bir analizin sonucu ayrıntılı bir şekilde değerlendirilmiş ve literatürdeki verilerle karşılaştırılarak sunulmuştur.

4.4.4.1. Hücre Canlılık Analizleri

I. Ortamların Hücrelerin Mitokondriyal Aktivitelerine Olan Etkilerinin Belirlenmesi:

Kullanılan hücre kültür ortamlarının hücrelerin mitokondriyal aktivitelerine olan etkilerinin belirlenmesi için hücre kültür kapları üzerinde kültüre edilen hücrelerle MTT analizleri gerçekleştirilmiştir. MTT analizleri, 3 farklı hücre kültür grubu üzerinden yürütülen 2B farklılaştırma çalışması sürecinde tüm gruplar için 3., 5., 7., 10., 14., 21. ve 28. günlerde 3 paralel örnek üzerinden gerçekleştirilmiştir.

Şekil 4.14'te farklılaşma ortamıyla kültüre edilen, hem farklılaşma ortamıyla kültüre edilip hem de soğuk induksiyonu uygulanan ve yalnızca büyüme ortamıyla kültüre edilen kontrol grubu olmak üzere 3 grubun optik yoğunluk verileri karşılaştırılmıştır. Grafik değerleri incelendiğinde 21. güne kadar soğuk induksiyonu uygulanarak farklılaştırma ortamıyla kültüre edilen grup mitokondriyal aktivitesinin soğuk induksiyonu uygulanmayan gruba kıyaslandığında daha yüksek olduğu görülmektedir.



Şekil 4.14. İki boyutlu farklılaştırma çalışması boyunca kültüre edilen AKH'lerin MTT grafiği (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık, n=3, kontrol grubu büyüme ortamı (kontrol) iken * $p<0.05$, ** $p<0.01$, **** $p<0.001$; kontrol grubu farklılaşma grubu iken ● $p<0.05$, ●● $p<0.01$, ●●● $p<0.001$).

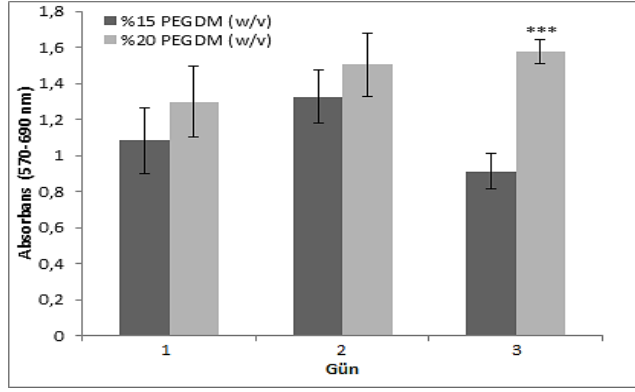
Kültürün ilk 5 gününde hücre canlılığı açısından deney grupları arasında anlamlı bir fark gözlemlenmemiştir ($p>0.05$). Ancak 7. güne gelindiğinde kontrol grubundaki hücrelerin üreme hızında diğer 2 gruptaki hücelere kıyasla anlamlı bir fark olduğu görülmektedir ($p<0.01$). Onuncu günde hem kontrol grubunda diğer 2 gruba kıyasla istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık ortaya çıkmış, hem de farklılaşma grubundaki hücreler ile soğuk indüksiyonu uygulanan gruptaki hücreler arasında hücrelerin mitokondriyal aktiviteleri açısından da anlamlı bir fark oluşmuştur ($p<0.05$). On dördüncü günde ise kontrol grubu ile diğer 2 grup arasında hücresel canlılık açısından anlamlı farklılık yüksektir ($p<0.001$). Yirmi birinci günde kontrol grubu ile farklılaşma grubu kıyaslandığında istatistiksel olarak yüksek bir anlamlı farklılık görülürken ($p<0.001$), kontrol grubu ile soğuk indüksiyonu uygulanan grup kıyaslandığında da yine belirgin bir farklılık ortaya çıkmıştır ($p<0.01$). Ancak 28. günde hücreler mitokondriyal aktiviteleri açısından değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir. Sonuç olarak AKH'lerin her 3 kültür ortamında da yayılıp çoğaldığı, ancak farklılaşmaya başlayan hücrelerde mitokondriyal aktivitenin kontrol grubunda kültüre edilen hücelere göre daha düşük olduğu görülmüştür. Farklılaşmaya başlayan hücreler proliferasyon fazından çıkmakta ve bu durum kontrol grubu ile kıyaslandığında farklılaşan hücrelerin daha düşük mitokondriyal aktivite göstermelerine neden

olmaktadır [86]. Kontrol grubundaki hücreler ise büyüme ortamıyla kültüre edilerek hücrel proliferasyona devam ederler. Dolayısıyla farklılaşma döngüsüne girmiş hücrelerle kıyaslandıklarında mitokondriyal aktivite, hücrel proliferasyona devam eden hücrelerde daha yüksektir. Buna ek olarak kültürün 14. gününden sonraki kontrol grubunda gözlenen düşüş hücrelerin hücre kültür kabının bütün yüzeyini kaplayarak “kontakt inhibisyon”a ulaşmaları neden olarak gösterilebilir.

II. Hidrojellerin Sitotoksitesinin Belirlenmesi

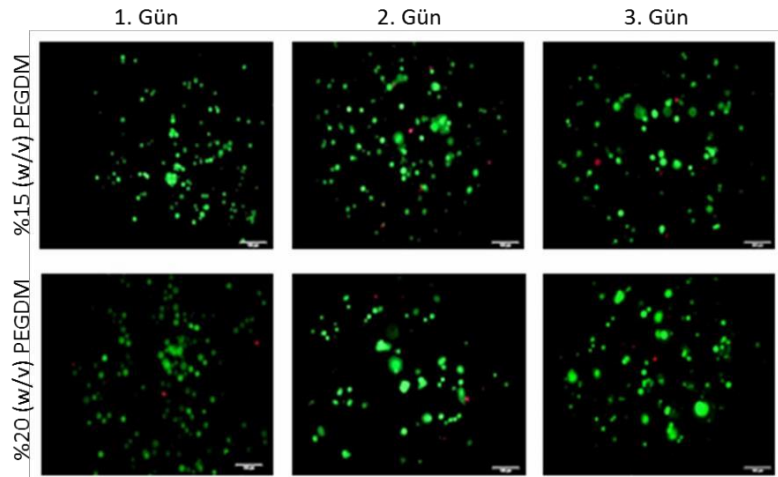
PEGDM polimerinden hidrojel elde edilebilmesi için gerçekleştirilen en uygun UV süresi ve polimer konsantrasyonunun belirlenmesi çalışmasında minimum 150 sn sürede %15 ve %20 (w/v) polimer konsantrasyonunda jelleşmenin sağlanabildiği görülmüştü (Bölüm 3.2). Jelleşmenin gerçekleştiği bu polimer konsantrasyonlarından hangisinin hücre canlılığını daha fazla desteklediğinin bulunması için L929 hücreleri enkapsüle edilen hidrojellerle MTT analizi ve canlı-ölü boyama analizleri gerçekleştirilmiştir. Ayrıca 3B farklılaştırma çalışması için gerçekleştirilen hücre kültürünün 7. gününde de canlı-ölü boyama analizi yapılarak hidrojel içine enkapsüle edilen AKH’lerin canlılık durumları gösterilmiştir.

İlk olarak L929 hücreleri %15 ve %20 (w/v) PEGDM hidrojellerine enkapsüle edilerek elde edilen kültürlerle 3 gün boyunca MTT analizi gerçekleştirilmiş (n=3) ve sonuçlar Şekil 4.15’te zamana karşı absorbans değeri olarak verilmiştir. Grafik verileri değerlendirildiğinde %20 (w/v) polimer konsantrasyonuna sahip olan hidrojellerde hücrel canlılığın daha yüksek olduğu görülmesine rağmen, 1. ve 2. günlerde %15 ve %20 (w/v) polimer konsantrasyonuna sahip hidrojellere enkapsüle edilmiş hücrelerin mitokondriyal aktivitelerinde istatistiksel açıdan anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p>0.05$). Ancak 3. güne gelindiğinde %20 (w/v) polimer konsantrasyonundaki hidrojellere enkapsüle olmuş hücrelerdeki üreme hızının, %15 (w/v) polimer konsantrasyonundaki hidrojellerdeki hücrelere kıyasla anlamlı derecede arttığı görülmektedir ($p<0.001$).



Şekil 4.15. Polimer konsantrasyonu %15 ve %20 (w/v) olan PEGDM hidrojellerine L929 hücrelerinin enkapsüle edilmesiyle elde edilen 3B kültürlerin MTT grafiği (İstatistiksel açıdan anlamlı farklılık, n=3, kontrol grubu %15 PEGDM (w/v) iken, *** $p < 0.001$).

Üç boyutlu kahverengi adipogenik farklılaşma çalışmasındaki AKH'lerin canlılığı, canlı-ölü boyama analizleri ile belirlenmiş ve floresan ataçmanlı optik mikroskop ile hücrelerin canlılık durumları görüntülenmiştir (Şekil 4.16). Böylece canlı hücreler (calcein AM ile boyanır) yeşil renkte görünürken, ölü hücreler (ethidium homodimer-1 ile boyanır) kırmızı renkte gözlemlenmiştir (Şekil 4.17). Boyanan hücrelerin % canlılık değerleri L929 hücreleri ve AKH'ler için sırasıyla Çizelge 4.3'te ve Çizelge 4.4 verilmiştir.

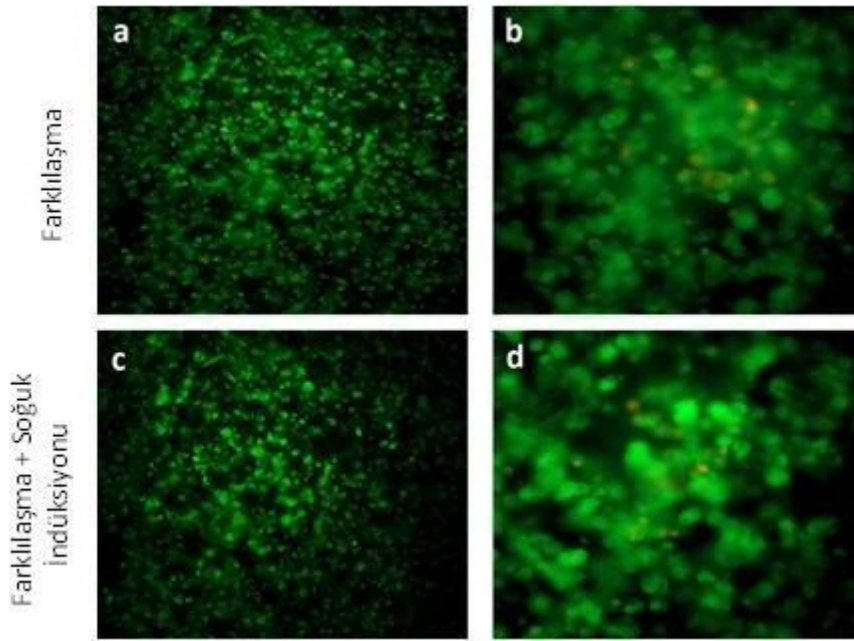


Şekil 4.16. Üç gün boyunca gerçekleştirilen canlı-ölü boyama analizi sonucunda %15 ve %20 (w/v) polimer konsantrasyonundaki PEGDM hidrojellerine enkapsüle edilen L929 hücrelerine ait 20X büyütmedeki mikroskop görüntüleri.

Çizelge 4.3. PEGDM hidrojellerinde canlı-ölü boyama görüntülerinden “Image J” programı kullanılarak hesaplanan ortalama L929 hücre canlılığı sonuçları

	Ortalama Hücre Canlılığı (%)	
	%15 (w/v) PEGDM	%20 (w/v) PEGDM
1. Gün	93.3 ± 3.5	93.7 ± 1.5
2. Gün	89.0 ± 2.0	89.7 ± 3.1
3. Gün	83.1 ± 1,0	93.3 ± 1.2

Üç boyutlu farklılaştırma çalışması için yürütülen kültürün 7. gününde yapılan canlı-ölü boyama analizine göre ise soğuk indüksiyonu uygulanan ve uygulamayan iki grupta da AKH’lerin hidrojel içinde yayılıp çoğaldıkları ve canlılık oranlarının oldukça yüksek olduğu görülmüştür (Şekil 4.17).



