

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**NANOTOPOGRAFINİN STROMAL HÜCRE DAVRANIŞI ÜZERİNE
ETKİSİNİN MOLEKÜLER DÜZEYDE ARAŞTIRILMASI**

Uzm. Biyo. Nur Kübra TAŞDEMİR

**Temel Cerrahi Araştırmalar Programı
DOKTORA TEZİ**

ANKARA

2025

**T.C
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**NANOTOPOGRAFINİN STROMAL HÜCRE DAVRANIŞI ÜZERİNE
ETKİSİNİN MOLEKÜLER DÜZEYDE ARAŞTIRILMASI**

Uzm. Biyo. Nur Kübra TAŞDEMİR

Temel Cerrahi Araştırmalar Programı

DOKTORA TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Doç. Dr. Z. Ekim TAŞKIRAN

ANKARA

2025

NANOTOPOGRAFINİN STROMAL HÜCRE DAVRANIŞI ÜZERİNE ETKİSİNİN
MOLEKÜLER DÜZEYDE ARAŞTIRILMASI

Nur Kübra Taşdemir

Danışman: Doç. Dr. Z. Ekim Taşkıran

Bu tez çalışması 13/06/2025 tarihinde jürimiz tarafından "Temel Cerrahi Araştırmalar Programı" nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Prof. Dr. Güneş ESENDAĞLI
Hacettepe Üniversitesi
Kanser Enstitüsü Temel Onkoloji ABD

Üye: Doç. Dr. Cem BAYRAM
Hacettepe Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü Nanoteknoloji ve Nanotıp ABD

Üye: Doç. Dr. Beren KARAOSMANOĞLU
Hacettepe Üniversitesi
Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik ABD

Üye: Doç. Dr. Diğdem YÖYEN ERMİŞ
Bursa Uludağ Üniversitesi
Tıp Fakültesi İmmünoloji ABD

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Beyza GÖKÇINAR MARPUÇ
Başkent Üniversitesi
Fen Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik ABD

Bu tez, Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuştur. 10.8 Haziran 2025

Prof. Dr. Müge YEMİŞÇİ ÖZKAN
Enstitü Müdürü

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

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

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

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayımlanan “*Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge*” kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H.Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- o Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir.¹
- o Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren ... ay ertelenmiştir. ²
- o Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir. ³

11/07/2025

Uzm. Biyo. Nur Kübra TAŞDEMİR

1“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”

(1) *Madde 6. 1. Lisansüstü teze ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.*

(2) *Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internetten paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkânı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile altı ayı aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.*

(3) *Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, tezin yapıldığı kurum tarafından verilir. Kurum ve kuruluşlarla yapılan iş birliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlere ilişkin gizlilik kararı ise, ilgili kurum ve kuruluşun önerisi ile enstitü veya fakültenin uygun görüşü üzerine üniversite yönetim kurulu tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir.*

Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir

** Tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu tarafından karar verilir.*

ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Doç. Dr. Z. Ekim Taşkiran danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.

Uzm. Biyo. Nur Kübra Taşdemir

TEŞEKKÜR

Hacettepe Üniversitesi Dahili ve Cerrahi Araştırmalar Anabilim Dalı Temel Cerrahi Araştırmalar Doktora Programı kapsamında yürütmüş olduğum tez çalışmam sürecinde, bölüm başkanımız Sayın Prof. Dr. Derya Karakoç'a destekleri için teşekkür ederim. Tez süresi boyunca bilgi, tecrübesi ve yönlendirmeleriyle bana rehberlik eden danışmanım Doç. Dr. Ekim Taşkiran'a en içten teşekkürlerimi sunarım. Destek ve katkıları için Doç. Dr. Beren Karaosmanoğlu'na ayrıca teşekkür ederim.

Multidisipliner olarak yürüttüğüm bu tez çalışması boyunca kıymetli desteği, bilgi birikimi ve ilgisi için Doç. Dr. Cem Bayram'a teşekkür ederim. Tez çalışmam süresince iş birliği, destek ve katkılarıyla yanımda olan değerli arkadaşlarım Büşra Aydın ve Muhammed Şamil Özışın'a teşekkür ederim. Ayrıca, eğitim sürecim boyunca katkılarıyla süreci kolaylaştıran bölüm sekreterimiz Menekşe Tarla'ya teşekkür ederim.

Teşekkürlerimin en büyüğünü, sevgili eşim Doruk'a ve kıymetli aileme; canım annem Sevil'e, canım babam Ertuğrul'a ve biricik ablam Merve'ye ayırıyorum. Kalbimin dışında, ömür boyunca burada ismen ve minnetle kalacaksınız. Bu meşakkatli süreci en az benim kadar yaşayan, maddi ve manevi olarak her zaman yanımda olan, varlıklarıyla yalnızca eğitim hayatıma değil, tüm yaşamıma anlam katan canlarım; iyi ki varsınız.

ÖZET

Taşdemir N.K., Nanotopografinin Stromal Hücre Davranışı Üzerine Etkisinin Moleküler Düzeyde Araştırılması, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Temel Cerrahi Araştırmalar Programı Doktora Tezi, Ankara, 2025. Bu tez çalışmasında, titanyum yüzeylerin elektro-kimyasal anodizasyon yoluyla nanotopografik olarak modifiye edilmesinin, mezenkimal kök hücrelerin (MKH) davranışı üzerindeki etkileri incelenmiştir. Farklı anodizasyon parametreleriyle elde edilen nanotüp yüzeyler, hücrelerin tutunma, yayılım, canlılık ve moleküler düzeydeki rejeneratif yanıtları açısından değerlendirilmiştir. Yüzey karakterizasyonları, morfoloji, yüzey enerjisi ve potansiyeli gibi fizikokimyasal özelliklerde anlamlı farklılıklar oluşturmuş; bu değişimler, hücrelerin yüzeye adaptasyon süreçlerini, oksidatif stres düzeylerini ve apoptoza yatkınlıklarını doğrudan etkilemiştir. Moleküler analizler, hücrelerin bu yüzeylere verdiği yanıtın yalnızca morfolojik değil, aynı zamanda genetik düzeyde de belirgin olduğunu ortaya koymuştur. Özellikle hücre iskeleti, ekstraselüler matriks sentezi, anjiyogenez ve migrasyonla ilişkili genlerdeki yukarı yönlü düzenlenme, bazı nanotopografik varyasyonların rejeneratif süreci destekleyici etkiler taşıdığını göstermiştir. Buna karşılık, ribozomal proteinlere ait genlerdeki baskılanma, hücrelerin yeni mikro ortama adaptasyon sürecinde enerji yönetimini önceliklendirdiğini düşündürmektedir. Elde edilen bulgular, yüzey nanotopografisinin biyomateryal-hücre etkileşimlerinde yalnızca fiziksel bir destek sağlamaktan öte, hücresel kaderi yönlendirebilen aktif bir biyolojik parametre olduğunu göstermektedir. Özellikle bazı yüzey modifikasyonlarının rejeneratif yanıtları destekleyen yolları etkinleştirme kapasitesi, bu yüzeyleri ileriye dönük biyomedikal uygulamalar açısından güçlü adaylar hâline getirmektedir. Bu tez, yüzey mühendisliği ile hücresel yanıtlar arasında kurulan bu köprüyü derinleştirerek, gelecekteki doku mühendisliği uygulamalarında daha etkili biyomalzeme tasarımları için özgün katkılar sunmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Mezenkimal kök hücreler (MKH), nanotopografya, titanyum dioksit, elektrokimyasal anodizasyon, doku mühendisliği, rejeneratif tedavi.

ABSTRACT

Taşdemir, N.K. Molecular-Level Investigation of the Effects of Nanotopography on Stromal Cell Behavior, Hacettepe University Graduate School of Health Sciences, PhD Thesis in Basic Surgical Research , Ankara, 2025.

In this study, the effects of nanotopographical modifications on titanium surfaces—achieved via electrochemical anodization—on mesenchymal stem cell (MSC) behavior were investigated. Nanotube surfaces generated under various anodization parameters were evaluated in terms of cellular adhesion, spreading, viability, and regenerative responses at the molecular level. Surface characterization revealed significant variations in physicochemical properties such as morphology, surface energy, and surface potential. These differences directly influenced cellular adaptation, oxidative stress responses, and susceptibility to apoptosis. Molecular analyses demonstrated that the cellular responses to these surfaces were not limited to morphological changes but also involved substantial genetic modulation. In particular, upregulation of genes associated with cytoskeletal organization, extracellular matrix production, angiogenesis, and migration indicated that certain nanotopographic variants promote regenerative processes. Conversely, the downregulation of genes related to ribosomal proteins suggested that cells prioritize energy management during adaptation to the modified microenvironment. The findings reveal that surface nanotopography functions not merely as a passive physical substrate but as an active biological parameter capable of directing cell fate. Notably, some surface designs were shown to activate gene pathways that enhance regenerative responses, positioning them as strong candidates for future biomedical applications. This dissertation deepens the understanding of the interface between surface engineering and cellular behavior and offers novel insights for the design of more effective biomaterials in tissue engineering.

Keywords: Mesenchymal stem cells, nanotopography, titanium dioxide, electrochemical anodization, tissue engineering, regenerative therapy.

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR	xii
ŞEKİLLER	xv
TABLolar	iii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Stromal Hücreler	3
2.1.1. Mezenkimal Kök Hücreler : Biyolojik Özellikleri ve Klinik Potansiyeli	4
2.2. Nanotopografik Yüzeylerin Yapısal Özellikleri ve Biyolojik Teması	6
2.2.1. Yüzey Modifikasyonlarının Ön Koşullandırma Etkisi	8
2.3. Elektrokimyasal Anodik Oksidasyon	11
2.4. Titanyum Dioksit Nanotüp Yüzeylerin Özellikleri	13
2.5. Gen İfade Analizleri ve Transkriptomik Yaklaşımların Önemi	14
3. GEREÇ VE YÖNTEM	17
3.1. Gereçler	17
3.1.1. Titanyum Dioksit Nanotübüler Yüzeylerin Hazırlanması	17
3.1.2. Mezenkimal Kök Hücre ve Dermal Fibroblast Kültürü	17
3.1.3. RNA İzolasyonu, Transkriptomik Analiz, Biyoinformatik Analiz	18
3.1.4. Taramalı Elektron Mikroskobu Analizi için Hücre Fiksasyonu	18

3.1.5. Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR)	18
3.1.6. Akım Sitometrisi Analizi	18
3.2. Yöntemler	19
3.2.1. Elektrokimyasal Anodik Oksidasyon ile Farklı Nanotopografik Özellikte TiO ₂ Yüzeylerin Üretilmesi	19
3.2.2. Titanyum Dioksit Yüzeyler Üzerinde Mezenkimal Kök Hücre Kültürü	20
3.2.3. Transkriptomik ve Biyoinformatik Analizler	21
3.2.4. Temel Bileşenler Analizi – PCA Analizi	24
3.2.5. Elektrokimyasal Anodik Oksidasyon Yöntemi ile Hiyerarşik Titanyum Yüzeylerin Türetilmesi	25
3.2.6. Türetilmiş Hiyerarşik TiO ₂ Yüzeylerde Mezenkimal Kök Hücre ve İnsan Dermal Fibroblast Kültürü	26
3.2.7. Taramalı Elektron Mikroskobu Analizi için Örneklerin Hazırlanması	27
3.2.8. cDNA Sentezi	28
3.2.9. Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR)	28
3.2.10. Akım Sitometrisi Analizi ile Hücre Canlılık Analizi	29
4. BULGULAR	31
4.1. Farklı Nanotopografik Özellikte TiO ₂ Yüzeylerin Morfolojik Karakterizasyonu	31
4.2. Mezenkimal Kök Hücrelerin Transkriptomik Verileri	32
4.3. PCA Temelli Transkriptomik Değerlendirme	34
4.4. Elektrokimyasal Anodik Oksidasyon ile Türetilen Yüzeyler ve Karakterizasyonu	35
4.4.1. Yüzey Morfolojisi, Gözeneklilik ve Gözenek Çapı Dağılımı	35
4.4.2. Sayısal Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM) ile Yüzey Topografya Analizi	37
4.4.3. Yüzeylerin Islanabilirlik ve Serbest Enerji Analizi	38

4.4.4. Yüzey Kimyasının Analizi	40
4.5. Modifiye Titanyum Yüzeylerin Mezenkimal Kök Hücre Davranışları Üzerindeki Etkileri	42
4.5.1. Taramalı Elektron Mikroskobu ile Hücre Yayılım Davranışının Değerlendirilmesi	42
4.5.2. Hücre–Titanyum Yüzey Etkileşimlerinin Grafikselleştirilmesi	43
4.6. Nanotopografik Yüzeylerin Rejenerasyonla İlgili Genlerin İfadesine Etkisi	44
4.7. MKH'lerin Canlılık Analizi: Akım Sitometrisi	45
5. TARTIŞMA	47
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	56
6.1. Sonuçlar	56
6.2. Öneriler	57
7. KAYNAKLAR	58
8. EKLER	63
EK-1. Tez Çalışması Orijinallik Raporu	
EK-2. Dijital Makbuz	
EK-3. Anlamlı Gen Listesi ($p \leq 0.05$)	
EK-4. Yayınlanmış Makale	
9. ÖZGEÇMİŞ	70

