

**BİYOFİZİKSEL VE BİYOKİMYASAL UYARANLARLA
DESTEKLENMİŞ DOKU İSKELELERİ İLE MEZENKİMAL
KÖK HÜCRELERİN OSTEOJENİK FARKLILAŞMASININ
İNCELENMESİ**

**INVESTIGATION OF OSTEOGENIC DIFFERENTIATION OF
MESENCHYMAL STEM CELLS WITH SCAFFOLDS
SUPPORTED BY BIOPHYSICAL AND BIOCHEMICAL
STIMULANTS**

ANIL SERA ÇAKMAK

Prof. Dr. MENEMŞE GÜMÜŞDERELİOĞLU

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim - Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Biyomühendislik Anabilim Dalı için Öngördüğü

DOKTORA TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2014

ANIL SERA ÇAKMAK'ın hazırladığı ‘‘Biyofiziksel ve Biyokimyasal Uyaranlarla Desteklenmiş Doku İskeleleri ile Mezenkimal Kök Hücrelerin Osteojenik Farklılaşmasının İncelenmesi’’ adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **BIYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI**'nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Tülin KUTSAL

Başkan



Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU

Danışman



Prof. Dr. Mehlika PULAT

Üye



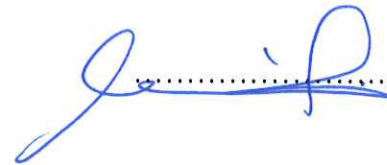
Prof. Dr. Mehmet Ali ONUR

Üye



Doç. Ayşe KARAKEÇİLİ

Üye



Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından **DOKTORA TEZİ** olarak onaylanmıştır.

Prof. Dr. Fatma SEVİN DÜZ

Fen Bilimleri Enstitü 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 eserlere 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.

15/07/2014

ANIL SERA ÇAKMAK

ÖZET

BİYOFİZİKSEL VE BİYOKİMYASAL UYARANLARLA DESTEKLENMİŞ DOKU İSKELELERİ İLE MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN OSTEOJENİK FARKLILAŞMASININ İNCELENMESİ

Anıl Sera ÇAKMAK

Doktora, Biyomühendislik Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU

Temmuz 2014, 170 sayfa

Sunulan tez çalışması kapsamında, farklı biyomalzemeler kullanılarak biyofiziksel ve biyokimyasal uyaranlar varlığında mezenkimal kök hücrelerin osteojenik farklılaşma potansiyellerinin incelenmesi hedeflenmiştir. Bu amaca yönelik olarak gerçekleştirilen deneysel çalışmalarda, kitosan doku iskeleleri ile fotostimülasyon, ipek biyomalzemeler ile elektrostimülasyon çalışmaları yürütülmüştür.

Fotostimülasyon çalışmalarında kullanılan kitosan doku iskeleleri, liyofilizasyon yöntemi ile üretilmiş ve yapısal özellikleri belirlenmiştir. Sıçandan izole edilen adipoz kökenli kök hücreler (AdMSC) TCPS (hücre kültür kabı) yüzeylerde ve kitosan doku iskelelerinde 28 gün boyunca kültüre edilmiştir. Fotostimülasyon çalışmaları 590-1395 nm dalga boyu aralığındaki ışıkları içeren plazma ark kaynağı kullanılarak yapılmış ve hücreler gün aşırı ışığa maruz bırakılmıştır. TCPS yüzeylerde uygulama mesafesi 10 cm, uygulama süresi 5 dk ve kitosan doku iskeleleri için uygulama mesafesi 10 cm, uygulama süresi 5 dk olarak belirlenmiştir. Işığın her iki koşulda da, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında hücre proliferasyonunu arttırdığı belirlenmiştir. TCPS yüzeylerde, ışık varlığındaki hücrelerin farklılaşmış morfolojisi, floresan mikroskop görüntüleri ile ortaya koyulmuştur. Ayrıca, optik mikroskop görüntüleri ile fotostimülasyonun uygulanan hücrelerde, hücre canlılığının daha uzun süre korunduğu belirlenmiştir. SEM analizi sonucu, ışık ile muamele edilen

kitosan doku iskelelerinde, kontrol grubuna göre, daha yoğun ve homojen bir hücre dağılımına rastlanmıştır. TCPS yüzeylerdeki matris mineralizasyonu Alkalın fosfataz-von Kossa (ALP-VK) boyamalar ile görüntülenmiş ve ışığın mineralize matris üretimini arttırdığı tespit edilmiştir. Kitosan iskeleler ile yapılan von Kossa boyamalarda da, ışık uygulanan doku iskelelerinin daha koyu boyandığı görülmüştür. Hücre farklılaşmasının moleküler düzeyde incelenmesi amacıyla gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) yapılmıştır. TCPS yüzeylerde ışığın kollajen tip 1 (*Col1a1*) ekspresyonunu uyardığı belirlenmiş ancak alkalın fosfataz (*Alp*), runt-iliskili transkripsiyon faktör (*Runx2*) ve osteopontin (*Opn*) ekspresyon seviyeleri arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır. Kitosan doku iskelelerinde ise, belirtilen genler açısından, ışığın gen ekspresyonları seviyesinde bir etkisine rastlanmamıştır.

Elektrostimülasyon çalışmalarında ipek filmler ve ipek doku iskeleleri kullanılarak, elektriksel alanın hem 2-boyutlu hem de 3-boyutlu sistemlerde, insan kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin (hMSC) osteojenik farklılaşması üzerindeki etkileri incelenmiştir. Bu amaçla, öncelikle hMSC'lerin kemik iliğinden izolasyonu ve karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Literatür bilgileri ışığında hücreler üzerine alternatif akım (AC) kullanılmasına karar verilmiştir. İpek filmler ile yürütülen elektrostimülasyon çalışmalarında, platin tel içeren ipek filmler kullanılmıştır. Optimizasyon çalışmaları sonucunda, 2.5 mm elektrot mesafesi ve 60 kHz frekans kullanılmasına karar verilmiştir. Yapılan analizler sonucu düşük voltajın hücre farklılaşması (10 mV), yüksek voltajın (50, 100, 250 ve 500 mV) ise hücre proliferasyonu üzerinde etkisi olduğu belirlenmiştir. Ayrıca elektrostimülasyon çalışmaları, farklılaşma ve büyüme ortamı olmak üzere farklı koşullarda yürütülmüş, elektriksel alanın, büyüme ortamı varlığında hücre proliferasyonunu, farklılaşma ortamı varlığında hücre farklılaşmasını uyardığı tespit edilmiştir. 10 mV ile yapılan çalışmalarda, Alizarin red boyamaları, elektriksel alanın, hücrelerin erken mineralizasyonunu uyardığını göstermiştir. Kültürün ilerleyen günlerinde, kontrol grubuna göre, elektrik uygulanan gruplarda mineralizasyon önemli derecede artmıştır. SEM analizi ile hücre-malzeme etkileşimleri ve elektriksel alan varlığında oluşan mineralize nodüller gösterilmiştir.

İpek doku iskeleleri ile yapılan çalışmalarda, kullanılan doku iskeleleri çözücü döküm-partikül uzaklaştırma yöntemi ile üretilmiştir. Üretilen doku iskeleleri, Petri kapları içerisinde, karbon elektrotlar arasına yerleştirilmiş ve kültür ortamı aracılığıyla elektriksel alan ile etkileşime girmeleri sağlanmıştır. 3-boyutlu sistemlerde yapılan elektrostimülasyon çalışmalarında, dışarıdan uygulanan elektriksel alan yanında, hücre içerisinde de elektriksel sinyaller oluşturmak hedeflenmiştir. Bu amaçla, hücre membranındaki iyon kanalları üzerinde etkisi olduğu bilinen, monensin ve glibenklamid adlı kimyasallar kullanılmış ve bu kimyasallar ile elektriksel alanın, osteojenik farklılaşma üzerindeki sinerjik etkisi incelenmiştir. İpek doku iskeleleri ile yapılan çalışmalarda, film çalışmalarında belirlenen 60 kHz frekans değeri olarak kullanılmıştır. Elektrotlar arası mesafe 8 mm ve optimizasyon çalışmaları doğrultusunda, voltaj 200 mV olarak seçilmiştir. 3-boyutlu sistemlerde, elektrostimülasyonun ve biyokimyasalların hücre proliferasyonu üzerinde etkisi gözlenmemiştir. Gruplar arasında karşılaştırılma yapıldığında, monensinin erken dönem osteojenik genler olan *ALP* ve *RUNX2* ekspresyonlarını arttırdığı görülmüştür. Örneklerdeki *ALP* aktivitesi de bu sonucu desteklemektedir. Monensinin *COL1A1*, *BSP* ve *OPN* ekspresyonlarını ise inhibe ettiği görülmüş, elektriksel alan varlığında bu inhibisyonun ortadan kalktığı belirlenmiştir. Diğer yandan glibenklamidin, özellikle *BSP* ve *OPN* gibi geç dönem osteojenik genler üzerinde etkisi olduğu tespit edilmiş, örneklerdeki Ca içeriği de benzer sonuçları vermiştir. Glibenklamid, elektriksel alan ile birlikte hMSC'ler üzerinde

sinerjik bir etki oluşturmuş ve osteojenik farklılaşmayı arttırmıştır. SEM analizi ile hücree morfolojisi incelenmiş, hücrelerin gözeneklerin iç kısmına yerleşerek, kollajen fiberler ve mineralize nodüller sentezledikleri belirlenmiştir. Tüm örnekler için, hemotoksilen&eoizin boyamaları etkin bir hücre-malzeme etkileşimini işaret etmektedir. Alizarin red ve von Kossa boyamaları da RT-PCR sonuçlarını desteklemektedir. Elektriksel alan varlığında, glibenklamid ile muamele edilen örneklerde, çok daha büyük ve homojen bir mineralizasyona rastlanmıştır.

Elde edilen veriler, mezenkimal kök hücrelerin metabolik aktivitelerinin düzenlenmesinde, fotostimülasyon ve elektrostimülasyon gibi biyofizksel uyaranların etkin bir rol oynadığını göstermektedir. Meydana gelen hücresel cevap, hücre tipine, mikroçevreye ve uygulama parametrelerine göre değişiklik göstermektedir. Hücre farklılaşmasında rol oynayan bir diğer faktör de biyokimyasal uyaranlardır. Bu amaçla kullanılan monensin ve glibenklamidin, elektrostimülasyon ile sinerjik bir etki oluşturduğu belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: kemik doku mühendisliği, fotostimülasyon, elektrostimülasyon, monensin, glibenklamid.

ABSTRACT

INVESTIGATION OF OSTEOGENIC DIFFERENTIATION OF MESENCHYMAL STEM CELLS WITH SCAFFOLDS SUPPORTED BY BIOPHYSICAL AND BIOCHEMICAL STIMULANTS

Anıl Sera ÇAKMAK

Doctor of Philosophy, Department of Bioengineering

Supervisor: Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU

June 2014, 170 pages

The aim of this study is to investigate the osteogenic differentiation potential of mesenchymal stem cells in the presence of biophysical and biochemical stimulants by using different biomaterials. For this purpose, photostimulation studies were carried out with chitosan scaffolds, while electrostimulation studies were realized by the use of silk biomaterials.

Chitosan scaffolds, which were used in photostimulation studies, were fabricated by lyophilization technique. Adipose derived mesenchymal stem cells (AdMSCs), which were isolated from rats, were cultured on TCPS surfaces and chitosan scaffolds for 28 days. Photostimulation studies were carried out by using a plasma arc source including 590-1395 nm wavelengths and cells were exposed to light every other day. For TCPS surfaces, exposure distance was 10 cm and exposure time was 5 min, while exposure distance and time were determined as 10 cm and 5 min, respectively for chitosan scaffolds. In both cases, it was seen that the light increased cell proliferation when compared to control group.

Florescence microscopy images showed the differentiated morphology of the cells on TCPS surfaces in the presence of light exposure. In addition, sustained viability was detected by optical microscopy images for the cells on which photostimulation was applied. SEM analysis showed that photostimulated scaffolds had denser and uniform cell distribution when compared to control groups. Matrix mineralization on TCPS surfaces was visualized by alkaline phosphatase-von Kossa (ALP-VK) staining and it was detected that the light exposure increased mineralized matrix production. Similarly in ALP-VK staining of chitosan scaffolds, darker staining was seen in the scaffolds, which were exposed to light. To analyze cell differentiation in molecular level, real time polymerase chain reaction (RT-

PCR) analysis was done. It was seen that the light stimulated the expression of *Col1a1* on TCPS surfaces, whereas no statistical difference was found for the expression levels of alkaline phosphatase (*Alp*), runt related transcription factor 2 (*Runx2*) and osteopontin (*Opn*). In chitosan scaffolds, no effects of light was found on the expression of prementioned genes.

In electrostimulation studies, silk films and silk scaffolds were used and the effects of electrical field on osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells (hMSCs) were investigated in both 2D and 3D systems. For this purpose, hMSCs were isolated from bone marrow and the characterization studies were carried out as a first step. In the light of the related literature, alternative current (AC) was selected for cell stimulation. For the electrostimulation studies carried out in 2D, silk films having platinum wires were used. After optimization studies, electrode distance was selected as 2.5 mm while frequency was selected as 60 kHz. The analysis showed that low voltage (10 mV) had influence on cell differentiation, whereas high voltage (50, 100, 250 and 500 mV) effected cell proliferation. In addition, electrostimulation studies were realized in two different culture conditions by using differentiation medium and growth medium, and the results demonstrated that cell proliferation was stimulated in growth medium, while cell differentiation was stimulated in differentiation medium. In the studies that were carried out with 10 mV, Alizarin red staining showed that the electrical field stimulated early mineralization of cells. In the following days of culture, mineralization was enhanced significantly in the electrostimulated groups when compared to control group. Cell-biomaterial interactions and the mineralized nodules formed in the presence of electrical field were visualized by SEM analysis.

For the electrostimulation studies carried out in 3D, silk scaffolds were fabricated by solvent casting-particulate leaching method. The scaffolds were inserted between carbon electrodes in Petri dishes, so that they could interact with the electrical field via culture medium. In 3D electrostimulation studies, in addition to external electrical field application, it was aimed to produce electrical signals within the cells. Towards this goal, chemicals like monensin and glibenclamide were used, which are known to have effects on ion channels on cell membrane and synergistic effect of these chemicals with the electrical field on osteogenic differentiation was examined. In the studies carried out with silk scaffolds, 60 kHz was used since this frequency value was determined in silk film studies. The distance between the electrodes was selected to be 8 mm and the voltage value was determined as 200 mV after optimization studies. In 3D systems no effects of electrostimulation and biochemicals were observed on cell proliferation. When the results obtained from different groups were compared, monensin was shown the increase the expression of early osteoblastic genes like *ALP* and *RUNX2*. The ALP activity of the samples also supported this finding. While monensin was shown to inhibit the expression of *COL1A1*, *BSP* and *OPN*, it was seen that the inhibition was disappeared in the presence of an electric field. On the other hand, it was detected that glibenclamide had effects on the expression of late osteogenic genes, particularly on *BSP* and *OPN*, and the Ca contents of the samples gave similar results. When used with electrical field, glibenclamide had a synergistic effect on hMSCs and enhanced osteogenic differentiation. Cell morphology was examined by SEM analysis and it was determined that cells were located at the inner parts of the pores synthesizing collagen fibers and mineralized nodules. For all samples, hematoxyline&eosin staining indicated the presence of active cell-material interactions. Alizarin red and von Kossa staining results supported the findings of RT-PCR analyses. For the samples, which were treated with glibenclamide, much more bigger and homogeneously distributed mineralization was obtained by the presence of electrical field.

The findings of this study showed that biophysical stimulants such as photostimulation and electrostimulation had an effective role on the regulation of metabolic activity of mesenchymal stem cells. However, the cellular response varies depending on the cell type, microenvironment and operational parameters. The other factors which contribute to cell differentiation are the biochemical stimulants. Monensin and glibenclamide, which were used as biochemical stimulants, were found to have a synergistic effect for the differentiation of hMSCs.

Keywords: bone tissue engineering, photostimulation, electrostimulation, monensin, glibenclamide.

TEŞEKKÜR

Öğrencisi olmanın gururunu her zaman taşıdığım, tez çalışmalarım boyunca benden desteğini esirgemeyen, bilimsel ve insani değerleriyle her zaman örnek alacağım çok değerli Hocam Menemşe Gümüşderelioğlu'na tüm sevgimle teşekkürlerimi sunuyorum.

Deneysel çalışmalarımın bir kısmını yürüttüğüm Tufts Üniversitesi, Biyomedikal Mühendisliği (Boston, ABD) Bölüm Başkanı Prof. Dr. David L. Kaplan ve ekibine, tüm desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Yurtdışında bulunduğum süre boyunca, 2214-A Yurt Dışı Doktora Sırası Araştırma Bursu kapsamında beni destekleyen TÜBİTAK Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı'na teşekkürlerimi sunarım.

Bilimsel yönünün yanında, tüm içtenliği ve samimiyeti ile yanımda olan sevgili Hocam Doç. Dr. Ayşe Karakeçili'ye teşekkür ederim.

Hayatımda oldukları için çok şanslı olduğum, birlikte daha nice anılar biriktirmeyi dilediğim sevgili dostlarım, Dr. Işıl Gerçek Beşkardeş'e, Özge Ekin Tunçay'a, Damla Çetin Altındal'a, Merve Çapkın Yurtsever ve Arda Yurtsever'e, Müşra Zeren'e, Ceren Kutlu'ya paylaştığımız her an için teşekkür ederim.

Yollarımızın kesişmesinden ve birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum sevgili arkadaşlarım Dr. Murat Şimşek'e, Nazife Ülker'e, Gülseren Irmak'a, Gökçe Kaynak'a, Sevcan Aldemir'e ve tüm Hücre ve Doku Mühendisliği Araştırma Grubu üyelerine teşekkürlerimi sunarım.

Sonsuz sevgilerini ve desteklerini her zaman hissettiğim, varlıkları bana güç veren canım anneme, kardeşlerim, Ceren, Rojan ve Rüzgar'a, dostukları kardeşliğe dönüşen Fatmagül Gün'e ve Şebnem Postacı Akbaş'a tüm kalbimle teşekkür ederim. İsimlerini tek tek sayamayacağım ama sevgilerini hep hissettiğim kocaman aileme ayrıca teşekkür ederim.

Hayatıma girdiği andan itibaren mutluluk kaynağım olan, sevgisi ve sabrıyla herşeyi daha anlamlı ve güzel yapan, tüm kalbimle sevdiğim canım eşim Soner'e yanımda olduğu her an için teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Kemik Doku.....	4
2.1.1. Kemik Dokunun Fizyolojisi ve Anatomisi	4
2.1.1.1. Kemiğin yapısı ve mekaniği	4
2.1.1.2. Kemiğin hücreyel organizasyonu	6
2.1.1.3. Kemiğin mekaniksel çevresi	7
2.1.2. Kemiğin Yapılanması.....	7
2.1.3. Doku İyileşmesi	8
2.2. Kemik Doku Mühendisliği	8
2.2.1. Hücreler	10
2.2.1.1. Mezenkimal kök hücreler: özellikleri ve kaynakları	11
2.2.1.2. Mezenkimal kök hücrelerin farklılaşması	13
2.2.1.3. Mezenkimal kök hücrelerin potansiyel klinik uygulamaları	14
2.2.2. Kemik Doku İskeleleri	15
2.2.2.1. Biyomalzeme seçimi	15
2.2.2.2. Doku iskelesi üretim yöntemleri	16
2.2.3. Kemik Doku Mühendisliğinde Biyosinyalizasyon	20
2.3. Biyofiziksel Stimülasyon.....	20

2.3.1. Fotostimülasyon	21
2.3.1.1. Işık kaynakları.....	21
2.3.1.2. Fotostimülasyonun moleküler mekanizması.....	22
2.3.1.3. Fotostimülasyona karşı oluşturulan hücresel cevap	25
2.3.1.4. Fotostimülasyon parametreleri.....	27
2.3.1.5. Fotostimülasyonun doku mühendisliğindeki kullanımı	30
2.3.1.6. Klinik uygulamalar	32
2.3.2. Elektrostimülasyon.....	33
2.3.2.1 Elektrostimülasyon metodları	34
2.3.2.2. Elektrostimülasyonun moleküler mekanizması	37
2.3.2.3. Elektrostimülasyona karşı oluşturulan hücresel cevap	38
2.3.2.4. Elektrostimülasyon parametreleri	41
2.3.2.5. Elektrostimülasyonun doku mühendisliğindeki kullanımı	42
2.3.2.6. Klinik uygulamalar	44
2.4. Biyokimyasal Stimülasyon	44
2.4.1. Monensin	48
2.4.2. Glibenklamid.....	48
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR	50
3.1. Deneyisel Çalışmalarda Kullanılan Kimyasal ve Biyolojik Malzemeler	50
3.2. Polimerik Sistemlerin Hazırlanması ve Karakterizasyonu	51
3.2.1. Kitosan Doku İskeleleri	51
3.2.1.1. Hazırlama yöntemi	51
3.2.1.2. Karakterizasyon çalışmaları.....	51
3.2.2. İpek Filmler ve Doku İskeleleri	53
3.2.2.1. İpek çözeltisinin hazırlanması.....	53
3.2.2.2. İpek ve platin tel içeren ipek filmlerin üretilmesi	53

3.2.2.3. İpek doku iskelelerinin üretilmesi	54
3.2.2.4. Taramalı elektron mikroskop (SEM) analizi	55
3.2.2.5. RGD fonksiyonizasyonu	55
3.3. Biyostimülasyonda Kullanılan Sistemler ve Deney Düzenekleri.....	55
3.3.1. Fotostimülasyon Düzeneği	55
3.3.2. Elektrostimülasyon Düzeneği	56
3.4. Hücre İzolasyonu ve Karakterizasyonu.....	57
3.4.1. Sıçan Kökenli AdMSC'lerin İzolasyonu.....	57
3.4.2. Sıçan Kökenli AdMSC'lerin Karakterizasyonu	57
3.4.3. İnsan Kökenli MSC'lerin İzolasyonu.....	59
3.4.4. İnsan Kökenli MSC'lerin Karakterizasyonu.....	59
3.5. <i>İn vitro</i> Biyostimülasyon Çalışmaları	60
3.5.1. Sıçan Kökenli Mezenkimal Kök Hücrelerin (AdMSC) Fotostimülasyon ile Osteojenik Farklılaşması.....	60
3.5.2. Fotostimülasyon Uygulaması.....	61
3.5.3. Fotostimülasyon Çalışmalarında Yapılan Hücre Kültürü Analizleri	61
3.5.4. İnsan Kökenli Mezenkimal Kök Hücrelerin (hMSC) Elektrostimülasyon ile Osteojenik Farklılaşması	64
3.5.5. Elektrostimülasyon Uygulamaları.....	64
3.5.6. Elektrostimülasyon Çalışmalarında Yapılan Hücre Kültürü Analizleri.....	65
3.6. İstatistiksel Analiz	68
4. DENEYSEL SONUÇLAR VE TARTIŞMALAR	69
4.1. Polimerik Biyomalzemelerin Hazırlanması ve Karakterizasyonu	69
4.1.1. Kitosan Doku İskelelerinin Hazırlanması.....	69
4.1.1.1. Kitosan doku iskelelerinin karakterizasyonu	70
4.1.2. İpek Biyomalzemelerin Üretilmesi	71
4.1.2.1. İpek ve platin tel içeren ipek filmlerin üretilmesi	72

4.1.2.2. İpek doku iskelelerinin üretilmesi	74
4.1.2.3. RGD fonksiyonallazasyonu	75
4.2. Hücre İzolasyonu ve Karakterizasyonu	77
4.2.1. Sıçan Kökenli AdMSC'lerin Karakterizasyonu	78
4.2.2. İnsan Kemik İliğı Kökenli MSC'lerin Karakterizasyonu	83
4.3. <i>İn vitro</i> Biyostimölasyon Çalışmaları	85
4.3.1. AdMSC'ler ile Yapılan Fotostimölasyon Çalışmaları	85
4.3.2. Fotostimölasyon Çalışmalarında Yapılan Hücre Kültürü Analizleri	86
4.3.2.1. Hücre proliferasyonunun belirlenmesi	86
4.3.2.2. Hücre morfolojisinin belirlenmesi	89
4.3.2.3. Matris mineralizasyonunun incelenmesi	93
4.3.2.4. Gen ekspresyonunun belirlenmesi	95
4.3.3. hMSC'ler ile Yapılan Elektrostimölasyon Çalışmaları	99
4.3.4. İpek Filmler ile Elektrostimölasyon Çalışmaları	100
4.3.4.1. Optimizasyon çalışmaları	101
4.3.4.2. Hücre kültürü analizleri	108
4.3.5. İpek Doku İskeleleri ile Elektrostimölasyon Çalışmaları	115
4.3.5.1. Optimizasyon çalışmaları	117
4.3.5.2. Hücre kültürü analizleri	118
5. GENEL SONUÇLAR	138
KAYNAKLAR	143
EK 1	161
EK 2	162
EK 3	163
EK 4	165
EK 5	166

ÖZGEÇMİŞ.....	167
---------------	-----

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

AgNO ₃	Gümüş Nitrat
Ca	Kalsiyum
Cl	Klor
CO ₂	Karbon Diyoksit
K	Potasyum
Li	Lityum
LiBr	Lityum Bromür
Mg	Magnezyum
Na	Sodyum
NaCl	Sodyum Klorür
Na ₂ CO ₃	Sodyum Karbonat
Rb	Rubidyum
V _{mem}	Membran Potansiyeli
W	Ağırlık
ZnO	Çinko Oksit
II	Gözeneklilik
ρ	Yoğunluk

Kısaltmalar

AC	Alternatif Akım
AdMSC	Adipoz Kökenli Kök Hücre
ALP	Alkalın Fosfataz
ASC	Yetişkin Kök Hücre
ATP	Adenozin Trifosfat
BAX	B-hücre Lenfoma 2 İlişkili X Proteini
BCL	B-hücre Lenfoma
BMP	Kemik Morfogenetik Protein
BSP	Kemik Sialoprotein
cAMP	Siklik Adenozin Monofosfat
Cbfa	Kor-bağlayıcı Faktör Altbirimi Alfa
CC	Kapasitif Bağlantı
CD	Başkalaşım Kümeleri
CFU-F	Koloni Oluşturan Birim-Fibroblastik
COL1A1	Kollajen Tip I Alfa I

Cox	Sitokrom C Oksidaz
CRY	Sirkadyan Ritm Protein Kriptokrom
C2C12	Fare Miyoblast Hücre Hattı
DAPI	4',6-Diamidino-2-fenilindol
DC	Doğru Akım
DD	Deasetilasyon Derecesi
DMEM	Dulbecco's Modifiye Eagle Ortamı
DNA	Deoksi Ribonükleik Asit
DPBS	Dulbecco Fosfat Tamponu Çözeltilisi
ECM	Ekstraselüler Matris
EDC	N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etil Karbodiimid Hidroklorür
EGF	Epidermal Büyüme Faktörü
ERK	Ekstraselüler Sinyal-Regüle Kinazlar
ES	Embriyonik Kök Hücre
FBS	Fötal Sığır Serumı
FSC	İleri Saçılma Kanalı
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
FGF	Fibroblastik Büyüme Faktörü
FITC	Floresan İzotiyosiyanat
Ga-Al-As	Galyum-Alüminyum-Arsenit
GAG	Glikozaminoglikan
GDF	Büyüme Farklılaşma Faktörü
HA	Hidroksiapatit
He-Ne	Helyum-Neon
HFIP	Hekzafloroizopropanol
HMDS	Hekzametildisilazan
HSF	Isı Şok Faktörü
HSPA1B	Isı Şok Proteini 1B
HSP1B	Isı Şok Proteini Beta 1
IC	İndüktif Bağlantı
IGF	Insulin-benzeri Büyüme Faktörü
IgG	İmmünoglobulin G
IL	İnterlökin
In-Ga-As-P	İndium-Galyum-Arsenit-Fosfat
IR	Kızılötesi

LLLT	Düşük Doz Lazer Terapisi
MC3T3-E1	Fare Osteoblastik Hücre Hattı
MEK	Mitojen Aktive Protein Kinaz
MEM	Minimum Esansiyel Eagle Ortamı
MES	2-(N-Morfolin)ethansülfonik Asit Hemisodyum
MHC	Ana Doku Uyumluluğu Kompleksi
mRNA	Haberci Ribonükleik Asit
MSC	Mezenkimal Kök Hücre
MTT	3-[4,5-Dimetiltiazol-2-il]-Difeniltetrazolyum Bromür
NF	Nükleer Faktör
NHS	N-Hidroksi Süksinimid
NIH3T3	Fare Embriyonik Fibroblast Hücre Hattı
NO	Nitrik Oksit
OCN	Osteokalsin
ODM	Osteojenik Farklılaşma Ortamı
OPN	Osteopontin
PBS	Fosfat Tamponu Çözeltisi
PCL	Polikaprolakton
PDGF	Platelet-kökenli Büyüme Faktörü
PDMS	Polidimetilsiloksan
PLGA	Poli laktid-ko-glikolik Asit
PPAR	Peroksizom Proliferator-aktive Reseptör
P13K	Fosfatidilinositol 3-Kinaz
RGD	Arjinin-Glisin-Aspartik Asit
RNA	Ribonükleik Asit
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
RT-PCR	Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RUNX2	Runt-ilışkili Transkripsiyon Faktörü 2
SAOS-2	İnsan Sarkoma Osteojenik Hücre Hattı
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
SSC	Yan Saçılma Kanalı
SUR	Sülfonilüre Reseptörü
TAZ	Bağlanma Motifi İçeren Transkripsiyonel Koaktivatör
TCPS	Tissue Culture Polystyrene (Hücre Kültür Kabı)
TE	Tris-HCl-EDTA

TEP	Trans-epitelyal Potansiyel
TGF- β	Transformik Büyüme Faktörü
TNF	Tümör Nekroz Faktörü
UV	Morötesi
VEGF	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
VK	von Kossa
β -TCP	Trikalsiyum Fosfat

1. GİRİŞ

Kemik doku, oldukça organize ve anizotropik bir dokudur. Vücutta kalsiyum ve fosfat deposu durumundadır, hematopoiezden sorumludur ve hareket için gerekli yapısal desteği sağlamaktadır. Kemiğin yeniden yapılanması, hücreler, hormonlar ve enzimler tarafından kontrol edilen, oldukça karmaşık bir süreçtir ve yaş, fiziksel aktivite ve mekanik faktörlerden oldukça etkilenmektedir [1]. Kemik hasarlarında, otograft ve allograft kullanımı ile ilgili kısıtlamalar, kemik greftleri oluşturmak için, biyomalzeme ve doku mühendisliği prensiplerinden yararlanmayı gündeme getirmiştir [2].

Kemik doku rejenerasyonu 4 temel bileşene ihtiyaç duymaktadır; morfogenetik sinyaller, bu sinyallere cevap verecek hücreler, sinyalleri taşıyacak ve hücre büyümesine olanak verecek doku iskeleleri ve uygulamanın yapılacağı vaskülarize bir transplantasyon bölgesi [3]. Yapılacak uygulamalarda etkin sonuçların elde edilebilmesi için bu parametrelerin ayrıntılı şekilde incelenmesi ve hasarlı bölgenin özellikleri gözönünde tutularak, biraraya getirilmesi gerekmektedir.

Doku iskeleleri, hücreler için geçici bir mikroçevre sağlayan biyomalzemeler olarak tanımlanabilir. Kemik doku mühendisliğinde kullanılan biyomalzemeler, temel olarak, hücresiz ve hücreli olmak üzere iki kısma ayrılabilir. Hücresiz sistemler herhangi bir şekilde hücresel bileşenler içermeyen ve kemik çimentosu gibi klinik uygulamalarda kullanılan ya da kullanım potansiyeli taşıyan sistemlerdir. Bu alanda kullanılan malzemeler, katı, absorbe edilebilir dolgu malzemeleri ya da kemik büyümesine izin verecek gözenekli malzemeler olarak sınıflandırılabilir. Hücreli sistemlerde ise, transplantasyon öncesi, belirlenen hücrelerin doku iskelelerine ekilmesi söz konusudur. Yeni nesil doku iskeleleri ise, malzemenin etkinliğini arttıracak biyosinyal moleküllerini taşımaktadır. Ayrıntılı olarak tanımlanmış biyosinyal moleküllerinden, transforming büyüme faktörü (TGF- β) ve kemik morfogenetik büyüme faktörü (BMP)'nin, embriyonik gelişim esnasında ve travma sonrası doku yenilenmesinde kemik oluşumunu desteklediği gösterilmiştir [3].

Kemik doku mühendisliğinde kullanılan tüm biyomalzeme yaklaşımlarında genel olarak, seramikler, polimerler ve kompozit malzemeler kullanılmaktadır. Seramikler ve polimerler, absorbe edilebilir ve edilemez olmakla beraber, polimerler doğal ve sentetik polimerler olarak tanımlanabilmektedir. Kemik doku mühendisliğinde sıklıkla kullanılan malzemeler, demineralize kemik, kollajen kompozitler, fibrin, kitosan, kalsiyum fosfat, poli(laktik-ko-glikolik asit) ve hidroksiapatit olarak sıralanabilir [3-6]. Üretilen doku iskelelerinin iki temel

özellği taşıması gerekmektedir; osteokondüktivite ve osteoindüktivite. Osteoindüksiyon, pluripotent hücrelerin, uygun koşullar altında, kemik yapımından sorumlu hücrelere farklılaşmaları olarak tanımlanabilir. Osteokondüksiyon ise, 3-boyutlu yapının, kemik oluşumuna olanak verecek şekilde, hücre büyümesini ve damarlanmayı desteklemesidir.

Mezenkimal kök hücreler (MSC), tamamen farklılaşmış dokularda bulunan ve rejenerasyonda görev alan hücrelerdir. Kemik iliğı, periosteum, kas, yağ, beyin ve deri dokusu olmak üzere pek çok yetişkin dokudan izole edilmiştir. Başlangıçta bu hücrelerin farklılaşma yeteneklerinin, bulundukları dokunun yetişkin hücreleri ile sınırlı olduğu düşünülmektedir. Ancak zamanla farklı dokulardaki hücrelere de farklılaşabildikleri ortaya koyulmuş ve bu özellik plastisite olarak tanımlanmıştır [7]. Mezenkimal kök hücrelerin *in vitro* koşullarda, bazı ekstrinsik ve intrinsik faktörlerin varlığı ile farklılaşmadan kalabildikleri, uygun koşullar altında ise değişik hücre hatlarına farklılaşabildikleri ortaya koyulmuştur [8]. MSC'ler, kendini yenileme kapasiteleri ve farklılaşma potansiyelleri nedeniyle, doku mühendisliği çalışmalarında en önemli hücre kaynağını oluşturmaktadır. MSC'ler ile yapılan çalışmalarda, *in vitro* koşullarda etkin bir hücre proliferasyonu ve farklılaşmasının sağlanabilmesi için biyofiziksel ve biyokimyasal uyarıların kullanılması kritik bir öneme sahiptir.

Fiziksel kuvvetlerin kemik doku üzerinde, doku mimarisini değiştirmek suretiyle etkili olduğu bilinmektedir. Mekanik deformasyonların kemik hücreleri içerisindeki elektriksel sinyalleri değiştirdiğı ve hücresel aktiviteleri kontrol ettiğı görülmüştür [1]. Kemik doku üzerinde etkili bu faktörler, **biyofiziksel uyarınlr** olarak tanımlanabilir. Bu tanımlama üzerinden, düşük yoğunluklu ses dalgaları [9], elektromanyetik alan [10], düşük yoğunluklu lazer ışınları [11] gibi pek çok uyarının osteojenik farklılaşma üzerinde etkinliğı araştırılmıştır. Fiziksel faktörlerin yanında, kemik doku rejenerasyonunda etkin olan bir diğr uyarın da, büyüme faktörleri, hormonlar ve sitokinleri kapsayan **biyokimyasal uyarınlardır** [12]. Elektriksel sinyallerin, proliferasyon, farklılaşma, göç gibi hücresel aktiviteler üzerindeki rolü göz önünde tutularak, geleneksel olarak kullanılan biyokimyasal uyarınlara alternatif moleküllerin de, osteojenik farklılaşma üzerinde etkili olabileceğı düşünülmektedir. Bu noktada yapılan bir çalışmada, hücre içerisinde elektriksel sinyaller oluşturmak amacıyla, hücre membranındaki iyon kanallarının aktivitesini ve buna bağılı olarak hücre membran potansiyelini değiştiren kimyasalların kullanımı söz konusu olmuştur [13].

Sunulan tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen deneysel çalışmalar 3 ana başlık altında toplanabilir. İlk kısımda, sıçan adipojenik doku kaynaklı mezenkimal kök hücreler (AdMSC) kullanılarak fotostimülasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Işık, TCPS yüzeylerde ve kitosan doku iskelelerinde AdMSC'ler üzerindeki etkisi, proliferasyon ve farklılaşma yönünden değerlendirilmiştir. Aynı zamanda hücrelerde meydana gelen morfolojik değişimler de görüntülenmiştir. Elektrostimülasyon çalışmaları ise 2-boyutlu ve 3-boyutlu malzemeler üzerinde yürütülmüştür. İpek filmler kullanılarak yapılan çalışmalarda, işlem parametreleri optimize edilmiş, elektriksel alan varlığında, hücre proliferasyonu, göçü, farklılaşması gibi hücresel aktiviteler değerlendirilmiştir. Son kısımda ise ipek doku iskeleleri ile yapılan çalışmalar sunulmuştur. Doku iskeleleri ile gerçekleştirilen çalışmalarda, elektriksel alanın yanında, monensin ve glibenklamid gibi hücre membranındaki iyon kanalları üzerinde etkili kimyasallar kullanılmıştır. Böylece hücre membran potansiyelindeki değişime bağlı, hücre içi elektriksel sinyallerin oluşumu gerçekleştirilmiştir. Hücre içinde ve dışında oluşturulan elektriksel sinyallerin osteojenik farklılaşma üzerindeki etkileri ayrıntılı olarak incelenmiş ve kemik rejenerasyonu için uygun bir doku modeli ortaya koyulmuştur.

2. GENEL BİLGİLER

Bu bölümde, yapılan tez çalışmasının temelini oluşturan konular ile ilgili literatür bilgisi sunulmuştur. Öncelikle kemik dokunun genel özellikleri, hücresel, fizyolojik ve mekanik açılardan ele alınmıştır. Daha sonra kemik doku mühendisliği tanımlanarak temel bileşenleri ortaya koyulmuştur. Bu amaçla doku iskelesi üretiminde kullanılan biyomalzemeler ve üretim yöntemleri özetlenmiştir. Doku mühendisliğinin diğer bileşeni olan hücreler sınıflandırılmış ve mezenkimal kök hücreler ayrıntılı olarak anlatılmıştır.

Son olarak doku farklılaşmasında görev alan uyaranlar, biyofiziksel ve biyokimyasal uyaranlar başlığı altında incelenmiştir. Biyofiziksel uyaranlar kapsamında kullanılan fotostimülasyon ve elektrostimülasyon uygulamaları, literatürden örnekler verilerek, detaylı olarak tartışılmıştır. Son kısımda, kemik doku mühendisliğinde kullanılan biyokimyasal uyaranlar özetlenmiş, çalışma kapsamında kullanılan monensin ve glibenklamid hakkında bilgi verilmiştir.

2.1. Kemik Doku

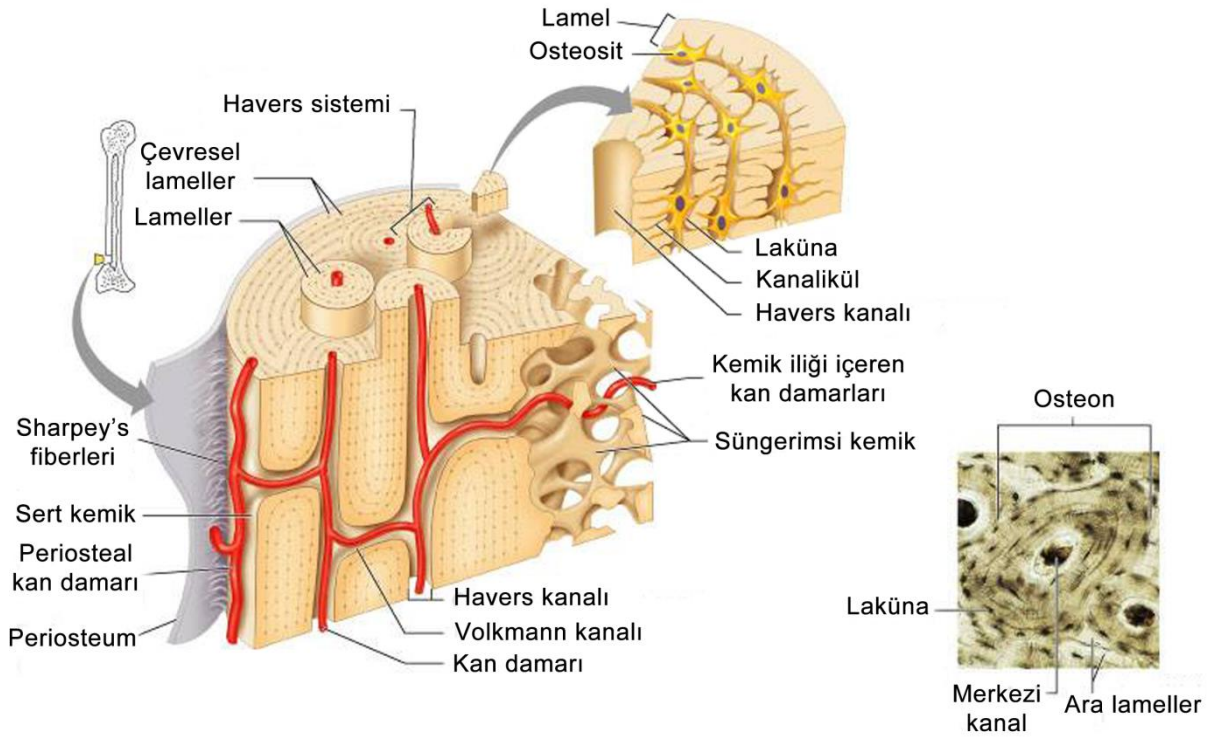
2.1.1. Kemik Dokunun Fizyolojisi ve Anatomisi

Kemik doku, karmaşık organizasyonu ile, vücut içerisinde birçok farklı işlevde rol almaktadır. Öncelikle hayati organların korunmasından ve kas dokusunun hareketinden sorumludur. Kemiğin malzeme olarak özellikleri ve doku organizasyonu yapıya, fizyolojik etkiler karşısında kırılmadan kalmasını sağlayacak, olağanüstü bir sağlamlık ve dayanım kazandırmaktadır. Ayrıca kemik doku, kalsiyum, fosfat gibi önemli mineraller için depo görevi görmektedir, ekstraselüler matris (ECM) içerisindeki iyon konsantrasyonlarını düzenlemektedir. Kemik iliği, kemik, kırıkta, tendon, kas, dermis ve yağ dokuya farklılaşabilen pluripotent özellikteki mezenkimal kök hücreler (MSC) için zengin bir kaynaktır. Bunun yanında kemik iliği, besin taşınımında ve immün cevabın oluşturulmasında görev alan, kırmızı ve beyaz kan hücrelerinin oluşturduğu hematopoietik hücrelerin de üretildiği yerdir [14].

2.1.1.1. Kemiğin yapısı ve mekaniği

Yetişkin bir kemik doku temel olarak %80 **kortikal** (sert), %20 **trabekular** (süngerimsi) kemikten oluşmaktadır. Kortikal kemik, uzun kemiklerde ve diğer bazı kemik türlerinde, kemik iliğini çevreleyen oldukça sağlam ve yoğun bir yapıdır, ayrıca az sayıda hücrenin ve kan damarının yerleşmesine olanak verecek şekilde, yalnızca %10'u gözeneklidir. Kortikal kemiğin yapısal birimi “osteon” olarak adlandırılır. Osteonlar, “lamella” adı verilen

tabakaların biraraya gelmesi ile oluşmaktadır. Kan damarları, her osteonun merkezinde bulunan ve “Havers kanalı” olarak tanımlanan kanalda yer almaktadır. Kemik içerisindeki besin alışverişi burada yer alan kan damarları ile “kanalikuli” denilen yapılar ya da mikroölçekli kanallar aracılığı ile gerçekleştirilmektedir. Osteonlar kemik içerisinde uzunlamasına yerleşmiştir ve kortikal kemik anizotropiktir (Şekil 2.1). Eksensel olarak kortikal kemik 79-151 MPa gerilim ve 131-224 MPa sıkışma mukavemeti göstermektedir. Her ikisi için de elastik modül 17-20 GPa arasında değişmektedir [15].



Şekil 2.1. Kemik dokunun mikroskobik yapısı ([16]’ten değiştirilerek).

Süngerimsi ve gözenekli bir yapıya sahip olan trabekular kemik kaburga kemiklerinde, omurgada ve uzun kemiklerin uç kısımlarında bulunmaktadır. %50-90’ı içsel bağlantılara sahip gözeneklerden oluşan trabekular kemik yükleme gerilimi yönünde uzanmaktadır. Gözenekli yapı kan damarları ve kemik iliği içermekle beraber, kortikal kemik ile karşılaştırıldığında oldukça düşük bir mekanik dayanıma sahiptir. Trabekular kemiğin dayanımı ve elastik modülü, kemiğin yoğunluğuna bağlı olarak değişmekle beraber, gerilim ve sıkışma için sırasıyla 5-10 MPa ve 50-100 MPa arasındadır.

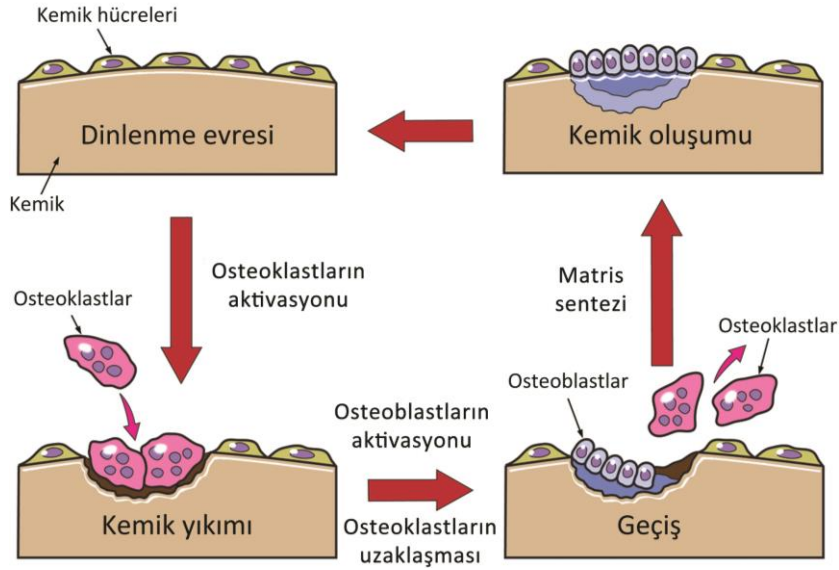
Kemiğe kendine özgü mekaniksel özellikleri kazandıran, nanoölçekteki kimyasal bileşenleridir. Kemik yaklaşık olarak, % 60 inorganik mineraller, % 30 organik yapılar ve

% 10 sudan meydana gelmektedir. Kalsiyum fosfat kristalleri, özellikle hidroksiapatit (HA), inorganik kısmı oluştururken, organik faz büyük oranda kollajenden meydana gelmektedir. Kollajen molekülü, kemik içerisinde, üçlü heliks yapısında uzanmakta ve birleşerek öncelikle fibrilleri (1.5-3.5 nm çap), daha sonra da fiberleri (50-70 nm) meydana getirmektedir. 2-3 nm kalınlığa sahip olan HA kristalleri, kollajen fiberler üzerine çökmektedir. Böylelikle HA kristalleri kompozit yapının sıkışma dayanımını arttırırken, kollajen fiberler enerjiyi dağıtarak kemiğe gerilim özelliklerini kazandırmaktadır [14, 15].

2.1.1.2. Kemiğin hücresel organizasyonu

Kemiğin organik-inorganik kompozit yapısı içerisinde 3 çeşit hücre yer almaktadır: osteoblastlar, osteositler ve osteoklastlar. **Osteoblastlar** MSC'lerden köken almakta ve "osteoid" adı verilen kemiğin organik matrisinin yapısına katılan kollajenöz proteinlerin salgılanmasında rol oynamaktadır. Olgun osteoblastlar osteoid ile çevrelendiklerinde matris sentezlemeyi bırakarak osteositlere dönüşür. **Osteositler**, mekanik uyarılara karşı oluşturulan sinyallerin düzenlenmesinde önemli rol oynar. Son hücre grubu olan **osteoklastlar**, hematopoietik hücrelerden köken alırlar ve salgıladıkları asidik proteolitik enzimlerle mineral tuzlarının ve organik matrisin çözünmesine neden olurlar (Şekil 2.2). Osteoblastlar ve osteoklastlar arasında bir denge söz konusudur ve bu dengenin yönü kimyasal, biyolojik ve mekanik faktörlerin varlığıyla değiştirilebilir.

Kemiğin oluşumu 5 evreye ayrılmıştır; durgun evre, aktivasyon, rezorpsiyon, yeniden yapılanma ve şekillenme. Süreç, durgun evre ile başlar ve bu evrede kemiğin yüzeyindeki hücreler inaktif durumdadır. Normal koşullarda kemiklerin serbest yüzeylerindeki hücrelerin % 80'i bu evrede bulunmaktadır. Biyokimyasal ya da fiziksel bir sinyal varlığında, mononükleer monositler ve makrofajlar, hasarlı bölgeye göç eder ve osteoklastların farklılaşmasını uyarak aktivasyon fazını başlatır. Osteoklastların organik ve inorganik yapıyı parçalayarak bir boşluk oluşturmasını takiben rezorpsiyon evresine geçilir. Yeniden yapılanma sürecinde, osteoklastlar bölgeyi terkeder ve mononükleer-makrofaj benzeri hücreler yüzeyde sement benzeri yapıları salgılar. Son aşamada osteoblastlar, kemik matrisi ile boşluğu doldurarak yeni osteonların oluşmasını sağlar. Sonraki aşamada kollajen demetlerinin oluşumunu mineralizasyon takip eder. Süreç tamamlandığında tekrar durgun evreye geçilir [17].



Şekil 2.2. Kemik dokunun hücresel organizasyonu ([18]'ten değiştirilerek).

2.1.1.3. Kemiğin mekaniksel çevresi

Hücre-hücre etkileşimleri kemiğin fonksiyonlarının devamı için oldukça önemlidir. Kemiğin ECM'si peptitler, glikoproteinler, çözünür haldeki büyüme faktörleri, hormonlar, kollajen ve diğer proteinleri içeren karmaşık bir ortamdır. Kemik matrisi içerisinde yerleşen osteositler, mekanik uyarıları algılayarak, biyokimyasal moleküller aracılığıyla gerekli sinyalleri üretirler. Bu hücresel sinyaller kemik dokunun devamlılığı için kritik öneme sahiptir [17].

2.1.2. Kemiğin Yapılanması

Üç çeşit kemik oluşumu tanımlanmıştır; endokondral, intramembranöz ve apozisyonel kemik oluşumu. Endokondral kemikleşme, embriyonik dönemdeki uzun ve kısa kemiklerin oluşumunu tanımlar. Ayrıca kemik hasarlarının iyileşmesinde de bu tip kemikleşme görülür [17, 19]. Bu süreçte öncelikle progenitor MSC'ler kondrositlere ya da kıkırdak oluşumundan sorumlu diğer hücrelere farklılaşır. Bu hücreler olgunlaşarak kıkırdak matrisini oluşturur ve bu noktada çoğalma yeteneklerini kaybeder. Periosteumdan (uzun kemikleri çevreleyen tabaka) köken alan MSC'ler matris içerisine göç eder, burada farklılaşır ve çoğalır. Bu hücreler kıkırdaktan çok kemik doku oluşturmaya eğilimlidir ve kemik yapılanması devam ederken damarlanma için gerekli geçiş yollarını oluşturur. Osteosit ve rastgele düzenlenmiş kollajen fiberlerden oluşan bu yapı **olgunlaşmamış kemik** olarak tanımlanır ve mekanik açıdan oldukça zayıftır. Bu dokunun lamellar kemiğe dönüşmesi yavaş bir süreçtir ve bu sürecin sonunda belirli bir mekanik dayanıma sahip **olgun kemik** meydana gelir.

İntramembranöz kemikleşme kafatası gibi düz kemiklerin oluşumunda meydana gelir. Endokondral kemikleşmeye benzer bir süreç izlemekle beraber, burada kemik geçici bir kıkırdak yapı olmaksızın doğrudan mezenkimal dokudan meydana gelir. **Apozisyonel büyüme** ise, büyüme esnasında, var olan kemiklerde görülür ve osteoblastların matris içerisine salgıladığı tabakalar ile gerçekleşir. Bu süreçlerin tümü, kemik oluşumu, büyümesi ve doku devamlılığının sağlanması için, vücut içerisinde durmaksızın devam etmektedir [19].

Kemik devamlılığını sağlayan diğer bir süreç de, yoğun, lamellar kemiğin yeni bir Havers sistemi ya da ikincil bir osteona dönüşmesini içermektedir. Sement olarak adlandırılan kalsifiye mukopolisakkarit kılıf yeni ve eski kemik olmak üzere ikiye ayrılır. Bu tabakanın dışında kalan osteonların kan ile teması kesilir ve bir süre sonra hücreler ölür. Osteonların bu şekilde konumlanması, kemiğe sıkışma ve gerilim dayanımını kazandıran önemli bir unsurdur [20].

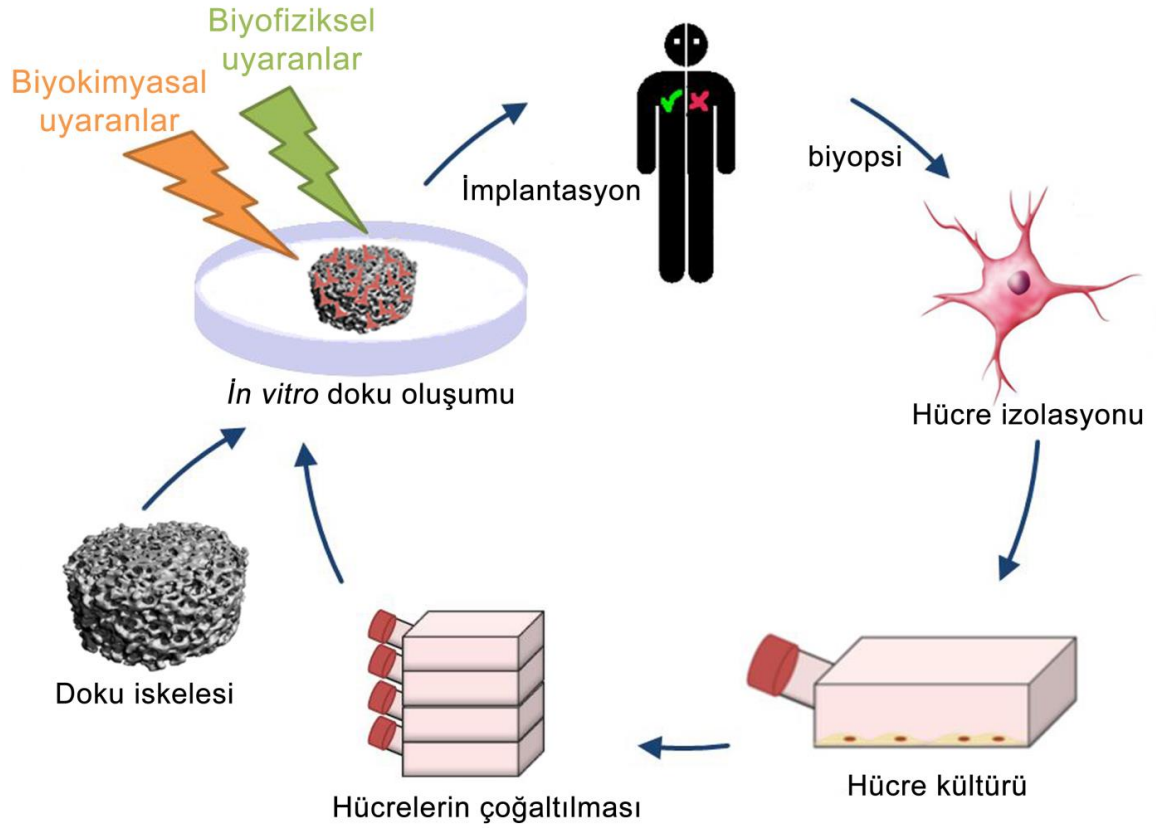
2.1.3. Doku İyileşmesi

Kemik hasarları, embriyonik kemik oluşumunda meydana gelen olayların tekrarlanmasına neden olur. Bu biyolojik olaylar 3 aşamada sınıflandırılır; inflamasyon, onarım ve yeniden yapılanma. İlk olarak kan damarlarının hasarlandığı bölgede akut bir inflamasyon cevabı oluşur ve bir hematoma meydana gelir. Bölgeye gelen nötrofil ve makrofajlar bir yandan nekroz sonrası oluşan hücre artıklarını sindirirken diğer yandan da büyüme faktörleri ve sitokinleri salgılar. Bu sinyaller çevre kemikte, kemik iliğinde ve periosteumda bulunan MSC'lerin hasarlı bölgeye göçünü uyarır. Kapiler oluşumlar ve fibroblastik aktiviteler sonucu fibrovasküler granülasyon dokusu meydana gelir. MSC'ler osteoblastlara farklılaşır ve blastema onarılır. Bu kısa inflamasyon evresinden sonra onarım evresine geçilir. Bu evrede osteoblastlar osteositleri oluşturur ve bu yapı kemik kallusu olarak adlandırılır. Son evrede, kollajen fiberler yeniden yapılır, şekillenir ve organize olarak mekanik yönden güçlü lamellar kemiği oluştururlar. Bazı kırıklarda, bu yeniden yapılanma süreci ve kemiğin eski halini alması bir yıldan fazla sürebilir. Yeterli aktif hücrenin bulunmadığı ya da hasarın çok büyük olduğu durumlarda ise doku iyileşmesi tamamlanamaz [17, 21].

2.2. Kemik Doku Mühendisliği

Travmalar ya da kemik hastalıkları ile oluşan kemik kayıpları, bazı durumlarda vücut tarafından iyileştirilememekte, hastanın bozulan sağlığı yaşam kalitesini düşürmekte ve bu durum toplumda sosyo-ekonomik açıdan pek çok soruna neden olmaktadır. Uygulanan geleneksel tedaviler, yan etkilerinin yanında sınırlı bir etkinliğe sahiptir. Bu nedenle kemik

kayıplarında ve hasarlarında kullanılacak alternatif bir tedaviye ihtiyaç duyulmaktadır. Bu noktada doku mühendisliği, mühendislik tekniklerini ve biyolojik prensipleri biraraya getirerek hasarlı dokunun rejenerasyonunu amaçlamaktadır. Doku mühendisliği stratejileri 3 başlık altında toplanabilir: (1) hücre-temelli uygulamalar; (2) büyüme faktörü-temelli uygulamalar ve (3) matris-temelli uygulamalar. Bu stratejiler tek başına kullanılacağı gibi bir arada da uygulanabilmektedir (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Kemik doku mühendisliği bileşenleri ([22]'dan değiştirilerek).

Başarılı sonuçlar elde etmek için uygulanan stratejinin osteojenik, osteoindüktif ve osteokondüktif elementleri biraraya getirmesi gerekmektedir. Osteojenik bileşenler kemik oluşturma yetisine sahip osteoprogenitör hücreler ya da farklılaşmış osteoblastlar gibi hücrelerden oluşmaktadır. Osteoindüktif faktörler ise, belirli hücreler için, farklılaşma ve proliferasyonu uyaran biyoaktif kimyasallardır. Kemik oluşumunu destekleyen biyomalzemeler ise osteokondüktiviteyi sağlamaktadır. Osteokondüktif bir doku iskelesi mekanik destek sağlarken, hücre yapışması ve damar oluşumu için elverişli olmalı, aynı zamanda da hücreler ve büyüme faktörleri için taşıyıcı bir görev üstlenmelidir [23].

Aşağıda kemik doku mühendisliğinin bu temel bileşenleri alt başlıklar halinde ayrı ayrı açıklanmıştır.

2.2.1. Hücreler

Kemik doku mühendisliğinde osteoblastlar, kök hücreler gibi çeşitli hücre kaynakları kullanılmaktadır. Hastanın kendisine ait biyopsiden izole edilen osteoblastlar “Altın standart” olup, otolog özellikte olduklarından immün cevap oluşturmazlar. Bu nedenle sıklıkla tercih edilmektedirler. Ancak bu yöntem birçok dezavantajı da beraberinde getirmektedir. Öncelikle elde edilen hücre sayısı ve çoğalma potansiyeli sınırlıdır. Ayrıca kemikle ilgili hastalıkların söz konusu olduğu durumlarda osteoblastların transplantasyonu, protein ekspresyonları yeterli olmadığı için, uygun değildir. Diğer bir seçenek de verici olarak insan olmayan bir canlıdan alınan osteoblastların (zenojenik) transplantasyonudur. Ancak bu durumda gerçekleşebilecek immün cevap, virüs gibi enfeksiyon ajanlarının taşınma riski, sosyal ve etik sorunlar nedeniyle bu tür kaynaklar çok fazla tercih edilmemektedir [24].

Bir diğer hücre kaynağını oluşturan kök hücreler, farklılaşmamış, yüksek proliferasyon kapasitesine sahip, kendini yenileyebilen (self-renewal) ve birçok hücreye farklılaşarak doku yenilenmesinde görev alan hücrelerdir. Kök hücrelerin farklılaşma potansiyelleri türlerine göre değişmektedir. Zigotun oluşmasından ve ilk bölünmesinden sonra meydana gelen hücreler “totipotent” olarak tanımlanır ve bu hücreler embriyoyu oluşturacak tüm doku hücrelerine, plasenta ve destek doku hücrelerine farklılaşabilir. Bir kaç gün sonra hücreler özelleşmeye başlayarak blastositi oluşturur. Blastosit içerisindeki hücre kütlesi **embriyonik kök hücreler** (ES) olarak tanımlanır ve **pluripotent** özelliktedir. Embriyonik kök hücreler 3 germ tabakasından köken alan her hücreye farklılaşabilir ancak plasenta ve destek doku hücrelerini oluşturamaz. Son olarak tamamen farklılaşmış dokularda bulunan **multipotent** özellikteki hücreler **yetişkin kök hücreler** (ASC) olarak adlandırılır. Bu hücreler, bulundukları dokunun embriyonik kökenine göre, sınırlı farklılaşma yeteneğine sahiptir [25].

ES’lerin biyomedikal ve doku mühendisliği uygulamalarındaki tüm kullanım potansiyeline rağmen halen bu konuda cevap bekleyen sorular bulunmaktadır. Öncelikle ES’lerin doğrudan farklılaşmasını sağlayacak bir yöntem ihtiyacı duyulmaktadır. Transplante edilen hücrelerin tümörojenik etkiler göstermeyeceğinden emin olmak gerekmektedir. Yapılan *in vivo* çalışmalarda, ES’lerin teratomlara ve teratokarsinomalara neden olduğuna dair bulgulara rastlanmıştır. Ayrıca ES’ler ile verici hücreleri arasında immünolojik uyumsuzluk

ortaya çıkabilmektedir. Bu durum “somatik nükleer klonlama transfer teknolojisi” ile çözülebilir. Son olarak bu konudaki etik ve sosyal kaygılar ES’ler ile çalışılmasının önündeki en büyük engel olarak halen varlığını korumaktadır [7].

Yetişkin kök hücreler, doku homeostazının sağlanmasında ve yaralanmalar ya da apoptoz sonucu meydana gelen doğal hücre kayıplarının yerini alarak, dokunun yenilenmesinde görev alır. Bu fonksiyonların yerine getirilmesinde kök hücrelerin kendini-yenileme ve farklılaşma mekanizmaları arasındaki denge kritik bir role sahiptir. Hücrelerin bulundukları niş (fizyolojik mikroçevre) içerisinde bu denge, hücre içerisindeki iç faktörler ve hücrenin bulunduğu çevreye bağlı olarak değişen dış faktörler ile kontrol edilmektedir [26].

Günümüze kadar yapılan çalışmalarda yetişkin kök hücreler; kemik iliğinden, periosteumdan, kas, yağ, beyin dokularından ve deriden izole edilmiştir. Yetişkin kök hücreler dokuya özgü olan ve dokuya özgü olmayan hücreler olarak ikiye ayrılabilir [25]. Hematopoietik kök hücreler, nöral kök hücreler, karaciğer dokusunda bulunan kök hücreler, kas dokusunda bulunan “satellit hücreleri”, deri ve saç folikülünde bulunan keratinosit kök hücreleri dokuya özgü kök hücre grubundandır. Kemik doku mühendisliğinin özellikle ilgilendiği kök hücreler ise, dokuya özgü olmayan ve “Mezenkimal Kök Hücreler” (MSC) olarak adlandırılan hücrelerdir.

2.2.1.1. Mezenkimal kök hücreler: özellikleri ve kaynakları

MSC’ler vücut içerisindeki bağ dokularda bulunur ve başta düz kas hücreleri, adipositler ya da kondrositler olmak üzere farklı hücrelere farklılaşabilirler. Yapılan çalışmalarda en sık kullanılan MSC kaynağı kemik iliğidir. İlk kez Petrakova ve arkadaşlarının 1963 yılında, kemik iliğinin bazı osteojenik öncülleri içerebileceğine dair görüşü sonrasında kemik iliği ile yapılan çalışmaların sayısı artmıştır. Friedenstein ve ark. kemik iliğinin osteojenik kök hücreleri içerebileceğini gösteren bir seri *in vivo* çalışma gerçekleştirmiştir. Bu hücrelerin kökenlerini ve yapılarını daha iyi anlayabilmek için fibroblast-benzeri hücrelerin, kültür kabının yüzeyine yapışma özelliklerinden yararlanarak, kemik iliğinden izolasyonları için bir yöntem geliştirilmiştir. Daha sonra, bu araştırmacılar, bu hücrelerin fibroblastik, non-fagositik ve klonojenik özelliklerde olduklarını ifade eden “Koloni oluşturan birim-fibroblastik” (CFU-F) terimini literatüre kazandırmıştır [7].

Bu çalışmalardan yaklaşık 20 yıl sonra Caplan bu hücreleri “mezenkimal kök hücreler” olarak adlandırmış ve belirli koşullar altında kemik, kıkırdak, yağ, kas, deri, tendon ve diğer mezenkimal kökenli hücrelere farklılaşabildiklerini ortaya koymuştur [27].

Bruder ve ark. MSC'lerin farklılaşma yeteneklerinin yanında *in vitro* koşullarda çoğaltılabildiklerini göstermişlerdir. Ayrıca Pittinger ve ark. bu hücrelerin ilerleyen pasajlarda kendiliğinden farklılaşmadıklarını belirlemişlerdir. MSC'lerin immün baskılayıcı özellikte oldukları ve allojenik ya da zenojenik olarak kullanılabilecekleri düşünülmektedir. Ancak bu konu henüz tam olarak açıklığa kavuşturulamamıştır [14, 28].

MSC'ler ile yapılan ilk çalışmalardan sonra, bu hücreleri kemik iliğindeki diğer hücrelerden ayırmak için, bazı özel işaretlerin belirlenmesi üzerinde çalışılmıştır. Öncelikle MSC'lere bağlanan SB10, SH-2, SH-3 ve SH-4 antikorları ortaya koyulmuştur. Daha sonra bu hücrelerin homojen olarak non-hematopoietik bir fenotip sergiledikleri ve SH-2, SH-3, CD-71, CD-44 ve CD-29 reseptörleri açısından pozitif oldukları gösterilmiştir. Bu işaretlerin yanında kök hücreler çeşitli sitokinleri, büyüme faktörlerini, ECM ve adezyonla ilişkili reseptörleri eksprese etmektedir. Ancak bu faktörlerin ekspresyonu için tüm MSC'leri kapsayan bir genelleme yapılamaz. MSC'lerin sahip olduğu bu heterojenite de birçok hücreye farklılaşabilmelerini sağlamaktadır [7]. Mezenkimal kök hücrelerin tanınmasında kullanılan özellikler Çizelge 2.1'de verilmiştir.

Çizelge 2.1. Mezenkimal kök hücrelerin tanınma kriterleri [29].

1. Standard kültür koşullarında plastic yüzeylere yapışma		
2. Fenotip	Pozitif ($\geq$ % 95 +)	Negatif ($\leq$ % 2 +)
	CD 105	CD 45
	CD 73	CD 34
	CD 90	CD 14 veya CD 11b
		CD 79 α veya CD 19
		HLA-DR
3. <i>In vitro</i> farklılaşma: osteoblastlar, adipositler, kondroblastlar		
<i>(In vitro</i> hücre kültüründe boyamalarla gösterilir)		

Özellikle doku mühendisliği çalışmalarında kullanılan bir diğer önemli mezenkimal kök hücre kaynağı da yağ dokusudur. Yağ doku da, kemik iliği gibi mezenkimden köken almıştır ve doku içerisinde kolayca izole edilebilen bir destek stroması bulunmaktadır. Burada bulunan kök hücreler, kararlı bir proliferasyon ve büyüme kinetiği gösterirken, MSC'ler gibi osteojenik, belli koşullarda adipojenik, miyojenik ve kondrojenik hatlara farklılaşabilirler. Hücre yüzey antijenleri incelendiğinde, adipoz kökenli kök hücrelerin (ADMSC), MSC'ler ile benzer olarak CD-29, CD-44, CD-71, CD-90, CD-105/SH2 ve SH3 ekspresyonu gösterdikleri ve CD-31, CD-34, CD-45 açısından negatif oldukları belirlenmiştir. Bunun

yanında ADMSC'ler iki yüzey antijeni açısından MSC'lerden ayrılır. ADMSC'ler CD-49 açısından pozitifken, CD-106 açısından negatiftir. MSC'lerde ise bu durum tam tersinedir. Yapılan araştırmalarda CD-106'nın hematopoez ile ilişkili olduğu belirlenmiştir. ADMSC'lerin bu antijen bakımından negatif olması non-hematopoietik bir dokuda bulunmalarından kaynaklanmaktadır [30].

2.2.1.2. Mezenkimal kök hücrelerin farklılaşması

Hücrelerin *in vivo* koşullarda farklılaşmalarını sağlayan mikroçevre, çözünür faktörlerin yanında, hücre-hücre ve hücre-matris etkileşimlerini içermektedir. Yetişkin kök hücre çalışmalarında, üstesinden gelinmesi gereken temel nokta hücre içi ve hücre dışı uygun sinyallerin sağlanması ve böylece *in vitro* koşullarda hücre farklılaşmasının kontrol edilmesidir. Bu amaca yönelik olarak gerçekleştirilen çalışmalarda sinyal yolları ve transkripsiyonel düzenlemeler ile ilgili birçok veriye ulaşılmakla birlikte henüz tüm farklılaşma mekanizmaları aydınlatılamamıştır.

MSC'lerin proliferasyonları ve özellikle adipojenik, kondrojenik ve osteojenik farklılaşmalarında etkili olan birçok hormon, vitamin, büyüme faktörü ve sitokin *in vitro* olarak test edilmiştir. MSC'lerin *in vitro* koşullarda proliferasyonlarının yanında kendini yenileme özelliklerinin ve farklılaşma potansiyellerinin korunmasının da büyük önemi vardır. Bu noktada FGF-2'nin (fibroblastik büyüme faktörü) önemli bir role sahip olduğu görülmüştür. Gen transferi kullanılarak yapılan çalışmalarda kemik morfogenetik protein (BMP) ekspresyonunun osteojenik, transformatik büyüme faktörü ($TGF-\beta$) ekspresyonunun ise kondrojenik farklılaşmayı uyardığı belirlenmiştir.

MSC'lerin en ayrıntılı şekilde karakterize edilmiş farklılaşma mekanizmaları osteojenik ve adipojenik farklılaşmalarıdır. Bu mekanizmalarda *RUNX2* ve *PPAR γ* transkripsiyon faktörleri rol oynamaktadır. Bu iki transkripsiyon faktörü TAZ adı verilen ko-aktivatörün kontrolü altındadır. TAZ, *RUNX2* bağımlı osteojenik gen ekspresyonunu aktive ederken, *PPAR γ* -bağımlı adipojenik gen ekspresyonunu baskılar.

Liu ve ark. yaptığı bir çalışmada telomeraz aktivitesinin de MSC farklılaşması üzerinde etkili olduğunu belirlemiştir. MSC'lerin de, diğer hücrelerde olduğu gibi, her bölünmede telomer bölgeleri kısalmakta ve replikasyon kapasiteleri azalmaktadır. Yapılan çalışmalarda telomeraz +/- fareler kullanılmış ve farelere ait MSC'lerin hiç bir koşulda adipojenik ya da osteojenik farklılaşmaya gitmediği belirlenmiştir. Bu doğrultuda, telomeraz aktivitesinin,

sadece MSC'lerin kendini yenileme mekanizmaları için değil, farklılaşma yetenekleri için de gerekli olduğu sonucuna varılmıştır [31].