Şekil 4.17. Üç boyutlu kahverengi adipogenik farklılaştırma çalışması için %20 (w/v) polimer konsantrasyonundaki PEGDM hidrojelleri içine enkapsüle edilen AKH’lerin kültürün 7. günündeki canlı-ölü boyama analizi sonucundaki floresan görüntüleri. (a) 10X, (b) 20X, (c) 10X, (d) 20X.

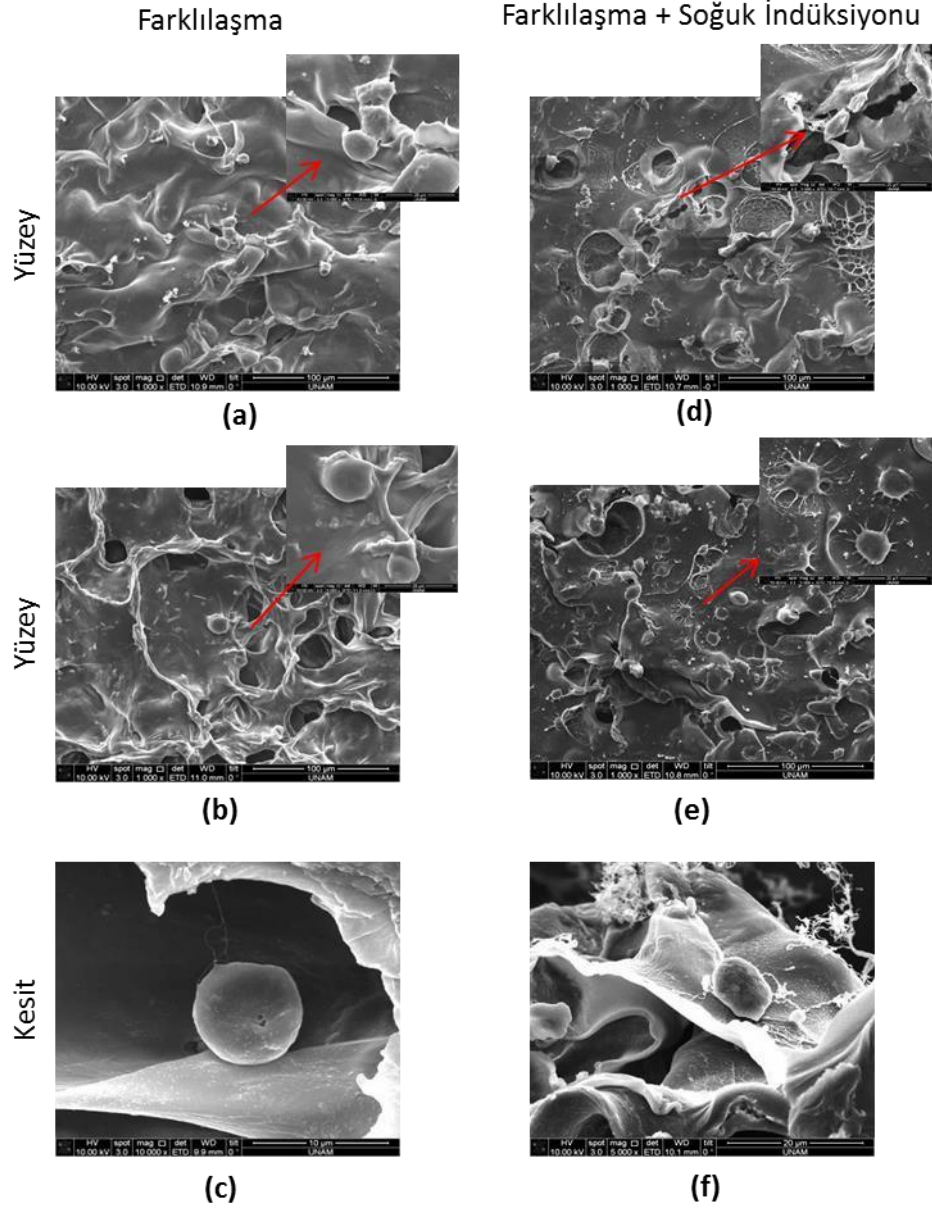
Çizelge 4.4. Kahverengi adipogenez çalışması için PEGDM hidrojelleri içine enkapsüle edilen AKH'lerin kültürün 7. gününde yapılan canlı-ölü boyama analizi sonucunda elde edilen görüntülerin "Image J" yazılımı kullanılarak hesaplanan % canlılık değerleri.

Örnek	% Canlılık
Farklılaşma Grubu	89.5 ± 6.4
Soğuk İndüksiyonu Grubu	90.0 ± 2.8

Elde edilen bu verilere göre PEGDM hidrojellerin deney koşullarımızda hücre canlılığını desteklediği ve 3B hücre kültürü çalışmaları için çalışmalarımızı gerçekleştirdiğimiz koşullarda biyouyumlu bir malzeme olduğu sonucuna varılmıştır.

4.4.4.2. Morfolojik Analizler

Hidrojel içine enkapsüle edilen hücrelerin jel içindeki morfolojilerinin, dağılımının ve etkileşimlerinin incelenmesi için SEM analizi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen görüntüler incelendiğinde hücrelerin hidrojel içine homojen dağıldıkları, birbirleriyle bağlantılar kurarak hidrojel içinde yayıldıkları ve adipositlere özgü küresel morfoloji kazandıkları görülmektedir (Şekil 4.18). Kahverengi adipositler elips benzeri küresel morfolojidedirler ve boyutları 15-50 µm arasında değişmektedir [87]. Ayrıca adipogenez sırasında tip I ve III kollajen, fibronektin ve β1 integrinlerin ifadesi azalırken, tip IV kollajen ve entaktin proteinleri adiposit ECM'sinde ifadesi artar [11]. İlgili literatürde adipogenez sırasında upregüle olmuş kollajenin varlığını ortaya koyan, hücrelerin etrafını çevreleyen kollajen fibrillerin varlığının ve kahverengi adiposit morfolojisinin SEM veya TEM analizleriyle ayrıntılı bir şekilde görüntülediği çeşitli çalışmalar mevcuttur [88-90]. Tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen SEM analizi sonucunda elde edilen fotoğraflarla oluşturulan Şekil 4.18 incelendiğinde hidrojel içine enkapsüle edilmiş hücrelerin kahverengi adiposit morfolojisini göstermesi ve hücre etrafında bulunan kollajen benzeri fibrillerin varlığının görüntülenmesi literatür bulgularını destekler niteliktedir. Buna ek olarak Şekil 4.18a ve 4.18d'deki hücrelerin matris içinde canlılıklarını koruyarak mitoz belirtileri gösterdikleri sonucuna varılmıştır. Benzer sonuçlar, Galateanu ve arkadaşlarının aljinat hidrojel içine enkapsüle ettikleri AKH'lerde de görülmüştür [91]. Şekil 4.18e'de ise hücrelerin uzantıları aracılığıyla matris ile etkileşime girip küresel morfolojilerini koruyarak hidrojel içinde yayıldıkları görülmektedir.

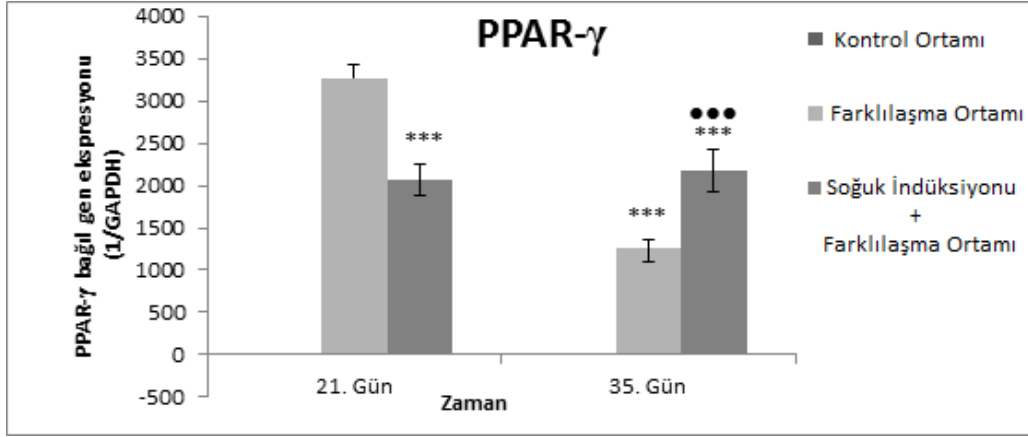


Şekil 4.18. PEGDM hidrojel içine enkapsüle edilip kahverengi adipogenik farklılaştırma ortamında kültüre edilen AKH'lerin SEM fotoğrafları. (a) 21. gün, büyük fotoğraf 1000X, küçük fotoğraf 5000X büyütme. (b) 35. gün, büyük fotoğraf 1000X, küçük fotoğraf 5000X büyütme. (c) 21. gün, 10.000 X büyütme. (d) 21. gün, büyük fotoğraf 1000X, küçük fotoğraf 5000X büyütme. (e) 35. gün, büyük fotoğraf 1000X, küçük fotoğraf 5000X büyütme. (f) 35. gün, 5000X büyütme.

4.4.4.3. Gen Ekspresyon Analizleri

Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) en basit tanımıyla DNA'nın spesifik bir parçasının *in vitro* koşulda bir tüp içinde çoğaltılması işlemidir [92]. Bu yöntemde spesifik DNA bölgesine özgü, bu bölgedeki baz dizilerini tamamlayıcı sentetik oligonükleotid primerler kullanılarak istenen gen bölgesinin enzimatik olarak sentezlenmesi amaçlanır. Reaksiyon sırasında DNA'nın çoğaltılması sırasında gerçekleşen her bir döngüde amplifikasyon ürünlerinin artışı ile eş zamanlı olarak floresan sinyalinin ölçülmesi ile kantitatif bir sonuç elde edilir. Böylece nükleik asit amplifikasyonu ve tespit adımları tek bir homojen analizde birleştirilir ve ortaya çıkan ürünlerin tespiti için jel elektroforez ihtiyacı ortadan kalkar [93]. Bunun için Cyber Green veya Eva Green gibi boyalar DNA'ya bağlandıktan sonra floresan sinyal veren belirteç molekülleri olarak kullanılır [94]. RNA izolasyonu sonrasında gerçekleştirilen PCR analizlerinde ilk olarak izole edilen RNA molekülünden "reverse transcriptase" (ters transkriptaz) enzimi ile komplementer (tamamlayıcı) DNA (cDNA) sentezi gerçekleştirilerek bir mRNA kalıbı oluşturulur. Sonrasında elde edilen cDNA, doğrudan RT-PCR analizi için kullanılır. PCR işlemi 3 ana basamakta gerçekleştirilir. İlk basamakta, çift zincirli, hedef DNA zincirinin yüksek sıcaklık (94°C-98°C) denatürasyonu ile DNA'nın tek zincirli hale gelmesi sağlanır. İkinci basamakta (hibridizasyon) ise tek iplikçik haline gelmiş hedef DNA'ya sentetik oligonükleotidler olan primerlerin bağlanması (37°C-65°C) gerçekleşir. Son basamak (polimerizasyon) ise Taq polimeraz enzimi vasıtasıyla istenen sekansın uzatılmasıdır (70°C-72°C) [93, 94]. Tez çalışması kapsamında 2B ve 3B kültürlerde kahverengi adipogenik farklılaştırma gösteren hücrelerin Cidea, PPAR- γ ve UCP-1 gen ifadeleri RT-PCR analizleri ile ortaya konulmuştur. Kültürlerin 21. ve 35. günlerinde toplanan örneklerle (n=4 paralel) analizler gerçekleştirilmiştir. Yapılan analizde "house keeping" gen olarak GAPDH kullanılmıştır.