SİMGELER ve KISALTMALAR

AFM	Sayısal atomik kuvvet mikroskobu
ACTB	Beta-aktin (referans gen)
AKT	Protein kinaz B
CXCR4	C-X-C motifli kemokin reseptörü 4
CD	<i>Cluster of Differentiation (CD90, CD105, CD73, CD44)</i>
cDNA	Tamamlayıcı DNA
COL1A2	Kollajen Tip I Alfa 2 Zinciri
COL3A1	Kolajen Tip III Alfa 1 Zinciri
COL4A1	Kollajen Tip IV Alfa 1 Zinciri
COL6A2	Kolajen Tip VI Alfa 2 Zinciri
DEG	Farklı ekspresyon gösteren gen
DMEM-LG	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium low glucose</i>
DIW	Deiyonize su
DF	Dermal fibroblast
ECM	Ekstraselüler matriks
EDS	Enerji Dağılımlı X-Işını Spektroskopisi
EMILIN1	Elastin mikrofibril arayüzey protein 1
ERK	Ekstraselüler sinyal düzenleyici kinaz
EtOH	Ethanol
EV	Hücre dışı vezikül
F	Flor
FAK	Fokal adezyon kinaz
FASTQ	Hızlı kalite formatı (sekans verisi dosya formatı)
FBS	Fetal sığır serumu
FITC	<i>Fluorescein Isothiocyanate</i>
HDF	İnsan dermal fibroblast hücresi
HLA-DR	<i>Human Leukocyte Antigen</i>
hTiO₂	Hiyerarşik titanyum dioksit
IEP	İzolektrik nokta
iDEP	<i>Integrative Differential Expression and Pathway Analysis</i>

iMKH	İndüklenmiş mezenkimal kök hücre
Kİ-MKH	Kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücre
KPFM	Kelvin Prob Kuvvet Mikroskobu
MAPK	Mitojen-aktive protein kinaz
MKH	Mezenkimal Kök Hücre
NH₄F	Amonyum florür
O	Oksijen
OWKR/Fowkes	Yüzey Serbest Enerjisi Yaklaşımı
PBS	Fosfat tamponlu tuzlu su
PCA	Temel Bileşenler Analizi
PI3K	Fosfoinozid 3-kinaz
PI	<i>Propidium iodide</i>
RaNa-Seq	Etkinleştirilmiş RNA-Seq analiz aracı
RhoA	Ras homolog aile üyesi A
ROCK	Rho ile ilişkili sarmal yapılı protein kinaz
ROS	Reaktif oksijen seviyesi
RNA	Ribonükleik asit
RNA-seq	RNA dizileme
RMS	Kök ortalama kare değeri, pürüzlülük
RPLP0	Ribozomal protein büyük alt birim P0
RPLS6	Ribozomal protein küçük alt birim S6
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
SDF-1	Stromal hücre kaynaklı faktör 1
SPON2	Spondin2/Mindin
SRP	Sinyal tanıma parçacığı
SYBR	SYBR Green DNA Boyası
TAZ	PDZ-bağlayıcı motif taşıyan transkripsiyonel eş düzenleyici
Ti	Titanyum
TiO₂	Titanyum dioksit
[TiF₆]²⁻	Heksafluorotitanat iyonu
TNC	Tenaskin C
TPM	Kilobaz milyon başına transkript

VEGFA	Vasküler endotelyal büyüme faktörü A
YAP	<i>Yes-associated protein</i>
ytot	Toplam yüzey serbest enerjisi
yd	Apolar bileşen
yp	Polar bileşen
qRT-PCR	Kantitatif Gerçek Zamanlı Ters Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu
WCA	Islanabilirlik derecesi
XRD	X ışını kırınımı

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. Farklı yüzey topografilerinin hücre morfolojisi üzerindeki etkileri.	6
2.2. Mezenkimal kök hücrelerin kültür koşullarında karşılaştığı biyolojik sınırlılıkların, modifikasyon stratejileriyle aşılması.	10
2.3. Elektrokimyasal anodik oksidasyon sürecinin aşamaları: F^- ve O_2^- iyonlarının birikimiyle oksit tabakası oluşumu, anodik çözünmeyle çukurlaşma, gözenek oluşumu, nanotüp yapılarının oluşumu.	13
3.1. Elektrokimyasal anodizasyon için kullanılan düzeneğin genel görünümü. Güç kaynağı aracılığıyla voltaj ve süre kontrolü sağlanarak, titanyum anot ve platin katot arasında oluşturulan elektriksel alan yardımıyla nanotüp yapıların üretildiği sistem.	20
3.2. Birinci elektrokimyasal anodik oksidasyon işlemi basamakları.	25
3.3. İkinci elektrokimyasal anodik oksidasyon işlemi ile yüzeylerin türetilmesi	26
3.4. 12 kuyucuklu plaklar içinde bulunan titanyum yüzeyler üzerinde droplet şeklinde hücre kültürü.	27
3.5. Akım sitometrisi ile kapılama stratejileri detayları. a) Kontrol (düz titanyum), b) 80V-20V, c) 80V-40V, d) 80V-60V. V: volt.	30
4.1. Farklı anodizasyon voltajlarıyla oluşturulan TiO_2 yüzeylerinin SEM görüntüleri. Soldan sağa: Kontrol (düz titanyum), 20V-20V, 60V-40V ve 80V-20V yüzeyleri (ölçek çubuğu: 2 μm). V: volt, μm : mikrometre.	32
4.2. MKH'lerde gen ifadesine bağlı olarak değişimlerinin Reaktom analizi. Upregulated: artan, downregulated: azalan genler.	33
4.3. Mezenkimal kök hücrelerin farklı yüzeylerdeki gen ifade profillerine göre gerçekleştirilen PCA analizi. V: volt, TCP: tissue culture plate, kontrol: düz titanyum.	35

- 4.4.** A) 80V–20V, B) 80V–40V ve C) 80V–60V yüzeylerinin SEM görüntüleri, görüntü işleme analizleri ve gözenek çapı dağılımları. Ölçek çubuğu: 200 nm, nm: nanometre. 36
- 4.5.** A) 80V–20V, B) 80V–40V ve C) 80V–60V yüzeylerine ait AFM topografik görüntüler ve çizgi profili analizleri. um: mikrometre. 38
- 4.6.** Kontrol, 80V–20V, 80V–40V ve 80V–60V yüzeylerine ait KPFM ile elde edilen yüzey potansiyeli dağılımları ve ilgili AFM topografik görüntüleri (görüntü alanı: 1 μm^2). um: mikrometre, mV: mili volt, nm: nanometre. 40
- 4.7.** A) Kontrol (düz titanyum) ve modifiye yüzeylerin EDS ile belirlenen atomik Ti, O ve F yüzdeleri; B) aynı örneklerle ait XRD spektrumları (Kontrol: siyah, 80V–20V: mavi, 80V–40V: yeşil, 80V–60V: kırmızı). V: volt, Ti: titanyum, O: oksijen, F: flor. 41
- 4.8.** A) Kontrol (düz titanyum), B) 80V–20V, C) 80V–40V, D) 80V–60V yüzeylerinde hücre tutunma davranışı; ilgili bölgelerin yüksek büyütme SEM görüntüleri (E–H) hücre-yüzey etkileşiminin detaylı gösterimi. V: volt, um: mikrometre. 42
- 4.9.** Anodize titanyum yüzeylerin fizikokimyasal özellikleri ve hücre sel yanıtlarının karşılaştırmalı analizi: A) Ortalama gözenek çapı, yüzey pürüzlülüğü ve porozite, B) Porozite ve oksit kaplama yüzdeleri, C) Flor konsantrasyonu, oksit kaplama ve yüzey potansiyeli, D) Yüzey potansiyeli, yüzey serbest enerjisi bileşenleri ve su temas açısı, E) Yüzey parametreleri ile canlı/geç apoptoz hücre oranları; F) Ortalama hücre yayılım alanları. V: volt, WCA: ıslanabilirlik derecesi. 44
- 4.10.** Farklı yüzeylerde kültüre edilen MKH ve DF'lara ait CXCR4 ve VEGFA genlerinin relatif mRNA ifadesi seviyeleri. Kontrol: düz titanyum, V: volt. 45
- 4.11.** Dört farklı yüzeyde kültüre edilen MKH'lere ait canlılık analizleri: akım sitometrisi dağılım grafikleri (sol) ve hücre popülasyon oranları (sağ). Kontrol: düz titanyum, FITC-H: Annexin, PerCP-H: PI, V: Volt. 46

TABLolar

Tablo	Sayfa
2.1. Yüzey modifikasyonları çeşitleri.	11
3.1. cDNA sentezi PCR döngüsü.	28
3.2. qRT-PCR deneyinde kullanılan primer dizileri. F: ileri, R: geri.	29
3.3. qRT-PCR döngü programı.	29

1. GİRİŞ

Biyoteknoloji ve tıpta kaydedilen ilerlemeler, yalnızca hastalıkların tedavisine değil, aynı zamanda bireylerin yaşam kalitesini artırmaya yönelik uygulamaların gelişmesine de katkı sağlamaktadır. Bu gelişmelerin arkasında, hücrelerin çevresel uyaranlara karşı geliştirdiği biyolojik tepkilerin anlaşılması ve bu tepkilerin kontrollü biçimde yönlendirilebilmesi yer almaktadır. Özellikle nanoteknolojinin sunduğu olanaklar, hücre davranışlarını kontrollü biçimde modüle etme potansiyeli ile rejeneratif tıp ve doku mühendisliği gibi alanlarda dikkat çekici uygulamalara zemin hazırlamaktadır [1].

Bu noktada, nanoyapılı yüzey tasarımlarında önemli bir yer tutan nanotopografi, yüzeylerin nanometre düzeyindeki mimarisinin hücrelerle olan etkileşimi üzerindeki belirleyici etkilerini ortaya koymak açısından önemli bir araçtır [2]. Hücrelerin yalnızca kimyasal sinyallerle değil, içinde buldukları fiziksel mikroçevreyle de etkileşime geçmesi; yapışma, yayılma, çoğalma ve farklılaşma gibi biyolojik süreçlerin kontrolünde temel bir rol üstlenmektedir [3]. Bu nedenle yüzey topografyasının kontrollü şekilde modifiye edilmesi, hücresel fonksiyonların yönlendirilmesi açısından stratejik bir yaklaşım sunmaktadır.

Titanyum dioksit (TiO_2), yüksek biyoyumluluğu, kimyasal stabilitesi ve mekanik dayanıklılığı nedeniyle dental implantoloji, ortopedi ve doku mühendisliği gibi birçok biyomedikal uygulamada yaygın olarak tercih edilmektedir [4]. Bununla birlikte, özellikle nanometrik ölçekte modifiye edilmiş TiO_2 yüzeylerin hücre biyolojisi üzerindeki etkilerini açıklayan çalışmalar sınırlıdır. Özellikle bu yüzeylerin stromal hücrelerle olan moleküler düzeydeki etkileşimlerine dair literatürde net ve bütüncül bilgiler henüz yeterince ortaya konmamıştır.

Bu tez çalışması, nanotopografik olarak modifiye edilmiş TiO_2 yüzeylerin stromal hücre davranışı üzerindeki etkilerini moleküler düzeyde incelemeyi amaçlamaktadır. Stromal hücreler, bağ dokusunun yapısal bütünlüğünü sağlayan ve doku onarım süreçlerinde aktif rol üstlenen heterojen bir hücre grubudur [5]. Özellikle mezenkimal kök hücreler (MKH) ve fibroblastlar gibi stromal hücre tiplerinin,

biyomalzeme yüzeyleriyle olan etkileşimleri; doku bütünlüğü, immün sistem modülasyonu ve rejeneratif kapasite açısından belirleyici unsurlardır. Bu nedenle, bu hücrelerin yüzey morfolojisine verdiği yanıtların detaylı olarak değerlendirilmesi, biyomalzeme tasarımına yönelik önemli çıktılar sunabilir.

Bu kapsamda, farklı nanotopografik özelliklere sahip TiO₂ yüzey dizileri üzerinde stromal hücrelerin adezyon, canlılık, migrasyon ve senesens gibi temel biyolojik parametreleri incelenmiş; biyolojik olarak avantaj sağlayan yüzey koşullarında transkriptomik analizler gerçekleştirilmiştir. Bulgular, klasik hücre kültürü analizleriyle birlikte değerlendirilmiş ve gen ifadesi düzeyinde ortaya çıkan değişimlerin fonksiyonel çıktıları doğrulanarak hücre-malzeme etkileşimlerinin moleküler düzeydeki karşılıkları analiz edilmiştir. Yapılan analizler aşağıda şematize edilmiştir.