2.2.1.3. Mezenkimal kök hücrelerin potansiyel klinik uygulamaları

MSC'lerin plastisite potansiyelleri ve kendini yenileme kapasiteleri klinik doku rejenerasyonu açısından büyük bir avantaj olarak görülmektedir. Bu amaçla yapılan çalışmalarda birçok hayvan modeli ortaya koyulmaktadır.

MSC'lerin klinikte kullanımına yönelik olarak yapılan çalışmaların büyük bir kısmı kemik hasarlarının giderilmesine yöneliktir. Burada amaçlanan biyomalzemeler aracılığıyla canlı implantlar oluşturmaktır. Bu alanda yapılan en heyecan verici klinik çalışmalar, 'osteogenesis imperfecta' ya da kırılğan-kemik hastaları üzerine gerçekleştirilmiş ve otolog MSC transplantasyonu yapılarak oldukça umut verici sonuçlar elde edilmiştir [32]. Kemikğin yanında artikular kıkırdak üzerine de çalışmalar gerçekleştirilmektedir. Ichinose ve ark., MSC'leri aljinat küreler içerisinde kondrojenik farklılaşma ortamında kültür etmişler ve kıkırdak nodüllerinin oluştuğunu gözlemlemişlerdir [33]. İlerleyen zamanlarda bu nodüllerin, ilginç bir şekilde, kalsifiye oldukları ve osteoblastik ekspresyon profili göstererek, endokondral kemikleşmeyi taklit ettiklerini belirlemişlerdir. Bu veriler 3-boyutlu yapıların kullanıldığı *in vitro* modellerde, MSC'ler aracılığı ile endokondral kemik oluşumunun gerçekleştirilebileceğini düşündürmektedir.

Bir diğer potansiyel uygulama ise kalp dokusunda bulunan MSC'lerin lokal rejenerasyonu sağlamasına yöneliktir. Yapılan birçok *in vivo* çalışmada, MSC transplantasyonunun, kardiyomiyopati ve iskemik hasarlı hayvan modellerinde, kardiyak fonksiyonlarını arttırdığını göstermektedir. Ancak MSC'lerin rejenerasyonu doğrudan sağladıkları ya da miyogenez ve anjiyogenezin MSC'lerin parakrin aktivitesi ile mi gerçekleştiği tam olarak aydınlatılamamıştır. Diğer bir çalışmada ise, korneaları kimyasal olarak hasara uğramış sıçanlarda, doku iyileşmesinde MSC'lerin paraklinik rolleri ortaya koyulmuştur [34].

Aynı zamanda MSC'lerin tedaviye yönelik çalışmalarda taşıyıcı olarak kullanılması da söz konusudur. Nakamura ve ark. yaptıkları bir çalışmada, adenoviral vektörler aracılığı ile IL-2 (interlökin-2) geni transfekte edilmiş MSC'lerin, tümör taşıyan hayvanlarda anti-tümörojenik etki gösterdiğini ve yaşam süresinin arttığını belirlemişlerdir. Literatürde, genetik olarak modifiye edilmiş MSC'lerin Parkinson hastalığından kalp rahatsızlığına kadar farklı hastalıkların tedavisinde kullanıldığı çalışmalar yer almaktadır.

Klinik uygulamalara yönelik olarak yapılan bu çalışmalarda MSC'lerin insanlarda ya da hayvanlarda allojenik reaksiyonlara neden olmadığı görülmüştür. Çok kesin olmamakla beraber bu hücrelerde doku uyumluluğu komplekslerinin (MHC-II) bulunmadığı düşünülmektedir. Bu noktada annenin bebeğine karşı geliştirdiği mekanizma ile benzer bir mekanizma söz konusudur. MSC'lerin *in vitro* koşullarda T-hücrelerinin proliferasyonu üzerinde immünbaskılayıcı bir etki gösterdiği ve inaktif T-hücreleri üzerinde bir etki göstermezken, aktif T-hücrelerinin apoptozunu uyardığı belirlenmiştir. Buradan yola çıkılarak MSC transplantasyonunun otoimmün hastalıkların tedavisinde kullanılabileceği düşünülmektedir. Ancak tüm bu çalışmaların klinikte uygulanabilir olması için, daha geniş araştırmalarla elde edilecek verilerin artırılması ve MSC'lerin, yüksek proliferasyon kapasitelerine bağlı olarak, ileride malignant yapılar oluşturup oluşturmayacağının anlaşılması gerekmektedir [35].

2.2.2. Kemik Doku İskeleleri

Kemik doku mühendisliğine yönelik olarak yapılan çalışmalarda, etkin bir kemik rejenerasyonunun sağlanması için, belirlenen hücrelerin ve uygun sinyallerin hasarlı bölgeye taşınması gerekmektedir. Bu noktada kullanılan doku iskeleleri, hücreler ve sinyal molekülleri için bir taşıyıcı görevi görmektedir.

2.2.2.1. Biyomalzeme seçimi

Daha önce de belirtildiği üzere, kemik doku rejenerasyonunda kullanılacak doku iskelelerinin 2 temel özelliği sağlaması gerekmektedir; **osteoindüksiyon** ve **osteokondüksiyon**. Malzemelerin osteoindüktif özellikleri sayesinde pluripotent hücreler, osteoblastlar gibi özelleşmiş hücrelere farklılaşırken, osteokondüktivite kan damarlarının gelişimi ve hücrelerin büyümesi için 3-boyutlu bir yapı sunmaktadır [3].

Biyomalzemelerin bozunma hızı, moleküler ağırlıkları, polidispersiteleri, kristaliniteleri ve termal geçişlerine göre farklılık göstermektedir. Malzemenin hidrofobisitesi ve kristalinite yüzdesi hücresel fenotipi etkilemektedir. Aynı zamanda yüzey yüklerinin, hücrelerin yayılmasında, yüzeye olan afinitelerinde ve fenotipik ekspresyonda etkin olduğu belirlenmiştir.

Biyomalzemelere karşı oluşturulan lokal doku cevabı, malzemenin ve bozunurluk ürünlerinin biyoyumluluğuna bağlıdır. Biyomalzemenin erozyon mekanizması, çevre dokulardaki pH'nın değişmesine neden olabilmektedir. Malzemenin vücut tarafından hızlıca

absorbe edilmesi pH'yı daha kararlı kılarken, uzun bir absorpsiyon sürecinden sonra pH ani olarak düşebilmektedir.

Doku iskelesi olarak kullanılacak biyomalzemelerin sahip olması gereken bir diğer özellik de, besin alış-verişine olanak sağlayan gözenekliliktir. Gözenek şeklinin ve boyutunun hücre yapışması ve uzun dönem hücre canlılığının korunmasında doğrudan etkili olduğu görülmüştür. Optimum gözenek boyutu hücre tipine göre farklılık göstermektedir. Tsuruga ve ark. seramik malzemeler için 300-400 µm gözenek çapının ektopik kemik gelişimine olanak sağladığını göstermiştir. Benzer şekilde Holmes ve ark., insan osteonlarını örnek alarak, 200-400 µm aralığında gözenek boyutunu optimum gözenek boyutu olarak önermişlerdir. Diğer yandan gözeneklilik malzemenin mekanik özelliklerini olumsuz olarak etkilemekte ve daha karmaşık malzeme tasarımlarına ihtiyaç duyulmaktadır.

Osteoblast proliferasyonunun, yüzey topografisi, gerinimi ve diğer mekanik uyaranlara karşı duyarlı olduğu bilinmektedir. Yüzeyin pürüzlülüğü, yüzeydeki yapıların boyutu, şekli, hücre yapışmasını, proliferasyonunu ve fenotipini etkilemektedir. Hücreler yüzey topografisindeki değişimleri ayırt edebilmekle beraber yüzey kimyası ve enerjisine de duyarlılık göstermektedirler [3, 36].

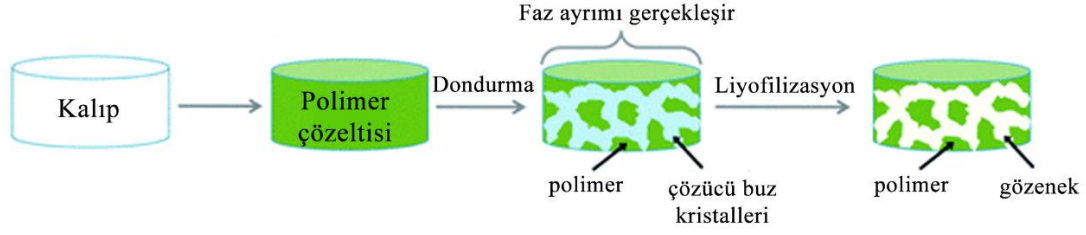
Bu sistemler genellikle, doğal polimerler, sentetik polimerler, seramikler ya da kompozit malzemeler kullanılarak hazırlanmaktadır [3]. Özellikle, doğal polimerler ve hidroksiapatitin kullanıldığı kompozit yapılar kemik doku mühendisliğinde sıklıkla tercih edilmektedir [4, 37, 38]. Kitosan/HA kompozit yapılar, mikrometreden, nanometreye kadar farklı boyutlardaki HA partiküllerinin yapıya katılması ile üretilmekte, bazı durumlarda bu sistemlerden ilaç salımı da yapılmaktadır [39, 40]. İpek ile gerçekleştirilen kemik doku mühendisliği çalışmalarında da, yapıya katılan HA ile, malzemenin mekanik ve osteokondüktif özellikleri geliştirilebilmektedir [41].

2.2.2.2. Doku iskelesi üretim yöntemleri

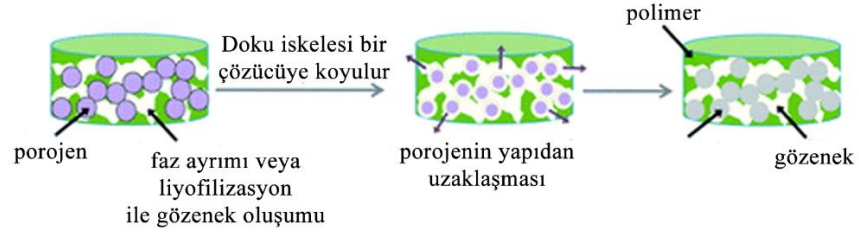
Kemik doku mühendisliği için tasarlanan 3-boyutlu doku iskelerinin bazı temel özellikleri taşınması gerekmektedir. Öncelikle doku iskelesi, osteoblast ve osteoprogenitör hücreleri barındırabilmek, hücre proliferasyonunu ve farklılaşmasını destekleyerek kemik doku oluşumunu güçlendirmek için yeterli gözenekliliğe sahip olmalıdır. Ayrıca homojen bir hücre dağılımı, besin maddelerinin ve metabolitlerin kolay diffüzyonu için gözenekler arası bağlantılar da önem taşımaktadır. Doku iskelesi yeni oluşan kemik dokuya uygun bir çevre sağlayacak mekanik özellikleri göstermelidir. Doku iskelesinin bozunma hızı yeni doku

oluşumu ile eş zamanlı olmalı böylece bir yandan yapısal bütünlük korunurken, bir yandan da yeni oluşan doku için yol gösterici bir ortam sağlanmalıdır. Son olarak doku iskelesi, kemik hücrelerinin yapışması ve fonksiyonları için uygun bir yüzey kimyasına sahip olmalıdır. Gözenekli 3-boyutlu polimerik doku iskelelerinin üretimi için birçok farklı teknik geliştirilmiştir (Şekil 2.4) [42]. Kemik doku mühendisliğinde kullanılan malzemeler ve üretim yöntemleri Çizelge 2.2’de özetlenmiştir [43].

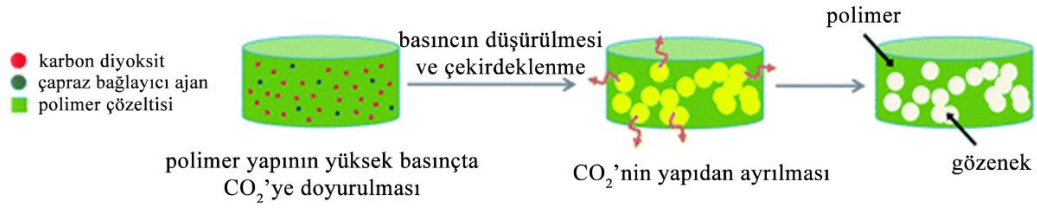
a) Faz ayrımı ve liyofilizasyon



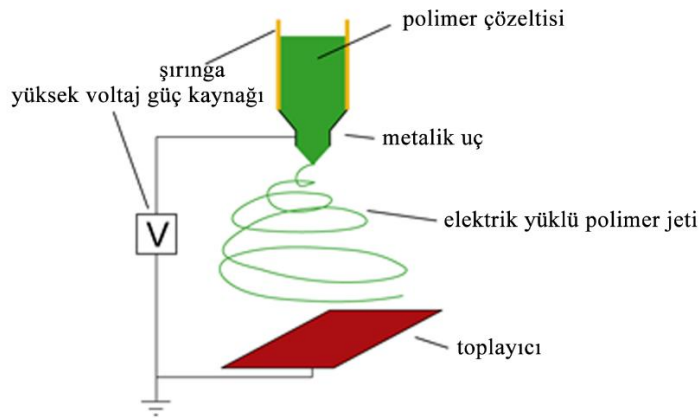
b) Çözücü döküm-partikül uzaklaştırma



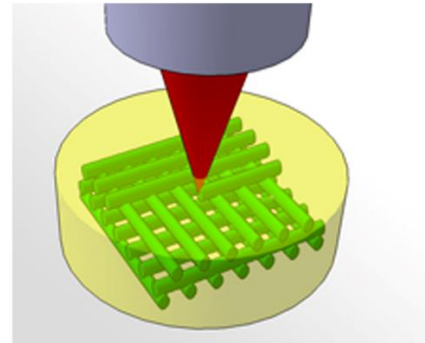
c) Gaz köpükleştirme



d) Elektroeğirme



e) Hızlı prototipleme



Şekil 2.4. Doku iskelesi üretim yöntemleri ([44]'ten değiştirilerek).

Çizelge 2.2. Kemik doku mühendisliğinde kullanılan malzemeler ve üretim yöntemleri.

Üretim yöntemi	Malzeme	Gözenek boyutu (μm)	Gözeneklilik (%)	Yapısal özellikler
• Çözücü-döküm parikül uzaklaştırma	İpek	30-300	20-50	Küresel gözenekler
• Gaz köpükleştirme	Poli (laktid-ko-glikolid)	<100	>90	Kapalı gözenekler
• Liyofilizasyon	Kitosan	<200	<97	Yüksek oranda içsel bağlantılı gözenekler
• Elektroeğirme	Polikaprolakton (PCL)	<5-100	>90	Yetersiz mekanik özellikler
• Hızlı-prototipleme	Aljinat	45-150	<60	Belli bir geometriye sahip, içsel bağlantılı gözenekler
• Sıcaklık ile oluşturulan faz ayrımı	Poli (L-laktik asit)	<200	>97	Yüksek oranda içsel bağlantılı gözenekler

2.2.3. Kemik Doku Mühendisliğinde Biyosinyalizasyon

Kemik rejenerasyonu, çeşitli mekanobiyolojik uyaranlar tarafından düzenlenen, kompleks hücresel olayları içeren biyolojik bir süreçtir. Bu süreçte öncül hücrelerin, fibroblast, kondrosit ya da osteoblast olmak üzere hangi hücelere farklılaşacakları, kollajenöz matrisin ve dokular arasındaki sıvının taşıdığı biyokimyasal ve biyofiziksel uyaranlarca belirlenir [45].

İnsan vücudunda, doku yapı ve fonksiyonunun geliştirilmesinde ve devamlılığında birçok biyofiziksel ve biyokimyasal uyaran rol almaktadır. Bu noktada, çeşitli uyaranların kullanımı, oluşturulacak dokunun biyolojik ve fizyolojik özelliklerinin iyileştirilmesinde kritik önem taşımaktadır. Yapılan *in vitro* çalışmalarda, kimyasal, mekanik ve malzeme temelli (topografi, doku iskeleleri vb.) uyaranlar oldukça iyi karakterize edilmiştir. Son yıllarda araştırmacılar ışık ve elektrik ile stimülasyon gibi alternatif hücre uyarıcı/aktive edici süreçlere yönelmişlerdir. Sinir, kardiyak ve iskelet doku ile yapılan birçok çalışma olmakla beraber, bu tür alternatif biyofiziksel uyaranların formları, doza ve zamana bağlı etkileri kapsamlı olarak incelenmeli ve hedef doku için etkin parametreler ortaya koyulmalıdır [46].

2.3. Biyofiziksel Stimülasyon

Biyolojik ve biyomekanik prensipler doğrultusunda, biyofiziksel uyaranların, dokunun lokal çevresine ve uygulanan mekanik strese bağlı olarak, kemik doku hasarlarının iyileşmesini hızlandırdığı bilinmektedir. 1955 yılında Yasuda'nın ortaya koyduğu 'Electric Callus' fenomenine göre; kemik dokuya uygulanan dinamik enerji, yeni doku oluşumuna aktarılmaktadır [47]. Bu fenomenin ortaya koyulması ile birçok biyofiziksel uyaranın kemik oluşumu üzerine etkisi incelenmiştir. Düşük yoğunluklu ses dalgalarının, erken dönem ECM protein sentezini arttırarak kemik iyileşmesini güçlendirdiği görülmüştür [48]. Bodamyali ve ark. elektromanyetik alanın, osteoblastlarda kemik morfogenetik protein 2 (BMP-2) ve kemik morfogenetik protein 4 (BMP-4) sentezini arttırarak osteogenezi uyardığını ortaya koymuştur [10]. Yapılan bir diğer çalışmada, ekstrakorporal şok dalgalarının mikrotravma ve mikrokırıklara neden olduğu ve bu durumun neovaskülarizasyonu uyarak, osteoblast ve fibroblast aktivitesini arttırdığı belirtilmiştir [49]. Düşük enerjili lazer ışıkları da kemik doku mühendisliğinde kullanılan diğer bir uyarı kaynağıdır. 632 nm dalga boyunda, osteobastlarla yapılan bir çalışmada, ışık varlığında, hücre proliferasyonunun yanında, alkalın fosfataz aktivitesinin (ALP), osteopontin (OPN) ve kemik sialoprotein (BSP) ekspresyonlarının da arttığı belirlenmiştir [11].

2.3.1. Fotostimölasyon

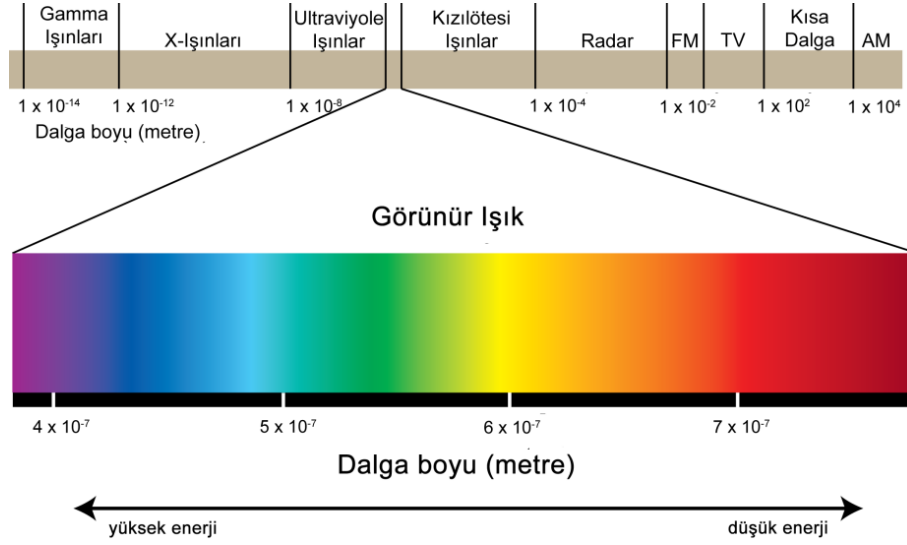
Düşük enerjili lazer terapi (Low-Level Laser Therapy-LLLT) yaklaşık 30 yıldır yara iyileşmesinde kullanılmaktadır. Ayrıca rejeneratif tıp, diş hekimliği gibi birçok alanda kendine kullanım alanı bulmakta olan LLLT, ilk kez Mester tarafından uygulanmış ve ‘fotobiyostimölasyon’ olarak tanımlanan bu uygulama tıp bilminde yeni bir sayfa açmıştır [50]. Daha sonra Karu, lazerin hücresel aktivitelerin biyomodölasyonu üzerindeki mekanizmalarını ayrıntılı olarak çalışmıştır [51]. Son yıllarda fotobiyomodölasyonun deri [52, 53], sinir [54], iskelet kası [55, 56] ve kemik [57] doku üzerindeki etkileri ile ilgili birçok çalışma sunulmuştur. Düşük enerjili lazerin yara iyileşmesinin yanında hücre proliferasyonunu ve kollajen sentezini arttırdığı ortaya koyulmuştur [58] ve fibroblast, keratinosit, insan osteoblastları ve lenfositler gibi birçok farklı hücrenin proliferasyonu üzerindeki etkileri incelenmiştir. Ayrıca, LLLT varlığında, kemik iliği kökenli kök hücreler, adipojenik kök hücreler, dental pulp kök hücreleri gibi farklı kök hücrelerin farklılaşma davranışları incelenmiş [59], 3-boyutlu matrislerde, mezenkimal kök hücrelerin osteojenik fenotipinin arttığı ortaya koyulmuştur [60].

LLLT uygulamalarında genellikle 600-1100 nm dalga boyu ve 1-500 mW arası güç kullanılmaktadır. Uygulama şekli sürekli ya da kesintili olacak şekildedir ve enerji yoğunluğu göreceli olarak düşüktür ($0.04-50 \text{ J/cm}^2$). LLLT hedef dokuya veya tek tabakalı hücrelere doğrudan uygulanabilir. LLLT’nin hücre apoptozunu önlerken, proliferasyonu, migrasyonu ve adezyonu arttırdığı görülmüştür. Ancak bu biyolojik cevaplar doza bağımlı olarak değişiklik gösterebilmektedir [61].

2.3.1.1. Işık kaynakları

Lazer ışık kaynakları: Lazer (Light amplification by stimulated emission of radiation), radyasyonun uyarılmış emisyonu ile ışığın uyarılması anlamına gelmektedir. Kavram olarak ilk kez 1917 yılında Einstein tarafından ortaya atılmış ve ‘Lazer’ sözcüğü ilk kez Gould tarafından kullanılmıştır. Teorik olarak lazer, dışarıdan yapısına elektron katan bir atomun ortama yaydığı tek dalga boyunda, uniform hareket gösteren (koherent) foton parçacıklarından oluşan, saçılım göstermeyen bir ışık demetidir.

Işımanın dalga teorisine göre, atomların çeşitli biçimlerde ortama yaydıkları enerji ve bu enerjinin elektrik ve manyetik alanda oluşan bileşenler eşliğindeki yayılımına ‘elektromanyetik radyasyon’ denir. Işın demetleri bu elektromanyetik saçılımın parçasıdır. ‘Radyasyon’ adı verilen enerji salımı, değişik dalga boylarında olup bunların tümü elektromanyetik spektrumu oluşturur (Şekil 2. 5) [62].



Şekil 2.5. Elektromanyetik spektrum ([63]'ten değiştirilerek).

Lazer kaynakları tek bir dalga boyundan oluşur. Böylece, belli bir frekanstaki yoğun enerji miktarı küçük bir alana yönlendirilebilir. Işığın dalga boyu içerdiği elemente göre değişir. Lazer sistemleri, ışığın oluşmasında rol oynayan bu aktif elemente göre adlandırılır [64, 65].

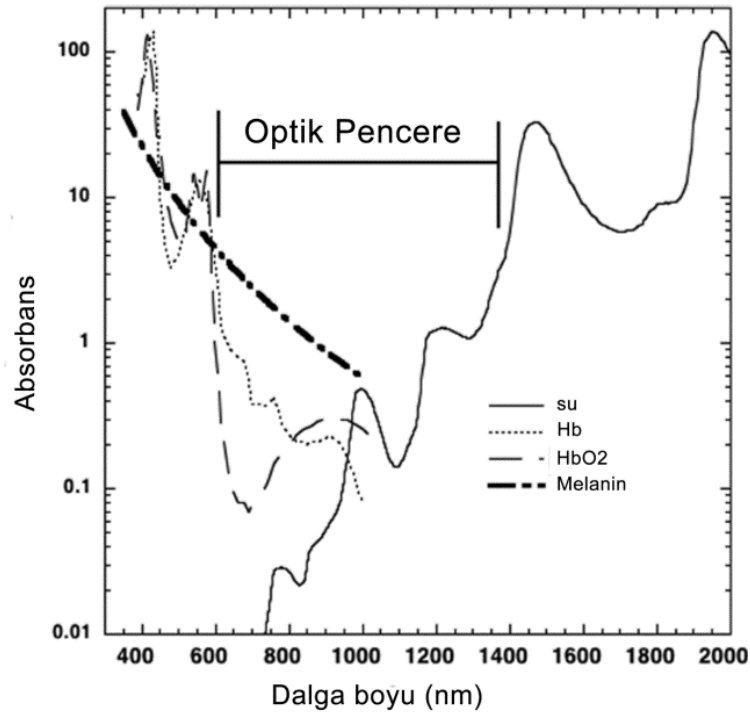
LED ışık kaynakları: LED (Laser Emitting Diode) ışık kaynakları 1990'lı yılların ortalarında geliştirilerek kullanıma sunulmuştur. Kelime anlamı 'ışık yayan diyotlar' olan LED'lerin yapılarında birinden diğerine elektron geçişini sağlayan iki ayrı iletken bulunur. Bu sistemde ortama elektrik verildiğinde, elektronlar bu iletkenlerden geçerek LED ışık kaynaklarından farklı dalga boylarında ışık yayılması sağlanmaktadır. LED'ler koherent olmayan ışık kaynaklarıdır [66].

Plazma ark ışık kaynakları: Plazma ark ışık kaynaklarında, inert gaz dolu basınçlı bir hazne içerisinde birbirinden ayrı iki tungsten elektrot bulunur. Bu elektrotlar aralarındaki boşlukta yüksek elektrik potansiyeli oluştururlar. Elektrotlar arasında yüksek voltajlı elektrik oluştuğunda bir kıvılcım meydana gelir ve çevresindeki ksenon gazı iyonize olarak plazmayı meydana getirir. 'Plazma' kelimesi, yüksek sıcaklıkta, pozitif iyonlardan ve elektrotlardan oluşmuş iyonize gazı ifade eder. Böylece çok yüksek seviyelerde enerji oluşturulur. Bu ışık kaynaklarının, morötesi (UV), görünür ve kızılötesi (IR) olmak üzere oldukça geniş bir enerji spektrumları vardır [65].

2.3.1.2. Fotostimülasyonun moleküler mekanizması

Fotostimülasyonun etki mekanizmalarını tam olarak anlamak için dokunun optik özelliklerini ortaya koymak gerekmektedir. Işığın dokuya en etkin şekilde penetre olduğu

bölgeye ‘optik pencere’ denilmektedir (Şekil 2.6). Bu pencere yaklaşık olarak 650-1200 nm arasında çalışmaktadır. Mavi bölgedeki ışığın doku tarafından absorpsiyonu ve doku içinde ilerlemesi kırmızı bölgeye göre çok daha yüksektir. Çünkü kromoforlar (hemoglobulin ve melanin) kısa dalga boylarında, ışığı çok daha etkin şekilde absorbe edebilirler. Bunun yanında 1100 nm’den daha büyük dalga boylarında su, doku tarafından güçlü bir şekilde absorblanır. Bu bilgiler ışığında, dokuların hasar görmemesi için, fotostimülasyon uygulamalarında kırmızı ve kırmızıya yakın ışık kullanılmaktadır (600-1100) [61] ve hücre büyümesi, proliferasyonu ve farklılaşmasının da olduğu birçok biyolojik süreç uyarılmaktadır. Bu etkinin arkasında yatan moleküler olgular tam olarak anlaşılmamakla beraber aşağıda açıklanan bazı mekanizmalar tanımlanmıştır.

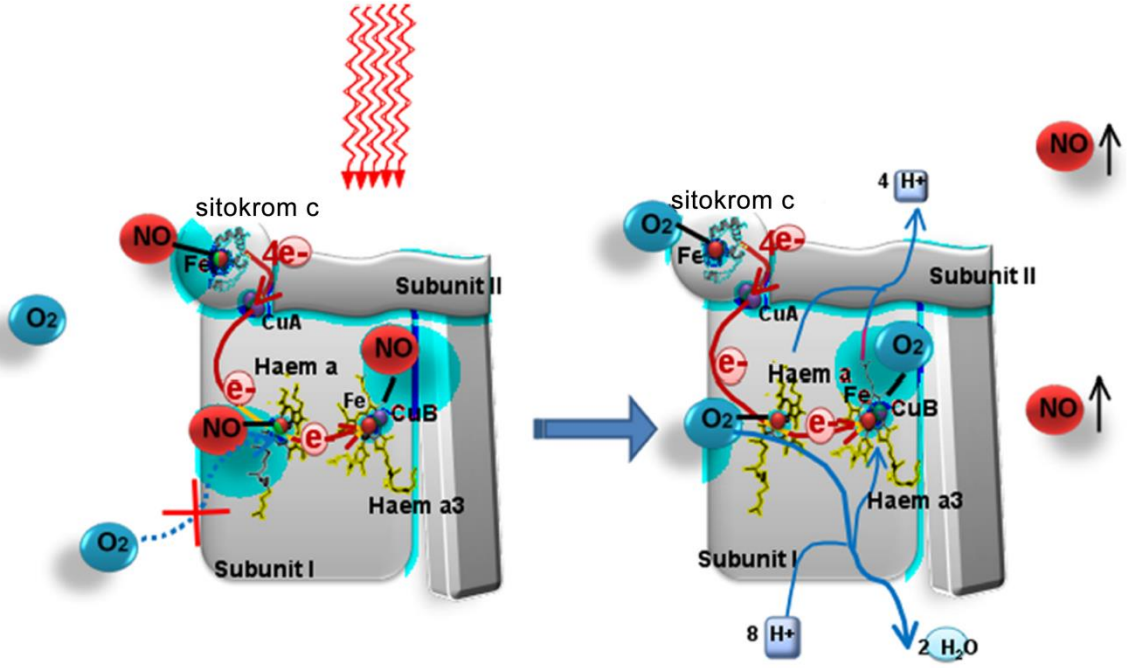


Şekil 2.6. Dokunun optik özellikleri ([61]'den değiştirilerek).

Hücrel kromoforlar: En bilinen mekanizmaya göre, ışık enerjisi (protonlar) hücre ya da mitokondri membranında yer alan kromoforlar tarafından absorblanmakta ve fotonik enerji kimyasal enerjiye dönüştürülmektedir [67]. ATP, çoklu P2 nükleotit reseptör alt tipi ile birlikte hücre içi kalsiyum (Ca^{+2}) seviyesini artırır [68-70], protein ve DNA sentezini, hücre farklılaşmasındaki erken ve geç dönem genlerinin ekspresyonlarını düzenler [70, 71]. Aynı zamanda ATP, hücre proliferasyonu için gerekli olan ERK1/ERK2 sinyal yollarını aktive eder [72]. ATP'nin indüklediği ERK1/ERK2 yolu mitojen aktive protein kinaz (MEK)'a

bağımlı, fosfatidilinositol 3-kinaz (P13K)'dan bağımsızdır ve hücrel proliferasyon için büyük önem taşımaktadır [73].

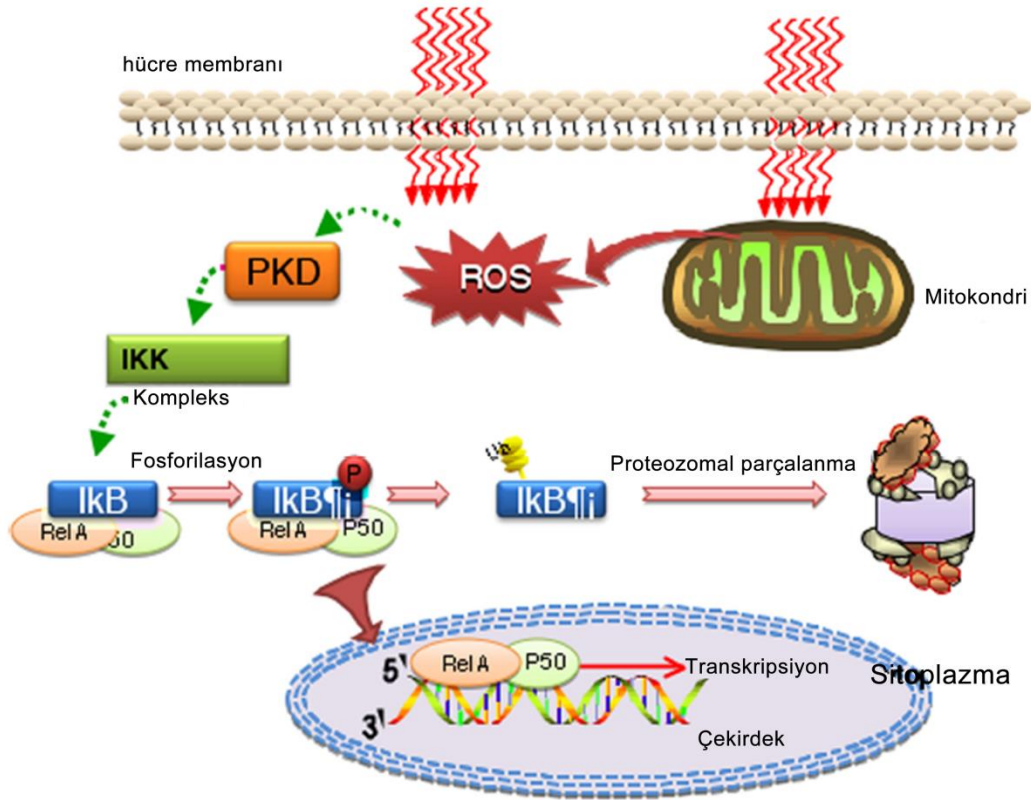
Mitokondriyal solunum ve ATP: Mitokondrinin hücre içi enerji üretiminde ve metabolizmanın kontrolünde önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. Yapılan birçok çalışmada, mitokondrinin fotostimülasyona karşı oluşturulan hücrel cevaptan sorumlu olduğuna dair bulgular sunulmuştur.



Şekil 2.7. Işığın NO üzerindeki etkisi ([61]'den değiştirilerek).

Sitokrom c oksidazın (Cox) kırmızı ve kırmızı yakın ışıklar için birincil fotoreseptör olduğu düşünülmektedir [74]. Özellikle stres altındaki ya da hipoksik hücrelerde, mitokondri tarafından üretilen nitrik oksit (NO) Cox'a bağlanarak solunumu inhibe etmekte ve yarışmalı olarak oksijenle yer değiştirmektedir. Fotostimülasyon sonrasında hücrelerde NO konsantrasyonunun arttığı tespit edilmiştir. Işığın NO'yu Cox'dan ayırdığı düşünülmektedir. Bu durumda oksijen boş kalan bölgeye tekrar bağlanmakta ve solunum eski seviyesine gelerek ATP sentezini arttırmaktadır (Şekil 2.7) [75, 76].

Aynı zamanda fotostimülasyon, hücre içi reaktif oksijen türlerinin (ROS) seviyesini artırır. ROS, süperoksit, serbest radikaller (hidroksil radikalleri, hidrojen peroksitler) ve hidroksil radikalleri içeren küçük oksijen iyonlarıdır. ROS, oksijenin normal metabolizması sonucu oluşmakta ve hücrel sinyal yollarında, nükleik asit ve protein sentezinde, enzim aktivasyonunda ve hücre döngüsünde önemli rol oynamaktadır. Fotostimülasyon çalışmalarında elde edilen bulgular, ışığın hücrelerin redoks potansiyelini oksidasyon yönünde değiştirdiğini ve ROS seviyesini arttırdığını ortaya koymuştur [77-79]. ROS seviyesindeki artış, ROS/Akt yolu üzerinden hücre proliferasyonunu indükler [80-82]. Proliferasyonun artışı yanında bu sitoplazmik cevaplar transkripsiyonel değişikliklere de neden olabilmektedir. NF- κ B gibi birçok transkripsiyon faktörü hücrel redoks seviyesindeki değişimler ile düzenlenmektedir (Şekil 2.8) [83].



Şekil 2.8. Işığın ROS üzerindeki etkisi ([61]’den değiştirilerek).

2.3.1.3. Fotostimülasyona karşı oluşturulan hücrel cevap

Fotonik enerjinin kimyasal enerjiye dönüştürülmesi sinyal yollarını uyardığı gibi hücrenin membran geçirgenliğini de değiştirmektedir ve bu durum hedef hücrede fizyolojik değişikliklere neden olmaktadır [84]. Moleküler düzeyde gerçekleşen bu olaylar sonucunda

mikrodolaşım, ATP, RNA ve DNA sentezi artmakta, hücrenin oksijenlenmesi, beslenmesi ve rejenerasyonu iyileşmekte, mitokondriyal elektron taşıma sistemi güçlenmektedir [85, 86].

Fotostimölasyon ile yapılan çalışmalarda en sık görölen etki költürdeki hücrelerin proliferasyonundaki artıştır. Proliferasyon çalışmalarında genellikle 632 nm’de kırmızı ışık yayan helyum-neon (He-Ne) ve 830 nm kırmızı ötesi ışık yayan galyum-aluminyum-arsenik ışık kaynakları kullanılır [80]. Literatürde ışığın hücre proliferasyonunu arttırdığına dair birçok bulgu bulunmakla beraber, bazı çalışmalarda negatif sonuçlar da sunulmuştur. Ga-Al-As lazer ile yapılan bir çalışmada, 830 nm dalga boyunun fibroblast ve keratinosit hücrelerinin költürdeki proliferasyonlarını arttırmadığını göstermiştir. Diğer bir çalışmada ise fibroblast hücrelerinin ışığa, endotel hücrelerinden daha fazla cevap verdiği görölmüştür. Elde edilen bu sonuçlar, fotostimölasyon çalışmalarında dalga boyunun ve hücre tipinin önemini vurgulamaktadır [87].

Ayrıca bazı çalışmalarda hücre proliferasyonunun 665-675 nm dalga boyunda en üst düzeye ulaşırken, 810 nm’de inhibe olduğu görölmüştür. Bu durum hücrenin fizyolojik durumu ile açıklanabilir. Sunulan raporlarda, hücrelerin yavaş ürediği durumlarda ışığın uyarıcı etkisinin olduğu, ancak hücrenin tam olarak işlevsel olduğu ve serumca zengin ortamlarda bulunduğu durumlarda ise ışığın uyarıcı etkisinin ortadan kalktığı gösterilmiştir [88].

Fotostimölasyon çalışmalarında tercih edilen bir diğer hücre grubu da mezenkimal kök hücrelerdir. Hou ve ark. yaptıkları çalışmada indium-galyum-arsenit-fosfat (In-Ga-As-P) ışık kaynağı ve 635 nm dalga boyunu kullanmışlardır. Kemik iliğinden izole ettikleri kök hücreleri, sırasıyla, 75, 150, 300 ve 750 s, 0.5, 1, 2 ve 5 J/cm² enerji yoğunluğuunda ışığa tabi tutmuşlardır. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında herhangi bir sitotoksik etkiye rastlanmazken, hücre proliferasyonu önemli derecede artmıştır [89]. Tuby ve ark. Ga-As lazer kullanarak, kardiyak kök hücreleri, *in vitro* koşullarda, 840 nm dalga boyuna maruz bırakmışlar ve fotostimölasyon sonrasında hücre sayısının önemli ölçüde arttığını gözlemlemişlerdir [90]. İnsan dental pulpa kök hücreleri ile yapılan bir diğer çalışmada ise, hücre büyümesinin, 660 nm (In-Ga-Al-P) dalga boyunda ve 3 J/cm² enerji yoğunluğuunda, artış gösterdiği belirlenmiştir [91]. AdMSC’ler ile yapılan fotostimölasyon çalışmasında, hücreler 635 nm dalga boyunda, 5 J/cm² enerji yoğunluğuuna maruz bırakılmıştır. Optik yoğunluk ile ölçölen proliferasyonun uyarıldığı ve aynı zamanda Western blot analizi ile kök hücreler için immönositokimyasal bir işaret olan β 1-integrinin arttığını tespit edilmiştir [80].

Fotostimülasyonun proliferasyon yanında farklılaşma üzerine de etkileri gösterilmiş ve osteoblast kültürlerinde, matris üretimini, DNA sentezini ve kemik nodül oluşumunu uyardığı belirlenmiştir. Abramovitch-Gottlib ve ark. mezenkimal kök hücre ektikleri 3-boyutlu mercan doku iskelelerini, He-Ne lazer kullanarak, 632.8 nm dalga boyunda ışığa maruz bırakmıştır. Işık ile uyarılan örnekler, kalsiyum ve fosforu ait pikler varlığında güçlü bir doku oluşumu ve osifikasyon seviyesi sergilemiştir [60]. Farklılaşmaya yönelik yapılan diğer bir çalışmada, mezenkimal kök hücreler, farklı periyotlar ve enerji yoğunluklarında 647 nm dalga boyundaki kırmızı ışık ile muamele edilmiştir. 4-5 gün sonra ışık, osteoblast mineralizasyonunu önemli derecede arttırmıştır [58]. Yine mezenkimal kök hücrelerin kültüre edildiği farklı bir çalışmada, Petri kaplarının altına tutturulan bir fiber yardımı ile 405 nm dalga boyundaki ışık kullanılmıştır. Sonuçlar, bu dalga boyundaki ışığın ekstraselüler kalsifikasyonu artırdığını ve sirkadyan ritm protein kriptokrom 1'in (CRY 1) sitoplazmadan çekirdeğe taşınmasını uyardığını göstermiştir. CRY, mezenkimal kök hücrelerdeki ekstraselüler kalsifikasyonu ve kemik yoğunluğunu kontrol eden sirkadyan ritimin temel düzenleyicisidir [92].

2.3.1.4. Fotostimülasyon parametreleri

Daha önce de değinildiği üzere, fotostimülasyon uygulamalarında en önemli parametre uygulanan ışığın dalga boyudur. Yapılan çalışmalarda kullanılan ışıklar, görünür, kızılötesi ve morötesi şeklinde sınıflandırılabilir. Bu alanda yapılan çalışmalarda, 860 nm'nin hücre proliferasyonunu arttırdığı, 812 nm'nin ise DNA sentezini arttırdığı belirlenmiştir [93, 94]. 660 nm'nin fibroblastik büyüme faktörü (FGF) üretimini artırırken, 632.8 nm'nin fibroblastları miyoblastlara dönüştürdüğü görülmüştür [95, 96]. 780 nm keratinosit kültürü üzerinde proliferasyonu artırıcı bir etki göstermiştir [97]. Fibroblast proliferasyonu 665 ve 675 nm'de en yüksek değerine ulaşırken, 810 nm proliferasyonu inhibe etmiştir [87].

Dalga boyunun yanında, lazer ışığının çıkış gücü, enerji yoğunluğu ve uygulama yapılan hücrelerin tipi de fotostimülasyon sonucu oluşacak biyolojik cevabı etkilemektedir [98-100]. Uygulanan parametreler, proliferasyon hızını arttırabileceği gibi bazı durumlarda, protein sentezini olumsuz olarak etkileyebilmektedir [101]. Bu nedenle yapılacak fotostimülasyon çalışmasında, parametreler açısından doğru kombinasyonun bulunması oldukça büyük önem taşımaktadır.

Fotostimülasyon çalışmalarında, aynı dalga boyunun düşük dozlarında, yüksek dozlar ile karşılaştırıldığında daha etkin sonuçlar elde edilebilmektedir. Bu fenomen 'bifazik doz cevabı' ya da 'hormesis' olarak adlandırılır. Bu fenomene göre düşük uyarılarda yaşamsal

aktiviteler yavaş yavaş artmakta ve uyaran güçlendikçe bu durum hızlanmaktadır. Ancak uyaran belli bir pik noktasına ulaştığında bu aktiviteler baskılanmakta ve negatif cevap meydana gelmektedir [80]. Bifazik eğriler, etkin bir biyostimülasyonun elde edilebilmesi için en uygun enerji seviyesinin belirlenmesinde kullanılabilir. Çünkü yapılan çalışmalarda yetersiz enerji uygulanırsa herhangi bir cevap oluşmamakta, fazla enerji uygulanır ise biyostimülasyon biyoinhibisyon ile yer değiştirmektedir [61, 102].

Fotostimülasyon uygulamalarındaki parametreler Çizelge 2.3'te özetlenmiştir:

Çizelge 2.3. Fotostimülasyon uygulamalarında kullanılan parametreler.

Fotostimülasyon Parametreleri		
Parametre	Birim	Açıklama
<u>Işığa bağlı parametreler</u>		
Dalga boyu	nm	Işık farklı bölümler arasında hareket eden ve dalga benzeri özellikler de gösteren elektromanyetik bir enerjidir. Görünür dalga boyu 400-700 nm arasındadır.
Yoğunluk	W/cm ²	Güç yoğunluğu = lazer çıkış gücü (W) / ışık alanı (cm ²)
Sinyal yapısı	Pik gücü (W) Sinyal frekansı (Hz) Sinyal genişliği (s)	Ortalama güç (W) = Pik gücü (W) x sinyal genişliği (s) x sinyal frekansı (Hz)
Koherens	Koherens uzunluğu spektral bant genişliğine göre değişir.	Koherent ışık, hücre ve hücresel organeller ile etkileşime girerek fotobiyomodülasyonda görev alan lazer noktacıkları üretir.
Polarizasyon	Doğrusal ya da dairesel polarize	Polarize ışığın, dokular gibi yüksek dağıtıcılığa sahip ortamlarda, hızla ilerleyebildiği bilinmektedir.
<u>Zamana bağlı parametreler</u>		
Yoğunluk	J	Enerji (J) = lazer çıkış gücü (W) x süre (s)
Enerji yoğunluğu	J/cm ²	Fotostimülasyonda doz, enerji yoğunluğu olarak tanımlanır.
Işınlama zamanı	s	
Uygulama aralığı	Saat, gün, hafta	Yapılan çalışmalarda uygulama periyodunun fotostimülasyonun etkinliğini önemli derecede değiştirdiği belirlenmiştir.

2.3.1.5. Fotostimülasyonun doku mühendisliğindeki kullanımı

Fotostimülasyonun moleküler mekanizmaları ortaya koyuldukça doku mühendisliği alanındaki kullanımı da gündeme gelmeye başlamıştır.

Yapılan uygulamalarda farklı parametreler denenerek hedef doku için en uygun koşullar ortaya koyulmaya çalışılmıştır. Işığın proliferasyon yanında, hücre farklılaşması üzerindeki etkileri incelenmiştir. Hücrelerin, uygun sinyalleri taşıyan ortamlar içerisinde, farklılaştıkları ve bu farklılaşmayı devam ettirdikleri bilinmektedir. Özellikle kemik doku mühendisliği kapsamında yapılan çalışmalarda, fotostimülasyonun hücreler üzerinde matris üretimini, DNA sentezini ve kemik nodül oluşumunu arttırdığına dair bulgular elde edilmiştir.

Kim ve ark. yaptıkları çalışmada hücrel farklılaşmayı desteklemek amacıyla 647 nm’de kırmızı ışık kullanmışlardır. Öncelikle fare mezenkimal kök hücreleri (D1 hücreleri), osteojenik farklılaşma ortamında (ODM: askorbik asit, deksametazon ve β -gliserofosfat içerir) 3 gün kültüre edilmiş ve daha sonra, 3 cm mesafeden 1 kez olmak üzere 10, 30 ve 90 s süre ile lazer uygulaması gerçekleştirilmiştir. Yapılan analizler sonucunda, lazere maruz bırakılan hücrelerde; mineralize ekstraselüler matris ile birlikte hücre nodülleri gözlenmiş, kontrol grubuna oranla, hücrelerde MTT analizi ile belirlenen proliferasyon artmış, alkalın fosfataz aktivitesi yükselmiş, osteokalsin, osteopontin, kollajen tip I ve Runx2’ nin mRNA ifadelerinde artış gözlenmiş, mezenkimal kök hücre işareti olan CD44 ifadesi gözlenirken hematopoietik hücre işareti olan CD45 ifadesi oluşmamıştır. Sonuç olarak; ODM ortamı içerisinde 647 nm LED (red light-emitting diode) ışığına maruz bırakılan mezenkimal kök hücrelerde osteojenik farklılaşmanın desteklendiği belirlenmiştir [58].

Fujihara ve ark. osteoblast benzeri hücreler üzerinde lazerin etkisini araştırmışlardır. Bu amaçla yaptıkları çalışmada lazer ışınları ile deksametazonun hücreler üzerinde sinerjik bir etki oluşturup oluşturmadığını incelemişlerdir. Yapılan çalışmada, Ga-Al-As lazer (780 nm) hücrelere 12 s boyunca uygulanmıştır. Sonuç olarak, deksametazon varlığından bağımsız olarak hücrelerin proliferasyon oranı lazerin etkisi ile artış göstermiş, hücrelerin yapışması ve osteonektin sentezi ise lazer uygulamasının yanında deksametazon varlığı ile önemli ölçüde artmıştır. Bu doğrultuda lazerin ortamda bulunan deksametazon ile sinerjik bir etki oluşturarak kemik doku farklılaşmasını desteklediği gösterilmiştir [103].

Peng ve Wu’ nun yaptıkları çalışmada, sıçandan elde edilen kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücreler, ODM ortamında kültüre edildikten 3 gün sonra LED (620 nm) ışığına, 2 cm mesafeden, günde 1 kez, 10 dk boyunca maruz bırakılmıştır. Sonuç olarak, kontrol grubuna

göre lazere maruz kalan hücrelerde, MTT analizi ile belirlenen hücre canlılığında artış meydana gelmiş, kollajen tip I alfa I (*Col1a1*)'in mRNA ifadesinde artış gözlenmiştir [104].

Soleimani ve arkadaşları, mezenkimal kök hücreler üzerinde aynı dalga boyunu farklı sürelerde ve farklı yoğunluklarda kullanarak, hücrelerin nöronlara ve osteoblastlara farklılaşmasını araştırmışlardır. Bu amaca yönelik olarak, insan kemik iliğinden elde edilen mezenkimal kök hücreler farklılaşma ortamında kültüre edilmişlerdir. Daha sonra Ga-Al-As lazer (810 nm), osteoblastik farklılaşma için 12 s (2 J/cm^2) ve 24 s (4 J/cm^2) ve ayrıca nöronlara farklılaşma için 18s (3 J/cm^2) ve 36s (6 J/cm^2) boyunca hücrelere uygulanmıştır. Yapılan deneyler sonucunda, hücre canlılığı, lazerin etkisi ile osteoblastlarda her iki doz uygulaması için, nöronlarda ise sadece 3 J/cm^2 lazer yoğunluğunda artmıştır. Fakat 6 J/cm^2 lazer yoğunluğunda herhangi bir farklılık gözlenmemiştir. Ayrıca lazere maruz bırakılan hücrelerde, mezenkimal kök hücre markerleri olan CD44, CD73, CD105 ve CD166 ifadeleri gözlenmiştir. Uygulanan her yoğunlukta nöronlara ve osteoblastlara farklılaşma desteklenmiştir. Sonuç olarak, kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücrelerin lazer etkisi ile çoğalması ve farklılaşmasının doza bağımlı olduğu belirtilmiştir [59].

Abramovitch ve ark. yaptıkları çalışmada, mercan iskeletlerini kullanarak 3-boyutlu yapılarda lazer ışınlarının hücrelerin farklılaşması üzerindeki etkisini araştırmışlardır. Bu amaçla mezenkimal kök hücrelere, He-Ne lazer (632.8 nm) 20 cm mesafeden 28 gün boyunca, her gün 10 dk uygulanmıştır. Yapılan analizler sonucunda, hücrelerin doku iskelesine ekimi ve lazer uygulamasından 1-2 hafta sonra hücre proliferasyon oranının arttığı ve ortamda ECM mineralizasyonu ile birlikte doku oluşumunun gerçekleştiği gözlenmiştir. Ayrıca Oil red O boyama yapılmış hücrelerde adipogenez oluşumunun gerçekleşmediği gösterilmiştir. Sonuç olarak 3-boyutlu biyomatris ile lazer sisteminin birlikte kullanımının, mezenkimal kök hücrelerin çoğalmasını ve osteoblastlara farklılaşmasını uyardığı ve *ex-vivo* kemikleşmeyi arttırdığı ifade edilmiştir [60].

Khadra ve ark. yapmış oldukları çalışmada, lazer ışınlarını kullanarak, titanyum implant materyali üzerinde insan osteoblast benzeri hücrelerin tutunmasını, çoğalmasını, farklılaşmasını ve TGF- β_1 sentezini araştırmıştır. Hücreler titanyum diskler üzerinde kültüre edildikten sonra, 3 gün boyunca Ga-Al-As lazere (830nm), 1.5 J/cm^2 ve 3 J/cm^2 dozlarında, 9 cm mesafeden maruz bırakılmışlardır. Lazer uygulanmış implant yüzeydeki hücrelerin kontrol grubuna göre malzeme yüzeyine tutunmalarında ve proliferasyonlarında artış gözlenmiştir. Osteokalsinin ekspresyonu ve kemik oluşumunda güçlü bir etkiye sahip olan

TGF- β 1' in sentezi 3 J/cm² lazer ışığına maruz kalan hücrelerde, kontrol grubu ve 1.5 J/cm² lazer ışığına maruz bırakılan hücrelere oranla, artış göstermiştir [105].

Bouvet-Gerbetaz ve ark. yaptıkları çalışmada, fare kemik iliği hücrelerine, Ga-Al-As lazer (808nm- 4 J/cm²), 9 cm mesafeden, 1 haftada 3 kez olmak üzere, 91 s uygulanmış ve hücrelerin çoğalması, osteoblast ve osteoklastlara farklılaşması incelenmiştir. Elde edilen veriler doğrultusunda, lazerin yaşayan veya tutunan hücreler üzerinde etkisi olmadığı, osteoklast ve osteoblast oluşumunu etkilemediği gösterilmiştir. Sonuç olarak, lazer uygulamasının mezenkimal kök hücrelerde proliferasyon ve osteoblast ve osteoklast farklılaşmasını etkilemediği, lazer uygulanan gruplarda ve kontrol gruplarında benzer sonuçlarla karşılaştığı, dolayısıyla kullanılan deneysel protokolün etkili olmadığı belirtilmiştir [106].

2.3.1.6. Klinik uygulamalar

Fotostimülasyonun klinik uygulamalarında etkin sonuçlar elde edebilmek için, diğer tedavi yöntemlerinde de olması gerektiği gibi, uygulama koşulları hastaya özel olarak belirlenmelidir. Bu doğrultuda, daha öncede belirtildiği üzere, frekans, dalga boyu, dalganın formu, enerji yoğunluğu ve uygulama süresi gibi parametreler göz önünde tutulmalıdır.

Dalga boyu, ışığın doku içine penetrasyonunu kontrol eden önemli bir faktördür. Ayrıca uygulanan dalga formunun tekrarı (frekans) ve ışık kaynağının gücü de penetrasyon derinliğini etkilemektedir. Belli bir güçten sonrası aşırı doz etkisi yaparak hücre yenilenmesini inhibe edebilir, hücre içi proteinlerin denatürasyonuna ve yanıklara neden olabilir [107, 108].

Tedavi süresi genellikle 15 dk ile 1 sa arasında değişmekle ve 10 seans şeklinde uygulanmakla beraber kişiden kişiye değişebilmektedir. Tedavi sonrasında elde edilen sonuçlar da kişiden kişiye ve hastalıktan hastalığa farklılık göstermektedir [108].

Fotostimülasyon yaklaşımları, patolojik durumlara hücresel seviyede etki ettiği için, oldukça umut verici sonuçlara sahiptir. Ayrıca, geçici olarak dolaşımı ve endorfinlerin salımını arttırdığından, semptomatik olarak da bir rahatlama sağlamaktadır [107, 109]. Non-invaziv, non-toksik ve kolay uygulanabilir olması bu yöntemin diğer avantajlarını oluşturmaktadır. Yapılan birçok klinik çalışmada, geleneksel yaklaşımlar ile tedavi edilemeyen hastalıklarda fotostimülasyonun kullanım potansiyeli ortaya koyulmuştur [108]. Bu hastalıklar aşağıda sıralanmıştır.

- Tekrar eden strese bağılı hasarlar: karpal tünel sendromu, epikondilitis, fibromiyalji, refleks simpatetik distropi, eklem bozuklukları
- Yaralanmalar: ligament ve tendon yırtıkları, yumuşak doku zedelenmesine bağılı kırıklar, fitik
- İnflamasyon: tedonitis, miyositis, sinovitis, romatoid artirit
- Dejeneratif rahatsızlıklar: osteoartirit, radikulapati, spinal stenoz, kalsifikasyon
- Diğer uygulamalar: yara iyileşmesi-dermal ülserler, yanıklar, lenfadenom, dermatolojik hastalıklar (herpes), artirit, nöropati.

2.3.2. Elektrostim lasyon

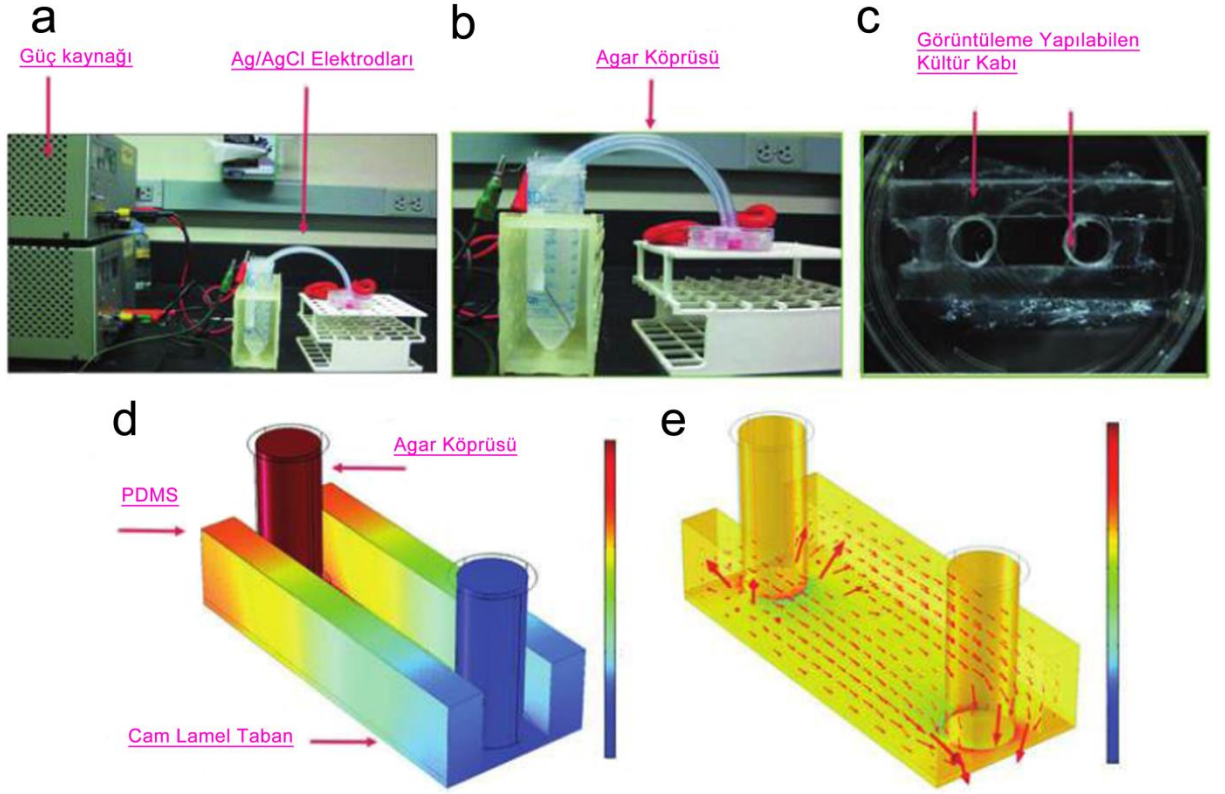
 n vivo koşullardaki en temel elektrik kaynağı hücrelerdir. İyon kanallarından sürekli olarak yapılan pompalama, hücre membranının her iki tarafında bir voltaj gradienti ve membran potansiyeli oluşturur (15-60 mV). Hücreler yan yana tek tabakalı bir şekilde sıralandıklarında, dirençli bir bariyer meydana gelir. Bu bariyerin iki tarafına taşınan polarize Na^+ , K^+ ve Cl^- iyonları doku seviyesinde bir elektriksel gradient oluştururlar [46]. Buna en iyi örnek, deri, lens ve korneada bulunan trans-epitelyal potansiyelidir (TEP). Örneğin epitelyumdaki bir yaralanma durumunda, hasarlı bölgede iki taraf arasında bir kısa devre oluşur ve elektriksel alan artar (0.04-0.2 V/mm). Bu durum bölünen hücrelerin sayısını ve konumlarını kontrol eder, hücrelerin hasarlı bölgeye gücünü indükler [110, 111]. Doku hasarlarının yanında, hücre içi ve dışı elektriksel alanın embriyonik gelişimde de önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. Embriyonik gelişim sırasında elektriksel alan, hücresel davranışları ve sol-sağ organ asimetrisi gibi konumsal yerleşimleri kontrol etmektedir [112]. Biyoelektrisitenin (hücre ve dokuların elektriksel özellikleri) rejenerasyondaki kritik rolünü Illinworth ve Bexter ortaya koymuştur. Yaptıkları çalışmada parmak uçları kesilmiş çocuklarda, hasarlı bölge uzun süre temiz ve hidrate tutulursa, tam olarak rejenerasyonun gerçekleşebileceğini ortaya koymuşlar ve hasarlı bölgede 30 A/cm²'lik bir elektriksel akım gözlemlemişlerdir. Ortaya koydukları teoriye göre hasarlı bölgenin nemli kalması buradaki elektriksel iletkenliğin devamını sağlamakta ve dokunun rejenerasyon kabiliyetini korumaktadır [113]. Kollajen molekülünün yarattığı potansiyel ve akım, piezoelektrisite, kemik içerisinde biyoelektriksel bir alan oluşturmaktadır. Bu elektriksel alan, osteositler üzerinden dokunun yeniden yapılanmasında ve iyileşmesinde önemli bir rol oynamaktadır [114, 115]. Aynı zamanda biyoelektrisite kondrosit hücrelerine sinyal iletiminde ideal bir mekanizma olarak g r lmektedir [116]. * n vivo* elektrisiteye diğer örnekler ise; sinir ve kas

hücrelerindeki aksiyon potansiyeli, hasarlı sinirlerdeki uzun ömürlü DC voltaj, arter ve venlerdeki trans-endotelial ekstraselüler potansiyeldir [117, 118].

In vivo dokularda yaygın olarak bulunan ve önemli etkiler yaratan biyoelektrik oluşumlar ışığında, araştırmacılar, elektriğin *in vitro* koşullarda uyarıcı olarak kullanım potansiyellerini araştırmaktadır. Elektrostimülasyon kardiyak dokuların iletkenlik ve kontraktıl özelliklerinin iyileştirilmesinde, kök hücrelerin proliferasyon ve farklılaşmalarının indüklenmesinde, nöronların hücresele uzamalarının arttırılmasında kullanılmaktadır [46].

2.3.2.1 Elektrostimülasyon metodları

Doğru akım (DC): Doğru akım, homojen ve sürekli bir elektriksel alan sunmaktadır. Genellikle yüzeyde bulunan hücrelerin migrasyon davranışlarını incelemek ya da hücre farklılaşmasını arttırmak için kullanılır. DC sistemlerde, sitotoksik reaksiyonları en aza indirmek için tuz köprüleri kullanılır. Elektrotlar ve tampon çözeltisi içerisindeki agar köprüler yardımı ile elektriksel akım iyonik akıma çevrilir. Elektrotlarda redoks reaksiyonları gerçekleşir. Pozitif uca bağlı olan elektrot okside olurken (anot), negatif uca bağlı elektrot indirgenir. Sistem bir DC güç kaynağı, iki elektrot ve hücre kültür kabı ile bağlantılı iki agar köprüden oluşur (Şekil 2.9). Voltaj, tuz köprülerinin direncini yenmek için en az 70 V olmalıdır. Biyoyumlu özelliklerinden dolayı genellikle gümüş/gümüş klorür elektrotlar tercih edilir. Hücrelerin bulunduğu yüzey alanı milimetre mertebesindedir, yüzey alanının küçülmesi ile akım yoğunluğu artar. Güç kaynağından hücrelere enerji aktarımı sıcaklığı arttırır. Sıcaklık değişimlerini incelemek için sisteme ek aygıtlar bağlanabilir. Elektriksel alanın kardiyak hücreler, kök hücreler, epitelyal hücreler, keratinositler ve fibroblastlar gibi birçok farklı hücre üzerindeki etkisinin incelenmesi için DC kullanılabilir. Oluşan etkiler hücre tipine göre değişiklik gösterebilmektedir [119].

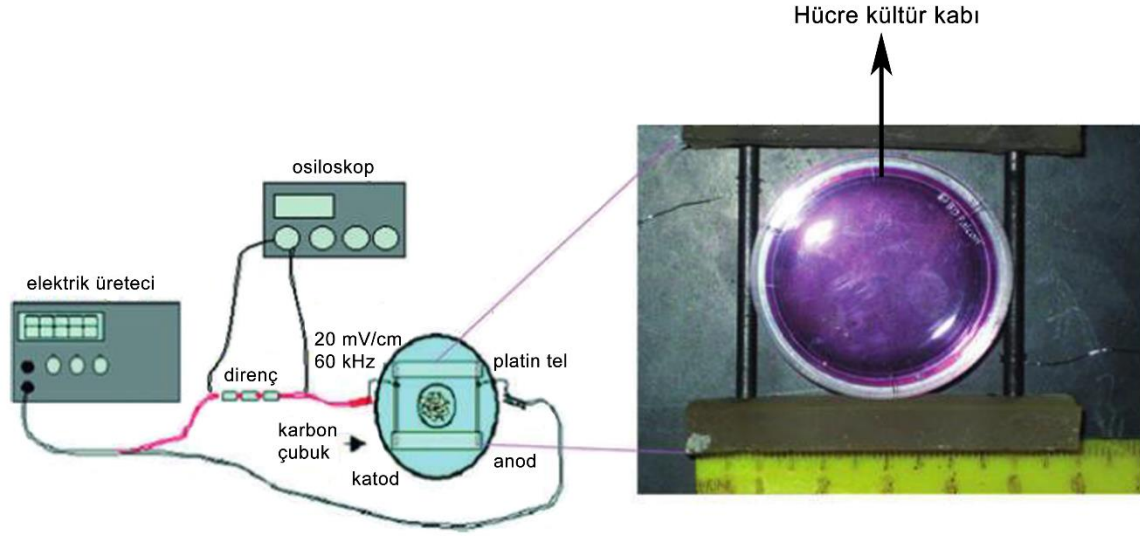


Şekil 2.9. DC elektriksel alan sistemleri ([120]'den değiştirilerek).

Alternatif akım (AC): AC iki yönlü elektriksel alan sunar ve CC (kapasitif bağlantı) ya da IC (indüktif bağlantı) olarak kategorize edilir. Genellikle kardiyak ya da kas hücrelerinin kontraktıl özelliklerini arttırmak, nöral ağ arasındaki iletişimi sağlamak ya da hücre farklılaşmasını ve proliferasyonunu iyileştirmek için kullanılır. CC ya da IC sistemlerde, 1-10 V arası düşük güçte voltaj sağlayan bir güç kaynağı bulunmaktadır. Sinyallerin frekansı 0.2 Hz-2 MHz arasında değişmekle beraber, şekilleri sinüs, kare ya da üçgen şeklinde olabilir. Sinyal süresi de değişiklik gösterebilmektedir. Karbon, platin, altın, titanyum ya da paslanmaz çelik gibi korozif olmayan elektrotlar kullanılır.

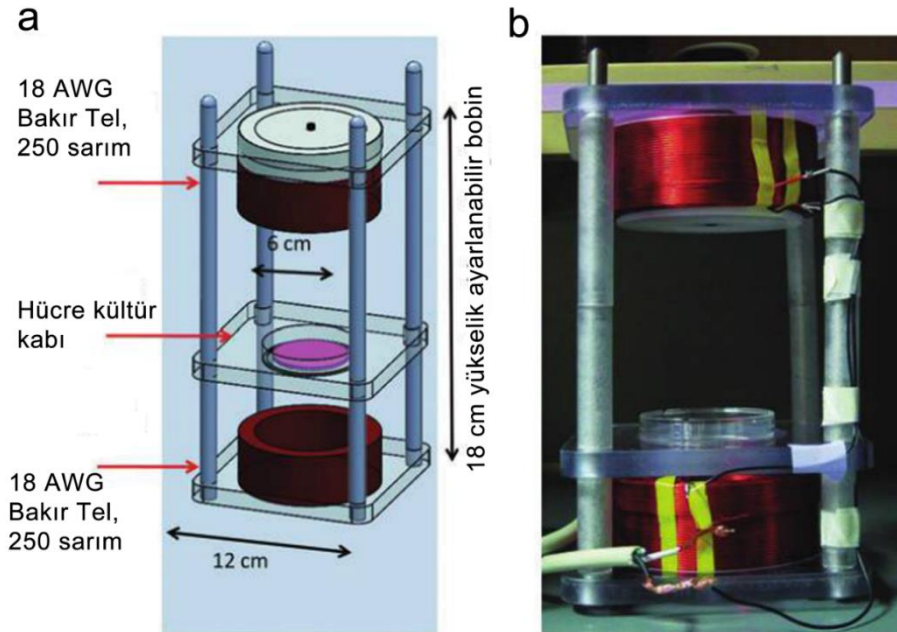
CC sistemlerde elektriksel alan, iki elektrot arasında yüklerin depolanması ile oluşur. Bir elektrot pozitif yüklü iken diğeri negatif yüklüdür (Şekil 2.10). Elektriksel alanın gücü, elektrotlar arasındaki mesafe ile ters orantılıdır. Elektrotlar hücrelere ulaşan elektriksel alanın gücünü hesaplamak için kapasitör olarak kullanılır ve düzgün bir şekle sahip olmaları gerekmektedir. Elektrotlar doku ya da kültür ortamı ile doğrudan temas ettiğinde, AC sistemlerde, elektrik akımı elektrot/elektrolit yüzeyinde iyonik akıma transfer edilir. Hücre kültür ortamlarının iletkenliği yaklaşık 10 mS/cm^{11} 'dir ve bu elektriksel alanın dokuya ne kadar penatre olacağını tahmin etmek için önemli bir faktördür. AC sistemler göreceli olarak

daha basit ve ucuz olduklarından, çoklu örneklerin birarada uyarıldığı büyük sistemlerde daha sık tercih edilir.



Şekil 2.10. CC elektriksel alan sistemleri ([120]'den değiştirilerek).

IC sistemlerde iletken yuvarlak bir tel vardır ve akım telin ortasındaki manyetik alan sonucu oluşur (Şekil 2.11). Örnek bu alanda yerleşmiştir. Manyetik alanın gücü halkadaki akım ile doğru orantılıdır. Bu sistemlerde halkanın çapı genellikle desimetre mertebesindedir ve manyetik alanı güçlendirmek için halka yüzlerce döngüden oluşur. Bu sistemlerde, hücresel proliferasyon ve farklılaşma davranışlarını değiştirmek için oldukça düşük frekanslar kullanılır [121, 122].

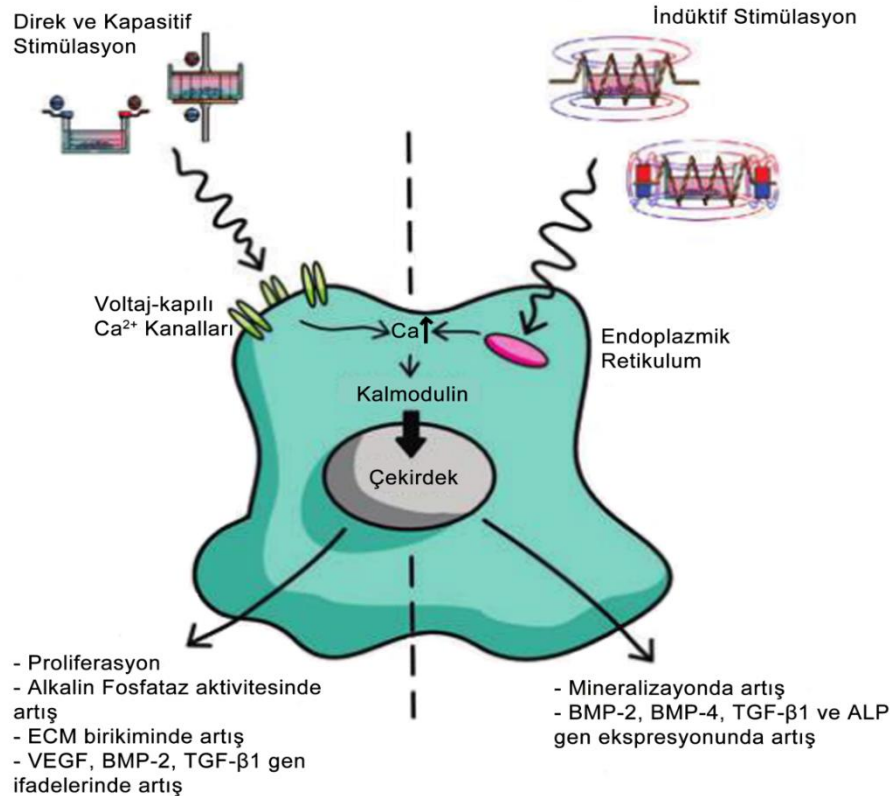


Şekil 2.11. IC elektriksel alan sistemleri ([120]'den değiştirilerek).