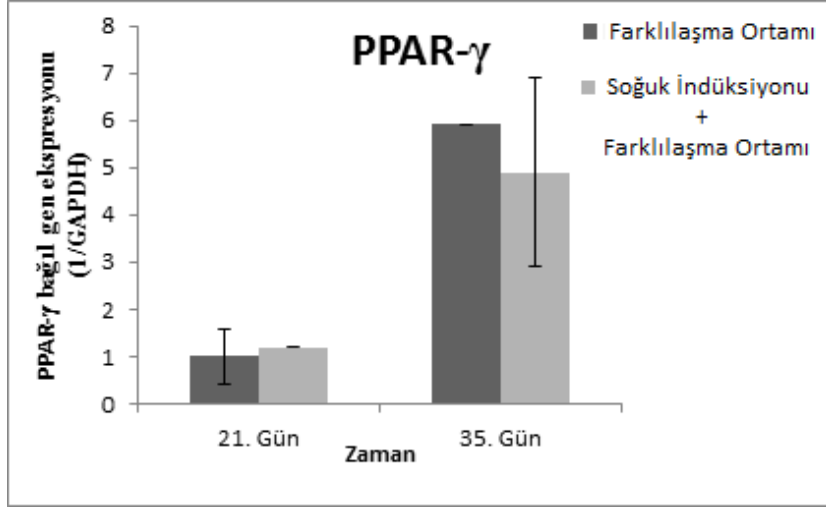
Transkripsiyon faktörü PPAR- γ lipid alımını uyaran, yağ asidi depolamasını aktive eden, glikoz metabolizmasını düzenleyen ve adipogenezi tetikleyen, yağ dokusu oluşumunu kontrol eden ana düzenleyicidir. Hem kahverengi, hem de beyaz adipositlerde yüksek oranda ifade edilir [1, 29]. Şekil 4.19'da 2B kültürdeki hücrelerle PPAR- γ geni için gerçekleştirilen RT-PCR analiz sonucu verilmiştir.



Şekil 4.19. İki boyutlu kültürlerde çoğaltılan AKH'lere ait bağıl PPAR- γ gen ekspresyonu sonuçları. Kontrol grubunun temel büyüme ortamında çoğaltılarak kontrol grubunu oluşturan hücreler olduğu durum, n=4, * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$; kontrol grubu farklılaşma grubunda çoğaltılan hücreler olduğu durum, n=4, ● $p<0,05$, ●● $p<0,01$, ●●● $p<0,001$.

Elde edilen grafiğe göre kültürün 21. gününde hem farklılaşma grubunda, hem de soğuk indüksiyonu uygulanan gruptaki AKH'lerin gen ekspresyon düzeylerinde yükseliş olmasına rağmen, yalnızca soğuk indüksiyonu uygulanan gruptaki artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmektedir ($p<0.001$). Kültürün 35. gününde ise kültüre edilen 2 grupta da PPAR- γ gen ekspresyonunda artış meydana geldiği ve soğuk indüksiyonu uygulanan gruptaki adipogenik farklılaşma düzeyinin, sadece farklılaşma ortamıyla kültüre edilen AKH'ler ile kıyaslandığında anlamlı derecede yüksek olduğu görülmektedir ($p<0.001$). Kontrol grubunu oluşturan temel büyüme ortamıyla kültüre edilen AKH'lerde ise adipogenik farklılaşma meydana gelmediği için PPAR- γ gen ifadesinin görülmeyişi beklenen bir durumdur.

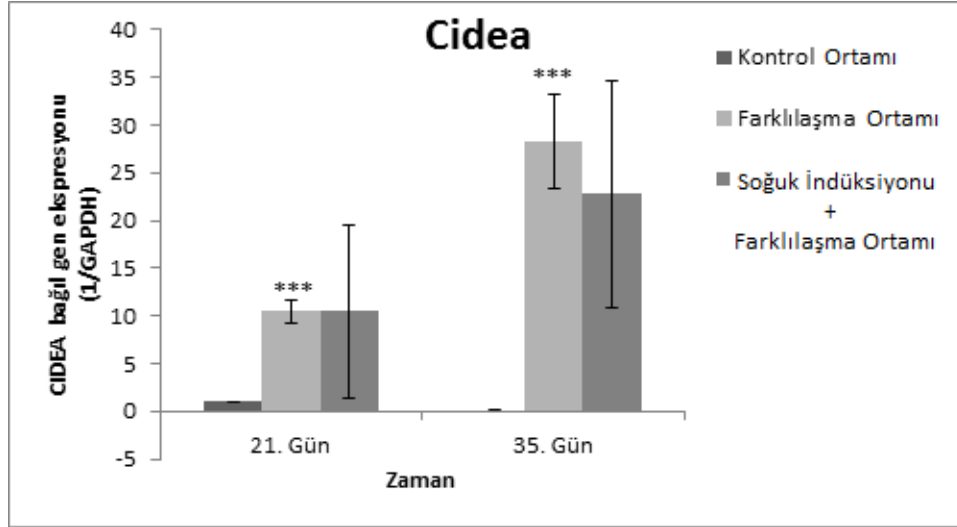
Şekil 4.20'de ise PEGDM hidrojele enkapsüle edilerek 3B koşullarda kültüre edilen AKH'lere ait PPAR- γ gen ekspresyonu sonuçları verilmiştir.



Şekil 4.20. Üç boyutlu kültürlerde çoğaltılan AKH'lere ait bağıl PPAR- γ gen ekspresyonu sonuçları.

Hidrojel içine enkapsüle edilen AKH'lerin 3B kültürdeki PPAR- γ gen ifadelerinde kültürün 35. gününde önemli bir artış olduğu ve buna ek olarak farklılaşma grubunda kültüre edilen hücrelerde soğuk indüksiyonu uygulanan gruba kıyasla gen ekspresyonunun daha yüksek olduğu gözlenmesine rağmen bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür.

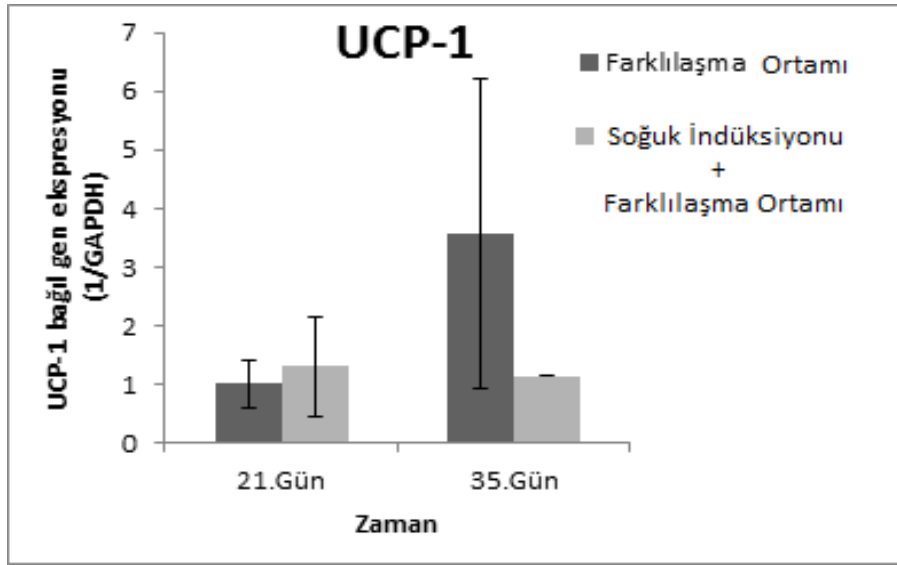
Kahverengi adipositlerde yüksek seviyede Cidea (cell death-inducing DNA fragmentation factor α -like effector A) mRNA ekspresyonu görülür [95]. Başlangıçta apoptotik bir gen olarak tanımlanan Cidea geni [96], UCP-1 aktivitesini doğrudan modüle ederek termogenez mekanizmasına etki eder [97]. Cidea'nın ifadesi KAD'daki UCP-1 ile sıkı bir şekilde ilişkilidir ve enerji harcamasında pozitif bir rol oynayarak obezitenin önlenmesiyle nedensel olarak bağlantılıdır [98]. Kemirgenlerde KAD'da yüksek bir Cidea ekspresyonu gözlenirken, BAD'da Cidea gen ekspresyonu saptanmaz [96]. Şekil 4.21'de 2B koşulda kültüre edilen AKH'lerdeki Cidea gen ekspresyonu analizi sonucu verilmiştir.



Şekil 4.21. İki boyutlu kültürlerde çoğaltılan AKH'lere ait bağıl Cidea gen ekspresyonu sonuçları. (Kontrol grubunun temel büyüme ortamında çoğaltılarak kontrol grubunu oluşturan hücrelerin olduğu durum, n=4, * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$).

Şekil 4.21'deki grafiğe göre kültürün 21. gününde hem farklılaşma grubunda, hem de soğuk indüksiyonu uygulanan gruptaki AKH'lerde Cidea gen ekspresyon düzeylerinde benzer düzeyde artış görülmektedir, ancak yalnızca farklılaşma grubunda kültüre edilen hücrelerdeki artış istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.001$). Kültürün 35. gününde ise farklılaşma grubundaki gen ekspresyonunun soğuk indüksiyonu uygulanan gruba göre daha yüksek olduğu ve bu sonucun anlamlı olduğu görülmektedir ($p<0.001$). Soğuk indüksiyonu uygulanan grupta ise farklılaşma grubuna nazaran daha düşük düzeyde gen ekspresyonu görülmüştür, ancak sonuç istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0.05$).

Şekil 4.22'de kahverengi adipositlerdeki termogenik özelliğin ana belirteci olan UCP-1'in 3B kültürlerdeki RT-PCR analiz sonuçları görülmektedir.



Şekil 4.22. Üç boyutlu kültürlerde çoğaltılan AKH'lere ait bağıl UCP-1 gen ekspresyonu sonuçları.

Elde edilen grafiğin (Şekil 4.22) sonuçlarına göre kültürün 21. gününde kahverengi adipogenik farklılaşma ortamıyla kültüre edilirken soğuk indüksiyonu uygulanan gruptaki AKH'lerdeki UCP-1 bağıl gen ekspresyonunun, soğuk indüksiyonu uygulanmayan gruba kıyasla daha yüksek olduğu görülmektedir. Otuz beşinci günde ise soğuk indüksiyonu uygulanmadan farklılaşma ortamında kültüre edilen hücrelerde UCP-1 gen ekspresyonunun daha yüksek olduğu ortaya çıkmıştır. Elde edilen bu sonuçlar istatistiksel açıdan anlamlı bulunmama ile birlikte ($p>0.05$), 3B kültürlerde PPAR- γ ve Cidea gen ekspresyonu sonuçlarıyla paralellik göstermektedir.