Bu çalışma, nanoyapılı yüzeylerin stromal hücre yanıtları üzerindeki etkilerini inceleyerek, biyomalzeme mühendisliği ve hücre biyoloji arasındaki ilişkiyi daha net biçimde ortaya koymayı hedeflemektedir. Elde edilen bulgular; stromal hücrelerin biyolojik yanıtlarını optimize edebilecek yüzey mimarilerinin belirlenmesi açısından yol gösterici olmanın yanı sıra, moleküler düzeyde hücre içi sinyal yolları ve genetik regülasyon mekanizmalarına dair literatürdeki önemli bir boşluğu doldurmayı amaçlamaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Stromal Hücreler

Stromal hücreler, doku mühendisliği, rejeneratif tıp ve hücresele tedavi gibi modern biyomedikal uygulamaların gelişiminde giderek daha önemli bir konuma gelmektedir [6]. Bu hücreler, bağ dokusunun yapısal bütünlüğünü ve fizyolojik işlevlerini koruyan temel hücre popülasyonlarıdır. Literatürde bu hücreler; stromal hücre, mezenkimal kök hücre (MKH), fibroblast veya fibroblast-benzeri hücreler gibi çeşitli terimlerle tanımlanır. Stromal hücre yelpazesi oldukça geniştir; bu hücreler arasında fibroblastlar, miyofibroblastlar, düz kas hücreleri, perisitler ve mezenkimal kök hücreler gibi alt gruplar sayılabilir [7].

MKH'lerin en dikkat çekici özelliklerinden biri, osteojenik, kondrojenik ve adipojenik soy hatlarına yönlenebilme kapasitesidir. MKH'ler, çevreleriyle etkileşimini sadece hücresele temas yoluyla değil, aynı zamanda büyüme faktörleri ve sitokinleri içeren parakrin mekanizmalarla da sürdürmektedir [8]. Bu hücreler aynı zamanda mikroçevresel sinyallere duyarlıdır ve bu doğrultuda ekstraselüler matriks (ECM) üretimini düzenleyerek hücre adezyonu, yayılımı ve farklılaşması gibi olayları etkilerler [9, 10].

Son dönem çalışmalarda, hücre-topografya etkileşiminde substrat sertliği, yüzey geometrisi ve aktin iskelet organizasyonunun belirleyici faktörler olduğu vurgulanmıştır [11]. Çalışmalar, sert yüzeylerde stromal hücrelerin daha belirgin ve organize aktin filamentleri oluşturduğunu, yumuşak yüzeylerde ise bu yapısal düzenin zayıf olduğunu göstermektedir. Bu gözlemler, hücrelerin fizyomekanik çevrelerine morfolojik ve fonksiyonel yanıt verdiklerini ortaya koymaktadır.

Stromal hücrelerin biyolojik işlevlerinin yalnızca biyokimyasal uyarılara değil, aynı zamanda içinde buldukları mikroçevrenin fiziksel ve topografik özelliklerine de bağlı olduğu unutulmamalıdır. Yüzey mimarisinin stromal hücrelerin kaderi üzerindeki etkisini anlayabilmek, doku mühendisliği stratejilerinin optimize edilmesi açısından kritik öneme sahiptir.

2.1.1. Mezenkimal Kök Hücreler : Biyolojik Özellikleri ve Klinik Potansiyeli

Mezenkimal kök hücreler (MKH'ler), çeşitli dokuların rejeneratif süreçlerinde görev alan, multipotent karakterde, fibroblast benzeri morfolojiye sahip ve kültür ortamında plastik yüzeylere yapışma özelliği gösteren hücrelerdir [12]. İlk olarak Arnold Caplan tarafından 1991 yılında tanımlanan bu hücreler, bağ dokusunun temel bileşenlerinden biri olarak kabul edilmekte ve hücre temelli tedavilerde yoğun şekilde araştırılmaktadır. MKH'ler, CD73, CD90 ve CD105 gibi hücre yüzey belirteçleri bakımından pozitifken, CD45, CD34, CD14 ve HLA-DR gibi hematopoetik belirteçleri ise ifade etmezler [12]. MKH'ler vücudun farklı anatomik bölgelerinden izole edilebilmekte ve bu özellik, onların klinik uygulamalardaki esnekliğini artırmaktadır. Kemik iliği, en klasik ve ilk tanımlanan kaynak olmakla birlikte; yağ dokusu, göbek kordonu (Wharton jeli), plasenta, diş pulpası, amniyotik membran gibi alternatif kaynaklar da mevcuttur [13]. Bu kaynaklar arasında özellikle göbek kordonu gibi neonatal dokular, daha az invaziv elde edilebilirliği ve yüksek hücre verimi nedeniyle öne çıkmaktadır [13].

MKH'lerin en ayırt edici özelliklerinden biri farklılaşma potansiyelleridir. Uygun mikroçevresel ve biyokimyasal sinyallerle osteoblastlara, kondrositlere, adipositlere ve miyositlere yönlendirilebilmeleri, onları doku mühendisliği ve rejeneratif tıpta stratejik bir araç haline getirmiştir [14]. Bu farklılaşma kapasitesi, hücrelerin embriyonik kök hücrelere benzer şekilde potansiyel taşımaya karşın, etik sorunlar oluşturmamaları bakımından önemli bir avantaj sağlamaktadır [14]. MKH'lerin sahip olduğu immünmodülatör, farklılaşma ve rejeneratif potansiyeller, onları klinik uygulamalar açısından oldukça cazip hale getirirse de terapötik kullanımları halen bazı temel sınırlamalarla karşı karşıyadır. Bu kısıtlılıkların başında, hücrelerin biyolojik heterojenliği gelmektedir. MKH'ler farklı doku kaynaklarından izole edilebildikleri için, her kaynak hücresel bileşim, gen ifade profili ve immünolojik özellikler açısından değişkenlik gösterebilmektedir [15]. Buna ek olarak, kültür ortamındaki besiyeri kompozisyonu, pasaj sayısı, oksijen seviyesi ve büyüme faktörü içeriği gibi parametreler de hücresel davranış üzerinde belirleyici olmaktadır [16]. Tüm bu değişkenler, elde edilen hücrelerin biyolojik özelliklerini doğrudan etkileyerek

tedaviye yanıtın öngörülebilirliğini azaltmakta; klinik etkililik ve güvenlik açısından standardizasyonu zorlaştırmaktadır [17].

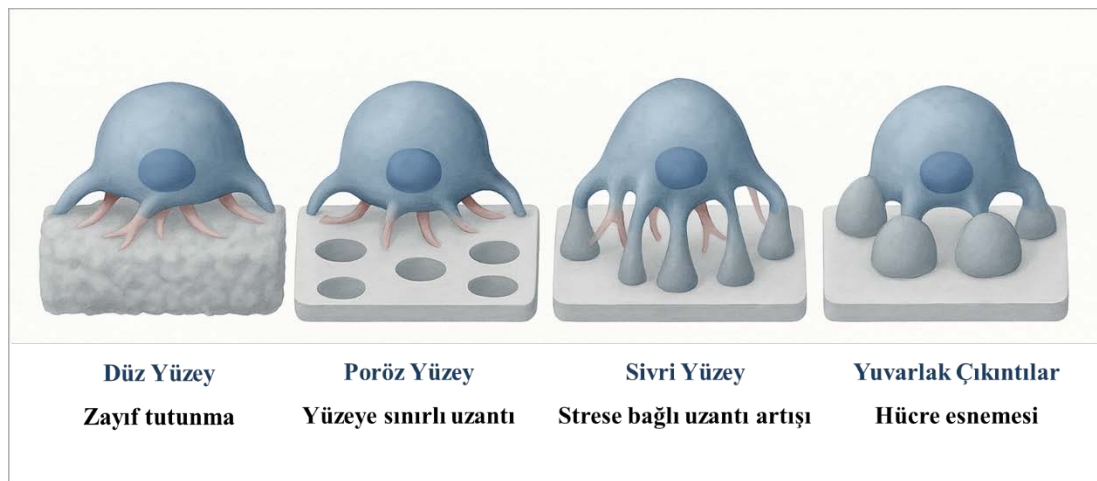
İmmünolojik yanıt açısından da MKH'lerin her zaman immün baskılayıcı rol üstlenmediği ve bağışıklık sisteminde karmaşık etkileşimlere neden olabileceği gösterilmiştir [18]. Allojenik MKH uygulamalarında, özellikle uzun vadeli takiplerde bağışıklık yanıtlarının şekillendiği ve bu durumun tedavi sürecine etki ettiği gözlemlenmiştir [18]. Ayrıca, MKH'lerin tümör mikro çevresinde proliferasyonu destekleyici etkileri olabileceği, literatürde giderek daha fazla vurgulanmaktadır [19]. Özellikle uzun süreli kültürlerde kromozomal instabilite ve epigenetik değişimlerin ortaya çıkması, hücrelerin tümörijenik potansiyel taşıma olasılığını gündeme getirmiştir [19]. Klinik araştırmalarda MKH'lerin etkinliği ile ilgili elde edilen sonuçlar da oldukça heterojendir. Bazı çalışmalarda belirgin klinik iyileşmeler raporlanırken, benzer uygulamaların bazı hastalarda anlamlı etki yaratmadığı bildirilmiştir [20]. Bu tutarsızlıklar, MKH'lerin uygulama öncesi karakterizasyonunun yeterince yapılmamasından, uygun hasta popülasyonunun belirlenememesinden ve etki mekanizmalarının hala tam olarak anlaşılmamış olmasından kaynaklanmaktadır [20]. Tüm bu sınırlamalara rağmen MKH'lerin biyolojik özellikleri onları hala güçlü bir klinik araç olarak gündemde tutmaktadır. MKH'ler yalnızca farklı hücre tiplerine dönüşebilme yetenekleriyle değil, aynı zamanda güçlü parakrin etkileri sayesinde rejeneratif etkiler yaratmaktadır [21]. Salgıladıkları büyüme faktörleri, kemokinler, sitokinler ve eksozomlar aracılığıyla doku onarım süreçlerini destekledikleri ve hücrel mikroçevreyi düzenleyerek anti-inflamatuar etkiler gösterdikleri bilinmektedir [21]. MKH'lerin immünomodülatör rolleri de oldukça dikkat çekicidir. T hücrelerinin çoğalmasını baskılayabilmekte, B hücresi aktivitesini düzenleyebilmekte ve doğal öldürücü hücrelerin sitotoksik etkilerini modüle edebilmektedirler [18].

Klinik uygulamalar açısından MKH'lerin kullanım alanları giderek genişlemektedir. Nörodejeneratif hastalıklarda (örneğin parkinson ve multipl skleroz), kardiyovasküler hastalıklarda (özellikle miyokard enfarktüsü sonrası kalp dokusunun rejenerasyonu), karaciğer fibrozisi ve siroz gibi kronik karaciğer hastalıklarında, osteoartrit gibi kas-iskelet sistemi hastalıklarında ve hatta COVID-19 gibi akut

inflatuar durumlarda MKH temelli tedaviler üzerinde yoğun çalışmalar yürütülmektedir [22, 23]. Sonuç olarak, mezenkimal kök hücreler, sahip oldukları geniş biyolojik potansiyellerle rejeneratif tıp ve hücre temelli terapilerde önemli bir yer tutmakta; ancak etkin, güvenli ve sürdürülebilir klinik kullanımlarının sağlanabilmesi için hücre kaynağından uygulama stratejilerine kadar birçok parametrenin dikkatle optimize edilmesi gerekmektedir.

2.2. Nanotopografik Yüzeylerin Yapısal Özellikleri ve Biyolojik Teması

Fiziksel ve kimyasal durumları sayesinde nanoyapılı yüzeyler, son yıllarda malzeme bilimi ve biyomedikal mühendislik alanlarında geniş uygulama potansiyeliyle dikkat çekmektedir [24]. Mikro ve nano ölçekte düzenlenmiş yüzey mimarisi, hücrelerin biyomalzemelere verdiği biyolojik yanıtları şekillendiren başlıca unsurlardan biridir. Özellikle pürüzlülük, porozite, sivrilik, çıkıntı geometrisi ve yüzey düzenliliği gibi topografik unsurlar; hücrelerin yüzeyi algılama biçimini, bağlanma yetkinliğini ve hücre iskeletinde gerçekleşen yeniden yapılanmaları belirlemede kritik rol oynamaktadır [25]. Bu parametrelerin hücre davranışları üzerindeki etkileri, aşağıdaki şekilde şematik olarak gösterilmiştir (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Farklı yüzey topografilerinin hücre morfolojisi üzerindeki etkileri.

Yüzeylerin düz, keskin, sivri veya yuvarlak formlarda tasarlanması, hücrelerin morfolojik özelliklerini ve aktin iskeleti organizasyonunu farklı şekilde

etkileyebilmektedir. Sivri ve düzensiz kenarlar, hücre zarında lokal stres noktaları oluşturarak hücresel gerilimi artırabilirken, daha düzenli ve yuvarlak yapılar, hücreye daha homojen bir temas ve adezyon yüzeyi sağlayabilir [26]. Bu nedenle yüzey topografyasının, hücre fonksiyonları üzerinde sadece fiziksel değil, aynı zamanda biyokimyasal düzeyde de etkili olduğu kabul edilmektedir. Hücrelerin bir biyomalzeme yüzeyiyle ilk temas anı genellikle üç temel aşamada tanımlanabilir [10].