2.3.2.2. Elektrostimülasyonun moleküler mekanizması

Elektriğin hücreler üzerindeki etkisini açıklayan birçok teori bulunmaktadır. Bu teorilere göre elektrostimülasyon genellikle mekanotransdüksiyon ve kemotaksis ile benzer yolları izlemektedir [123, 124].

Hücre içi kalsiyum: Elektrik sinyallerinin kısmen de olsa kalsiyum/kalmodulin yollarını etkiledikleri düşünülmektedir (Şekil 2.12). Bu etki kullanılan metoda göre değişiklik gösterebilmektedir. Doğrudan ve kapasitif uyarı hücre membranı üzerine etkilidir. Bu metodlar membranın yüksek elektriksel direncini yenemezler, hücre membranındaki Ca voltaj kanallarının aktivasyonu ile hücre içi Ca^{+2} ve prostaglandin seviyesi artar. İndüktif uyarıda ise elektromanyetik alan, sitoplazma içerisinde potansiyel ve akım oluşturur. Bunun sonucunda hücre içi Ca, endoplazmik retikulum gibi depolardan salınır. Her iki durumda da, Ca seviyesinin yükselmesi ile kalmodulin aktive olur ve buna bağlı olarak proliferasyon, vasküler endotelial büyüme faktörü (*VEGF*) ve transforming büyüme faktörü (*TGF-β*) ekspresyonları artar. Kalsiyum kanalları verapamil ya da nifedipin gibi ilaçlar ile bloke edildiğinde stimülasyon etkileri ortadan kalkmaktadır [117, 125].



Şekil 2.12. Elektriksel alanın hücre üzerinde moleküler düzeydeki etkisi ([46]’ten değiştirilerek).

Elektriksel alan altında büyüme faktörleri ve reseptörler: Elektriksel alanın özellikle epidermal büyüme faktörü (EGF), fibroblast büyüme faktörü (FGF), TGF- β 1 ve VEGF gibi büyüme faktörlerinin reseptörleri üzerinde etkisi olduğu düşünülmektedir. Kültür ortamından büyüme faktörlerinin uzaklaştırılması ile elektriksel alanın uyardığı hücrel migrasyonun bozulması bu görüşü desteklemektedir. Diğer bir çalışmada da, EGF reseptörlerinin, hücrelerin katoda bakan yüzlerine doğru hareket ettikleri görülmüştür [111, 126].

Hücre migrasyonu (galvanotaksis): Elektriksel alanın hücre migrasyonunu tam olarak nasıl etkilediği bilinmemekle beraber, bu olayda aktin filamentlerinin asimetrik olarak biraraya gelmelerinin ya da ayrılmalarının, membran reseptörlerinin yeniden konumlanmalarının ve integrinlerin büyük önem taşıdığı düşünülmektedir. Golgi aygıtının katoda yönelmesinin hareketin yönünün belirlenmesinde kritik bir rol oynadığı öne sürülmektedir. Bu organelin, çekirdeğin ön kısmında bulunması ile hücreler ileri doğru hareket etmektedir. Bu polarizasyon elektriksel alan ile uyarılan migrasyonda belirleyicidir [111, 117, 123, 127].

Hücre içi sinyal yolları: Hücre içerisinde elektriksel alanın etkileri ile ilişkili olduğu düşünülen, kalsiyum/kadmiyum yolu ile birlikte birçok sinyal yolu vardır. Elektrik sinyalleri P13K/Pten yolunu aktive etmektedir ve bu aktivasyon ile Akt, protein kinaz C, mitojen-aktive protein kinaz 38 ve ERK uyarılmaktadır. Bu sinyal yolları proliferasyonu ve farklılaşmayı sağlayan genlerin ekspresyonlarından sorumludur. P38, ERK ve P13K yolları bloke edildiğinde, mezenkimal kök hücrelerde elektriksel alanın uyardığı proliferasyonun, VEGF ve BMP-2 ekspresyonunun inhibe olduğu görülmüştür [128, 129].

2.3.2.3. Elektrostimülasyona karşı oluşturulan hücrel cevap

DC elektriksel alan

Morfoloji: Hücreler, uygulanan DC elektriksel alana, uzama, yeniden organize olma, yönelme gibi morfolojik cevaplar verir. DC elektriksel alan altında gerçekleşen morfolojik değişimler genellikle uygulama yapıldıktan sonraki 24 sa içerisinde meydana gelir. AdMSC'ler ve insan epikardiyal yağ dokusundan izole edilen kök hücrelerin, 6 V/cm'lik elektriksel alana tabi tutulduktan 4 sa sonra uzayarak elektriksel alana yöneldikleri belirlenmiştir. NIH3T3 hücrelerinde ise bu yönelme 3 sa sonra gerçekleşmiştir. Morfolojik cevabın zamanı elektriksel alanın gücüne göre değişiklik göstermektedir. Örneğin insan deri fibroblastları, 0.1 V/mm'de 24 sa, 0.4 V/mm'de ise 3 sa sonra uzama gösterir. Oluşan bu

morfolojik cevaplarda etkin olan bir diğer parametre de hücre tipidir. Fibroblast hücreleri, 7 V/cm'ye 60 dk içinde morfolojik olarak cevap verirken, mezenkimal kök hücrelerde herhangi bir yeniden organizasyon görülmez. Hücrelerin morfolojik kontrolü, korneal stroma tabakalarının oluşturulmasında, periferik sinir hasarlarında sinir uçlarındaki bağlantıların yeniden kurulmasında ve kardiyak kas hücrelerinin düzenlenmesinde önem taşımaktadır [120].

Migrasyon: Migrasyon, diğer adı ile galvanotaksis, DC elektriksel alanın en iyi bilinen bir diğer etkisidir. Migrasyonun yönü hücre tipine göre değişiklik göstermektedir. İnsan keratinositleri, fare embriyonik fibroblastları katoda doğru hareket ederken, insan granülositleri, tavşan kornea entotelyal hücreleri ve insan vasküler endotelyal hücreleri anodu tercih eder. Migrasyon, doku iskelesinin iç kısımlarındaki hücre infiltrasyonu, evsahibi doku ile bütünleşme gibi noktalarda büyük önem taşımaktadır [120]. İnsan fibroblastları, 0.1 V/cm elektriksel alanda, 0.58 mg/mL kollajen jel boyunca göç etmiştir. İnsan ve sığır epitel hücreleri, 150 mV/mm elektriksel alan varlığında, katoda doğru saatte 15 µm hızla hareket etmiştir [130].

Farklılaşma: DC elektriksel alan varlığında yapılan bazı çalışmalar, elektriksel alanın, mRNA ekspresyonunu, protein sentezini ve bunlara bağlı olarak da farklılaşmayı arttırdığını ortaya koymuştur. Yetişkin insan dermal fibroblastları, 1 sa boyunca, 100 mV/mm elektriksel alana tabi tutulmuş ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, toplam 164 genin transkripsiyonunda artış tespit edilmiştir. Diğer bir çalışmada, insan mezenkimal kök hücrelerine, 10 gün boyunca, günde 30 dk, 0.1 V/cm elektriksel alan uygulanmıştır. Uyarılan hücrelerde, ALP aktivitesi ve kalsiyum mineralizasyonu önemli derecede artmıştır [120]. Tüm bu çalışmaların yanında, literatürde, DC elektriksel alanın farklılaşma üzerine etkin olmadığını gösteren çalışmalar da mevcuttur. Agaroza ekilen kondrositler, 6 sa boyunca, 4 mA/cm² elektriksel alan altında tutulmuş, ancak agregan ve tip II kollajen mRNA ekspresyonlarında bir farklılık görülmemiştir [131].

AC elektriksel alan

Farklılaşma: Yapılan birçok çalışma, AC elektriksel alanın hücreleri, gen ekspresyonu düzeyinde etkilediğini göstermiştir. Kesikli olarak elektromanyetik alana tabi tutulan hücrelerde ALP seviyesi büyük oranda artmıştır. İnsan MSC'leri osteojenik farklılaşma sırasında, günde 40 dk 60 kHz, 20 mV/cm elektriksel alana maruz bırakılmış, ALP ve tip I kollajen ekspresyonları, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, güçlenmiştir. 3-D

biyomalzemeler ile yapılan çalışmalar kapsamında, insan sarkoma ostojenik hücre hattı (SAOS-2), poliüretan iskelelere ekilmiş ve sisteme 75 ± 2 Hz, 5 ± 1 mV ve 2 ± 0.2 mT elektromanyetik alan uygulanmıştır. Sonuçlar doğrultusunda, ekstraselüler matriste, dekorin, osteokalsin, osteopontin, tipI kollajen ve tipIII kollajen birikiminin, yaklaşık 10 kat arttığı görülmüştür. Gen ekspresyon seviyesindeki elektriksel etkiler hücrenin durumuna göre değişiklik gösterebilmektedir. Örneğin; 15 Hz, 7 mT elektriksel alan, farklılaşma seviyesindeki osteoblastların kemik-benzeri doku oluşturmalarını uyarırken, mineralizasyon aşamasındaki osteoblastlarda, kemik oluşumunu inhibe etmiştir. Bir diğer çalışmada, 20 mV, 60 kHz elektriksel alan uygulanan kıkırdak eksplantında, proteoglikan seviyesi 5 kat, kollajen seviyesi 2 kat artmıştır [132]. Elektriksel alanın kardiyomiyositlerde de gen ekspresyonunu arttırdığı rapor edilmiştir. Miyositler, kollajen süngerlere ekilmiş ve 5 gün boyunca, 2 ms, 5 V/cm ve 1 Hz elektrik uygulaması yapılmıştır. Yapı Western blot, PCR ve immünohistokimya analizleri ile araştırılmıştır. Major doku uyumluluğu kompleksi, konneksin 43, kreatin kinaz MM, kardiyak troponin I, sarkomerik alfa aktin, miyosinin ağır zincirinin beta izoformu ve beta integrinin içerisinde bulunduğu genlerin ekspresyonları artış göstermiştir [133].

Proliferasyon: Proliferasyon hücre metabolizması ve büyümesi açısından kritik bir öneme sahiptir. Rejeneratif tıp alanında, elektriksel alanın proliferasyonu güçlendirdiği gösterilmiştir. Bu kapsamda yapılan bir çalışmada, PLGA doku iskelelerine ekilen osteoblastlar, 300 ms ve 7.5 Hz elektriksel alana tabi tutulmuştur. Bu uygulama günde 2 sa yapılmıştır ve hücre proliferasyonu, 6. gün %39, 12. gün %14 oranında artmıştır. SAOS-2 insan osteoblastları titanyum yüzeylere ekilmiş ve 75 Hz elektromanyetik alan varlığında proliferasyon 2 kat artmıştır. Diğer bir çalışmada, hMSC'lerin sayısı, elektrostimülasyon boyunca %20'den %60'a çıkmıştır. Elektromanyetik alanın, hMSC'leri 6-12 sa arası daha çok G2/M ve 18-24 sa arası G0/G1 fazında tuttuğu bilinmektedir. Dekalsifiye kemik matrisi, sıçanların torasik bölgesine implante edildikten sonra, günde 8 sa, 1-10 mV, $10-20 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ elektriksel alana maruz bırakılmıştır. Bu çalışmada, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında DNA miktarı açısından bir fark gözlenmemiştir. Yapılan bir *in vivo* çalışmada, gözenekli titanyum implantlar, tavşanların humerusuna yerleştirilmiştir. 10 Hz, 2 G manyetik alan ve 25 μs sinyal uygulamasında 14 gün sonra kemik oluşumu gerçekleşmiştir. İmplant dizaynı, malzeme, gözenek boyutu ve implantın kemik doku ile kaynaşması gibi birçok faktör, elektromanyetik alan içerisindeki kemik büyümesini etkilemektedir [120].

Adezyon: 2- ve 3-boyutlu kültürlerde, hücre yapışması, hücresel davranışlar açısından ve kültür ortamında optimal bir mikroçevre yaratmak için önemlidir. Elektromanyetik uygulamalar yapışma davranışlarını değiştirebilmektedir. Hücre yapışması, yüzeye bağlanma, farklılaşma, proliferasyon ve hücre-hücre sinyallerini içeren morfogenez ve organogenezde belirleyici rol oynar. Bu alanda yapılan çalışmalarda çelişkili sonuçlar elde edilmiştir. 60-1000 Hz elektriksel alan sıçan tendon fibroblastlarına ve sıçan kemik iliği osteoprogenitör hücrelerine uygulanmış ve yüzeye yapışan hücrelerin, yüzeyden ayrılması söz konusu olmuştur [134].

İşlevsellik: Bu alanda yapılan birçok çalışma, kardiyak ve iskelet kası hücrelerinin kasılmalarına, sinir hücreleri arasındaki iletişime odaklanmıştır. Kardiyak kası ile yapılan bir çalışmada, 5 V, 1 Hz, 2 ms elektriksel alan varlığında, kasılmaların şiddeti, kontrol grubuna göre 7 kat fazladır. Kardiyomiyositler ile yapılan elektrostimülasyon uygulaması, komşu kas tabakası ile senkronize edilebilir. Kollajen kaplı Petri kaplarında kültüre edilen miyotüpler, 5 Hz elektriksel alan ile uyarıldıklarında, daha büyük bir kasılma göstermişlerdir. *In vivo* çalışmalarda, elektrostimülasyonun kısa ve uzun dönemli periferik sinir rejenerasyonunu etkileyebileceği, kalpteki sitolik ve diastolik dolumu arttırabileceği gösterilmiştir [135].

Morfoloji: AC elektriksel alandan, çoklu hücre tabakaları ve hücre agregatları oluştururken, hücrelerin şeklini değiştirmek için yararlanılır. Çoklu hücre tabakaları ve hücre agregatları, 3-boyutlu doku yapıları oluştururken ve hücresel mikroçevreyi anlamaya çalışırken oldukça önem kazanır. Morfolojik değişiklikler, elektrot boyutuna, uygulanan voltaja ve elektriksel alanın dağılımına göre değişiklik gösterir. Örneğin elektromanyetik alan içerisinde, 6 saatte, 500 Hz'de kondrositler üzerinde herhangi bir etki gözlenmezken, 100 Hz ve 0.0039 mV/cm'de hücre morfolojileri, satellitten iğsiye ve iğsiden küresele doğru değişmiştir [136].

2.3.2.4. Elektrostimülasyon parametreleri

Elektrostimülasyon çalışmalarında, hücre kültürünü etkileyen en önemli faktör, uygulanan voltajın seviyesi ve yapısıdır. Uygulanan voltaj arttıkça, özellikle hücre migrasyonu ve gen ekspresyonu açısından, daha etkin sonuçlar elde edilmektedir [137]. Diğer yandan, hücre proliferasyonundaki ve ECM sentezindeki artış, göreceli olarak hem düşük hem de yüksek akımlarda görülebilmektedir. Bu doğrultuda akım şiddetinin, stimülasyon açısından çok etkin bir parametre olmadığı düşünülmektedir. Ancak belli bir akım şiddetinin üstünde hücreler öleceğinden bu parametreye de dikkat edilmesi gerekmektedir [138]. Maksimum

sinyal genişliği akım yoğunluğu ile sınırlıdır: nekrozu önlemek açısından yüksek akım, kısa uygulama süresini beraberinde getirmektedir [139].

Yapılan çalışmalarda oldukça geniş bir frekans aralığı (7.5-60000 Hz) kullanılmakla birlikte [140], genellikle kullanılan frekans 100 Hz'in altındadır. 10-30 Hz arası kemik oluşumu açısından en etkin frekans aralığı olarak tanımlanmıştır. 7.5 Hz'in ise osteoblast proliferasyonu ve osteoklast farklılaşması için en uygun frekans olduğu belirtilmiştir [125].

2.3.2.5. Elektrostimülasyonun doku mühendisliğindeki kullanımı

Çizelge 2.4'te elektrostimülasyonun doku mühendisliği çalışmalarındaki kullanımı ve elde edilen sonuçlar özetlenmiştir.

Çizelge 2.4. Elektrostimülasyonun doku mühendisliği uygulamaları.

Kaynak	Hücre tipi	Stimülasyon	Sonuçlar
<u>Doğru akım (DC)</u>			
Schmidt, 2007	Sıçan PC-12	0.1 V, 10 μ A, 2 sa	Nörit uzaması
Serena, 2009	İnsan ESC-H13	1 V/mm, 1 Hz	Kasılma, tromponin T ekspresyonu
Shi, 2008	İnsan fibroblastları	0.05 V/mm, 24-48 sa	Hücre yapışması, yayılması ve proliferasyonu
Sun, 2006	Sıçan kemik iliği MSC'leri	0.2, 0.4, 0.7 V/mm, 0-60 dk	Sitokin üretimi, morfolojik düzenlenme
Radisic, 2004	Sıçan fibroblastları ve ventriküler miyositleri	0.5 V/mm, 2 ms, 1 Hz	HücreSEL düzenlenme, kasılma, yapısal organizasyon
<u>Alternatif akım (CC)</u>			
Au, 2007	Sıçan kardiyomiyositleri ve NIH-3T3 fibroblastları	0.23 ve 0.43 V/mm, 1 ms	Uzama, fibroblastların düzenlenmesi, topografik değişimler
Hartig, 2000	Sığır osteoblastları	6 V/mm, 62.5 ms, 16 Hz, 5-18 gün	Proliferasyon ve ECM sentezi
Kim, 2006	Sıçan osteoblastları	1.5 μ A/cm ² , 3000 Hz, 6 sa ya da 24 sa/gün	Proliferasyon
Kim, 2008	İnsan kemik iliği MSC'leri	1.5 μ A/cm ² , 100 Hz, 24 sa/gün, 7 gün	Proliferasyon, VEGF sentezi
Kim, 2009	İnsan MSC'leri	1.5 μ A/cm ² , 250/25 μ s, 100 Hz, 7 gün	Proliferasyon, ALP aktivitesi, kalsiyum birikimi, VEGF ve BMP-2 ekspresyonu
Zhuang, 1997	MC3T3-E1	0.002 V/mm, 300 μ A/cm ² , 60 kHz, 30 dk-24 sa	Proliferasyon, TGF- β 1 ekspresyonu
<u>Alternatif akım (IC)</u>			
Bodamyali, 1998	Sıçan osteoblastları	1 G, 0.225 ms, 6 sa	Kemik benzeri nodül oluşumu, Bmp-2 ve Bmp-4 ekspresyonu
Lohmann, 2003	Osteoblast benzeri hücre hattı (ML0-Y4)	16 G, 15 Hz, 8 sa/gün	Alp aktivitesi, Tgf- β 1 ve prostaglandin E2 ekspresyonu
McLeod, 1993	Osteosarkom hücre hattı (ROS 17/2.8)	0.0018 T, 30 Hz, 12 ya da 72 sa	Proliferasyon ve Alp aktivitesi
Molen, 2000	Osteosarkom hücre hattı (ROS 17/2.8)	0.0018 T, 30 Hz, 12 ya da 120 sa	Hücre farklılaşması

2.3.2.6. Klinik uygulamalar

Doku mühendisliği araştırmaları neredeyse çeyrek yüzyıllık bir tarihe sahip olmasının yanında elektroterapötik yaklaşımların geliştirilmesi 300 yıllık bir zamanı kapsamaktadır. 1900’lü yıllarda, klinikte kullanılacak birçok elektriksel cihaz, FDA (Food and Drug Administration) tarafından onaylanmıştır ki bunların bazıları halen günümüzde kullanılmaktadır. 1952 yılında ilk kez, tamamen implante edilebilir kalp pilleri insanlarda denenmiştir. 1970’lerin sonuna doğru, FDA birçok noninvaziv ve implante edilebilir, elektriksel kemik stimölantını onaylamıştır. Özellikle, Ortofix tarafından üretilen ‘Cervical-Stim’ ve ‘Spinal-Stim’ isimli elektromanyetik uyarıcılar, kemik kırıklarının kaynamasını iyileştirmek için kullanılmıştır. Ortofix tarafından geliştirilen ‘Physco-Stim’im hergün kullanılması, uzun ve kısa kemiklerdeki iyileşme hızını %88 oranında arttırmaktadır. 1980’lerin ortalarında, kemik büyümesi için kullanılan elektrotların patenti alınmıştır. 1997 yılında, elektrotlar ve pillerden oluşan beyin uyarıcıları, istemsiz titremelerin tedavisinde kullanılmak üzere onaylanmıştır ve daha sonra bu sistemler Parkinson hastalığındaki semptomları azaltmak için kullanılmaya başlanmıştır. 2002 yılında, kronik basınç ülserleri, nöropatik diyabetik ülserler ve venöz bacak ülserlerinde kullanılmak üzere, düşük yoğunlukta akım uygulayan elektriksel sinir uyarıcıları gündeme gelmiştir.

Klinikte kullanılan DC cihazlar genellikle implante edilebilir cihazlardır ve ‘SpF-XL Iıb Spinal Fusion Stimulator’, ‘SpF PLUS-Mini Spinal Fusion Stimulator’ şeklinde adlandırılmışlardır. Genellikle eksternal olarak kullanılan AC cihazlar ise ‘EBI Bone Healing Systems’, ‘Orthopak 2 Bone Growth Stimulator’ ve ‘SpinalPak II Spinal Fusion Stimulator’ olarak sıralanabilir [120].

2.4. Biyokimyasal Stimölasyon

Doku iyileşmesi, tam olarak açıklığa kavuşturulamamış, birçok biyolojik sürecin birarada yürütölmesi ile gerçekleşmektedir. Daha önce de belirtildiğı üzere bu biyolojik süreçler hücre içi ve hücre dışı sinyal moleküllerini içermektedir [141].

Diğer dokularda olduğı gibi kemik doku gelişiminde etkin olan lokal ve sistemik faktörler; büyüme ve farklılaşma faktörleri, hormonlar, sitokinler ve ECM içerisinde bulunan farklı hücre tipleri şeklinde sıralanabilir. Kemik doku iyileşmesinde görev alan biyokimyasal moleküllerin ekspresyonu zamana bağılı bir profil göstermektedir. Doku iyileşmesinin belli dönemlerinde, ortamda baskın olarak bulunan biyokimyasal molekül de değışmektedir. Bu bilgiler ışığında biyokimyasal moleküller erken ve geç dönem farklılaşmaya etki eden faktörler olarak tanımlanabilir ve temel olarak şu şekilde sınıflandırılmaktadır; 1) pro-inflamator sitokinler, 2)

büyüme faktörleri ve 3) anjiyojenik faktörler [12].

1) Pro-inflamator sitokinler: İnterlökin-1(IL-1), interlökin-6 (IL-6) ve tümör nekroz faktör-alfa (TNF- α) iyileşme sürecinde başlatıcı faktörler olarak görülmektedir. Makrofajlar ve inflamatuvar hücrelerinin yanında, periosteumda bulunan mezenkimal kökenli hücreler tarafından da salgılanır. Diğer inflamatuvar hücreler üzerinde kemotaktik etki yaratarak, ECM sentezini, anjiyogenezi ve fibrojenik hücrelerin hasarlı bölgede toplanmasını uyarırlar. Hasar oluşumundan 24 sa sonra ekspresyon seviyeleri en üst noktaya ulaşır. Kıkırdak oluşumu sırasında bu seviye düşer ancak kemiğin yeniden yapılanması sırasında tekrar yükselir [142].

Sitokinler aynı zamanda endokondral kemik oluşumunu ve kemiğin yeniden yapılanmasını da düzenlerler. TNF- α mezenkimal kök hücrelerinin biraraya gelmesini, endokondral kemik oluşumu sırasında hipertropik kondrositlerin apoptoza gitmesini ve osteoklastik farklılaşmayı uyarırlar. Ayrıca IL-1, IL-6 ve TNF- α , kemik iyileşmesinin geç aşamalarında, oluşan kemiğin şekillenmesinde yeniden devreye girerler [143].

2) Büyüme ve farklılaşma faktörleri: Transforming büyüme faktörü- β (TGF- β), kemik morfojenik protein (BMP), transforming büyüme faktörü (TGF- β), büyüme farklılaşma faktörü (GDF), aktivatörler ve inhibitörleri içine alan oldukça büyük bir ailedir. Bu büyüme faktörleri yüksek molekül ağırlığına sahip öncüllerden köken alır ve proteolitik enzimlerce aktive edilir. Büyüme faktörleri, hedef hücrelerdeki serin/treonin kinaz membran reseptörlerine bağlanarak hareket eder. Bu ligand-reseptör bağlanması, hücre içi sinyal yollarını aktive ederek çekirdekteki gen ekspresyon seviyelerini uyarır. Platelet-kökenli büyüme faktörü (PDGF), fibroblast büyüme faktörü (FGF) ve insulin-benzeri büyüme faktörü (IGF) kemik doku oluşumunda etkili diğer büyüme faktörleridir. Kemik doku oluşumunda etkin olan büyüme faktörleri Çizelge 2.5'te kısaca özetlenmiştir [12].

Çizelge 2.5. Kemik doku rejenerasyonunda etkili olan büyüme faktörleri.

TGF- β

- Kaynak: Granüle olmayan plateletler, inflamator hücreler, endotelyum, ECM, kondrositler, osteoblastlar
- Hedef: MSC'ler, osteoprogenitör hücreler, osteoblastlar, kondrositler
- Kemik oluşumundan sorumlu hücreler için mitojenik ve kemotaktik, makrofajlar için kemotaktik
- Doku iyileşmesinin çok erken safhalarında eksprese olurlar

PDGF

- Kaynak: Granüle olmayan plateletler, makrofajlar, monositler (erken evrede), endotelial hücreler, osteoblastlar (geç hücrede)
- Hedef: Mezenkimal ve inflamator hücreler, osteoblastlar
- Osteoblastlar ve mezenkimal hücreler için mitojenik, ayrıca inflamator ve mezenkimal hücreler için kemotaktik
- Doku iyileşmesinin çok erken safhalarında salınırlar

BMP'ler

- Kaynak: Osteoprogenitör ve mezenkimal hücreler, osteoblastlar, kemik ECM'si ve kondrositler
- Hedef: Mezenkimal ve osteoprogenitör hücreler, osteoblastlar
- Mezenkimal hücrelerin kondrositlere ve osteoblastlara farklılaşması, osteoprogenitör hücrelerin osteoblastlara farklılaşması
- Doku iyileşmesi esnasında BMP'ler zamana bağlı bir ekspresyon profile çizerler. *BMP-2* doku iyileşmesi sırasında ilk eksprese olan genidir ve mezenkimal kök hücrelerin biraraya gelmesi ile başlayan iyileşme sürecini uyarır. *BMP-3* ve *4* de erken dönem genleridir. İyileşme sürecinin yanında monositlerin göçünde de görev alırlar. *BMP-2* geç dönem geni olarak mineralizasyonda görev alır

FGF

- Kaynak: Monositler, makrofajlar, mezenkimal hücreler, osteoblastlar, kondrositler
- Hedef: Mezenkimal ve epitelyal hücreler, osteoblastlar, kondrositler
- Anjiyojenik ve mitojenik etki gösterirler
- Osteoblast oluşumuna kadarki evrede eksprese olurlar

IGF

- Kaynak: Kemik matrisi, endotelial ve mezenkimal hücreler (granülasyon aşaması), osteoblastlar ve hipertropik kondrositler (kemik ve kıkırdak oluşumu sırasında)
 - Hedef: MSC, endotelial hücreler, osteoblastlar, kondrositler
 - IGF-I mezenkimal ve osteoprogenitör hücrelerin biraraya gelmesini ve proliferasyonunu uyarırken, IGF-II endokondral ossifikasyon sırasında proliferasyonu ve protein sentezini (tip II kollajen) arttırır.
-

3) Metalloproteinaz ve anjiyojenik faktörler: Kemik rejenerasyonunun optimum düzeyde gerçekleşmesi için, yeterli bir kan akışı olması gerekmektedir. Endokondral osifikasyonun son aşaması yeniden yapılanma evresidir ve bu evrede metalloproteinazlar kırıktağı degrade ederek yeni kemik ve kan damarları için yer açar.

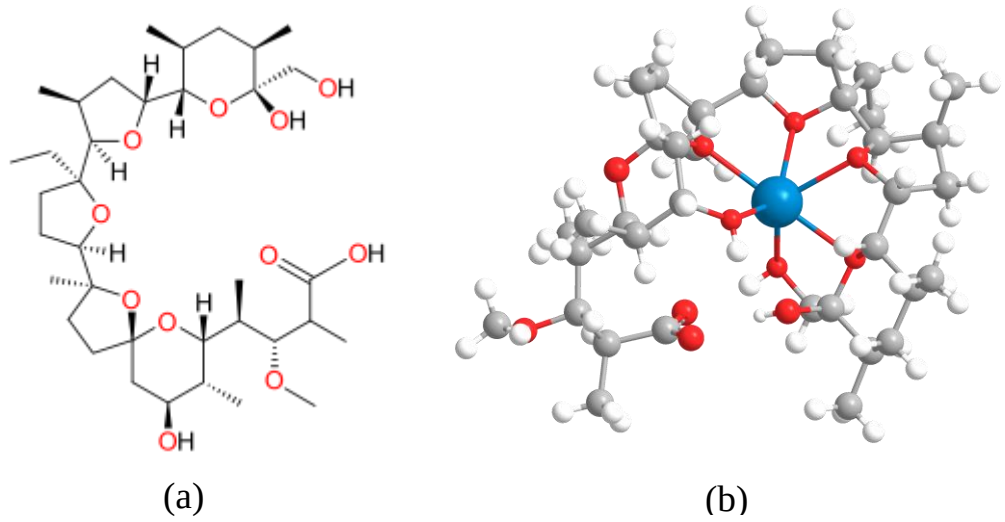
Anjiyogenezin iki ayrı yoldan kontrol edildiğine inanılmaktadır; vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF)-bağımlı yol ve anjiyopoietin-bağımlı yol. Her iki yolun da, doku iyileşmesi sırasında işlevsel olduğu düşünülmektedir. VEGF yeni anjiyogenez için gereklidir ve endotelial hücrelere özgü bir mitojendir. Anjiyopoietin 1 ve 2 ise büyük damarların oluşumundan ve varolan damarların dallanmalarından sorumludur. Ancak bu moleküllerin kemik doku iyileşmesindeki rolleri tam olarak anlaşılamamıştır. Street ve ark. dışarıdan uygulanan VEGF'in doku onarımını hızlandırdığını göstermiştir. Yeni yapılan çalışmalar da, BMP'nin osteoblast ve osteoblast benzeri hücrelerden *VEGF* ekspresyonunu uyardığını belirtmektedir [12, 144].

Kemik doku mühendisliğinde, daha etkin sonuçlar elde etmek için, yukarıda sözü edilen biyosinyal molekülleri sıklıkla tercih edilmektedir. Bu moleküller, anlatıldığı üzere, hücre içerisindeki sinyal yollarını aktive ederek etkinliklerini göstermektedir. Ancak bu moleküllerin pahalı oluşları ve kararsız kimyasal yapıları, araştırmacıları başka uyarılara yönlendirmektedir.

Proliferasyon, farklılaşma, migrasyon gibi birçok hücrel davranışta, hücre içi elektrik sinyalleri önemli bir rol oynamaktadır. Hücre içi elektriksel alan, birçok hasarlı ve rejene olan dokuda ölçülmüştür. Hasarlı dokularda, bütünlüğünü kaybeden hücre membranlarından sızan iyonların potansiyel bir farka neden olduğu ve bunun sonucunda oluşan akımın, doku rejenerasyonunda etkin olduğu belirlenmiştir [129, 145]. Kemik doku mühendisliği kapsamında gerçekleştirilen çalışmalarda, hücrel davranışları etkileyecek biyoelektrik sinyaller, genellikle dışarıdan bir elektriksel alan yaratılarak sağlanmaktadır. Bunun yanında hücre içerisinde elektriksel sinyaller oluşturarak, hücrelerin elektrofizyolojik koşullarını düzenlemeyi amaçlayan çalışmalar oldukça nadirdir. Bu amaçla yapılan bir çalışmada, iyon kanallarını hedefleyen ilaçlar kullanılmış ve oluşan hücre içi elektriksel alanın, osteojenik farklılaşma üzerindeki etkinliği incelenmiştir [13]. Aşağıda, sunulan tez çalışması kapsamında kullanılan iyon kanallarını hedefleyen iki molekül (monensin ve glibenklamid) ile ilgili bilgi verilmiştir.

2.4.1. Monensin

Doğal karboksilik polietar iyonoforlar, antibakteriyal, antifungal, antiparazitik, antiviral ve kanser hücrelerindeki toksik etkileri nedeniyle oldukça ilgi çekmektedir. Karboksilik iyonoforların psödo-siklik yapısındaki polietar iskelet, metal katyonları ile kompleks yaparak onların hücresel membrandan taşınımını sağlar. Monensin doğal iyonoforların en çok çalışılanıdır ve genellikle veterinerlik alanında kullanılmaktadır. Monensinin kimyasal yapısı ve moleküler gösterimi Şekil 2.13’te verilmiştir.



Şekil 2.13. Monensinin kimyasal yapısı (a) ve moleküler gösterimi (b).

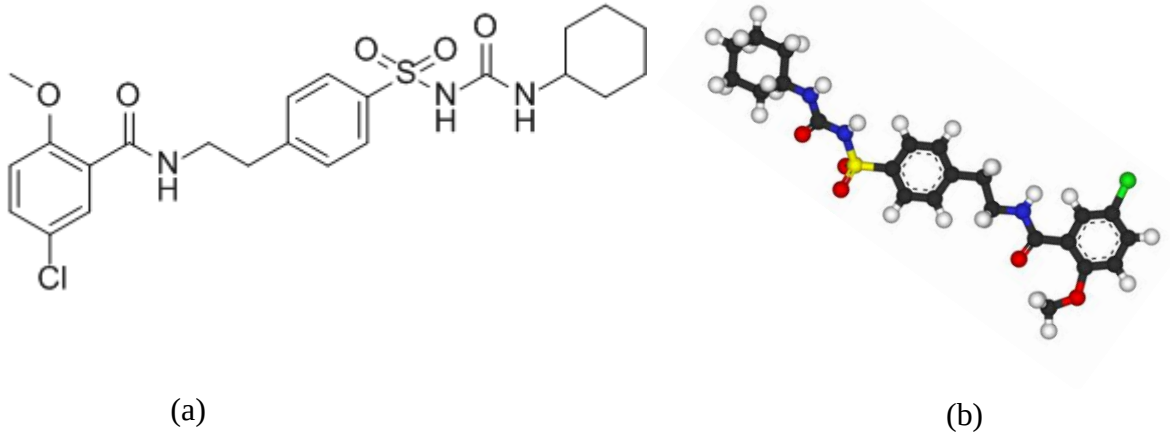
Monensin, sodyum katyonları (Na^+) ile kompleks oluşturarak, Na^+/K^+ gradiyentine ters şekilde, bu katyonların hücre membranından taşınmasını sağlar. Bu durum gram pozitif bakterilerde ölüme neden olmaktadır [146].

Metal katyon taşınmasında en bilinen yol, proton ve katyonların değişimidir ve elektronötral yol olarak tanımlanır. X-ray kristallografisi ile, monensinin birçok monovalent katyon (Li^+ , Na^+ , K^+ , Rb^+) ile kararlı bir kompleks oluşturduğu görülmüştür. Monensinin kimyasal yapısındaki, baş-kuyruk bölgesi moleküller arası hidrojen bağları ile kararlı hale gelmekte ve bu yapı psödo-siklik yapıyı oluşturmaktadır. Katyonlar daima psödo-siklik yapı ile etkileşime geçmektedir. Elektronötral yola göre, monensin, katyonlar ile kompleks oluşturarak nötral tuzları (Mon^-M^+) ya da nötral monensin asidi (MonH) meydana getirmektedir. Taşınım bu şekilde sağlanmaktadır. Bunun nedeni, hücre membranından ancak yüksüz moleküllerin geçebilmesidir [147].

2.4.2. Glibenklamid

Glibenklamid, sülfonilüreaz grubuna giren ve glibürid adı ile de bilinen antidiyabetik bir

ilaçtır. Pankreatik beta hücrelerindeki, ATP-duyarlı potasyum kanallarının (K_{ATP}) düzenleyici altbirimi olan, sülfonilüre reseptör 1 (SUR1)'e bağlanarak aktivitelerini inhibe eder. Bu inhibisyon, voltaj-bağımlı kanalların açılarak hücre membranının depolarizasyonuna neden olur. Daha sonra, beta hücrelerinde hücre içi kalsiyum seviyesi yükselir ve bunu takiben insulin salımı gerçekleşir [148]. Glibenklamidin kimyasal yapısı ve moleküler gösterimi Şekil 2.14'de gösterilmiştir.



Şekil 2.14. Glibenklamidin kimyasal yapısı (a) ve moleküler gösterimi (b).

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Bu bölümde, tez kapsamında gerçekleştirilen deneysel çalışmalar ile ilgili bilgiler sunulmaktadır. İlk bölümde çalışmalarda kullanılan kimyasal ve biyolojik maddeler özetlenmiştir. İkinci bölümde, kitosan doku iskeleleri, ipek filmler ve ipek doku iskelelerini kapsayan biyomalzemelerin üretim yöntemleri ve karakterizasyon çalışmaları anlatılmıştır. Üçüncü kısımda, fotostimülasyon ve elektrostimülasyon olmak üzere, çalışmalarda kullanılan biyostimülasyon düzenekleri hakkında bilgi verilmiştir. Sonraki bölümde hücre kültürü çalışmalarında kullanılan AdMSC ve hMSC'lerin izolasyon ve karakterizasyon yöntemlerinden bahsedilmiştir. Son kısımda ise *in vitro* biyostimülasyon çalışmalarına yer verilmiştir. Fotostimülasyon ve elektrostimülasyon başlıkları altında, hücre ekimi, biyostimülasyon uygulaması, hücre proliferasyonu ve farklılaşmasını belirlemek amacıyla yapılan analizler hakkında bilgi verilmiştir. Doktora tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen deneysel aşamalar Şekil 3.1'de özetlenmiştir.

3.1. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Kimyasal ve Biyolojik Malzemeler

Kitosan doku iskelelerinin üretiminde kullanılan kitosan Sigma (ABD), asetik asit Riedel-de Haen (Almanya) firmasından satın alınmıştır. İpek doku iskelelerinin üretiminde kullanılan Na_2CO_3 ve LiBr Sigma (ABD) firmasından alınmıştır. Arjinin-glisin-aspartik asit tripeptit (RGD) Bachem (ABD) firmasından temin edilmiştir. RGD ile fonksiyonizasyon çalışmalarında kullanılan 2-(N-Morfolin)ethansülfonik asit hemisodyum tuzu (MES tamponu), N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etil karbodiimid hidroklorür (EDC) ve N-Hidroksi süksinimid (NHS) Thermo Fischer Scientific (ABD) firmasından alınmıştır. İpek filmlerin üretiminde kullanılan platin teller A-M Systems'den (ABD) alınmıştır. Elektrik stimülasyonunda kullanılan karbon elektrotlar Electron Microscopy Sciences (ABD) firmasından temin edilmiştir.

Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan α -MEM, penisilin-streptomisin ve serum (FBS) Invitrogen (ABD) firmasından satın alınmıştır. Farklılaşma ortamına eklenen β -gliserol fosfat tuzu, L-askorbik asit ve dekzametazon Sigma (ABD) firmasından satın alınmıştır. Hücre proliferasyonunun belirlenmesinde kullanılan MTT (3-[4,5-dimetiltiyazol-2-il]-difeniltetrazolyum bromür), hücre fiksasyonunda kullanılan gluteraldehit ve von Kossa boyamada kullanılan gümüş nitrat Sigma-Aldrich (Almanya) firmasından satın alınmıştır. Alamar blue çözeltisi Life Technologies (ABD) firmasından satın alınmıştır. Hücre boyamalarında kullanılan Alexa Fluor® 488 Phalloidin ve 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) Invitrogen ve propidyum iyodür Sigma-Aldrich (Almanya) firmalarından temin

edilmiştir. Gerçekleştirilen tüm deneylerde ultra saf su kullanılmıştır (Barnstead E-PURE™, Thermo Scientific, ABD).

3.2. Polimerik Sistemlerin Hazırlanması ve Karakterizasyonu

3.2.1. Kitosan Doku İskeleleri

Fotostimülasyon çalışmaları kapsamında kitosan doku iskeleleri kullanılmış, temel karakterizasyonları yapıldıktan sonra, hücre kültürü çalışmalarına geçilmiştir.

3.2.1.1. Hazırlama yöntemi

Kitosan doku iskeleleri “dondurarak kurutma” yöntemi ile hazırlanmıştır [6]. Bu yöntemde >%85 deasetilasyon derecesine (DD) sahip kitosan %1’lik (v/v) asetik asit çözeltisinde çözünene kadar karıştırılmış ve %2’lik (w/v) kitosan çözeltisi elde edilmiştir. Elde edilen çözelti safsızlıklarından arındırılmak üzere filtrelenmiş ve 24-gözlü kültür kaplarına dökülerek -20°C’de dondurulmuştur. Bu aşamadan sonra kitosan doku iskeleleri, liyofilizatörde (-80°C, Christ, Almanya) kullanılarak “dondurarak kurutma” işlemine tabi tutulmuştur. Elde edilen iskeleler, 10 mm çap ve 2 mm kalınlığa sahip olacak şekilde kesilmiştir. Son olarak iskeleler, 96’lık (v/v) etanol çözeltisi içerisinde 1 gün, %70’lik (v/v) etanol çözeltisi içerisinde ise 1 sa bekletilerek stabilizasyon işlemi tamamlanmıştır.

3.2.1.2. Karakterizasyon çalışmaları

Taramalı elektron mikroskop (SEM) analizi

Üretilen kitosan doku iskelelerinin gözenek yapısını belirlemek üzere SEM (Zeiss Evo 50, Almanya) analizi yapılmıştır. Bu amaçla örnekler altın ile kaplanmış ve mikroskop altında görüntüleri çekilmiştir.

Su tutma çalışmaları

Kitosan doku iskelelerinin su tutma oranlarını belirlemek üzere kuru örnekler öncelikle tartılmış ve daha sonra 37°C’de fosfat tampon çözeltisine (PBS, pH:7.4) alınmıştır. Belirlenen süre sonunda çözelti içerisinde çıkarılan örneklerin üzerindeki fazla çözelti filtre kağıdı ile uzaklaştırılmış ve yaş ağırlıkları ölçülmüştür. Su tutma oranları gravimetrik olarak Eşitlik 3.1 kullanılarak hesaplanmıştır:

$$\text{Su tutma oranı} = (W - W_0)/W_0 \quad [3.1]$$

Eşitlikteki W_0 kitosan iskelenin kuru ağırlığını, W ise yaş ağırlığını belirtmektedir.

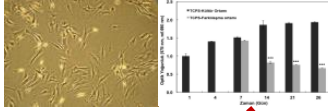
In vitro Biyostimülasyon Çalışmaları

Fotostimülasyon

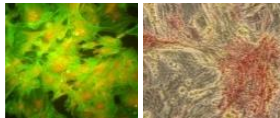


Sıçan AdMSC İzolasyonu

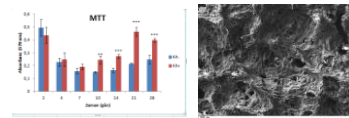
Sıçan AdMSC Karakterizasyonu



TCPS



Kitosan doku iskeleleri



Elektrostimülasyon

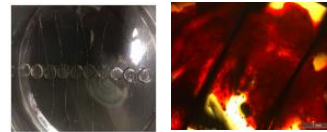


İnsan hMSC İzolasyonu

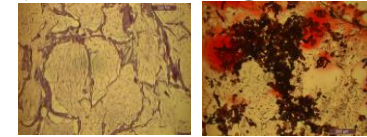
İnsan hMSC Karakterizasyonu



İpek filmler



İpek doku iskeleleri+ biyokimyasallar (monensin ve gibenklamid)



Şekil 3.1. Doktora tez çalışması kapsamındaki deneysel aşamaların şematik gösterimi.

Gözenekliliğin belirlenmesi

Doku iskelelerinin toplam gözenekliliği (Π) Eşitlik 3.2 kullanılarak, gravimetrik olarak hesaplanmıştır [149].

$$\Pi = 1 - \rho_{\text{doku iskelesi}} / \rho_{\text{malzeme}} \quad [3.2]$$

Belirtilen eşitlikteki ρ_{malzeme} doku iskelesi üretiminde kullanılan malzemenin yoğunluğunu, $\rho_{\text{doku iskelesi}}$ ise doku iskelesinin, ağırlığının hacmine bölünmesi ile elde edilen, görünür yoğunluğu temsil etmektedir.

3.2.2. İpek Filmler ve Doku İskeleleri

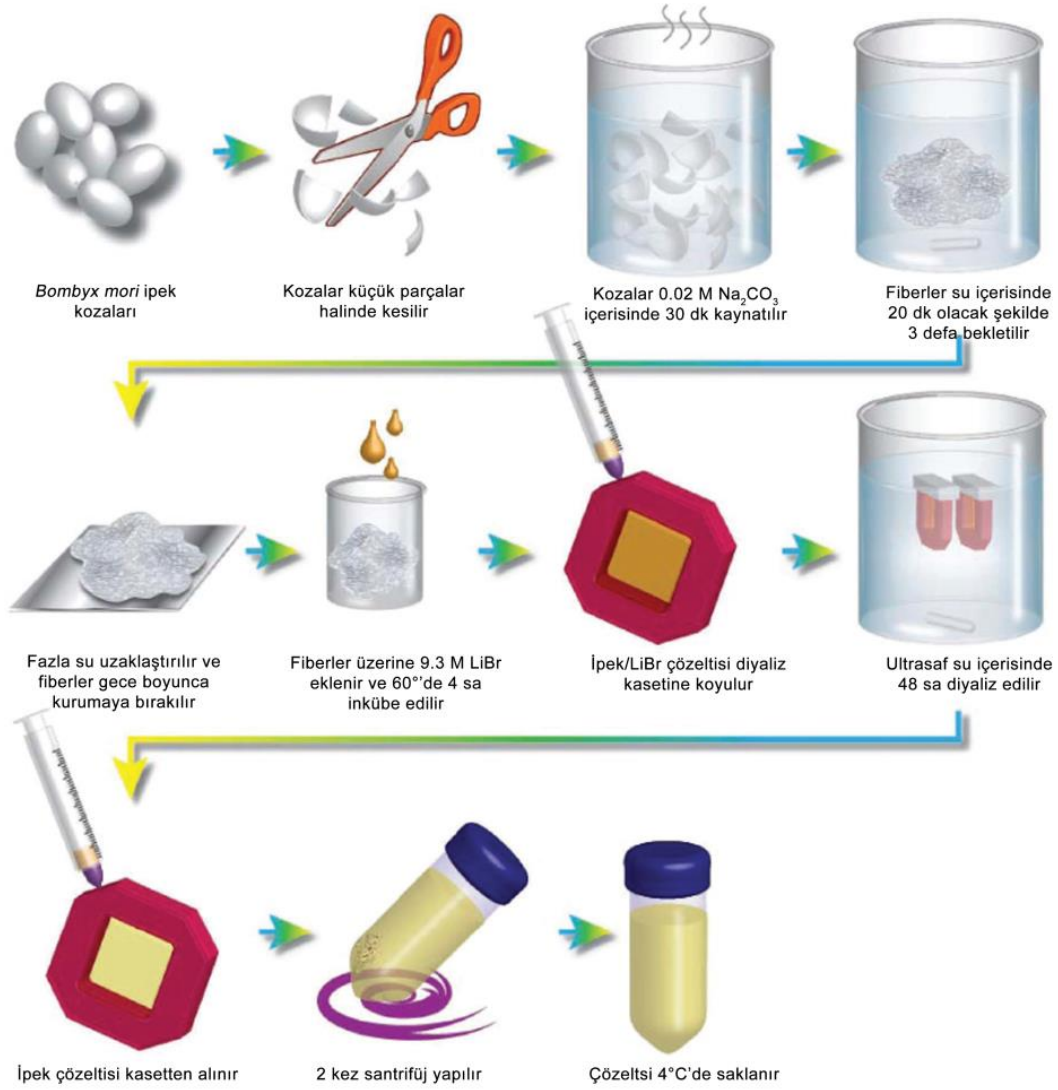
Elektrostimülasyon çalışmaları, ipek filmler ve doku iskeleleri kullanılarak, 2-ve 3-boyutlu sistemlerde yürütülmüştür.

3.2.2.1. İpek çözeltisinin hazırlanması

İpek çözeltisi elde etmek amacıyla, *Bombyx mori* ipek kozaları (Tsukuba, Japonya) küçük parçalara bölünmüş ve 0.02 M Na_2CO_3 çözeltisi içerisinde 30 dk kaynatılmıştır. Böylece yapışkan serisin proteini yapısal fibroin proteininden uzaklaştırılmıştır. Daha sonra elde edilen fibroin ekstraktı 3 kez distile su ile yıkandıktan sonra oda sıcaklığında 9.3 M LiBr çözeltisi içerisinde çözülmüştür. Elde edilen çözelti 60°C'de 4 sa bekletildikten sonra 48 sa boyunca su içerisinde diyalize tabi tutulmuştur. Diyaliz sonrasında elde edilen ipek çözeltisi 13,000 g'de 10 dk santrifüj edilmiş ve süpernatant 4°C'de saklanmıştır (Şekil 3.2). Çözeltinin konsantrasyonu gravimetrik olarak hesaplanmıştır [150].

3.2.2.2. İpek ve platin tel içeren ipek filmlerin üretilmesi

Daha sonra 250 μL ipek çözeltisi, pipet yardımı ile 11 mm çaplı Polidimetilsiloksan (PDMS) kalıplar üzerine koyulmuş ve 1 gece oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Platin tel içeren ipek filmleri üretmek amacıyla, iki adet, 127 μm çapa sahip platin tel, aralarında belirli bir mesafe olacak şekilde PDMS kalıplar üzerine yerleştirilmiştir ve ipek çözeltisi daha sonra kalıplara koyulmuştur. Havada kurutulan ipek ve platin tel içeren ipek filmler su buharı ile stabilize edilmiştir. Bu amaçla filmler su dolu desikatör içerisinde, 24 mmHg vakumda bırakılmış ve 4 sa boyunca su buharına tabi tutulmuştur. Stabilizasyon sonrasında filmler PDMS kalıplardan ayrılmıştır.



Şekil 3.2. İpek çözeltisinin hazırlanması [151].

3.2.2.3. İpek doku iskelelerinin üretilmesi

3-boyutlu ipek doku iskeleleri “çözücü döküm-partikül uzaklaştırma” yöntemi ile üretilmiştir. Bu amaçla 4 g NaCl partikülü (500-600 μm), 2 mL, %6’lık (w/v) ipek çözeltisi içerisine eklenmiştir. Bu işlem Teflon silindirler içerisinde ve oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. 48 sa’lık inkübasyon sonunda silindirler su içerisine alınmış ve 2 gün boyunca, belli aralıklarla içerisinde bulundukları su değiştirilerek, tuz partiküllerinin yapıdan tamamen uzaklaştırılması sağlanmıştır [152]. Son olarak ipek doku iskeleleri, hücre kültürü çalışmalarında kullanılmak üzere, 8 mm çapa ve 2 mm kalınlığa sahip olacak şekilde kesilmiştir.

3.2.2.4. Taramalı elektron mikroskop (SEM) analizi

Üretilen ipek biyomalzemelerin morfolojik yapılarını belirlemek üzere SEM (Zeiss Evo 50, Almanya) analizleri yapılmıştır. Bu amaçla örnekler altın ile kaplanmış ve mikroskop altında görüntüleri çekilmiştir.

3.2.2.5. RGD fonksiyonallizasyonu

İpek biyomalzemelerin yüzeyleri, hücresel yapışmayı arttırmak amacı ile RGD ile işlevsel hale getirilmiştir. İpek filmler ve doku iskeleleri MES tamponu içerisinde, oda sıcaklığında, 30 dk bekletilmiştir. Daha sonra örnekler EDC/NHS çözeltisi (50 mg EDC/70 mg NHS) içerisine alınmış, 30 dk inkübasyon sonunda MES tamponu ile 2 kez yıkanmıştır. Son olarak örnekler 2 sa boyunca RGD çözeltisi (0.2 mg/mL) içerisinde bekletilmiş ve PBS tamponu ile yıkama yapılmıştır. Hücre kültürü çalışmalarından önce örnekler %70'lik (v/v) etanol ile sterilize edilmiş ve sonrasında 7-8 kez PBS ile yıkama işlemlerine tabi tutulmuştur [153].

3.3. Biyostimülasyonda Kullanılan Sistemler ve Deney Düzenekleri

3.3.1. Fotostimülasyon Düzenekleri

Fotostimülasyon çalışmaları kapsamında ışık kaynağı olarak kullanılan Collagentex®, kuartz plazma ark lamba, özel filtreler ve reflektör sistemden oluşmaktadır (Şekil 3.3). Bu sistemde 590-1550 nm arası dalga boylarını kapsayan polikromatik ışık ve kızılötesi enerji sağlanmaktadır. Cihazın çıkış gücü 685 W'dır, plazma ark ışık kaynağı olarak tanımlanmaktadır.

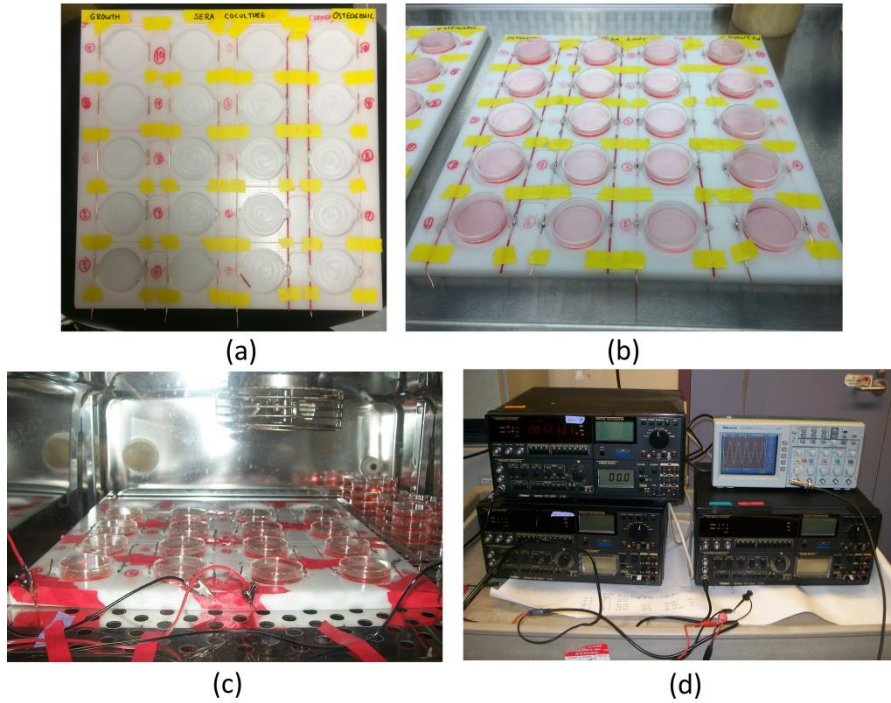


Şekil 3.3. Fotostimülasyon sistemi.

Plazma ark ışık kaynağı temel olarak, 550 nm'nin altındaki ve 1500 nm'nin üstündeki temel emisyonları bloke ederek, 590, 633, 666, 712, 812, 1018, 1128, 1356 ve 1395 nm dalga boylarındaki ışıkları bir arada sunmaktadır. Cihazdan yayılan ışık 0.3 m²'lik alanda etkilidir ve enerji yoğunluğu 130 mW/cm²'dir.

3.3.2. Elektrostimülasyon Düzeneği

Elektrostimülasyon çalışmaları için, 30.5 x 30.5 cm boyutlara ve 1.25 cm kalınlığı sahip DELRIN® bloklar kullanılarak, plakalar hazırlanmıştır. Her plaka iki kısma ayrılmış ve her kısım 2 kolon içermektedir. Kolonlar içerisinde, 35 mm'lik Petri kaplarının yerleştirilmesi için 5'er adet dairesel bölüm bulunmaktadır. Hazırlanan sisteme göre 10 adet filme ve 30 adet doku iskelesine aynı anda elektrik uygulanabilmektedir.



Şekil 3.4. Elektrostimülasyon sistemi; a) elektrostimülasyon plakası, b) elektrostimülasyon plakası üzerine örneklerin yerleştirilmesi, c) elektriksel bağlantılar, d) güç kaynağı.

Film çalışmalarında, platin tel içeren filmler Petrilere yerleştirildikten sonra, tellerin bir ucu sistemdeki pozitif uca, diğer ucu ise negatif uca bağlanmıştır. Bağlantılar leğim yardımı ile yapılmıştır. 3-boyutlu doku iskeleleri için yapılan çalışmada ise oluşturulan sistem literatürden seçilmiştir [132]. Bu sistemde 2.5 cm uzunluğundaki karbon elektrotlar, aralarında 8 mm olacak şekilde Petri kaplarına silikon yapıştırıcı ile yapıştırılmıştır. Öncesinde elektrotların karşılıklı birer ucu delinmiş ve bu deliklere 6 cm uzunluğundaki

platin teller bağlanmıştır. Son olarak lehim ile ana sistem ve teller arasında bağlantı kurulmuştur (Şekil 3.4). Elektrostimülasyon çalışmaları, Tufts Üniversitesi, Biyomedikal Mühendisliği Bölümü'nde Prof. Dr. David Kaplan'ın laboratuvarlarında yürütülmüştür.

3.4. Hücre İzolasyonu ve Karakterizasyonu

3.4.1. Sıçan Kökenli AdMSC'lerin İzolasyonu

Tez kapsamında gerçekleştirilen fotostimülayon çalışmalarında Sıçan Adipoz Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücreler kullanılmıştır. Hücreler, Ege Üniversitesi, Biyomühendislik Bölümü Öğretim Üyesi Prof. Dr. İsmet Deliloğlu Gürhan ve ekibi tarafından sıçandan izole edilmiştir. Çalışmada kullanılacak olan ergin sıçanlar, Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Deney Hayvanları Üretim Merkezi'nden temin edilmiştir. Öncelikle Ketamin/ksilazin bileşimine maruz bırakılarak bayıltılan sıçanlar servikal dislokasyon ile sakrifiye edilmiştir. Sıçanlar %70'lik (v/v) etanol içerisinde sterillenmiş ve laminar kabin içerisine alınmıştır. Bu aşamadan sonraki tüm işlemler kabinde gerçekleştirilmiştir. Sıçanın böbrek arkasından alınan adipoz doku PBS (pH:7.4) içinde yıkayıp başka bir Petri kabında küçük parçalara bölünmüştür. Tüpe aktarılan doku, 25 mL %0.075 (w/v) Tip I kollajenaz çözeltisi içerisine alınarak 37°C'de 60 dk boyunca inkübe edilmiş ve enzimatik olarak parçalanma gerçekleşmiştir. İnkübasyon sonunda elde edilen karışım pipetleme ile homojenize edilmiş ve 800 rpm'de 10 dak santrifüjlenmiştir. Yağ hücrelerinden ve yıkama sıvısından oluşan süpernatant uzaklaştırılmış ve kalan hücreler 10 mL kültür ortamı eklenerek 1,800 rpm'de tekrar santrifüjlenmiştir. Bu işlem 2 kez tekrarlanmış ve elde edilen stromal vasküler fraksiyon (SVF) 70 µm'lik filtreden geçirilmiştir. Son olarak elde edilen hücreler, %15 (v/v) FBS, %1 (v/v) gentamisin, %0.1 (v/v) penisilin/streptomisin ve %0.1 (v/v) amfoterisin-B içeren α -MEM kültür ortamında, 20 adet 25 cm²'lik flaska aktarılmıştır. Kültür ortamı 72 sa sonra değiştirilmiş, hücre yoğunluğu %75'e ulaştıktan sonra pasaj yapılmıştır [154].

3.4.2. Sıçan Kökenli AdMSC'lerin Karakterizasyonu

AdMSC'lerin karakterizasyonlarını gerçekleştirmek amacıyla öncelikle mikroskop altında morfolojik gözlemleri gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla 3. pasajdaki hücreler 6-gözlü TCPS'lerde kültüre edilmiştir. Hücrelerin tek tabakalı kültürdeki morfolojileri invert mikroskop (Olympus, ABD) ile görüntülenmiştir. Belirlenen günlerde hücresel iskeletin görüntülenmesi için filamentöz aktin (F-aktin) ve çekirdek boyamaları gerçekleştirilmiştir. Hücreler üzerindeki ortam uzaklaştırıldıktan sonra PBS ile yıkama işlemi yapılmıştır. Daha sonra %2.5'luk (v/v) gluteraldehit çözeltisi kullanılarak fiksasyon işlemi gerçekleştirilmiştir.

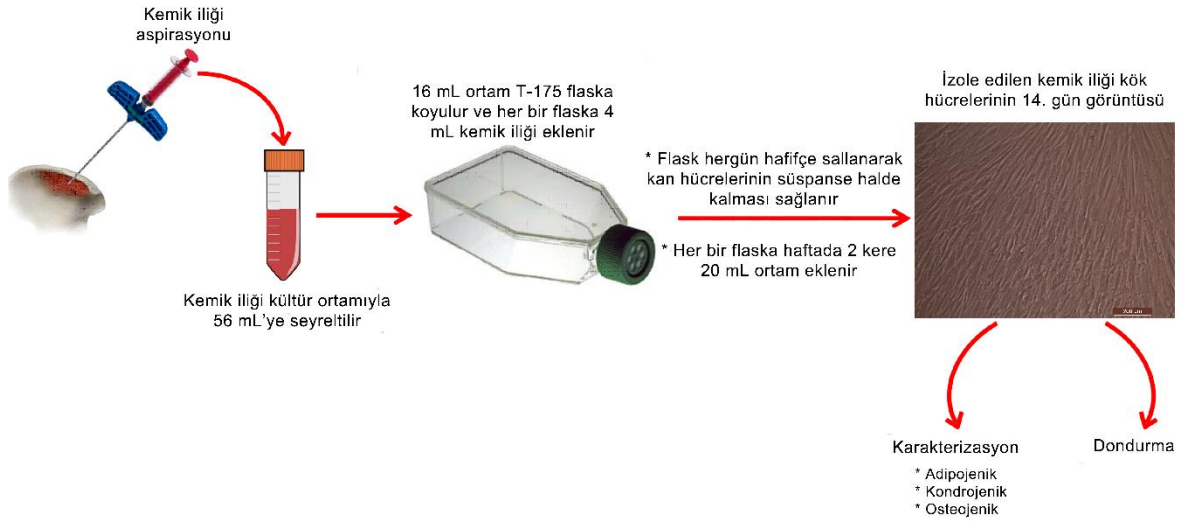
Hücrelerin F-aktinleri Alexa Fluor 488 phalloidin ile 20 dk, hücre çekirdeği ise propidyum iyodür ile 5 dk muamele edilerek boyanmıştır ve hücreler floresan mikroskop (Olympus, ABD) ile görüntülenmiştir. Ayrıca AdMSC'ler DAPI ile boyanarak herhangi bir mikoplazma kontaminasyonuna karşı kontrol edilmiştir. PBS ile yıkanan hücreler aynı şekilde %2.5'luk (v/v) gluteraldehit çözeltisi ile fiks edilmiştir. Son olarak DAPI (5 ng/mL) çözeltisi ile 5 dk muamele edilen hücreler floresan mikroskop (Olympus, ABD) altında görüntülenmiştir.

Sıçan kökenli AdMSC'lerin kültürde ürerken fenotipik karakterlerini koruduğunu doğrulamak amacıyla farklılaştırılmamış mezenkimal hücrelere akış sitometri analizi yapılmıştır. Analizler Kocaeli Üniversitesi, Kök Hücre ve Gen Tedavileri Araştırma ve Uygulama Merkezi'nce hizmet alımı ile gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla 3. pasajdaki AdMSC'ler yüzeyden kaldırılmış ve hücre derişimi 1×10^6 hücre/mL olacak şekilde süspanse edilmiştir. Santrifüjden sonra yıkama tamponunda süspanse edilen hücrelere 300 µL floresan izotiyosiyanat (FITC)-konjuge antikorlar eklenerek oda sıcaklığında 45 dk inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Akış sitometri analizi için FACSCalibur (BD Biosciences, San Diego, ABD) cihazı kullanılmıştır. Hücrelerin immüno-fenotiplemesinde CD29, CD90, CD54, CD45, CD106, MHC sınıf 1 ve MHC sınıf 2 antijenlerine uygun sıçan antikorları ve antikorlar için önerilen izotip kontrolleri kullanılmıştır (Becton Dickinson, ABD) [155]. AdMSC'lerin üreme davranışlarını incelemek amacıyla belirlenen zamanlarda 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-difeniltetrazolyum bromür (MTT) kullanılarak mitokondriyel aktiviteleri tayin edilmiştir. Öncelikle hücreler üzerindeki ortam uzaklaştırılmış ve her bir göze 600 µL serumsuz besi ortamı ve 60 µL MTT çözeltisi (2.5 mg/mL PBS) eklenmiştir. Daha sonra 37°C'de 3 sa boyunca inkübasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Inkübasyon sonunda hücrelerin üzerindeki ortam uzaklaştırılmış ve her bir göze 400 µL asidik izopropanol eklenerek oluşan formazan kristallerinin çözünmesi sağlanmıştır. Elde edilen çözeltiden 200 µL alınarak, 690 nm referans olmak üzere 570 nm'de mikropilaka okuyucu (Asys UVM 340, Avusturya) ile spektrofotometrik olarak ölçüm gerçekleştirilmiştir.

Osteojenik ortamda üretilen AdMSC'lerin, matris mineralizasyonunun görüntülenmesi için, von Kossa boyaması yapılmıştır. Bu amaçla hücreler üzerindeki ortam uzaklaştırılmış ve soğuk (ice-cold) saf etanol ile oda sıcaklığında 20 dk fiksasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Daha sonra saf su ile yıkanan hücreler %5'lik (w/v) AgNO₃ ile karanlıkta inkübe edilmiştir. Inkübasyon sonunda hücreler tekrar yıkanarak 2 dk UV ışığına maruz bırakılmıştır [156].

3.4.3. İnsan Kökenli MSC'lerin İzolasyonu

Çalışmada kullanılan hMSC'ler, aspire edilen kemik iliğinden (Lonza, Gaithersburg, MD, ABD) izole edilmiştir [157]. Temel olarak, aspire edilen kemik iliği %10 (v/v) FBS, %1 (v/v) antibiyotik (penisilin, streptomisin ve fungizon) ve fibroblast growth factor (1 ng/mL) içeren 56 mL DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium) ile seyreltilmiştir. Öncelikle T-175'lik flaskların (Corning, MA, ABD) herbirine 16 mL hazırlanan ortamdan koyulmuş ve 4 mL kemik iliği eklenmiştir. Hücreler %50 doygunluğa ulaşana kadar, haftada 2 kez, her bir flaska 20 mL taze ortam eklenmiştir. Hücre doygunluğu %50'yi geçince, yüzeyden bağımsız hematopoietik hücreler yıkama işlemleri ile ortamdan uzaklaştırılmış ve mezenkimal kök hücreler dondurularak saklanmıştır (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. Kemik iliği kökenli insan mezenkimal kök hücrelerin izolasyonu.

3.4.4. İnsan Kökenli MSC'lerin Karakterizasyonu

hMSC'lerin adipojenik, kondrojenik ve osteojenik potansiyellerini belirlemek için hücreler, kontrol ortamının yanında (%10 (v/v) FBS ve %1 (v/v) penisilin-streptomisin içeren DMEM), adipojenik ortam (50 μ M indometasin, 0.5 mM izobütül ksantin, 1 μ M dekzametazon, 5 μ g/mL insülin içeren kontrol ortamı), kondrojenik ortam (%2 (v/v) FBS, %1 pen-strep, %1 insülin-transferrin-selenyum, 50 μ g/mL askorbik asit, 100 nM dekzametazon, 10 ng/mL TGF- β ve 40 μ L L-prolin içeren DMEM) ve osteojenik ortam (0.05 nM askorbik asit, 100 nM dekzametazon ve 10 mM β -gliserol fosfat içeren kontrol ortamı) içerisinde, 6-gözlü kültür kaplarında kültüre edilmiştir. Ortam her 3-4 günde bir tazelenmiştir. 3 hafta sonunda hücreler üzerindeki ortam uzaklaştırılmış ve %10'luk (v/v) formalin ile oda sıcaklığında 30 dk fiksasyon yapılmıştır [158].

Lipid damlacıkları Oil red boyaması ile görüntülenmiştir. Fiksasyon işleminden sonra tek tabakalı hücreler Oil red çözeltisi (%1.5'lik, w/v) ile kaplanmış ve oda sıcaklığında 5 dk inkübasyon yapılmıştır. Oil red çözeltisi uzaklaştırıldıktan sonra distile su ile 3 kez yıkama işlemi gerçekleştirilmiş ve ışık mikroskobu (Zeiss Axiovert S 100, Almanya) altında gözlem yapılmıştır.

Glikozaminoglikan zengin ECM mineralizasyonu Alcian blue (%1'lik, w/v) boyaması ile görüntülenmiştir. Fiksasyon işleminden sonra tek tabakalı hücreler Alcian blue çözeltisi ile kaplanmış ve oda sıcaklığında 5 dk inkübasyon yapılmıştır. Alcian blue çözeltisi uzaklaştırıldıktan sonra distile su ile 3 kez yıkama işlemi gerçekleştirilmiş ve ışık mikroskobu altında gözlem yapılmıştır.

Kalsiyum zengin ECM mineralizasyonu Alizarin red boyaması ile görüntülenmiştir. Fiksasyon işleminden sonra tek tabakalı hücreler Alizarin red çözeltisi (%2'lik, w/v) ile kaplanmış ve oda sıcaklığında 5 dk inkübasyon yapılmıştır. Alizarin red çözeltisi uzaklaştırıldıktan sonra distile su ile 3 kez yıkama işlemi gerçekleştirilmiş ve ışık mikroskobu altında gözlem yapılmıştır [159].

3.5. *In vitro* Biyostimülasyon Çalışmaları

3.5.1. Sıçan Kökenli Mezenkimal Kök Hücrelerin (AdMSC) Fotostimülasyon ile Osteojenik Farklılaşması

Hücre kültürü çalışmaları TCPS yüzeyler ve kitosan doku iskeleleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Yapılan çalışmalarda 24-gözlü kültür kapları kullanılmıştır. Kitosan doku iskeleleri kültür kaplarına yerleştirilmeden önce, kültür kaplarının yüzeyleri Parafilm ile kaplanmıştır. Böylece hücrelerin doku iskelelerinden kültür kabının yüzeyine göç etmeleri engellenmiştir. Parafilmelerin sterilizasyonu %70'lik (v/v) etanol ile gerçekleştirilmiştir. Daha sonra etanol içerisinde, vakum altında çöktürülen doku iskeleleri her bir göze yerleştirilmiştir. Son olarak örnekler 45 dk UV'ye maruz bırakılarak sterilizasyon işlemi tamamlanmıştır. Hücre ekiminden önce iskeleler Dulbecco PBS ve α -MEM ile yıkanmış ve etanolün yapıdan tamamen uzaklaştırılması sağlanmıştır. Yıkama işlemlerinden sonra kitosan doku iskelelerinin üzerine 1 mL %10 (v/v) FBS ve %1 (v/v) penisilin içeren α -MEM eklenmiş ve CO₂ etüvünde (Heraeus Instruments, Almanya) 24 sa inkübasyon yapılmıştır. Böylece, daha etkin bir hücre yapışması için serum proteinlerinin iskele yüzeyine çökmesi sağlanmıştır.