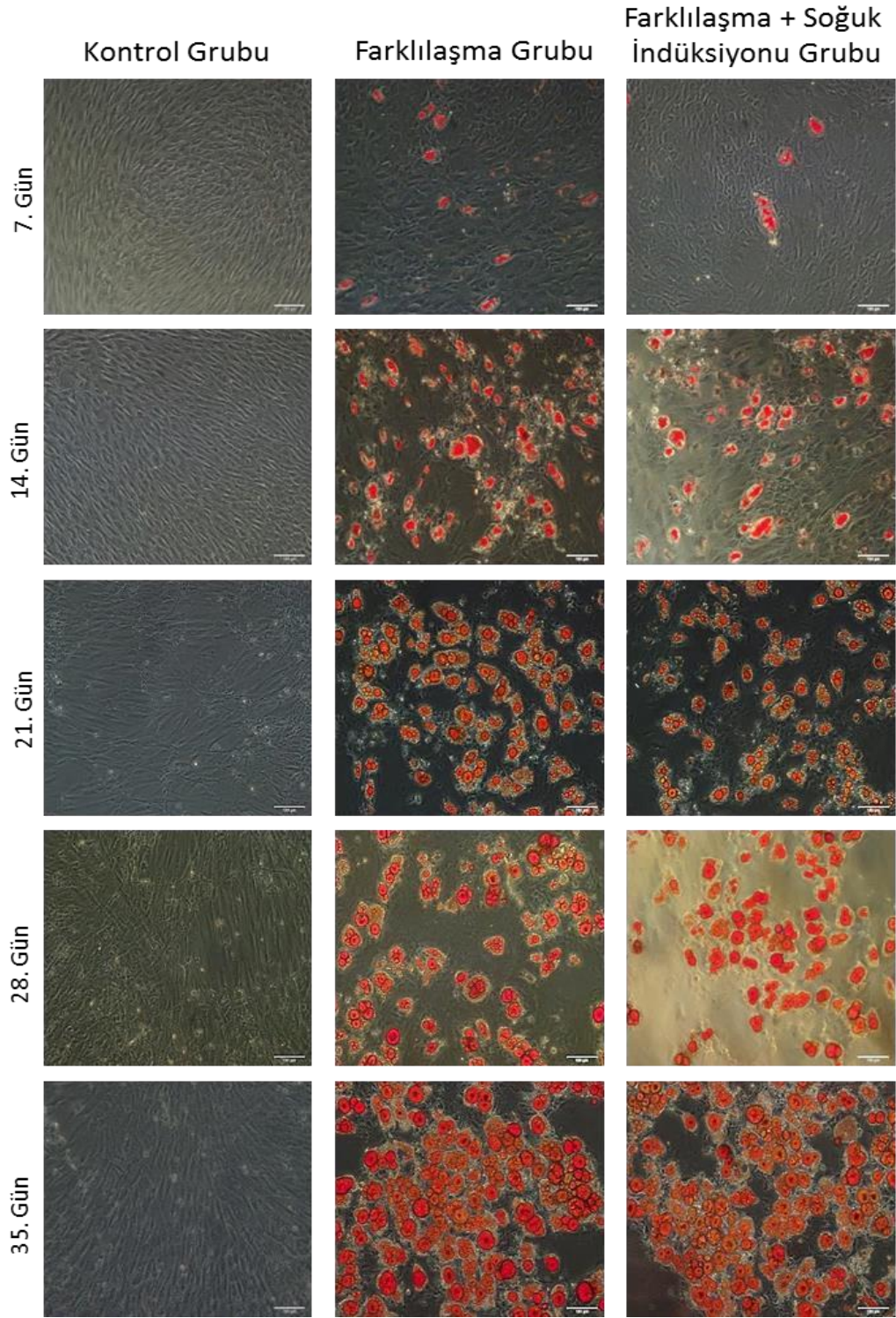
Üç boyutlu kültürlerde ise farklı fiziksel koşullarla tekrarlı bir şekilde RT-PCR denemeleri gerçekleştirilmiş olmasına rağmen Cidea gen ekspresyonu ve 2B kültürlerde de UCP-1 gen ekspresyonu sonucu elde edilememiştir.

Yapılan tüm RT-PCR analiz sonuçlarına göre kültürlerin ilk 3 haftasında AKH'lerin kahverengi adiposit farklılaşması için soğuk indüksiyonunun faydalı olabileceği, ancak 5. haftaya kadar sürdürülen kültürasyon çalışmaları için soğuk indüksiyonunun farklılaşmaya olumlu yönde etki etmediği sonucuna varılmıştır.

4.4.4.4. Oil Red O ile Lipit Damlacıklarının Boyanması

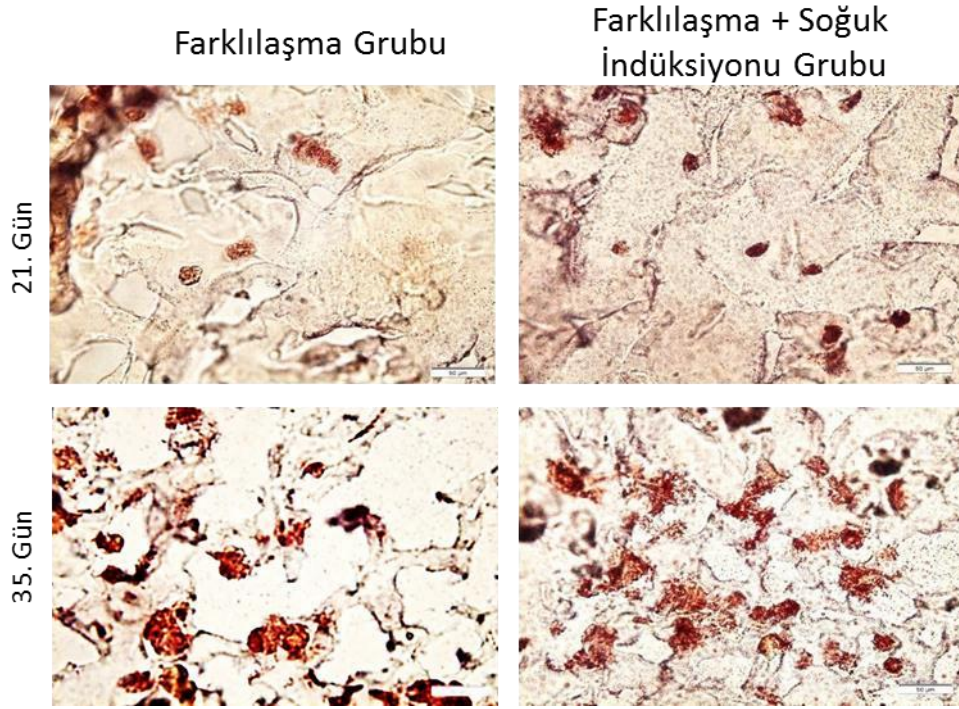
Hem 2B hem de 3B kültürlerde dekzametazon, indometazin, IBMX, insülin, rosiglitazon ve tiroid hormonu T3 ile kahverengi adipositlere farklılaşan hücrelerdeki lipit birikiminin nicel olarak görüntülenmesi için Oil Red O boyaması yapılmıştır.

İki boyutlu kültürde farklılaştırılan hücreler 7., 14., 21., 28. ve 35. günlerde Oil Red O ile boyanmıştır. Farklılaşma ortamında 35 gün boyunca tek tabaka olarak kültüre edilen AKH'lerde kültürün ilk haftasından itibaren lipitçe zengin vakuollerin oluşmaya başladığı görülmektedir (Şekil 4.23). Kültür süresi ilerledikçe farklılaşan hücrelerdeki artış oldukça belirgindir. Ayrıca farklılaşan hücrelerdeki lipit birikiminin artmasıyla hücreler belirgin olarak küresel morfoloji kazanmaya başlamıştır. Kontrol grubundaki AKH'lerde ise kültürün 35. gününde dahi herhangi bir boyanma görülmemiştir.



Şekil 4.23. İki boyutlu kültürde kahverengi adipositlere farklılaştırılan AKH'lerdeki lipit damlacıklarının ve kontrol grubundaki hücrelerin Oil Red O boyaması ile optik mikroskop altında 20X büyütmede görüntülenmesi.

Üç boyutlu kültürde ise hidrojel içine enkapsüle edilen hücrelerdeki lipit damlacıklarının boyanması için ise 21. ve 35. günlerde alınan örnekler, %4 (w/v) PFA ile 4°C'de 16 saat fikse edilmiş, ardından kriyostat kullanılarak 20 µm kalınlığında kesitler alınmıştır. Lamel üzerine aktarılan kesitler için ise 2B kültürlerine uygulandığı şekilde Oil Red O boyama protokolü uygulanmıştır. Hidrojel içinde kahverengi adipositlere farklılaşan AKH'lerin hücre içi lipit depoları kırmızı renkte boyanmıştır (Şekil 4.24).



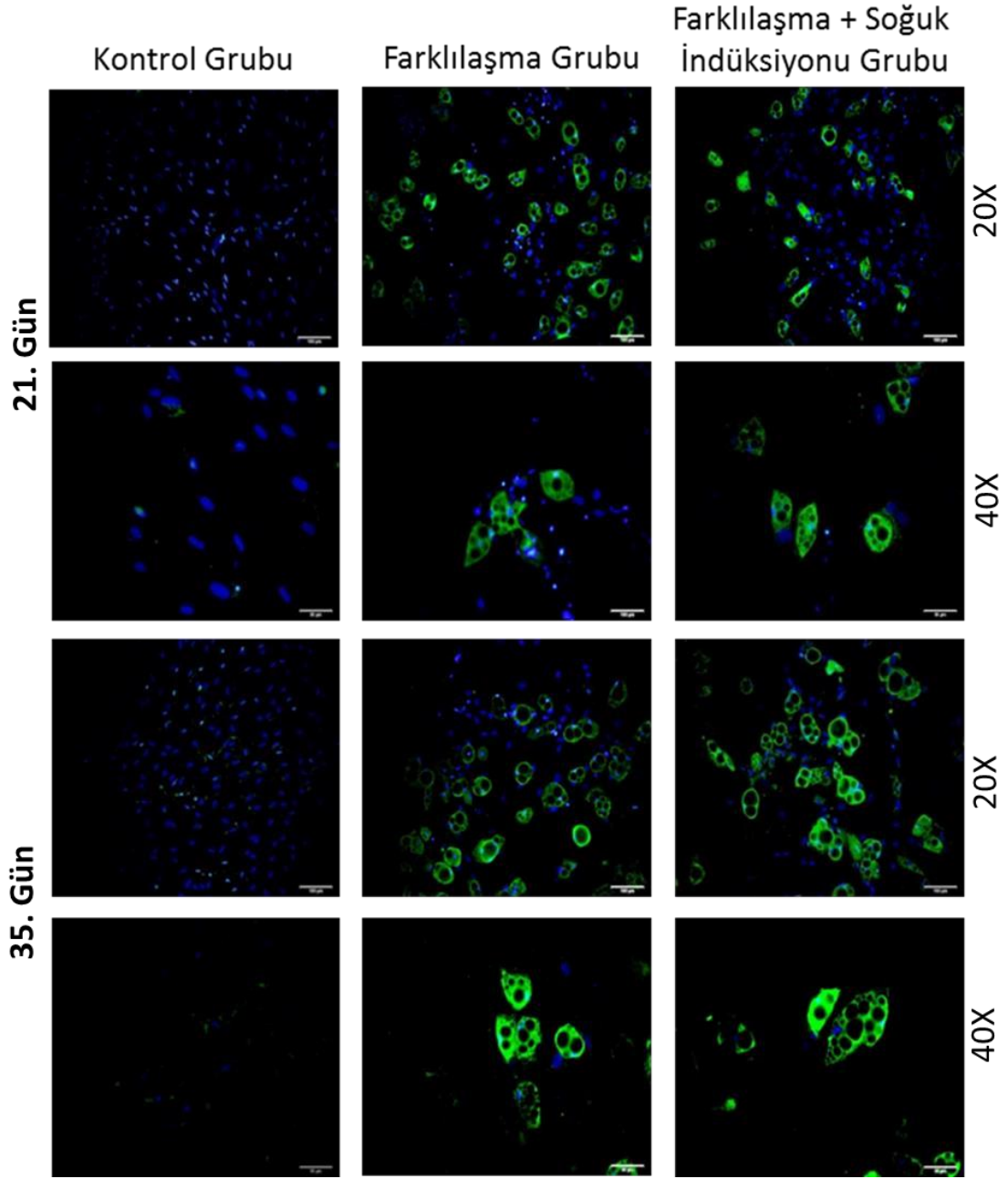
Şekil 4.24. Hidrojel içinde kahverengi adipositlere farklılaştırılan AKH'lerdeki lipit damlacıklarının Oil Red O boyaması ile optik mikroskop ile 40X büyütmede görüntülenmesi.