1. Hücrelerin, doğal olarak nanoyapılı bir mimariye sahip olan ekstraselüler matriks (ECM) ile benzer yapılar içeren yüzeylere tutunması,
2. Yüzeylere saniyeler içinde adsorbe olan proteinlerin, hücre tanıma ve bağlanma süreçlerini yönlendirmesi,
3. Bu proteinlerin bağlandığı reseptörler aracılığıyla başlatılan biyokimyasal sinyallerin, hücre iskeletinde yeniden yapılanmaya yol açması.

Bu temas süreci, özellikle integrin gibi transmembran reseptör proteinlerinin aktivasyonu ile başlar. İntegrinler, hücre dışı matriks (ECM) proteinlerinden fibronektin, laminin, kolajen gibi yapıları tanıyarak onlara bağlanır ve bu bağlanma sonrasında hücre zarının iç yüzeyinde fokal adezyon komplekslerinin oluşumunu tetikler [27]. Fokal adezyonlar; integrinlerin sitoplazmik kuyruklarının, adaptör proteinler (talin, vinkulin, paxillin, α -aktinin) aracılığıyla aktin filamentlerine bağlanmasıyla şekillenir. Bu bağlantı sadece hücrenin substrata tutunmasını sağlamakla kalmaz, aynı zamanda ECM'den gelen mekanik ipuçlarını algılayan bir mekanosensör görevi görür [28]. Bu yapılar aracılığıyla dış ortamdan gelen fiziksel sinyaller, fokal adezyon kinaz (FAK) ve Src kinaz gibi sinyal proteinlerinin aktivasyonu yoluyla hücre içine iletilir. Bu sinyaller, RhoA/ROCK, PI3K/AKT, MAPK/ERK ve YAP/TAZ gibi hücresel yolları etkileyerek hücre iskeletinin yeniden yapılanmasına, proliferasyon, migrasyon, farklılaşma ve apoptoz gibi hücresel süreçlerin düzenlenmesine aracılık eder [29]. Özellikle RhoA/ROCK yolu, aktin-myozin kontraktilitesini artırarak hücre gerilimini düzenlerken, bu mekanik gerilim nükleer mekano-sensörlerin (örneğin YAP/TAZ) çekirdek içine taşınmasını kolaylaştırır [30]. Bu sinyal yollarının aktivasyonu ile birlikte, hücre iskeletinde yeniden yapılanma gerçekleşir. Aktin filamentlerinin yönelimi ve gerilim dengesi, hücre morfolojisini, kutuplanmasını ve yüzeye tutunma biçimini belirler. Yüzey topografisinin sunduğu fiziksel ipuçları, özellikle mikro- ve nanoölçekteki pürüzler,

çıkıntılar veya sivrilikler, bu süreçleri daha da hassas biçimde yönlendirir [31]. Böylece, mekanotransdüksiyonun son aşamasında görev alan YAP/TAZ transkripsiyon faktörleri, hücre iskeletinde oluşan kuvvetlere bağlı olarak sitoplazmadan çekirdeğe taşınır. Özellikle sivri, düzensiz ya da gerilim yaratan yüzeylerde YAP/TAZ'ın nükleer lokalizasyonu artmakta ve bu faktörler proliferasyon, farklılaşma ve adezyona yönelik genlerin ifade düzeylerini düzenlemektedir [30].

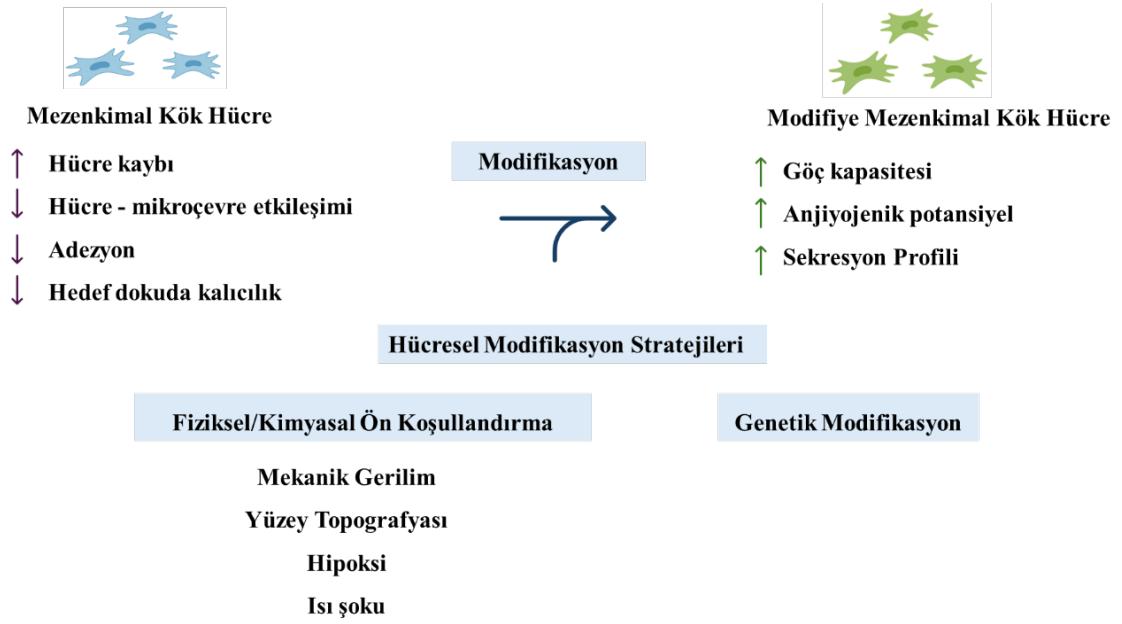
Literatürde, nanotopografik yapıların hücre iskelet düzeni, adezyon kompleksleri ve gen ifadelerini önemli ölçüde etkilediği gösterilmiştir [32]. Özellikle titanyum temelli nanotüp yüzeyler, mezenkimal kök hücrelerin hem yapısal organizasyonunu hem de osteojenik yönelimlerini artırmada etkili bulunmuştur. Yapılan bir çalışmada, farklı çaplarda üretilen TiO₂ nanotüplerin hücre morfolojisi, proliferasyonu ve osteojenik belirteç ekspresyonu üzerindeki etkileri değerlendirilmiş; 20–30 nm aralığındaki nanotüplerin hücreler tarafından daha etkin şekilde algılandığı ve daha güçlü adezyon oluşturduğu gösterilmiştir [33].

Günümüzde yüksek çözünürlüklü konfokal mikroskopi, atomik kuvvet mikroskopisi (AFM) ve canlı hücre görüntüleme gibi gelişmiş tekniklerin yardımıyla, hücre-yüzey etkileşimleri daha ayrıntılı şekilde incelenebilmektedir. Bu teknikler, hücre zarındaki mikrofilament organizasyonunu, lamellipodia ve filopodia oluşumunu, yüzey topografyasının yönelimlerine göre nasıl şekillendiğini yüksek uzaysal çözünürlükte ortaya koymaktadır [34]. Sonuç olarak, hücrelerin yüzeyle kurduğu etkileşimlerde yalnızca biyokimyasal bağlanmalar değil; topografyanın geometrik formu, düzenliliği ve yönelimi de belirleyici faktörler arasındadır. Bu nedenle, biyomalzeme tasarımlarında yüzey topografyasının yalnızca hücresel tutunma açısından değil; aynı zamanda fenotipik yönelim, gen ifade profili ve uzun vadeli hücresel kader üzerinde etkili olabileceği dikkate alınmalıdır [34].

2.2.1. Yüzey Modifikasyonlarının Ön Koşullandırma Etkisi

Nanotopografik yüzeylerin hücre davranışları üzerindeki etkileri değerlendirildiğinde, bu tür fiziksel uyarıların yalnızca anlık morfolojik değişikliklere yol açmakla kalmayıp, hücrelerin uzun vadeli biyolojik yanıtlarını da şekillendirdiği görülmektedir [35]. Bu bağlamda, belirli yüzey tasarımları, hücreler

açısından yalnızca temas yüzeyi değil; aynı zamanda fenotipik yönelimi etkileyebilecek hazırlayıcı bir etki oluşturarak, bir tür ön koşullandırma (pre-conditioning) işlevi görebilir. Literatürde pre-conditioning kavramı, MKH'lerin fizyolojik stres koşullarına veya rejeneratif uygulamalara karşı daha dirençli ve işlevsel hale gelmesini sağlamak amacıyla, hücrelerin önceden belirli çevresel uyaranlara maruz bırakılması şeklinde tanımlanır [36]. Bu uyaranlar arasında hipoksi, ısı şoku, enflamatuvar sitokinler, trofik faktörler, farmakolojik ajanlar, fiziksel koşullar ve genetik modifikasyon teknikleri yer almaktadır [36]. Bu süreç sonucunda MKH'lerin yalnızca hayatta kalma yeteneklerinde değil; proliferatif kapasite, parakrin etki, immün modülasyon yeteneği ve doku iyileşmesine katkı sağlayan sekresyon profilleri gibi birçok fonksiyonel özelliğinde de belirgin artış gözlenmektedir. Nitekim yapılan çalışmalar, bu ön koşullandırma uygulamalarının MKH'lerin hedef dokuda daha uzun süre hayatta kalmasını, daha etkili şekilde göç etmesini ve eksozomlar, büyüme faktörleri ile anti-inflamatuvar ajanlar gibi parakrin molekülleri daha yüksek düzeyde salgılamasını sağladığını göstermiştir. Bu sayede koşullandırılmış MKH'ler, transplantasyon sonrası karşılaştıkları olumsuz mikroçevresel koşullara karşı daha dirençli hale gelmekte ve terapötik etkinlikleri artmaktadır [36]. Bu durumu kavramsal olarak özetleyen bir model, aşağıdaki şekilde gösterilmektedir (Şekil 2.2). MKH'lerin kültür ortamında karşılaştıkları sınırlayıcı koşullar, çeşitli fiziksel veya kimyasal modifikasyonlarla aşılabılır; böylece daha dirençli ve fonksiyonel hücre popülasyonları elde edilerek doku mühendisliği uygulamalarında daha başarılı sonuçlar alınabilir. Benzer bir şekilde, mikro/nano ölçekte tasarlanmış yüzeylerin hücreler üzerindeki etkileri de yalnızca morfolojik yanıtlarla sınırlı kalmaz. Bu yüzeylerin pürüzlülük derecesi, çıkıntı formu, sivrilik ve geometrik düzenliliği gibi topografik özellikleri, hücre iskeletinde oluşan mekanik gerilim üzerinden mekanotransdüksiyon yollarını tetikler. Bu yollar, çekirdek organizasyonu, gen ifade düzeyi ve sonuç olarak hücrelerin fenotipik yönelimi üzerinde belirleyici rol oynar [37, 38].



Şekil 2.2. Mezenkimal kök hücrelerin kültür koşullarında karşılaştığı biyolojik sınırlılıkların, modifikasyon stratejileriyle aşılması.

Pre-conditioning kavramını destekleyen dikkat çekici örneklerden biri, fibroblastların kimyasal faktörlerle yeniden programlanarak mezenkimal kök hücre benzeri hücrelere (iMKH) dönüştürülmesidir. Lai ve arkadaşları, insan dermal fibroblastlarını SP600125, SB202190 ve Go6983 gibi inhibitörleri içeren bir kimyasal kokteyle 6 gün süreyle maruz bırakarak, CD90+ ve CD105+ fenotipine sahip iMKH'ler elde etmişlerdir [39]. Bu hücreler, osteojenik, adipojenik ve kondrojenik yönelim gösterebilmiş; ayrıca *in vivo* immünmodülasyon kapasiteleri ile fonksiyonel farklılıklar sergilemiştir. Bu bulgular, çevresel uyarıların hücre kaderi üzerinde yalnızca geçici değil, kalıcı ve programlayıcı etkiler oluşturabileceğini ortaya koymaktadır. Benzer şekilde, biyomalzeme mühendisliğinde kullanılan titanyum gibi yüzey modifikasyonuna uygun materyallerin de hücrelerin yalnızca yüzeye tutunma biçimini değil; transkripsiyonel ve epigenetik seviyede yeniden yapılanmalarını tetikleyebileceği düşünülmektedir. Yüzeye temasla birlikte aktin iskeletinde oluşan gerilim, YAP/TAZ gibi çekirdeğe taşınan transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu yoluyla, hücreyi yeni bir fenotipik programlama sürecine sokabilir. Bu fiziksel sinyallerin, gen düzeyinde ifade değişikliklerine yol açabilmesi, yüzey topografyasının

yalnızca biyomekanik değil, aynı zamanda biyoaktif bir rehber olarak değerlendirilmesini gerektirmektedir.

2.3. Elektrokimyasal Anodik Oksidasyon

Hücrelerin biyomalzeme yüzeyine karşı gösterdiği yanıtlar, büyük ölçüde yüzey özellikleri tarafından belirlenir. Bu nedenle, yüzey modifikasyonu biyouyumluluğun artırılması ve fonksiyonel implant tasarımı için temel bir strateji olarak görülmektedir [40]. Günümüzde titanyum ve alaşımları üzerinde gerçekleştirilen yüzey modifikasyonları; mekanik, fiziksel ve kimyasal yöntemler olmak üzere üç ana kategori altında sınıflandırılmaktadır. Her bir yöntem grubu, yüzey morfolojisi, kimyasal bileşim, enerji durumu ve topografya gibi parametreleri farklı biçimlerde etkileyerek hücre davranışlarını yönlendirme potansiyeline sahiptir [41]. Yüzeylerin modifikasyonunda yaygın olarak kullanılan başlıca yöntemler Tablo 2.1.'de özetlenmiştir.