AdMSC'ler %10 (v/v) FBS ve %1 (v/v) penisilin içeren α -MEM ile flasklarda çoğaltılmıştır. Hücreler yeterli sayıya ulaştıklarında tripsinizasyon ile yüzeyden kaldırılmışlardır. TCPS

yüzeyler için, herbir göze 3×10^4 hücre olacak şekilde hücre ekimi yapılmıştır. Doku iskeleleri için ise 1×10^5 hücre 50 µL ortam içerisinde herbir iskeleye emdirilmiştir. Hücre yapışmasının gerçekleşmesi için 3 sa beklenmiş ve herbir göze 1 mL osteojenik farklılaşma ortamı eklenmiştir. Osteojenik farklılaşma ortamı %10 (v/v) FBS ve %1 (v/v) penisilinin yanı sıra 10 mM β-gliserol fosfat, 50 µg/mL askorbik asit ve 10 nM dekzametazon içermektedir. Steril ortam gerektiren tüm işlemler laminar akış kabininde (Bioair, Type II Laminer Akış Kabini, İtalya) yürütülmüştür.

3.5.2. Fotostimülasyon Uygulaması

Fotostimülasyon çalışmaları Bölüm 3.3.1’de açıklanan plazma ark kaynağı kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.3). İşlem parametreleri daha önce grubumuzda tamamlanan, Nazife Ülker’in yüksek lisans tezi kapsamında belirlenmiştir [62]. Işık uygulaması, gün aşırı yapılmak üzere, TCPS grubu için 10 cm mesafeden, 5 dk ve kitosan doku iskeleleri için ise 10 cm mesafeden 10 dk olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Işık uygulamasından önce örnekler üzerindeki besi ortamı uzaklaştırılmış ve yerine 500 µL DPBS koyulmuştur. Uygulama sonunda DPBS çekilerek yerine tekrar besi ortamı koyulmuş ve hücrelerin inkübasyonuna devam edilmiştir.

3.5.3. Fotostimülasyon Çalışmalarında Yapılan Hücre Kültürü Analizleri

Hücre proliferasyonunun belirlenmesi

AdMSC’ler ile yapılan fotostimülasyon çalışmalarında, hücre proliferasyonu MTT ile takip edilmiştir. MTT analizi Bölüm 3.4.2’de belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir. MTT çözeltisi canlı hücrelerin mitokondrilerinde formazan kristaline dönüştürülmektedir. Oluşan formazan kristalleri isopropanolde çözdürülmekte ve spektrofotometrik olarak ölçüm gerçekleştirilmektedir. Bu prensibe bağlı olarak, belirlenen zamanlarda gerçekleştirilen MTT analizinde elde edilen absorbans değerleriyle, hücre canlılığı kantitatif olarak değerlendirilmiştir.

Hücre morfolojisinin belirlenmesi

TCPS ile yapılan fotostimülasyon çalışmalarında hücre morfolojisi floresan boyama ile takip edilmiştir. Bu amaçla hücrelerin F-aktinleri Alexa Fluor 488 phalloidin ile, çekirdekleri propidyum iyodür ile ikili olarak boyanmıştır. Boyama prosedürü daha önce belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir. Hücrelerin morfolojileri ve iskelet organizasyonları floresan mikroskop altında incelenmiştir.

Kitosan doku iskeleleri ile yapılan çalışmada hücrel morfoloji, hücrelerin doku iskelesindeki dağılımları ve ECM sentezleri SEM ile görüntülenmiştir. Bu amaçla örnekler üzerindeki besi ortamı uzaklaştırılmış ve DPBS ile yıkama işlemi yapılmıştır. Daha sonra %2.5'lük gluteraldehit ile karanlıkta ve oda sıcaklığında fiksasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. 30 dk'lık fiksasyon işleminden sonra örnekler tekrar DPBS ile yıkanmış ve analiz yapılana kadar DPBS içerisinde 4°C'de saklanmıştır. SEM analizi öncesinde örnekler etanol serilerinden geçirilmiş (%10, 30, 50, 70, 90 ve 100) ve yapı içerisindeki suyun tamamen uzaklaştırılması sağlanmıştır. Son olarak örnekler heksametildisilazanda (HMDS) 5 dk bekletilmiş ve havada kurutulmuştur. SEM ile görüntüleme öncesi örnekler altın ile kaplanmıştır.

Matris mineralizasyonunun incelenmesi

TCPS yüzeyine ekilen hücrelerin matris mineralizasyonunu incelemek üzere ALP-von Kossa boyamaları yapılmıştır. Hücreler üzerindeki ortam uzaklaştırıldıktan sonra PBS ile yıkama gerçekleştirilmiştir. Daha sonra %10'luk (v/v) formalin ile 15 dk fiksasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu sırada taze substrat hazırlanmıştır. Bu amaçla, 0.005 g naftanol 200 µL dimetilformamid içerisinde çözdürülmüştür. Daha sonra hazırlanan karışıma 25 mL Tris-HCL çözeltisi ve 15 mL distile su eklenmiştir. Son olarak 0.03 g Red Violet koyulmuş ve çözelti filtrelenmiştir. Fiksasyon sonunda her bir göze taze substrat ilave edilmiş ve oda sıcaklığında 45 dk inkübasyon yapılmıştır. Inkübasyon sonunda örnekler distile su ile 4 kez yıkama yapılarak, %2.5'luk (w/v) gümüş nitrat çözeltisi ile 30 dk boyunca ikinci kez inkübe edilmiştir. Son olarak distile su ile 4 kez yıkama yapılmış ve mikroskop altında gözlem gerçekleştirilmiştir.

Kitosan doku iskelelerindeki mineralizasyonu görüntülemek için von Kossa boyama yapılmıştır. Von Kossa boyama işleminde Bölüm 3.4.2'de belirtilen yöntem kullanılmıştır.

Gen ekspresyonunun belirlenmesi

Osteojenik farklılaşmanın takibi için, hücrelerin alkalın fosfataz (*Alp*), runt-ilişkili transkripsiyon faktör (*Runx2*), kollajen 1 (*Coll 1*) ve osteopontin (*Opn*) gen ekspresyon seviyeleri gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) (Light Cycler Nano®, Roche, İsviçre) ile belirlenmiştir. Kullanılan primerlerin listesi Çizelge 3.1'de verilmiştir. Öncelikle örneklerin RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla örnekler üzerine 1 mL Trizol (İnvitrogen) koyulmuştur. Daha sonra örnekler 25-30 s vortekslenmiş ve 4°C'de 2 sa bekletilmiştir. Ardından örnekler üzerine 200 µL kloroform koyulmuş ve 12,000g'de,

4°C’de 10 dk santrifüjlenmiştir. Santrifüj işleminden sonra RNA’nın bulunduğu sıvı faz başka bir tüpe alınmıştır. Bu basamak 2 kez tekrarlanmıştır. Sonraki aşamada örnekler üzerine 400 µL izopropanol koyulmuş ve 45 dk boyunca -20°C’de inkübasyon yapılmıştır. İnkübasyon sonunda tekrar 12,000g, 4°C’de 10 dk santrifüjleme işlemi gerçekleştirilmiştir. Daha sonra süpernatant uzaklaştırılmış ve pellet %75’lik (v/v) etanol içerisinde 17,500g’de, 4°C’de 5 dk santrifüjlenerek yıkanmıştır. Son olarak her bir tüpe 35 µL Rnase free su koyulmuş ve örnekler 55-60°C’deki su banyosunda 15 dk bekletilmiştir. Elde edilen RNA’lar -80°C’de saklanmıştır.

Çizelge 3.1. RT-PCR analizinde kullanılan primer dizileri.

<i>β-Aktin</i>	F-5' -TAAAGACCTCTATGCCAACAC-3' R-5'-CTCCTGCTTGCTGATCCACAT- 3'
<i>Runx2</i>	F-5'-GCTTCTCCAACCCACGAATG-3' R-5'-GAACTGATAGGACGCTGACGA-3'
<i>Alp</i>	F-5'-AGC TGC CCG CAT CCT TAA-3' R-5'-TGT ACG TCT TGG AGA GAG CCA-3'
<i>Col1a1</i>	F-5'-TCCTGCCGATGTCGCTATC-3' R-5'-CAAGTTCCGGTGTGACTCGTG-3'
<i>Opn</i>	F-5'-GACGGCCGAGGTGATAGCTT-3' R-5'-CATGGCTGGTCTTCCCGTTGC-3'

RNA izolasyonundan sonra iki basamaklı RT-PCR analizine geçilmiştir. İlk aşamada cDNA kiti (Roche, İsviçre) ile cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. İkinci aşamada ise FastStart Essential DNA Green Master (Roche, İsviçre) kiti ile PCR analizi yapılmıştır. Bu aşamada, aktivasyon basamağı 95°C’de 10 dk, denatürasyon ve çoğalma basamağı 95°C’de 20 s, birleşme basamağı 60°C’de 20s ve uzama basamağı 72°C’de 20 s sürmüştür.

3.5.4. İnsan Kökenli Mezenkimal Kök Hücrelerin (hMSC) Elektrostimülasyon ile Osteojenik Farklılaşması

İpek film çalışması için hücreler, osteojenik ortam içerisinde, hücre yoğunluğu 3×10^6 hücre/mL olacak şekilde ekilmiştir. Öncelikle boş ipek ve platin tel içeren ipek filmler 35 mm'lik Petri kaplarına yerleştirilmiş ve hücre ekiminden önce 2 sa şartlama ortamında (1 mL %10 (v/v) FBS ve %1 (v/v) penisilin içeren α -MEM) bekletilmiştir. Platin tel içeren ipek filmlerin bulunduğu Petriler, elektrostimülasyon plakası içerisine alınmış ve teller lehim yardımı ile ana sisteme bağlanmıştır. Şartlama ortamı uzaklaştırıldıktan sonra her bir filme 30 μ L hücre süspansiyonu ekilmiş ve hücre yapışması için 30 dk beklenmiştir. Her 30 dk'da bir hücreler üzerine 30 μ L ortam eklenerek, hücrelerin kuruması engellenmiştir. 3 sa sonunda her bir Petriye 3 mL osteojenik ortam eklenerek, örnekler etüve kaldırılmıştır.

3-boyutlu doku iskeleleri için hücreler, 3×10^7 hücre/mL yoğunlukta, osteojenik ortam içerisinde süspanse edilmiştir. Her bir Petri için, 3 adet doku iskelesi, karbon elektrotlar arasına sıkıştırılmıştır. Kontrol grubundaki doku iskeleleri 24-gözlü külür kaplarına yerleştirilmiştir. Doku iskeleleri 2 sa şartlama ortamında bekletildikten sonra, 30 μ L ortam ile hücre ekimi gerçekleştirilmiştir. Doku iskelesinin kurumasını engellemek için her 30 dk bir ortam eklemesi gerçekleştirilmiştir. 3 sa sonunda Petri kaplarına 4.5 mL, 24-gözlü kültür kaplarına ise 1.5 mL osteojenik farklılaşma ortamı eklenmiştir.

3.5.5. Elektrostimülasyon Uygulamaları

Film çalışmalarında, günde 1 sa olmak üzere, 14 gün boyunca hücreler elektriksel alana tabi tutulmuşlardır. Optimizasyon çalışmaları kapsamında frekans, elektrotlar arası mesafe ve uygulanan voltaj gibi parametreler değiştirilmiştir. 2.5 ve 5 cm olmak üzere iki farklı elektrot mesafesi kullanılmıştır. Aynı zamanda frekans 20 Hz ya da 60 kHz olacak şekilde değiştirilmiştir. 10-500 mV arasında belirlenen voltajlar sisteme uygulanmıştır. Osteojenik farklılaşma ortamının yanında büyüme ortamının kullanıldığı gruplarda da elektrostimülasyonun etkileri incelenmiştir.

Doku iskelelerinin kullanıldığı çalışmalarda, günde 1 sa olmak üzere 28 gün boyunca hücreler elektriksel alana tabi tutulmuşlardır. Bu sistemde frekans 60 kHz'de sabit tutulmuş ve uygulanan voltaj 100-500 mV arasında değiştirilmiştir. Ayrıca elektrostimülasyon ile sinerjik etkisinin araştırılması için 2 adet elektrofizyolojik düzenleyici ajan kullanılmıştır [13]. Monensin (10 nM) ve glibenklamid (10 μ M) adlı bu ajanlar osteojenik ortam içerisine ilave edilmiş ve elektriksel alan varlığında ve yokluğundaki etkileri karşılaştırılmalı olarak incelenmiştir.

3.5.6. Elektrostimülasyon Çalışmalarında Yapılan Hücre Kültürü Analizleri

Hücre proliferasyonunun belirlenmesi

Alamar blue analizi: Alamar blue analizi ile hücre proliferasyonu ve canlılığı değerlendirilmiştir. Bu amaçla örnekler üzerine 500'er µL, %10 (v/v) Alamar blue içeren osteojenik farklılaşma ortamı koyulmuş ve 37°C'de 3 sa inkübasyon gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon sonunda her bir örnekten 200 µL alınarak absorbans ölçümü (560 nm eksitasyon, 590 nm emisyon) yapılmıştır (Molecular Devices, ABD). Hücre içermeyen doku iskelelerinden elde edilen değerler sonuçlardan çıkarılmıştır.

Alamar blue çözeltisinin aktif maddesi resazurin, toksik olmayan ve hücre zarını geçebilen mavi renkli, floresan özellik göstermeyen bir maddedir. Bu madde canlı hücrelerde, kırmızı renkte floresan üreten, resorufine indirgenir. Böylece oluşan floresan şiddet, canlı hücre sayısı ile orantılı ve hücre metabolitesi ile ilişkilidir.

DNA miktarı: Doku iskeleleri 7., 14. ve 28. günlerde alınmış ve ortadan ikiye bölünmüştür. DPBS ile yıkanan örnekler analiz yapılmaya kadar -80°C'de saklanmıştır. Örneklerin yarısı ile DNA miktarı ve ALP aktivitesi analiz edilirken, diğer yarısı ile Ca içeriğine bakılmıştır. DNA ve ALP analizleri için örnekler Eppendorf tüplerine alınmış ve üzerlerine 200 µL hücre lizis çözeltisi (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, ABD) eklenmiştir. Örnekler bu lizis çözeltisi içerisinde 20 dk inkübe edilmiş ve sonrasında %10 amplitüt ile 10 dk boyunca homojenize edilmişlerdir (Branson Ultrasonics, Danbury, CT, ABD). Homojenizasyon sonrası 12,000 rpm'de 10 dk santrifüjleme işlemi gerçekleştirilmiştir. DNA miktarı PicoGreen kiti (Life Technologies™, Grand Island, NY, ABD) ile ölçülmüştür. 96-gözlü kültür kaplarında, 10 µL süpernatant üzerine 100 µL, kit içerisindeki, 1xTE tamponu koyulmuştur. Son olarak 1:200 oranında seyreltilmiş 100 µL Quant-iT PicoGreen çözeltisi eklenmiş ve floresan şiddeti okunmuştur (480 nm eksitasyon, 520 nm emisyon). DNA miktarı kalibrasyon grafiği kullanarak hesaplanmış (Ek 1) ve doku iskelesinin gramı başına normalize edilmiştir.

Hücre farklılaşmasının belirlenmesi

ALP aktivitesinin belirlenmesi: Doku iskelelerine ekilen hücrelerin ALP aktiviteleri Alkalın Fosfataz kiti (Abcam, Cambridge, MA, ABD) ile ölçülmüştür. Bir önceki bölümde anlatıldığı üzere örneklerin lizisi, homojenizasyonu ve santrifügasyonu ile elde edilen süpernatanttan 1 µL alınmış ve 96-gözlü kültür kaplarında, üzerlerine 80 µL tampon çözeltisi koyulmuştur. Sonraki aşamada seyreltilen örneklerle 50 µL, 5 mM p-nitrofenil fosfat substratı eklenmiş ve örneklerin oda sıcaklığında, hafif çalkalamalı ortamda, 1 sa

inkübasyonları yapılmıştır. İnkübasyonun sonunda herbir göze 20 µL reaksiyon sonlandırıcı çözelti koyulmuş ve 450 nm’de absorbans değerleri ölçülmüştür. ALP aktivitesi kalibrasyon grafiği (Ek 2) kullanarak hesaplanmış ve g doku iskelesi başına normalize edilmiştir.

Ca içeriğinin belirlenmesi: DNA ve ALP analizlerinde kullanılan örneklerin diğer yarıları Eppendorf tüplerine alınmış ve üzerlerine 200 µL ultrasaf su koyulmuştur. Daha sonra örneklerin %10 amplitüt ile 10 dk boyunca homojenizasyonları gerçekleştirilmiştir. Homojenizasyon sonrası, kalsiyumun ekstrakte edilmesi için, herbir tüpe 200 µL %5’lik trikloroasetikasit (Fischer Scientific, Pittsburgh, PA, ABD) eklenmiş ve örnekler 4°C’de, hafif çalkalamalı ortamda, 1 gece bekletilmişlerdir. Kalsiyum içeriği, Total Calcium Liquicolor® kiti (Stanbio, TX, ABD) kullanılarak tespit edilmiştir. Kısaca 10 µL lizat ve standartlar üzerine, 500 µL renk çözeltisi ve 500 µL reaksiyon ajanı eklenmiştir. 5 dk inkübasyon sonunda 200 µL çözelti alınarak 96-gözlü kültür kaplarına koyulmuş ve 550 nm’de absorbans değerleri okunmuştur. Ca içeriği florometrik olarak belirlenmiş ve g doku iskelesi başına normalize edilmiştir.

RT-PCR analizi: RT-PCR analizi için ayrılan örnekler DPBS (pH 7.4) ile yıkanmıştır ve mikrotüplere aktarılmıştır. Mikromakas kullanılarak parçalanmış örnekler 200 µL Trizol (Invitrogen, ABD) eklenmiştir. Vorteks kullanılarak karıştırılan örnekler analize kadar -80°C’de saklanmıştır. RNA izolasyonu için tek basamaklı asit-fenol guanidinyum metodu kullanılmıştır. RNA saflaştırılması için ise RNEasy kit (Qiagen, ABD) kullanılmıştır. Reverse transkripsiyon basamağı yüksek kapasiteli cDNA Reverse Transkripsiyon kiti (Invitrogen, ABD) ile PTC100 programlanabilir termal kontrol cihazında (MJ Research Inc, ABD) gerçekleştirilmiştir. Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz (*GAPDH*), alkalın fosfataz (*ALP*), osteokalsin (*OCN*), kemik sialoprotein (*BSP*), kollajen tip 1 alfa 1 (*COL1A1*), runt-ilişkili transkripsiyon faktörü 2 (*RUNX2*) ve osteopontin (*OPN*), ısı şok proteini 27 (*HSP27*) ve ısı şok proteini 70 (*HSP70*) genleri için Taqman problemleri Life Technologies (ABD) firmasından alınmıştır. Çizelge 3.2’de RT-PCR analizinde kullanılan genler ve analiz kodları verilmiştir.

Çizelge 3.2. RT-PCR analizinde kullanılan genler ve analiz kodları.

<u>GEN</u>	<u>ANALİZ KODU</u>
<i>GAPDH</i>	Hs99999905_m1
<i>RUNX2</i>	Hs00231692_m1
<i>ALP</i>	Hs00758162_m1
<i>COL1A1</i>	Hs00164004_m1
<i>BSP</i>	Hs00173720_m1
<i>OPN</i>	Hs00959010_m1
<i>HSP27</i>	Hs00356629_g1
<i>HSP70</i>	Hs00271244_s1

Morfolojik çalışmalar

Taramalı elektron mikroskop (SEM) analizi: Hücre morfolojisi, hücresel dağılım ve ECM sentezinin belirlenmesi için, ipek fimlerden 14. günde ve doku iskelelerinden 7. ve 28. günlerde örnekler alınmıştır. SEM görüntüleme öncesinde örnekler daha önce belirtilen işlemlere tabi tutulmuşlardır.

Alizarin red boyama: İpek filmler üzerindeki mineralizasyonun belirlenmesi için Alizarin red boyama yapılmıştır. Bu amaçla kültürün 3. ve 14. gününde örnekler üzerindeki ortam uzaklaştırılmış, DPBS ile yıkama işlemleri yapılmış ve %10'luk (v/v) formalin ile fiksasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Sonraki aşamada örnekler Alizarin red çözeltisinde (Fischer, ABD) 5 dk bekletilmiştir. Son olarak distile su ile yıkama işlemi yapılmış ve ışık mikroskobu altında görüntüleme gerçekleştirilmiştir.

Histolojik analizler: Doku iskelelerindeki hücresel dağılım ve mineralize bölgeler histolojik boyamalar ile belirlenmiştir. Bu amaçla örnekler %4'lik paraformaldehit ile fikslenmiş ve parafin içine gömülerek 8 µm'lik kesitler alınmıştır. Elde edilen kesitler ksilen ve etanol serilerinden geçirilerek hemotoksilen&ezoin boyamalar gerçekleştirilmiştir (Ek 3). Hücreler tarafından oluşturulan mineral depoları, Alizarin red ve von Kossa boyamalarla (Ek 4 ve 5) tespit edilmiş ve ışık mikroskobu altında görüntülemeler yapılmıştır.

3.6. İstatistiksel Analiz

Çalışma kapsamında elde edilen veriler GraphPad Software InStat programı kullanılarak istatistiksel açıdan değerlendirilmiştir. Veriler üç deney için ortalama $\pm$ standart sapma değerleri ile birlikte sunulmuştur. Farklı grupların istatistiksel olarak karşılaştırılması için Tek Yönlü ANOVA yöntemi Tukey–Kramer post hoc testiyle birlikte kullanılmış ve p-değerinin 0.05’den az olduğu durumlar anlamlı kabul edilmiştir.

4. DENEYSEL SONUÇLAR VE TARTIŞMALAR

Bu bölümde, mezenkimal kök hücrelerin, farklı uyaranlar varlığında üreme ve osteojenik farklılaşma potansiyellerinin belirlendiği çalışmalardan elde edilen sonuçlar verilmiş ve elde edilen veriler literatürle karşılaştırılarak tartışılmıştır. İlk bölümde fotostimülasyon ve elektrostimülasyon çalışmalarında kullanılmak üzere üretilen kitosan doku iskeleleri, ipek filmler ve ipek doku iskelelerinin üretimi ve karakterizasyonu ile ilgili sonuçlar sunulmuştur. Sonraki kısımda ise hücre kültürü çalışmalarında kullanılan AdMSC ve hMSC'lerin karakterizasyon sonuçlarına yer verilmiştir. Son bölüm, fotostimülasyon ve elektrostimülasyon çalışmaları olmak üzere iki kısma ayrılmıştır. Fotostimülasyon çalışmaları kapsamında TCPS yüzeylerde ve kitosan doku iskeleleri üzerinde kültüre edilen AdMSC'lerin, üreme ve farklılaşma davranışları analiz edilmiştir. hMSC'ler ile yapılan elektrostimülasyon çalışmalarının anlatıldığı kısımda ise öncelikle ipek filmler ile elde edilen çalışmalara yer verilmiştir. Son olarak ipek doku iskeleleri ile yapılan ve elektriksel alan varlığında çeşitli biyokimyasalların kullanıldığı çalışmaya ait sonuçlar sunulmuş ve oluşan sinerjik etki, hücresel aktiviteler açısından değerlendirilmiştir.

4.1. Polimerik Biyomalzemelerin Hazırlanması ve Karakterizasyonu

Doktora tez çalışması kapsamında kullanılan biyomalzemelerin üretiminde, doğal polimerler sınıfından olan kitosan ve ipek malzemeler tercih edilmiştir. Farklı üretim yöntemleriyle, farklı formlarda üretilen biyomalzemelerin temel karakterizasyon çalışmaları yapıldıktan sonra hücre kültürü çalışmalarına geçilmiştir.

4.1.1. Kitosan Doku İskelelerinin Hazırlanması

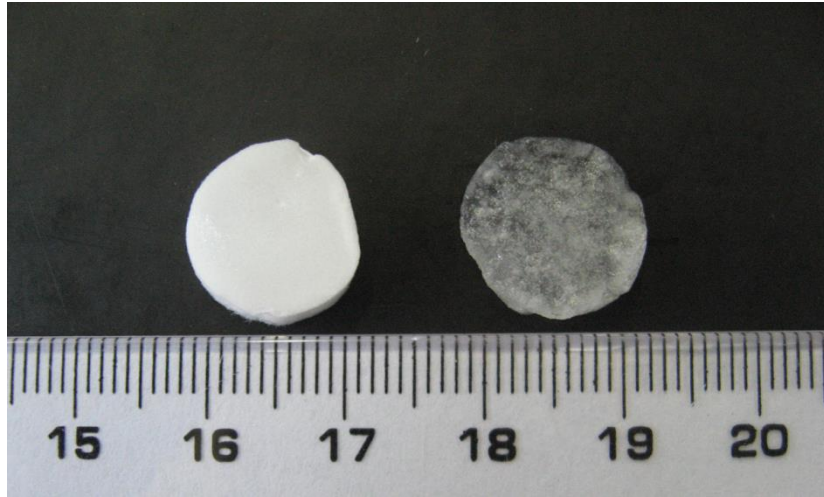
Fotostimülasyon çalışmaları kapsamında gerçekleştirilen çalışmalarda kitosan doku iskeleleri kullanılmıştır. Kitosan, mukoadesyon ve hemostatik özellikleri, antibakteriyel aktivitesi ve analjezik etkisi gibi sahip olduğu üstün özellikler nedeniyle, doku mühendisliği çalışmalarında biyomalzeme olarak sıklıkla tercih edilmektedir [6, 160-162]. Doku mühendisliğinde kullanılan sünger formundaki biyomalzemeler, açık gözeneklere sahip köpükler olarak tanımlanabilir. Makro ve mikro gözeneklere sahip bu yapı bulunduğu ortamda sıvı absorplayarak yumuşaklığını ve esnekliğini korurken, hücresel etkileşim açısından da etkin sonuçlar sergiler [163].

Kemik doku mühendisliğinde, genellikle kitosanın 3-boyutlu sünger formları tercih edilmektedir. Kullanılan kitosan doku iskeleleri çoğunlukla liyofilizasyon yöntemi ile elde edilmektedir [164]. Bu yöntemde, temel olarak, kitosan çözeltisi dondurulmakta ve donan

çözelti düşük basınç altında süblimleştirilerek yapıdan uzaklaştırılmaktadır. Süblimleşme sonucunda içsel bağlantılı gözeneklere sahip bir yapı elde edilmektedir. Literatürde, liyofilizasyon yöntemi ile kitosanın tek başına veya trikalsiyum fosfat, kollajen, ZnO gibi farklı malzemelerle kompozit olarak üretildiği birçok çalışma mevcuttur [164-166].

Kitosanın deasetilasyon derecesi (DD) arttıkça, katyonik primerin taşıdığı primer amin grupları da artmaktadır. Hücrelerin, membranları vasıtası ile kitosandaki protonlanmış aminlere bağlandıkları ve bu yolla malzeme yüzeyi ile etkileşime geçtikleri bilinmektedir. Bu nedenle, DD arttıkça, hücre yapışması da artmaktadır [6].

Yapılan çalışmada, >%85 DD'ye sahip kitosan kullanılarak, liyofilizasyon yöntemi ile kitosan doku iskeleleri üretilmiştir. Üretilen kitosan doku iskelelerinin genel görüntüleri Şekil 4.1'de verilmiştir.



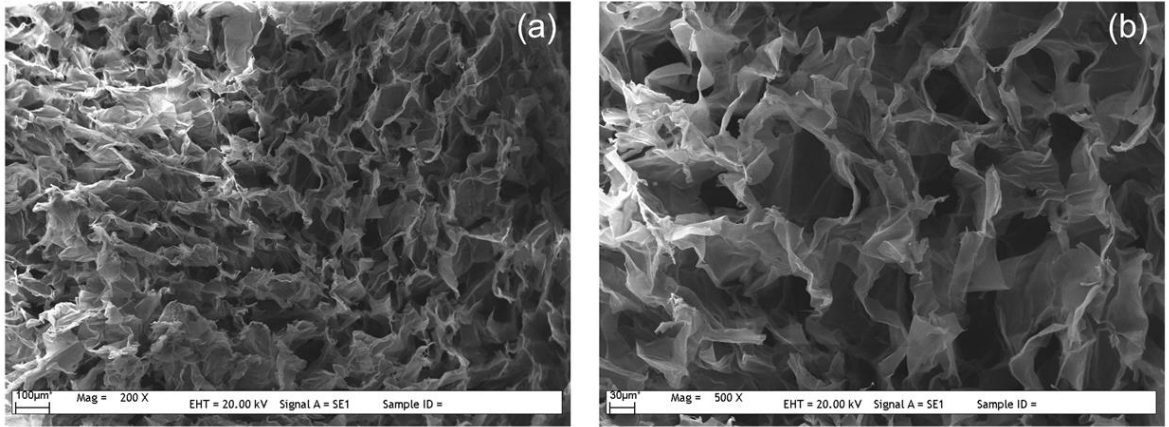
Şekil 4.1. Liyofilizasyon yöntemi ile hazırlanan kitosan doku iskelelerinin kuru ve şişmiş görüntüleri.

4.1.1.1. Kitosan doku iskelelerinin karakterizasyonu

Karakterizasyon çalışmaları kapsamında, öncelikle kitosan doku iskelelerinin SEM analizleri yapılmıştır. Doku iskelelerinden alınan kesitler, malzemenin gözenekli yapısını ve bu gözeneklerin içsel bağlantılara sahip olduğunu ortaya koymaktadır (Şekil 4.2). Gözenekler arasındaki içsel bağlantılar, homojen bir hücre ekiminin ve dağılımının sağlanması, hücre göçünün iskelenin iç kısımlarına kadar ulaşabilmesi ve dış ortam ile hücreler arasındaki besin alış-verişinin sağlıklı olabilmesi için oldukça kritik bir öneme sahiptir [167]. ImageJ programı ile yapılan hesaplamalarda ortalama gözenek çapı 95 ± 31

μm olarak hesaplanmıştır. Literatürde de optimum gözenek çapı, hücreye özgü bir parametre olmakla beraber, kemik doku mühendisliği için 200-400 μm olarak belirlenmiştir [3]. Gözenek çapının yanında, hücre proliferasyonunu, farklılaşmasını ve kemik oluşumunu destekleyecek malzemenin yüksek gözenekliliğe sahip olması gerekmektedir. Kemik doku mühendisliği çalışmalarında, diğer dokularda olduğu gibi, etkin sonuçlar elde etmek için %90 ve üzeri gözeneklilik tercih edilmektedir [34]. Kitosan doku iskelelerinin gözenekliliği gravimetrik olarak hesaplanmış ve yaklaşık %95 olarak bulunmuştur.

Kitosan doku iskelelerinin 37°C'deki PBS içerisinde rehidre edilmeleri ile şişme oranları hesaplanmıştır. Kitindeki asetamid gruplarının, deasetilasyon sonrasında amid gruplarına dönüştükleri ve amid gruplarının hidrofilik yapıda olduğu bilinmektedir. Bu nedenle kitosan doku iskeleleri, ilk bir kaç dakika içerisinde ortamda bulunan suyu absorblamış ve denge şişmeye ulaşmıştır [168]. Gravimetrik olarak hesap edilen denge şişme oranı kuru temelde 34.47 ± 4.12 olarak hesap edilmiştir. Yapının şişme dengeye geldikten sonra da, formunu koruduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.2. Kitosan doku iskelelerinin SEM görüntüleri; (a) 200X, (b) 500 X.

4.1.2. İpek Biyomalzemelerin Üretilmesi

İpek, protein yapıda doğal bir polimerdir ve doğada farklı böcek ve örümcek türleri tarafından üretilmektedir. İpeğin yapısına bakıldığında hafifliğin ($d=1.3 \text{ g/cm}^3$) ve yüksek mekanik dayanımın (4.8 GPa, doğada bulunan en kuvvetli fiber) bir arada bulunduğu görülmektedir. Örneğin sentetik bir malzeme olan Kevlar 49'a göre 4-7 kat daha elastiktir ve ipek fiberleri koparmak için gereken enerji, Kevlar 49'u koparmak için gereken enerjiden 3-4 kat daha fazladır. Ayrıca ipek, 250°C'ye kadar termal kararlılık göstermektedir [169].

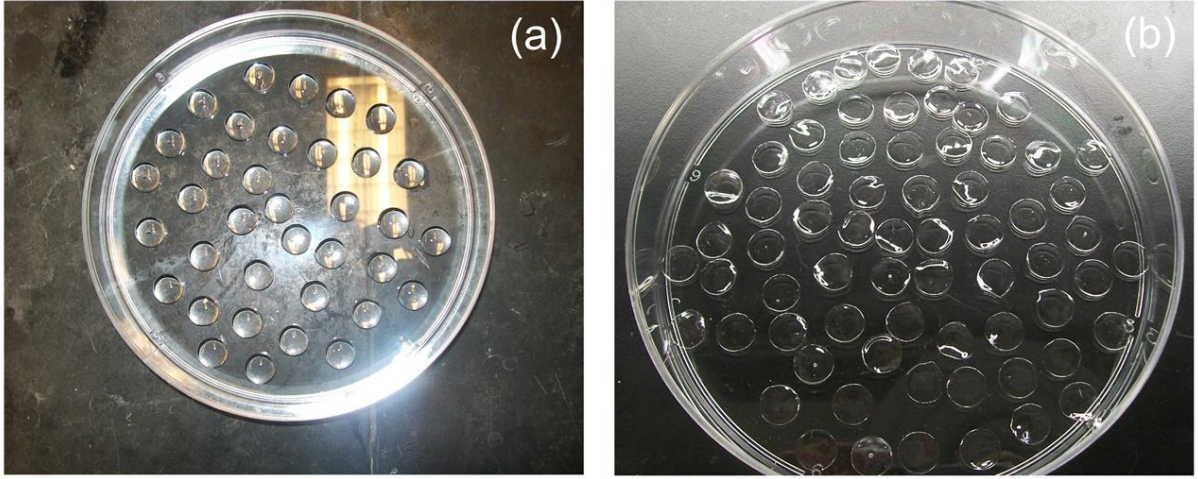
İpek doğal formunda, ipek fibroin adı verilen filament yapıda bir çekirdek proteini ile bu yapıyı saran yapışkan serisin proteininden oluşmaktadır. Serisin proteini, ipek malzemelere karşı oluşturulan immün cevabın temel nedeni olarak görülmektedir [170]. İpek biyomalzemelerin üretiminde kullanılan ipek çözeltisi, *Bombyx mori* adı verilen ipek böceğinden elde edilmiş ve kullanılan yöntemde serisin proteini yapıdan uzaklaştırılmıştır. Böylece, immün cevap oluşma riski azaltılırken, biyouyumlu, kan ile uyumlu, oksijen ve su geçirgenliği oldukça iyi ipek fibroin yapısı elde edilmiştir [171-173].

İpek fiberler, su, etanol, seyreltilmiş asit ve baz çözeltileri gibi birçok çözücüde çözünmez. Ancak derişik sülfürik asit, formik asit, hekzafloroizopropanol (HFIP), kalsiyum nitrat ya da lityum bromür (LiBr) gibi çözeltiler ipek fiberleri çözmek için kullanılmaktadır. Inouye ve Gotoh yaptıkları çalışmalarda, ipek böceği kozalarından elde ettikleri fiberleri 9-9.5 M LiBr çözeltisinde çözmüştür. Elde ettikleri ipek fibroini kullanarak ürettikleri filmlerin, çeşitli insan ve hayvan kaynaklı hücre hatları için, hücre yapışmasını ve büyümesini desteklediğini belirtmişlerdir [174, 175]. Tez kapsamında yapılan üretim çalışmalarında, elde edilen ipek fibroin yapısı LiBr’de çözdürülerek ipek çözeltisi hazırlanmıştır.

Biyomedikal alanda yapılan çalışmalarda ipek, film/membran, mikro/nano fiber, hidrojel ve gözenekli doku iskelesi olmak üzere birçok farklı formda kullanılmıştır [169]. Elektrostimülasyon çalışmaları kapsamında, ipek filmler ve gözenekli doku iskeleleri kullanılarak, 2- ve 3-boyutlu sistemlerde elektriksel alanın etkileri incelenmiştir.

4.1.2.1. İpek ve platin tel içeren ipek filmlerin üretilmesi

Elektriksel alanın hMSC’lerin osteojenik farklılaşması üzerine etkilerini incelemek için ipek filmler üretilmiştir. Boş ipek filmleri hazırlamak amacıyla %3’lük ipek çözeltisi, daha önceden kesilmiş PDMS kalıplar üzerine, pipet yardımı ile koyulmuş ve bir gece oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Bu yöntemle hazırlanan filmler kontrol grubu olarak kullanılmıştır (Şekil 4.3). Elektrostimülasyon çalışmalarında kullanılacak ipek filmlerin üretiminde ise platin teller kullanılmıştır. Bu amaçla öncelikle platin teller, iğne yardımıyla, PDMS kalıplara sabitlenmiş ve ipek çözeltisi bu teller üzerine dökülmüştür. Kurutma işlemi sonunda platin telleri içeren ipek fimler elde edilmiş ve ipek filmler boyunca elektriksel iletkenlik bu teller aracılığı ile sağlanmıştır (Şekil 4.4).



Şekil 4.3. Oda sıcaklığında bekletilen ipek filmlerin (a) kurumadan önceki ve (b) kuruduktan sonraki görüntüleri.



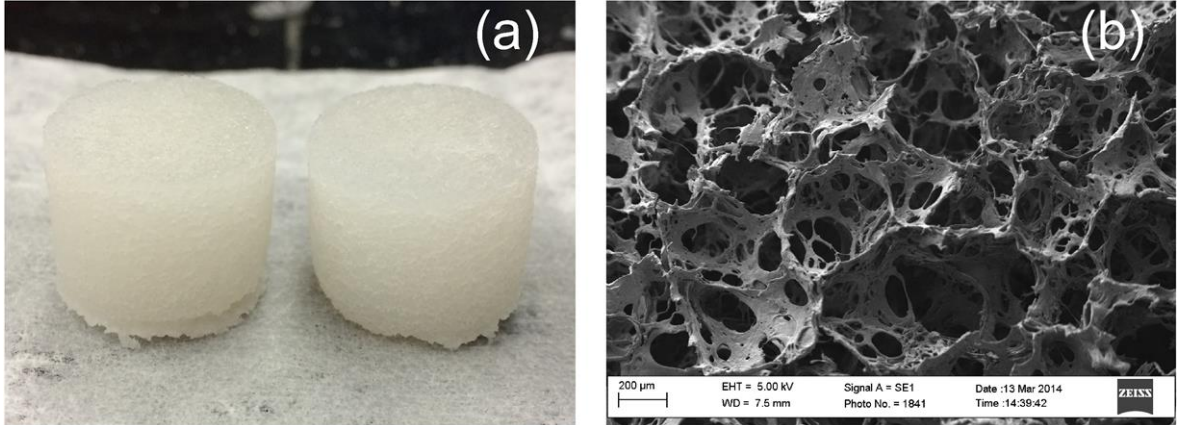
Şekil 4.4. Elektrostimülasyon çalışmalarında kullanılmak üzere üretilen, platin tel içeren ipek filmlerin genel görüntüleri.

Üretilen filmlerin stabilizasyonu su buharı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla filmler, 24 mmHg vakum varlığında su dolu desikatör içerisine bırakılmıştır. İpeğin iki yapısal modeli bulunmaktadır. Birinci modelde ipek, rastgele sarmallardan oluşan kompleks heliks yapısında ve çözünür bir formdadır. İkinci modelde ise, çözünmez ve birbirine paralel

β -tabaka kristal konformasyonu söz konusudur [176]. İpek filmlerin yapısındaki β -tabaka oluşumunu uyarmak ve kararlılıklarını sağlamak için kullanılan geleneksel yöntem, malzemelerin metanol gibi kimyasallar ile muamele edilmesidir. Ancak organik kimyasallar yerine su buharı ile yapılan stabilizasyon çalışmaları, malzeme yüzeyine yapışan ve yayılan hücre sayısının arttığını ve böylece malzemenin hücrel uyumluluğunun güçlendiğini ortaya koymuştur [177].

4.1.2.2. İpek doku iskelelerinin üretilmesi

Eksternal ve internal elektriksel alanın, hMSC'lerin osteojenik farklılaşması üzerindeki sinerjik etkisi 3-boyutlu sistemlerde incelenmiş ve bu amaçla “çözücü döküm-partikül uzaklaştırma” yöntemi kullanılarak gözenekli ipek doku iskeleleri üretilmiştir. Şekil 4.5 a’da üretilen ipek doku iskelelerinin genel görüntüsü verilmiştir. Literatürde, gözenekli doku iskelelerinin, su ya da organik çözücüler (HFIP) varlığında, tuz partiküllerini uzaklaştırma, gaz köpükleştirme veya liyofilizasyon gibi tekniklerin kullanılması ile üretildiği çalışmalar mevcuttur [178, 179]. Tuz partiküllerinin yapıdan uzaklaştırılması ile yüksek gözenekliliğe ve mekanik dayanıma sahip doku iskeleleri üretilebilmektedir. Ayrıca elde edilen gözenekler, tek tip ve içsel bağlantılara sahip olmakla beraber, gözenek boyutu ve dağılımı kontrol edilebilmektedir.



Şekil 4.5. Çözücü döküm- partikül uzaklaştırma yöntemi ile hazırlanan ipek doku iskelelerinin; (a) genel görüntüsü, (b) SEM fotoğrafı.

Üretilen doku iskelelerinin morfolojik ve yapısal özellikleri, ipek fibroin konsantrasyonuna, yüklenen tuzun miktarına, boyutuna ve proseste kullanılan çözücüye göre farklılık göstermektedir. Genellikle çözücü olarak su ya da HFIP tercih edilmektedir. HFIP temelli doku iskelelerinde daha yüksek konsantrasyondaki (%6-20, w/v) ipek çözeltiler

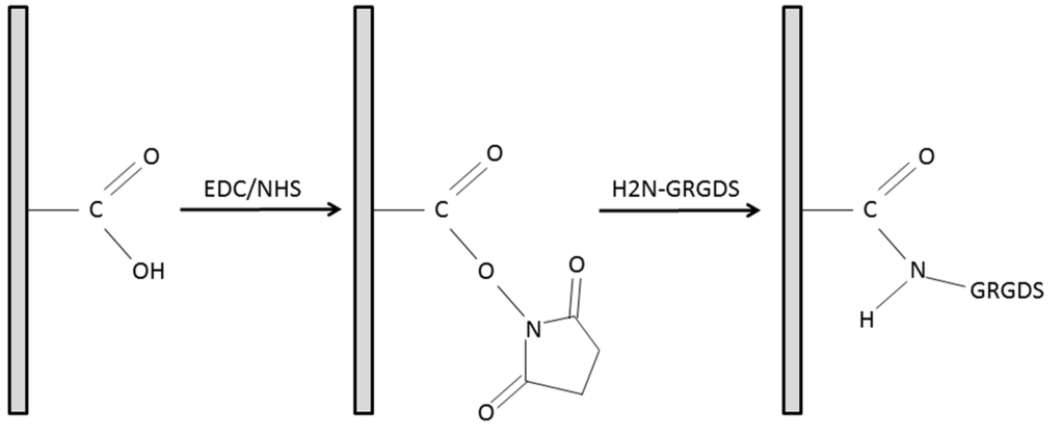
kullanılırken, su bazlı üretimlerde düşük konsantrasyonlar (%4-10, w/v) tercih edilmektedir [178]. Su kullanılarak üretilen doku iskelelerinde bulunan gözenekler daha gelişmiş içsel bağlantılara sahip olmakla birlikte, malzeme yüzeyi daha pürüzlü ve hidrofiliktir. Ayrıca daha iyi bir mekanik dayanım sağlanırken, doku iskeleleri, HFIP yöntemine göre, daha hızlı bozunmaktadır. Bu nedenle, etkin sonuçlar elde etmek için, yapılacak uygulamaya göre yöntemin seçilmesi gerekmektedir [179].

Sahip olduğu avantajlar nedeniyle ipek doku iskelelerinin üretiminde su bazlı yöntem tercih edilmiştir. Temel olarak 500-600 µm boyutundaki NaCl partikülleri, sulu ipek çözeltisine katılmıştır. Tuz partiküllerinin bir kısmı çözünürken, çözeltinin doygunluğa ulaşması nedeniyle, büyük bir kısmı katı formda kalmaya devam etmiştir. İyonlar boyutlarına ve yüklerine göre kozmotropik ya da kaotropik olarak sınıflandırılır. Ca^{+2} , Mg^{+2} gibi yüksek yük yoğunluğuna sahip olan iyonlar kuvvetli kozmotropik, K^{+} gibi düşük yük yoğunluğuna sahip olanlar ise kaotropik olarak adlandırılır. Bu durumda Na^{+} zayıf kozmotropik ve Cl^{-} zayıf kaotropiktir. Kozmotropik iyonlar, kaotropik iyonlara göre, bitişik su moleküllerine çok daha güçlü bağlanırlar. Ayrıca bu iyonlar, yüksek yüklerinden dolayı, proteinlerin yüzeyindeki zıt yükler ile kuvvetli bir etkileşime geçer. İpek fibroinin ağır zinciri 7 adet hidrofobik blok ve 2 tanesi uçlarda olmak üzere 7 adet küçük hidrofilik blok içermektedir. Hidrofobik blok tüm yapının %79'unu oluşturmaktadır ve bu kısımda bulunan glisin-alanin tekrar dizileri kristalin alanlar oluşturarak β -tabaka yapısının oluşmasında rol oynamaktadır. İpek çözeltisi içerisinde çözünen iyonlar su moleküllerini kendilerine bağlayarak suyun protein yapıdan uzaklaşmasını sağlamıştır. Bu durumda protein yapı içerisinde zincirler arasındaki etkileşimler baskın duruma geçmiş ve hidrofobik etkileşimler sonucunda, protein yapı katlanarak β -tabaka formunu oluşturmuştur. Sonraki aşamada meydana gelen doku iskelesi su içerisinde bekletilmiş ve çözünmeyen tuz partiküllerinin yapıdan uzaklaştırılması ile gözenekli bir yapı elde edilmiştir (Şekil 4.5 b) [180-182].

4.1.2.3. RGD fonksiyonallizasyonu

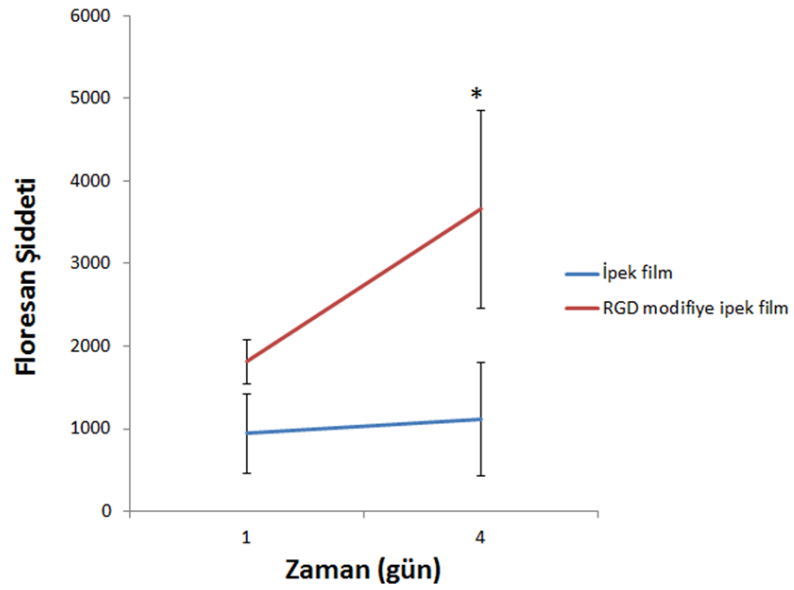
Hücre kültürü çalışmalarından önce, hücre yapışmasını arttırmak amacıyla, ipek biyomalzemelerin yüzeyi RGD ile fonksiyonel hale getirilmiştir. Hücreler ECM içerisinde vitronektin, fibronektin gibi integrin proteinleri ile etkileşim halindedir. Bu nedenle, hücrelerin biyomalzemeler ile etkileşimini arttırmak için bu proteinlerden yararlanılmaktadır. Yüzey modifikasyonunda sıklıkla kullanılan RGD (Arjinin-glisin-aspartik asit), fibronektinin en bilinen sekansıdır [183].

Protein matrislerin, çeşitli kimyasallar için sundukları farklı bağlanma bölgeleri (amino asitler), ipek bazlı sistemlerin doku mühendisliği uygulamalarında sahip oldukları diğer bir avantajdır. İpek biyomalzemelerin yüzeyinde bulunan karboksilik grupları EDC/NHS ile aktive edildikten sonra RGD yüzeye kovalent olarak bağlanmıştır (Şekil 4.6). Yapılan bir çalışmada, karbodiimid kimyası ile ipek filmlerin yüzeyine RGD bağlanmış ve SAOS-2 osteoblastların, fibroblastların ve kemik iliği stromal hücrelerinin yüzeydeki yapışmalarının, yayılmalarının, proliferasyonlarının ve farklılaşmalarının arttığı gözlenmiştir [153, 184]. Kardeşuncer ve ark., RGD modifiye ipek fibroininin, insan tenositlerinin adezyonunu ve proliferasyonunu desteklediğini, dekorin ve kollajen I ekspresyonu doğrultusunda hücre farklılaşmasını uyardığını göstermişlerdir [185]. RGD bağlı yüzeylerde hücrel farklılaşmanın güçlenmesi, hücre yoğunluğu ile doğru orantılı olarak artan hücre-hücre etkileşimlerine bağlanmaktadır [184].

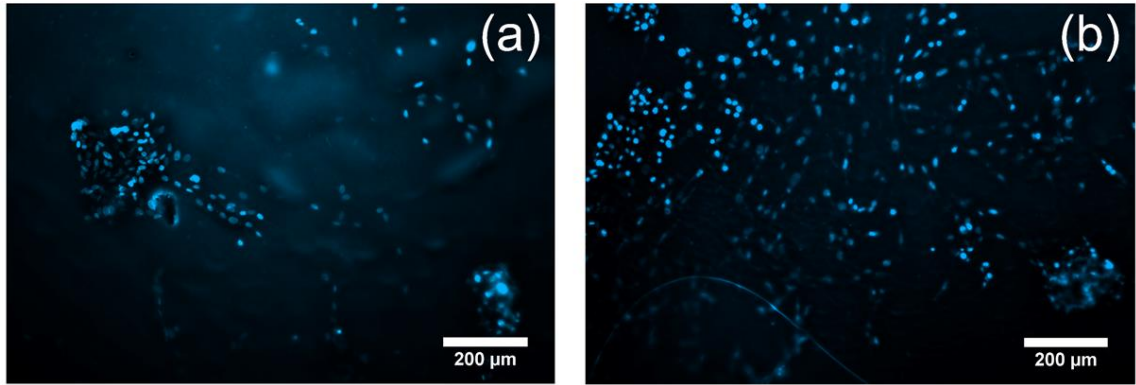


Şekil 4.6. İpek biyomalzemelerin yüzeyine RGD bağlanma mekanizması.

İpek filmlerdeki hücre proliferasyonu ve dağılımı kontrol grubu ile karşılaştırılarak, RGD'nin etkinliği kontrol edilmiştir. RGD bağlı filmlerde hMSC proliferasyonunun, kontrol grubuna göre yaklaşık 4 kat arttığı görülmüştür (Şekil 4.7). DAPI boyamaları ise RGD varlığında, yüzeyde çok daha yoğun ve homojen bir hücre dağılımı olduğunu işaret etmektedir (Şekil 4.8).



Şekil 4.7. Boş ve RGD modifiye ipek yüzeylerde hMSC proliferasyonunun Alamar blue analizi ile belirlenmesi. İstatistiksel olarak anlamlı farklılık; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, $n = 3$.



Şekil 4.8. Boş (a) ve RGD modifiye (b) ipek yüzeylerde kültüre edilen hMSC'lerin, 7. gün DAPI boyamaları.

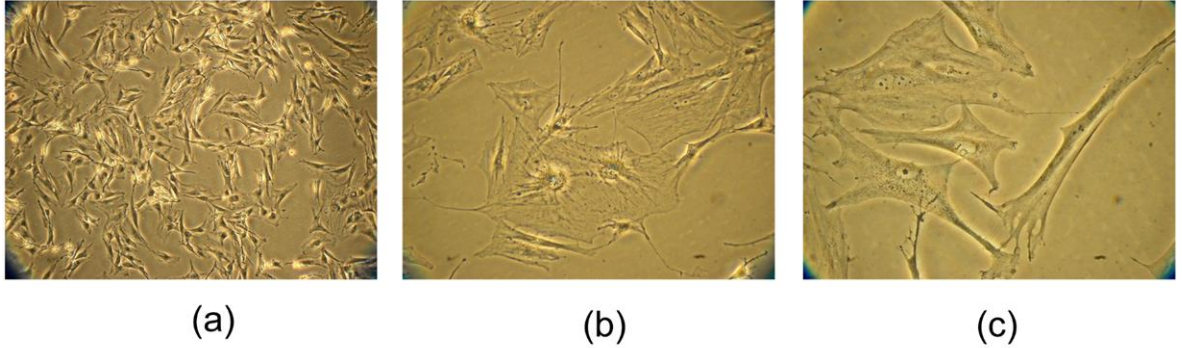
4.2. Hücre İzolasyonu ve Karakterizasyonu

Hücre kültürü çalışmaları iki kısma ayrılmıştır. Fotostimülasyon çalışmalarında sıçan kökenli adipojenik kök hücreler kullanılmıştır. TCPS yüzeyler ve kitosan doku iskeleleri kullanılarak, ışığın 2- ve 3-boyutlu sistemlerde hücre proliferasyonu ve osteojenik farklılaşma üzerine etkileri incelenmiştir. Elektrostimülasyon çalışmalarında ise, öncelikli

olarak ipek filmler kullanılmış ve elektriksel alanın kemik iliğinden izole edilen insan mezenkimal kök hücrelerinin proliferasyonu ve osteojenik farklılaşması üzerine etkileri araştırılmıştır. Daha sonra, elektriksel alanın 3-boyutlu sistemlerdeki etkinliğini belirlemek amacıyla, gözenekli ipek doku iskeleleri üzerinde hMSC'lerin kültürü gerçekleştirilmiştir. Bu aşamada, aynı zamanda hücredeki iyon kanallarını etkileyen ilaçlar kullanılarak, hücre içi ve dışı elektriksel alanın oluşturduğu sinerjik etki incelenmiştir. Biyostimülasyon çalışmalarından önce, çalışmalarda kullanılacak hücrelerin izolasyonu ve karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir.

4.2.1. Sıçan Kökenli AdMSC'lerin Karakterizasyonu

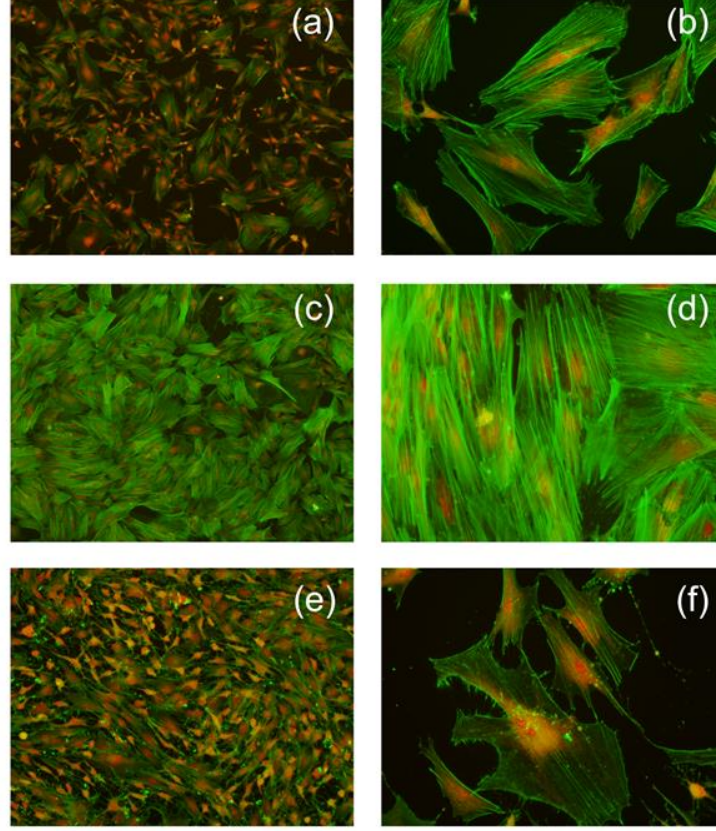
Fotostimülasyon çalışmalarında kullanılmak üzere yağ dokudan izole edilen mezenkimal kök hücrelerin karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, hücrelerin optik ve floresan mikroskop altında morfolojik incelemeleri yapılmış, akış sitometresi ile fenotipik karakterleri belirlenmiş, von Kossa boyamalar ile matris mineralizasyonu görüntülenmiş ve MTT analizi ile hücrelerin, kültür kaplarındaki üreme davranışları ortaya koyulmuştur. Şekil 4.9'da gösterilen optik mikroskop görüntülerinde hücrelerin kültür kabının yüzeyine yapışık yayıldıkları ve genellikle poligonal bir morfoloji sergiledikleri belirlenmiştir.



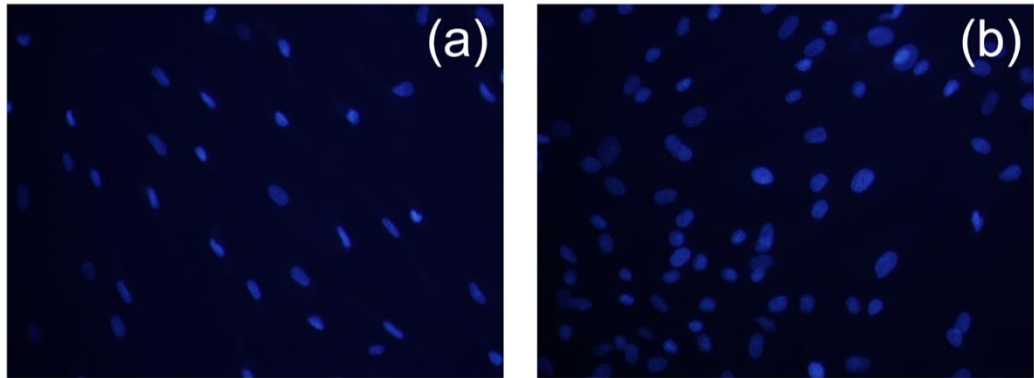
Şekil 4.9. TCPS yüzeylerde kültüre edilen AdMSC'lerin farklı büyütmelelerdeki optik mikroskop görüntüleri; (a) 4X, (b) 10 X ve (c) 20X.

Floresan mikroskop görüntülerinde, aktin filamentleri yeşil ve hücre çekirdekleri kırmızı renkte boyanmıştır. Hücrelerde yoğun bir iskelet yapısı gözlenirken, optik mikroskop ile benzer şekilde, hücre morfolojisi poligonaldir. Ancak kültürün ilerleyen günlerinde hücreler çoğalarak tek tabakalı yapı içerisinde iğsi bir morfoloji sergilemiştir (Şekil 4.10). Hücre kültüründeki mikoplazma kontaminasyonu DAPI boyama ile kontrol edilmiştir. Mikoplazma varlığı, çekirdeğin etrafındaki ve sitoplazma üzerindeki mavi noktalar ile tespit

edilmektedir. Ancak AdMSC kültüründe, DAPI sadece hücre çekirdeğini boyamış ve çekirdek etrafında ya da sitoplazma üzerinde kontaminasyona dair bir bulguya rastlanmamıştır (Şekil 4.11).



Şekil 4.10. TCPS yüzeylerdeki AdMSC'lerin kültürün farklı günlerindeki floresan mikroskop görüntüleri; (a) 3. gün 4X ve (b) 20X, (c) 13. gün 4X ve (d) 20X, (e) 26. gün 4X ve (f) 20X.

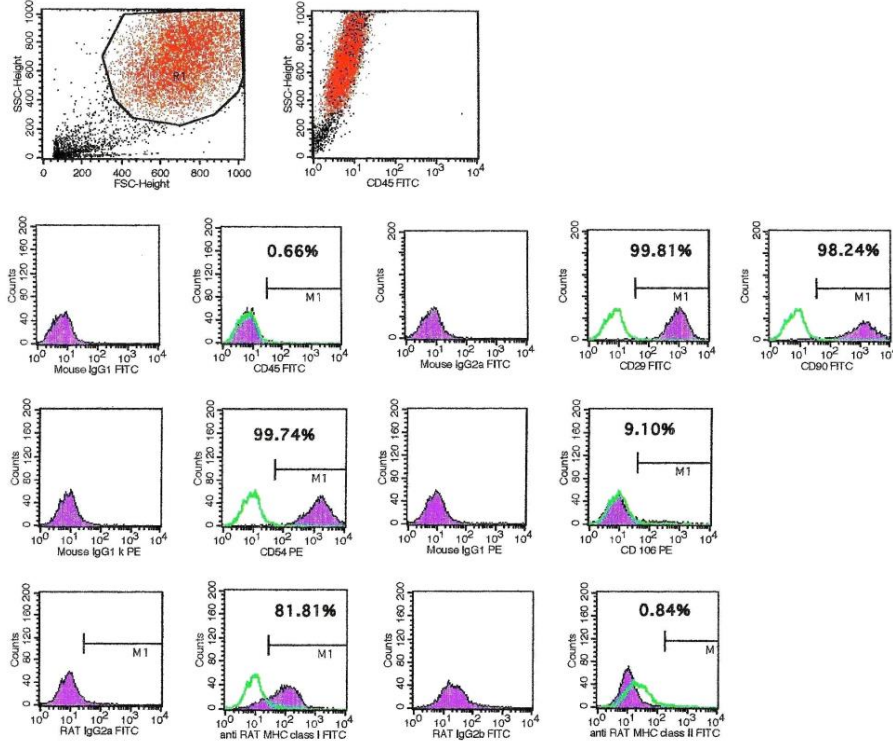


Şekil 4.11. AdMSC kültürlerinde DAPI boyama ile mikoplazma kontrolü; (a) 26. gün, (b) 33. gün.

Mezenkimal ve Doku Kök Hücre Komitesi tarafından belirlenen kriterlere göre mezenkimal kök hücrelerin sahip olması gereken 3 temel özellik bulunmaktadır; 1) Plastik yüzeylere tutunabilme, 2) Uygun yüzey antijenlerinin ifadesi ve 3) Multipotent farklılaşma yeteneği [29].

Hücrelerin kök hücrelere özgü yüzey antijenlerini taşıyıp taşımadığını kontrol etmek için akış sitometrisi kullanılmıştır. Akış sitometrisinde hücre süspansiyonu, lazer ışığı ile aydınlatılan bir bölümden geçirilmekte ve ışık saçılımı, floresan emisyonu gibi özellikler dijital sinyallere dönüştürülmektedir. Oluşan sinyallerin, hücrelerin büyüklük ya da granülaritelerine bağlı olabileceği gibi, hücreye bağlanan çeşitli florokromlar ile hücrenin yüzey antijenleri, DNA içeriği, enzim aktiviteleri, hücre membran potansiyeli ve canlılığı hakkında da bilgi edinilebilir [186]. Bu yöntemde ileri saçılım kanal (forward scatter channel, FSC) dedektörü hücrenin boyutu hakkında bilgi verirken, yana saçılım kanal (side scatter channel, SSC) dedektörü, hücrenin granüler içeriği hakkında bilgi sunmaktadır. Şekil 4.12’de AdMSC’lerin akış sitometrisi analizinde, FSC ve SSC dedektörlerinden elde edilen sinyaller verilmiştir. Bu grafikte tek çekirdekli hücre özelliğine sahip olan hücre grubu ve böylece hücre süspansiyonunda bulunan lenfosit ya da granülosit gibi hücrelerin IgG işaretlenme oranları değerlendirme dışı bırakılmıştır. Diğer grafikte CD45 antijeni ile yapılan işaretleme sonucu, SSC dedektöründen elde edilen sinyaller değerlendirilmiştir. Bu grafikte kırmızı işaretlenmiş hücrelerin grafiğin sol üst bölümünde bulunması, hücrelerin CD45 negatif olduğunu göstermektedir. Yeşil renk kontrol, mor ise yüzey IgG işaretleyicilerden alınan sonuçları ifade etmektedir. Yeşil ve mor histogramların çakışması, negatif işaretlemeyi, yani hücrenin ilgili yüzey antijenini ifade etmediğini göstermektedir. Pozitif durumda ise mor histogramın, kontrolün sağ tarafında bulunması gerekmektedir [187].

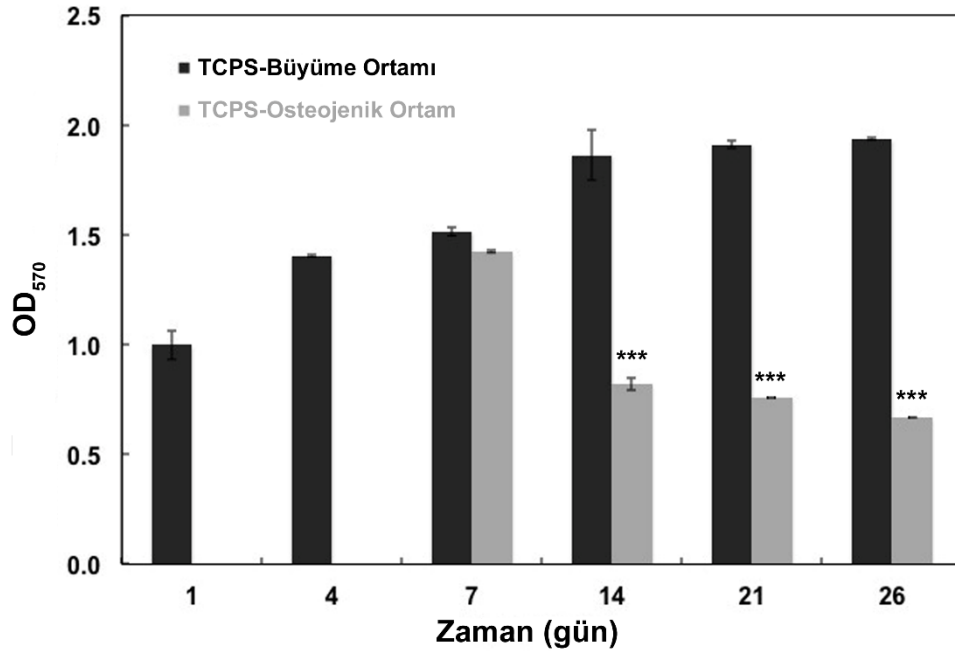
Literatürde MSC’lerin fenotipik karakteri şu şekilde belirtilmiştir; fenotip pozitif antijenler ($\geq 95\%$): CD105, CD73, CD90, CD29 ve fenotip negatif antijenler ($\leq 2\%$): CD45, CD34, CD14, CD79 [29]. Hücrelerin literatürle uyumlu bir şekilde CD29, CD90, CD54 ve MHC sınıf 1 işaretleyicileri için pozitif olduğu görülmüştür. CD45 ve MHC sınıf 2 antijenleri için ise oldukça düşük işaretlenme oranları bulunmuştur ($\leq 1\%$). Akış sitometrisi ile elde edilen veriler ışığında, hücrelerin yüksek saflıkta olduğu ve mezenkimal hücrelere uygun yüzey antijenlerini ifade ettikleri söylenebilmektedir [187].



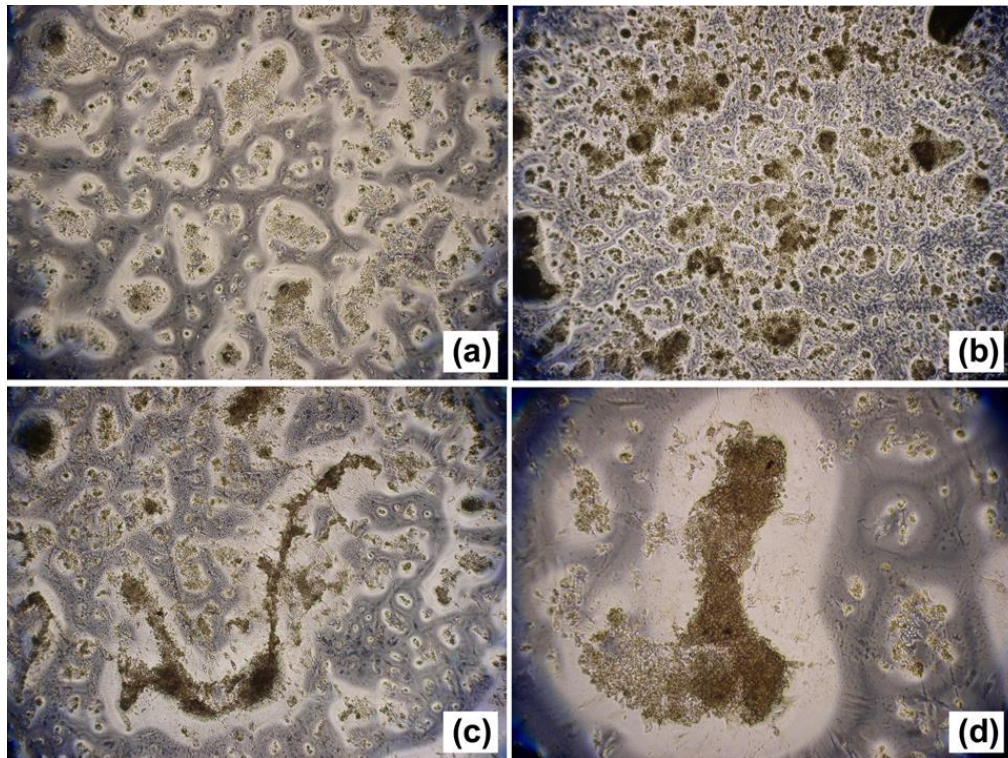
Şekil 4.12. Sıçan kökenli AdMSC'lere ait akış sitometri analiz sonuçları (Yeşil ve mor histogramlar sırasıyla kontrol ve yüzey IgG işaretleyicilerdir).

Hücrelerin kültür kaplarındaki üreme davranışları 26 gün boyunca MTT analizi ile takip edilmiştir (Şekil 4.13). Büyüme ortamında kültüre edilen hücrelerin bir kısmı, 1. haftanın sonunda farklılaşma ortamına alınmıştır. MTT analizi, büyüme ortamındaki hücre proliferasyonunun 14. güne kadar arttığını ve ilerleyen günlerde, kontak inhibisyona bağlı olarak, yavaşladığını göstermektedir. Ancak hücreler farklılaşma ortamına alındıklarında, 2. hafta sonunda mitokondriyel aktivitenin büyük oranda azaldığı tespit edilmiştir. Hücre proliferasyonu ile farklılaşması arasında ters bir ilişki olduğu bilinmektedir. Bu nedenle hücre proliferasyonundaki bu azalış, hücrelerin farklılaşmaya gittiği şeklinde yorumlanabilir.

Farklılaşma ortamında kültüre edilen AdMSC'lerin matris mineralizasyonu von Kossa boyama ile görüntülenmiştir (Şekil 4.14). Boyama sonrasında kahverengi görülen mineralizasyon bölgeleri, hücrelerin kemik hücrelerine farklılaşma potansiyellerini ortaya koymaktadır.



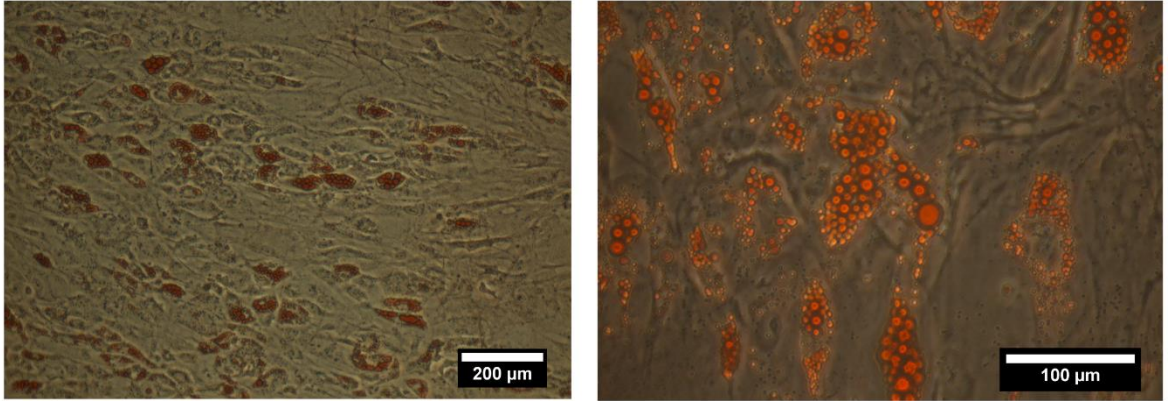
Şekil 4.13. AdMSC'lerin tek tabakalı kültürdeki mitokondriyal aktiviteleri. İstatistiksel olarak anlamlı farklılık; * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, $n=3$.



Şekil 4.14. Kültürün 26. gününde matris mineralizasyonu; boyama öncesi (a) 4X ve von Kossa boyama sonrası; (b) 4X, (c) 10X, (d) 20X.