4.4.4.5. İmmünohistokimyasal ve İmmünohistokimyasal Analizler

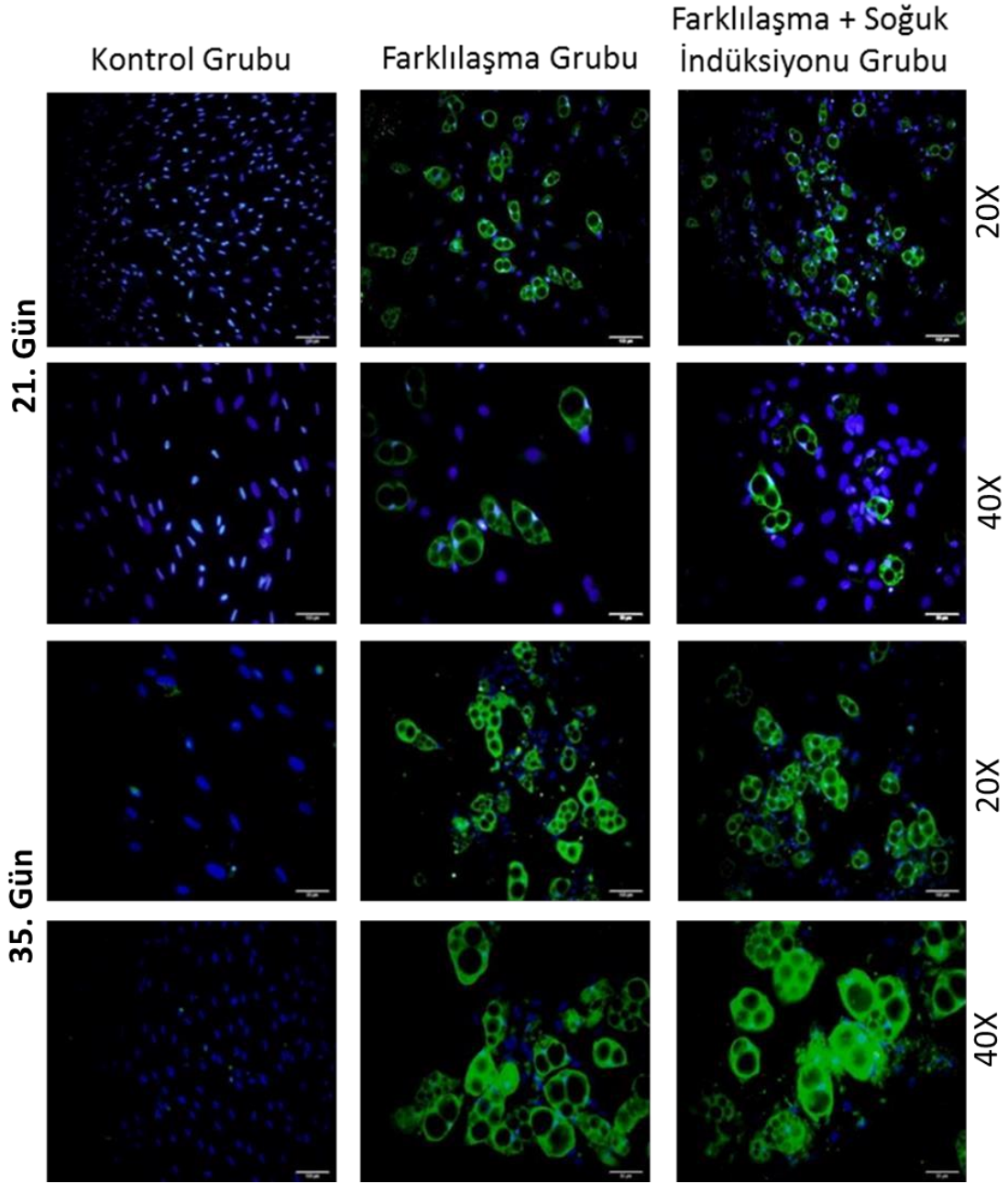
Tez çalışması kapsamında yapılan immünohistokimyasal ve immünohistokimyasal analizler uncoupling protein-1 (UCP-1) ve peroksizom proliferatör-aktive reseptör gamma (PPAR- γ) proteinlerinin ekspresyonunu ve hücresel lokalizasyonunu analiz etmek için 21. ve 35. günlerde toplanan örnekler ile gerçekleştirilmiştir. UCP-1, mitokondrinin iç zarı boyunca ATP sentezini ve oksidatif fosforilasyonu birbirinden ayırarak proton sızıntısı oluşturan mitokondriyal taşıyıcı proteindir [1, 36, 99, 100]. Bu özelliği sayesinde organizmadaki enerjinin ısı olarak dağıtılmasına neden olur. KAD'ın obezite ve glikoz metabolizması üzerindeki önemli etkileri, çok sayıda mitokondri

barındıran kahverengi adipositlerdeki UCP-1 proteininin bu eşsiz özelliği ile gerçekleşir [27, 36]. Soğuk maruziyeti adrenerjik reseptörler aracılığıyla kahverengi adipositlerin proliferasyonunu ve farklılaşmasını uyarır. Bu fizyolojik yanıt mitokondriyal biyogenez ve buna bağlı olarak UCP-1 genlerinin aktivasyonu ile meydana gelir [101]. Kahverengi adipositler dışındaki tüm doku elemanlarında (damarlar, sinirler, fibroblastlar, kas lifleri) ve unioöküler hücrelerde (beyaz adipositler gibi) tutarlı UCP-1 ekspresyonu görülmez [102]. Bir transkripsiyonel düzenleyici olan PPAR- γ hem beyaz, hem de kahverengi adipogenik farklılaştırma için önemli bir belirteçdir. PPAR- γ adipositlere özgü olan bir hormon reseptörüdür ve adipogenezin gerçekleşmesindeki anahtar faktördür [22].

Çalışma kapsamında gerçekleştirilen immüno Floresan analizlere göre hem 2B, hem de 3B kültürlerde kahverengi adipositlere farklılaştırılan hücrelerde UCP-1 ve PPAR- γ proteinlerinin varlığı net bir şekilde görülmektedir (Şekil 4.25 ve 4.26). Floresan ataçmanlı optik mikroskop (2B kültür için) ve konfokal mikroskop (3B kültür için) ile elde edilen bu görüntülerden özellikle Şekil 4.25 ve 4.26 incelendiğinde farklılaştırılan AKH'lerde kahverengi adipositlere özgü multiöküler hücre yapısı oldukça belirgindir. Ayrıca kahverengi adipogenik farklılaştırma ajanlarını içermeyen DMEM-high glikoz besin ortamında kültüre edilen AKH'lerden oluşan kontrol grubu incelendiğinde ise herhangi bir immüno Floresan boyanmanın gerçekleşmediği görülmüştür. Bu durum adipogenik farklılaşmanın sadece farklılaştırma ortamıyla kültüre edilen hücrelerde gerçekleştiğini göstermektedir.

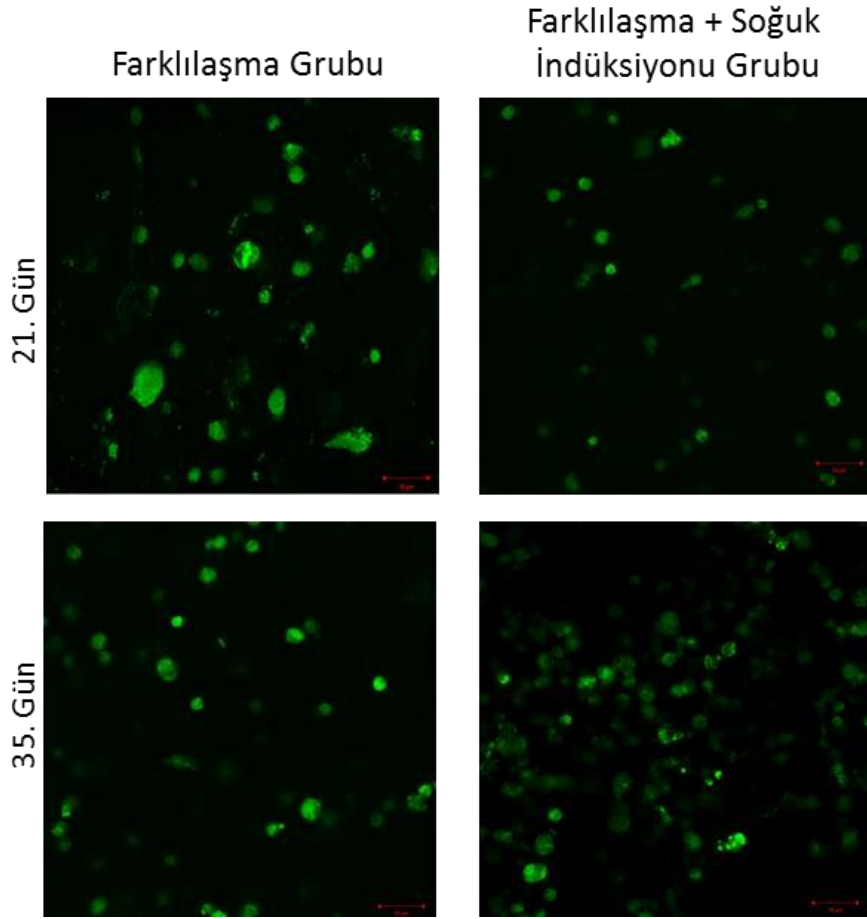


Şekil 4.25. İki boyutlu kültürde kahverengi adipogenik ortamda ve büyüme ortamında (kontrol grubu) kültüre edilen AKH'lerdeki UCP-1 proteininin 21 ve 35. günlerdeki immüno Floresan görüntüleri. Primer antikor olarak anti-UCP-1 antikorunu, sekonder antikor olarak Alexa Fluor 488 kullanılmıştır. Hücre çekirdeği DAPI ile mavi renkte görüntülenmiştir.

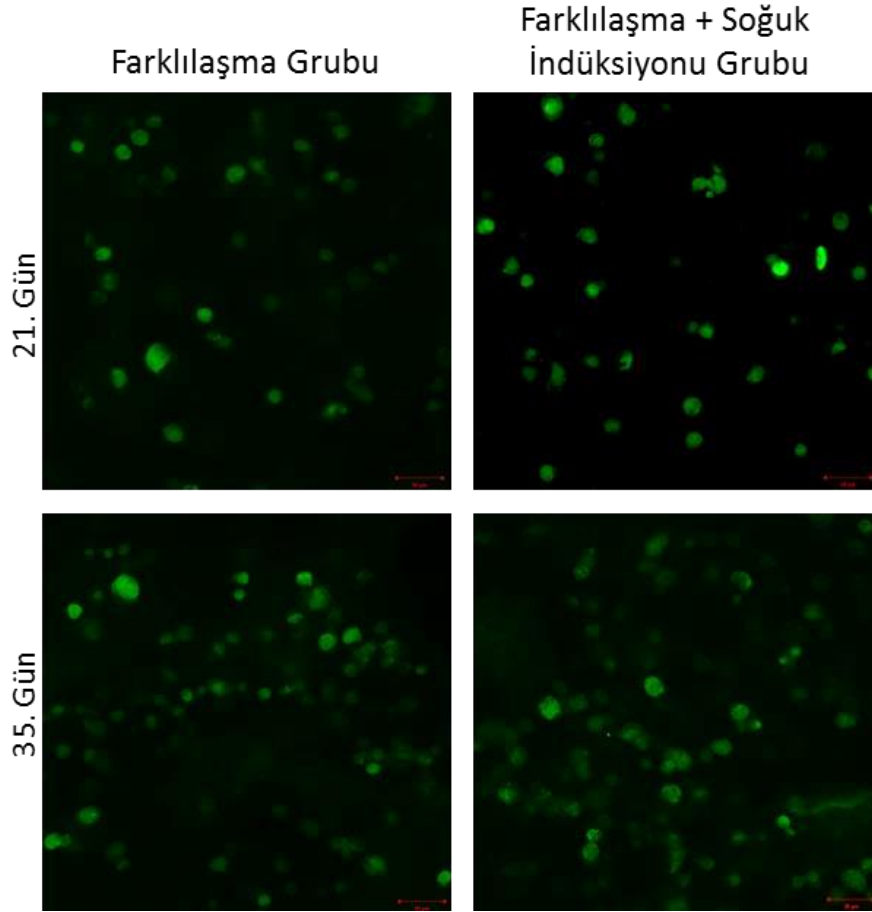


Şekil 4.26. İki boyutlu kültürde kahverengi adipogenik ortamda ve büyüme ortamında (kontrol grubu) kültüre edilen AKH'lerdeki PPAR- γ proteininin 21. ve 35. günlerdeki immünofloresan görüntüleri. Primer antikor olarak anti-PPAR- γ antikorunu, sekonder antikor olarak Alexa Fluor 488 kullanılmıştır. Hücre çekirdeği DAPI ile mavi renkte görüntülenmiştir.

Üç boyutlu kahverengi adipogenik farklılaştırma çalışması için gerçekleştirilen immünohistokimyasal analizler için ise örneklere immünofloresan boyama işleminden önce, Bölüm 3.4.4.6’da ayrıntılı bir şekilde açıklanan antijen gerilimi protokolü uygulanmıştır. Bu işlemle fiksasyon sırasında çapraz bağlantı proteinleri ve antijenik bölgeler arasında oluşan metilen köprüler kırılır ve antijenik bölgeler açığa çıkar. Böylece antikorların bağlanması mümkün hale gelir. Şekil 4.27 ve Şekil 4.28 incelendiğinde soğuk indüksiyonu uygulanan ve uygulanmayan iki grupta da UCP-1 ve PPAR- γ proteinlerinin varlığı görülmektedir. Bu durum, PEGDM hidrojel içine enkapsüle edilen AKH’lerde kahverengi adipogenik farklılaştırmanın başarılı bir şekilde gerçekleştiğini göstermektedir.