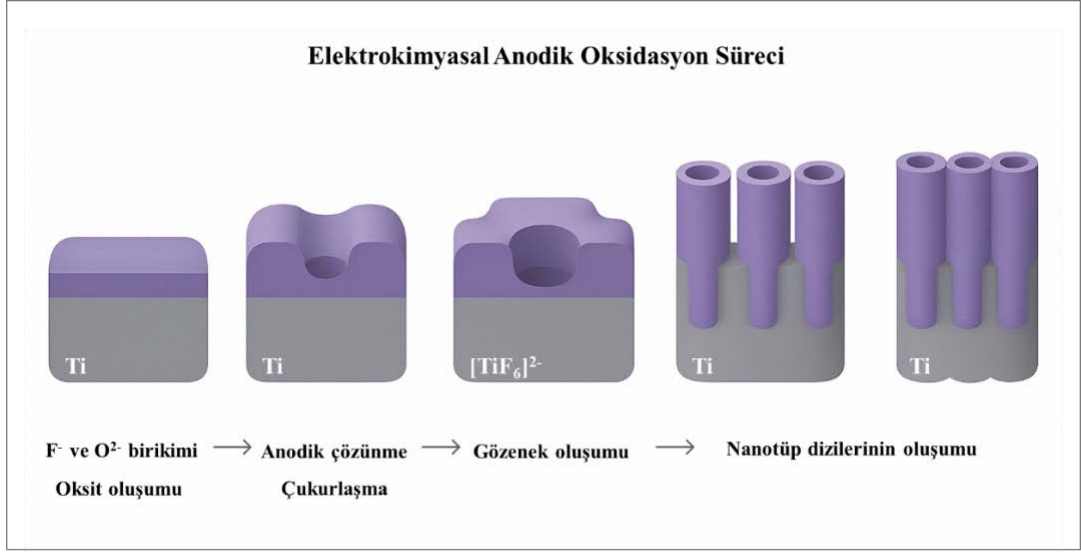
Tablo 2.1. Yüzey modifikasyonları çeşitleri.

Mekanik Modifikasyonlar	Fiziksel Modifikasyonlar	Kimyasal Modifikasyonlar
İşleme	İyon implantasyonu ve parlatma	Anodik oksidasyon
Kumlama	Termal püskürtme	Kimyasal arıtma (asit, hidrojen, peroksit, alkali)
Taşlama	Fiziksel buhar biriktirme	Sol – jel işlemi
Parlatma	Akkor deşarjlı plazma işlemi	Kimyasal buhar biriktirme

Bu yöntemler arasında yer alan elektrokimyasal anodik oksidasyon, titanyum yüzeylerin nano ölçekte düzenli yapılarla modifiye edilmesini sağlayan etkili bir yüzey işleme yöntemidir. Bu işlemde titanyum anot, genellikle platin veya grafit ise katot olarak görev yapar. İki elektrot arasında uygulanan sabit voltaj sayesinde, titanyum yüzeyinde oksitlenme meydana gelir. Titanyum yüzeyinde uygulanan sabit voltaj, anot

bölgesinde oksitlenmeyi başlatır. Florür iyonları içeren elektrolit ortamı ise bu oksit tabakasının seçici çözünmesini sağlayarak boru benzeri TiO₂ nanotüp yapıların oluşmasına imkân tanır [42]. İşlem sırasında, voltaj ve süre gibi parametreler doğrudan bu tüplerin morfolojisini şekillendirir. Genellikle 30V'un altındaki voltajlar, küçük çaplı ve yapısal olarak düzensiz nanotüplerin oluşumuna neden olurken, 30V–60V aralığında elde edilen yapılar daha homojen, silindirik ve hücre biyolojisi açısından daha elverişli olarak değerlendirilmektedir [43]. Anodizasyon süresi ise oluşan nanotüplerin boyunu belirler. Genellikle 1 ile 3 saat arası süreler tercih edilir; sürenin uzatılması tüplerin uzamasını sağlar, ancak aşırı süreler tüplerin duvar kalınlığında zayıflamalara ve yapısal bütünlükte bozulmalara yol açabilir [44].

Elektrolit kompozisyonu da kritik bir değişkendir; özellikle etilen glikol–su karışımına florür tuzları (ör. NH₄F) eklendiğinde hem kontrollü çözünme sağlanır hem de tüp düzenliliği artar [45]. İşlem genellikle oda sıcaklığında yürütülür, çünkü yüksek sıcaklıklar çözünme hızını artırarak morfolojik kontrolü zorlaştırabilir [46]. Bu parametrelerin birlikte optimize edilmesi, düşük maliyetli, tekrarlanabilir ve biyoyumlu nano yüzeylerin üretimine olanak sağlar. Bu süreçte meydana gelen başlıca yapısal değişimlerin şematik gösterimi Şekil 2.3'te sunulmuştur. Bu sayede elde edilen nanotüp yüzeyler, hücrelerin yüzeye tutunma, yayılma ve farklılaşma gibi biyolojik davranışlarını yönlendirebilecek şekilde mühendislik ürünü hale getirilebilir.



Şekil 2.3. Elektrokimyasal anodik oksidasyon sürecinin aşamaları: F⁻ ve O₂⁻ iyonlarının birikimiyle oksit tabakası oluşumu, anodik çözünmeyle çukurlaşma, gözenek oluşumu, nanotüp yapılarının oluşumu.

2.4. Titanyum Dioksit Nanotüp Yüzeylerin Özellikleri

Titanyum ve alaşımları, biyouyumluluğu, korozyon direnci ve üstün mekanik özellikleriyle implantoloji ve doku mühendisliğinde sıkça tercih edilmektedir [47]. Titanyumun biyolojik ortamda kararlı oluşu, onun inert yüzey özelliğinden kaynaklanır. Ancak hücre davranışlarını yönlendirecek aktif yüzey özellikleri kazandırmak için yüzey modifikasyonları gereklidir.

TiO₂ nanotüp yapılar, mikroçevreyi hücresel düzeyde taklit eden topografik platformlar sunarak hücre davranışlarının yönlendirilmesinde önemli roller üstlenir. Bu yüzeyler, hücre adezyonunu artırmak, hücre yayılımı ve proliferasyonunu desteklemek ve osteojenik farklılaşmayı teşvik etmek gibi çeşitli avantajlar sunar [48, 49]. Aynı zamanda ilaç salınım sistemleri için de taşıyıcı platformlar olarak değerlendirilebilmektedir [50].

TiO₂ nanotüplerin hücrelerle ilk teması, büyük ölçüde yüzeyin elektriksel yüküne bağlıdır [51]. Bu yük, ortamın pH değeri ile doğrudan ilişkilidir ve “izoelektrik nokta (IEP)” olarak adlandırılan pH aralığı, yüzeyin yük değiştirdiği sınırı belirtir. TiO₂'nin izoelektrik noktası genellikle pH 5 ile 6 arasındadır. Bu değerlerin altında, yüzey pozitif yüklüdür; pH 6'nın üzerinde ise negatif yüke sahiptir [52]. Hücre zarının

negatif yüklü yapısı dikkate alındığında, bu yüzey yük değişimi protein adsorpsiyonunu ve dolayısıyla hücre-sinyal etkileşimini yönlendirmektedir. Özellikle vitronektin ve fibronektin gibi ECM proteinlerinin adsorpsiyon davranışı, yüzeyin yük durumuna bağlı olarak değişir [53]. Dolayısıyla, yüzey yükü yalnızca adezyonun miktarını değil, kalitesini de belirler.

Ayrıca, ıslanabilirlik ve yüzey serbest enerjisi, hücrelerin yüzeye ilk temasını ve tutunmasını doğrudan etkileyen kritik parametrelerdir. Bir yüzeyin ıslanabilirliği, üzerine damlatılan sıvının ne kadar yayılabildiğiyle ilgilidir ve genellikle temas açısı ölçümüyle değerlendirilir. Küçük temas açısı iyi ıslanabilirlik (hidrofilik yüzey), büyük temas açısı düşük ıslanabilirlik (hidrofobik yüzey) anlamına gelir. Bu özellik, hücrelerin yüzeye tutunmasında önemli bir rol oynar. Hidrofilik yüzeyler, hücre proteinlerinin düzgün ve fonksiyonel şekilde adsorbe olmasını sağlar [52]. Yüksek yüzey enerjisi ve hidrofilik karakter, proteinlerin düzgün ve fonksiyonel şekilde adsorbe olmasını sağlar [54]. TiO₂ nanotüp yüzeyler, düz yüzeylere kıyasla daha yüksek yüzey enerjisi göstererek hücre yayılımını destekler [55]. Islanabilirlik, aynı zamanda yüzeyin serbest enerjisiyle yakından ilişkilidir. Yüzey serbest enerjisi ne kadar yüksekse, biyomoleküllerin yüzeye bağlanma olasılığı o kadar artar. TiO₂ nanotüpler, düz yüzeylere göre daha yüksek yüzey serbest enerjisi ve ıslanabilirliğe sahiptir. Bu da hücrelerin yüzeye temasını kolaylaştırır, tutunma sonrası yayılımı hızlandırır.

2.5. Gen İfade Analizleri ve Transkriptomik Yaklaşımların Önemi

Gen ifade analizleri, hücrelerin belirli koşullara verdiği moleküler yanıtları anlamak için kullanılan temel yöntemlerdir [56]. Bu analizler, hücrelerin çevresel faktörlere, biyokimyasal uyarılara veya fiziksel etkilere nasıl tepki verdiğini belirlemek amacıyla RNA düzeyindeki değişiklikleri inceler. Mikroarray teknolojisi ve RNA dizileme (RNA-Seq) gibi yöntemler, gen ifade profillerinin kapsamlı bir şekilde analiz edilmesine olanak tanır [57]. RNA-Seq, özellikle düşük bollukta olan transkriptlerin tespiti, alternatif splicing olaylarının analizi ve yeni transkriptlerin keşfi gibi avantajlar sunarak transkriptomik çalışmaların hassasiyetini artırır [57].

Transkriptomik, bir hücrenin tüm RNA içeriğini analiz ederek, farklı koşullara verdiği moleküler tepkileri anlamaya odaklanır. Bu yaklaşım, hücrelerin doku rejenerasyonu, inflamasyon ve bağışıklık düzenlemesi gibi biyolojik süreçlerde gösterdiği genetik yanıtları detaylandırabilir [58]. Ayrıca, ilaç etkileri, toksik yanıtlar ve hücre tipine özgü moleküler imzaların belirlenmesi açısından da önemlidir. Örneğin, insan endometriyal stromal hücrelerinin embriyo invazyonu sırasında gösterdiği dinamik transkriptomik değişiklikler, embriyo implantasyonu sürecinin moleküler mekanizmalarını aydınlatmada önemli bilgiler sunmuştur [58].

Transkriptomik yaklaşımlar, hücrelerin karmaşık biyolojik olaylara verdiği yanıtları tüm yönleriyle inceleme imkânı sunar [59]. Geleneksel gen ifade analizleri yalnızca belirlenen birkaç gen üzerinde yoğunlaşırken, transkriptomik çalışmalar hücrenin tamamına ait genetik aktiviteyi ortaya koyar [57, 59]. Bu sayede, hücrelerin beklenmedik tepkileri, alternatif moleküler yolak kullanımları ve yeni biyobelirteç adayları gibi daha önce fark edilmeyen önemli bulgular gün yüzüne çıkarılabilir [57]. Ayrıca, transkriptomik analizlerin en güçlü yönlerinden biri, yalnızca mevcut hipotezleri test etmekle sınırlı kalmayıp, geniş veri setleri üzerinden yeni hipotezler üretmeye olanak tanınmasıdır. Özellikle yüzey topografyasına verilen hücresel yanıtların araştırılmasında, bu yöntem; hücrelerin hangi sinyal yollarını aktive ettiğini, metabolik ve yapısal adaptasyonlarını, doku mühendisliği uygulamaları açısından hangi gen setlerinin kritik olduğunu kapsamlı şekilde anlamayı mümkün kılar [60]. Böylece transkriptomik çalışmalar, malzeme tasarımından rejeneratif tedavi stratejilerinin geliştirilmesine kadar uzanan geniş bir alanda bilim insanlarına yol gösterici olur [60].

Stromal hücrelerin transkriptomik profili, onların immün sistem regülasyonundaki rolleri, yara iyileşmesi süreçleri ve farklı mikroçevrelere verdiği tepkileri anlamada önemli bilgiler sunar. Özellikle yüzey topografyasının bu genetik yanıtları nasıl yönlendirdiği, hücre davranışları ile malzeme bilimini buluşturan kritik bir kavşaktır. Nanotopografik yüzeylerin, stromal hücrelerin immünomodülatör kapasitelerini artırdığı ve metabolik yollarını yeniden programladığı gösterilmiştir [61]. Bu nedenle, transkriptomik analizler; nanotopografik yüzey tasarımı ve hücre-temelli tedavi yaklaşımlarında vazgeçilmez araçlardır [61]. Bu nedenle,

transkriptomik analizler; nanotopografik yüzey tasarımı, doku mühendisliği uygulamaları ve hücre-temelli tedavi yaklaşımlarında vazgeçilmez araçlar olup, hücre fonksiyonlarının yönlendirilmesi için moleküler ölçekli rehberler sunmaktadır [62].