4.2.2. İnsan Kemik İliği Kökenli MSC'lerin Karakterizasyonu

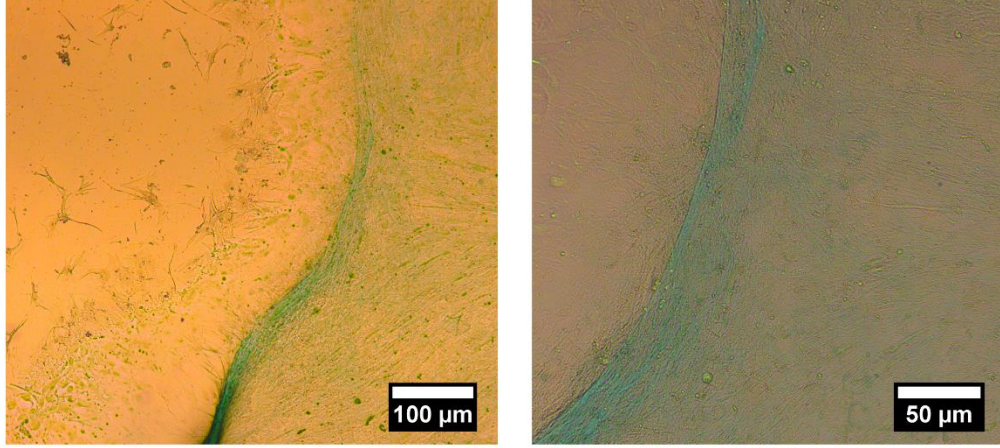
Hücre çalışmalarının ikinci kısmında, elektrostimülasyon uygulamalarında kullanılmak üzere, insan kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücrelerin izolasyonu ve karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Birçok yetişkin dokuda, travma, hastalık ya da yaşlanma gibi durumlarda ortaya çıkabilecek doku hasarları, kök hücreler tarafından, bir dereceye kadar onarılmakta ve doku yenilenmesi sağlanmaktadır. Kök hücrelerin bulunduğu dokular, kök hücre kaynağı olarak tanımlanmaktadır. Örneğin kemik iliği, yetişkin hematopoietik kök hücreler için temel kaynaktır ve dolaşım sisteminin yenilenmesinden sorumludur. Yetişkin kemik iliği, aynı zamanda mezenkimal kök hücreleri (MSC) de taşır ve bu hücreler, kemik, kıkırdak, kas, ligament, tendon, adipoz ve stroma dokusu gibi mezenkimal dokuların rejenerasyonunda görev alır [28]. Kemik iliğinden elde edilen kanlı doku flasklarda kültüre edilmiş ve mezenkimal kök hücrelerin izolasyonunda, bu hücrelerin seçici olarak plastik yüzeylere yapışma özelliğinden yararlanılmıştır [188]. Yüzeye bağımlı olmayan hematopoietik hücreler, yıkamalar ile ortamdan uzaklaştırılmıştır. Elektrostimülasyon çalışmalarında kullanılan hMSC'ler izole edildikten sonra, adipojenik, osteojenik ve kondrojenik ortamlarda kültüre edilmiş ve çeşitli boyamalar ile ECM yapısı karakterize edilerek, hücrelerin farklılaşma potansiyelleri ortaya koyulmuştur.



Şekil 4.15. Adipojenik ortamda kültüre edilen hMSC'lerde yağ damlacıklarının optik mikroskop görüntüleri.

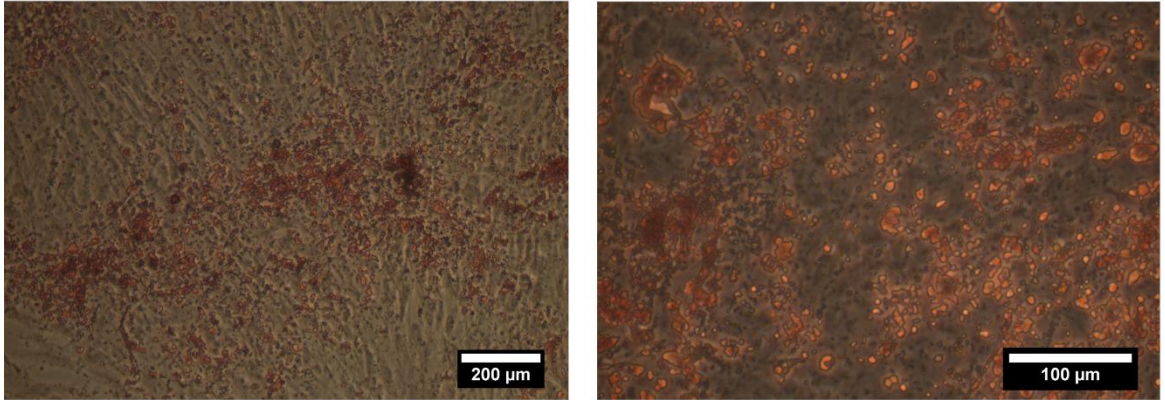
Adipojenik farklılaşma, kültür ortamına eklenen 1-metil-3-izobütillsantin, dekzametazon, ksantin ve indometasin ile uyarılmıştır [189]. Kültürün ilk haftasından sonra hücreler içerisinde lipidce zengin vakuoller belirmeye başlamıştır. Kültürün ilerleyen günlerinde lipid vakuolleri büyümeye devam etmiş ve hücrelerin içerisini doldurmuştur. 21. günde

gerçekleştirilen boyamalarda, kontrol grubu boyanmazken, adipojenik ortamda kültüre edilen hücreler Oil red pozitif boyanmış ve kırmızı lipid damlacıkları görüntülenmiştir (Şekil 4.15).



Şekil 4.16. Kondrojenik ortamda kültüre edilen hMSC'lerin ürettiği proteoglikanca zengin ECM'nin optik görüntüleri.

Kondrojenik farklılaşmanın sağlanması için hücreler %2'lik (v/v) FBS ve TGF- β 3 içeren farklılaşma ortamında kültüre edilmiştir [190]. Optik mikroskop altında, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında morfolojik açıdan herhangi bir farka rastlanmamıştır. 21. gün yapılan Alcian blue boyamalarında ise kondrojenik ortamda kültüre edilen hücrelerde, proteoglikanca zengin ECM mavi renk boyanmıştır (Şekil 4.16).



Şekil 4.17. Osteojenik ortamda kültüre edilen hMSC'lerin ürettiği apatit minerallerin optik görüntüleri.

%10 (v/v) FBS içeren osteojenik farklılaşma ortamı, dekzametazon, askorbik asit ve β -gliserol fosfat ile desteklenmiştir [191]. Kültürün ilk haftasından sonra, kalsiyum birikimine

bağlı olarak nodül benzeri yapılar oluşmaya başlamış ve oluşan nodüllerin miktarı zamana bağlı olarak artış göstermiştir. Kültürün 21. günü, mineralize bölgeler Alizarin red ile kırmızı boyanmıştır (Şekil 4.17).

4.3. *In vitro* Biyostimülasyon Çalışmaları

In vitro biyostimülasyon çalışmalarında ışık ve elektrik olmak üzere iki farklı uyaran kullanılmıştır. Işık kullanılan fotostimülasyon çalışmaları AdMSC'ler ile elektriksel alan varlığındaki elektrostimülasyon çalışmaları ise hMSC'ler ile yürütülmüştür.

4.3.1. AdMSC'ler ile Yapılan Fotostimülasyon Çalışmaları

AdMSC'ler ile yürütülen fotostimülasyon çalışmalarında TCPS yüzeyler ve kitosan doku iskeleleri kullanılmıştır. Fotostimülasyon uygulamalarındaki en önemli parametrelerden biri kullanılan ışığın dalga boyudur. Bu alanda yapılan çalışmalarda, lazer sistemler ve LED ışıklar varlığında, mor ötesi ışınlardan kızıl ötesi ışınlar kadar farklı dalga boylarında birçok ışık kullanılmış ve başarılı sonuçlar ortaya koyulmuştur. Ancak bu uygulamalarda monokromatik yani tek bir dalga boyunda ışık kullanılmakta ve elde edilen sonuçlar doğrultusunda, hücresel aktiviteler üzerinde etkin, tek bir dalga boyundan söz etmek mümkün olmamaktadır. Bu nedenle doktora tez çalışması kapsamındaki fotostimülasyon uygulamalarında, plazma ark ışık kaynağının kullanılmasına karar verilmiştir. Kullanılan plazma ark ışık kaynağı, diğer ışık kaynaklarından farklı olarak, birçok dalga boyunu aynı anda uygulamaya olanak veren, patentli özel bir filtreye sahiptir. Bir arada sunulan dalga boyları, bilimsel çalışmalar sonucunda elde edilen optimum sonuçlara göre seçilmiş olup, hücreler üzerinde tek tek etkinliği gösterilmiş dalga boylarının bir arada kullanılmasına imkan vermektedir. Plazma ark sistemi ile kullanılan dalga boyları; 633-660 nm arasındaki kırmızı ışık, 712-852 nm arasındaki kızıl ötesi ışık ve 912-1250 nm arasındaki dalga boyları olarak sıralanabilir.

Lazer terapilerinde kullanılan enerji oldukça düşük seviyeli ve ısı, ses, titreşim yaymaz. Oluşan reaksiyonlar termal olmadığından dokuda herhangi bir şekilde sıcaklık yükselmesi gerçekleşmez. Yapılan çalışmalar, lazere maruz kalan hedef dokulardaki sıcaklık artışının önemsenmeyecek düzeyde ($\pm 1^{\circ}\text{C}$) olduğunu göstermektedir [192]. Fibroblast süspansiyonları ile yapılan bir çalışmada, lazer uygulaması sıcaklıkta herhangi bir değişime neden olmamıştır [193]. Schneede ve ark., 40 mW/cm^2 yoğunlukta lazer kullanımının, sıcaklığı 0.065°C 'den daha az yükselttiğini belirtmişlerdir [194].

Yüksek güçlü plazma ark ışık kaynaklarındaki sıcaklık artışı ise lazer sistemlere ve LED'lere göre daha fazladır. Tez çalışması kapsamında kullanılan plazma ark ışık kaynağının enerji yoğunluğu 10^4 W/cm^2 'dir ve bu değer literatür ile karşılaştırıldığında oldukça fazladır. Bu nedenle grubumuzda yapılmış bir yüksek lisans tezi kapsamında, kullanılan plazma ark sisteminin uygulandığı ortamın sıcaklığı üzerindeki etkisi kontrol edilmiştir. Yapılan çalışmada, plazma ark uygulamasının 22°C 'deki ortamın sıcaklığını, uygulandığı mesafeye bağlı olarak, en fazla 3°C arttırdığı görülmüştür. Hücre kültürü çalışmalarında, fotostimülasyon uygulamasından önce hücreler üzerindeki ortam oda sıcaklığındaki DPBS ile değiştirilmiştir. Fotostimülasyon uygulamasından sonra ortamın sıcaklığı 28°C 'ye yükseldiğinden, hücreler herhangi bir şekilde zarar görmemiştir [62]. Söz konusu çalışmada MC3T3-E1 hücreleri ile çalışılmış ve fotostimülasyonun hücre proliferasyonu ve farklılaşması üzerindeki etkileri incelenmiştir. Oldukça etkin sonuçların elde edildiği çalışmadaki uygulama koşulları, AdMSC'ler ile yapılan fotostimülasyon çalışmalarında da işlem parametreleri olarak kullanılmıştır [62]. Bu parametreler şu şekilde sıralanabilir;

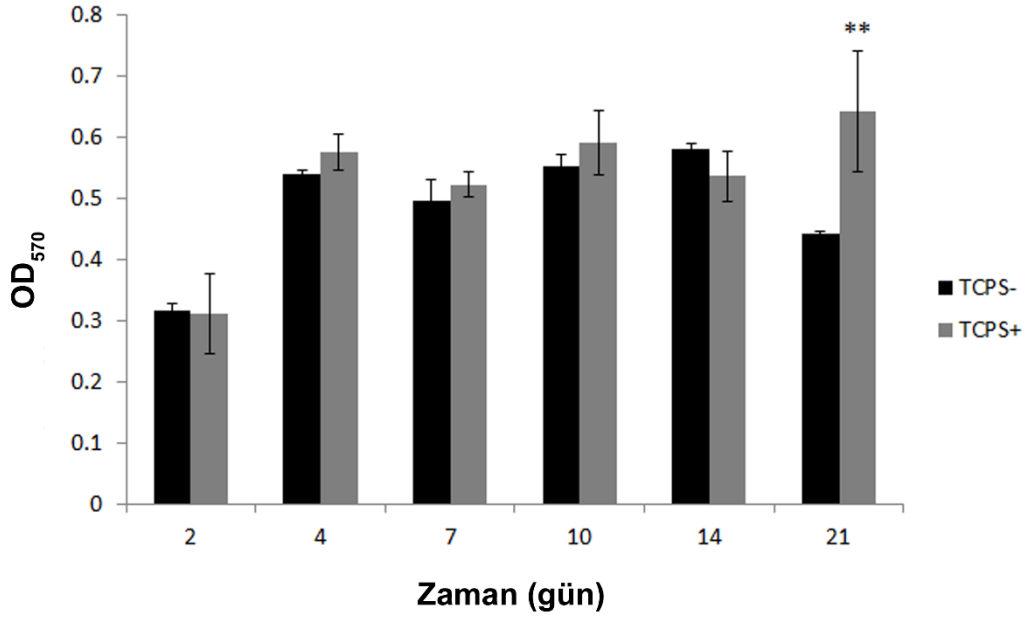
- ✓ TCPS ve kitosan doku iskeleleri için uygulama mesafesi 10 cm ve uygulama sıklığı gün aşırıdır.
- ✓ TCPS grubu için uygulama süresi 5 dk, kitosan doku iskeleleri için 10 dk'dır.

4.3.2. Fotostimülasyon Çalışmalarında Yapılan Hücre Kültürü Analizleri

Gerçekleştirilen hücre kültürü çalışmalarında, fotostimülasyonun hücreler üzerindeki etkisi, proliferasyon, morfolojik özellikler ve farklılaşma yönünden ele alınmıştır.

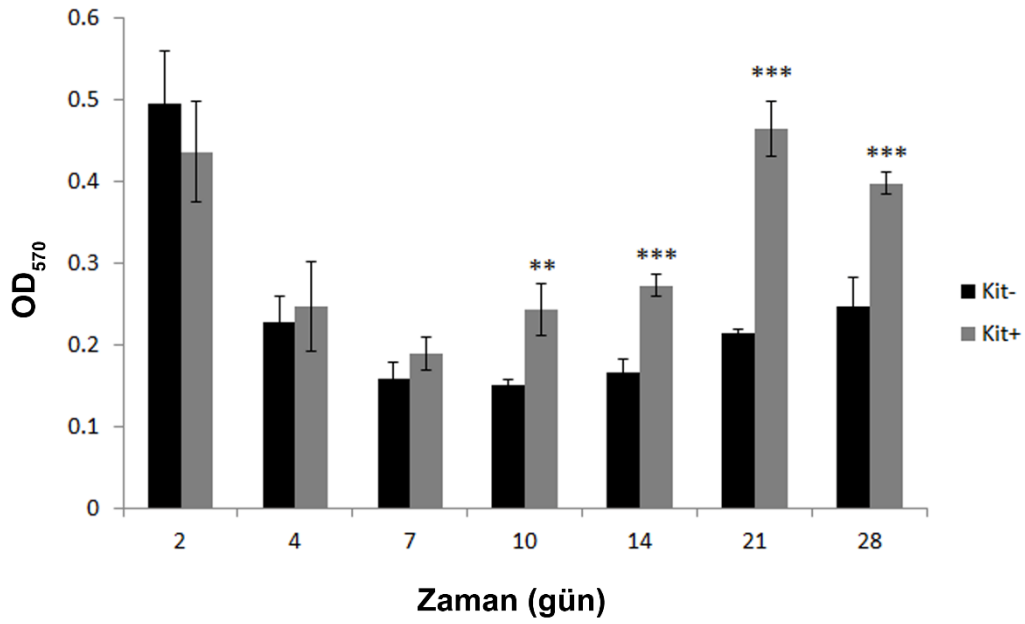
4.3.2.1. Hücre proliferasyonunun belirlenmesi

Fotostimülasyon uygulamalarında, öncelikle ışık varlığındaki hücrelerin metabolik aktiviteleri MTT testi ile belirlenmiş ve kontrol grubu ile karşılaştırma yapılmıştır. TCPS yüzeylerde yürütülen çalışmaların MTT analizi Şekil 4.18'de verilmiştir. MTT grafiğine bakıldığında, 2. günden 4. güne gelindiğinde, hücrelerin metabolik aktivitelerinin her iki grupta da artış gösterdiği belirlenmiştir. Sonraki günlerde, hücreler farklılaşma ortamında bulunduklarından, hücre canlılığı artış göstermemiş ve 21. güne kadar sabit bir şekilde seyretmiştir. Ancak 21. güne gelindiğinde kontrol grubundaki hücrelerin proliferasyonunda bir azalma görülürken, ışığa maruz bırakılan grupta hücrelerin çoğalma hızının, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, yaklaşık 1.5 kat daha fazla olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.18. Fotostimülasyon çalışmaları kapsamında, TCPS yüzeylerde kültüre edilen AdMSC’lerin MTT analizi (TCPS-; ışık uygulanmayan kontrol grubunu, TCPS+; ışık uygulanan grubu temsil etmektedir). İstatistiksel olarak anlamlı farklılık; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, $n=3$.

Kitosan doku iskelelerinde kültüre edilen hücrelerde ise, 2-boyutlu ortamlardan farklı olarak, hücre yoğunluğu, 2. günden 4. güne gelindiğinde ani bir şekilde düşmüş ve 10. günden itibaren tekrar yükselmeye başlamıştır. Bunun nedeni, hücrelerin 3-boyutlu biyomalzeme üzerinde, 2-boyutlu ortamlara göre, farklılaşma ortamına daha zor uyum sağlaması şeklinde yorumlanabilir. Fotostimülasyonun hücre proliferasyonu üzerindeki etkisi, TCPS yüzeylere göre, daha erken açığa çıkmıştır. 10. günden itibaren ışık hücrelerin proliferasyonunu, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, güçlü bir şekilde uyarmıştır ($p < 0.001$). Işık uygulanmayan hücrelerin metabolik aktiviteleri neredeyse sabit kalırken, fotostimülasyonun hücre yoğunluğunu logaritmik olarak arttırdığı belirlenmiştir (Şekil 4.19).



Şekil 4.19. Fotostimülasyon çalışmaları kapsamında, kitosan doku iskelelerinde kültüre edilen AdMSC’lerin MTT analizi (kit-; ışık uygulanmayan kontrol grubunu, kit+; ışık uygulanan grubu temsil etmektedir). İstatistiksel olarak anlamlı farklılık; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, $n=3$.

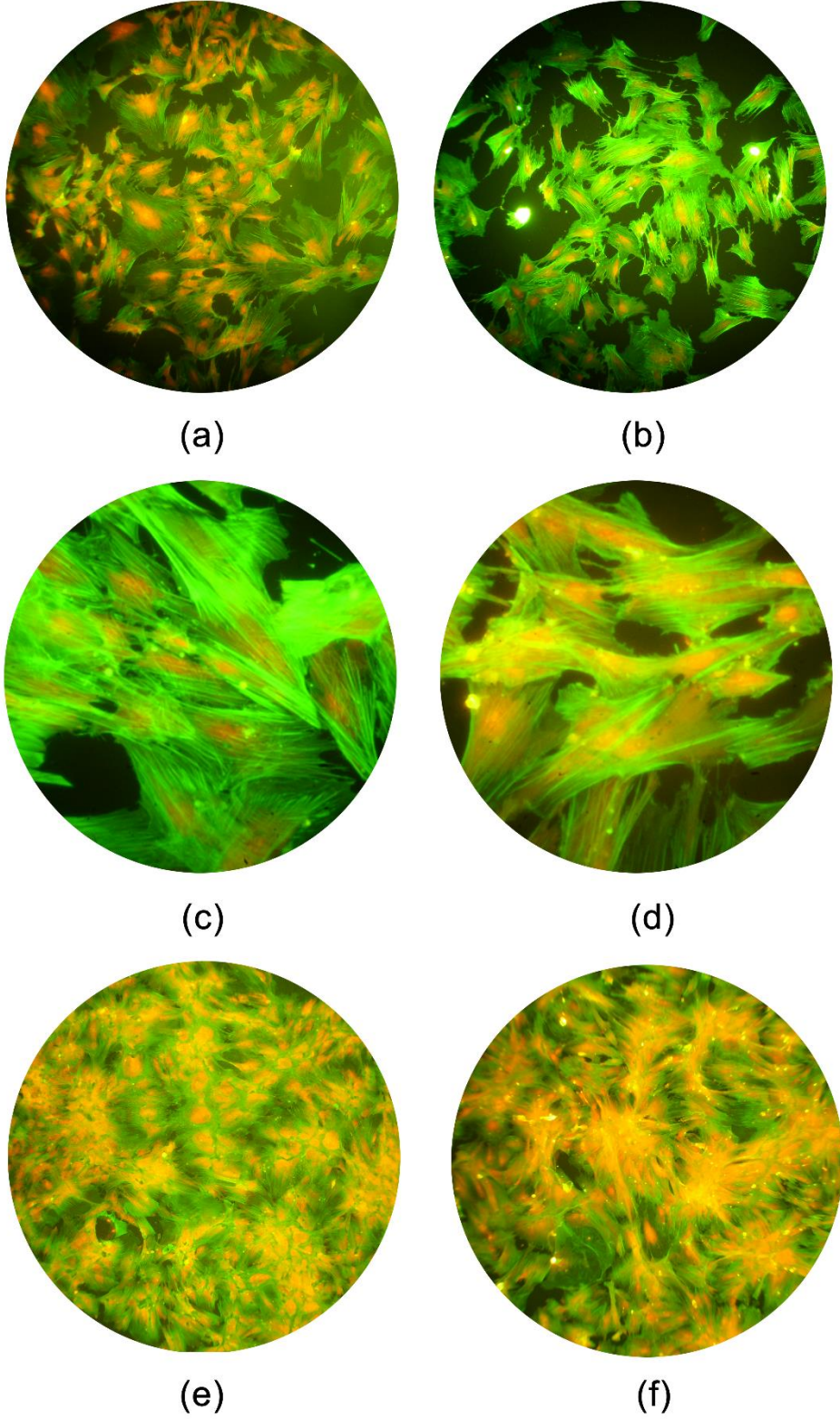
Literatürdeki fotostimülasyon çalışmalarında birçok farklı hücre tipi kullanılmakla birlikte, ışığın kök hücreler ve progenitor hücreler üzerindeki etkisini gösteren geniş çaplı çalışmalar oldukça azdır. Nöral progenitor hücrelerde, ışığın etkisi ile ATP sentezinin arttığı belirtilmiştir. Ayrıca fotostimülasyonun kardiyak ve mezenkimal kök hücrelerin proliferasyon hızını arttırdığı belirlenmiştir. Yine adipojenik kök hücreler ile yapılan bir başka çalışmada, ışık varlığında hücrelerin proliferasyonu artış göstermiştir [195].

Işığın proliferasyon üzerindeki etkisi tam olarak anlaşılamamakla birlikte, hücrelerin belli reseptörlerinde, bir ligand varlığından bağımsız olarak, dimerizasyona ve aktivasyona neden olduğu düşünülmektedir. Böylece hücre, ışığı kullanabileceği ‘doğru enerjetik konum’a geçmekte ve otofosforilasyon ile bunu takip eden hücresel olaylar meydana gelmektedir. Kalsiyum kanallarının aktivasyonu, hücre içi kalsiyum seviyesini arttırarak, proliferasyonu uyarmaktadır. Kızıl ve kızıl yakın ışınlar, mitokondriyal solunum zincirinin bileşenleri tarafından absorblanmakta, böylece hücre içi ROS, ATP/cAMP seviyesi yükselmekte ve buna bağlı sinyal yollarının devreye girmesi ile hücresel proliferasyon uyarılmaktadır [196, 197].

Fotostimölasyon çalışmalarından maksimum verimi elde etmek için, ışık uygulaması sırasında örnekler DPBS içerisine alınmıştır. Bunun nedeni, költer ortamında bulunan serum proteinlerinin, oluşacak reaksiyonları etkilemesini engellemektir. Ayrıca, uygulanan ışığın etkisini arttırmak amacı ile uygulama karanlık ortamda gerçekleştirilmiştir. Bu koşullar varlığında, plazma ark kullanılarak yapılan fotostimölasyon uygulaması, AdMSC'lerin 2- ve 3-boyutlu ortamlardaki proliferasyonunu arttırmıştır [90].

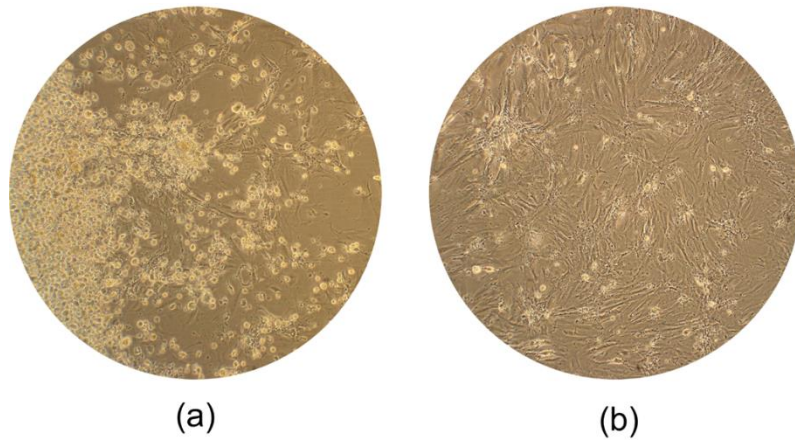
4.3.2.2. Hölcre morfolojisinin belirlenmesi

TCPS yüzeyler kullanılarak yapılan fotostimölasyon çalışmalarında hölcre morfolojisi floresan mikroskop altında incelenmiştir (şeki 4.20). Bu amaçla hölcrelerin çekirdeği propidyum iyodür ile kırmızıya, aktin filamentleri ise Alexa Fluor ile yeşile boyanmıştır. Her iki grupta da hölcreler polistiren yüzeylere yapışmış ve yayılmıştır. Költerün 4. gününde fotostimölasyon varlığında hölcrelerin çok daha yoğun bir iskelet organizasyonuna sahip olduğu görölmektedir. Mikrotübüller, aktin filamentleri ve ara filamentlerden oluşan 3-boyutlu hölcre iskeleti, hölcre farklılaşması ile son bulan birçok hölcreyel olayda görev almaktadır. Bu hölcreyel olaylar; hölcre şeklinin ve organellerin konumsal organizasyonlarının belirlenmesi, hölcre içi membran aktiviteleri, yüzey reseptörlerinin ve mitozun kontrolü şeklinde sıralanabilir [198]. Hölcrelerin 7. gün fotoğrafları karşılaştırıldığında, kontrol grubundaki hölcrelerin paralel olarak konumlanmış aktin filamentleri varlığında fibroblast benzeri yapılarını korudukları görölmektedir. Işığa maruz kalmış hölcrelerde ise, aktin filamentleri, daha kalın demetler oluşturarak, hölcrenin periferine yakın kısımlarda yeniden organize olmuşlardır. Yeniden yapılanmanın sonucunda hölcre çekirdeği daha görünür bir hal alarak, hölcre morfolojisi, osteojenik farklılaşmanın bir göstergesi olarak, iğsiden kübik yapıya doğru değişmiştir [199]. 14. günde, fotostimölasyon uygulanan grupta hölcreler bir araya gelerek kafes yapıları oluşturmuş ve bu yapılar arasında hölcreyel uzantılar ile yoğun bağlantılar kurulmuştur.



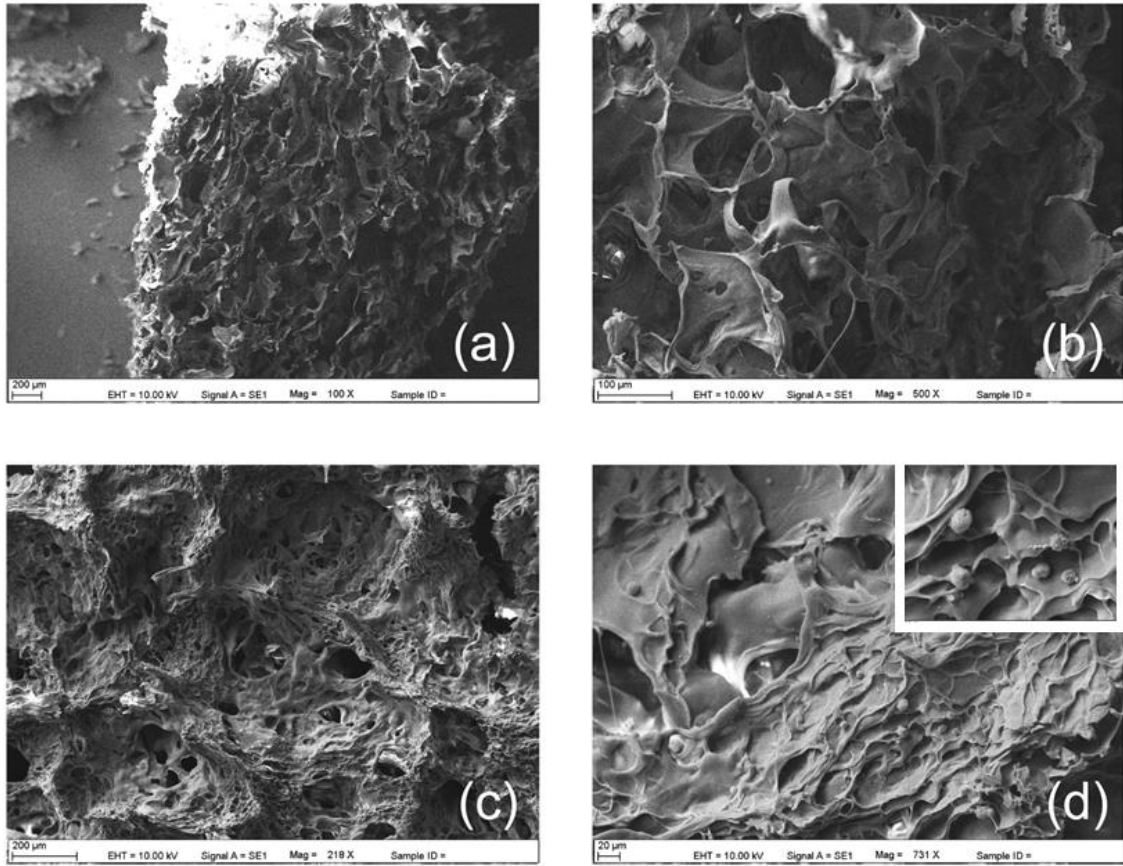
Şekil 4.20. Fotostimülasyon çalışmaları kapsamında TCPS yüzeylerde kültüre edilen AdMSC'lerin floresan mikroskop görüntüleri; (a) kontrol grubu, 4. gün, 10X, (b) fotostimülasyon grubu, 4. gün, 10X, (c) kontrol grubu, 7. gün, 40X, (d) fotostimülasyon grubu, 7. gün, 40X, (e) kontrol grubu, 14. gün, 10X, (f) fotostimülasyon grubu, 14. gün, 10X.

In vitro hücre kültürü çalışmalarında, hücreler çoğalarak kültür kabının tüm yüzeyini kapladığında proliferasyon durur. Bu durum ‘kontakt inhibisyon’ olarak tanımlanır [200]. Proliferasyonları duran hücrelerin kültürlerine devam edildiğinde, bir süre sonra ölüme gittikleri görülür. Çalışmanın 21. gününde hücreler optik mikroskop altında görüntülenmiştir (Şekil 4.21). Kontrol grubundaki hücrelerin canlılığını kaybederek yuvarlaklaştıkları ve yüzeyden ayrılmaya başladığı belirlenmiştir. Işık uygulanan grupta ise, hücre canlılığının devam ettiği, hücre-yüzey ve hücre-hücre arası etkileşimlerin korunduğu görülmüştür. Bu durum ışığın apoptoz mekanizması üzerindeki etkisi ile açıklanabilir. Kontrollü hücre ölümü olarak tanımlanan apoptoz mekanizmasının kontrolü BCL-2 ailesi tarafından gerçekleştirilmektedir. Bu aile, pro-apoptotik (BAX) ve anti-apoptotik (Bcl-2, Bcl-Xl) moleküllerden oluşmaktadır. Apoptoz mekanizmasında, p53 proteininin rol oynadığı bir dizi olay gerçekleşmekte, hücre bölünmesi durdurulmakta ve p21, BAX gibi genlerin ekspresyonu uyarılmaktadır. Hücre kültürü koşullarında, serum yokluğu gibi stres oluşturan durumlar, normalde apoptoz mekanizmasını uyarırken, ışık varlığında bu mekanizmanın çalışmadığı saptanmıştır. Fotostimülasyon sonucunda anti-apoptotik Bcl-2 geninin ekspresyonu artarken, pro-apoptotik protein BAX’ın ekspresyonu inhibe olmaktadır. Işığın bu etkisinin, p53 ekspresyonunun baskılanması ya da doğrudan Bcl-2 ekspresyonunun post-transkripsiyonel düzeyde uyarılması ile ortaya çıktığı düşünülmektedir. Tüm bu bulgular, fotostimülasyonun hücreleri apoptozdan koruyan bir etkisi olduğunu ortaya koymaktadır [201]. TCPS ile yapılan fotostimülasyon çalışmasında, plazma ark kaynağından çıkan ışınların hücre içi filament organizasyonu ve buna bağlı olarak hücre morfolojisi üzerindeki etkileri ortaya koyulmuştur. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında hücre canlılığının daha uzun süre korunduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.21. TCPS yüzeylerdeki AdMSC’lerin, kültürün 21. günündeki optik mikroskop görüntüleri (10X); (a) kontrol grubu, (b) fotostimülasyon grubu.

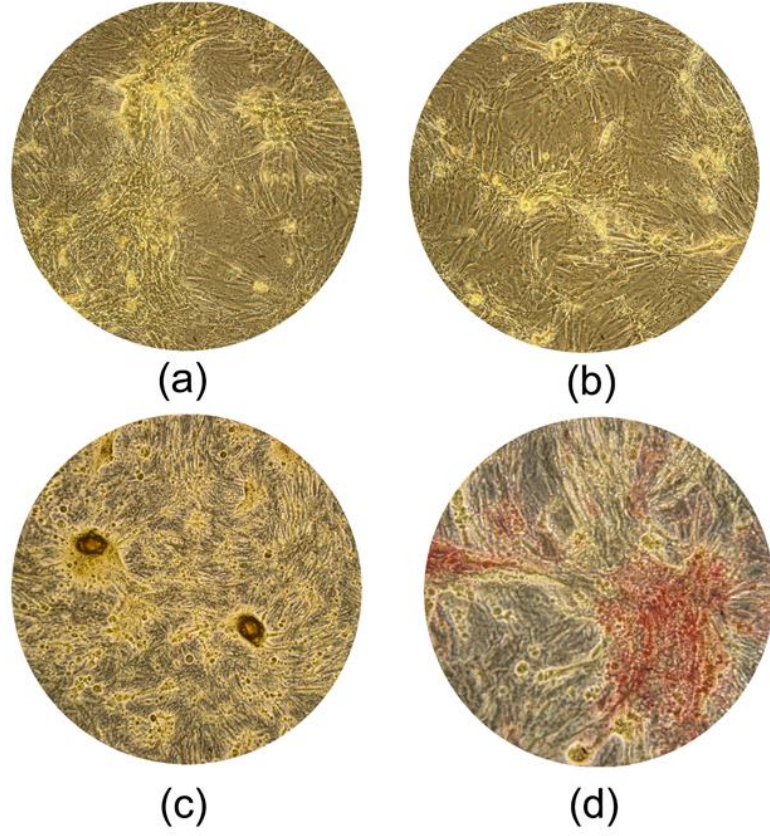
Kitosan doku iskeleleri ile yapılan fotostimülasyon çalışmalarındaki hücrelerin morfolojileri SEM ile analiz edilmiştir (Şekil 4.22). 14. gün SEM fotoğraflarına bakıldığında, kontrol grubundaki kitosan doku iskeleleri üzerinde hücre kalıntılarına rastlanmıştır ancak sağlıklı bir hücre-malzeme etkileşimi olmadığı görülmüştür. Fotostimülasyon uygulanan gruplarda ise, malzeme yüzeyinde hücresel bir dağılım olduğu ve bazı bölgelerde, hücre-malzeme etkileşimleri ile, gözeneklerin kapandığı belirlenmiştir. Yüksek büyütmelelerde, ışık uygulanan gruplarda, mineral benzeri yapılanmalara rastlanmıştır. Abramovitch ve ark., mercan iskeleleri ile yaptıkları çalışmada mezenkimal kök hücreleri üzerine, 632.8 nm dalga boyundaki ışığı, 0.5 W/cm² yoğunlukta ve günde 10 dk olmak üzere, 28 gün boyunca uygulamışlardır. Fotostimülasyon varlığında hücrelerin, doku iskelesine başarılı bir şekilde tutunduklarını ve hidroksiapatit (HA) ya da HA öncülü yapıları oluşturduklarını gözlemlemişlerdir [60]. Fotostimülasyon ile yapılan 3-boyutlu çalışmalardan bir diğeri de, Leonida ve ark. tarafından kollajen matrisler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Fotostimülasyon uygulamasında, mezenkimal kök hücreleri, 15 Hz, 100 mJ, 1.5 W ve 15 Hz, 150 mJ, 2.25 W olmak üzere iki farklı koşulda uyarılmıştır. Hücre-malzeme etkileşimi, SEM yerine hemotoksilen & eozin boyaması ile takip edilmiştir. Işık uygulaması yapılan her iki grupta da, kontrol grubuna göre, hücre yoğunluğunda artış tespit edilmiştir [202]. Kitosan ile yapılan fotostimülasyon çalışmalarında, AdMSC'ler ile malzeme arasındaki etkileşim çok etkin bir şekilde gerçekleşmemiştir. Bu durum MTT analizindeki düşük absorbans değerlerinden de belli olmaktadır. Ancak kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, fotostimülasyonun hem proliferasyon hem de hücre dağılımı açısından uyarıcı etkisi ortaya koyulabilmiştir.



Şekil 4.22. Fotostimülasyon çalışmaları kapsamında kültüre edilen AdMSC’lerin, 14. gün SEM fotoğrafları; (a), (b) kontrol grubu, (c), (d) fotostimülasyon grubu.

4.3.2.3. Matris mineralizasyonunun incelenmesi

Osteojenik farklılaşmanın göstergelerinden biri de matris mineralizasyonudur. Matris mineralizasyonunu görüntülemek için kullanılan boyalar, hücre içi mineralize kristallere bağlanarak, hücreler tarafından oluşturulan kalsiyum fosfat yapılarının varlığını ortaya koyar. TCPS yüzeylerdeki matris mineralizasyonu ALP-von Kossa (ALP-VK) boyamalar ile belirlenmiştir. 21. gün yapılan boyamalar optik mikroskop altında görüntülenmiş ve Şekil 4.23’te sunulmuştur. Kontrol grubunda, mineralizasyonu işaret eden, herhangi bir boyanma gerçekleşmezken, fotostimülasyon varlığında, hücreler arasında kahverengi nodüller ve kırmızı mineralize bölgeler tespit edilmiştir. Literatürde de benzer şekilde, fotostimülasyonun, kemik nodül oluşumunu arttırdığını gösteren çalışmalar mevcuttur [203, 204]. Fujimoto ve ark., fotostimülasyonun *BMP* ifadesini arttırarak mineralizasyonu uyardığını ifade etmişlerdir [205].



Şekil 4.23. TCPS yüzeylerde kültüre edilen AdMSC’lerin, matris mineralizasyonunu gösteren ALP-VK boyamaları (20 X); (a), (b) kontrol grubu, (c), (d) fotostimülasyon grubu.

Kitosan doku iskelelerinde yapılan von Kossa boyamalarda her iki doku iskelesi de boyanmakla birlikte, ışık ile muamele edilen iskelede daha koyu bir boyanma gerçekleşmiştir (Şekil 4.24). 3-boyutlu sistemlerde yapılan fotostimülasyon çalışmalarında matris mineralizasyonunu göstermek için çeşitli yöntemler denenmiştir. Mercan iskeleler ile yapılan çalışmada, fotostimülasyonun, Alizarin red boyama ile gösterilen kalsiyum sentezini ve von Kossa boyama ile gösterilen fosfat depolarının oluşumunu arttırdığı belirlenmiştir [60]. Diğer bir çalışmada, ışığa maruz bırakılan kollajen matrisler, mineralizasyon açısından, Alizarin red ile histolojik olarak boyanarak takip edilmiş ve kontrol grubu ile karşılaştırma yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda, kültürün ilerleyen günlerinde, mineralizasyonun kontrol grubunda yavaş bir şekilde arttığı, ancak ışık uygulanan grupta bu artışın katlanarak gerçekleştiği belirtilmiştir [202].



Şekil 4.24. Fotostimülasyon çalışmaları kapsamında, AdMSC kültüre edilen kitosan doku iskelelerinin, von Kossa boyamaları (sol taraf kontrol grubu, sağ taraf fotostimülasyon grubu).

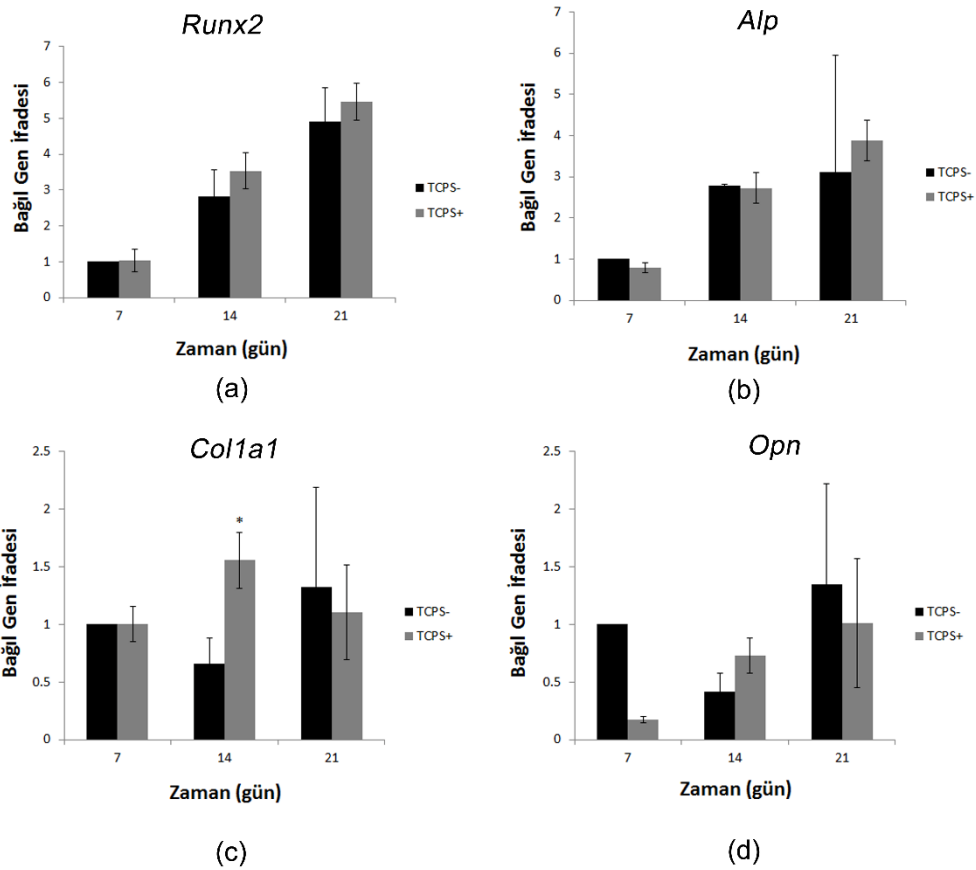
4.3.2.4. Gen ekspresyonunun belirlenmesi

Kök hücrelerin, kemik oluşumundan sorumlu öncül hücrelere dönüşme potansiyeli moleküler mekanizmalarca kontrol edilmektedir. Osteoprogenitör hücrelerin olgunlaşmasında bazı anahtar moleküller görev almaktadır. Örneğin *Cbfa-1* ve *c-fos*, osteogenez için gerekli transkripsiyon faktörleridir [206]. *Cbfa-1*, runt-ilişkili transkripsiyon faktör 2 olarak da bilinmektedir (*RUNX2*). Öncül hücrelerden olgunlaşan osteoblastların gerçekleştirdiği kemik oluşumu, iki temel süreç ile karakterize edilmektedir. İlk olarak, osteoblastların farklılaşmasında görev alan, kollajen tip I, alkalın fosfataz (ALP), osteopontin (OPN), kemik sialoproteini (BSP), osteokalsin (OCN) gibi kemiğe özgü ECM proteinlerini kodlayan genler eksprese olur. İkinci aşamada ise, matriste Ca ve P depolanması ile ECM mineralizasyonu gerçekleşir. Kemik matris proteinleri öncelikle osteoblastlarca sentezlenir ve kemik oluşumu sırasında ECM'ye salınarak, olgun kemik matrisini oluşturur. Genellikle, kemik oluşumu sırasındaki, kemik matris proteinlerinin ECM'de birikimi, Ca depolanması ile gerçekleşen matris mineralizasyonu ile orantılıdır. Tüm kemik oluşumunu kapsayan periyotta, kemiğe özgü genlerin ekspresyonu, oldukça organize bir şekilde ve zaman bağlı bir profil izleyerek gerçekleşir. Bu periyot sırası ile, proliferasyon, matrisin olgunlaşması ve matris mineralizasyonu basamaklarını içerir. Tüm bu genlerin transkripsiyonu, temel olarak *RUNX2* tarafından kontrol edilir [207]. Fotostimülasyon çalışmalarında, osteojenik farklılaşmanın değerlendirilmesi için, *Runx2*,

Alp, *Col1a1* ve *Opn* ekspresyon seviyeleri gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ile belirlenmiştir.

TCPS yüzeylerdeki osteojenik genlerin ifadesi Şekil 4.25'te verilmiştir. *Runx2* ekspresyonu incelendiğinde gruplar arasında anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür. İlk günler ile karşılaştırıldığında, *Runx2* ekspresyonu, kültür sonuna kadar her iki grupta da artış göstermiştir. *Alp* çoğunlukla hücre yüzeyinde bulunan bir glikoproteindir ve mineralizasyonda görev almaktadır ve ekspresyonu erken dönem osteojenik farklılaşma için gereklidir [206]. RT-PCR sonuçları doğrultusunda, fotostimülasyonun *Alp* ekspresyonunu etkilemediği görülmüştür. *Alp* ekspresyonu, her iki grupta da, 7. günden 14. güne gelindiğinde artış göstermiştir. Kültürün sonunda ise *Alp* ekspresyon seviyesinin neredeyse aynı kaldığı belirlenmiştir. Yapılan bir çalışmada, hücrelerdeki *Alp* aktivitesinin hücre yoğunluğunun bir fonksiyonu olduğu belirtilmiştir [206]. TCPS yüzeylerde, hücrelerin MTT grafiklerinde büyük bir artış görülmediğinden, *Alp* ekspresyonunun, belli bir noktadan sonra sabit kalması beklenen bir sonuçtur. Hücrelerin, çoğalmaları, farklılaşmaları ve canlılıklarını devam ettirebilmeleri için matrisle sıkı bir etkileşim halinde olmaları gerekmektedir. Kollajen tip I kemiğin organik kısmını oluşturan en önemli proteindir ve ekspresyonu-sentezi mineralizasyon açısından kritik bir önem taşımaktadır. Hücrelerin kollajene bağlanması integrin proteinleri aracılığı ile gerçekleşmektedir ve bu bağlanma kinaz sinyal yolları üzerinden hücre proliferasyonu ve kemik büyümesini uyarmaktadır [208]. Fotostimülasyon uygulaması, 2. haftanın sonunda, *Col1a1* ekspresyonunu, kontrol grubuna göre anlamlı derecede artırmıştır. Çalışmalarda ışık kaynağı olarak tercih edilen plazma ark sistemi, klinik uygulamalarda deri yenilenmesi amacıyla kullanılmakta ve dokuların doğal kollajen üretimini arttırdığı bilinmektedir. Peng ve Wu, 620 nm dalga boyunda ışık kullanarak yaptıkları fotostimülasyon çalışmasında, ışık uygulanan mezenkimal kök hücrelerde tip I kollajen sentezinin arttığını belirlemişlerdir [104]. Kim ve ark., 10, 30 ve 90 s ışığa tabi tuttıkları mezenkimal kök hücrelerde, tip I kollajen sentezinin, sırasıyla, %132, %158 ve %137 oranında arttığını görmüşlerdir [58]. Kollajenin, ECM bütünlüğünü sağlamanın yanında, hücre apoptozunu da önlediği düşünülmektedir. Hücreler kollajenöz matris üzerinde yapışıp yayılmaktadır. Kollajen üretimi yeterli olmadığında, yapışma ile ilişkili sinyaller oluşmamakta ve hücre içi Ca seviyesi aşırı derecede artmaktadır. Bunun sonucunda da Ca iyonları çeşitli metabolik yollara sinyaller göndermekte, sitosolik Ca miktarının artışıyla, Ca-bağımlı endonükleazlar aktive olmaktadır. Apoptotik fenotip olarak adlandırılan bu bir dizi olayı, DNA'nın bozunması ve apoptoz takip etmektedir [209, 210].

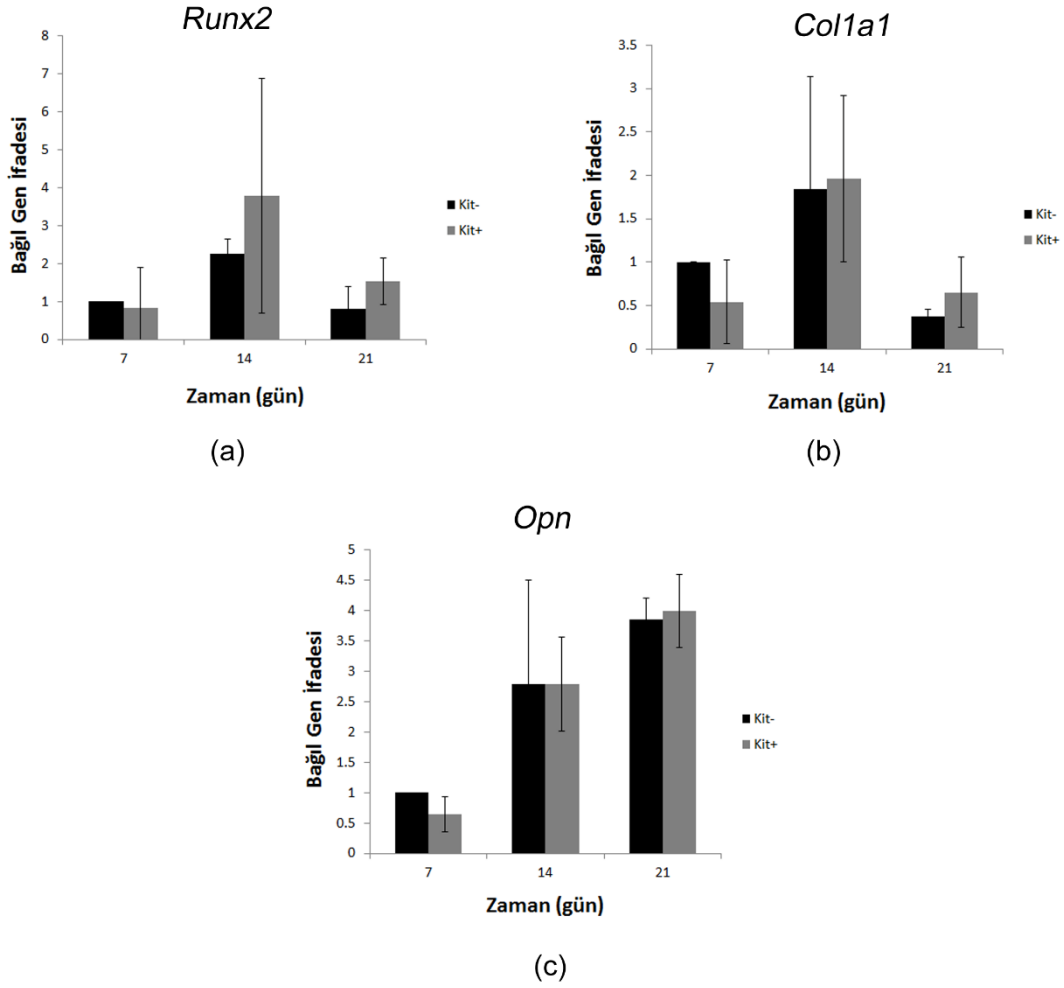
Optik mikroskop fotoğraflarında, fotostimülasyon uygulaması ile birlikte, hücre canlılığının daha uzun sürdüğü belirlenmiştir. Bu durumun, ışığın apoptotik genler üzerindeki etkisi yanında, artan kollajen ekspresyonu ile de ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Osteopontin fosforile bir glikoproteindir ve kalsifiye matrise bağlanarak, doku adezyonu için gerekli organik ve inorganik fazları bir arada tutar. Ca iyonlarına ve hidroksiapatite afinitesi olduğu düşünülmektedir, matrisin olgunlaşma süreci boyunca eksprese olur [211, 212]. *Opn* ekspresyonu kontrol grubunda, 7. günden sonra düşüş gösterirken, fotostimülasyon uygulamasında 14. güne kadar artmıştır. Gruplar arasında, *Opn* ekspresyonu açısından anlamlı bir fark bulunamamıştır.



Şekil 4.25. Fotostimülasyon çalışmaları kapsamında, TCPS yüzeylerde kültüre edilen AdMSC’lerin bağıl gen ifadeleri; (a) *Runx2*, (b) *Alp*, (c) *Col1a1* ve (d) *Opn* (TCPS-; ışık uygulanmayan kontrol grubunu, TCPS+; ışık uygulanan grubu temsil etmektedir). İstatistiksel olarak anlamlı farklılık; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, $n=3$.

Kitosan doku iskeleleri ile yürütülen fotostimülasyon çalışmalarında da, aynı gen ifadeleri üzerinden, osteojenik farklılaşma değerlendirilmiştir (Şekil 4.26). Doku iskeleleri üzerinde

kültüre edilen AdMSC'lerde, gerek kontrol gerekse fotostimülasyon grubunda, *Alp* ekspresyonuna rastlanmamıştır. Bu durumun primer ile ilgili bir sorundan kaynaklandığı düşünülmektedir. *Runx2* ve *Col1a1* ekspresyonları, maksimum seviyesine 14. günde ulaşmış ve kültürün sonuna doğru azalma göstermiştir. Fotostimülasyon grubu ile kontrol grubu arasında, bu genlerin ekspresyonu açısından anlamlı bir fark bulunamamıştır. *Opn* ekspresyonu, her iki grupta da, kültür boyunca artış göstermiştir. Ancak fotostimülasyonun *Opn* ekspresyonunu uyardığına dair bir bulguya rastlanmamıştır. Literatürde fotostimülasyonun osteojenik farklılaşma üzerine uyarıcı etkisini ortaya koyan birçok çalışma bulunmakla birlikte, ışık varlığında farklılaşmanın etkilenmediği çalışmalar da mevcuttur [106]. Daha önce grubumuz tarafından gerçekleştirilen fotostimülasyon çalışmasında, aynı ışık kaynağı ve uygulama koşulları MC3T3-E1 preosteoblastik hücreleri üzerinde kullanılmıştır. RT-PCR analizi ile elde edilen *Alp*, *Col1a1*, *Ocn* ekspresyonları ve SEM analizi ile elde edilen kollajen fiber ve mineralizasyon görüntüleri, ışığın, osteojenik farklılaşmayı önemli derecede arttırdığını ortaya koymaktadır [62]. Karu ve ark., ışık etkisinin, dalga boyu, doz gibi ışığa bağlı özellikler yanında hücre kültürü koşullarına bağlı olarak da değişebileceği üzerinde durmuştur. Farklı hücrelerin, aynı parametrelerde uygulanan fotostimülasyona farklı cevaplar verebileceğini vurgulamışlardır [213, 214]. TCPS yüzeyler ve kitosan doku iskeleleri kullanılarak yapılan fotostimülasyon çalışmalarında, ışık, AdMSC hücreleri üzerinde daha çok proliferatif bir etki göstermiştir. TCPS yüzeylerde, aynı zamanda kollajen tip 1 sentezinin de arttığı görülmüştür. Kitosan doku iskelelerinde kollajen sentezi açısından bir fark görülmemesi, hücre tipi yanında, kültürün yapıldığı mikroçevrenin de uygulamanın etkinliğini belirlediğini göstermektedir. Ayrıca, fotostimülasyonun, çeşitli boyamalar ile mineralizasyonu uyardığı belirlense de, bu durum moleküler olarak gösterilememiştir. Yapılan çalışmalar, fotostimülasyon uygulamalarının etkinliğinin, birçok parametreye birden bağlı olduğunu ve bu parametrelerin her uygulama için optimize edilmesi gerektiğini göstermektedir.



Şekil 4.26. Fotostimülasyon çalışmaları kapsamında, kitosan doku iskelelerinde kültüre edilen AdMSC’lerin bağıl gen ifadeleri; (a) *Runx2*, (b) *Col1a1*, (c) *Opn* (kit-; ışık uygulanmayan kontrol grubunu, kit+; ışık uygulanan grubu temsil etmektedir). İstatistiksel olarak anlamlı farklılık; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, $n = 3$.

4.3.3. hMSC’ler ile Yapılan Elektrostimülasyon Çalışmaları

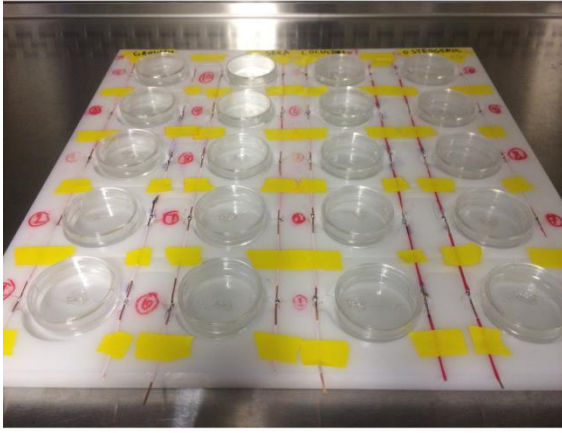
hMSC’ler ile yapılan elektrostimülasyon çalışmaları, 2- ve 3-boyutlu sistemler olmak üzere iki kısımda incelenmiştir. Öncelikle ipek filmler kullanılarak, elektriksel alan varlığında hMSC’lerin osteojenik farklılaşması incelenmiş, çeşitli optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Daha sonra ipek doku iskelelerinin üzerinde hMSC’lerin kültürü yapılmış ve elektriksel alan yanında, hücre membranındaki iyon kanallarını etkileyen kimyasallar kullanılmıştır. Böylece yaratılan eksternal ve internal alanın hMSC’lerin osteojenik farklılaşması üzerindeki sinerjik etkisi belirlenmiştir.

4.3.4. İpek Filmler ile Elektrostimülasyon Çalışmaları

2-boyutlu sistemlerde elektrostimülasyon çalışmaları ipek filmler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla platin tel içeren ipek filmler üretilmiş ve Petri kaplarına yerleştirildikten sonra hMSC'lerin ekimi yapılmıştır. Daha sonra filmler, platin teller aracılığı ile alternatif akım üreten sisteme paralel olarak bağlanmıştır. Doğrudan akım üreten sistemlerde, elektrotlardan kaynaklanan toksisite sorunları, ortam pH'sındaki değişimler, moleküler oksijen seviyesindeki düşüş ve ROS gibi yan ürünlerin oluşması, uygulamanın dezavantajlarını oluşturmaktadır [215]. Bu dezavantajlardan korunmak için tercih edilen bir diğer yöntem de alternatif akımdır. Alternatif akım kapasitif bağlantı ve indüktif bağlantı olmak üzere iki şekilde uygulanabilir. Kapasitif bağlantılı alternatif akımın en büyük dezavantajı, yüksek voltaj kaynağı kullanımına ihtiyaç duyulmasıdır ($>1000V$). Bunun nedeni, elektriksel alanın, havadan ve kültür kabından geçerken, karşılaştığı direnç neticesinde, hücrelere ulaşana kadar zayıflamasıdır. Örneğin 2 pik arasındaki büyüklük, 100 V olduğunda, hücrelere ulaşan voltaj sadece $100 \mu V$ 'dir [216]. Bu nedenle alternatif akımın doğrudan uygulandığı sistemler bulunmaktadır. Bu sistemlerde elektrotlar, kültür ortamı içerisine yerleştirilmiş olup, hücreler ile doğrudan temas halindedir. Elektrot seçiminde yük transferi, korozyon özellikler, biyouyumluluk gibi parametreler göz önünde bulundurulmaktadır [132, 217]. Literatürde TCPS yüzeylerde uygulanan bu sistem, tez çalışması kapsamında ipek filmlere taşınmış ve bu amaçla platin teller, birbirine paralel olarak ipek film içerisine yerleştirilmiştir. Böylece oluşan akımın hücreler üzerinde homojen olarak dağılması sağlanmıştır [218]. Kurulan sistemde, elektrot görevi gören platin teller kültür ortamıyla doğrudan temas halinde olduğundan, elektrot-elektrolit arayüzeyinde, elektriksel akım iyonik akıma dönüştürülmekte ve hücresel aktivitelerde değişiklikler meydana gelmektedir [219]. Şekil 4.27'de elektrostimülasyon çalışmasında kullanılan ipek filmlerin genel görüntüleri verilmiştir.

İskelet sistemi ve kardiyak sistem ile yapılan çalışmalarda genellikle alternatif akım tercih edilmektedir. Yapılan bir çalışmada, hücresel kısımlarından arındırılan fare kası üzerinde C2C12 hücrelerinin kültürü gerçekleştirilmiş ve 40V, 40 Hz koşullarında elektrostimülasyon uygulaması yapılmıştır. Farklılaşan hücrelerden oluşan miyotübün, boylamasına, $17.3 \pm 1.2 \mu N$ düzeyinde kasıldığı belirlenmiştir. AC'nin kullanıldığı diğer bir çalışmada, miyoblastlar 3-boyutlu poliglikolik asit doku iskeleleri üzerinde kültüre edilmiş ve 1.54 mA, 564 mV/cm olmak üzere, kardiyak dokudakine benzer bir akıma maruz bırakılmıştır. Kültürün 14. günü

proliferasyon 2 katına çıkmasına rağmen, farklılaşma üzerinde bir uyarıcı etkiye rastlanmamıştır [219].



(a)



(b)

Şekil 4.27. Elektrostimülasyon çalışmalarında kullanılan, platin tel içeren ipek filmlerin (a) kuru haldeki ve (b) kültür ortamı içerisindeki genel görüntüleri.

Literatürde kapasitif bağlantının kemik ve kıkırdak hücreleri ile birlikte kullanıldığı çeşitli çalışmalar mevcuttur. Bu çalışmalarda, 60 kHz ve 20 mV/cm parametreleri kullanılmıştır. Sonuçlar doğrultusunda, ECM üretiminde, agregan ve kollajen gen ekspresyonunda, osteoindüktif BSP ve ALP aktivitesinde artış meydana gelmiştir [220-222].

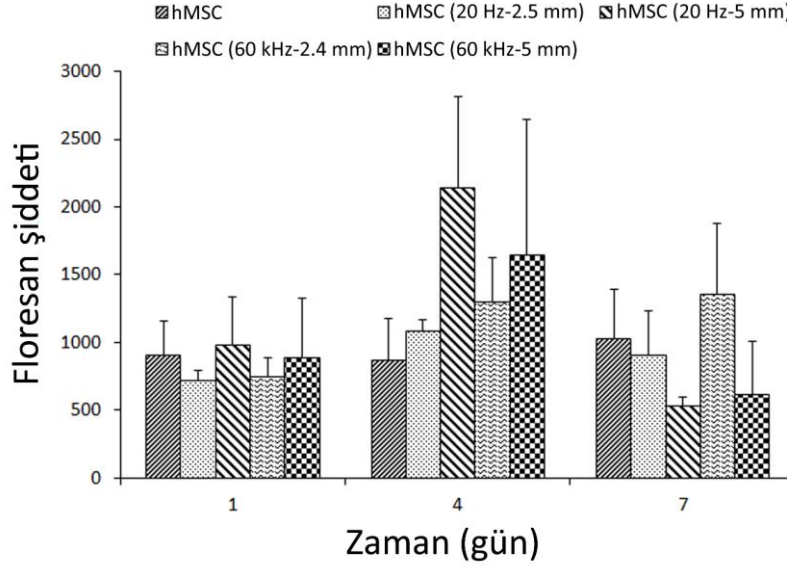
4.3.4.1. Optimizasyon çalışmaları

Kapasitör bağlantılarda, elektrotlar genellikle, doku ya da kültür ortamından izole durumdadır. Bu nedenle, elektrokimyasal reaksiyonların oluşturacağı sorunlar ortadan kalkmaktadır. Bir sisteme voltaj uygulandığında, iki elektrot arasındaki potansiyel fark elektriksel alanı oluşturur. Alternatif akımda, doğru akımdan farklı olarak, iki elektrot arasındaki polarite sürekli olarak değişmekte ve böylece alternatif bir elektriksel alan oluşmaktadır [218]. Kapasitör bağlantılı elektriksel alanın osteoblastların proliferasyonunu, farklılaşmasını ve ECM sentezini arttırdığı gösterilmiştir. Yapılan bir çalışmada, sıçan embriyosundan izole edilen kemik hücreleri, alternatif akıma tabi tutulmuştur. Uygulanan parametreler 12-54 V/cm ve 3-100 Hz arasında değiştirilmiştir. Ayrıca hücrelerin kültüre edildiği ortama, radyoaktif işaretli ^{45}Ca eklenmiştir. Elektriksel alan varlığında Ca'nın hücre içine alımının arttığı gözlenmiştir. Sıçan kemik hücreleri ile yapılan bir diğer çalışmada, 2.62 mV/cm elektriksel alan 2.5-30 dk olmak üzere farklı sürelerde uygulanmış ve cAMP oluşumunun %59 oranında arttığı belirlenmiştir [218]. Wiesmann ve ark., 6-21 kV/m

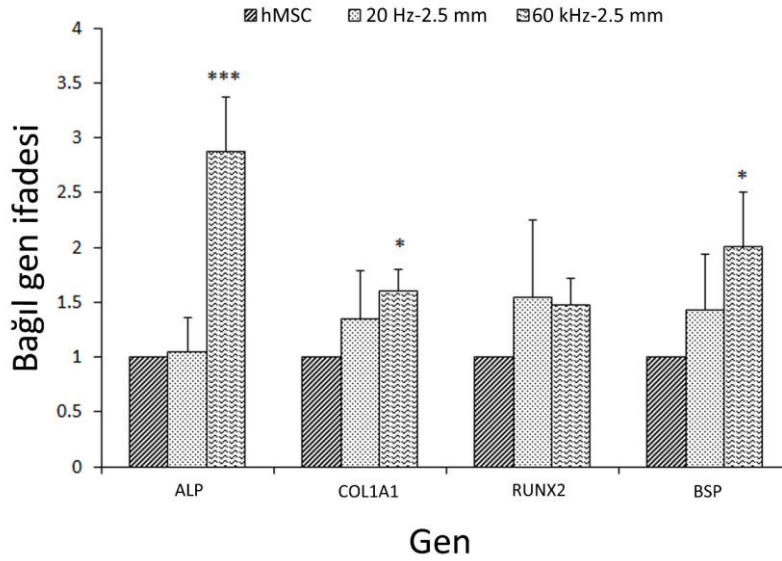
elektriksele alanı osteoblast benzeri hücrelere uygulamışlardır. Oluşan sinyalin genişliği 63 ms ve frekansı 16 Hz olarak belirtilmiştir. Uygulanan elektriksele alanın yeni mineralize kristal oluşumunu uyardığı belirtilmiştir [223]. Wang ve ark., 44.81 V, 60 kHz parametrelerini kullandıkları elektrostimülasyon çalışmasında, 30 dk'lık uygulamadan sonra, kondrositlerde agregan ve tip II kollajen ekspresyonlarının arttığını tespit etmişlerdir [221]. Elektrostimülasyon çalışmalarında, uygulamanın etkinliğini değiştiren en önemli parametreler; uygulanan voltaj, frekans ve elektrot mesafesidir.

Frekans ve elektrotlar arasındaki mesafenin belirlenmesi

Optimizasyon çalışmaları kapsamında öncelikle 10 mV elektrik varlığında, farklı frekans ve elektrot mesafeleri denenmiştir. İnsan osteoblastları ile yapılan bir çalışmada, günde 2 sa, 60 kHz, 20 mV elektriğe maruz bırakılmış ve uyarılan hücrelerde, *BMP-1*, *-4*, *TGF-β1*, *-β2*, *-β3*, *OCN* ve *ALP* ekspresyonlarının arttığı belirlenmiştir [224]. 15 V ve 20 Hz'de yapılan bir diğer çalışmada ise elektriksele alan varlığında uyarılan hücrelerin proliferasyonlarının yanında hücre içi Ca birikiminin de arttığı gösterilmiştir [114]. Hartig ve ark., 100 V ve 16 Hz kullanarak yaptıkları elektrostimülasyon çalışmasında, hem proliferasyonun hem de ECM proteinlerinin sentezinin arttığını belirlemişlerdir [225]. Literatürde kullanılan frekans değerleri göz önünde bulundurularak, elektriksele sinyalin frekansı, 20 Hz ve 60 kHz olarak seçilmiştir [226, 227]. Elektrot mesafesi ise 2.5 mm (0.004 V/mm) ve 5 mm (0.002 V/mm) olarak değiştirilmiştir. Optimizasyon çalışmaları kapsamında seçilen parametreler, 7 gün boyunca, günde 1 sa uygulanmış, hücre proliferasyonu ve farklılaşması üzerinden değerlendirilme yapılmıştır. Hücre proliferasyonu, 7 gün boyunca Alamar blue ile takip edilmiştir. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda, gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmamakla birlikte, elektrot mesafesi 2.5 mm olan gruplarda, en yüksek floresan şiddetine ulaşıldığı görülmüş ve bu gruplarda, kontrol grubu ile karşılaştırılmalı olarak, RT-PCR analizinin yapılmasına karar verilmiştir (Şekil 4.28).



Şekil 4.28. Farklı frekans ve elektrotlar arasındaki mesafe değerlerinin hücre proliferasyonuna etkisi. İstatistiksel olarak anlamlı farklılık; * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, $n=3$.



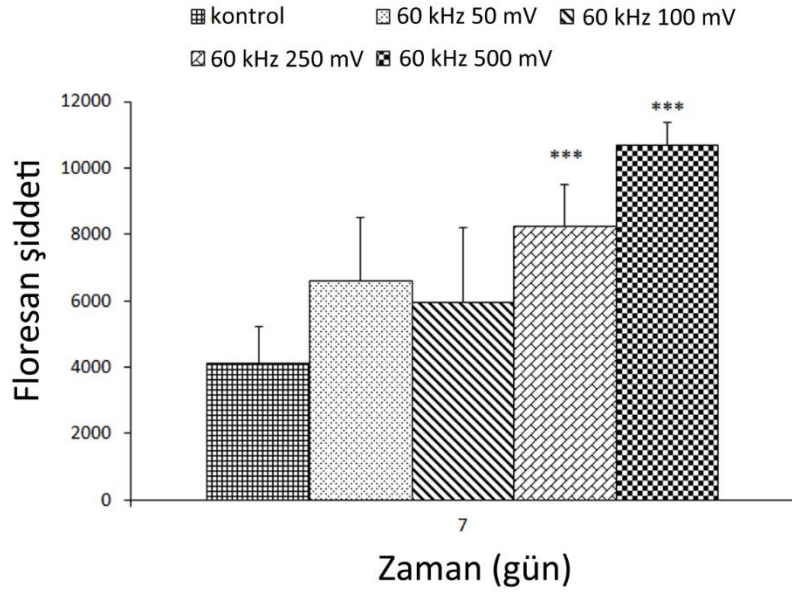
Şekil 4.29. Kültürün 7. gününde, farklı frekans ve elektrotlar arasındaki mesafe değerlerinin hücre farklılaşmasına etkisi. İstatistiksel olarak anlamlı farklılık; * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, $n=3$.