Şekil 4.27. Hidrojel içine enkapsüle edilen AKH’lerde kahverengi adipogenik farklılaştırma sonrasında eksprese olan UCP-1 proteininin immünofloresan yöntemle görüntülenmesi. Primer antikor olarak anti-UCP-1 antikorunu kullanılırken, sekonder antikor olarak Alexa Fluor 488 kullanılmıştır (Büyütme: 20X).

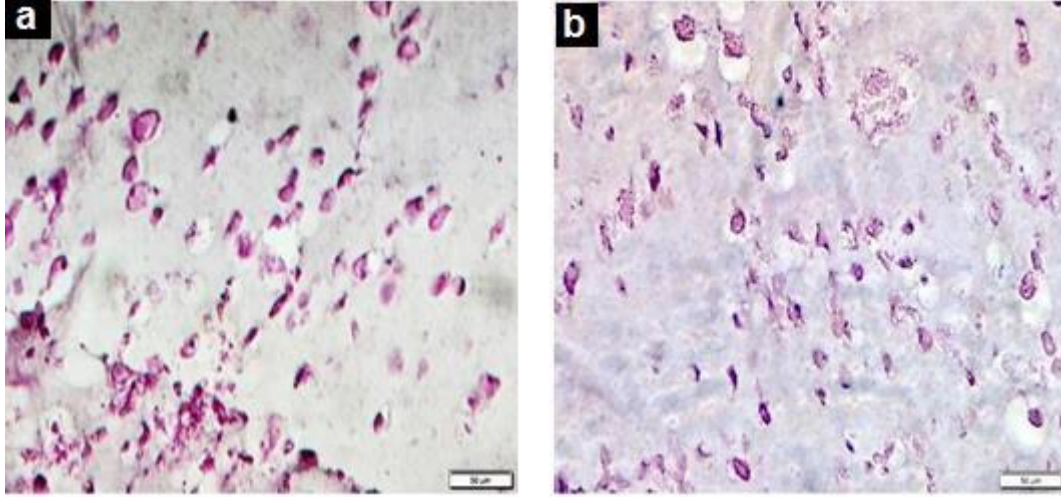


Şekil 4.28. Hidrojel içine enkapsüle edilen AKH'lerde kahverengi adipogenik farklılaştırma sonrasında eksprese olan UCP-1preoteininin immünofloresan yöntemle görüntülenmesi. Primer antikor olarak anti-UCP-1 antikor kullanılırken, sekonder antikor olarak Alexa Fluor 488 kullanılmıştır (Büyütme: 20X).

4.6.6.6. Histolojik Boyamalar

Sunulan tez çalışması kapsamında 3B kültürlerin 21. gününde toplanan örneklerle histolojik boyamalar gerçekleştirilmiştir. Bunun için hücre enkapsüle edilmiş PEGDM hidrojel örneklerine standart parafine gömme metodu uygulanmış ve 8 µm kalınlığında kesitler alınmıştır. Ardından lam üzerine aktarılan örnekler Hematoksilen ve Eozin ile boyanmıştır. Hematoksilen ile pH değeri yüksek olan hücre çekirdeği mavi-mor renkte boyanırken, Eozin ile pH değeri daha düşük olan sitoplazma içeriği pembe renkte boyanmaktadır. Şekil 4.29'da soğuk indüksiyonu uygulanan ve uygulanmayan örneklerin histolojik boyama fotoğrafları görülmektedir. Buna göre her 2 grupta da yağ

asitlerince zengin olan ve bu nedenle pH değeri düşük olan hücre sitoplazması pembe renkte boyanmıştır. Ayrıca adiposit farklılaşması nedeniyle hücrenin kenar kısımlarına kayan hücre çekirdekleri koyu mor renkte görülmektedir. Hidrojel içine enkapsüle edilen hücrelerin yapı içinde homojen dağılım gösterdiği anlaşılmaktadır. Buna ek olarak iki grupta da hücre dağılımı ve farklılaşması açısından histolojik görüntüleri bakıldığında belirgin bir fark olmadığı görülmüştür.



Şekil 4.29. PEGDM hidrojel içine enkapsüle edilip adipogenik farklılaşma gösteren AKH'lerin 21. gün, 40X büyütmedeki H&E boyama görüntüleri. (a) Farklılaşma grubu, (b) Soğuk indüksiyonu grubu.

5. GENEL SONUÇLAR

Sunulan tez çalışmasında sıçan beyaz adipoz dokusu kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin (AKH) 2B ve 3B *in vitro* hücre kültür koşullarında kahverengi adipositlere farklılaştırılması gerçekleştirilmiştir. İki boyutlu hücre kültürü çalışmaları için polistren hücre kültür kapları kullanılırken, 3B hücre kültürleri için PEGDM polimerinden elde edilen hidrojel kullanılmıştır. Ayrıca iki kültür koşulunda da kronik soğuk maruziyetinin kahverengi adipogeneze olan etkisi incelenmiştir. Gerçekleştirilen tüm deneysel çalışmalardan elde edilen bulgular sırasıyla aşağıda özetlenmiştir.

- ✓ Çalışma kapsamında ilk olarak polietilen glikol (PEG) polimeri mikrodalga yardımıyla metakrilik anhidrit ile fonksiyonelleştirilerek PEGDM sentezlenmiştir. Fonksiyonelleştirme işleminde mikrodalga enerjisi 1100 Watt ve 5 dk süreli olacak şekilde uygulanmıştır.
- ✓ Mikrodalga desteğiyle PEG polimerinin yapısına katılan metakrilat gruplarının varlığı FTIR analizi ile, metakrilatlanma derecesi ise ¹H-NMR analizi ile %99.4 olarak bulunmuştur. Böylece PEG'in başarılı bir şekilde fonksiyonelleştirilerek PEGDM'in sentezlendiği sonucuna varılmıştır.
- ✓ PEGDM'den hidrojel elde edilmesi için fotobaşlatıcı ajan olan Irgacure 2959 (I2959) ile UV ışık kullanılarak fotopolimerizasyon prosesi uygulanmıştır. Buna göre %10, %15 ve %20 (w/v) olmak üzere 3 farklı makromer konsantrasyonunda hazırlanan PEGDM çözeltileri %0.1 (w/v) I2959 ile karıştırılmış ve 5 cm mesafe ile 150 sn UV ışığa maruz bırakılarak hidrojel yapıları elde edilmiştir. Yüzde 10 konsantrasyonda hazırlanan çözeltilerde jelleşme sağlanamazken, %15 ve %20 konsantrasyondaki çözeltilerle jelleşme sağlanmıştır. Ayrıca minimum UV maruziyeti süresi 150 sn olarak belirlenmiştir.
- ✓ SEM fotoğraflarından PEGDM hidrojellerin içsel bağlantılı gözenek yapılarının varlığı görüntülenmiş, ortalama gözenek boyutunun $93.8 \pm 29.6 \mu\text{m}$ ve gözenek boyut aralığının ise $34.1 \mu\text{m} - 173.2 \mu\text{m}$ olduğu bulunmuştur.
- ✓ Hidrojellerin su tutma kapasitesi gravimetrik yöntemle belirlenmiş ve hidrojellerin yaklaşık 60 dakikada denge şişmesine ulaştığı görülmüştür.

Biyobozunurluk tayini için hidrojeller, PBS (pH:7.4) ortamında 21 gün boyunca bekletilmiş ve üretilen PEGDM hidrojellerde anlamlı bir kütle kaybının olmadığı belirlenmiştir.

- ✓ Hidrojellerin mekanik özelliklerinin belirlenmesi için ise 1 cm çap ve 1.7 cm yükseklikte, disk şeklinde hazırlanan örneklere tek eksenli sıkıştırma testi uygulanmış ve hidrojellerin elastisite modülü 286.37 (± 13.44) kPa olarak bulunmuştur.
- ✓ Hücre kültür çalışmaları için Hacettepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 52338575-59 sayılı kararı ile Wistar albino sıçanlarının derialtı beyaz adipoz dokularından izole edilip, hücre bankamıza eklenen mezenkimal kök hücreler (AKH) kullanılmıştır. Kullanılacak hücreler ilk olarak DMEM-high glikozla hazırlanan proliferasyon ortamında 6. pasaja kadar çoğaltılmış, daha sonra 2B ve 3B kahverengi adipogenez çalışmasına geçilmiştir. Çalışma kapsamında tek tabaka olarak çoğaltılan AKH'lerin iğsi ve fibroblastik morfolojileri optik mikroskop kullanılarak görüntülenmiştir.
- ✓ Soğuk indüksiyonunun *in vitro* koşulda kahverengi adipogenik farklılaşmaya olan etkisinin incelenmesi için 2B kültürlerde için gün aşırı, 15 dk, 16°C; 3B kültürlerde ise gün aşırı 1 saat, 16°C soğuk indüksiyonu uygulanmıştır.
- ✓ İki boyutlu kültürler için kültürün belirli günlerinde optik mikroskopla alınan görüntülerle farklılaşan hücrelerin lipit birikimi nedeniyle günden güne küreselleşen morfolojileri görüntülenmiştir.
- ✓ Hem MTT analiz sonuçlarına göre, hem de canlı-ölü boyama analizlerine göre %20 (w/v) makromer konsantrasyonuna sahip hidrojellerin %15 (w/v) konsantrasyondaki hidrojellerle kıyaslandığında hücresel canlılığı daha çok desteklediği görülmüştür. Bu nedenle 3B kahverengi adipogenez çalışması için deneysel çalışmaların %20 (w/v) makromer konsantrasyonuna sahip hidrojellerle yürütülmesine karar verilmiştir.
- ✓ Hidrojel içine enkapsüle edilen AKH'lerin kültürün 21. ve 35. görüntülerinden hücrelerin birbiri ile etkileşimde oldukları ve küresel morfoloji kazanarak adipositlere dönüştükleri görülmüştür.
- ✓ Çalışma kapsamında gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) analizleri ile 2B ve 3B kültürlerde kültürlerin 21. ve 35. günlerinde toplanan

örneklerle kahverengi adipogenik farklılaştırma gösteren hücrelerin Cidea, PPAR- γ ve UCP-1 gen ifadeleri belirlenmiştir.

- ✓ Elde edilen tüm RT-PCR analiz sonuçlarına göre kültürlerin ilk 3 haftasında kahverengi adipogenik farklılaşma için soğuk indüksiyonunun yararlı olduğu, ancak 5. haftaya gelindiğinde sürdürülen kültür çalışmalarında soğuk indüksiyonunun farklılaşmaya etkisinin olmadığı sonucuna varılmıştır.
- ✓ Tez çalışması kapsamında 2B ve 3B kültürlerde farklılaştırılan hücrelerdeki lipid damlacıkları Oil red O boyası ile boyanarak optik mikroskop ile görüntülenmiştir. Farklılaşan hücrelerdeki parlak kırmızı renkte boyanan lipid vakuelleri net bir biçimde görülmüş ve hücrelerin çaplarında artış meydana gelerek adiposit morfolojisi kazandıkları ortaya koyulmuştur. Kontrol grubundaki hücrelerde ise kültürün 35. gününde dahi herhangi bir boyanma görülmemiştir.

Sunulan çalışma kapsamında yukarıda açıklanan tüm deneysel veriler değerlendirildiğinde, beyaz adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin PEGDM hidrojellerine enkapsüle edilmesiyle elde edilen 3B hücre kültürleri *in vitro* ortamda kahverengi adiposit elde edilmesi için aday bir sistem olarak önerilebilir. Uygulanan soğuk indüksiyonunun uzun süreli *in vitro* hücre kültür çalışmaları kapsamında AKH'lerin kahverengi adipositlere farklılaşmasında belirgin bir etkisinin olmadığı görülmüştür. Gelecekteki çalışmalar için, hücre canlılığını, proliferasyonunu ve farklılaşmasını destekleyen hidrojellerin KAD farklılaşmasında etkinliği olan FGF21 ve BMP7 gibi biyolojik ajanlarla modifiye edilerek, biyolojik açıdan daha aktif matrislerle *in vitro* kültür çalışmalarının yürütülmesi önerilmektedir.