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu tez çalışması kapsamında, ticari olarak satın alınan mezenkimal kök hücreler ve dermal fibroblast hücreleri kullanıldı. Bu teze ait deneyler, Hacettepe Üniversitesi Translasyonel Tıp Laboratuvarları ve Fen Bilimleri Enstitüsü Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı Laboratuvarları kullanılarak, Dahili ve Cerrahi Araştırmalar Anabilim Dalı Doktora Programı kapsamında gerçekleştirildi.

3.1. Gereçler

3.1.1. Titanyum Dioksit Nanotübüler Yüzeylerin Hazırlanması

Amonyum Florür ($\geq\%98,0$) (Sigma Aldrich)

Etilen Glikol ($\geq\%99,0$) (Isolab)

Deiyonize Su

Platin Örgü Elektrot (20x20mm)

Titanyum Folyo (Strem Chemicals)

Etanol ($\geq\%99,9$) (Isolab)

Aseton ($\geq\%99,8$) (Carlo Ebra Reagents)

UV

3.1.2. Mezenkimal Kök Hücre ve Dermal Fibroblast Kültürü

İnsan Kemik İliği Mezenkimal Kök Hücreleri (Kİ-MKH) (ATCC, PCS-500-012™, 63208778)

İnsan Dermal Fibroblast Hücreleri (HDF) (Gibco™, C0135C, 325163)

Tripan Mavisi (VWR Life Science)

Dulbecco's Modified Eagle Medium-Low Glucose (DMEM-LG) (Biosera)

Fetal Bovine Serum (FBS) (Biowest)

Penicillin Streptomycin (Pen/Strep) (100X, Biowest)

L-glutamine (100X, Biowest)

Fosfat Tamponlu Tuzlu Su (PBS) (Biowest)

Tripsin %25 (Biosera)

3.1.3. RNA İzolasyonu, Transkriptomik Analiz, Biyoinformatik Analiz

Total RNA Pürifikasyon Kiti (Norgen #17200)

Single-cell RNA Pürifikasyon kiti (Norgen #51800)

Etanol (Sigma)

NanoDrop Spektrofotometre (Thermo Fisher Scientific)

SENSE Kütüphane Kiti (Lexogen)

Klonal amplifikasyon için Ion PI Hi-Q T2 200 kit (Thermo Fisher Scientific, A26434)

Ion PI Hi-Q Sekanslama 200 Kit Quantitect Reverse Transkripsiyon Kiti (Qiagen #205313)

Ion Proton Instrument (Thermo Fisher Scientific)

3.1.4. Taramalı Elektron Mikroskobu Analizi için Hücre Fiksasyonu

Gluteraldehit (Sigma)

Etanol (Sigma)

Fosfat Tamponlu Tuzlu Su (PBS) (Biowest)

3.1.5. Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR)

LightCycler 480 SYBR Green I Master (Roche #04707516001)

LightCycler® 480 Multiwell Plate 96, White (Roche #04729692001)

Roche LightCycler® 480 Instrument II

Primerler

3.1.6. Akım Sitometrisi Analizi

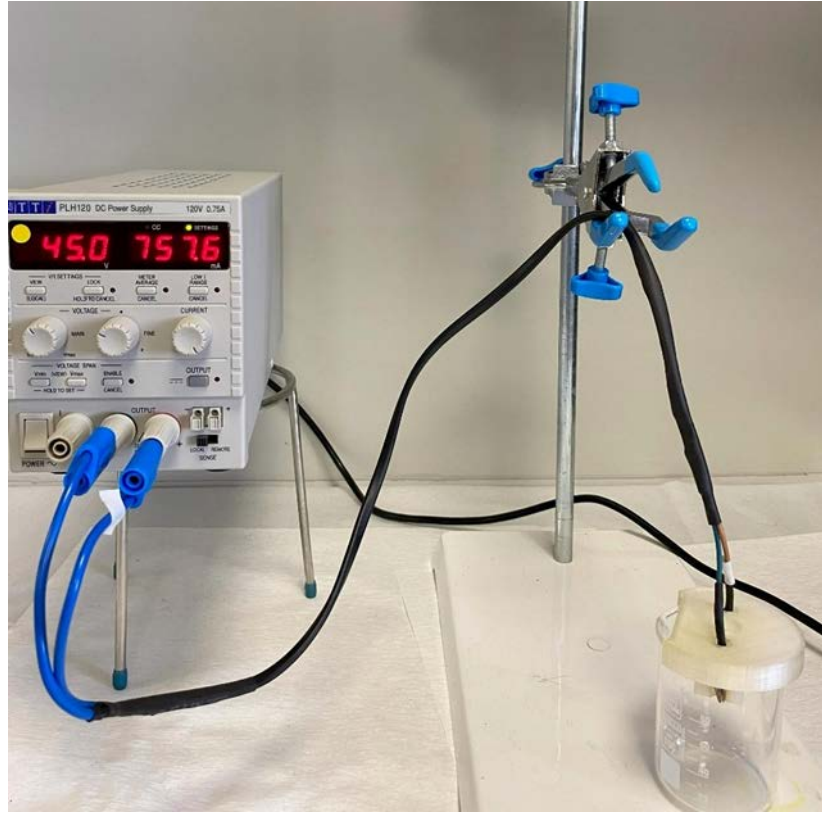
FITC Annexin V Apoptoz Tespit Kiti (BioLegend #640914)

Hücre Boyama Tamponu (BioLegend #420201)

3.2. Yöntemler

3.2.1. Elektrokimyasal Anodik Oksidasyon ile Farklı Nanotopografik Özellikte TiO₂ Yüzeylerin Üretilmesi

Farklı nanotopografik yüzeyler elde etmek amacıyla çeşitli voltaj parametreleri kullanılarak TiO₂ yüzeyleri üretildi. %99,7 saflıkta ve 125 µm kalınlığında titanyum folyolar, 3×1 cm² boyutlarında kesildi. Numuneler sırasıyla deterjanlı su, deiyonize su (DIW) ve etanol (EtOH) ile sonikasyon banyosunda temizlendi ve oda sıcaklığında kurutuldu. Anodik oksidasyon işlemleri için NH₄F içeren bir etilen glikol elektroliti hazırlandı (333 mg NH₄F + 2 mL DIW + 98 mL etilen glikol). Elektrot sisteminde titanyum anot, platin tel ise katot olarak kullanıldı (Şekil 3.1). Farklı yüzey mimarileri elde edebilmek amacıyla farklı voltaj protokolleri uygulandı; kontrol (düz titanyum), 20V-20V, 60V-40V, 80V-20V. İlk aşamada 2 saat boyunca oda sıcaklığında anodizasyon yapılarak nanotüplerin dış çapları oluşturuldu. İkinci aşamada ise, oda sıcaklığında 30 dakika boyunca anodizasyon uygulandı. Her işlem sonrasında yüzeyler DIW ve EtOH ile yıkanarak kurutuldu. Elde edilen bu yüzeyler, ilerleyen aşamalarda hücre kültürü uygulamaları için kullanıldı. Yüzeyler kültür işlemi öncesinde, petri kaplarına alınarak önce distile su sonrasında %70'lik etanol ile muamele edildi. Her bir yüzeyi 20 dakika olacak şekilde UV ile sterilize edildi.



Şekil 3.1. Elektrokimyasal anodizasyon için kullanılan düzeneğin genel görünümü. Güç kaynağı aracılığıyla voltaj ve süre kontrolü sağlanarak, titanyum anot ve platin katot arasında oluşturulan elektriksel alan yardımıyla nanotüp yapıların üretildiği sistem.

3.2.2. Titanyum Dioksit Yüzeyler Üzerinde Mezenkimal Kök Hücre Kültürü

-80°C'de saklanan, 500.000 hücre olarak dondurulmuş olan ticari kaynaklı insan kemik iliği mezenkimal kök hücreleri, 37°C su banyosunda çözüldükten sonra 4 ml besiyeri içeren 15 ml hacimdeki deney tüpüne alındı ve 500 g'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüjden sonra süpernatant atıldı ve hücre peleti besiyeri içinde çözülerek T75 hücre kültür kaplarına ekildi. Hücreler %80 yoğunluğa ulaşana kadar %5 CO₂ 37°C inkübatörde kültüre edildi ve haftada iki kere besiyeri değişikliği yapıldı. İstenilen yoğunluğa ulaşan hücreler pasaj 3 hücreler, kültür kaplarından tripsin ile kaldırıldı ve 12 kuyucuklu plaklar içine yerleştirilen kontrol (düz titanyum), 20V–20V, 60V–20V ve 80V–20V titanyum dioksit yüzeyler üzerine, 2×10^4 hücre/cm² yoğunlukta ve 60 µL'lik damlacıklar halinde ekilerek, 37 °C ve %5 CO₂ koşullarında

1 saat süreyle inkübe edildi. 1 saatlik inkübasyonun ardından üzerlerine besiyerleri eklendi ve 48 saat boyunca 37 °C ve %5 CO₂ ortamında inkübe edildi.

3.2.3. Transkriptomik ve Biyoinformatik Analizler

12 kuyucuklu kültür kaplarında 48 saatlik kültürün ardından, Toplam RNA, üreticinin talimatlarına göre Norgen Tek Hücreli RNA Saflaştırma Kiti kullanılarak izole edildi. RNA miktar ölçümleri ve kalite kontrol değerleri için nanospektrofotometre kullanıldı. polyA kuyruğu seçimi, kütüphane oluşturma, kütüphane çoğaltma ve kütüphane hazırlıkları yapıldı. Bu değerlendirmede istatistiksel anlamlılık sınırı olarak $p \leq 0.05$ eşiği temel alınmıştır.

Biyoinformatik analizinde TPM (Kilobaz Milyon Başına Transkript) yöntemi kullanıldı. Farklı şekilde ifade edilen genler (DEG'ler) p değeri $\leq 0,05$ ve log₂ kat değişimi 1'den büyük olacak şekilde tanımlandı. DEG analizinden türetilen gen setinin biyolojik bağlamını çözmek için bir zenginleştirme analizi gerçekleştirdi [63]. Çalışma, temeldeki biyolojik süreçlere ve veri setimizle ilişkili yollara (reaktom yolları) göre zenginleştirilmiş yolların kapsamlı bir görünümünü sağladı.

RNA İzolasyonu

Toplam RNA, üreticinin talimatlarına göre Norgen Biotek Corporation tarafından geliştirilen Single Cell RNA Purification Kit kullanılarak izole edildi. 12 kuyucuklu plaklar içine yerleştirilen titanyum yüzeyler üzerinde kültüre edilen MKH'ler, 48 saatlik kültürün ardından PBS ile yıkandı. PBS uzaklaştırıldıktan sonra hücreler üzerine 100 uL hücre parçalayıcı solüsyon eklendi ve 5 dakika boyunca bekletildi. Elde edilen lizat mikro santrifüj tüpüne aktarıldı ve hücre içeriğini bağlayıcı özellikte çözelti oluşması için 120 uL %70'lik etanol eklendi. 10 saniye vorteksledikten sonra kolona aktarıldı ve 3500 g'de santrifüj edildi. Altta kalan kısım atıldı, 400 uL yıkama solüsyonu ile 14.000 g'de santrifüj edildi. Bu yıkama işlemi 3 kez tekrarlandı ve altta kalan kısım atıldı. Kurutmak için 14.000 g'de 2 dakika santrifüj edildi. Yeni tüpe alınan kolon üzerine 17 uL çözme solüsyonu eklendi ve 200 g'de 1 dakika ve 14.000 g'de 1 dakika santrifüj edildi. RNA miktarı ve kalitesi

spektrofotometre ile ölçüldü. Elde edilen RNA örnekleri ileri çalışmalar için -80 °C'de saklandı.

Transkriptomik Analiz – PolyA Seçimi

İlk olarak, her örnek için 10 µl olacak şekilde Purification Beads, manyetik rack'e yerleştirildi ve Bead Wash Buffer kullanılarak iki defa yıkama işlemi gerçekleştirildi. Ardından beadler, RNA Hybridization Buffer içerisinde süspansiyon edildi. Devamında, RNase-free su ile 500 ng RNA'nın hacmi 10 µl'ye tamamlandı. Bu karışım, 60°C'de 1 dakika inkübe edilip ardından 25°C'ye alınarak denatüre edildi. Elde edilen 10 µl RNA örneği, 10 µl bead süspansiyonuna ilave edildi ve 25°C'de 1250 rpm'de 20 dakika inkübe edildi. Sonrasında, tüplerdeki beadler iki kez, her seferinde 5 dakika olmak üzere 25°C'de 1250 rpm'de inkübe edilerek yıkandı. Her yıkama adımının sonunda süpernatant uzaklaştırıldı.