RT-PCR çalışmasında, erken ve orta dönem farklılaşmanın işaretleri olan *RUNX2*, *ALP* ve *COL1A1* ekspresyonlarına bakılmıştır. Ayrıca hücrelerde mineralizasyonun başlayıp başlamadığı *BSP* ekspresyonu ile kontrol edilmiştir. Gen ekspresyon seviyelerine

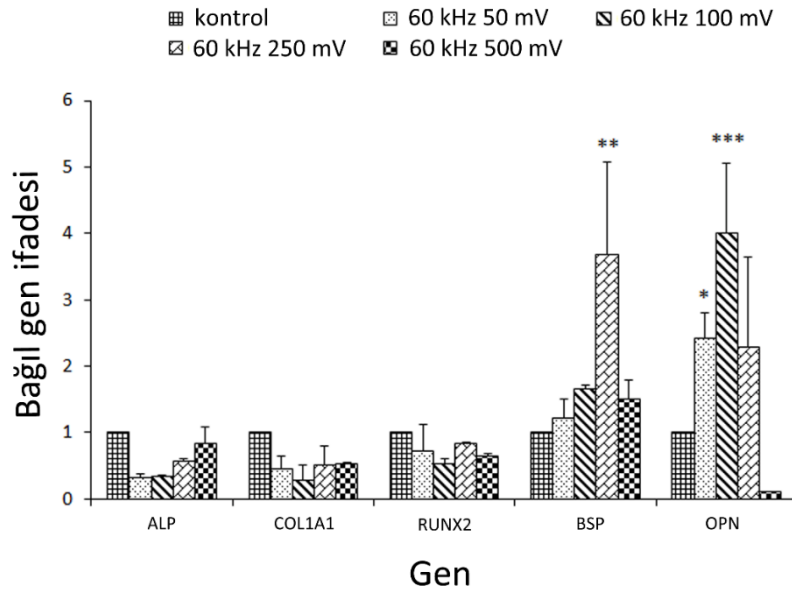
bakıldığında, *RUNX2* ekspresyonu açısından gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır. 60 kHz elektrik uygulanan gruplarda, *ALP* ekspresyonu, diğer gruplara göre anlamlı derecede artmıştır. *COL1A1* ekspresyonu, 20 Hz ve 60 kHz olmak üzere, elektrik uygulanan her iki grupta da, kontrol grubuna göre artış göstermiştir. Kültürün erken dönemi olmakla birlikte, tüm gruplarda *BSP* ekspresyonu başlamış ve en yüksek ekspresyon seviyesinin 60 kHz elektrik uygulanan grupta olduğu görülmüştür (Şekil 4.29). Hronik-Tupaj ve ark., benzer şekilde, 60 kHz frekans kullanarak uyguladıkları 20 mV/cm elektriksel alan varlığında, mezenkimal kök hücrelerin proliferasyonlarında, kontrol grubuna göre, bir fark gözlemezken, *ALP* ve *COL1A1* ekspresyonunun arttığını belirlemişlerdir [132]. Sun ve ark., elektrostimülasyonun hücre büyümesine ve morfolojisine etkisi olmadığı ancak *ALP* ve *COL1A1* ekspresyonunu arttırarak farklılaşmayı uyardığı sonucuna varmışlardır [130]. Elektriksel sinyallerin, hücresel aktiviteler üzerindeki temel etkisinin Ca^{+2} sinyal yolları üzerinden olduğu düşünülmektedir. Elektriksel uyarı ile ECM'deki kalsiyumun hücre içine akışı gerçekleşmekte, bu durum başta kalmodulin, kalsinörin gibi sinyal yollarını uyarmaktadır. Oluşan sinyaller nükleusa ulaşmakta ve ilgili genlerin transkripsiyonu başlatılmaktadır [224].

Voltaj optimizasyonu

Frekans ve elektrot mesafesiyle ilgili yapılan optimizasyon sonuçları, hücre farklılaşması açısından en etkin sonuçların, 60 kHz frekans ve 2.5 mm elektrot mesafesinde elde edildiğini göstermiştir. Bu parametreler kullanılarak yüksek voltajlara çıkılmış ve uygulanan voltajın hücresel aktiviteler üzerindeki etkisi incelenmiştir. Hücreler üzerine 7 gün boyunca, günde 1 sa, 50, 100, 250 ve 500 mV elektrik uygulanmıştır. Düşük voltajın aksine yüksek voltajın hücre proliferasyonunu arttırdığı belirlenmiştir. 250 ve 500 mV elektrik uygulanan gruplarda en yüksek proliferasyon değerine ulaşılmıştır (Şekil 4.30). Elektriğin proliferasyon üzerindeki etkisi, çeşitli sinyal yollarının yanında, yüzeydeki absorpsiyon miktarının değişimine de bağlanmaktadır. Elektriksel alan varlığında, hücre yapışmasında görev alan vitronektin, fibronektin gibi proteinlerin, daha etkin bir şekilde yüzeye absorblandığı belirlenmiştir. Bu durum yüzeye yapışan hücre sayısını ve dolayısıyla, hücre proliferasyonunu arttırmaktadır [114].



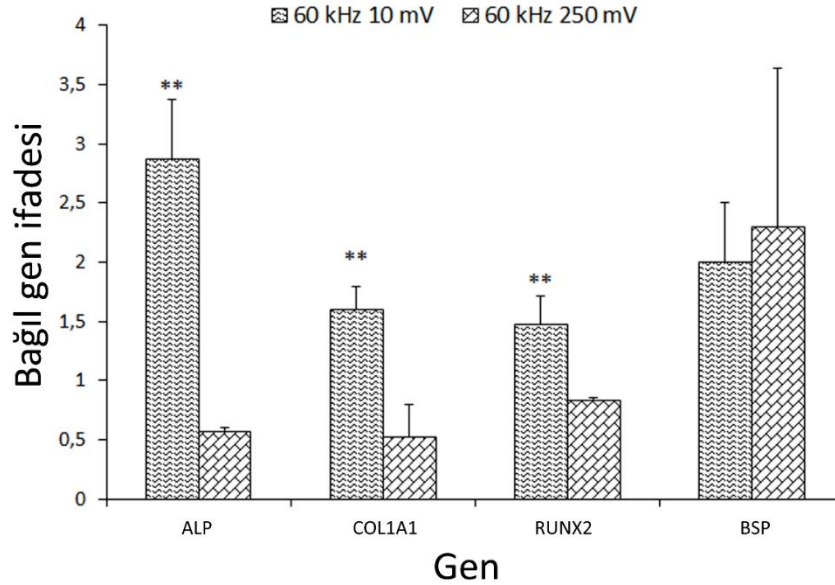
Şekil 4.30. Farklı voltaj değerlerinin hücre proliferasyonuna etkisi. İstatistiksel olarak anlamlı farklılık; * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, $n=3$.



Şekil 4.31. Farklı voltaj değerlerinin, kültürün 7. gününde hücre farklılaşmasına etkisi. İstatistiksel olarak anlamlı farklılık; * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, $n=3$.

RT-PCR analizi ile elde edilen sonuçlar da, düşük voltaj ile karşılaştırıldığında oldukça dikkat çekicidir. Yüksek voltaj varlığında, *RUNX2*, *ALP* ve *COL1A1* ekspresyonlarının seviyesinde herhangi bir değişiklik meydana gelmemiştir. Ancak geç dönem osteojenik farklılaşma genlerinden olan *BSP* ve *OPN* ekspresyonu elektriksel alan varlığında artmıştır.

250 mV elektrik uygulanan gruplarda *BSP* ekspresyonu en yüksek seviyeye çıkmıştır. 50 ve 100 mV elektriğin ise *OPN* seviyesini, kontrol grubuna göre arttırdığı tespit edilmiştir. En yüksek proliferasyon seviyesine sahip olan 500 mV grubunda ise *OPN* seviyesi, kontrol grubuna göre inhibe olmuştur (Şekil 4.31). Kim ve ark., 3000 Hz, 15 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ elektriksel alan kullandıkları çalışmada, hMSC'lerin proliferasyonunda artış tespit ederken, *ALP*, *OPN*, *COL1A1*, *BMP-2*, *-4*, *IGF-2* ve *TGF- β 1* seviyelerinde değişiklik olmadığını belirtmişlerdir. Yaptıkları diğer bir çalışmada ise, frekansı 100 Hz'e düşürmüşler ve artan proliferasyonun yanında osteojenik farklılaşmanın uyarılmadığını göstermişlerdir [128, 228]. Düşük ve yüksek voltaj varlığında gen ekspresyon seviyeleri, Şekil 4.32'de karşılaştırılmıştır. Düşük voltaj altında, erken ve geç dönem olmak üzere tüm osteojenik genlerin ekspresyonları uyarılırken, yüksek voltajın sadece geç dönem osteojenik farklılaşma genleri üzerinde etkisi olduğu görülmüştür.

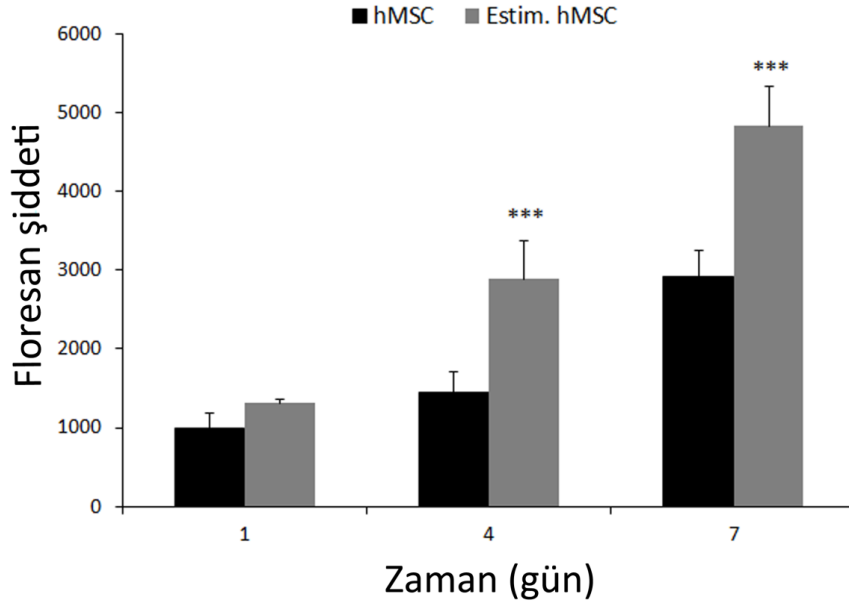


Şekil 4.32. Kültürün 7. günü, yüksek ve düşük voltaj altında bağıl gen ifadelerinin karşılaştırılması. İstatistiksel olarak anlamlı farklılık; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, $n=3$.

Farklı kültür ortamlarının etkisinin incelenmesi

Frekansın, elektrot mesafesinin ve voltajın belirlendiği optimizasyon çalışmalarında, dekzametazon, β -gliserol fosfat ve askorbik asit içeren, osteojenik farklılaşma ortamı kullanılmıştır. Kültür ortamı içeriğinin, elektriksel alana karşı oluşturulan hücresel cevapta bir etkisi olup olmadığını araştırmak için hMSC'ler, aynı zamanda, büyüme ortamı (%10 (v/v) FBS, %1 (v/v) antibiyotik içeren α -MEM) içerisinde de kültüre edilmiştir. Büyüme

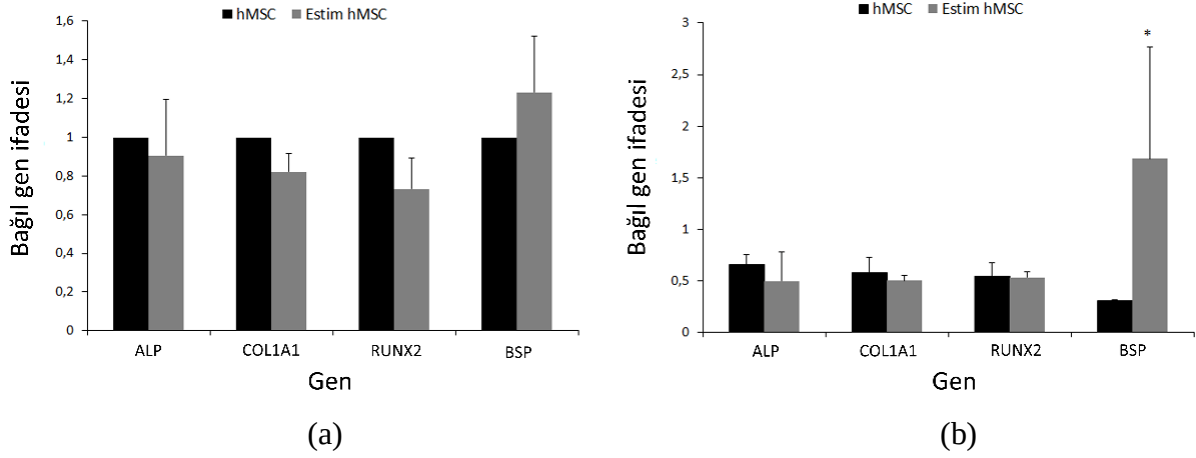
ortamı içerisinde bulunan hücelere, optimizasyon çalışmaları doğrultusunda, 60 kHz frekansta 10 mV elektrik uygulanmıştır. Kullanılan elektrot mesafesi 2.5 cm'dir. Şekil 4.33'te verilen Alamar blue analizleri, büyüme ortamı içerisinde, hücre proliferasyonunun, elektriksel alan varlığında arttığını göstermektedir.



Şekil 4.33. Elektrostimülasyonun, büyüme ortamı içerisinde, hücre proliferasyonuna etkisi (hMSC; kontrol grubu, Estim. hMSC; elektrostimülasyon grubu). İstatistiksel olarak anlamlı farklılık; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, $n=3$.

RT-PCR analizi ile elde edilen sonuçlar, kültürün 7. gününde, gen ekspresyonu açısından, gruplar arasında herhangi bir farka işaret etmemektedir (Şekil 4.34 a). Bu durum osteojenik farklılaşma ile elde edilen sonuçların tam tersidir. Yapılan araştırmalar, elektriksel alanın hücre iskeleti organizasyonunu değiştirerek, hücreler üzerinde mekanik bir etki yarattığını göstermektedir. Titushkin ve ark., yaptıkları çalışmada, hMSC'ler ve osteoblastlar üzerine 2V/cm elektriksel alan uygulamışlardır. Uygulama sonrasında, her iki hücre tipinin de elastik modüllerinin değiştiği ve aktin filamentlerinin yeniden organize olduğu belirlenmiştir. Bu organizasyon, hücre içi Ca^{+2} miktarındaki ve ATP kullanımındaki artışa bağlıdır. Titushkin ve ark. azalan aktin organizasyonu ve membran geriliminin, endositoz ve membran geçişlerini kuvvetlendirdiği hipotezini ortaya koymuşlardır. Dolayısıyla hücreler ortamda bulunan çözünür faktörlerden daha çok faydalanabilmektedir. Yapılan çalışmada, elektrostimülasyona tabi tutulan hücrelerin, farklılaşma ortamı içerisinde farklılaşmalarının,

büyüme ortamı içerisinde ise proliferasyonlarının artması bu hipotezi desteklemektedir [117, 229].



Şekil 4.34. Elektrostimülasyonun, büyüme ortamında, kültürün (a) 7. ve (b) 14. gününde hücre farklılaşmasına etkisi (hMSC; kontrol grubu, Estim. hMSC; elektrostimülasyon grubu). İstatistiksel olarak anlamlı farklılık; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, $n = 3$.

Büyüme ortamı içerisinde kültüre edilen hücrelerin 14. gün RT-PCR analizleri de gerçekleştirilmiş ve *RUNX2*, *ALP*, *COL1A1* ekspresyonu açısından, gruplar arasında bir fark bulunamamıştır. Ancak, elektriksel alanın, büyüme ortamında dahi, *BSP* ekspresyonunu uyardığı belirlenmiştir (Şekil 4.34 b). *BSP*, başta kemik olmak üzere kalsifiye dokulardaki ECM'nin temel bileşenlerindendir. Apatit kristallerinin oluşumunda çekirdeklenme bölgesi oluşturduğu ve kollajen fiberler boyunca mineralizasyon oluşumunu düzenlediği düşünülmektedir [230]. Literürde yapılan çalışmalarda da, elektriksel alanın özellikle mineralize kalsiyum oluşumu üzerindeki etkilerine vurgu yapılmaktadır. Ancak yapılan çalışmaların büyük bir kısmında osteojenik farklılaşma ortamı kullanılmıştır. Creecy ve ark. büyüme ortamında kültüre ettikleri hMSC'lere 10 μA ve 40 μA elektrik uygulamışlar, *RUNX2*, *OPN* ve *OCN* ekspresyonlarının, uygulanan akımın ve uygulanan sürenin bir fonksiyonu olarak arttığını göstermişlerdir [231]. Literatür çalışmaları ile uyumlu olarak, ipek filmler ile yürütülen elektrostimülasyon çalışmalarında *BSP* ekspresyonu, gerek farklılaşma gerekse büyüme ortamında, yüksek ya da düşük voltaj varlığında, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında artış göstermiştir.

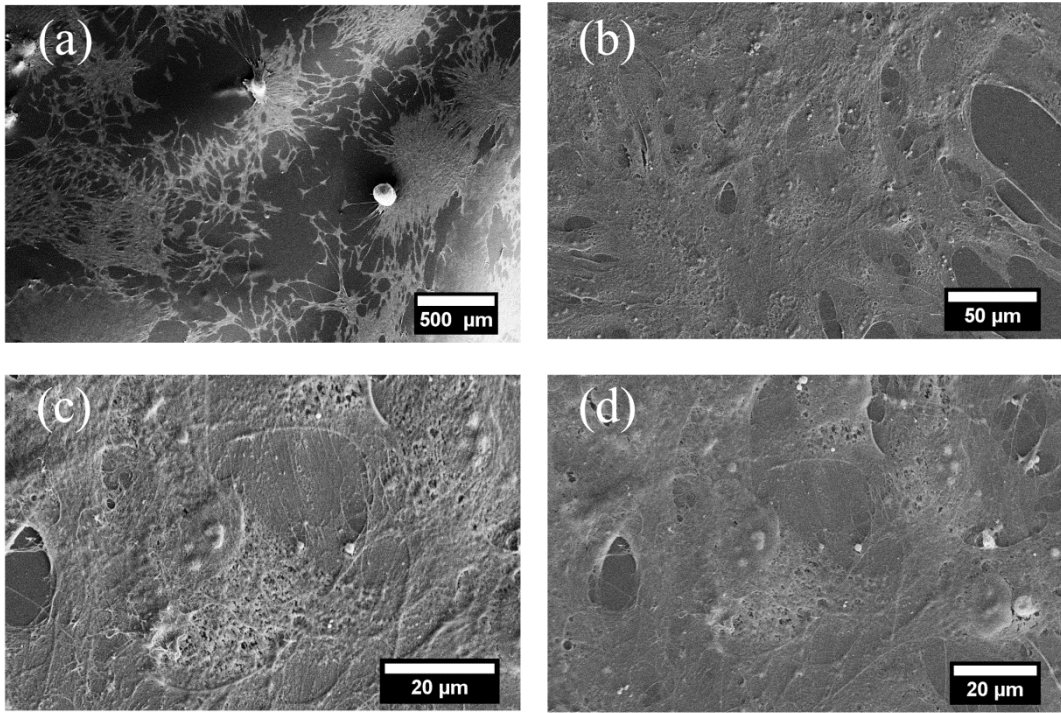
4.3.4.2. Hücre kültürü analizleri

Optimizasyon çalışmalarında, osteojenik farklılaşma açısından, 10 mV elektriksel gerilim, 60 kHz frekans ve 2.5 mm elektrot mesafesi en etkin sonuçları vermiştir. Bu parametreler

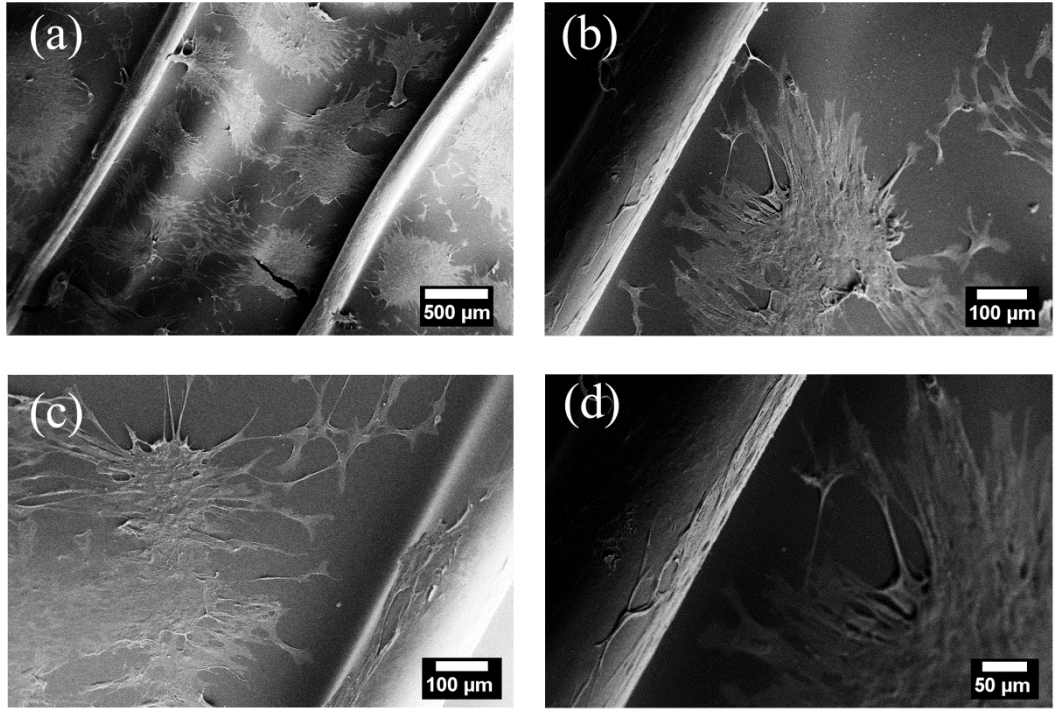
kullanılarak yapılan elektrostimülasyon çalışmalarında, büyüme ve farklılaşma ortamındaki hücrelerin, morfolojik analizleri SEM, matris mineralizasyonları ise Alizarin red boyaması ile belirlenmiştir.

Hücre morfolojisinin belirlenmesi

14. gün yapılan SEM analizleri, büyüme ortamı ve farklılaşma ortamı olmak üzere iki kısımda incelenmiştir. Büyüme ortamı kullanılan gruplarda, hücrelerin, her iki yüzeye de başarılı bir şekilde yapışıp yayıldıkları belirlenmiştir (Şekil 4.35 ve 4.36). Platin tel içeren ipek filmlerde, hücrelerin çeşitli uzantılar ile tellere doğru yöneldikleri belirlenmiştir.

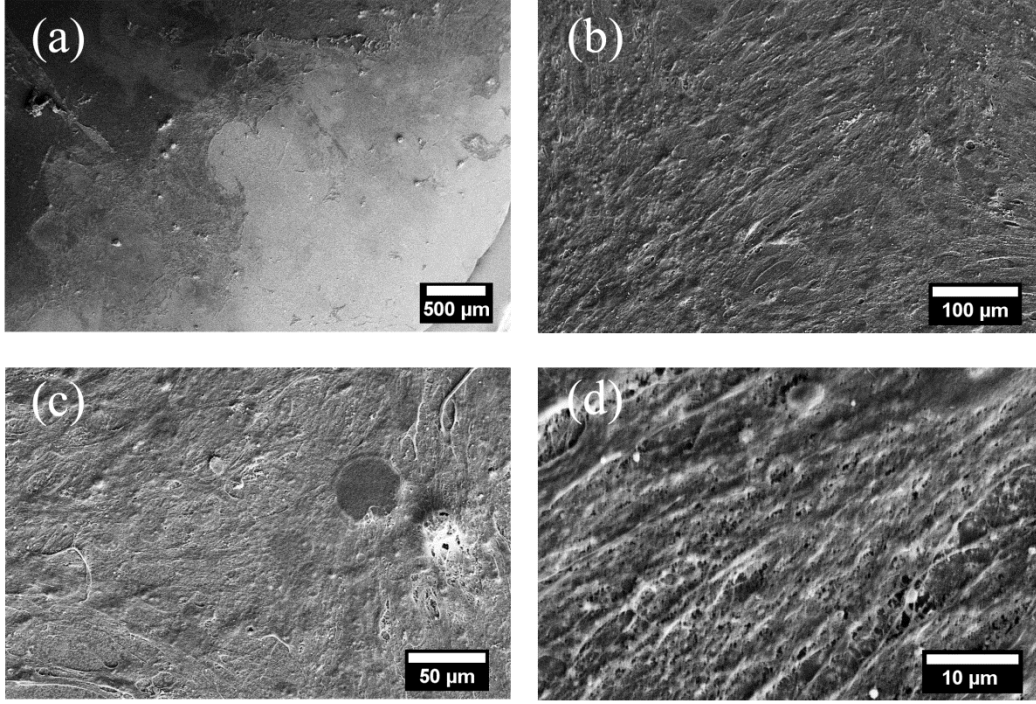


Şekil 4.35. hMSC'lerin kültürün 14. gününde, büyüme ortamı içerisinde, ipek film yüzeyler üzerindeki SEM görüntüleri; (a) , (b) , (c) ve (d).

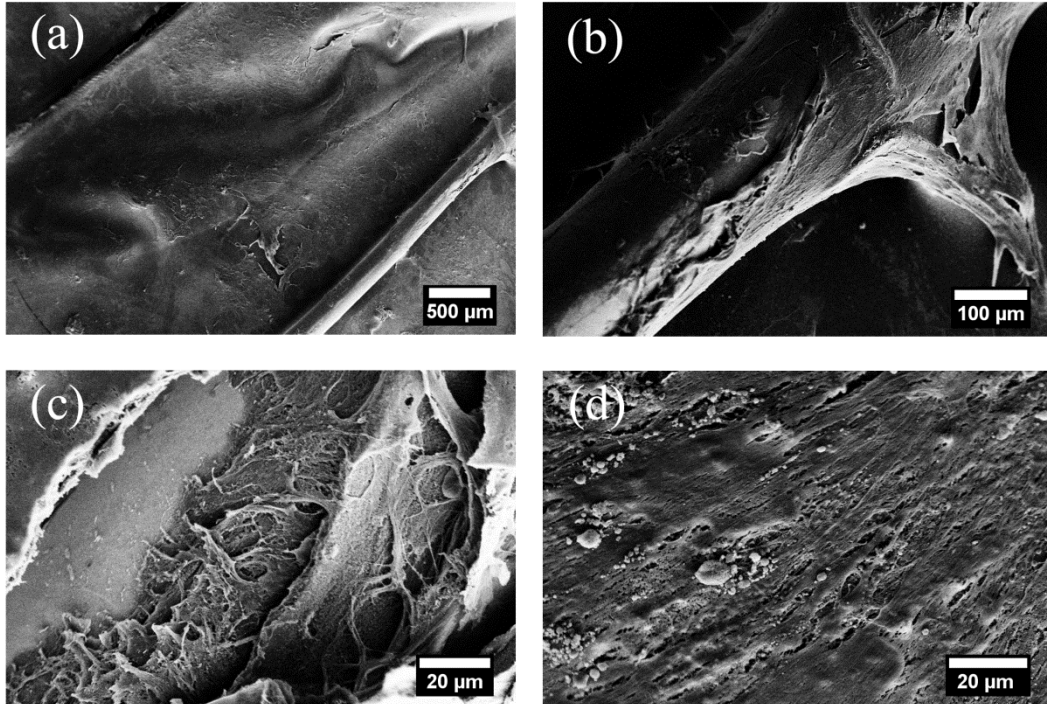


Şekil 4.36. Elektriksel alana maruz bırakılan hMSC'lerin kültürün 14. gününde, büyüme ortamı içerisinde, platin tel içeren ipek film yüzeyler üzerindeki SEM görüntüleri; (a) , (b) , (c) ve (d).

Farklılaşma ortamında ise hücrelerin, her iki grupta da, yoğun bir şekilde filmlerin yüzeyini kapladığı gözlenmiştir (Şekil 4.37 ve 4.38). Elektrostimülasyon uygulanan gruplarda, hücrelerin özellikle elektrotların (platin tellerin) yüzeyini kapladıkları ve burada yoğun bir şekilde ECM sentezledikleri tespit edilmiştir. Elektriksel alan varlığında birçok ECM bileşeninin etkilendiği bilinmektedir. Bu bileşenler; çözünür iyonlar, glikozaminoglikanlarda (GAG) bulunan yüklü gruplar ve proteinler olarak sıralanmaktadır. Proteinlerin elektriksel alan boyunca hareket ederek, hücrelerin membranlarındaki bağlanma bölgelerine ulaştıkları rapor edilmiştir [232]. Ayrıca, elektriksel alan, başta fibronektin olmak üzere birçok serum proteininin elektrotlar üzerine absorbe olmalarını sağlamaktadır [233]. Elektriksel alanın bu etkileri, hMSC'lerin, ipek filmler üzerindeki elektrotlara göç etmelerini, yapışmalarını ve burada çoğalmalarını sağlamıştır.

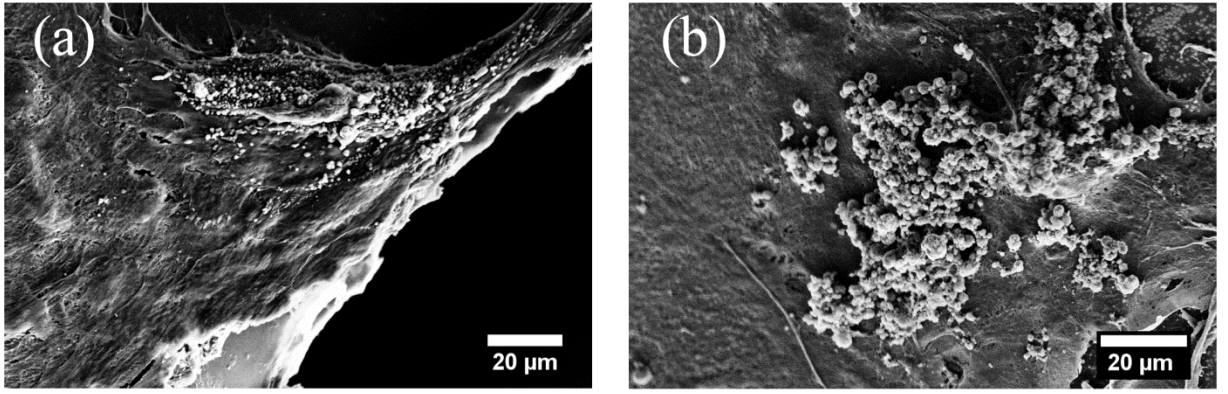


Şekil 4.37. Kültürün 14. gününde, hMSC'lerin, osteojenik farklılaşma ortamı içerisinde, ipek film yüzeyler üzerindeki SEM görüntüleri; (a) , (b) , (c) ve (d).



Şekil 4.38. Elektriksel alana maruz bırakılan hMSC'lerin kültürün 14. gününde, osteojenik farklılaşma ortamı içerisinde, platin tel içeren ipek film yüzeyler üzerindeki SEM görüntüleri; (a) , (b) , (c) ve (d).

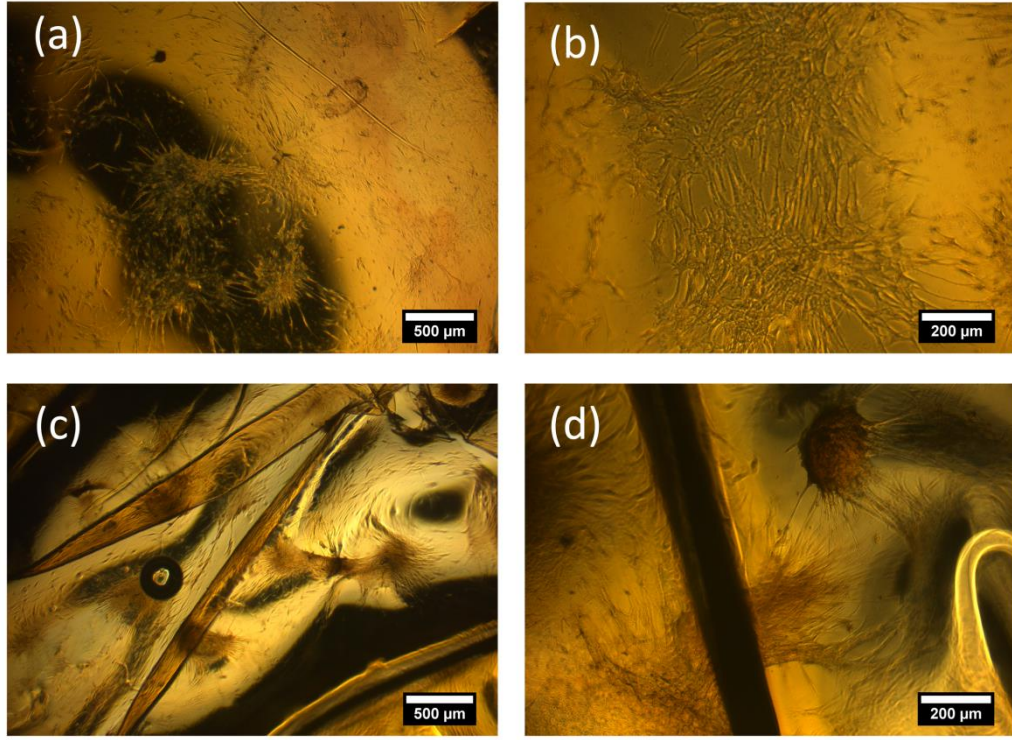
SEM görüntüleri, elektrostimülasyon uygulanan gruplarda, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, yoğun mineralize bölgelerin olduğunu işaret etmektedir (Şekil 4.39). Martino ve ark., SAOS-2 hücrelerine, 15 Hz frekansta, 9 mV/cm elektriksel alan uygulamışlar ve kemik benzeri nodül oluşumunun, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, 2 kat arttığını belirlemişlerdir [234]. Yapılan bir diğer çalışmada ise, 1 Hz ve 1 V/cm uygulanan elektriksel alanın, mineral miktarını, kontrol grubuna göre 2 katına çıkardığı tespit edilmiştir [235]. Literatür ile benzer sonuçları veren SEM görüntüleri, osteojenik farklılaşmayı gösteren RT-PCR verileri ile uyumludur.



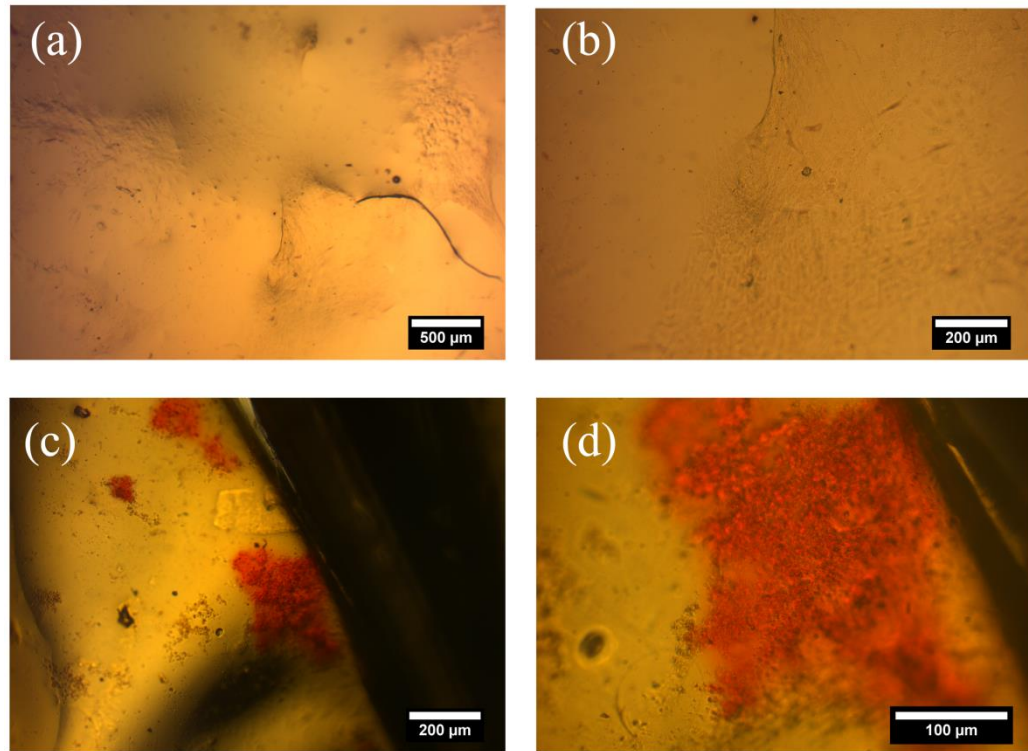
Şekil 4.39. Kültürün 14. gününde, elektrostimülasyon varlığında, hMSC'ler üzerinde oluşan mineralize bölgelerin SEM görüntüleri; (a) ve (b).

Matris mineralizasyonunu belirlenmesi

Matris mineralizasyonunu belirlemek amacıyla, büyüme ortamı ve farklılaşma ortamında, elektrostimülasyona tabi tutulan hücrelere, Alizarin red boyaması yapılmıştır. Büyüme ortamında bulunan hücrelerde yoğun bir boyanma gerçekleşmemekle birlikte, elektriksel alan varlığında bölgesel boyanmalara rastlanmıştır (Şekil 4.40). Farklılaşma ortamında ise Alizarin red boyama öncelikle, kültürün 3. günü yapılmıştır. Kontrol grubunda herhangi bir boyanmaya rastlanmamakla beraber, elektriksel alan varlığında mineralizasyonun, bu erken evrede başladığı görülmüştür. Mineralize bölgelerin özellikle elektrotlara yakın bölgelerde lokalize oldukları tespit edilmiştir (Şekil 4.41). Ercan ve ark., elektriksel alan varlığında, Ca depolarının erken dönemde oluştuğunu belirtmişlerdir [114].

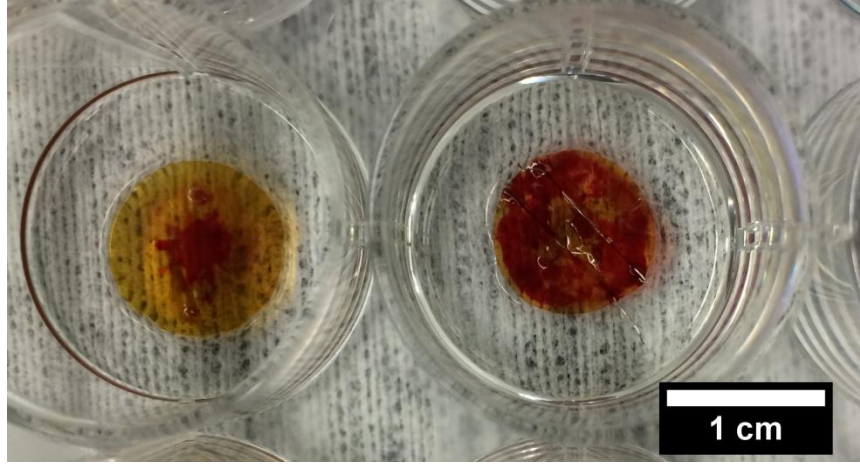


Şekil 4.40. Büyüme ortamında kültüre edilen hMSC'lerin, 14. gün Alizarin red boyamaları; (a) ve (b) kontrol grubu, (c) ve (d) elektrostimülasyon grubu.

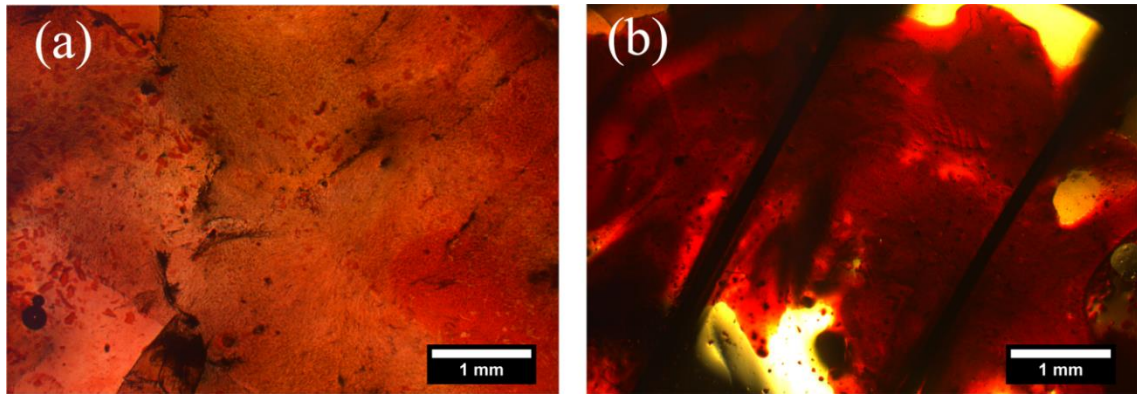


Şekil 4.41. Osteojenik farklılaşma ortamında kültüre edilen hMSC'lerin, 3. gün Alizarin red boyamaları; (a) ve (b) kontrol grubu, (c) ve (d) elektrostimülasyon grubu.

Kültürün 14. gününde yapılan boyamalarda ise, elektrostimülasyon uygulanan gruplarda, mineralizasyona bağlı olarak çok daha koyu bir boyanma gerçekleşmiş ve mineralize bölgelerin film yüzeyini neredeyse kapladığı görülmüştür. Alizarin red boyama yapılan filmlerin genel görüntüsü Şekil 4.42’de ve optik mikroskop görüntüleri ise Şekil 4.43’te verilmiştir.



Şekil 4.42. Alizarin red boyaması yapılan (a) ipek ve (b) platin tel içeren ipek filmlerin genel görüntüsü.



Şekil 4.43. Alizarin red boyaması yapılan (a) ipek ve (b) platin tel içeren ipek filmlerin optik mikroskop görüntüsü.

Supronowicz ve ark., 10 μ A ve 10 Hz’de uyguladıkları elektriğin hücre dışı kalsiyum konsantrasyonunu %307 arttırdığını ortaya koymuşlardır [236]. Yapılan bir diğer çalışmada ise, 1 Hz ve 1 V/cm uygulanan elektriksel alan, kontrol grubuna ve çalışmada uygulanan diğer elektriksel alanlara (3 ve 5 V/cm) göre, mineralize kalsiyum miktarını önemli derecede

arttırmıştır [235]. Elektriksel alan varlığında, osteojenik genlerin ekspresyonunun uyarıldığı bir çalışmada, histolojik boyamalar ile mineralize kalsiyum miktarının da arttığı belirlenmiştir [130]. İpek filmler ile yapılan doktora tez çalışmasında, elektriksel alanın, özellikle matris mineralizasyonundan sorumlu *BSP* ekspresyonunu, her koşulda arttırdığı tespit edilmiştir. Alizarin red boyaması ile ortaya koyulan matris mineralizasyonu, çok erken dönemde başlamış ve kültürün ilerleyen günlerinde, *BSP* ekspresyonunun da bir göstergesi olarak, artmaya devam etmiştir.

4.3.5. İpek Doku İskeleleri ile Elektrostimülasyon Çalışmaları

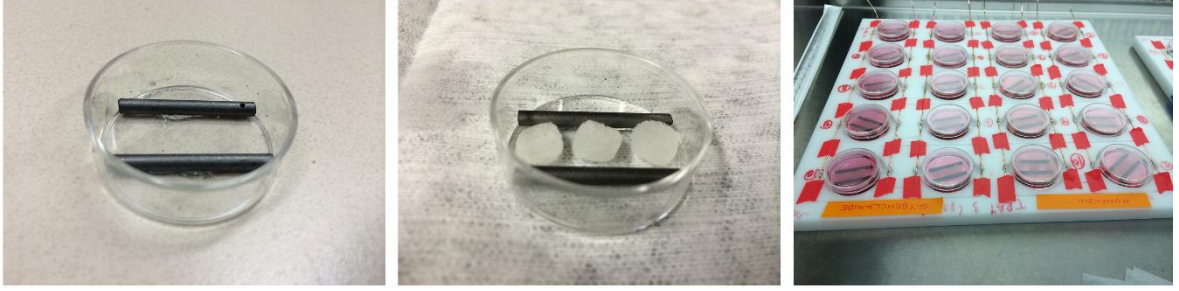
3-boyutlu elektrostimülasyon çalışmaları ipek doku iskeleleri kullanılarak yapılmıştır. Çözücü döküm-partikül uzaklaştırma yöntemi ile elde edilen doku iskelelerinin üzerinde hMSC'lerin kültürü gerçekleştirilmiş ve kullanılan uyaranlar varlığında *in vitro* kemik farklılaşması için uygun bir model oluşturulmaya çalışılmıştır.

1972'de Galvini'nin farenin kas hücreleri ile yaptığı çalışmalardan beri, tüm organizmaların elektrodinamik bir sisteme sahip olduğu bilinmektedir. Bakterilerden, memeli hücrelerine tüm organizmalar, elektriksel alana karşı, hücre bölünme hızı, doku büyümesi ve doku yenilenmesi açısından hassasiyet göstermektedir [1].

Kemik doku elektriksel özellikleri yönünden incelendiğinde, oluşan mekaniksel deformasyonların, kemik dokuda, hücre içi elektriksel sinyallere neden olduğu görülmüştür [237]. Mekanik strese karşı gösterilen elektriksel cevaplar piezoelektrik özellikler olarak tanımlanır. Kemik piezoelektrik özellikleri üzerine yapılan çalışmalarda, elektriksel cevapların oluşturulmasında kollajen fiberlerin etkin olduğu belirlenmiştir. *In vivo* çalışmalar, insan tibiasında, yürürken yaklaşık 300 mV'luk bir elektriksel cevabın oluştuğunu göstermektedir. Yaş, cinsiyet, beslenme, su içeriği gibi faktörlere bağlı olan, yapısal ve kimyasal özellikler, kemik elektriksel özelliklerini değiştirmektedir [1].

Dokunun elektriksel özelliklerine hücresel düzeyde bakıldığında, hücre içerisinde oluşan elektriksel sinyallerin, hücre membranındaki iyon giriş-çıkışlarını etkilediği belirlenmiştir. Oluşan elektriksel sinyaller ile iyonlar üzerinden hücre membran potansiyeli (V_{mem}) ve buna bağlı olarak hücresel aktiviteler değişmektedir. Hücre membran potansiyelinin, embriyonik doku gelişiminde ve doku yenilenmesinde kritik bir önemi olduğu bilinmektedir. Membran potansiyeli, hücre içi ve dışı arasındaki iyon konsantrasyonuna bağlı olarak oluşan voltaj farkından kaynaklanmaktadır [238]. Osteoblastların dinlenme halindeki membran potansiyelleri -37 mV'dir. Bu konumda iken, hücre içerisindeki K^+ konsantrasyonu dışarıya

göre fazladır. Ancak hücre dışı ortamda K^+ konsantrasyonu artmaya başladığında, dış ve iç ortam konsantrasyonu arasındaki oran 1'e yaklaşır ve membran potansiyeli yükselir (~ 0 mV, depolarizasyon). Membran potansiyelinin düştüğü durumlar ise hiperpolarizasyon olarak adlandırılır. Yapılan bir çalışmada kök hücrelerin, depolarizasyon durumunda farklılaşmalarının inhibe olduğu, hiperpolarizasyon durumunda ise adipojenik ve osteojenik hücrelere farklılaştıkları belirlenmiştir [239].



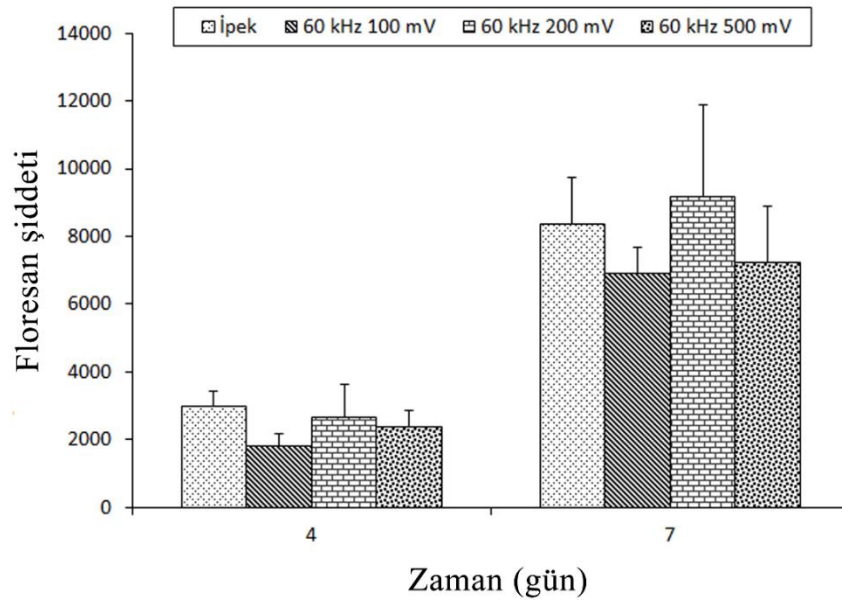
Şekil 4.44. 3 boyutlu elektrostimülasyon çalışmalarında kullanılan sistemin genel görüntüleri.

İpek doku iskeleleri ile gerçekleştirilen çalışmada, kemiğin biyoelektrik özellikleri göz önünde bulundurulmuş ve elektriksel sinyaller aracılığı ile hMSC'lerin osteojenik farklılaşmasının uyarılması amaçlanmıştır. Elektriksel alanın etkili olduğu temel iyon Ca^{+2} iyonudur. Ortaya koyulan etki mekanizması şöyle sıralanmıştır; 1) reseptör tarafındaki moleküler değişimler ve Ca^{+2} bağlanmasının değişmesi, 2) oluşan sinyalin, hücre içerisindeki reseptör kısmına ulaşması, 3) membranda oluşan sinyalin hücre içi cevap oluşturması [1]. Elektrostimülasyon kapsamında yapılan çalışmalarda, genellikle yaklaşım, bir güç kaynağı aracılığı ile hücrelerin bulunduğu dış ortamda bir elektriksel alan oluşturmaktır. Biyoelektrik alanında yapılan bir çalışmada ise, çeşitli biyokimyasallar ile hücre içerisinde bir elektriksel alan oluşturmak ve oluşan elektriksel sinyallerin, proliferasyon, farklılaşma, migrasyon gibi hücresel aktiviteler üzerindeki etkisinin incelenmesi hedeflenmiştir [13]. Doktora tez çalışması kapsamında, ortaya koyulan *in vitro* modelde, literatürde bir ilk olarak, hücre dışı ve içi oluşturulan elektriksel alanın, osteojenik farklılaşma üzerindeki sinerjik etkisi incelenmiştir. Bu amaçla hMSC ekilmiş doku iskeleleri, Petri kapları içerisinde, iki adet karbon elektrot arasına yerleştirilmiştir (Şekil 4.44). Karbon elektrotlar, termal ve kimyasal kararlılıklarının yanında, oldukça iyi iletkenlik özelliklerine (1×10^4 S/cm) sahiptir. Sonraki aşamada, elektrotlar, platin teller aracılığı ile ana sisteme bağlanmış ve bir güç kaynağı ile belirlenen koşullarda, sisteme elektrik

uygulanmıştır [218]. Uygulama yapıldığında, fizyolojik ortam içerisinde yüklü gruplar yeniden organize olmakta, iyonlar arasındaki yükler elektrondan elektrona taşınmaktadır. Böylece, belli bir süre sonra, kültür ortamı içerisinde kararlı bir akım oluşmaktadır [119]. Oluşturulan sistemde hücre içi elektriksel alan ise, monensin ve glibenklamid adlı, iyon kanallarını hedef alan kimyasallar ile sağlanmıştır.

4.3.5.1. Optimizasyon çalışmaları

Osteoblastlar ile yapılan elektrostimülasyon çalışmalarında, kalsiyum iyonu aktivitesinin, frekans ve dalga formunun süresine bağlı olarak değişiklik gösterebileceği belirtilmiştir. 13 V/cm elektriksel alanın osteoblastlarda cAMP miktarını düşürdüğü ve DNA sentezini %40 oranında arttırdığı tespit edilmiştir. Diğer bir çalışmada ise, 1 mV/cm elektriksel alanın, 20 dk uygulama sonrası, 30 Hz frekansta, hücre içi kalsiyum miktarını %20 arttırdığı, aynı deneysel koşullarda, 60 Hz’de ise %25 oranında azalttığı görülmüştür [1].

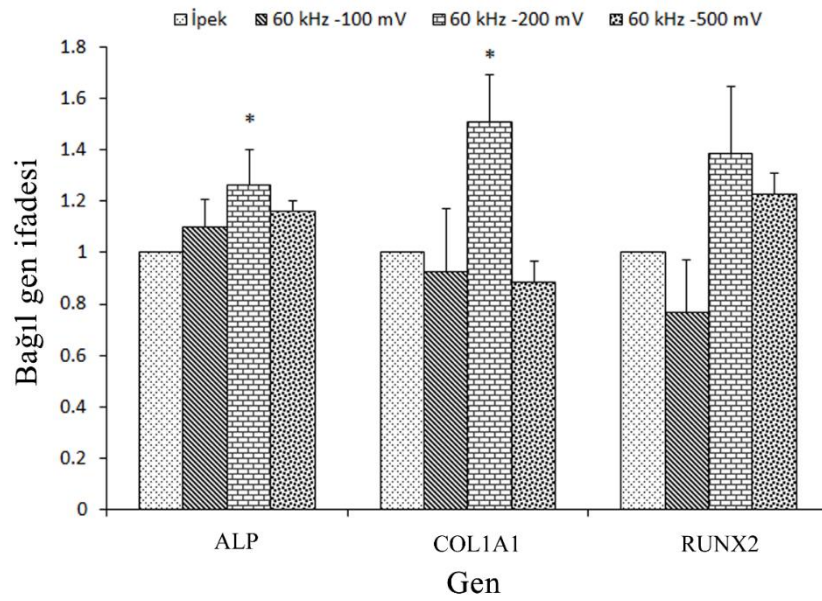


Şekil 4.45. İpek doku iskeleleri ile yapılan elektrostimülasyon uygulamasında voltaj optimizasyonu sonucu elde edilen Alamar blue sonuçları. İstatistiksel olarak anlamlı farklılık; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, $n=3$.

3-boyutlu elektrostimülasyon çalışmalarında, film çalışmalarında etkinliği gösterilen, 60 kHz frekans değeri kullanılmıştır. Elektrotlar arasındaki mesafe, doku iskelelerinin sıkışması için, 8 mm olarak belirlenmiştir. Hücre kültürü çalışmalarına geçmeden önce, voltaj optimizasyonu yapmak amacıyla, hücreler üzerine, 100, 200 ve 500 mV olmak üzere üç

farklı voltaj uygulanmıştır. Birinci haftanın sonunda Alamar Bue ve RT-PCR analizleri ile uygulanan voltajların etkinliği incelenmiştir. Alamar blue analizleri sonucunda, hücre proliferasyonu açısından, gruplar arasında anlamlı bir farka rastlanmamıştır (Şekil 4.45).

RT-PCR analizleri ile *ALP*, *COL1A1* ve *RUNX2* ekspresyon seviyeleri kontrol edilmiştir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, 100 mV ve 500 mV elektrik uygulanan gruplarda, bu genlerin ekspresyonu açısından anlamlı bir fark bulunamamıştır. Ancak 200 mV elektrik uygulamasının, *ALP* ve *COL1A1* ekspresyonlarını uyardığı görülmüştür (Şekil 4.46). Bu nedenle, daha sonra yapılacak uygulamalarda, işlem parametreleri olarak; 8 mm elektrot mesafesi, 60 kHz frekans ve 200 mV voltaj kullanılmıştır.



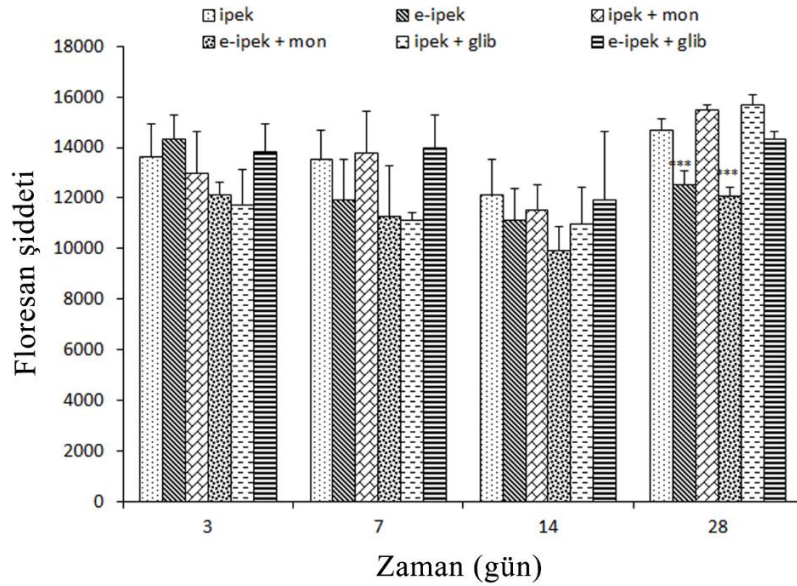
Şekil 4.46. İpek doku iskeleleri ile yapılan elektrostimülasyon uygulamasında voltaj optimizasyonu sonucu elde edilen RT-PCR sonuçları. İstatistiksel olarak anlamlı farklılık; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, $n=3$.

4.3.5.2. Hücre kültürü analizleri

Hücre kültürü çalışmaları kapsamında, hMSC'ler ipek doku iskeleleri üzerinde kültüre edilmiştir. Kontrol grubundaki hücreler sadece farklılaşma ortamında kültüre edilirken, diğer gruplardaki hücrelerin ortamına monensin ya da glibenklamid ilavesi yapılmıştır. Belirlenen gruplar ile yapılan çalışmalar, elektriksel alan varlığında veya yokluğunda yürütülmüştür. Deney grupları kısaca şu şekilde sıralanmıştır; 1) ipek, 2) e-ipek, 3) ipek+monensin, 4) e-ipek+monensin, 5) ipek+glibenklamid, 6) e-ipek+glibenklamid. Gruplardaki “e” harfi elektriksel alan varlığına işaret etmektedir.

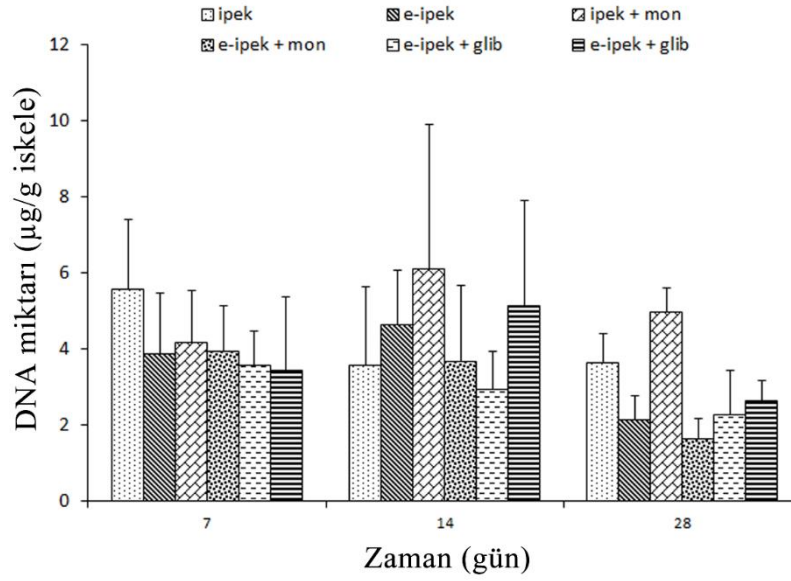
Hücre proliferasyonunun belirlenmesi

Doku iskeleleri üzerindeki hücre canlılığı ve proliferasyonu Alamar blue analizi ile incelenmiş, aynı zamanda örneklerin DNA miktarı analiz edilmiştir. Şekil 4.47’de verilen Alamar blue analizi, ipek ve e-ipek gruplarında hücre proliferasyonunun, 28. gün boyunca, aynı kaldığını göstermiştir ($p>0.05$). İpek+monensin ($p<0.05$) ve ipek+glibenklamid ($p<0.01$) gruplarında ise 14. günden 28. güne gelindiğinde hücre proliferasyonu anlamlı derecede artmıştır. 28. gün analizleri, e-ipek ve e-ipek+monensin gruplarında, kontrol grubuna göre proliferasyonun düştüğünü göstermektedir ($p<0.001$). Bunun yanında, monensin ve glibenklamid ile muamele edilen hücrelerde proliferasyon, elektriksel alana tabi tutulan tüm gruplara göre, daha fazladır ($p<0.001$). Elektriksel alan varlığında ise en yüksek proliferasyon glibenklamid varlığında gerçekleşmiştir ($p<0.001$).



Şekil 4.47. İpek doku iskelelerinde, hücre içi ve hücre dışı elektriksel alanın hücre proliferasyonuna etkisi. İstatistiksel olarak anlamlı farklılık; * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, $n=3$.

DNA miktarı, tüm gruplar için, kültür boyunca büyük bir değişikliğe uğramamıştır ($p>0.05$). Kültürün 28. gününde, monensin grubundaki DNA miktarı, elektriksel alana tabi tutulan, e-ipek ($p<0.01$), e-ipek+monensin ($p<0.01$) ve e-ipek+glibenklamid ($p<0.05$) gruplarına göre, anlamlı derecede fazladır. Bu veri Alamar blue analizleri ile de uyumludur (Şekil 4.48).



Şekil 4.48. İpek doku iskelelerinde, hücre içi ve hücre dışı elektriksel alanın örneklerdeki DNA miktarına etkisi. İstatistiksel olarak anlamlı farklılık; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, $n=3$.

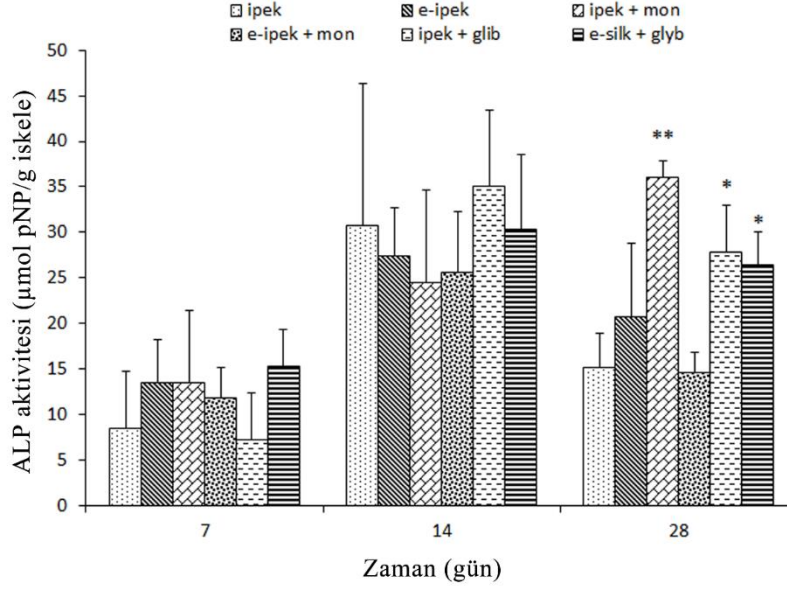
Hücre proliferasyonu ve canlılığı ile ilgili elde edilen veriler özetlenecek olursa, kültürün 28. gününde gruplar arasında farklılıklar olduğu söylenebilir. Kontrol grubunda ve monensin uygulanan gruplarda, elektriksel alan hücre proliferasyonunu bir miktar düşürmüştür. Glibenklamid uygulaması yapılan gruplarda ise, hücre proliferasyonu elektriksel alan varlığından etkilenmemiştir.

Hücre farklılaşmasının belirlenmesi

Hücre farklılaşmasının incelenmesi amacıyla, örneklerdeki ALP aktivitesi ve Ca içeriği belirlenmiştir. Ayrıca osteojenik genlerin ekspresyon seviyeleri RT-PCR analizi ile incelenmiştir.

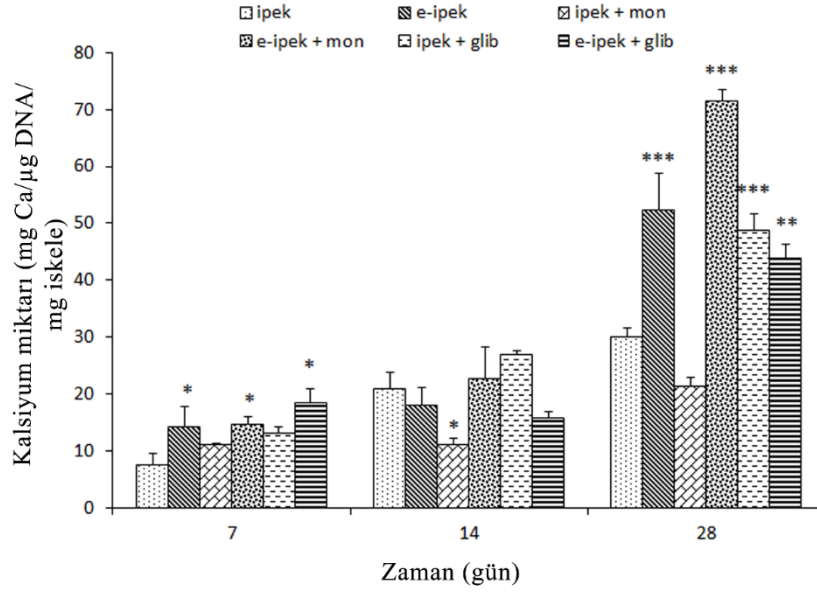
ALP aktivitesi: ALP, detaylı olarak tanımlanmış ve osteojenik farklılaşmanın göstergesi olarak bilinen bir enzimdir. Alkalın pH'da, fosfat esterlerinin hidrolizini katalizler. ALP'nin bir izoformu osteoblastların membranında bulunmaktadır ve matris mineralizasyonunda görev alır [240]. Şekil 4.49'da verilen sonuçlara göre, ALP aktivitesi ipek ve e-ipek gruplarında kültür boyunca değişmemiştir ($p > 0.05$). İpek+monensin ($p < 0.01$) ve ipek+glibenklamid ($p < 0.01$) gruplarında, ALP aktivitesi, 14. gün artış göstermiştir. Kültürün 28. günü, monensin ile muamele edilen grup, kontrol grubuna göre en yüksek ALP

aktivitesine sahiptir ($p < 0.01$). Aynı zamanda elektriksel alan varlığında, ipek+monensin grubunda ALP aktivitesi düşmüştür ($p < 0.01$). İpek+glibenklamid ve e-ipek+glibenklamid gruplarında ise ALP aktivitesi, kontrol grubuna göre, anlamlı derecede yüksektir ($p < 0.05$).



Şekil 4.49. İpek doku iskelelerinde, hücre içi ve hücre dışı elektriksel alanın ALP aktivitesine etkisi. İstatistiksel olarak anlamlı farklılık; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, $n=3$.

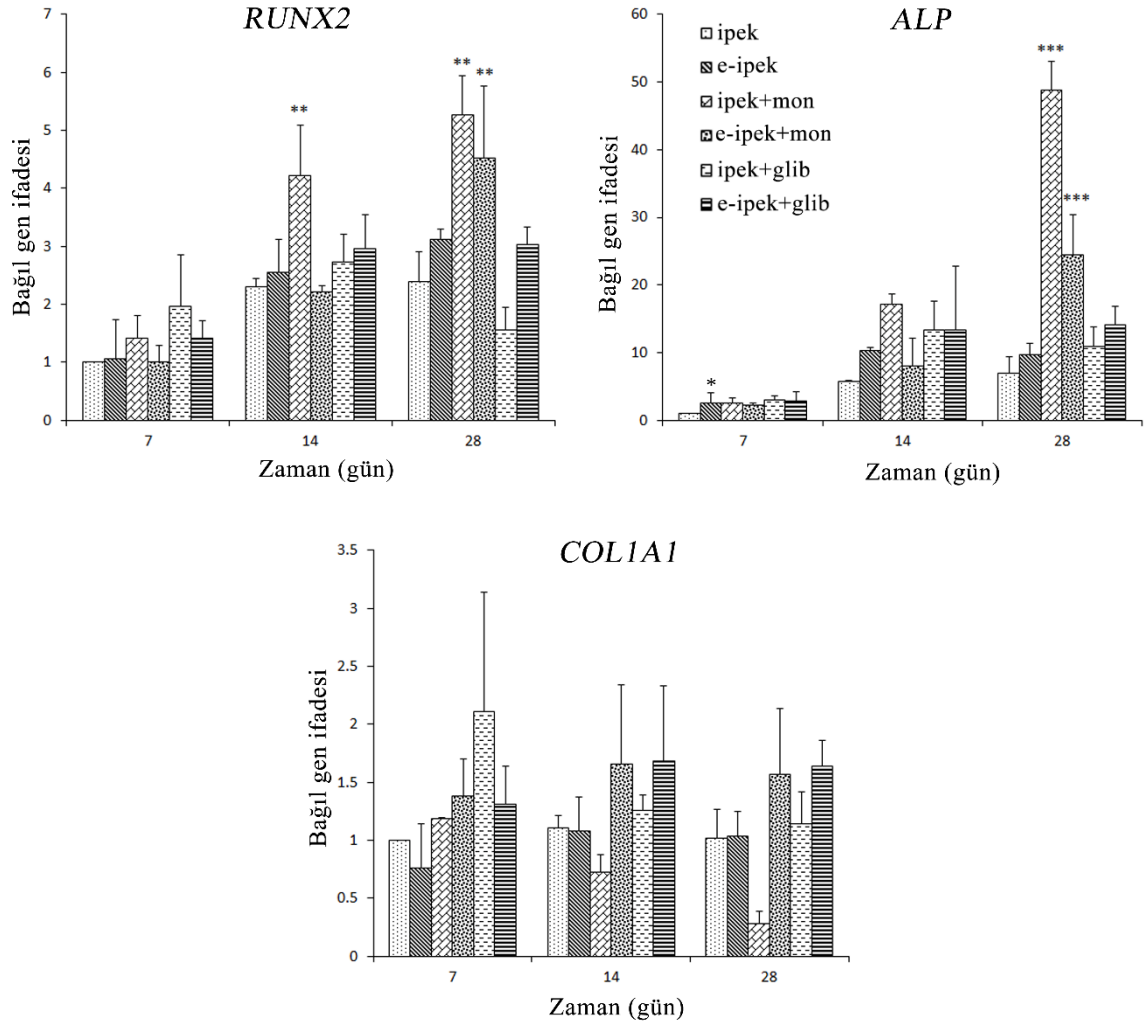
Kalsiyum içeriği: Kalsiyum (Ca) kemik ECM'sinin temel bileşenidir, geç dönem osteojenik farklılaşmanın bir işareti olarak kabul edilir ve zamana bağlı olarak içeriğinin artış göstermesi beklenir [241]. 3-boyutlu sistemlerde yapılan elektrostimülasyon çalışmasında, tüm gruplardaki Ca içeriği kültür süreci boyunca artış göstermiştir. 7. gün analizleri doğrultusunda, elektriksel alanın, tüm gruplarda Ca içeriğini arttırdığı söylenebilir ($p < 0.05$). 14. günden itibaren ipek+monensin grubu en düşük Ca içeriğini göstermeye başlamıştır. Kültürün 28. gününde, elektriksel alan, monensin varlığında Ca içeriğini uyarak, en yüksek değere ulaşmıştır ($p < 0.001$). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, e-ipek, ipek+glibenklamid ve e-ipek+glibenklamid gruplarında, Ca içeriği anlamlı derecede yüksektir ($p < 0.001$) (Şekil 4.50).



Şekil 4.50. İpek doku iskelelerinde, hücre içi ve hücre dışı elektriksel alanın örneklerdeki kalsiyum içeriğine etkisi. İstatistiksel olarak anlamlı farklılık; * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, $n=3$.

RT-PCR analizi: İpek doku iskeleleri ile yapılan elektrostimülasyon çalışmasında, osteojenik farklılaşmanın moleküler düzeyde incelenmesi için, RT-PCR analizi gerçekleştirilmiştir.

Erken dönem osteojenik genlerin ekspresyon seviyeleri Şekil 4.51’de verilmiştir. Öncelikle örneklerin *RUNX2* ekspresyon seviyeleri incelenmiş, ipek, e-ipek, ipek+monensin, ve e-ipek+glibenklamid gruplarında *RUNX2* ekspresyonu, 7. günden 14. güne gelindiğinde artmış ($p<0.05$) ve daha sonra sabit kalmıştır. e-ipek+monensin grubunda ise artış 14. günden, 28. güne gelindiğinde ortaya çıkmıştır ($p<0.05$). Glibenklamid uygulanan grupta *RUNX2* seviyesi değişmemiştir ($p>0.05$). Kültürün 7. günü gruplar arasında fark gözlenmezken, 14. gün en yüksek *RUNX2* ekspresyonu ipek+monensin grubunda görülmüştür ($p<0.01$). 28. günde, diğer gruplardaki ekspresyon seviyeleri değişmezken e-ipek+monensin grubunun *RUNX2* ekspresyonu artarak, ipek+monensin grubunun seviyesini yakalamıştır.