6. KAYNAKLAR

- [1] Yang, J.P., Anderson, A.E., McCartney, A., Ory, X., Ma, G., Pappalardo, E., Bader, J., Elisseeff, J.H., *Tissue Engineering Part A*, 23(7-8) (2017) 253-262.
- [2] Silva, F.J., Holt, D.J., Vargas, V., Yockman, J., Boudina, S., Atkinson, D., Grainger, D.W., Revelo, M.P., Sherman, W., Bull, D.A., Pater, A.N., *Stem Cell*, 32(2) (2014) 572-581.
- [3] Peirce, V., Carobbio, S., Vidal-Puig, A., *Nature*, 510(7503) (2014) 76.
- [4] Lee, M.H., Goralczyk, A.G., Kriszt, R., Ang, X.M., Li, Y., Summers, S.A., Toh, S., Yassin, M.S., Shabbir, A., Sheppard, A., Raghunath, M., *Scientific Reports*, 6 (2016) 21173.
- [5] Kiefer, F.W., *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 30(4) (2016) 479-485.
- [6] Tharp, K.M., Stahl, A., *Frontiers in Endocrinology*, 6, (2015) 164.
- [7] Sidossis, L., Kajimura, S., *The Journal of clinical investigation*, 125(2) (2015) 478-486.
- [8] Flynn, L., Woodhouse, K.A., *Organogenesis*, 4(4) (2008), 228-235.
- [9] Drury, J.L., Mooney, D.J., *Biomaterials*, 24(24), (2003) 4337-4351.
- [10] Escudero-Castellanos, A., Ocampo-Garcia, B.E., Dominguez-Garcia, M.V., Flores-Estrada, J., Flores-Merino, M.V., *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 27(12), (2016) 176.
- [11] Benoit, D.S., Schwartz, M.P., Durney, A.R., Anseth, K.S., *Nature Materials*, 7(10) (2008) 816.
- [12] Lin, C.C., Anseth K.S., *Pharmaceutical Research*, 26(3) (2009) 631-643.
- [13] Van Hove, A.H., Wilson, B.D., Benoit, D.S., *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, 80 (2013).
- [14] Lin-Gibson, S., Bencherif, S., Cooper, J.A., Wetzel, S.J., Antonucci, J.M., Vogel, B.M., Horkay, F., Washburn, N.R., *Biomacromolecules*, 5(4) (2004) 1280-1287.
- [15] Klingenspor, M., *Experimental Physiology*, 88(1) (2003) 141-148.
- [16] Pope, B.D., Warren, C.R., Parker, K.K., Cowan, C.A., *Trends in Cell Biology*, 26(10) (2016) 745-755.
- [17] Van Marken Lichtenbelt, W.D., Vanhommerig, J.W., Smulders, N.M., Drossaerts, J.M., Kemerink, G.J., Bouvy, N.D., Schrauwen, P., Teule, G.J., *The New England Journal of Medicine*, 360(15) (2009) 1500-1508.
- [18] Alkhouli, A., Mansfield, J., Green, E., Bell, J., Knight, B., Liversedge, N., Tham, J.C., Welbourn, R., Shore, A.C., Kos, K., Winlove, C.P., *American*

Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism, 305(12) (2013) E1427-E1435.

- [19] Choi, Y.S., Cha, S.M., Lee, Y.Y., Kwon, S.W., Park, C.J., Kim, M., Biochemical and Biophysical Research Communications, 345(2) (2006) 631-637.
- [20] Bugge, A., Dib, L., Collins, S., *Methods in Enzymology*, Elsevier, 233-247, **2014**.
- [21] Harms, M., Seale, P., Nature Medicine, 19(10) (2013) 1252.
- [22] Azhar, Y., Parmar, A., Miller, C.N., Samuels, J.S., Rayalam, S., Nutrition & Metabolism, 13(1) (2016) 89.
- [23] Ràfols, M.E., Endocrinología y Nutrición (English Edition), 61(2) (2014) 100-112.
- [24] Giralt, M., Villarroya, F., Endocrinology, 154(9) (2013) 2992-3000.
- [25] Flouris, A.D., Dinas, P.C., Valente, A., Andrade, C.M.B., Kawashita, N.H., Sakellariou, P., Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation, 31(2) (2017).
- [26] Bertholet, A.M., Kirichok, Y., Biochimie, 134 (2017) 28-34..
- [27] Van Marken Lichtenbelt, W.D., Vanhommerig, J.W., Smulders, N.M., Drossaerts, J.M., Kemerink, G.J., Bouvy, N.D., Schrauwen, P., The New England Journal of Medicine, 360(15) (2009) 1500-1508.
- [28] Labbé, S.M., Caron, A., Bakan, I., Laplante, M., Carpentier, A.C., Lecomte, R., Richard, D., The FASEB Journal, 29(5) (2015) 2046-2058.
- [29] Bargut, T.C.L., Aguila, M.B., Mandarim-de-Lacerda, C.A., Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation, 31(1) (2017).
- [30] Contreras, C., Nogueiras, R., Dieguez, C., Medina-Gomez, G., Lopez, M., Molecular and Cellular Endocrinology, 438 (2016) 107-115.
- [31] Calvani, R., Leeuwenburgh, C., Marzetti, E., Diabetes, 63(12) (2014) 3998-4000.
- [32] Cannon, B., Nedergaard, J., Physiological Reviews, 84(1) (2004) 277-359.
- [33] Bartelt, A., Heeren, J., Nature Reviews Endocrinology, 10(1) (2014) 24.
- [34] Feldmann, H.M., Golozoubova, V., Cannon, B., Nedergaard, J., Cell Metabolism, 9(2) (2009) 203-209.
- [35] Yoneshiro, T., Aita, S., Matsushita, M., Kameya, T., Nakada, K., Kawai, Y., Saito, M., Obesity, 19(1) (2011) 13-16.
- [36] Chondronikola, M., Volpi, V., Borsheim, E., Porter, C., Annamali, P., Enerback, S., Diabetes, 63(12) (2014) 4089-4099.
- [37] Lee, P., Smith, S., Linderman, J., Courville, A.B., Brychta, R.J., Dieckmann, W., Werner, C.D., Chen, K.Y., Celi, F.S., Diabetes, 63(11) (2014) 3686-98.
- [38] Gomillion, G.T., Burg, K.J., Biomaterials, 27(26) (2006) 6052-6063.

- [39] Patrick, C.W., Adipose tissue engineering: the future of breast and soft tissue reconstruction following tumor resection, in *Seminars in Surgical Oncology*, Wiley Online Library, **2000**.
- [40] Kuss, M., Kim, J., Qi, D., Wu, S., Lei, Y., Chung, S., Duan, B., *Acta Biomaterialia*, 71 (**2018**) 486-495.
- [41] Heath, C.A., *Trends in Biotechnology*, 18(1) (**2000**) 17-19.
- [42] Lee, Y.H., Petkova, A.P., Mottillo, E.P., Granneman, J.G., 15(4) (**2012**) 480-491.
- [43] Iwen, K.A., Backhaus, J., Cassens, M., Walzl, M., Hedesan, O.C., Heeren, J., Sina, C., Rademacher, L., Windjager, A., Haug, A.R., Kiefer, F.W., Lehnert, H., Schmid, S.M., *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 102(11) (**2017**) 4226-4234.
- [44] Barbatelli, G., Murano, I., Madsen, L., Hao, Q., Jimenez, M., Kristiansen, K., Giacobino, J.P., De Matteis, R., Cinti, S., *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 298(6), (**2010**) E1244-E1253.
- [45] Seebacher, F., Glanville, E.J., *PLoS One*, 5(9) (**2010**) 13022.
- [46] Nguyen, K.D., Qui, Y., Cui, X., Goh, Y.P., Mwangi, J., David, T., Mukundan, L., Brombacher, F., Locksley, R.M., Chawla, A., *Nature*, 480(7375) (**2011**) 104.
- [47] Tsuboyama-Kasaoka, N., Tsunoda, N., Maruyama, K., Takahashi, M., Kim, H., Ikemoto, S., Ezaki, O., *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 247(2) (**1998**) 498-503.
- [48] Vargas, D., Rosales, W., Lizcano, F., *Stem Cells International*, (**2015**) 2015.
- [49] Cao, L., Choi, E.Y., Liu, X., Martin, A., Wang, C., Xu, X., Doring, M.J., *Cell Metabolism*, 14(3) (**2011**) 324-338.
- [50] Montanari, T., Pošćić, N., Colitti, M., *Obesity Reviews*, 18(5) (**2017**) 495-513.
- [51] Chatterjee, K., Young, M.F., Simon, C.G., *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, 14(4) (**2011**) 227-236.
- [52] Brandl, F., Sommer, F., Goepferich, A., *Biomaterials*, 28(2) (**2007**) 134-146.
- [53] Khetan, S., Guvendiren, M., Legant, W.R., Cohen, D.M., Chen, C.S., Burdick, J.A., *Nature Materials*, 12(5) (**2013**) 458.
- [54] Li, C., Mu, C., Lin, W., *RSC Advances*, 6(49) (**2016**) 43663-43671.
- [55] Caló, E., Khutoryanskiy, V.V., *European Polymer Journal*, 65 (**2015**) 252-267.
- [56] Patrick Jr, C.R., *Annual Review of Biomedical Engineering*, 6 (2004) 109-130.
- [57] Von Heimburg, D., Zachariah, S., Heschel, I., Kühling, H., Schoof, H., Hafemann, B., Pallua, N. Von Heimburg, D., *Biomaterials*, 22(5) (**2001**) 429-438.
- [58] Gentleman, E., Nauman, E.A., Livesay, G.A., Dee, K.C., *Tissue Engineering*, 12(6) (**2006**) 1639-1649.
- [59] Cho, S.W., Kim, S.S., Rhie, J.W., Cho, H.M., Choi, C.Y., Kim, B.S., *Biomaterials*, 26(17) (**2005**) 3577-3585.

- [60] Huber, B., Borchers, K., Tovar, G.E., Kluger, P.J., *Journal of Biomaterials Applications*, 30(6) (2016) 699-710.
- [61] Kawaguchi, N., Toriyama, K., Nicodemou-Lena, E., Inou, K., Torii, S., Kitagawa, Y., *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(3) (1998) 1062-1066.
- [62] Alhadlaq, A., Tang, M., JMao, J.J., *Tissue Engineering*, 11(3-4) (2005) 556-566.
- [63] Khoushabi, A., Schmocker, A., Pioletti, D.P., Moser, C., Schizas, C., Månson, J.A., Bourban, P.E., *Composites Science and Technology*, 119, (2015) 93-99.
- [64] Lin-Gibson, S., Jonas, R.L., Washburn, N.R., Horkay, F., *Macromolecules*, 38(7), (2005) 2897-2902.
- [65] Tanuma, H., Saito, T., Nishikawa, K., Dong, T., Yazawa, K., Inoue, Y., *Carbohydrate Polymers*, 80(1) (2010) 260-265.
- [66] Fairbanks, B.D., Schwartz, M.P., Bowman, C.N., Anseth, K.S., *Biomaterials*, 30(35) (2009) 6702-6707.
- [67] Bryant, S.J., Anseth, K.S., *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 64(1), (2003) 70-79.
- [68] Anonim, Live/Dead[®] Viability/Cytotoxicity Kit For Mammalian Cells, Product Information Sheet, Thermo Fisher, <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/L3224>, (Erişim Tarihi: 13 Eylül 2018).
- [69] Nacar, E., A. Nacar, *Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Dergisi*, 8(29) (2017) 46-49.
- [70] Callahan, L.A.S., Ginos, A.M., Childers, E.P., Weiner, S.D., Becker, M.L., *Acta Biomaterialia*, 9(4) (2013) 6095-6104.
- [71] Benoit, D.S., Durney, A.R., Anseth, K.S., *Biomaterials*, 28(1) (2007) 66-77.
- [72] Benoit, D.S., Anseth, K.S., *Acta Biomaterialia*, 1(4) (2005) 461-470.
- [73] Irmak, G., Demirtaş, T.T., Gümüşderelioğlu, M., *ACS Biomaterials Science & Engineering*, (2018).
- [74] Dobić, S.N., Filipović, J.M., Tomić, S.L., *Chemical Engineering Journal*, 179 (2012) 372-380.
- [75] Kumar, A., Lahiri, S.S., *International Journal of Pharmaceutics*, 323 (1-2) (2006) 117-124.
- [76] Shi, J., Hu, H., Xia, Y., Liu, Y., Liu, Z., *Journal of Materials Chemistry A*, 2(24) (2014) 9134-9141.
- [77] Fedorovich, N.E., Oudshoorn, M.H., Van Geemen, D., Hennik, W.E., Alblas, J., Dhert, W.J., *Biomaterials*, 30(3) (2009) 344-353.
- [78] Caliari, S.R., Burdick, J.A., *Nature Methods*, 13(5) (2016) 405.
- [79] Killion, J.A., Geever, L.M., Devine, D.M., Kennedy, J.E., Higginbotham, C.L., *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 4(7) (2011) 1219-1227.