Kütüphane Oluşturma

Her bir tüpe 15 µl Reverse Transcription ve Ligation Mix ilave edilerek beadler süspansiyon edildi. Sonrasında, her örneğe 2 µl Starter/Stopper Mix eklendi ve 25°C'de 1250 rpm hızında 5 dakika inkübe edildi. Ardından her tüpe 3 µl Enzyme Mix 1 eklendi ve yine 25°C'de 1250 rpm'de 5 dakika inkübe işlemi uygulandı. İnkübasyon tamamlandıktan sonra sıcaklık 37°C'ye yükseltilerek 1250 rpm'de 1 saat bekletildi. Devamında, beadler 100 µl Bead Wash Buffer ile iki kez yıkandı. Her örnekteki beadler, 17 µl Second Strand Synthesis Mix ile süspansiyon edildi. Bu karışım, PCR plakasına aktarıldı ve her örneğe 1 µl Enzyme Mix 2 ilave edildi. Thermocycler cihazında tek döngü çalıştırıldı: 98°C'de 90 saniye, 65°C'de 60 saniye ve 72°C'de 5 dakika. Daha sonra, 14 µl bead ile 2 µl Purification Solution karıştırıldı ve 5 dakika inkübe edildi. Karışım 5 dakika magnet üzerinde bekletildikten sonra süpernatant uzaklaştırıldı. Ardından, her örneğe 50 µl Elution Buffer eklenip karıştırıldı ve oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edildi. 70 µl Purification Solution ilave edilip karıştırıldı ve oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi. Karışım tekrar magnet üzerine alınıp 5 dakika bekletildi ve süpernatant atıldı. Beadler, %80 etanol ile iki kez (her biri 120 µl olacak şekilde) yaklaşık 30 saniye yıkandı. Sonrasında 10 dakika kurutma işlemi uygulandı. Kurutma sonrası, her örneğe

20 µl Elution Buffer eklenip iyice karıştırıldı ve oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edildi. Son adımda, tüpler magnete yerleştirilerek 5 dakika bekletildi ve süpernatant yeni bir PCR plakasına transfer edildi.

Kütüphane Çoğaltma

Her bir örneğe, 7:1 oranında hazırlanmış PCR Mix ve Enzyme Mix 2 karışımından 8 µl eklendi. Daha sonra, seçilen Barcode Primer her örneğe 5 µl olacak şekilde ilave edilerek karışım iyice karıştırıldı. İlk olarak, 98°C’de 30 saniye boyunca başlangıç denatürasyonu gerçekleştirilmiştir. Ardından, aşağıdaki üç aşamadan oluşan döngü 11 ila 25 kez tekrarlanmıştır:

- 98°C’de 10 saniye (denatürasyon)
- 65°C’de 20 saniye (primerlerin bağlanması)
- 72°C’de 30 saniye (uzama)

Döngüler tamamlandıktan sonra, 72°C’de 1 dakika süreyle son uzama yapılmış ve reaksiyon, 10°C’de süresiz olarak bekletilmiştir

Her bir örneğe 30 µl Purification Beads eklenerek karışım iyice homojenize edildi ve 5 dakika boyunca inkübe edildi. İnkübasyonun ardından tüpler magnet üzerine yerleştirilerek yaklaşık 5 dakika bekletildi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Sonrasında, her örneğe 30 µl Elution Buffer ilave edilip oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edildi. 30 µl Purification Solution eklenerek yine oda sıcaklığında 2 dakika bekletildi. Ardından, tüpler magnete yerleştirilip 5 dakika bekletildikten sonra süpernatant atıldı. Beadler, %80 etanol ile iki kez (her biri 120 µl hacminde) yaklaşık 30 saniye yıkandı. Yıkama sonrası, beadler yaklaşık 10 dakika kadar kurutuldu. Daha sonra her bir örneğe 20 µl Elution Buffer eklenerek karışım iyice çözüldü ve oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edildi. Son adımda, tüpler magnet üzerine yerleştirilip 5 dakika bekletildikten sonra elde edilen süpernatant, yeni bir PCR plakasına transfer edildi.

Kütüphane Hazırlığı

Kütüphane hazırlığı için her bir gene özgü olarak tasarlanmış primer havuzları (Ion AmpliSeq™ Human Gene Expression Panel) kullanılarak ultra-high multiplex PCR işlemi gerçekleştirildi. Kütüphane oluşturma sürecindeki amplifikasyon ve barkodlama adımları, Ion Chef cihazı aracılığıyla otomatik şekilde yapıldı. Her örneğe farklı barkod dizileri eklenerek, tüm örneklerin aynı yeni nesil dizileme çalışmasında birlikte analiz edilmesi sağlandı. Kütüphanelerin kantitatif miktar tayini, Qubit cihazı ve PicoGreen kiti kullanılarak florometrik yöntemle gerçekleştirildi. Ölçümler sırasında, Qubit dsDNA High Sensitivity Quantitation Kit içerisindeki standartlardan yararlanılarak çift zincirli DNA miktarı belirlendi. Ion Chef cihazından elde edilen birleştirilmiş kütüphaneler, emülsiyon PCR ile yapılan klonal amplifikasyona uygun olacak şekilde 10 pM konsantrasyona ayarlandı. Kütüphanelerin klonal amplifikasyonu için Ion PI Hi-Q OT2 200 kiti kullanıldı. Yeni nesil dizileme reaksiyonu, Ion PI Hi-Q Sequencing 200 Kit ile Ion Proton cihazında gerçekleştirildi. Elde edilen verilerin analizi, Torrent Server üzerinde bulunan analiz plug-in kodları yardımıyla yapıldı. Dizileme sonrasında elde edilen tüm okuma verileri, RPM (reads per million) yöntemiyle normalize edilerek karşılaştırmalı analizler için kullanıldı.

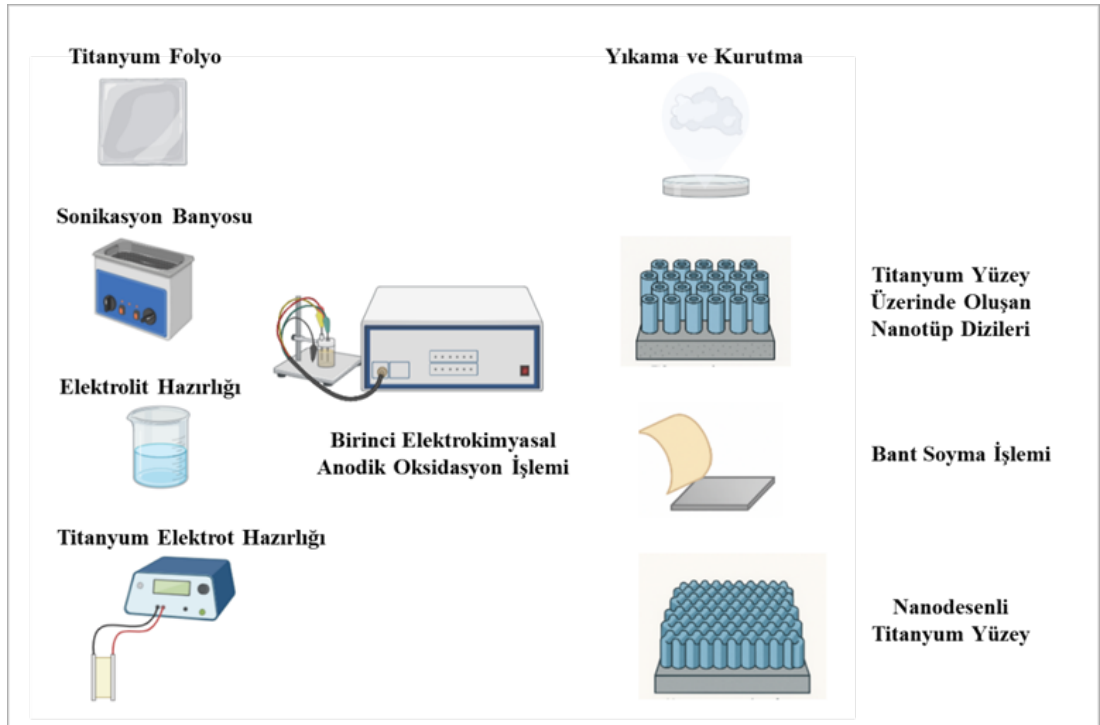
3.2.4. Temel Bileşenler Analizi – PCA Analizi

Farklı yüzeylerde kültüre edilen mezenkimal kök hücre örneklerinden elde edilen transkriptomik veriler kullanılarak temel bileşenler analizi (Principal Component Analysis, PCA) gerçekleştirilmiştir. Analiz, TCP (tissue culture plate), kontrol (düz titanyum), 20V-20V, 60V-40V, 80V-20V yüzey modifikasyonları arasındaki gen ifadesi farklılıklarını değerlendirmek amacıyla yapılmıştır. Ham dizileme verileri kalite kontrol ve hizalama adımlarından geçirildikten sonra, her örnek için normalleştirilmiş gen ifadesi değerleri (TPM) elde edilmiştir. PCA uygulaması, bu veriler temel alınarak gerçekleştirilmiştir. İlk iki bileşen (PC1 ve PC2) doğrultusunda örnekler iki boyutlu düzlemde konumlandırılmıştır. Veri işleme ve PCA analizi, R programlama dili kullanılarak gerçekleştirilmiş, analizde “prcomp” fonksiyonu ve ggplot2 paketi görselleştirme amacıyla kullanılmıştır. PCA grafiğinde her yüzey grubuna ait örnekler, farklı semboller ve renklerle gösterilmiş; benzer gen

ifade profiline sahip örneklerin konumları kümelenme eğilimleri doğrultusunda değerlendirilmiştir.

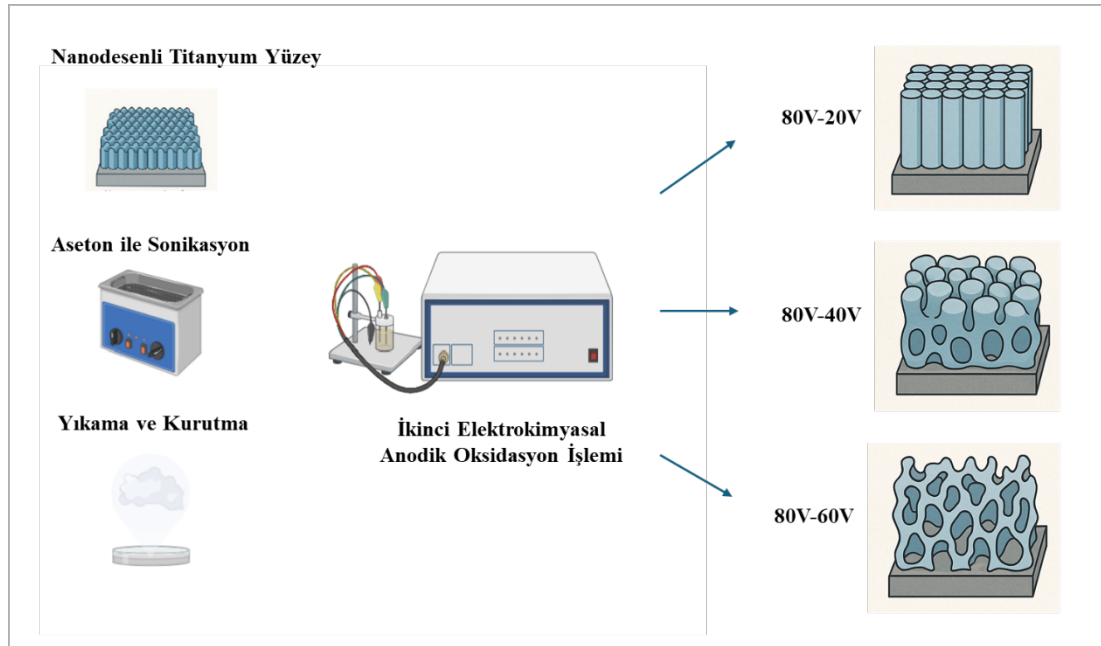
3.2.5. Elektrokimyasal Anodik Oksidasyon Yöntemi ile Hiyerarşik Titanyum Yüzeylerin Türetilmesi

Titanyum yüzeylerde farklı hiyerarşik nanotüp yapılarına sahip TiO_2 dizileri elde etmek amacıyla, iki aşamalı bir elektrokimyasal anodik oksidasyon işlemi uygulanmıştır. Bu yöntemde, nanotüplerin iç çaplarının kontrollü şekilde ayarlanabilmesi için uygulanan anodizasyon voltajı değiştirilmiştir. Ön deneysel uygulamalardan farklı olarak, hiyerarşik yapının daha belirgin hale getirilmesi amacıyla ilk aşamada 2 saat süreyle 80V sabit potansiyel uygulanmıştır (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Birinci elektrokimyasal anodik oksidasyon işlemi basamakları.

Uygulanan bu potansiyel, nanotüplerin dış çaplarının belirlenmesini sağlamıştır. Ardından, farklı nanotopografik yüzeylerin oluşturulması amacıyla ikinci anodizasyon aşaması gerçekleştirilmiş ve bu adımda sırasıyla 20 V, 40 V ve 60 V potansiyelleri uygulanarak 30 dakika süreyle anodik oksidasyon işlemi yapılmıştır (Şekil 3.3). İşlem sonrasında elde edilen yüzeyler, deiyonize su (DIW) ve/veya etanol (EtOH) ile yıkanarak temizlenmiş ve oda koşullarında havada kurutulmuştur.