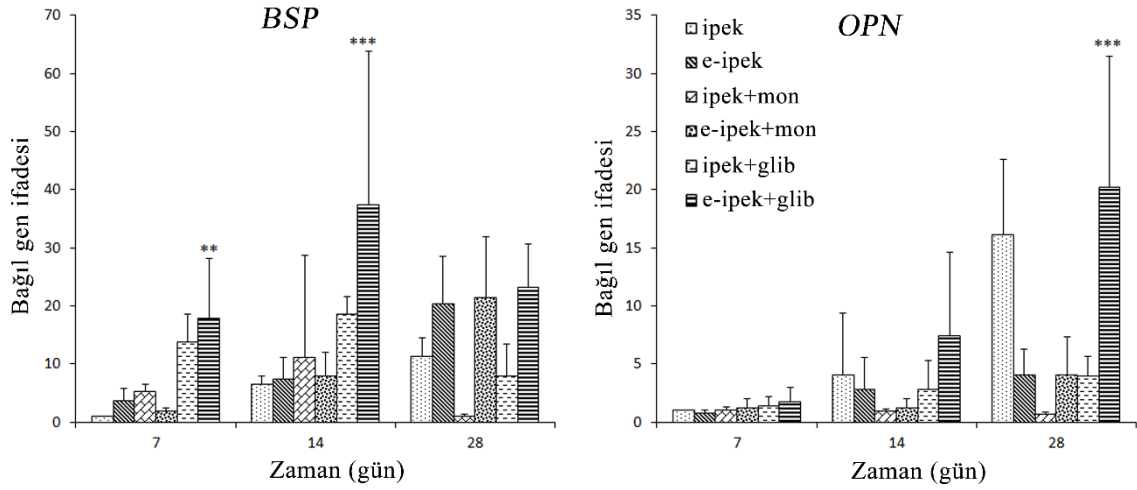


Şekil 4.51. İpek doku iskelelerinde, hücre içi ve hücre dışı elektriksel alanın örneklerdeki *RUNX2*, *ALP* ve *COL1A1* ekspresyonu üzerindeki etkisi. İstatistiksel olarak anlamlı farklılık; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, $n=3$.

ALP ekspresyonu incelendiğinde, ipek ve e-ipek gruplarında, ekspresyonun, 7. günden 14. güne kadar arttığı ($p < 0.01$) ve daha sonra sabit kaldığı tespit edilmiştir ($p > 0.05$). İpek+monensin grubunda ise *ALP* ekspresyonundaki artış 28. güne kadar devam ederken ($p < 0.01$), e-ipek+monensin grubunda 14. günden sonra *ALP* ekspresyonunda artış ($p < 0.01$) olduğu belirlenmiştir. Glibenklamid ile muamele eden gruplarda *ALP* ekspresyonu, kültür boyunca değişmemiştir ($p > 0.05$). 7. gün sonunda elektriksel alan, kontrol grubunda *ALP* ekspresyonunu arttırırken ($p < 0.05$), diğer gruplar arasında anlamlı bir farka rastlanmamıştır ($p > 0.05$). 28. gün verileri incelendiğinde, en yüksek *ALP* ekspresyon seviyesine monensinin sahip olduğu görülmektedir ($p < 0.001$). e-ipek+monensin grubundaki *ALP* ekspresyonu

kontrol grubundan yüksek olmakla beraber, sadece monensin uygulanan gruptan anlamlı derecede düşüktür ($p<0.001$). Glibenklamid ile muamele edilen gruplarda, ipek ve e-ipek grupları ile karşılaştırıldığında, *ALP* ekspresyonu açısından, anlamlı bir fark bulunmamaktadır ($p>0.05$).

COL1A1 ekspresyon seviyesi, kültür boyunca, ipek+monensin dışındaki gruplarda, sabit kalmıştır. İpek+monensin grubunda ise monensinin varlığı kollajen ekspresyonunu azaltmıştır. Ancak 28. gün verileri, elektriksel alanın, monensin varlığında dahi, kollajen ekspresyonunu arttırdığını göstermektedir ($p<0.01$). Ayrıca ipek+glibenklamid ($p<0.05$) ve e-ipek+glibenklamid ($p<0.01$) gruplarında da kollajen ekspresyonu, ipek+monensin grubuna göre, anlamlı derecede fazladır.

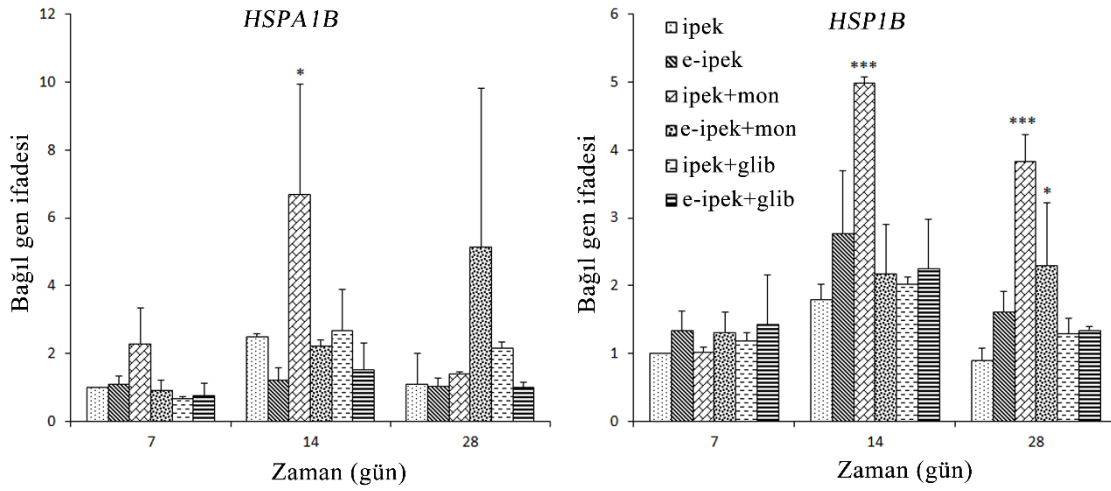


4.52. İpek doku iskelelerinde, hücre içi ve hücre dışı elektriksel alanın örneklerdeki *BSP* ve *OPN* ekspresyonu üzerindeki etkisi. İstatistiksel olarak anlamlı farklılık; * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, $n=3$.

Örneklerin, geç dönem osteojenik farklılaşma profillerinin karşılaştırılması için, *BSP* ve *OPN* ekspresyon seviyelerine bakılmıştır (Şekil 4.52). Kültürün 7. günü, glibenklamid ile muamele edilen grup, elektriksel alan varlığında, en yüksek *BSP* ekspresyonunu göstermiştir ($p<0.01$). Bu gruptaki *BSP* ekspresyon seviyesi 14. günde en üst noktaya ulaşmış olup diğer gruplardan önemli derecede fazladır ($p<0.001$). Elektrik uygulanan kontrol ve monensin grubunda *BSP* ekspresyonu, 14. günden, 28. güne gelindiğinde artış göstermiştir ($p<0.05$). 28. gün elektrik uygulanan gruplardaki *BSP* ekspresyon seviyelerinin birbirine yakın olduğu belirlenmiştir. İpek+monensin grubu en düşük ekspresyon seviyesine sahiptir ($p<0.001$). Elektriksel alan, monensin eklenen gruplardaki *BSP* seviyesini arttırmıştır ($p<0.01$). Ayrıca

elektrik uygulanan glibenklamid grubunda da, *BSP* ekspresyonu, sadece glibenklamid eklenen gruba göre daha fazladır ($p<0.05$).

OPN ekspresyonu açısından, kültürün 7. ve 14. günü, gruplar arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir. 28. güne gelindiğinde, ipek, e-ipek+monensin ve e-ipek+glibenklamid gruplarında, *OPN* ekspresyonunun arttığı belirlenmiştir. Glibenklamid ile muamele edilen grup, elektriksel alan varlığında, en yüksek ekspresyon seviyesine sahiptir ($p<0.001$). Ayrıca elektriksel alan, *BSP* ekspresyonu ile benzer şekilde, monensin ile muamele edilen grupta, sadece monensin eklenen gruba göre, *OPN* ekspresyonunu önemli derecede arttırmıştır ($p<0.05$).



Şekil 4.53. İpek doku iskelelerinde, hücre içi ve hücre dışı elektriksel alanın örneklerdeki ısı şok proteinlerinin ekspresyonu üzerindeki etkisi. İstatistiksel olarak anlamlı farklılık; * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, $n=3$.

RT-PCR analizleri kapsamında, örneklerdeki ısı şok proteinlerinin ekspresyonlarına da bakılmıştır. Isı şok proteinleri, sıcaklık değişimi, oksidatif stres gibi zor koşullarda eksprese olmakta ve proteinlerin katlanmasında, bozunmasında, salgılanmasında görev alarak, hücre homeostazının devamlılığını sağlamaktadır [120]. Tez kapsamında HSP27 (HSPB1) ve HSP70 (HSPA1B) proteinlerinin ekspresyonlarına bakılmıştır (Şekil 4.53). Isı şok proteinlerinin farklılaşmada da görev aldığı bilinmektedir. Örneğin HSP27, 1 sa boyunca 41°C'ye maruz kalan insan epidermal keratinositlerinin farklılaşmasını uyarmıştır [242]. HSP70'in ise kemik iliği stromal hücrelerinin proliferasyonunu ve farklılaşmasını uyardığı gösterilmiştir [243]. Isı şok proteinlerinin ekspresyonuna bakıldığında, kültürün ilk günlerinde gruplar arasında anlamlı bir farka rastlanmamıştır ($p>0.05$). Ancak 14. güne gelindiğinde, her iki gen için de, ipek+monensin grubu en yüksek ekspresyon seviyesine

sahiptir (*HSP27* için $p<0.001$, *HSP70* için $p<0.05$). 28. gün, monensin içeren gruptaki, *HSP70* ekspresyonu, diğer gruplar ile aynı seviyeye düşmüştür. Kültürün 28. günü, *HSP27* gen ekspresyonu ise, monensin grubu için, neredeyse aynı seviyede kalmıştır. Ayrıca elektriksel alan uygulanan monensin grubunda da, *HSP27* ekspresyon seviyesi, kontrol grubuna göre, anlamlı derecede artmıştır ($p<0.05$).

İstatistiksel analizlerden sonra, RT-PCR verileri tekrar değerlendirilecek olursa, tek başına elektrik uygulamasının, hücrelerin *ALP* ekspresyonunu ve Ca içeriğini arttırdığı gözlenmiştir. Ancak diğer genlerin ekspresyonunda anlamlı bir fark bulunamamıştır.

Hücrelere uygulanan monensin, erken dönem osteojenik genlerden biri olan *RUNX2* ekspresyonunu arttırmıştır. Aynı zamanda, bu grupta *ALP* aktivitesin de uyarıldığı tespit edilmiştir. RT-PCR analizi de bu sonucu desteklemiş ve en yüksek *ALP* ekspresyonu, tek başına monensin uygulanan grupta görülmüştür. Monensin uygulanan grupta, aynı zamanda ısı şok proteinleri olan *HSP27* ve *HSP70* proteinlerinin ekspresyon seviyeleri de, diğer gruplara göre, anlamlı derecede yüksektir ve *ALP* ekspresyonu ile benzer bir profil göstermektedir. Yapılan çalışmalarda, ısı şok proteinlerinin, hücre proliferasyonu yanında, *ALP* ekspresyonunu da uyardığı belirtilmiştir [244]. Hücrelerin, yüksek sıcaklık, ağır metaller, toksinler, oksidantlar, bakteriyel ve viral enfeksiyonlar karşısında, değişen mikroçevreye verdikleri cevap, ısı şok faktörleri (HSF) ile sağlanmaktadır. Normal hücrelerde, HSF sitoplazma ve çekirdek içerisinde monomerik formda bulunmaktadır ve DNA-bağlanma özelliği taşımaz. Fizyolojik stres altında HSF trimer forma dönüşür ve çekirdek içerisinde birikmeye başlar. Son olarak DNA'nın belirli bölgelerine bağlanarak, ısı şok proteinlerinin transkripsiyonunu sağlar [245]. Monensin Na^+ iyonunu taşıyan bir iyonofordur ve hücre membranının depolarizasyonuna neden olur [13]. Isı şok proteinlerindeki artış, hücre içi Na^+ konsantrasyonundaki ve membran potansiyelindeki değişimin, hücre için fizyolojik bir stres kaynağı olabileceğini göstermektedir. Diğer yandan monensin uygulanan grupta Ca içeriği oldukça düşüktür. Aynı zamanda bu grubun, mineralizasyonda görev alan *BSP* ve *OPN* genleri açısından, en düşük ekspresyon seviyesine sahip olması bu sonucu desteklemektedir. Kültürün 28. gününde kollajen tip 1 ekspresyonunun, monensin muamelesi ile önemli derecede düştüğünü göstermektedir. Monensinin, sindirim enzimleri, hormonlar, hücre dışı fiberler gibi proteinlerin, Golgi aygıtından taşınımını bloke ettiği görülmüştür. Bu durum sentezlenen bileşenlerin hücre içerisinde birikmesine neden olmakta ve hücre dışı fiber oluşumu azalmaktadır [246]. Kollajen ekspresyonundaki azalmanın, bu durum ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir.

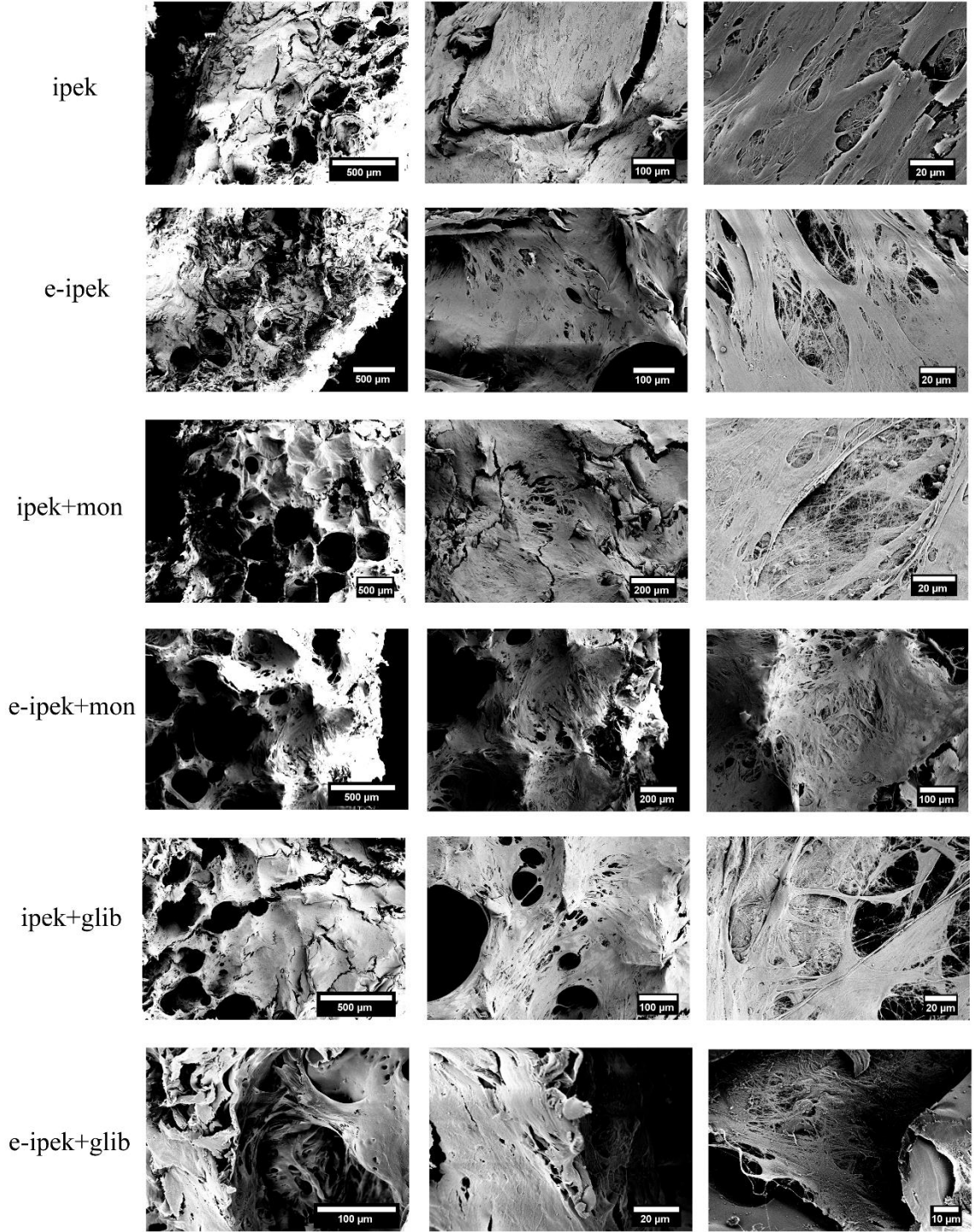
Ancak elektriksel alan, monensinin, *BSP*, *OPN* ve *Col1A1* ekspresyonu üzerindeki inhibe edici etkisini ortadan kaldırmakta ve bu genlerin ekspresyon seviyelerini, sadece monensin uygulanan örneklerle göre, anlamlı derecede arttırmaktadır. Bu noktada elektriksel alanın hücre içi kalsiyum birikimi ve sinyal yolları üzerinden, gen ekspresyonlarını etkilediği düşünülmektedir.

Glibenklamid ile muamele edilen örneklerde ise *Ca* içeriğinin yanında *BSP* ve *OPN* ekspresyonlarının da yüksek olduğu görülmüştür. Glibenklamidin etki mekanizması incelendiğinde, elektriksel alan ile benzer şekilde, hücre içi kalsiyum konsantrasyonunu değiştirdiği görülmektedir. Glibenklamid, ATP-bağımlı potasyum (K^+) kanallarını bloke etmektedir. K^+ kanallarının kapanmasıyla voltaj-aktif Ca^{+2} kanallarının açılmasına neden olmakta ve hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonu artmaktadır [247]. Moreau ve ark. yaptıkları çalışmada, osteoblast-benzeri hücreleri glibenklamid ile muamele etmişler ve osteokalsin sentezinin arttığını belirlemişlerdir. Osteokalsin sentezindeki artışın, Ca^{+2} kanalları aracılığıyla gerçekleştiğini ortaya koymuşlardır [247]. Glibenklamidin, adenosin trifosfat (ATP) üzerinden de, mineralizasyon üzerine etkisi olduğu düşünülmektedir. ATP'nin, hücre içi enerji metabolizmasındaki rolü uzun zamandır bilinmektedir. Ancak ATP aynı zamanda, hücre dışı bir sinyal molekülüdür. Osteoblastlar içerisinde yüksek konsantrasyonda bulunan ATP, hücre membranında bulunan ATP-bağımlı kanallar aracılığı ile ECM ortamına salınmaktadır. Bu noktada, P2-reseptör bağımlı yollar üzerinden kollajenöz matrisin mineralizasyonunu engellediği düşünülmektedir. Aynı zamanda, ATP'nin hidrolizi ile bir mineralizasyon inhibitörü olan pirofosfatlar meydana gelmektedir. Glibenklamid, ATP-bağımlı K^+ kanallarını bloke ederek, ATP'nin hücre dışına salımını kısıtlamaktadır [248, 249]. Elde edilen veriler, mineralizasyon üzerinde etkili olan glibenklamid ve elektriksel alanın hücreler üzerinde sinerjik bir etki oluşturduğunu ve osteojenik farklılaşmayı uyardığını göstermektedir.

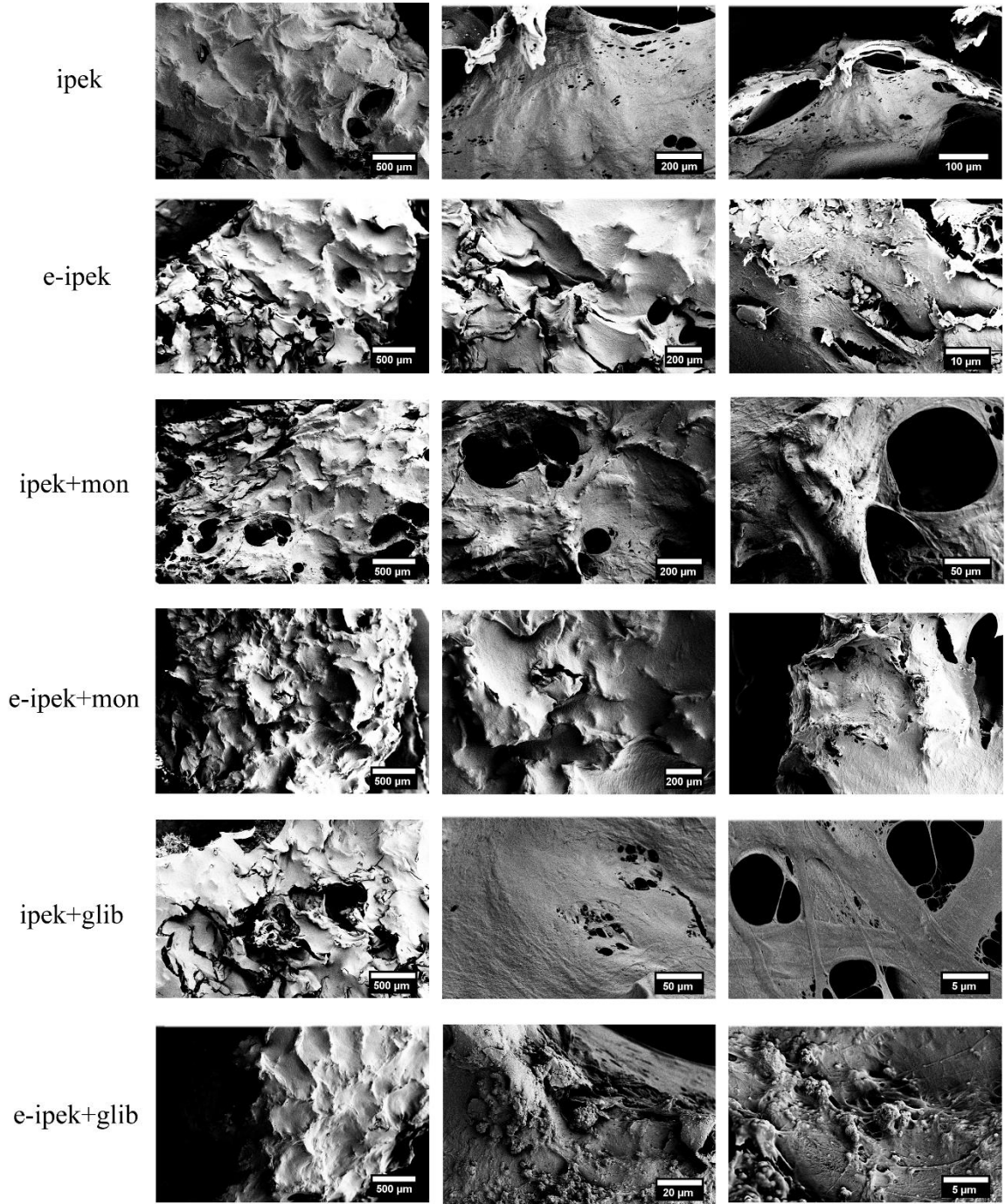
Hücre morfolojisinin belirlenmesi

SEM analizi: Hücrelerin ipek doku iskeleleri üzerindeki morfolojilerini ve hücre-malzeme etkileşimlerini incelemek amacıyla SEM analizi gerçekleştirilmiştir. 7. gün SEM analizleri, tüm gruplarda hücrelerin başarılı bir şekilde doku iskelelerine yapışıp yayıldıklarını göstermektedir (Şekil 4.54). Elde edilen görüntülerde, hücreler arasındaki yoğun bağlantılar dikkat çekmektedir. Monensin ve glibenklamid ile muamele edilen hücrelerde, kollajen fiberler ile karakterize edilen ECM sentezinin başladığı görülmektedir. Özellikle elektriksel alan varlığında, glibenklamid ile muamele edilen örneklerde, kollajen fiberler üzerinde

mineralize yapılara rastlanmıştır. Kollajen fiberlerin çapı, literatür ile uyumlu olarak, yaklaşık 100 nm olarak bulunmuştur [250].



Şekil 4.54. İpek doku iskelelerinde, hücre içi ve hücre dışı elektriksel alanın, kültürün 7. gününde hMSC morfolojileri üzerindeki etkisi.

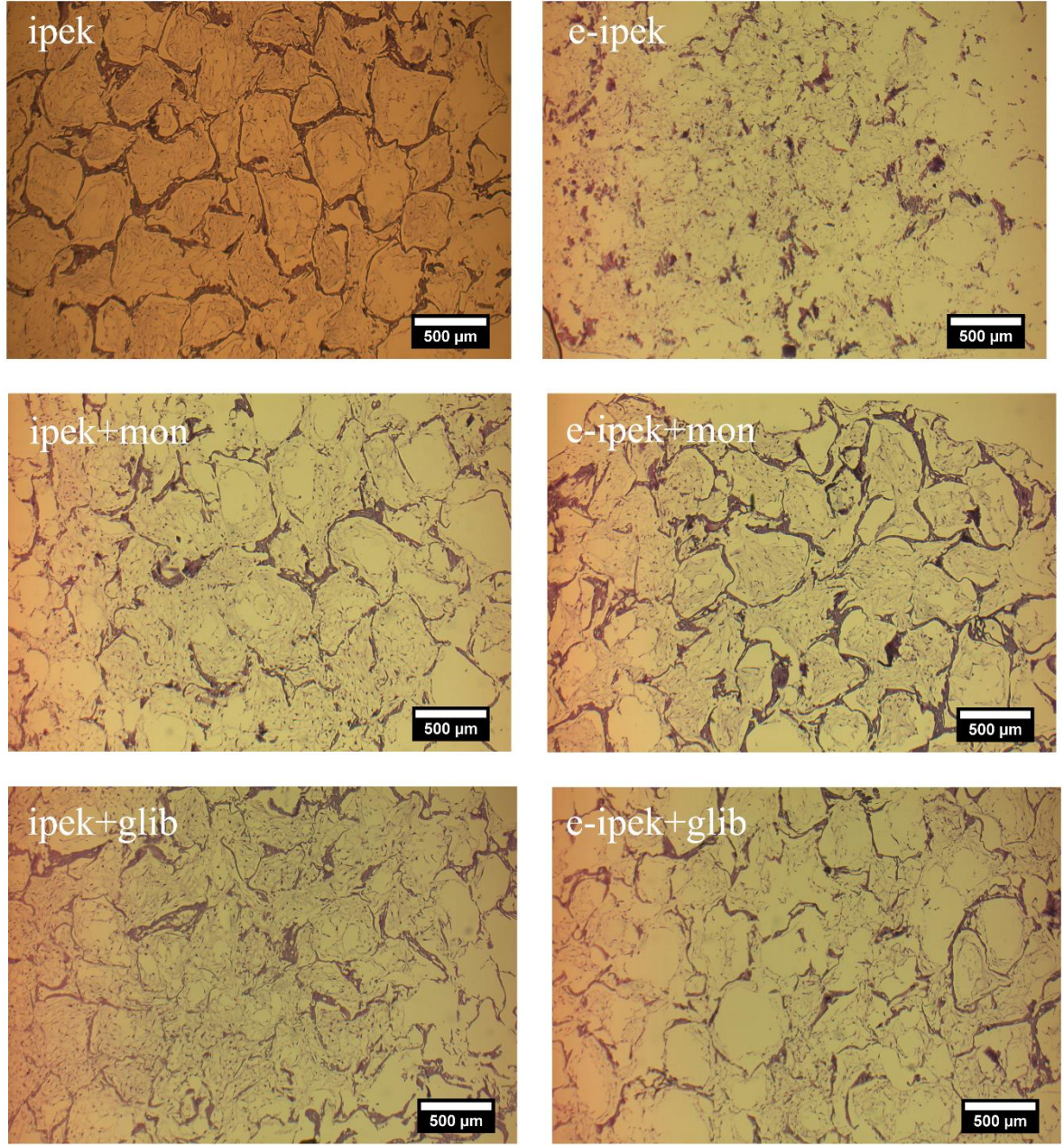


Şekil 4.55. İpek doku iskelelerinde, hücre içi ve hücre dışı elektriksel alanın, kültürün 28. gününde hMSC morfolojileri üzerindeki etkisi.

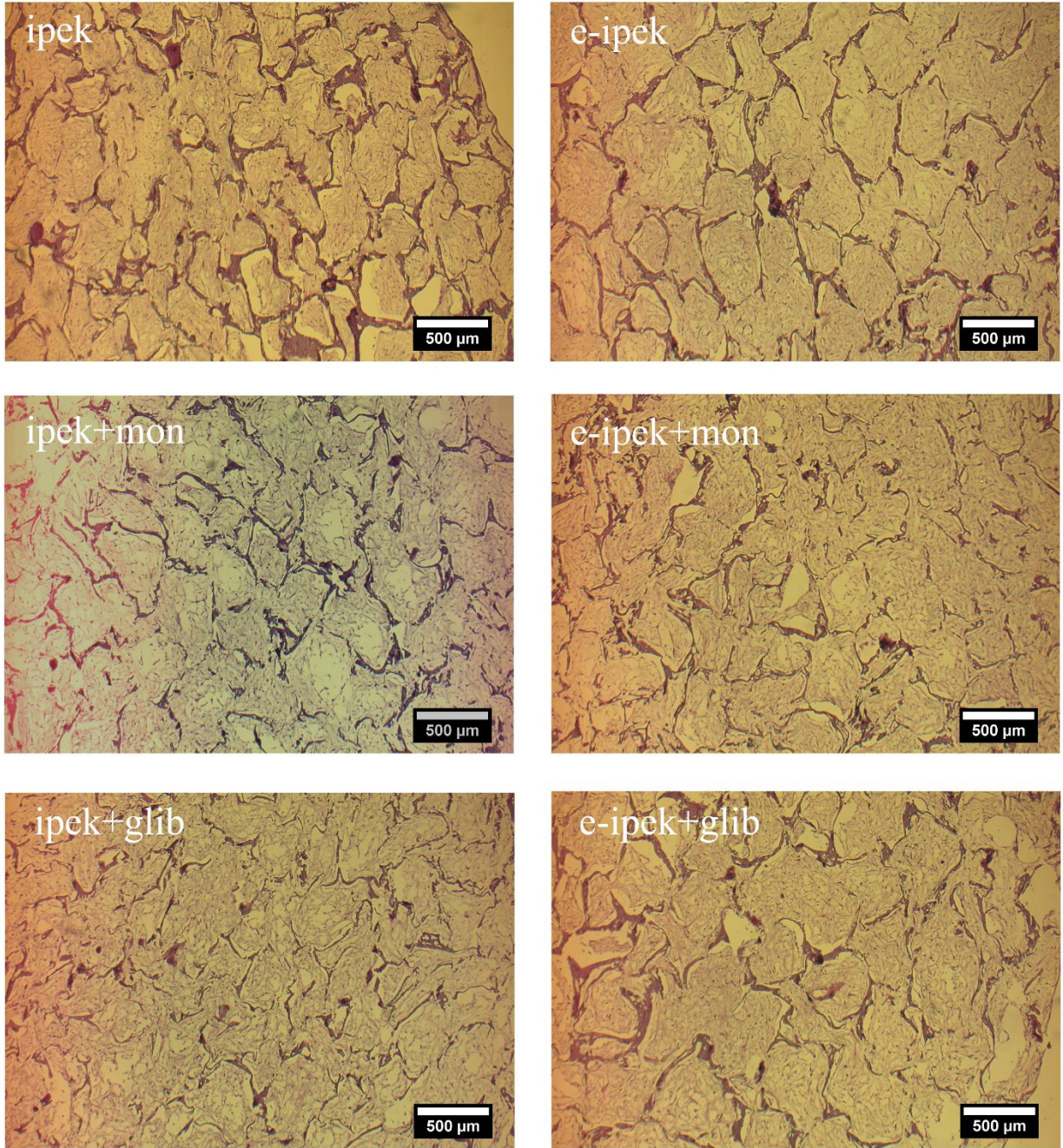
28. gün SEM görüntülerinde, doku iskelelerinin yoğun bir şekilde ECM ile kaplandığı görülmektedir (Şekil 4.55). Alamar blue analizi, kültür boyunca hücre proliferasyonunun çok fazla değişmediğini göstermektedir. Kültürün başlangıcı ve sonu arasında, SEM görüntülerindeki bu değişim, hücre sayısından çok ECM sentezine bağlıdır. Özellikle

elektiriksel alana tabi tutulan tüm gruplarda, elektiriksel alan kullanılmayan gruplara göre, ECM sentezinin çok daha yoğun olduğu, malzeme yüzeylerinin tamamen kaplandığı ve gözeneklerin kapandığı belirlenmiştir. Glibenklamid ile elektiriksel alanın birlikte uygulanması sonucu hücrelerdeki mineralize bölgelerin sayısının arttığı ve diğer gruplara göre daha büyük nodüllerin oluştuğu tespit edilmiştir. Globüler mineralize yapılar, *in vivo* osteogenez sırasında oluşan erken dönem mineralizasyon ile benzerlik göstermektedir. Nodüller mineralize matris vezikülleridir ve mineral kürelerinin öncülleri olarak tanımlanır. Matris vezikülleri, çekirdeklenme bölgesi oluşturarak yeni mineral oluşumlarını destekler ve biyomineralizasyonun oluşmasını sağlar [223]. RT-PCR sonuçlarına göre, elektiriksel alan varlığında glibenklamide maruz bırakılan örnekler, en yüksek *BSP* ve *OPN* ekspresyonuna sahiptir. Bu genlerin mineralizasyondan sorumlu olduğu düşünülürse, SEM ile elde edilen görüntüler, RT-PCR sonuçlarını desteklemektedir.

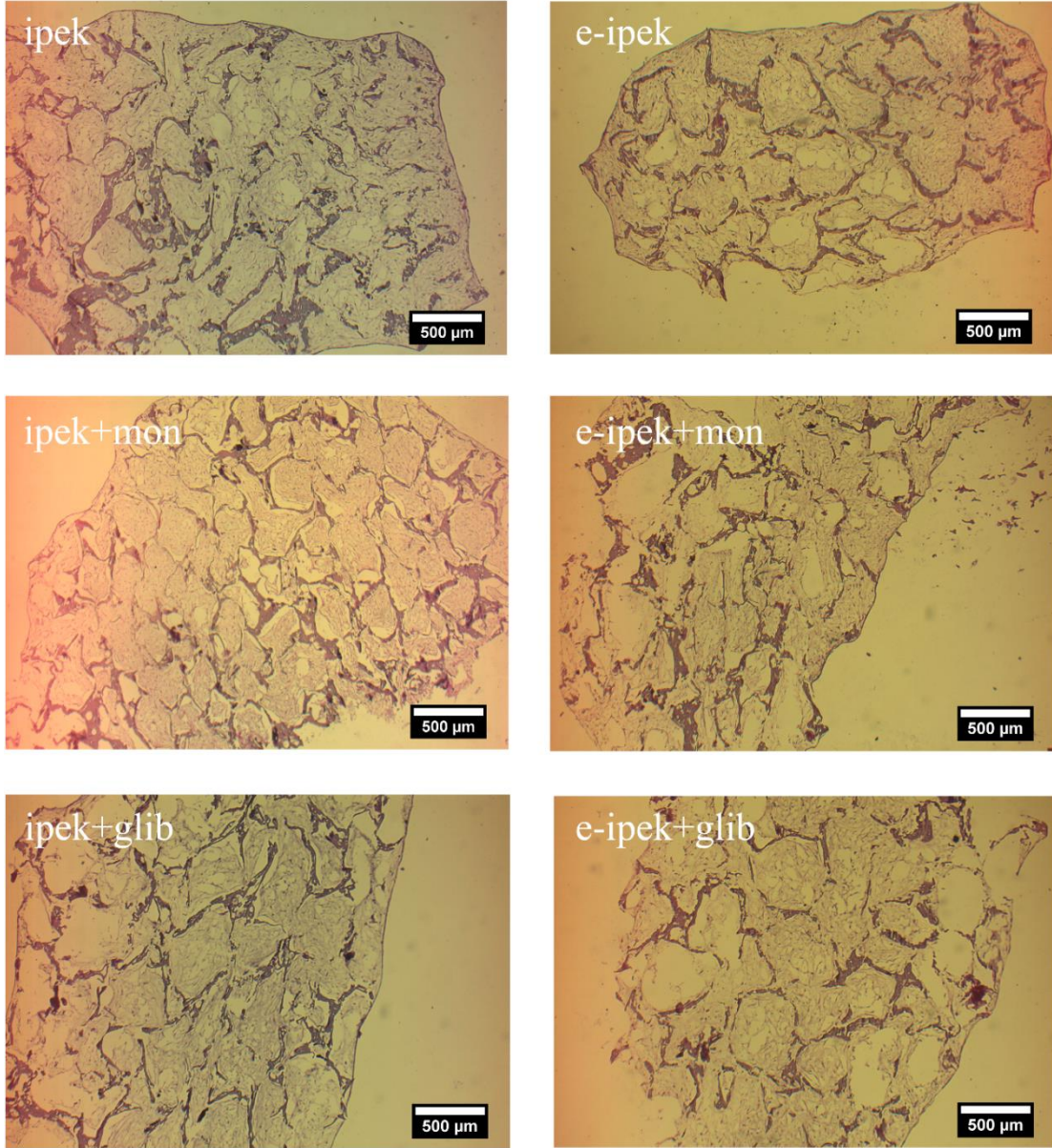
Histolojik boyamalar: Hücrelerin doku iskelerindeki dağılımını belirlemek amacıyla H&E boyama gerçekleştirilmiştir. 7. gün görüntüleri hücrelerin örnekler içerisinde homojen bir şekilde dağıldıklarını göstermekle beraber, halen malzemenin bazı bölgelerinde boşluklar olduğu görülmektedir (Şekil 4.56). Hücreler, özellikle gözenek kenarlarına yerleşmiş ve iç kısımları doldurmaya başlamıştır. 28. gün görüntülerinde ise, gözeneklerin tamamen hücreler ile dolu olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.57). Aynı zamanda doku iskelelerinin dikey kesitleri alınmıştır. İçsel bağlantılara sahip gözeneklerin, doku iskelelerinin iç kısımlarına kadar hücre göçüne izin verdiği tespit edilmiştir (Şekil 4.58). 28. gün boyamalarında, tüm örneklerde homojen bir hücre dağılımı görülmekle birlikte, e-ipek+monensin ve e-ipek+glibenklamid gruplarında ECM sentezine bağlı daha yoğun bir boyanma gerçekleşmiştir.



Şekil 4.56. İpek doku iskelelerinde, hücre içi ve hücre dışı elektriksel alan varlığında, kültürün 7. gününde hMSC'lerin doku iskelelerindeki dağılımları.



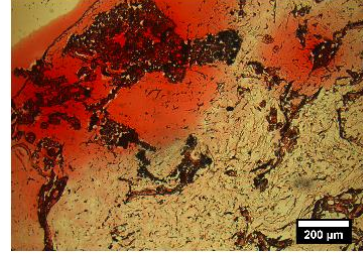
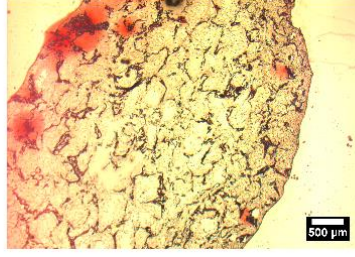
Şekil 4.57. İpek doku iskelelerinde, hücre içi ve hücre dışı elektriksel alan varlığında, kültürün 28. gününde hMSC'lerin doku iskelelerindeki dağılımları.



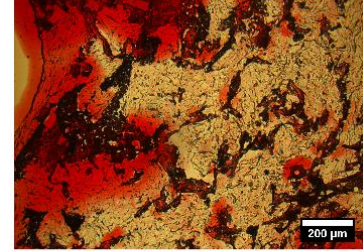
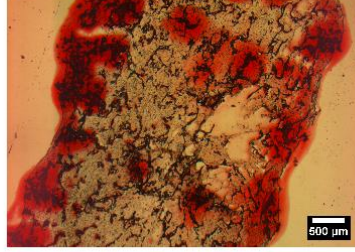
Şekil 4.58. İpek doku iskelelerinde, hücre içi ve hücre dışı elektriksel alan varlığında, kültürün 28. gününde doku iskelelerinin dikey kesitlerinde hMSC'lerin dağılımları.

Matris mineralizasyonunu belirlemek amacıyla, histolojik kesitler alınmış, Alizarin red ve von Kossa boyamalar gerçekleştirilmiştir. Boyamalar sonunda, örnekler üzerindeki kalsiyum fosfat depoları görüntülenmiştir. Alizarin red boyamaları, kontrol grubunda ve monensin uygulanan örneklerde, boyanan bölgelerin özellikle doku iskelelerinin kenar kısımlarında olduğunu göstermektedir (Şekil 4.59). Glibenklamid ile muamele edilen örneklerde ise, daha yoğun bir boyanma gerçekleşmiştir. Elektriksel alan varlığında glibenklamid, kalsiyum içeriğinin daha homojen bir dağılım göstererek iç kısımlara taşınmasını sağlamıştır.

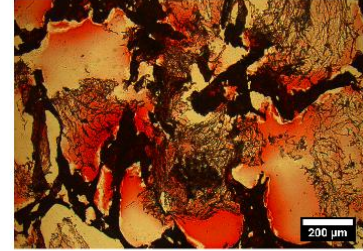
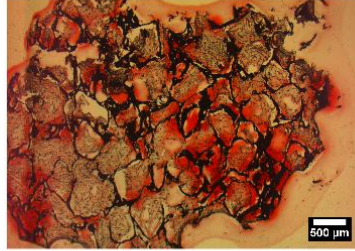
ipek



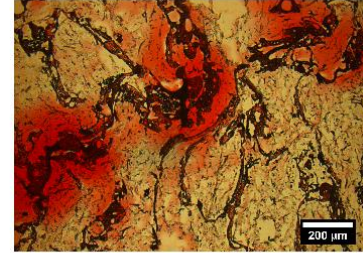
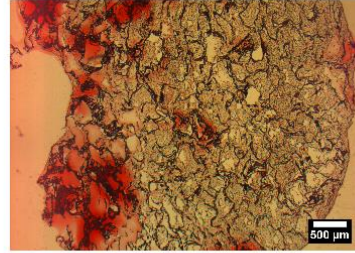
e-ipek



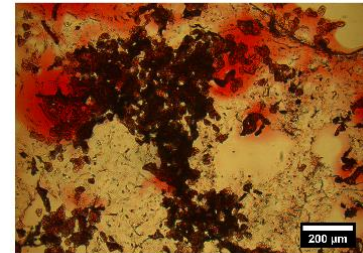
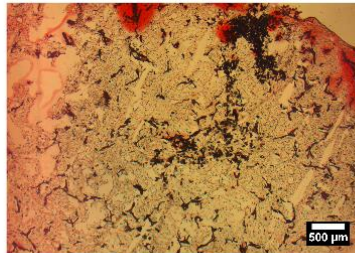
ipek+mon



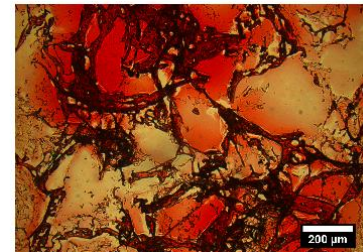
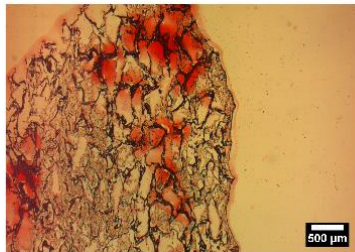
e-ipek+mon



ipek+glib

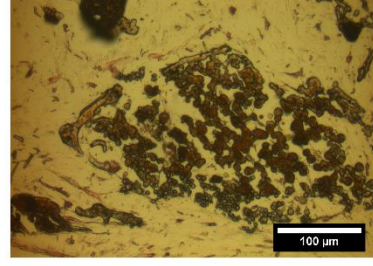
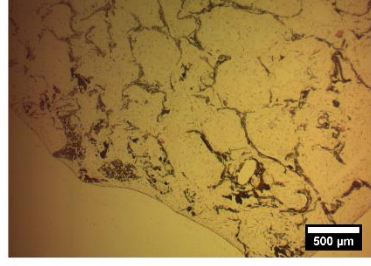


e-ipek+glib

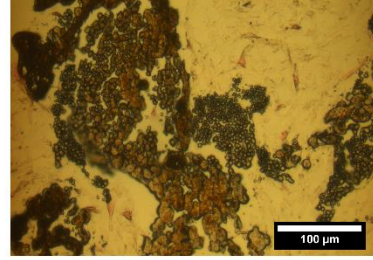
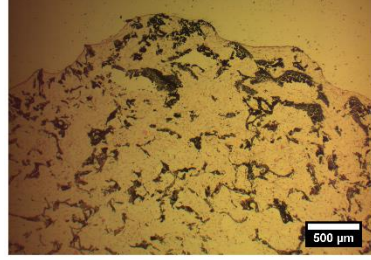


Şekil 4.59. İpek doku iskelelerinde, hücre içi ve hücre dışı elektriksel alan varlığında, kültürün 28. gününde doku iskelelerindeki mineralize bölgelerin Alizarin red boyama ile gösterimi.

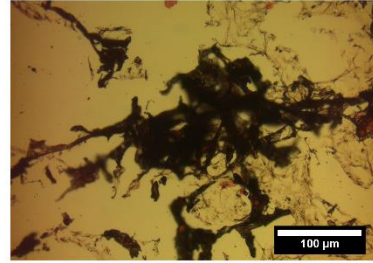
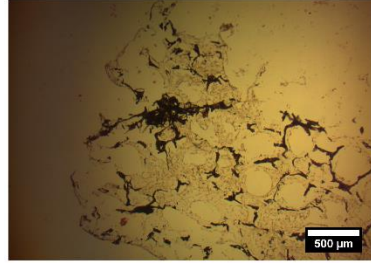
ipek



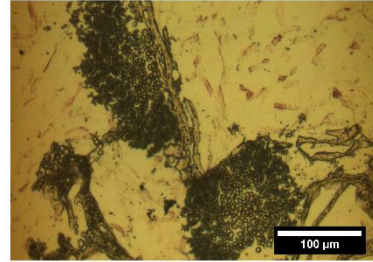
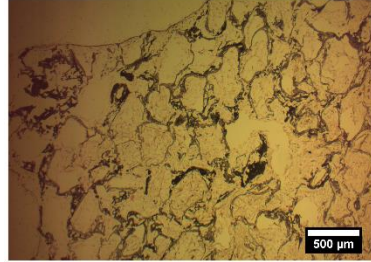
e-ipek



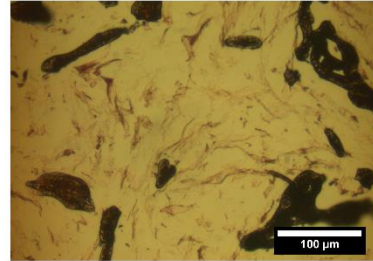
ipek+mon



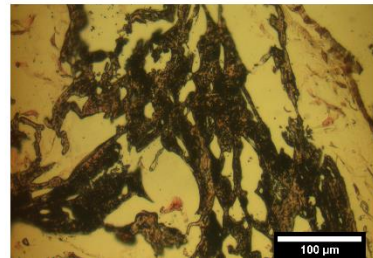
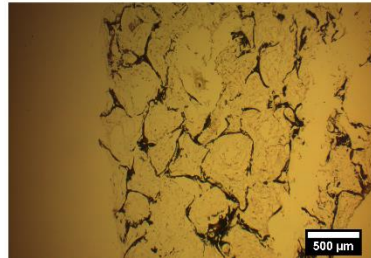
e-ipek+mon



ipek+glib



e-ipek+glib



Şekil 4.60. Hücre içi ve hücre dışı elektriksel alan varlığında, kültürün 28. gününde doku iskelelerindeki mineralize bölgelerin von Kossa boyama ile gösterimi.

Von Kossa boyamalar da her grup için, özellikle elektriksel alanın mineral oluşumunu desteklediğini göstermektedir (Şekil 4.60). Ca içeriğini belirlemek için yapılan analizlerde de, elektriksel alanın tüm örneklerde Ca içeriğini arttırdığı tespit edilmiştir. Alizarin red boyamaları ile benzer şekilde, elektriksel alan ve glibenklamidin birlikte uygulandığı örneklerde, mineralize bölgelerin daha büyük olduğu tespit edilmiştir. Elektriksel alan kullanılarak yapılan bir çalışmada, PCL/ β -TCP yüzeyler üzerinde elektrostimülasyon uygulaması gerçekleştirilmiştir. Bu yüzeylerden salınan kalsiyum iyonlarının, elektriksel alan ile sinerjik bir etki oluşturduğu, ALP aktivitesini ve Ca depolanmasını arttırdığı belirlenmiştir [251]. Glibenklamid de, benzer şekilde, Ca iyonları üzerinden elektrostimülasyon ile sinerjik bir etki oluşturmuş ve hMSC'lerin osteojenik farklılaşmasını arttırmıştır. Histolojik boyamalar ile elde edilen sonuçlar, RT-PCR ve SEM analizleri ile uyumludur.

Elektrostimülasyon çalışması kapsamında ortaya koyulan doku modelinde, kemik dokunun piezoelektrik özellikleri dikkate alınmış ve osteojenik farklılaşmanın uyarılmasında elektriksel sinyallerin kullanılmasına karar verilmiştir. Elektriksel alanın birçok dokunun gelişiminde ve rejenerasyonunda rol oynadığı bilinmektedir. Bu alanda yapılan bir çalışmada, elektriksel alanın, menisküs tedavisinde hücre göçünü ve doku entegrasyonunu arttırdığı belirlenmiştir [252]. Kardiyak doku mühendisliği çalışmalarında da, *in vitro* koşullarda işlevsel bir doku oluşumu için, elektrostimülasyondan yararlanılmaktadır [119]. Kemik doku mühendisliğinde, elektriksel alan, doku oluşumunu destekleyen itici bir güç olarak kullanılmaktadır. Elektriksel alan, hücresel düzeyde üç noktada devreye girmektedir; 1) fiziksel mikroçevrenin düzenlenmesi, 2) büyüme faktörleri ve 3) sinyal yolları [253]. Yapılan çalışmalarda, elektrostimülasyon ile BMP-2, BMP-4 ve IGF-1 sentezlerinin arttığı belirlenmiştir [10, 254]. Elektriksel alanın diğer bir etkisi de, hücre membranında bulunan reseptörler gibi yüklü moleküller üzerindedir. Osteokondral alanda yapılan bir çalışmada, elektriksel alan varlığında, kondrositlerin yüzeyindeki paratiroid hormon ve TGF β -1 reseptörlerinin aktivasyonu artmıştır. Bunun sonucunda artan TGF β -1 konsantrasyonu, proliferasyon ve farklılaşma üzerinden osteokondral fenotipi uyarmıştır. Kıkırdak dokunun ECM sentezindeki artış, doku iskelesine benzer bir yüzey alanı sunarak, kemik doku oluşumunu uyarmıştır [254]. Zhuang ve ark., elektriksel alanın, kalsiyum/kalmodulin yolu üzerinden osteoblastlarda TGF β -1 mRNA'sını %39 arttırdığını göstermiştir [227]. Elektriksel alan varlığında ortaya çıkan uyarının, hücre membranında başladığı ve daha

sonra siklik nükleotitler gibi ikincil uyarılar ile hücre içi cevapların oluştuğu düşünülmektedir.

Doku gelişimi ve rejenerasyonu göz önünde tutulduğunda, hücre farklılaşmasında önemli olan bir diğer noktanın hücre membran potansiyeli olduğu görülmektedir. Hücre membranında bulunan iyon kanalları aracılığı ile hücre içerisine ve dış ortama iyon giriş-çıkışı sağlanmakta, bu akış hücre içerisinde elektriksel sinyaller yaratarak, hücresel faaliyetler üzerinde etkili olmaktadır. Doktora tez çalışması kapsamında biyokimyasal uyarı olarak, hücre membranındaki iyon kanalları üzerinde etkili, monensin ve glibenklamid adlı kimyasalların kullanılmasına karar verilmiştir [13]. Elektriksel alan varlığında bu kimyasalların kullanımı ile hücrelerin elektrofizyolojik özellikleri düzenlenmiştir. Her iki kimyasal da, elektriksel alan varlığında, osteojenik farklılaşmaya farklı düzeylerde etki etmiştir. Elde edilen veriler özellikle glibenklamidin elektrostimülasyon uygulaması ile sinerjik bir etki oluşturduğunu, mineralizasyon ile karakterize edilen osteojenik farklılaşmayı arttırdığını göstermiştir. Ortaya koyulan doku modelinde, mekanik uyarılara ve büyüme faktörlerine alternatif olarak, elektriksel alan ve iyon kanalları üzerinde etkili kimyasalların, kemik doku mühendisliğinde kullanımlarının etkin sonuçlar verebileceği gösterilmiştir.

5. GENEL SONUÇLAR

Sunulan tez çalışması kapsamında biyofiziksel ve biyokimyasal uyaranların, mezenkimal kök hücrelerin osteojenik farklılaşması üzerindeki etkisi incelenmiştir. Bu amaçla, kitosan doku iskeleleri üzerinde, AdMSC'ler ile fotostimülasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Elektrostimülasyon çalışmaları ise, ipek biyomalzemeler ile hMSC'ler kullanılarak yürütülmüştür. Öncelikle ipek filmler üzerinde, elektriksel alanın hücreler üzerindeki etkisi incelenmiş, optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. İpek doku iskeleleri ile yapılan çalışmalarda ise, elektriksel alanın yanında, hücre membranındaki iyon kanallarını hedef alan biyokimyasallar kullanılmış ve bu uyaranların osteojenik farklılaşma üzerindeki sinerjik etkileri araştırılmıştır. Çalışma kapsamında elde edilen bulgular aşağıda özetlenmiştir.

- Gözenek çapı 95 μm olan ve içsel bağlantılara sahip kitosan doku iskeleleri liyofilizasyon yöntemi ile üretilmiştir.
- Karakterizasyon çalışmaları kapsamında, kitosan doku iskelelerinin gözenekliliği $\%94.47 \pm 0.68$ ve su tutma oranı 34.47 ± 4.12 olarak hesaplanmıştır.
- Elektrostimülasyon çalışmalarında kullanılmak üzere öncelikle ipek filmlerin üretimi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla hazırlanan ipek çözeltisi PDMS kalıplar üzerine dökülmüş ve su buharı yardımı ile malzemelerin stabilizasyonu sağlanmıştır. Elektrostimülasyon çalışmalarında kullanılmak üzere hazırlanan ipek filmlerde iletkenlik, platin teller ile sağlanmıştır.
- RGD kullanılarak üretilen ipek filmlerin fonksiyonallasyonu sağlanmıştır. İpek filmlerdeki hücre proliferasyonu ve dağılımı kontrol grubu ile karşılaştırılarak, RGD'nin etkinliği kontrol edilmiştir. RGD bağlı filmlerde hMSC proliferasyonunun, kontrol grubuna göre, yaklaşık 4 kat arttığı görülmüştür. DAPI boyamaları ise RGD varlığında, yüzeyde çok daha yoğun ve homojen bir hücre dağılımı olduğunu işaret etmiştir.
- İpek doku iskeleleri, "çözücü döküm-partikül uzaklaştırma" yöntemi ile hazırlanmıştır. Üretim aşamasında 500-600 μm boyutundaki NaCl partikülleri varlığında su bazlı yöntem kullanılmıştır.
- Fotostimülasyon çalışmalarında kullanılmak üzere yağ dokudan izole edilen mezenkimal kök hücrelerin karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla öncelikle AdMSC'ler optik mikroskop altında incelenmiş, kültür kabının yüzeyine yapışıp yayıldıkları ve genellikle poligonal bir morfoloji sergiledikleri belirlenmiştir.

- Floresan boyamalarda, hücrelerde yoğun bir iskelet yapısı gözlenirken, optik mikroskop ile benzer şekilde, hücre morfolojisi poligonaldir. Ancak kültürün ilerleyen günlerinde hücreler çoğalarak tek tabakalı yapı içerisinde iğsi bir morfoloji sergilemiştir. Hücre kültüründeki mikoplazma kontaminasyonu DAPI boyama ile kontrol edilmiş ve kontaminasyona dair bir bulguya rastlanmamıştır.
- Akış sitometrisi analizleri, hücrelerin literatürle uyumlu bir şekilde CD29, CD90, CD54 ve MHC sınıf 1 işaretleyicileri için pozitif olduğunu göstermektedir. CD45 ve MHC sınıf 2 antijenleri için ise oldukça düşük işaretlenme oranları bulunmuştur ($\leq 1\%$). Akış sitometrisi ile elde edilen veriler ışığında, hücrelerin yüksek saflıkta olduğu ve mezenkimal hücrelere uygun yüzey antijenlerini ifade ettikleri belirlenmiştir.
- Hücrelerin kültür kaplarındaki üreme davranışları 26 gün boyunca MTT analizi ile takip edilmiştir. Büyüme ortamında kültüre edilen hücrelerin bir kısmı, 1. haftanın sonunda farklılaşma ortamına alınmıştır. MTT analizi, büyüme ortamındaki hücre proliferasyonunun 14. güne kadar arttığını ve ilerleyen günlerde, kontak inhibisyona bağlı olarak yavaşladığını göstermiştir.
- Farklılaşma ortamında kültüre edilen AdMSC'lerin matris mineralizasyonu von Kossa boyama ile görüntülenmiştir. Boyama sonrasında kahverengi görülen mineralizasyon bölgeleri, hücrelerin kemik hücrelerine farklılaşma potansiyellerini ortaya koymuştur.
- Elektrostimülasyon çalışmalarında kullanılmak üzere izole edilen hMSC'ler, adipojenik, osteojenik ve kondrojenik ortamlarda kültüre edilmiş ve çeşitli boyamalar ile ECM yapısı karakterize edilerek, hücrelerin farklılaşma potansiyelleri ortaya koyulmuştur.
- Adipojenik ortamda kültüre edilen hücreler Oil red pozitif boyanmış ve kırmızı lipid damlacıkları görüntülenmiştir. Alcian blue boyamalarında ise, kondrojenik ortamda kültüre edilen hücrelerde, proteoglikan zengin ECM mavi renk boyanmıştır. Osteojenik ortamda kültüre edilen hücrelerde, kültürün ilk haftasından sonra, kalsiyum birikimine bağlı olarak nodül benzeri yapılar oluşmaya başlamış ve oluşan nodüllerin miktarı zamana bağlı olarak artış göstermiştir. Kültürün ilk haftasından sonra, kalsiyum birikimine bağlı olarak nodül benzeri yapılar oluşmaya başlamış ve oluşan nodüllerin miktarı zamana bağlı olarak artış göstermiştir. Kültürün 21. günü, mineralize bölgeler Alizarin red ile kırmızı boyanmıştır.
- Fotostimülasyon çalışmaları, TCPS yüzeylerde ve kitosan doku iskelelerinde yürütülmüştür. TCPS ve kitosan doku iskeleleri için uygulama mesafesi 10 cm ve

uygulama sıklığı gün aşırıdır. Diğer yandan TCPS grubu için uygulama süresi 5 dk, kitosan doku iskeleleri için 10 dk'dır.

- TCPS yüzeylerde yapılan fotostimülasyon çalışmasında, kültürün sonlarına doğru, kontrol grubundaki hücrelerin proliferasyonunda bir azalma görülürken, ışığa maruz bırakılan grupta hücrelerin çoğalma hızının, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, yaklaşık 1.5 kat fazla olduğu belirlenmiştir.
- Kitosan doku iskelelerinde, fotostimülasyonun hücre proliferasyonu üzerindeki etkisi, TCPS yüzeylere göre daha erken açığa çıkmıştır. 10. günden itibaren ışık hücrelerin proliferasyonunu, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, güçlü bir şekilde uyarmıştır ($p<0.001$). Işık uygulanmayan hücrelerin metabolik aktiviteleri neredeyse sabit kalırken, fotostimülasyonun hücre yoğunluğunu logaritmik olarak arttırdığı belirlenmiştir.
- TCPS yüzeylerde, ışığa maruz kalmış hücrelerde ise, aktin filamentleri, daha kalın demetler oluşturarak, hücrenin periferine yakın kısımlarda yeniden organize olmuşlardır. Yeniden yapılanmanın sonucunda hücre çekirdeği daha görünür bir hal alarak, hücre morfolojisi, osteojenik farklılaşmanın bir göstergesi olarak, içsiden kübik yapıya doğru değişmiştir. 14. günde, fotostimülasyon uygulanan grupta hücreler bir araya gelerek kafes yapıları oluşturmuş ve bu yapılar arasında hücresel uzantılar ile yoğun bağlantılar kurulmuştur.
- TCPS ile yapılan fotostimülasyon çalışmasının 21. gününde hücreler optik mikroskop altında incelenmiştir. Kontrol grubundaki hücrelerin canlılığını kaybederek yuvarlaklaştıkları ve yüzeyden ayrılmaya başladığı belirlenmiştir. Işık uygulanan grupta ise, hücre canlılığının devam ettiği, hücre-yüzey ve hücre-hücre arası etkileşimlerin korunduğu görülmüştür.
- Kitosan doku iskeleleri ile yapılan fotostimülasyon çalışmalarındaki hücrelerin morfolojileri SEM ile analiz edilmiştir. 14. gün SEM fotoğraflarına bakıldığında, kontrol grubundaki kitosan doku iskeleleri üzerinde hücresel kalıntılara rastlanmış ancak sağlıklı bir hücre-malzeme etkileşimi olmadığı görülmüştür. Fotostimülasyon uygulanan gruplarda ise, malzeme yüzeyinde hücresel bir dağılım olduğu ve bazı bölgelerde, hücre-malzeme etkileşimleri ile gözeneklerin kapandığı belirlenmiştir. Yüksek büyütmelerde, ışık uygulanan gruplarda mineral benzeri yapılanmalara rastlanmıştır.
- TCPS yüzeylerdeki matris mineralizasyonu ALP-von Kossa (ALP-VK) boyamalar ile belirlenmiş ve 21. gün yapılan boyamalar optik mikroskop altında görüntülenmiştir. Kontrol grubunda, mineralizasyonu işaret eden, herhangi bir boyanma gerçekleşmezken,

fotostimölasyon varlığında, hücreler arasında kahverengi nodüller ve kırmızı mineralize bölgeler tespit edilmiştir

- Kitosan doku iskelelerinde yapılan von Kossa boyamalarda her iki doku iskelesi de boyanmakla birlikte, ışık ile muamele edilen iskelede daha koyu bir boyanma gerçekleşmiştir.
- Fotostimölasyon çalışmaları kapsamında yapılan RT-PCR sonuçları, TCPS yüzeylerde ışığın *Col1a1* ekspresyonunu arttırdığını gösterirken, kitosan doku iskelelerinde ışığın hücre farklılaşmasını, moleküler düzeyde etkilediğine dair bir bulguya rastlanamamıştır.
- Fotostimölasyon çalışmaları sonucu elde edilen veriler, ışığın AdMSC hücreleri üzerinde daha çok proliferatif bir etkisi olduğunu göstermiştir. TCPS yüzeylerde, aynı zamanda kollajen tip 1 sentezinin de arttığı görülmüştür. Aynı zamanda, hücre tipi yanında, kültürün yapıldığı mikroçevrenin de uygulamanın etkinliğini belirlediği ortaya koyulmuştur.
- İpek filmler ile yapılan elektrostimölasyon çalışmalarında, 60 kHz frekans ve 2.5 mm elektrot mesafesi en etkin parametreler olarak belirlenmiştir.
- Düşük voltajın hücre farklılaşmasını, yüksek voltajın ise hücre proliferasyonunu uyardığı belirlenmiştir.
- Düşük voltaj ile yapılan elektrostimölasyon çalışmaları, büyüme ve farklılaşma ortamı olmak üzere iki farklı ortamda yürütülmüştür. Büyüme ortamı ile yapılan çalışmalarda elektriksel alan hücre farklılaşmasını uyarmıştır. Aynı zamanda kültürün 14. günü, büyüme ortamında dahi *BSP* ekspresyonunun arttığı tespit edilmiştir.
- Farklılaşma ortamında ise, *ALP*, *COL1A1* ve *BSP* ekspresyonlarının arttığı belirlenmiştir. SEM görüntüleri hücrelerin, elektriksel alan varlığında, yoğun ECM sentezi ile birlikte elektrot yüzeylerini kapladığı görülmüştür. Aynı zamanda hücrelerin yüzeyinde, yoğun mineralize bölgelere rastlanmıştır. Alizarin red boyamalarda ise, elektrostimölasyonun erken mineralizasyonu başlattığı tespit edilmiştir.
- İpek doku iskeleleri ile yapılan elektrostimölasyon çalışmasında, film çalışmalarında belirlenen 60 kHz frekans değeri olarak kullanılmıştır. Elektrot mesafesi 8 mm ve optimizasyon çalışmaları sonucunda voltaj 200 mV olarak seçilmiştir. Elektriksel alanın yanında, hücre membran potansiyeli üzerinde etkili kimyasallar (monensin ve glibenklamid) kullanılarak, hücre içerisinde de elektriksel sinyaller oluşturulmuştur.
- 3-boyutlu sistemlerde elektrostimölasyon ile yapılan çalışmada, hücre proliferasyonu ve DNA miktarı açısından, örnekler arasında bir farka rastlanmamıştır.

- RT-PCR analizleri, monensinin tek başına erken dönem osteojenik farklılaşmayı arttırdığını göstermiştir. Örneklerdeki ALP aktivitesi de bu sonucu desteklemektedir. Bunun yanında, elektriksel alan, monensinin geç dönem osteojenik genler üzerindeki inhibe edici etkisini ortadan kaldırmıştır.
- Diğer yandan RT-PCR sonuçları doğrultusunda, elektriksel alan ve glibenklamidin hMSC'lerin osteojenik farklılaşması üzerinde sinerjik bir etki oluşturduğu görülmektedir. Aynı zamanda, örneklerdeki Ca içeriği de RT-PCR sonuçları ile benzerlik göstermektedir.
- SEM analizi sonucunda tüm örneklerde kuvvetli bir hücre-malzeme etkileşimi gösterilmiştir. Elektriksel alan varlığında glibenklamid ile muamele edilen örneklerde, kollajen fiberler ve mineralize nodüller ile karakterize edilen ECM sentezinin arttığı tespit edilmiştir.
- Hemotoksilen&eoizin boyamaları ile hücrelerin doku iskeleleri içerisinde homojen bir şekilde dağıldıkları ve gözenek içlerini doldurdıkları görülmüştür. Aynı zamanda dikey kesitler ile hücrelerin gözenekli yapı içerisinde göç ederek iç kısımlara kadar ulaştıkları tespit edilmiştir.
- Matris mineralizasyonu ise Alizarin red ve von Kossa boyamalar ile görüntülenmiştir. Elektriksel alanın tüm gruplarda mineralizasyonu uyardığı görülmekle beraber, glibenklamidin de ortama katılması ile daha büyük mineralize yapıların iskele içerisindeki homojen dağılımları ortaya koyulmuştur.

Tez kapsamında elde edilen tüm sonuçlar değerlendirildiğinde, biyofiziksel uyaranlar olan, fotostimülasyon ve elektrostimülasyon uygulamalarında işlem parametrelerinin hücresel aktiviteler üzerinde kritik bir öneme sahip olduğu belirlenmiştir. Biyokimyasal uyaranlarla desteklenen optimum koşullarda, mezenkimal kök hücrelerin osteojenik farklılaşmasını destekleyen bir mikroçevre oluşturulabileceği ortaya koyulmuştur.

KAYNAKLAR

- [1] Isaacson, B.M., Bloebaum, R.D., Bone bioelectricity: what have we learned in the past 160 years?, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 95, 1270-9, **2010**.
- [2] Healy, K.E., Guldberg, R.E., Bone tissue engineering, *Journal of Musculoskeletal and Neuronal Interactions*, 7, 328-30, **2007**.
- [3] Burg, K.J., Porter, S., Kellam, J.F., Biomaterial developments for bone tissue engineering, *Biomaterials*, 21, 2347-59, **2000**.
- [4] Beskardes, I.G., Demirtas, T.T., Durukan, M.D., Gumusderelioglu, M., Microwave-assisted fabrication of chitosan-hydroxyapatite superporous hydrogel composites as bone scaffolds, *Journal of Tissue Engineering and Regenerative medicine*, doi: 10.1002/term.1677 **2012**.
- [5] Calis, M., Demirtas, T.T., Atilla, P., Tatar, I., Ersoy, O., Irmak, G., Celik, H.H., Cakar, A.N., Gumusderelioglu, M., Ozgur, F., Estrogen as a novel agent for induction of adipose-derived mesenchymal stem cells for osteogenic differentiation: *in vivo* bone tissue-engineering study, *Plastic and Reconstructive Surgery*, 133, 499-510, **2014**.
- [6] Tigli, R.S., Karakeçili, A., Gumusderelioglu, M., *In vitro* characterization of chitosan scaffolds: influence of composition and deacetylation degree, *Journal of Materials Science Materials in Medicine*, 18, 1665-74, **2007**.
- [7] Salgado, A.J., Coutinho, O.P., Reis, R.L., Bone tissue engineering: state of the art and future trends, *Macromolecular Biosciences*, 4, 743-65, **2004**.
- [8] Tuan, R.S., Boland, G., Tuli, R., Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering, *Arthritis Research & Therapy*, 5, 32, **2003**.
- [9] Yang, K.H., Parvizi, J., Wang, S.J., Lewallen, D.G., Kinnick, R.R., Greenleaf, J.F., Bolander, M.E., Exposure to low-intensity ultrasound increases aggrecan gene expression in a rat femur fracture model, *Journal of Orthopaedic Research*, 14, 802-9, **1996**.
- [10] Bodamyali, T., Bhatt, B., Hughes, F.J., Winrow, V.R., Kanczler, J.M., Simon, B., Abbott, J., Blake, D.R., Stevens, C.R., Pulsed electromagnetic fields simultaneously induce osteogenesis and upregulate transcription of bone morphogenetic proteins 2 and 4 in rat osteoblasts *in vitro*, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 250, 458-61, **1998**.
- [11] Stein, A., Benayahu, D., Maltz, L., Oron, U., Low-level laser irradiation promotes proliferation and differentiation of human osteoblasts *in vitro*, *Photomedicine and Laser Surgery*, 23, 161-6, **2005**.
- [12] Dimitriou, R., Tsiridis, E., Giannoudis, P.V., Current concepts of molecular aspects of bone healing, *Injury*, 36, 1392-404, **2005**.
- [13] Sundelacruz, S., Li, C., Choi, Y.J., Levin, M., Kaplan, D.L., Bioelectric modulation of wound healing in a 3D *in vitro* model of tissue-engineered bone, *Biomaterials*, 34, 6695-705, **2013**.
- [14] Scott P. Bruder, A.I.C., *Principles of Tissue Engineering* Second Edition ed. Academic Press, **2000**.

- [15] Athanasiou, K.A., Zhu, C., Lanctot, D.R., Agrawal, C.M., Wang, X., Fundamentals of biomechanics in tissue engineering of bone, *Tissue engineering*, 6, 361-81, **2000**.
- [16] Anonim, <http://www.oxford174.com/diagram-of-bone-structure/> (Temmuz, **2014**).
- [17] Sikavitsas, V.I., Temenoff, J.S., Mikos, A.G., Biomaterials and bone mechanotransduction, *Biomaterials*, 22, 2581-93, **2001**.
- [18] Anonim, <http://www.medicalarttexas.com/cellular/> (Temmuz, **2014**).
- [19] Mistry, A.S., Mikos, A.G., Tissue Engineering Strategies for Bone Regeneration, *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 94, 1-22, **2005**.
- [20] Kneser, U., Schaefer, D.J., Polykandriotis, E., Horch, R.E., Tissue engineering of bone: the reconstructive surgeon's point of view, *Journal Of Cellular And Molecular Medicine*, 10, 7-19, **2006**.
- [21] Bancroft, G.N., Mikos, A.G. Bone Tissue Engineering by Cell Transplantation. In: Reis R, Cohn D, editors. Polymer Based Systems on Tissue Engineering, Replacement and Regeneration: Springer Netherlands; 251-63, **2002**.
- [22] Anonim, http://en.wikipedia.org/wiki/Tissue_engineering (Temmuz, **2014**).
- [23] Rose, F.R., Oreffo, R.O., Bone tissue engineering: hope vs hype, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 292, 1-7, **2002**.
- [24] Heath, C.A., Cells for tissue engineering, *Trends in biotechnology*, 18, 17-9, **2000**.
- [25] Blau, H.M., Brazelton, T.R., Weimann, J.M., The evolving concept of a stem cell: entity or function?, *Cell*, 105, 829-41, **2001**.
- [26] Li, J.Z., Li, H., Sasaki, T., Holman, D., Beres, B., Dumont, R.J., Pittman, D.D., Hankins, G.R., Helm, G.A., Osteogenic potential of five different recombinant human bone morphogenetic protein adenoviral vectors in the rat, *Gene Therapy*, 10, 1735-43, **2003**.
- [27] Caplan, A.I., Mesenchymal stem cells, *Journal of Orthopaedic Research : Official Publication of the Orthopaedic Research Society*, 9, 641-50, **1991**.
- [28] Pittenger, M.F., Mackay, A.M., Beck, S.C., Jaiswal, R.K., Douglas, R., Mosca, J.D., Moorman, M.A., Simonetti, D.W., Craig, S., Marshak, D.R., Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells, *Science*, 284, 143-7, **1999**.
- [29] Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D., Horwitz, E., Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement, *Cytotherapy*, 8, 315-7, **2006**.
- [30] Zuk, P.A., Zhu, M., Ashjian, P., De Ugarte, D.A., Huang, J.I., Mizuno, H., Alfonso, Z.C., Fraser, J.K., Benhaim, P., Hedrick, M.H., Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells, *Molecular Biology of the Cell*, 13, 4279-95, **2002**.
- [31] Liu, L., Saldanha, S.N., Pate, M.S., Andrews, L.G., Tollefsbol, T.O., Epigenetic regulation of human telomerase reverse transcriptase promoter activity during cellular differentiation, *Genes, Chromosomes & Cancer*, 41, 26-37, **2004**.
- [32] Horwitz, E.M., Gordon, P.L., Koo, W.K., Marx, J.C., Neel, M.D., McNall, R.Y., Muul, L., Hofmann, T., Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications

for cell therapy of bone, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 8932-7, **2002**.