- [80] Omidian, H., Hasherni, S.A., Askari, F., Nafisi, S., *Iranian J. of Polymer Science and Technology*, 3(2) (1994).
- [81] Lee, D., Zhang, H., Ryu, S., *Cellulose-Based Superabsorbent Hydrogels*, Springer, 2018.
- [82] Patel, N.R., Whithead, A.K., Newman, J.J., Caldorera-Moore, M.E., *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 3(8) (2016) 1494-1498.
- [83] Dobner, S., Bezuidenhout, D., Govender, P., Zilla, P., Davies, N., *Journal of Cardiac Failure*, 15(7) (2009) 629-636.
- [84] Bryant, S.J., Anseth, K.S., *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, 64(1) (2003) 70-79.
- [85] Shikhaliyeva, İ., Mezenkimal Kök Hücrelerin Osteojenik Farklılaşmalarının Bor Katkılı HAp-Kaplı Kitosan Doku İskelelerinde İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2015.
- [86] Jakoby, M., Schnittger, A., *Current Opinion in Plant Biology*, 7(6) (2004) 661-669.
- [87] Sarjeant, K., Stephens, K.J.M., *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(9) (2012) a008417.
- [88] Panettiere, P., Accorsi, D., Marchetti, L., Minicozzi, A.M., Orsini, G., Bernardi, P., *European Journal of Histochemistry: EJH*, 55(2) (2011).
- [89] Bal, N.C., Singh, S., Reis, F.C.G., Maurya, S.K., Pani, S., Rowland, L.A., *Journal of Biological Chemistry*, 292(40) (2017) 16616-16625.
- [90] Khan, T., Muise, E.S., Iyengar, P., Wang, Z.V., Chandalia, M., Abate, N., *Molecular and Cellular Biology*, 29(6) (2009) 1575-1591.
- [91] Galateanu, B., Dimonie, D., Vasile, E., Nae, S., Cimpean, Costache, A.M., *BMC Biotechnology*, 12(1) (2012) 35.
- [92] Mullis, K.B., *Scientific American*, 262(4) (1990) 56-65.
- [93] Navarro, E., Serrano-Heras, G., Castano, M.J., Solera, J., *Clinica Chimica Acta*, 439 (2015) 231-250.
- [94] Bustin, B., Benes, V., Nolan, T., Pfaffl, M.W., *Journal of Molecular Endocrinology*, 34(3) (2005) 597-601.
- [95] Boström, P., Wu, J., Jedrychowski, M.P., Korde, A., Ye, L., Lo, J.C., *Nature*, 481(7382) (2012) 463.
- [96] Gummesson, A., Jernas, M., Svensson, P.A., Larsson, I., Glad, C.A., Schele, E., *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 92(12) (2007) 4759-4765.
- [97] Christian, M., Kiskinis, E., Debevec, D., Leonardsson, G., White, R., Parker, M.G., *Molecular and Cellular Biology*, 25(21) (2005) 9383-9391.
- [98] Elabd, C., Chiellini, C., Carmona, M., Galitzky, J., Cochet, O., Petersen, R., *Stem Cells*, 27(11) (2009) 2753-2760.

- [99] Vergnes, L., Davies, G.R., JLin, R.Y., Yeh, M.W., Livhits, M.J., Harari, A., The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 101(11) (2016) 4440-4448.
- [100] Nguyen, K.H., Mishra, S., Nyomba, B.G., Obesity, 23(10) (2015) 2083-2092.
- [101] Golic, I., Velickovic, K., Markelic, M., Stancic, A., Jankovic, A., Vucetic, M., European Journal of Histochemistry: EJH, 58(3) (2014).
- [102] Manieri, M., Murano, I., Fianchini, A., Brunelli, A., Cinti, S., Nutrition, M., Metabolism and Cardiovascular Diseases, 20(8) (2010) 567-574.

7. EKLER

$\%15$ (w/v) PEGDM Zaman (sn)	1. Örnek	2. Örnek	3. Örnek	Ort.	Std. Sapma	Ws-Wd	(Ws- Wd)/Wd	%
0	101,1	111,7	103,9	105,57	5,49	0	0	0
10	150,2	142,7	140,7	144,53	5,01	34,7333	0,3163	31,63
20	158,2	155,7	143,6	152,50	7,81	42,7000	0,3889	38,89
30	155,9	159,6	153,9	158,50	2,89	48,7000	0,4435	44,35
40	164,5	160,1	160,9	161,83	2,34	52,0333	0,4739	47,39
50	168,3	159,7	167,7	165,23	4,80	55,4333	0,5049	50,49
60	167,4	165,4	164,6	165,80	1,44	56,0000	0,5100	51
70	168,7	163,1	165,1	165,63	2,84	55,8333	0,5085	50,85
80	169,1	163,9	163,5	165,50	3,12	55,7000	0,5073	51,03
90	168,6	163,5	164,8	165,63	2,65	55,8333	0,5085	50,85

$\%20$ (w/v) PEGDM Zaman (sn)	1. Örnek	2. Örnek	3. Örnek	Ort.	Std. Sapma	Ws-Wd	(Ws- Wd)/Wd	%
0	105,9	109,6	113,9	109,8	4,00	0	0	0
10	128,4	137,6	135,9	133,97	4,90	28,4000	0,2690	26,90
20	134,8	149,9	144,3	143,00	7,63	37,4333	0,3546	35,46
30	142,2	158,9	155,1	152,07	8,75	46,5000	0,4405	44,05
40	146,9	162,4	155,9	155,07	7,78	49,5000	0,4689	46,89
50	145,6	161,9	154,5	154,00	8,16	48,4333	0,4588	45,88
60	146,1	161,9	154,6	154,20	7,91	48,6333	0,4607	46,07
70	146,4	159,6	154,3	153,43	6,64	47,8667	0,4534	45,37
80	146,9	159,2	154,6	153,57	6,21	48,0000	0,4547	45,47
90	146,5	158,5	154,4	153,13	6,10	47,5667	0,4506	45,06

Ek 1. Şişme kinetiği çalışmaları ile ilgili veriler.

(Ws-Wd)/Wd: Şişme oranı

Ws: Şişmiş hidrojel ağırlığı (mg)

Wd: Kuru hidrojel ağırlığı (mg)

%15 (w/v) PEGDM Zaman (gün)	1. Örnek	2. Örnek	3. Örnek	Ort.	Std. Sapma	% Ağırlık Kaybı
0	0,1361	0,1164	0,1125	0,1117	0,0052	0
1	0,1068	0,1168	0,1098	0,1111	0,0051	0,4799
2	0,1045	0,1157	0,1119	0,1107	0,0057	0,8732
3	0,1058	0,1161	0,1101	0,1107	0,0052	0,9036
7	0,1049	0,1163	0,1009	0,1074	0,0080	0,4799
10	0,1045	0,1154	0,1120	0,1106	0,0056	0,6600
14	0,1051	0,1159	0,1118	0,1109	0,0055	0,6611
21	0,1056	0,1163	0,1093	0,1104	0,0054	0,1473

%20 (w/v) PEGDM Zaman (gün)	1. Örnek	2. Örnek	3. Örnek	Ort.	Std. Sapma	% Ağırlık Kaybı
0	0,1286	0,1364	0,1339	0,1330	0,0040	0
1	0,1296	0,1339	0,1327	0,1321	0,0022	0,6815
2	0,1301	0,1331	0,1348	0,1327	0,0024	0,2261
3	0,1293	0,1336	0,1331	0,1320	0,0024	0,7323
7	0,1279	0,1353	0,1342	0,1325	0,0040	0,3775
10	0,1288	0,1332	0,1358	0,1326	0,0035	0,2765
14	0,1282	0,1327	0,1353	0,1321	0,0036	0,6815
21	0,1282	0,1332	0,1367	0,1327	0,0043	0,2765

	%Ağırlık Kaybı=$((W_0-W_n)/W_0) \times 100$	
Zaman (gün)	%15 (w/v) PEGDM	%20 (w/v) PEGDM
0	0	0
1	0,4799	0,6815
2	0,8732	0,2261
3	0,9036	0,7323
7	0,4799	0,3775
10	0,6600	0,2765
14	0,6611	0,6815
21	0,1473	0,2765

Ek 2. Biyobozunurluk tayini ile ilgili veriler.

W_0 : Hidrojel örneğinin başlangıç ağırlığı (g)

W_n : Belirli günde ölçülen hidrojel ağırlığı (g)



HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS/~~DOKTORA~~ TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI'NA

Tarih: 19/02/2019

Tez Başlığı / Konusu: ADİPOZ KÖKENLİ MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN POLİETİLENGLİKOL DİMETAKRİLAT HİDROJELLERDE KAHVERENGİ VE BEYAZ ADİPOZ DOKUYA FARKLILAŞMALARININ İNCELENMESİ

Yukarıda başlığı/konusu gösterilen tez çalışmamın a) Kapak sayfası, b) Giriş, c) Ana bölümler d) Sonuç kısımlarından oluşan toplam 94 sayfalık kısmına ilişkin, 15/02/2019 tarihinde ~~şahsım~~/tez danışmanım tarafından Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 3 'tür.

Uygulanan filtrelemeler:

- 1- Kaynakça hariç
- 2- Alıntılar hariç/~~dâhil~~
- 3- 5 kelimedenden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Çalışması Orjinallik Raporu Alınması ve Kullanılması Uygulama Esasları'nı inceledim ve bu Uygulama Esasları'nda belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini saygılarımla arz ederim.

19.02.2019

Tarih ve İmza

Adı Soyadı: Aslı Sena Karanfil
Öğrenci No: N16229756
Anabilim Dalı: Biyomühendislik
Programı:
Statüsü: Y.Lisans Doktora Bütünleşik Dr.

DANIŞMAN ONAYI

UYGUNDUR.

Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU
(Unvan, Ad Soyad, İmza)

8. ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı-Soyadı: Aslı Sena KARANFİL

Doğum Yeri: İstanbul

Medeni Hali: Bekar

E-posta: aslisenakaranfil@gmail.com

Adresi: Hacettepe Üniversitesi, Biyomühendislik ABD, Ankara

Eğitim

Lise: Ataköy Cumhuriyet Lisesi (2010)

Lisans: Yıldız Teknik Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü (2016)

Yüksek Lisans: Hacettepe Üniversitesi Biyomühendislik ABD (2019)

Yabancı Dil ve Düzeyi: İngilizce-İleri

Çalışma Alanları:

- Doku mühendisliği
- Hücre kültürü çalışmaları

Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi: Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Koordinasyon Birimi tarafından desteklen Lisansüstü Tez Projesi, Proje No: FYL-2018-17299, Adipoz Kökenli Mezenkimal Kök Hücrelerin 3 Boyutlu Hidrojellerde Kahverengi ve Beyaz Adipoz Dokuya Farklılaşmalarının İncelenmesi, 30,000 TL.

Tezden Üretilmiş Yayınlar: -

Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar:

Karanfil, A.S., Kaynak Bayrak, G., Gümüşderelioğlu, M., Adipoz kökenli mezenkimal kök hücrelerin 3B hidrojellerde kahverengi adipoz dokuya farklılaşmalarının incelenmesi, Poster Sunumu, 23. Biyomedikal Bilim ve Teknoloji Sempozyumu, 15-16 Aralık, İstanbul, 2018.