- [33] Ichinose, S., Yamagata, K., Sekiya, I., Muneta, T., Tagami, M., Detailed examination of cartilage formation and endochondral ossification using human mesenchymal stem cells, *Clinical And Experimental Pharmacology & Physiology*, 32, 561-70, **2005**.
- [34] Ma, P.X., Zhang, R., Xiao, G., Franceschi, R., Engineering new bone tissue in vitro on highly porous poly(alpha-hydroxyl acids)/hydroxyapatite composite scaffolds, *Journal Oof Biomedical Materials Research*, 54, 284-93, **2001**.
- [35] Vaananen, H.K., Mesenchymal stem cells, *Annals of Medicine*, 37, 469-79, **2005**.
- [36] Hollinger, J.O., Battistone, G.C., Biodegradable bone repair materials. Synthetic polymers and ceramics, *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 290-305, **1986**.
- [37] Cetin, D., Kahraman, A.S., Gumusderelioglu, M., Novel Scaffolds Based on Poly(2-hydroxyethyl methacrylate) Superporous Hydrogels for Bone Tissue Engineering, *Journal of Biomaterials Science Polymer Edition*, 1157-78, **2011**.
- [38] Demirtas, T.T., Karakeçili, A.G., Gumusderelioglu, M., Hydroxyapatite containing superporous hydrogel composites: synthesis and in-vitro characterization, *Journal of Materials Science Materials in Medicine*, 19, 729-35, **2008**.
- [39] Li, Z., Yubao, L., Aiping, Y., Xuelin, P., Xuejiang, W., Xiang, Z., Preparation and in vitro investigation of chitosan/nano-hydroxyapatite composite used as bone substitute materials, *Journal of Materials Science Materials in Medicine*, 16, 213-9, **2005**.
- [40] Teng, S.H., Lee, E.J., Wang, P., Jun, S.H., Han, C.M., Kim, H.E., Functionally gradient chitosan/hydroxyapatite composite scaffolds for controlled drug release, *Journal of biomedical materials research Part B, Applied Biomaterials*, 90, 275-82, **2009**.
- [41] Bhumiratana, S., Grayson, W.L., Castaneda, A., Rockwood, D.N., Gil, E.S., Kaplan, D.L., Vunjak-Novakovic, G., Nucleation and growth of mineralized bone matrix on silk-hydroxyapatite composite scaffolds, *Biomaterials*, 32, 2812-20, **2011**.
- [42] Liu, X., Ma, P.X., Polymeric scaffolds for bone tissue engineering, *Annals of Biomedical Engineering*, 32, 477-86, **2004**.
- [43] Hutmacher, D.W., Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage, *Biomaterials*, 21, 2529-43, **2000**.
- [44] Levengood, S.L., Zhang, M., Chitosan-based scaffolds for bone tissue engineering, *Journal of materials chemistry B, Materials for Biology and Medicine*, 2, 3161-84, **2014**.
- [45] Lacroix, D., Prendergast, P.J., Li, G., Marsh, D., Biomechanical model to simulate tissue differentiation and bone regeneration: application to fracture healing, *Medical & Biological Engineering & Computing*, 40, 14-21, **2002**.
- [46] Balint, R., Cassidy, N.J., Cartmell, S.H., Electrical stimulation: a novel tool for tissue engineering, *Tissue Engineering Part B, Reviews*, 19, 48-57, **2013**.
- [47] Chao, E.Y., Inoue, N., Biophysical stimulation of bone fracture repair, regeneration and remodelling, *European Cells & Materials*, 6, 72-84,, **2003**.

- [48] Yang, S.F., Leong, K.F., Du, Z.H., Chua, C.K., The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part II. Rapid prototyping techniques, *Tissue Engineering*, 8, 1-11, **2002**.
- [49] Whang, K., Thomas, C.H., Healy, K.E., Nuber, G., A novel method to fabricate bioabsorbable scaffolds, *Polymer*, 36, 837-42, **1995**.
- [50] Gaspar, L., Professor Endre Mester, the father of photobiomodulation, *Journal of Laser Dentistry*, 17, 146-8, **2009**.
- [51] Karu, T.I., *Low-Power Laser Therapy*. CRC Press, **2003**.
- [52] Conlan, M.J., Rapley, J.W., Cobb, C.M., Biostimulation of wound healing by low-energy laser irradiation. A review, *Journal of Clinical Periodontology*, 23, 492-6, **1996**.
- [53] Yu, W., Naim, J.O., Lanzafame, R.J., Effects of photostimulation on wound healing in diabetic mice, *Lasers in Surgery and Medicine*, 20, 56-63, **1997**.
- [54] Assia, E., Rosner, M., Belkin, M., Solomon, A., Schwartz, M., Temporal parameters of low energy laser irradiation for optimal delay of post-traumatic degeneration of rat optic nerve, *Brain Research*, 476, 205-12, **1989**.
- [55] Bibikova, A., Oron, U., Promotion of muscle regeneration in the toad (*Bufo viridis*) gastrocnemius muscle by low-energy laser irradiation, *The Anatomical Record*, 235, 374-80, **1993**.
- [56] Weiss, N., Oron, U., Enhancement of muscle regeneration in the rat gastrocnemius muscle by low energy laser irradiation, *Anatomy and Embryology*, 186, 497-503, **1992**.
- [57] Kawasaki, K., Shimizu, N., Effects of low-energy laser irradiation on bone remodeling during experimental tooth movement in rats, *Lasers in Surgery and Medicine*, 26, 282-91, **2000**.
- [58] Kim, H.K., Kim, J.H., Abbas, A.A., Kim, D.O., Park, S.J., Chung, J.Y., Song, E.K., Yoon, T.R., Red light of 647 nm enhances osteogenic differentiation in mesenchymal stem cells, *Lasers in Medical Science*, 24, 214-22, **2009**.
- [59] Soleimani, M., Abbasnia, E., Fathi, M., Sahraei, H., Fathi, Y., Kaka, G., The effects of low-level laser irradiation on differentiation and proliferation of human bone marrow mesenchymal stem cells into neurons and osteoblasts--an *in vitro* study, *Lasers in Medical Science*, 27, 423-30, **2012**.
- [60] Abramovitch-Gottlib, L., Gross, T., Naveh, D., Geresh, S., Rosenwaks, S., Bar, I., Vago, R., Low level laser irradiation stimulates osteogenic phenotype of mesenchymal stem cells seeded on a three-dimensional biomatrix, *Lasers in Medical Science*, 20, 138-46, **2005**.
- [61] Huang, Y.Y., Chen, A.C., Carroll, J.D., Hamblin, M.R., Biphasic dose response in low level light therapy, *Dose-response : a Publication of International Hormesis Society*, 7, 358-83, **2009**.
- [62] Ülker, N., *Işık-Etkili Kemik Doku Mühendisliği*. Ankara, Hacettepe Üniversitesi **2013**
- [63] Anonim, <http://www.pion.cz/en/article/electromagnetic-spectrum> (Temmuz, **2014**).

- [64] Dederich, D.N., Bushick, R.D., Affairs, A.D.A.C.o.S., Division of, S., Journal of the American Dental, A., Lasers in dentistry: separating science from hype, *Journal of the American Dental Association*, 135, 204-12, **2004**.
- [65] Rueggeberg, F., Contemporary issues in photocuring, *Compendium of Continuing Education in Dentistry (Jamesburg, NJ : 1995) Supplement*, S4-15; quiz S73, **1999**.
- [66] M.S., B., *Rezin esaslı fissür örtücülerin farklı ışık kaynaklarıyla polimerizasyonu sonrasında açığa çıkan artık monomer miktarının, yüzey sertliğinin ve bağlanma dayanımının araştırılması*. Konya, Selçuk Üniversitesi **2008**.
- [67] Karu, T., Pyatibrat, L., Kalendo, G., Irradiation with He-Ne laser increases ATP level in cells cultivated in vitro, *Journal of Photochemistry and Photobiology B, Biology*, 27, 219-23, **1995**.
- [68] Corr, L., Burnstock, G., Analysis of P2-purinoceptor subtypes on the smooth muscle and endothelium of rabbit coronary artery, *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 23, 709-15, **1994**.
- [69] Kalthof, B., Bechem, M., Flocke, K., Pott, L., Schramm, M., Kinetics of ATP-induced Ca^{2+} transients in cultured pig aortic smooth muscle cells depend on ATP concentration and stored Ca^{2+} , *The Journal of Physiology*, 466, 245-62, **1993**.
- [70] Kitajima, S., Ozaki, H., Karaki, H., Role of different subtypes of P2 purinoceptor on cytosolic Ca^{2+} levels in rat aortic smooth muscle, *European Journal of Pharmacology*, 266, 263-7, **1994**.
- [71] Malam-Souley, R., Seye, C., Gadeau, A.P., Loirand, G., Pillois, X., Campan, M., Pacaud, P., Desgranges, C., Nucleotide receptor P2u partially mediates ATP-induced cell cycle progression of aortic smooth muscle cells, *Journal of Cellular Physiology*, 166, 57-65, **1996**.
- [72] Wilden, P.A., Agazie, Y.M., Kaufman, R., Halenda, S.P., ATP-stimulated smooth muscle cell proliferation requires independent ERK and PI3K signaling pathways, *The American Journal of Physiology*, 275, H1209-15, **1998**.
- [73] Kohno, M., Pouyssegur, J., Targeting the ERK signaling pathway in cancer therapy, *Annals of Medicine*, 38, 200-11, **2006**.
- [74] Karu, T.I., Kolyakov, S.F., Exact action spectra for cellular responses relevant to phototherapy, *Photomedicine and Laser Surgery*, 23, 355-61, **2005**.
- [75] Brown, G.C., Regulation of mitochondrial respiration by nitric oxide inhibition of cytochrome c oxidase, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1504, 46-57, **2001**.
- [76] Lane, N., Cell biology: Power games, *Nature*, 443, 901-3, **2006**.
- [77] Bentley, J.K., Newcomb, D.C., Goldsmith, A.M., Jia, Y., Sajjan, U.S., Hershenson, M.B., Rhinovirus activates interleukin-8 expression via a Src/p110beta phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in human airway epithelial cells, *Journal of Virology*, 81, 1186-94, **2007**.
- [78] Chen, A.C., Arany, P.R., Huang, Y.Y., Tomkinson, E.M., Sharma, S.K., Kharkwal, G.B., Saleem, T., Mooney, D., Yull, F.E., Blackwell, T.S., Hamblin, M.R., Low-level laser therapy activates NF-kB via generation of reactive oxygen species in mouse embryonic fibroblasts, *PloS One*, 6, e22453, **2011**.

- [79] Zhang, J., Xing, D., Gao, X., Low-power laser irradiation activates Src tyrosine kinase through reactive oxygen species-mediated signaling pathway, *Journal of Cellular Physiology*, 217, 518-28, **2008**.
- [80] AlGhamdi, K.M., Kumar, A., Moussa, N.A., Low-level laser therapy: a useful technique for enhancing the proliferation of various cultured cells, *Lasers in Medical Science*, 27, 237-49, **2012**.
- [81] Ushio-Fukai, M., Alexander, R.W., Akers, M., Yin, Q., Fujio, Y., Walsh, K., Griendling, K.K., Reactive Oxygen Species Mediate the Activation of Akt/Protein Kinase B by Angiotensin II in Vascular Smooth Muscle Cells, *Journal of Biological Chemistry*, 274, 22699-704, **1999**.
- [82] Wang, X., Epidermal Growth Factor Receptor-dependent Akt Activation by Oxidative Stress Enhances Cell Survival, *Journal of Biological Chemistry*, 275, 14624-31, **2000**.
- [83] Pal, G., Dutta, A., Mitra, K., Grace, M.S., Romanczyk, T.B., Wu, X., Chakrabarti, K., Anders, J., Gorman, E., Waynant, R.W., Tata, D.B., Effect of low intensity laser interaction with human skin fibroblast cells using fiber-optic nano-probes, *Journal of Photochemistry and Photobiology B, Biology*, 86, 252-61, **2007**.
- [84] Pinheiro, A.L., Carneiro, N.S., Vieira, A.L., Brugnera, A., Jr., Zanin, F.A., Barros, R.A., Silva, P.S., Effects of low-level laser therapy on malignant cells: *in vitro* study, *Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery*, 20, 23-6, **2002**.
- [85] Takac, S., Stojanovic, S., Diagnostic and biostimulating lasers, *Medicinski Pregled*, 51, 245-9, **1998**.
- [86] Yu, W., Naim, J.O., McGowan, M., Ippolito, K., Lanzafame, R.J., Photomodulation of oxidative metabolism and electron chain enzymes in rat liver mitochondria, *Photochemical Photobiology*, 66, 866-71, **1997**.
- [87] Moore, P., Ridgway, T.D., Higbee, R.G., Howard, E.W., Lucroy, M.D., Effect of wavelength on low-intensity laser irradiation-stimulated cell proliferation *in vitro*, *Lasers in Surgery and Medicine*, 36, 8-12, **2005**.
- [88] Smith, K.C., The Photobiological Basis of Low Level Laser Radiation Therapy, *Laser Therapy* 3, 19-24, **1991**.
- [89] Hou, J.F., Zhang, H., Yuan, X., Li, J., Wei, Y.J., Hu, S.S., *In vitro* effects of low-level laser irradiation for bone marrow mesenchymal stem cells: proliferation, growth factors secretion and myogenic differentiation, *Lasers in Surgery and Medicine*, 40, 726-33, **2008**.
- [90] Tuby, H., Maltz, L., Oron, U., Low-level laser irradiation (LLLI) promotes proliferation of mesenchymal and cardiac stem cells in culture, *Lasers in Surgery and Medicine*, 39, 373-8, **2007**.
- [91] Mvula, B., Mathope, T., Moore, T., Abrahamse, H., The effect of low level laser irradiation on adult human adipose derived stem cells, *Lasers in Medical Science*, 23, 277-82, **2008**.
- [92] Eduardo Fde, P., Bueno, D.F., de Freitas, P.M., Marques, M.M., Passos-Bueno, M.R., Eduardo Cde, P., Zatz, M., Stem cell proliferation under low intensity laser irradiation: a preliminary study, *Lasers in Surgery and Medicine*, 40, 433-8, **2008**.

- [93] Loevschall, H., Arenholt-Bindslev, D., Effect of low level diode laser irradiation of human oral mucosa fibroblasts in vitro, *Lasers in surgery and medicine*, 14, 347-54, **1994**.
- [94] Bolton, P.Y., Steve; Dyson, Mary, The direct effect of 860 nm light on cell proliferation and on succinic dehydrogenase activity of human fibroblasts in vitro, *Laser Therapy*, 7, 55-60, **1995**.
- [95] Pourreau-Schneider, N., Ahmed, A., Soudry, M., Jacquemier, J., Kopp, F., Franquin, J.C., Martin, P.M., Helium-Neon Laser Treatment Transforms Fibroblasts into Myofibroblasts, *American Journal of Pathology*, 137, 171-8, **1990**.
- [96] Yu, W., Naim, J.O., Lanzafame, R.J., The effect of laser irradiation on the release of bFGF from 3T3 fibroblasts, *Photochemical Photobiology*, 59, 167-70, **1994**.
- [97] Grossman, N., Schneid, N., Reuveni, H., Halevy, S., Lubart, R., 780 nm low power diode laser irradiation stimulates proliferation of keratinocyte cultures: involvement of reactive oxygen species, *Lasers in Surgery and Medicine*, 22, 212-8, **1998**.
- [98] Almeida-Lopes, L., Rigau, J., Zangaro, R.A., Guidugli-Neto, J., Jaeger, M.M., Comparison of the low level laser therapy effects on cultured human gingival fibroblasts proliferation using different irradiance and same fluence, *Lasers in Surgery and Medicine*, 29, 179-84, **2001**.
- [99] Kreisler, M., Christoffers, A.B., Al-Haj, H., Willershausen, B., d'Hoedt, B., Low level 809-nm diode laser-induced in vitro stimulation of the proliferation of human gingival fibroblasts, *Lasers in Surgery and Medicine*, 30, 365-9, **2002**.
- [100] Pereira, A.N., Eduardo Cde, P., Matson, E., Marques, M.M., Effect of low-power laser irradiation on cell growth and procollagen synthesis of cultured fibroblasts, *Lasers in Surgery and Medicine*, 31, 263-7, **2002**.
- [101] Marques, M.M., Pereira, A.N., Fujihara, N.A., Nogueira, F.N., Eduardo, C.P., Effect of low-power laser irradiation on protein synthesis and ultrastructure of human gingival fibroblasts, *Lasers in Surgery and Medicine*, 34, 260-5, **2004**.
- [102] Sommer, A.P., Pinheiro, A.L., Mester, A.R., Franke, R.P., Whelan, H.T., Biostimulatory windows in low-intensity laser activation: lasers, scanners, and NASA's light-emitting diode array system, *Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery*, 19, 29-33, **2001**.
- [103] Fujihara, N.A., Hiraki, K.R., Marques, M.M., Irradiation at 780 nm increases proliferation rate of osteoblasts independently of dexamethasone presence, *Lasers in Surgery and Medicine*, 38, 332-6, **2006**.
- [104] Fei, P., Hua, W. 620Nm Red Light Promotes Cellular Viability and Mrna Expression of Collagen Type I in Bone Mesenchymal Stem Cells of Rat, *Photonics and Optoelectronic (SOPO)*, 2010 Symposium1-3, **2010**.
- [105] Khadra, M., Lyngstadaas, S.P., Haanaes, H.R., Mustafa, K., Effect of laser therapy on attachment, proliferation and differentiation of human osteoblast-like cells cultured on titanium implant material, *Biomaterials*, 26, 3503-9, **2005**.
- [106] Bouvet-Gerbetaz, S., Merigo, E., Rocca, J.P., Carle, G.F., Rochet, N., Effects of low-level laser therapy on proliferation and differentiation of murine bone marrow cells into osteoblasts and osteoclasts, *Lasers in Surgery and Medicine*, 41, 291-7, **2009**.

- [107] Cheong, S.-K., Krishnan, S., Cho, S.H., Modeling of plasmonic heating from individual gold nanoshells for near-infrared laser-induced thermal therapy, *Medical Physics*, 36, 4664, **2009**.
- [108] Rayegani, S.M., Bayaat, M., Sedighipour, L., Samadi, B., Low Intensity Laser Therapy, Basics and Clinical Applications, *Journal of Lasers in Medical Sciences*, 1, 31-4,, **2010**.
- [109] Liu, X.G., Zhou, Y.J., Liu, T.C., Yuan, J.Q., Effects of low-level laser irradiation on rat skeletal muscle injury after eccentric exercise, *Photomedicine and Laser Surgery*, 27, 863-9, **2009**.
- [110] Song, B., Zhao, M., Forrester, J.V., McCaig, C.D., Electrical cues regulate the orientation and frequency of cell division and the rate of wound healing in vivo, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 13577-82, **2002**.
- [111] Zhao, M., Electrical fields in wound healing-An overriding signal that directs cell migration, *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 20, 674-82, **2009**.
- [112] McCaig, C.D., Rajniecek, A.M., Song, B., Zhao, M., Controlling cell behavior electrically: current views and future potential, *Physiological Reviews*, 85, 943-78, **2005**.
- [113] Illingworth, C.M., Barker, A.T., Measurement of electrical currents emerging during the regeneration of amputated finger tips in children, *Clinical Physics and Physiological Measurement*, 1, 87, **1980**.
- [114] Ercan, B., Webster, T.J., The effect of biphasic electrical stimulation on osteoblast function at anodized nanotubular titanium surfaces, *Biomaterials*, 31, 3684-93, **2010**.
- [115] Huang, C.P., Chen, X.M., Chen, Z.Q., Osteocyte: the impresario in the electrical stimulation for bone fracture healing, *Medical Hypotheses*, 70, 287-90, **2008**.
- [116] Xu, J., Wang, W., Clark, C.C., Brighton, C.T., Signal transduction in electrically stimulated articular chondrocytes involves translocation of extracellular calcium through voltage-gated channels, *Osteoarthritis and Cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society*, 17, 397-405, **2009**.
- [117] Titushkin, I., Cho, M., Regulation of cell cytoskeleton and membrane mechanics by electric field: role of linker proteins, *Biophysical Journal*, 96, 717-28, **2009**.
- [118] Zhao, M., Bai, H., Wang, E., Forrester, J.V., McCaig, C.D., Electrical stimulation directly induces pre-angiogenic responses in vascular endothelial cells by signaling through VEGF receptors, *Journal of Cell Science*, 117, 397-405, **2004**.
- [119] Tandon, N., Cannizzaro, C., Chao, P.H., Maidhof, R., Marsano, A., Au, H.T., Radisic, M., Vunjak-Novakovic, G., Electrical stimulation systems for cardiac tissue engineering, *Nature Protocols*, 4, 155-73, **2009**.
- [120] Hronik-Tupaj, M., Kaplan, D.L., A review of the responses of two- and three-dimensional engineered tissues to electric fields, *Tissue Engineering Part B, Reviews*, 18, 167-80, **2012**.
- [121] Fassina, L., Visai, L., Saino, E., De Angelis, M.G.C., Benazzo, F., Magenes, G., Surface modification of titanium fiber-mesh scaffolds through a culture of human SAOS-2 osteoblasts electromagnetically stimulated, *11th Mediterranean Conference on Medical and Biological Engineering and Computing 2007*, 16, 238-41, **2007**.

- [122] Borschel, G.H., Dennis, R.G., Kuzon, W.M., Jr., Contractile skeletal muscle tissue-engineered on an acellular scaffold, *Plastic and Reconstructive Surgery*, 113, 595-602, **2004**.
- [123] Funk, R.H., Monsees, T., Ozkucur, N., Electromagnetic effects - From cell biology to medicine, *Progress in Histochemistry and Cytochemistry*, 43, 177-264, **2009**.
- [124] Lin, F., Baldessari, F., Gyenge, C.C., Sato, T., Chambers, R.D., Santiago, J.G., Butcher, E.C., Lymphocyte electrotaxis *in vitro* and *in vivo*, *Journal of Immunology*, 181, 2465-71, **2008**.
- [125] Li, J.K., Lin, J.C., Liu, H.C., Sun, J.S., Ruaan, R.C., Shih, C., Chang, W.H., Comparison of ultrasound and electromagnetic field effects on osteoblast growth, *Ultrasound in Medicine & Biology*, 32, 769-75, **2006**.
- [126] Nuccitelli, R. A Role for Endogenous Electric Fields in Wound Healing. *Current Topics in Developmental Biology*, Academic Press; 1-26, **2003**.
- [127] Titushkin, I., Sun, S., Shin, J., Cho, M., Physicochemical control of adult stem cell differentiation: shedding light on potential molecular mechanisms, *Journal of Biomedicine & Biotechnology*, 2010, 743476, **2010**.
- [128] Kim, I.S., Song, J.K., Song, Y.M., Cho, T.H., Lee, T.H., Lim, S.S., Kim, S.J., Hwang, S.J., Novel effect of biphasic electric current on *in vitro* osteogenesis and cytokine production in human mesenchymal stromal cells, *Tissue Engineering Part A*, 15, 2411-22, **2009**.
- [129] Levin, M., Large-scale biophysics: ion flows and regeneration, *Trends in Cell Biology*, 17, 261-70, **2007**.
- [130] Sun, S., Liu, Y., Lipsky, S., Cho, M., Physical manipulation of calcium oscillations facilitates osteodifferentiation of human mesenchymal stem cells, *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 21, 1472-80, **2007**.
- [131] Akanji, O.O., Lee, D.A., Bader, D.A., The effects of direct current stimulation on isolated chondrocytes seeded in 3D agarose constructs, *Biorheology*, 45, 229-43, **2008**.
- [132] Hronik-Tupaj, M., Rice, W.L., Cronin-Golomb, M., Kaplan, D.L., Georgakoudi, I., Osteoblastic differentiation and stress response of human mesenchymal stem cells exposed to alternating current electric fields, *Biomedical Engineering* 10, 9, **2011**.
- [133] Radisic, M., Park, H., Shing, H., Consi, T., Schoen, F.J., Langer, R., Freed, L.E., Vunjak-Novakovic, G., Functional assembly of engineered myocardium by electrical stimulation of cardiac myocytes cultured on scaffolds, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, 18129-34, **2004**.
- [134] Blumenthal, N.C., Ricci, J., Breger, L., Zychlinsky, A., Solomon, H., Chen, G.G., Kuznetsov, D., Dorfman, R., Effects of low-intensity AC and/or DC electromagnetic fields on cell attachment and induction of apoptosis, *Bioelectromagnetics*, 18, 264-72, **1997**.
- [135] George, I., Geddis, M.S., Lill, Z., Lin, H., Gomez, T., Blank, M., Oz, M.C., Goodman, R., Myocardial function improved by electromagnetic field induction of stress protein hsp70, *Journal of Cellular Physiology*, 216, 816-23, **2008**.

- [136] Jahns, M.E., Lou, E., Durdle, N.G., Bagnall, K., Raso, V.J., Cinats, D., Barley, R.D., Cinats, J., Jomha, N.M., The effect of pulsed electromagnetic fields on chondrocyte morphology, *Medical & Biological Engineering & Computing*, 45, 917-25, **2007**.
- [137] Hammerick, K.E., Longaker, M.T., Prinz, F.B., In vitro effects of direct current electric fields on adipose-derived stromal cells, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 397, 12-7, **2010**.
- [138] Brighton, C.T., Black, J., Friedenberg, Z.B., Esterhai, J.L., Day, L.J., Connolly, J.F., A multicenter study of the treatment of non-union with constant direct current, *The Journal of Bone and Joint Surgery American volume*, 63, 2-13, **1981**.
- [139] Franek, A., Polak, A., Kucharzewski, M., Modern application of high voltage stimulation for enhanced healing of venous crural ulceration, *Medical Engineering & Physics*, 22, 647-55, **2000**.
- [140] Brighton, C.T., Wang, W., Seldes, R., Zhang, G., Pollack, S.R., Signal transduction in electrically stimulated bone cells, *The Journal of Bone and Joint Surgery American Volume*, 83-A, 1514-23, **2001**.
- [141] Marsell, R., Einhorn, T.A., The biology of fracture healing, *Injury*, 42, 551-5, **2011**.
- [142] Kon, T., Cho, T.J., Aizawa, T., Yamazaki, M., Nooh, N., Graves, D., Gerstenfeld, L.C., Einhorn, T.A., Expression of osteoprotegerin, receptor activator of NF-kappaB ligand (osteoprotegerin ligand) and related proinflammatory cytokines during fracture healing, *Journal of Bone and Mineral Research*, 1004-14, **2001**.
- [143] Gerstenfeld, L.C., Cho, T.J., Kon, T., Aizawa, T., Tsay, A., Fitch, J., Barnes, G.L., Graves, D.T., Einhorn, T.A., Impaired fracture healing in the absence of TNF-alpha signaling: the role of TNF-alpha in endochondral cartilage resorption, *Journal of Bone and Mineral Research*, 18, 1584-92, **2003**.
- [144] Street, J., Bao, M., deGuzman, L., Bunting, S., Peale, F.V., Jr., Ferrara, N., Steinmetz, H., Hoeffel, J., Cleland, J.L., Daugherty, A., van Bruggen, N., Redmond, H.P., Carano, R.A., Filvaroff, E.H., Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 9656-61, **2002**.
- [145] Borgens, R.B., Endogenous ionic currents traverse intact and damaged bone, *Science*, 225, 478-82, **1984**.
- [146] Huczynski, A., Janczak, J., Lowicki, D., Brzezinski, B., Monensin A acid complexes as a model of electrogenic transport of sodium cation, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1818, 2108-19, **2012**.
- [147] Riddell, F.G., Structure, conformation, and mechanism in the membrane transport of alkali metal ions by ionophoric antibiotics, *Chirality*, 14, 121-5, **2002**.
- [148] Serrano-Martin, X., Payares, G., Mendoza-Leon, A., Glibenclamide, a blocker of K⁺(ATP) channels, shows antileishmanial activity in experimental murine cutaneous leishmaniasis, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50, 4214-6, **2006**.
- [149] Karageorgiou, V., Kaplan, D., Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis, *Biomaterials*, 26, 5474-91, **2005**.
- [150] Lawrence, B.D., Marchant, J.K., Pindrus, M.A., Omenetto, F.G., Kaplan, D.L., Silk film biomaterials for cornea tissue engineering, *Biomaterials*, 30, 1299-308, **2009**.

- [151] Rockwood, D.N., Preda, R.C., Yucel, T., Wang, X., Lovett, M.L., Kaplan, D.L., Materials fabrication from Bombyx mori silk fibroin, *Nature Protocols*, 6, 1612-31, **2011**.
- [152] Nazarov, R., Jin, H.J., Kaplan, D.L., Porous 3-D scaffolds from regenerated silk fibroin, *Biomacromolecules*, 5, 718-26, **2004**.
- [153] Sofia, S., McCarthy, M.B., Gronowicz, G., Kaplan, D.L., Functionalized silk-based biomaterials for bone formation, *Journal of Biomedical Materials Research*, 54, 139-48, **2001**.
- [154] Capkin, M., Cakmak, S., Kurt, F.O., Gumusderelioglu, M., Sen, B.H., Turk, B.T., Deliloglu-Gurhan, S.I., Random/aligned electrospun PCL/PCL-collagen nanofibrous membranes: comparison of neural differentiation of rat AdMSCs and BMSCs, *Biomedical Materials*, 7, 045013, **2012**.
- [155] Karaoz, E., Aksoy, A., Ayhan, S., Sariboyaci, A.E., Kaymaz, F., Kasap, M., Characterization of mesenchymal stem cells from rat bone marrow: ultrastructural properties, differentiation potential and immunophenotypic markers, *Histochemistry and Cell Biology*, 132, 533-46, **2009**.
- [156] Suck, K., Behr, L., Fischer, M., Hoffmeister, H., van Griensven, M., Stahl, F., Scheper, T., Kasper, C., Cultivation of MC3T3-E1 cells on a newly developed material (Sponceram) using a rotating bed system bioreactor, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 80, 268-75, **2007**.
- [157] Meinel, L., Karageorgiou, V., Hofmann, S., Fajardo, R., Snyder, B., Li, C., Zichner, L., Langer, R., Vunjak-Novakovic, G., Kaplan, D.L., Engineering bone-like tissue in vitro using human bone marrow stem cells and silk scaffolds, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 71, 25-34, **2004**.
- [158] Altman, G.H., Horan, R.L., Martin, I., Farhadi, J., Stark, P.R., Volloch, V., Richmond, J.C., Vunjak-Novakovic, G., Kaplan, D.L., Cell differentiation by mechanical stress, *FASEB journal*, 16, 270-2, **2002**.
- [159] Camassola, M., de Macedo Braga, L.M., Chagastelles, P.C., Nardi, N.B., Methodology, biology and clinical applications of human mesenchymal stem cells, *Methods in Molecular Biology (Clifton, NJ)*, 879, 491-504, **2012**.
- [160] Croisier, F., Jérôme, C., Chitosan-based biomaterials for tissue engineering, *European Polymer Journal*, 49, 780-92, **2013**.
- [161] Karakecili, A.G., Satriano, C., Gumusderelioglu, M., Marletta, G., Enhancement of fibroblastic proliferation on chitosan surfaces by immobilized epidermal growth factor, *Acta Biomaterialia*, 4, 989-96, **2008**.
- [162] Kutlu, C., Cakmak, A.S., Gumusderelioglu, M., Double-effective chitosan scaffold-PLGA nanoparticle system for brain tumour therapy: *in vitro* study, *Journal of Microencapsulation*, 1-8, **2014**.
- [163] Jayakumar, R., Prabakaran, M., Sudheesh Kumar, P.T., Nair, S.V., Tamura, H., Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications, *Biotechnology Advances*, 29, 322-37, **2011**.
- [164] Seol, Y.J., Lee, J.Y., Park, Y.J., Lee, Y.M., Young-Ku, Rhyu, I.C., Lee, S.J., Han, S.B., Chung, C.P., Chitosan sponges as tissue engineering scaffolds for bone formation, *Biotechnology Letters*, 26, 1037-41, **2004**.

- [165] Costa-Pinto, A.R., Reis, R.L., Neves, N.M., Scaffolds based bone tissue engineering: the role of chitosan, *Tissue Engineering Part B, Reviews*, 17, 331-47, **2011**.
- [166] Lee, J.H., Kim, J.H., Oh, S.H., Kim, S.J., Hah, Y.S., Park, B.W., Kim, D.R., Rho, G.J., Maeng, G.H., Jeon, R.H., Lee, H.C., Kim, J.R., Kim, G.C., Kim, U.K., Byun, J.H., Tissue-engineered bone formation using periosteal-derived cells and polydioxanone/pluronic F127 scaffold with pre-seeded adipose tissue-derived CD146 positive endothelial-like cells, *Biomaterials*, 32, 5033-45, **2011**.
- [167] Freyman, T.M., Yannas, I.V., Gibson, L.J., Cellular materials as porous scaffolds for tissue engineering, *Progress in Materials Science*, 46, 273-82, **2001**.
- [168] Tigli, R.S., *Kırdak Doku Rejenerasyonunda Kitosan Doku İskelesi Destekli Biyoreaktör Performansının İncelenmesi* Ankara, Hacettepe Üniversitesi **2009**.
- [169] Wang, Y., Kim, H.J., Vunjak-Novakovic, G., Kaplan, D.L., Stem cell-based tissue engineering with silk biomaterials, *Biomaterials*, 27, 6064-82, **2006**.
- [170] Altman, G.H., Diaz, F., Jakuba, C., Calabro, T., Horan, R.L., Chen, J., Lu, H., Richmond, J., Kaplan, D.L., Silk-based biomaterials, *Biomaterials*, 24, 401-16, **2003**.
- [171] Minoura, N., Tsukada, M., Nagura, M., Fine structure and oxygen permeability of silk fibroin membrane treated with methanol, *Polymer*, 31, 265-9, **1990**.
- [172] Sakabe, H., Ito, H., Miyamoto, T., Noishiki, Y., Ha, W.S., *In vivo* blood compatibility of regenerated silk fibroin, *Sen'i Gakkaishi*, 45, 487-90, **1989**.
- [173] Santin, M., Motta, A., Freddi, G., Cannas, M., In vitro evaluation of the inflammatory potential of the silk fibroin, *Journal of Biomedical Materials Research*, 46, 382-9, **1999**.
- [174] Gotoh, Y., Tsukada, M., Minoura, N., Effect of the chemical modification of the arginyl residue in Bombyx mori silk fibroin on the attachment and growth of fibroblast cells, *Journal of Biomedical Materials Research*, 39, 351-7, **1998**.
- [175] Inouye, K., Kurokawa, M., Nishikawa, S., Tsukada, M., Use of Bombyx mori silk fibroin as a substratum for cultivation of animal cells, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 37, 159-64, **1998**.
- [176] Hu, X., Shmelev, K., Sun, L., Gil, E.S., Park, S.H., Cebe, P., Kaplan, D.L., Regulation of silk material structure by temperature-controlled water vapor annealing, *Biomacromolecules*, 12, 1686-96, **2011**.
- [177] Min, B.-M., Jeong, L., Lee, K.Y., Park, W.H., Regenerated Silk Fibroin Nanofibers: Water Vapor-Induced Structural Changes and Their Effects on the Behavior of Normal Human Cells, *Macromolecular Bioscience*, 6, 285-92, **2006**.
- [178] Kim, H.J., Kim, H.S., Matsumoto, A., Chin, I., Jin, H., Kaplan, D.L., Processing Windows for Forming Silk Fibroin Biomaterials into a 3D Porous Matrix, *Australian Journal of Chemistry*, 58, 716-20, **2005**.
- [179] Kim, U.J., Park, J., Kim, H.J., Wada, M., Kaplan, D.L., Three-dimensional aqueous-derived biomaterial scaffolds from silk fibroin, *Biomaterials*, 26, 2775-85, **2005**.
- [180] Li, G., Zhou, P., Shao, Z., Xie, X., Chen, X., Wang, H., Chunyu, L., Yu, T., The natural silk spinning process. A nucleation-dependent aggregation mechanism, *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 268, 6600-6, **2001**.

- [181] Zhou, C.Z., Confalonieri, F., Medina, N., Zivanovic, Y., Esnault, C., Yang, T., Jacquet, M., Janin, J., Duguet, M., Perasso, R., Li, Z.G., Fine organization of Bombyx mori fibroin heavy chain gene, *Nucleic Acids Research*, 28, 2413-9, **2000**.
- [182] Braun, F., Modelling self assembly of natural silk solutions, *International Journal of Biological Macromolecules*, 32, 59-65, **2003**.
- [183] Karakecili, A., Satriano, C., Gumusderelioglu, M., Marletta, G., Relationship between the fibroblastic behaviour and surface properties of RGD-immobilized PCL membranes, *Journal of Materials Science Materials in Medicine*, 18, 317-9, **2007**.
- [184] Chen, J., Altman, G.H., Karageorgiou, V., Horan, R., Collette, A., Volloch, V., Colabro, T., Kaplan, D.L., Human bone marrow stromal cell and ligament fibroblast responses on RGD-modified silk fibers, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 67, 559-70, **2003**.
- [185] Kardestuncer, T., McCarthy, M.B., Karageorgiou, V., Kaplan, D., Gronowicz, G., RGD-tethered silk substrate stimulates the differentiation of human tendon cells, *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 448, 234-9, **2006**.
- [186] İsmail Karaboz, E.K., Suna Akar, Flow Sitometri ve Kullanım Alanları, *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi TR*, 6, 1-18, **2008**.
- [187] Beşkardeş, I.G., *Mezenkimal Kök Hücrelerin Osteojenik Farklılaşmasında Çeşitli Biyoreaktör Performanslarının Karşılaştırılması*, Ankara, Hacettepe Üniversitesi **2014**.
- [188] Kassem, M., Abdallah, B.M., Human bone-marrow-derived mesenchymal stem cells: biological characteristics and potential role in therapy of degenerative diseases, *Cell and Tissue Research*, 331, 157-63, **2008**.
- [189] Pittenger, M.F. Adipogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. Google Patents; 1998.
- [190] Mackay, A.M., Beck, S.C., Murphy, J.M., Barry, F.P., Chichester, C.O., Pittenger, M.F., Chondrogenic differentiation of cultured human mesenchymal stem cells from marrow, *Tissue Engineering*, 4, 415-28, **1998**.
- [191] Jaiswal, N., Haynesworth, S.E., Caplan, A.I., Bruder, S.P., Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro, *Journal of Cellular Biochemistry*, 64, 295-312, **1997**.
- [192] Hrnjak, M., Kuljic-Kapulica, N., Budisin, A., Giser, A., Stimulatory effect of low-power density He-Ne laser radiation on human fibroblasts in vitro, *Vojnosanitetski Pregled Military-Medical and Pharmaceutical Review*, 52, 539-46, **1995**.
- [193] Quickenden, T.I., Daniels, L.L., Attempted Biostimulation of Division in Saccharomyces-Cerevisiae Using Red Coherent-Light, *Photochemical Photobiology*, 57, 272-8, **1993**.
- [194] Schneede, P., Jelkmann, W., Schramm, U., Fricke, H., Steinmetz, M., Hofstetter, A., Effects of the helium-neon laser on rat kidney epithelial cells in culture, *Lasers in Medical Science*, 3, 249-57, **1988**.
- [195] Tuby, H., Maltz, L., Oron, U., Induction of autologous mesenchymal stem cells in the bone marrow by low-level laser therapy has profound beneficial effects on the infarcted rat heart, *Lasers in Surgery and Medicine*, 43, 401-9, **2011**.

- [196] Gavish, L., Asher, Y., Becker, Y., Kleinman, Y., Low level laser irradiation stimulates mitochondrial membrane potential and disperses subnuclear promyelocytic leukemia protein, *Lasers in Surgery and Medicine*, 35, 369-76, **2004**.
- [197] Karu, T.I., Mitochondrial signaling in mammalian cells activated by red and near-IR radiation, *Photochemical Photobiology*, 84, 1091-9, **2008**.
- [198] Maccioni, R.B., Cambiazo, V., Role of microtubule-associated proteins in the control of microtubule assembly, *Physiological Reviews*, 75, 835-64, **1995**.
- [199] Rodriguez, J.P., Gonzalez, M., Rios, S., Cambiazo, V., Cytoskeletal organization of human mesenchymal stem cells (MSC) changes during their osteogenic differentiation, *Journal of Cellular Biochemistry*, 93, 721-31, **2004**.
- [200] Schutz, L., Mora, P.T., The need for direct cell contact in "contact" inhibition of cell division in culture, *Journal of Cellular Physiology*, 71, 1-6, **1968**.
- [201] Gao, X., Xing, D., Molecular mechanisms of cell proliferation induced by low power laser irradiation, *Journal of Biomedical Science*, 16, 4, **2009**.
- [202] Leonida, A., Paiusco, A., Rossi, G., Carini, F., Baldoni, M., Caccianiga, G., Effects of low-level laser irradiation on proliferation and osteoblastic differentiation of human mesenchymal stem cells seeded on a three-dimensional biomatrix: *in vitro* pilot study, *Lasers in Medical Science*, 28, 125-32, **2013**.
- [203] Ozawa, Y., Shimizu, N., Kariya, G., Abiko, Y., Low-energy laser irradiation stimulates bone nodule formation at early stages of cell culture in rat calvarial cells, *Bone*, 22, 347-54, **1998**.
- [204] Ueda, Y., Shimizu, N., Effects of pulse frequency of low-level laser therapy (LLLT) on bone nodule formation in rat calvarial cells, *Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery*, 21, 271-7, **2003**.
- [205] Fujimoto, K., Kiyosaki, T., Mitsui, N., Mayahara, K., Omasa, S., Suzuki, N., Shimizu, N., Low-intensity laser irradiation stimulates mineralization via increased BMPs in MC3T3-E1 cells, *Lasers in Surgery and Medicine*, 42, 519-26, **2010**.
- [206] Marom, R., Shur, I., Solomon, R., Benayahu, D., Characterization of adhesion and differentiation markers of osteogenic marrow stromal cells, *Journal of Cellular Physiology*, 202, 41-8, **2005**.
- [207] Kwun, I.S., Cho, Y.E., Lomeda, R.A., Shin, H.I., Choi, J.Y., Kang, Y.H., Beattie, J.H., Zinc deficiency suppresses matrix mineralization and retards osteogenesis transiently with catch-up possibly through Runx2 modulation, *Bone*, 46, 732-41, **2010**.
- [208] Mizuno, M., Kuboki, Y., Osteoblast-related gene expression of bone marrow cells during the osteoblastic differentiation induced by type I collagen, *The Journal of Biochemistry*, 129, 133-8, **2001**.
- [209] Orrenius, S., Zhivotovsky, B., Nicotera, P., Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link, *NatureReviews Molecular Cell Biology*, 4, 552-65, **2003**.
- [210] Scoltock, A.B., Bortner, C.D., St, J.B.G., Putney, J.W., Jr., Cidlowski, J.A., A selective requirement for elevated calcium in DNA degradation, but not early events in anti-Fas-induced apoptosis, *The Journal of Biological Chemistry*, 275, 30586-96, **2000**.

- [211] Aubin, J.E., Regulation of osteoblast formation and function, *Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders*, 2, 81-94, **2001**.
- [212] zur Nieden, N.I., Kempka, G., Ahr, H.J., In vitro differentiation of embryonic stem cells into mineralized osteoblasts, *Differentiation*, 71, 18-27, **2003**.
- [213] Karu, T., Low Intensity Laser Light Action Upon Fibroblasts and Lymphocytes, *Progress in Laser Therapy*, 175-80,
- [214] Anonim, <http://www.isan.troitsk.ru/dls/publ/128.pdf> (Temmuz, **2014**).
- [215] Merrill, D.R., Bikson, M., Jefferys, J.G., Electrical stimulation of excitable tissue: design of efficacious and safe protocols, *Journal of Neuroscience Methods*, 141, 171-98, **2005**.
- [216] Armstrong, P.F., Brighton, C.T., Star, A.M., Capacitively coupled electrical stimulation of bovine growth plate chondrocytes grown in pellet form, *Journal of Orthopaedic Research*, 6, 265-71, **1988**.
- [217] Tandon, N., Cannizzaro, C., Figallo, E., Voldman, J., Vunjak-Novakovic, G., Characterization of electrical stimulation electrodes for cardiac tissue engineering, *Conference proceedings : Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society IEEE Engineering in Medicine and Biology Society Conference*, 1, 845-8, **2006**.
- [218] Shiyun, M., Mahmoud, R., Ze, Z., Electrical Stimulation in Tissue Regeneration, *Applied Biomedical Engineering*, (eds: Gargiulo, G.D.), InTech, 37-62, **2011**.
- [219] Pedrotty, D.M., Koh, J., Davis, B.H., Taylor, D.A., Wolf, P., Niklason, L.E., Engineering skeletal myoblasts: roles of three-dimensional culture and electrical stimulation, *American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology*, 288, H1620-6, **2005**.
- [220] Brighton, C.T., Wang, W., Clark, C.C., Up-regulation of matrix in bovine articular cartilage explants by electric fields, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 342, 556-61, **2006**.
- [221] Wang, W., Wang, Z., Zhang, G., Clark, C.C., Brighton, C.T., Up-regulation of chondrocyte matrix genes and products by electric fields, *Clinical Orthopaedics and Related Research*, S163-73, **2004**.
- [222] Wang, Z., Clark, C.C., Brighton, C.T., Up-regulation of bone morphogenetic proteins in cultured murine bone cells with use of specific electric fields, *The Journal of Bone and Joint Surgery American Volume*, 88, 1053-65, **2006**.
- [223] Wiesmann, H.-P., Hartig, M., Stratmann, U., Meyer, U., Joos, U., Electrical stimulation influences mineral formation of osteoblast-like cells in vitro, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1538, 28-37, **2001**.
- [224] Clark, C.C., Wang, W., Brighton, C.T., Up-regulation of expression of selected genes in human bone cells with specific capacitively coupled electric fields, *Journal of orthopaedic research*, 32, 894-903, **2014**.
- [225] Hartig, M., Joos, U., Wiesmann, H.P., Capacitively coupled electric fields accelerate proliferation of osteoblast-like primary cells and increase bone extracellular matrix formation *in vitro*, *European Biophysics Journal : EBJ*, 29, 499-506, **2000**.

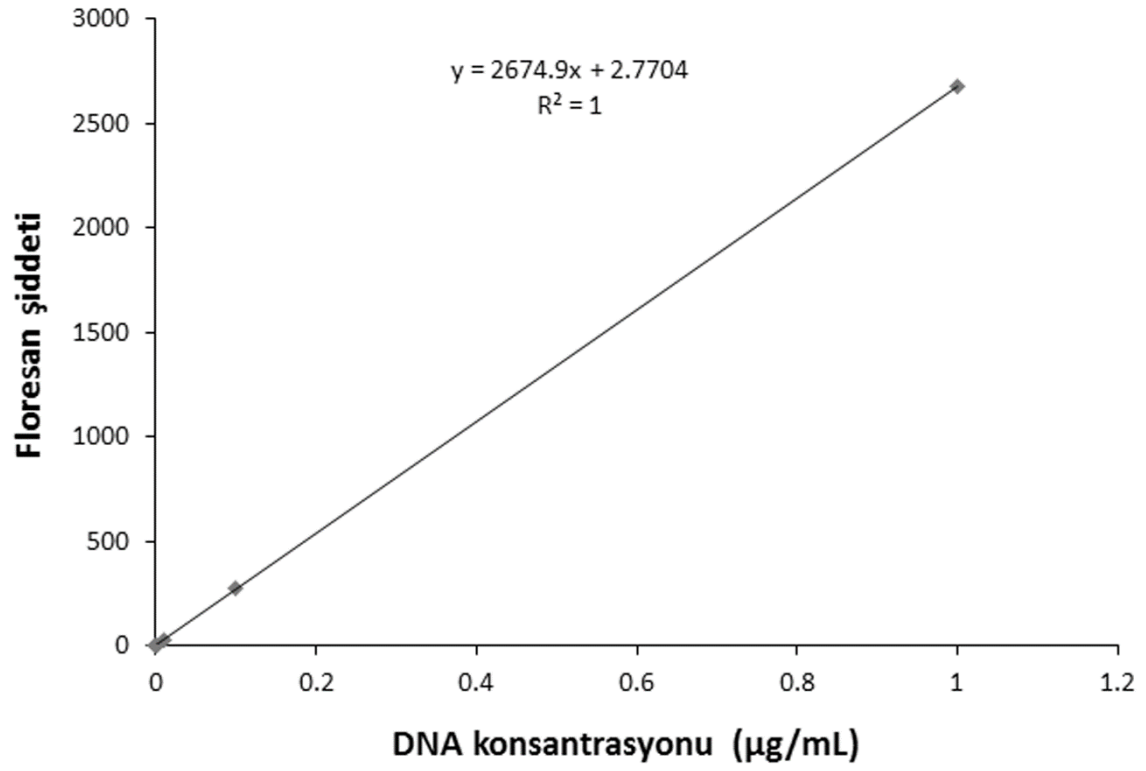
- [226] Brighton, C.T., Wang, W., Clark, C.C., The effect of electrical fields on gene and protein expression in human osteoarthritic cartilage explants, *The Journal of Bone and Joint Surgery American Volume*, 90, 833-48, **2008**.
- [227] Zhuang, H., Wang, W., Seldes, R.M., Tahernia, A.D., Fan, H., Brighton, C.T., Electrical stimulation induces the level of TGF-beta1 mRNA in osteoblastic cells by a mechanism involving calcium/calmodulin pathway, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 237, 225-9, **1997**.
- [228] Kim, I.S., Song, J.K., Song, Y.M., Lee, T.H., Cho, T.H., Lim, S.S., Pan, H., Kim, S.J., Hwang, S.J., Novel action of biphasic electric current in vitro osteogenesis of human bone marrow mesenchymal stromal cells coupled with VEGF production, *Bone*, 43, Supplement 1, S43-S4, **2008**.
- [229] Titushkin, I., Cho, M., Modulation of cellular mechanics during osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells, *Biophysical Journal*, 93, 3693-702, **2007**.
- [230] Hunter, G.K., Goldberg, H.A., Modulation of crystal formation by bone phosphoproteins: role of glutamic acid-rich sequences in the nucleation of hydroxyapatite by bone sialoprotein, *The Biochemical Journal*, 302 (Pt 1), 175-9, **1994**.
- [231] Creecy, C.M., O'Neill, C.F., Arulanandam, B.P., Sylvia, V.L., Navara, C.S., Bizios, R., Mesenchymal stem cell osteodifferentiation in response to alternating electric current, *Tissue Engineering Part A*, 19, 467-74, **2013**.
- [232] Adey, W.R., Biological effects of electromagnetic fields, *Journal of Cellular Biochemistry*, 51, 410-6, **1993**.
- [233] Kotwal, A., Schmidt, C.E., Electrical stimulation alters protein adsorption and nerve cell interactions with electrically conducting biomaterials, *Biomaterials*, 22, 1055-64, **2001**.
- [234] Martino, C.F., Belchenko, D., Ferguson, V., Nielsen-Preiss, S., Qi, H.J., The effects of pulsed electromagnetic fields on the cellular activity of SaOS-2 cells, *Bioelectromagnetics*, 29, 125-32, **2008**.
- [235] McCullen, S.D., McQuilling, J.P., Grossfeld, R.M., Lubischer, J.L., Clarke, L.I., Loba, E.G., Application of low-frequency alternating current electric fields via interdigitated electrodes: effects on cellular viability, cytoplasmic calcium, and osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells, *Tissue Engineering Part C, Methods*, 16, 1377-86, **2010**.
- [236] Supronowicz, P.R., Ajayan, P.M., Ullmann, K.R., Arulanandam, B.P., Metzger, D.W., Bizios, R., Novel current-conducting composite substrates for exposing osteoblasts to alternating current stimulation, *Journal of Biomedical Materials Research*, 59, 499-506, **2002**.
- [237] Singh, S., Saha, S., Electrical properties of bone. A review, *Clinical Orthopaedics And Related Research*, 249-71, **1984**.
- [238] Sundelacruz, S., Levin, M., Kaplan, D.L., Role of membrane potential in the regulation of cell proliferation and differentiation, *Stem Cell Reviews*, 5, 231-46, **2009**.

- [239] Sundelacruz, S., Levin, M., Kaplan, D.L., Membrane potential controls adipogenic and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells, *PloS One*, 3, e3737, **2008**.
- [240] Register, T.C., McLean, F.M., Low, M.G., Wuthier, R.E., Roles of alkaline phosphatase and labile internal mineral in matrix vesicle-mediated calcification. Effect of selective release of membrane-bound alkaline phosphatase and treatment with isosmotic pH 6 buffer, *The Journal of Biological Chemistry*, 261, 9354-60, **1986**.
- [241] Datta, N., Holtorf, H.L., Sikavitsas, V.I., Jansen, J.A., Mikos, A.G., Effect of bone extracellular matrix synthesized in vitro on the osteoblastic differentiation of marrow stromal cells, *Biomaterials*, 26, 971-7, **2005**.
- [242] Berge, U., Kristensen, P., Rattan, S.I., Hormetic modulation of differentiation of normal human epidermal keratinocytes undergoing replicative senescence in vitro, *Experimental Gerontology*, 43, 658-62, **2008**.
- [243] Gong, B., Asimakis, G.K., Chen, Z., Albrecht, T.B., Boor, P.J., Pappas, T.C., Bell, B., Motamedi, M., Whole-body hyperthermia induces up-regulation of vascular endothelial growth factor accompanied by neovascularization in cardiac tissue, *Life Sciences*, 79, 1781-8, **2006**.
- [244] Shui, C., Scutt, A., Mild Heat Shock Induces Proliferation, Alkaline Phosphatase Activity, and Mineralization in Human Bone Marrow Stromal Cells and Mg-63 Cells In Vitro, *Journal of Bone and Mineral Research*, 16, 731-41, **2001**.
- [245] Morimoto, R.I., Cells in stress: transcriptional activation of heat shock genes, *Science*, 259, 1409-10, **1993**.
- [246] Yamazaki, Y., Sejima, H., Yuguchi, M., Shinozuka, K., Isokawa, K., Cellular origin of microfibrils explored by monensin-induced perturbation of secretory activity in embryonic primary cultures, *Journal of Oral Science*, 49, 107-14, **2007**.
- [247] Moreau, R., Aubin, R., Lapointe, J.Y., Lajeunesse, D., Pharmacological and biochemical evidence for the regulation of osteocalcin secretion by potassium channels in human osteoblast-like MG-63 cells, *Journal of bone and mineral research*, 12, 1984-92, **1997**.
- [248] Bowler, W.B., Buckley, K.A., Gartland, A., Hipkind, R.A., Bilbe, G., Gallagher, J.A., Extracellular nucleotide signaling: a mechanism for integrating local and systemic responses in the activation of bone remodeling, *Bone*, 28, 507-12, **2001**.
- [249] Orriss, I.R., Key, M.L., Hajjawi, M.O., Arnett, T.R., Extracellular ATP released by osteoblasts is a key local inhibitor of bone mineralisation, *PloS One*, 8, e69057, **2013**.
- [250] Fratzl, P., Gupta, H.S., Paschalis, E.P., Roschger, P., Structure and mechanical quality of the collagen-mineral nano-composite in bone, *Journal of Materials Chemistry*, 14, 2115-23, **2004**.
- [251] Jin, G., Kim, G., The effect of sinusoidal AC electric stimulation of 3D PCL/CNT and PCL/[small beta]-TCP based bio-composites on cellular activities for bone tissue regeneration, *Journal of Materials Chemistry B*, 1, 1439-52, **2013**.
- [252] Yuan, X., Arkonac, D.E., Chao, P.H., Vunjak-Novakovic, G., Electrical stimulation enhances cell migration and integrative repair in the meniscus, *Scientific Reports*, 4, 3674, **2014**.

- [253] Haddad, J.B., Obolensky, A.G., Shinnick, P., The biologic effects and the therapeutic mechanism of action of electric and electromagnetic field stimulation on bone and cartilage: new findings and a review of earlier work, *Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 13, 485-90, **2007**.
- [254] Aaron, R.K., Boyan, B.D., Ciombor, D.M., Schwartz, Z., Simon, B.J., Stimulation of growth factor synthesis by electric and electromagnetic fields, *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 30-7, **2004**.

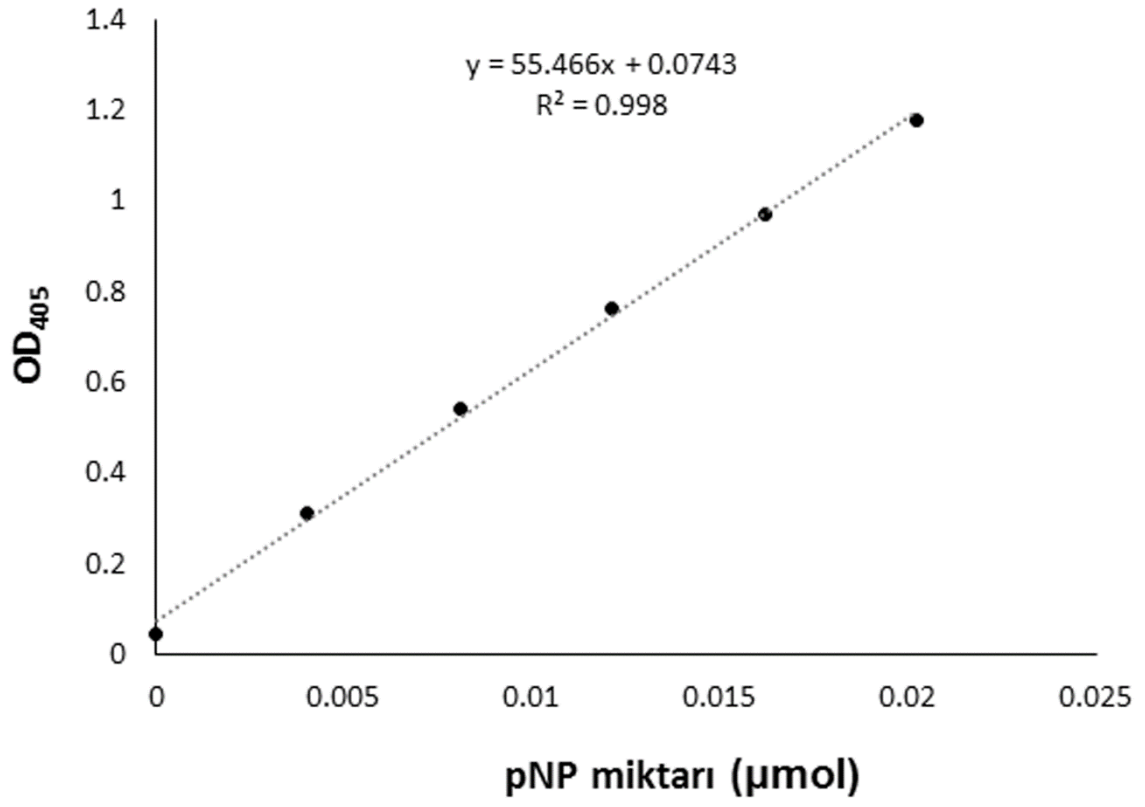
EK 1

DNA KALİBRASYON GRAFİĞİ



EK 2

ALP KALİBRASYON GRAFİĞİ



EK 3

HEMOTOKSİLEN&EOZİN (H&E) BOYAMA

Doku iskelelerindeki hMSC hücreleri, H&E boyamaya geçilmeden önce aşağıdaki protokol takip edilerek fikslenmiştir.

Fiksasyon Protokolü

- Doku iskeleleri, histolojik kasetler içerisine yerleştirilir.
- Doku iskelelerini içeren kasetler %70'lik (v/v) etanol içerisinde 30 dk bekletilir.
- Kasetler, daha sonra %95'lik (v/v) etanol içerisine alınır ve 30 dk bekletilir.
- %95'lik (v/v) etanol yenisiyle değiştirilir ve kasetler bir 30 dk daha bekletilir.
- Kasetler, %100'lük etanol içerisine alınır ve 30 dk bekletilir. Bu basamak %100'lük yeni etanol çözeltisiyle iki kere daha tekrarlanır.
- Kasetler, etanol basamaklarından sonra ksilen içerisine transfer edilir ve ksilen içerisinde 30 dk bekletilir. Bu basamak yeni ksilen çözeltisiyle bir kez daha tekrarlanır.
- Kasetler, ksilen basamağından sonra parafin içerisine koyulur ve bir gece bekletilir.

H&E Boyama Protokolü

- Doku iskeleleri parafin içerisine gömülür ve -20°C'de parafinin sertleşmesi beklenir.
- Parafin sertleştikten sonra mikrotom ile doku iskelelerinin 8 µm'lik kesitleri alınır.
- Kesitleri içeren lameller sırasıyla aşağıdaki işlemlere tabi tutulurlar;
 1. Ksilende 4 dk bekleme
 2. Ksilende 4 dk bekleme
 3. Mutlak etanolde 2 dk bekleme
 4. Mutlak etanolde 3 dk bekleme
 5. %95'lik (v/v) etanolde 1 dk bekleme
 6. %70'lik (v/v) etanolde 1 dk bekleme
 7. Deiyonize suda 2 dk bekleme
 8. Mayer's hemotoksilin (Sigma, MO, ABD) boya çözeltisinde 10 dk bekleme
 9. Musluk suyunda 1 dk bekleme
 10. Asit alkolde (%70'lik (v/v) etanol içerisinde %5 (v/v) asetik asit) 20 s bekleme
 11. Musluk suyunda asit hızlı bir şekilde uzaklaştırılır
 12. Lameller, Scott's tamponuna (Sigma, MO, ABD) 10 kez hızlıca batırılıp çıkarılır – Kesitlerin rengi mor-mavi renge dönüşür

- 13.** Kesitler, musluk suyuna hızlıca batırılıp çıkarılır
 - 14.** Kesitler, %70'lik (v/v) etanole hızlıca batırılıp çıkarılır
 - 15.** Eozin (Sigma, MO, ABD) boya çözeltisinde 1 dk bekleme
 - 16.** %95'lik (v/v) etanolde 1 dk bekleme
 - 17.** %95'lik (v/v) etanolde 1 dk bekleme
 - 18.** Mutlak etanolde 2 dk bekleme
 - 19.** Mutlak etanolde 3 dk bekleme
 - 20.** Ksilende 3 dk bekleme
 - 21.** Ksilende 3 dk bekleme
- Boyanmış kesitler Permout kapatma çözeltisiyle, iki lamel arasına yerleştirilir.
 - Kapama işlemi sonunda kesitler kurumaya bırakılır.

EK 4

ALİZARİN RED BOYAMA

Doku iskeleleri H&E boyamada anlatıldığı şekilde fikslenir ve mikrotom ile kesitleri alınır. H&E boyamadan farklı olarak kesit kalınlıkları 5 µm'dir.

Alizarin red Boyama Protokolü

- Kesitler, deparafinize edilir ve deiyonize suda yıkanır (H&E boyamadaki ilk 7 basamak aynı şekilde takip edilir)
- Lameller, birkaç kez distile su ile yıkanır.
- Lameller, Alizarin red (Fisher Scientific, ABD) içerisinde 5 dk bekletilir.
- Lameller, distile su ile birkaç kez yıkanır.
- Fazla su, doku kağıtlarına emdirilir.
- Lameller kurumaya bırakılır.

EK 5

VON KOSSA BOYAMA

Doku iskeleleri H&E boyamada anlatıldığı şekilde fikslenir ve mikrotom ile kesitleri alınır. H&E boyamadan farklı olarak kesit kalınlıkları 5 µm'dir.

Von Kossa Boyama Protokolü

- Kesitler, deparafinize edilir ve deiyonize suda yıkanır (H&E boyamadaki ilk 7 basamak aynı şekilde takip edilir)
- Kesitler, birkaç kez distile su ile yıkanır.
- Kesitler, %1'lik (w/v) gümüş nitrat (Sigma, MO, ABD) çözeltisine alınır ve UV ışığı altında 1 sa bekletilir.
- Kesitler, birkaç kez distile su ile yıkanır.
- Reaksiyona girmeyen fazla gümüş nitrat, %5'lik (w/v) sodyum tiyosülfat ile 5 dk boyunca uzaklaştırılır.
- Kesitler, birkaç kez distile su ile yıkanır.
- Kesitler, eozin ile ikincil bir boyama işlemine tabi tutulur.
- Distile su ile yıkama yapılır.
- Kesitler, alkol serileri ile dehidre edilir, ksilen ile temizlenir (H&E boyamaya bakınız).
- Boyanmış kesitler Permout kapatma çözeltisiyle, iki lamel arasına yerleştirilir.
- Kapama işlemi sonunda kesitler kurumaya bırakılır.

ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı : Anıl Sera ÇAKMAK
Doğum Yeri : Giresun
Medeni Hali : Evli
E-posta : anilsera@gmail.com
Adresi : Hacettepe Üniversitesi, Biyomühendislik Anabilim Dalı, Ankara

Eğitim

Lise : Bahçelievler Deneme Lisesi (2001)
Lisans : Hacettepe Üniversitesi, Biyoloji Bölümü (2005)
Yüksek Lisans : Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı (2008)
Doktora : Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyomühendislik Anabilim Dalı (2014)

Yabancı Dil ve Düzeyi

İngilizce-ileri derecede

İş Deneyimi

- Davetli araştırmacı, Tufts Üniversitesi, Biyomedikal Mühendisliği Bölümü, Medford, MA, ABD (Eylül 2013-Mayıs 2014).

Deneyim Alanları

- Mezenkimal kök hücrelerin farklılaşmasında etkin biyofiziksel faktörler; fotostimülasyon ve elektrostimülasyon
- Biyokimyasal moleküllerin hücre farklılaşması üzerindeki etkisi
- Kemik doku mühendisliği için biyomalzeme tasarımı ve üretimi

- Doku mühendisliği uygulamaları için mikro ve nanopartikül üretimi ve karakterizasyonu
- Sitotoksikite testleri

Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi

-

Tezden Üretilmiş Yayınlar

-

Diğer Yayınlar

- Kutlu C., Çakmak A.S., Gümüşderelioğlu M., 2014, Double-effective chitosan scaffold-PLGA nanoparticle system for brain tumour therapy: in vitro study, *Journal of Microencapsulation*, DOI: 10.3109/02652048.2014.913727.
- Çakmak S., Çakmak A.S., Gümüşderelioğlu M., 2013, RGD-bearing peptide-amphiphile-hydroxyapatite nanocomposite bone scaffold: an *in vitro* study, *Biomedical Materials*, 8, 1-15.
- Gümüşderelioğlu M., Çakmak S., Timuçin H.Ö., Çakmak A.S., 2013 Thermosensitive pHEMA microcarriers: ATRP synthesis, characterization, and usabilities in cell cultures, *Journal of Biomaterials Science*, 24, 18, 2110-2125.
- Çakmak S., Çakmak A.S., Gümüşderelioğlu M., 2013, PNIPAAm-grafted thermoresponsive microcarriers: surface-initiated ATRP synthesis and characterization, *Materials Science and Engineering C: Materials for Biological Applications*, 33, 5, 3033-3040.
- Pulat M., Kahraman A.S., Tan N., Gümüşderelioğlu M., 2013, Sequential antibiotic and growth factor releasing chitosan-PAAm semi-IPN hydrogel as a novel wound dressing, *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 24, 7, 807-819.
- Çetin D., Kahraman A.S., Gümüşderelioğlu M., 2012, Novel Phema-gelatin SPHs as bone scaffolds in dynamic cultures, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 23, 11, 2803-2812.

- Gümüşderelioğlu M., Kahraman A.S., Tuncel A., 2012, Magnetic poly(glycerol dimethacrylate) latex particles: synthesis, characterization and cellular interactions, *Polymer Bulletin*, 69, 3, 323-335.
- Çetinkaya G., Kahraman A.S., Gümüşderelioğlu M., Arat S., Onur M.A., 2012, Derivation, characterization and expansion of fetal chondrocytes on different microcarriers, *Cytotechnology*, 63, 6, 633-643.
- Çetin D., Kahraman A.S., Gümüşderelioğlu M., 2011, Novel scaffolds based on poly(2-hydroxyethyl methacrylate) superporous hydrogels for bone tissue engineering, *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 22, 9, 1157-1178.
- Kahraman A.S., Gümüşderelioğlu M., Tuncel A., 2011, Cellular interactions of monodisperse poly(GDMA) latex particles-containing DMAEM brushes, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 384, 1-3, 90-97.

Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar

-

Diğer Sunumlar

- Çakmak, S., Çakmak, A.S., Gümüşderelioğlu, M., "Peptide Amphiphile/Hydroxyapatite Nanocomposite Scaffolds for Bone Tissue Engineering", 8th Nanoscience and Nanotechnology Congress, 25-29 Haziran 2012, Ankara, TÜRKİYE (Poster sunumu).
- Toz, T., Kiremitçi A., Palaska, E., Tan, O.Ü., Kahraman A.S., Soysal, Z., Gümüşderelioğlu, M., "In Vitro Biocompatibility of Current Adhesive Restorative Systems", 5th CONSEURO Istanbul, Ekim 2011, İstanbul, TÜRKİYE (Poster sunumu)
- Kutlu, C., Kahraman, A.S., Gümüşderelioğlu, M., "Controlled Release of an Anticancer Drug and an Antivascularization Agent in Chitosan Scaffold for Site-Specific Brain Tumour Therapy", Nanobio Conference 2010, 24-27 Ağustos, Zürich, İsviçre (Poster sunumu).
- Çetinkaya, G., Kahraman A. S., Gümüşderelioğlu M., "Derivation, Characterization and Expansion of Chondroprogenitors on Different Microcarriers", The 5th Congress For Bioengineering, 16-19 Haziran 2010, İzmir, TÜRKİYE (Poster sunumu).

- Pulat, M., Kahraman, A. S., Tan, N., Gümüşderelioğlu, M., “EGF Yüklü Kitosan Poli(Akrilamit) IPN Hidrojellerin Fibroblastlarla Etkileşimi ”, Ulusal Biyoloji Kongresi, 21-25 Haziran 2010, Denizli, TÜRKİYE (Poster sunumu).
- Çetin, D., Tıǧlı, R. S., Kahraman, A.S., Gümüşderelioğlu, M., “Superporous Poly(2-Hydroxyethyl Methacrylate)-Based Scaffolds for Bone Regeneration”, 15th Biomedical Science & Technology Symposium, 16-19 Ağustos 2009, Güzelyurt, KIBRIS (Poster sunumu).
- Çakmak, S., Kahraman, A. S., Kılıç, O. T., Gümüşderelioğlu, M., “Thermoresponsive Poly(HEMA) Microcarriers for Large Scale Cell Production, 15th Biomedical Science & Technology Symposium, 16-19 Ağustos 2009, Güzelyurt, KIBRIS (Poster presentation).
- Kahraman, A. S., Gümüşderelioğlu, M., Tuncel, S. A., “Manyetik Lateks Partiküllerin Kemik Doku Mühendisliğindeki Kullanımları”, 4th Ulusal Biyomühendislik Kongresi, 15-18 Ekim 2008, İzmir, TÜRKİYE (Poster sunumu).
- Kahraman, A. S., Gümüşderelioğlu, M., Tuncel, S. A., Positively-Charged Latex Particles for Culture Surface Modification, 14th Biomedical Science & Technology Symposium, 03-07 Mayıs 2008, Muğla, TÜRKİYE, (Poster sunumu).
- Kahraman, A. S., Gümüşderelioğlu, M., Tuncel, S. A., “Novel Thermo-Sensitive and Magnetic Particles for Cell Separation”, 13th Biomedical Science & Technology Symposium, 26-28 Ağustos 2007, İstanbul, TÜRKİYE (Poster sunumu).
- Kahraman, A. S., Gümüşderelioğlu, M., Tuncel, S. A., “Novel Thermo-Sensitive and Magnetic Particles for Cell Separation”, 8th Advanced Summer Course In Cell-Materials Interactions, 18-22 Haziran 2007, Porto, PORTEKİZ (Poster Sunumu).