Şekil 3.3. İkinci elektrokimyasal anodik oksidasyon işlemi ile yüzeylerin türetilmesi.

3.2.6. Türetilmiş Hiyerarşik TiO₂ Yüzeylerde Mezenkimal Kök Hücre ve İnsan Dermal Fibroblast Kültürü

Kültür çalışmaları için ticari olarak temin edilen insan kemik iliği kaynaklı MKH'ler ve insan dermal fibroblastları (DF'ler) kullanıldı. Hücreler, büyüme ortamında (DMEM-LG, %10 fetal sığır serumu (FBS), %1 penisilin-streptomisin ve %1 L-glutamin ile desteklenmiş) 37°C'de, %5 CO₂ şartlarında kültüre edildi. 12 kuyucuklu plaklara uygun boyutta kesilen titanyum yüzeyler üzerindeki pasaj 3 hücreler, droplet şekilde ekilerek 37°C'de 1 saat inkübe edildi (Şekil 3.4). Hücreler, ana deneyler için 12.500 hücre/cm², hücre adezyonu ve yayılma testleri için 7.500

hücre/cm² yoğunlukta ekildi. 1 saatin sonunda yüzeyler üzerine 1 mL hücre besiyeri koyuldu ve ileri deneyler için inkübasyona bırakıldı.



Şekil 3.4. 12 kuyucuklu plaklar içinde bulunan titanyum yüzeyler üzerinde droplet şeklinde hücre kültürü.

3.2.7. Taramalı Elektron Mikroskobu Analizi için Örneklerin Hazırlanması

48 saat sonunda titanyum yüzeyler üzerindeki hücreler üzerinden besiyerleri çekildi ve 3 kez PBS ile yıkandı. Hücrelerin üzerine 1 mL %2'lik gluteraldehit eklenerek 20 dakika oda sıcaklığında alüminyum folyoya sarılarak inkübe edildi. İnkübasyon bitiminde soğuk PBS ile yıkandı. Hücreler, %50-75-90-100'lük etanol dizilerinden geçirildi. Her dizide 5 dakika bekletildi. %100'lük etanol uygulamasından sonra, plakanın kapağı açık şekilde tamamen kuruması beklendi. Parafilmlemlenip +4°C'ye kaldırıldı.

3.2.8. cDNA Sentezi

3.2.3'te açıklanan RNA izolasyon basamağından sonra cDNA, High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Scientific) kullanılarak sentezlendi. Gen-spesifik primerler (Tablo 3.2), hedef mRNA'ların göreceli kantifikasyonu için kullanıldı ve *ACTB*, temel gen olarak kullanıldı. Buz üzerinde, 10 uL 2X RT master ve 10 uL RNA örneği (550 ng) eklenerek pipetleme yapıldı. Tüplerin kapakları kapatıldı, RNA içeriğinin dibe çözmesi ve hava kabarcığı kalmaması için santrifüj edildi. Tüpler, PCR cihazına yüklenmeye hazır olana kadar buz üzerinde bekletildi. cDNA sentezi için PCR döngü ayarları aşağıdaki gibidir (Tablo 3.1).

Tablo 3.1. cDNA sentezi PCR döngüsü.

Adım	Sıcaklık (°C)	Süre
1. Adım	25°C	10 dakika
2. Adım	37°C	120 dakika
3. Adım	85°C	5 dakika
4. Adım	4°C	∞

3.2.9. Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR)

Hedef genlerin ifade düzeyleri qRT-PCR yöntemiyle analiz edildi. Buz üzerinde, su, PCR primer, master mixten oluşan karışım pipetleme yapılarak karıştırıldı. LightCycler® 480 multiwell plakanın her bir kuyusuna 15 ul PCR karışımı eklendi ve folyo ile kapatıldı. 1500 g'de 2 dakika santrifüj edildi. LightCycler® 480 cihazına yüklendi. mRNA gen ifadesinin göreceli seviyeleri, $2^{-\Delta\Delta CT}$ yöntemi kullanılarak hesaplandı. CT verileri, *ACTB* ifadesi ile normalize edildi. Tüm reaksiyonlar için Roche Diagnostics'in talimatlarına göre Lightcycler® 480 SYBR Green Master Mix kullanıldı ve örnekler, LightCycler® 480 System kullanılarak üçlü

olarak çalıştırıldı. Kullanılan primer dizileri (Tablo 3.2) ve qRT-PCR döngü programı aşağıdaki gibidir (Tablo 3.3).

Tablo 3.2. qRT-PCR deneyinde kullanılan primer dizileri. F: ileri, R: geri.

Gen Adı	Forward Dizisi	Reverse Dizisi
CXCR4	F: GTATTGTCATCCTGTCCTGCT	R: CTCAAACCTCACACCCTTGCT
VEGFA	F: CAGATTATGCGGATCAAACCT	R: AAACAAATGCTTTCTCCGCT
ACTB	F: CGCAAAGACCTGTACGCCAAC	R: GAGCCGCCGATCCACACG

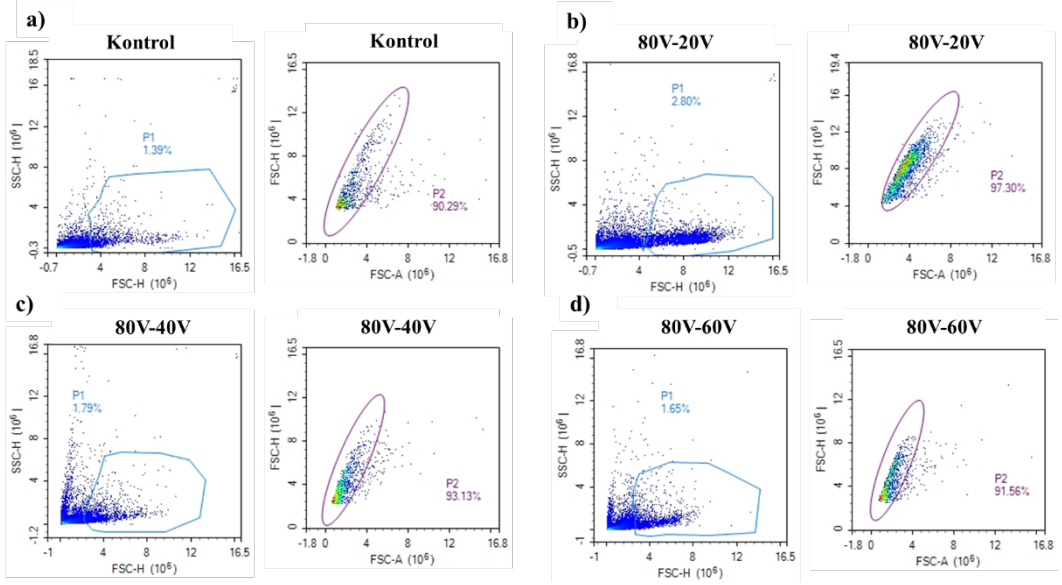
Tablo 3.3. qRT-PCR döngü programı.

	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
Başlangıç	95°C	5 dakika	1
Denatürasyon	95°C	10 saniye	
Annealing	60°C	30 saniye	
Extension	72°C	30 saniye	45

3.2.10. Akım Sitometrisi Analizi ile Hücre Canlılık Analizi

- 72 saatlik kültür sonunda, hücreler 500 uL tripsin ile kaldırıldı ve 1 mL PBS ile 400 g'de 5 dakika santrifüj edildi.
- 400 g'de 5 dakika daha santrifüj edilerek, PBS uzaklaştırıldı.
- Kit içeriğindeki cell stain bufferdan 2 mL eklenerek 2 kez daha 400 g'de 5 dakika santrifüj edildi ve flow tüpüne geçildi.
- Pelet 100 uL binding buffer ile sulandırıldı.
- 1 uL Annexin V antikoru eklendi.
- 2 uL PI antikoru eklendi, vortekslendi.
- 15 dakika oda sıcaklığında karanlıkta inkübe edildi.
- İnkübasyon bitiminde final volüm 300 uL olacak şekilde binding buffer eklendi ve 40 mm'lik filtreden geçirildi.

- Örneklerin okuması NovoCyte akım sitometri cihazında yapıldı (Annexin-FITC, PI-PE). Kapılama stratejileri Şekil 3.5’te verilmiştir.

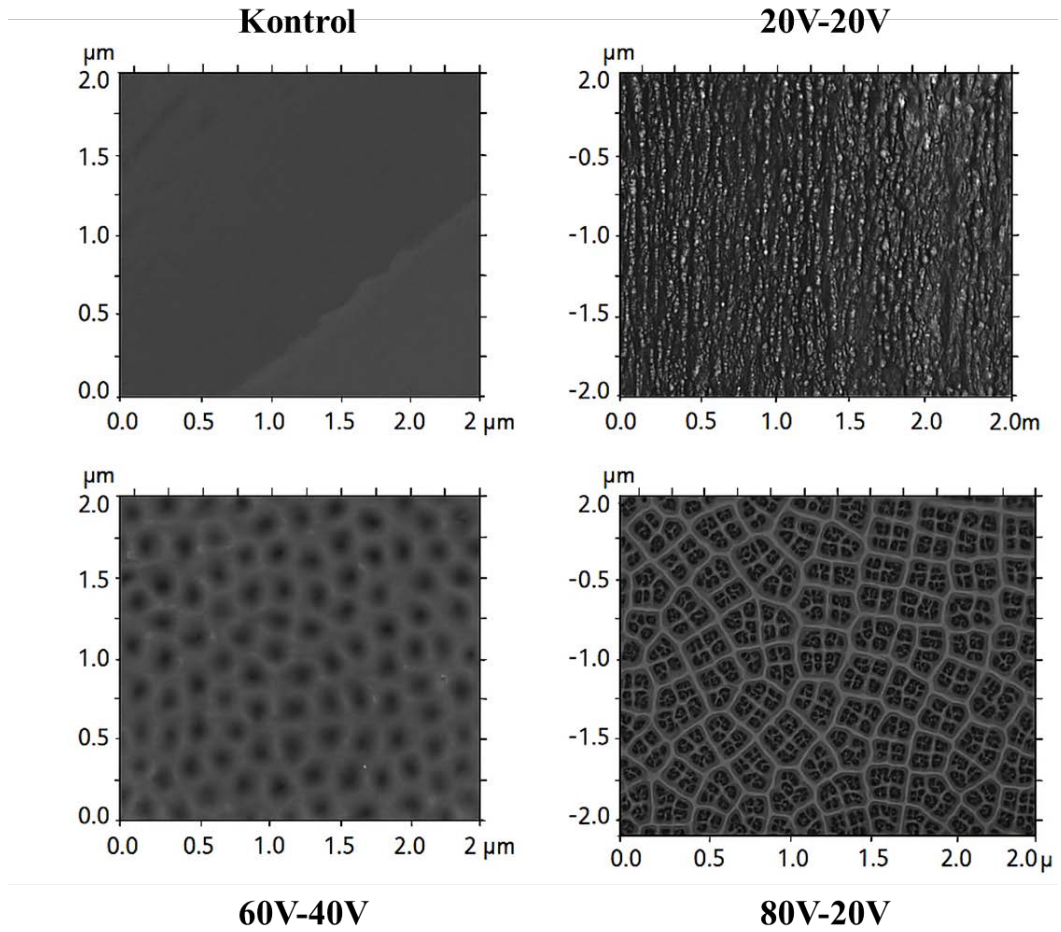


Şekil 3.5. Akım sitometrisi ile kapılama stratejileri detayları. a) Kontrol (düz titanyum), b) 80V-20V, c) 80V-40V, d) 80V-60V. V: volt.

4. BULGULAR

4.1. Farklı Nanotopografik Özellikte TiO₂ Yüzeylerin Morfolojik Karakterizasyonu

Bu bölümde, elektro-kimyasal anodik oksidasyon yöntemi ile farklı voltaj protokolleri uygulanarak elde edilen TiO₂ yüzeylerin morfolojik karakterizasyonu taramalı elektron mikroskobu (SEM) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Uygulanan voltajların, yüzey topografyasında belirgin yapısal farklılıklar oluşturduğu gözlenmiştir (Şekil 4.1). Kontrol (düz titanyum) yüzeyi pürüzsüz bir yapı sergilemiş, üzerinde gözenekli bir formasyon gözlenmemiştir. Yüzey genel olarak homojen ve düz karakterdedir. 20V–20V yüzeyinde, yüzeye paralel olarak uzanan, çizgisel ve yönlü yapılar izlenmiştir. Bu yapılar yüzey boyunca sık aralıklı ve düzenlidir. 60V–40V yüzeyinde, homojen dağılım gösteren, belirgin dairesel gözenekler gözlenmiştir. Gözenekler birbirine yakın konumda ve benzer çap özelliklerine sahiptir. 80V–20V yüzeyinde, poligonal sınırlarla çevrili alanlar içerisinde daha küçük boyutlu düzenli yapılar yer almaktadır. Yüzey, çok ölçekli ve örgü benzeri bir görünüme sahiptir.



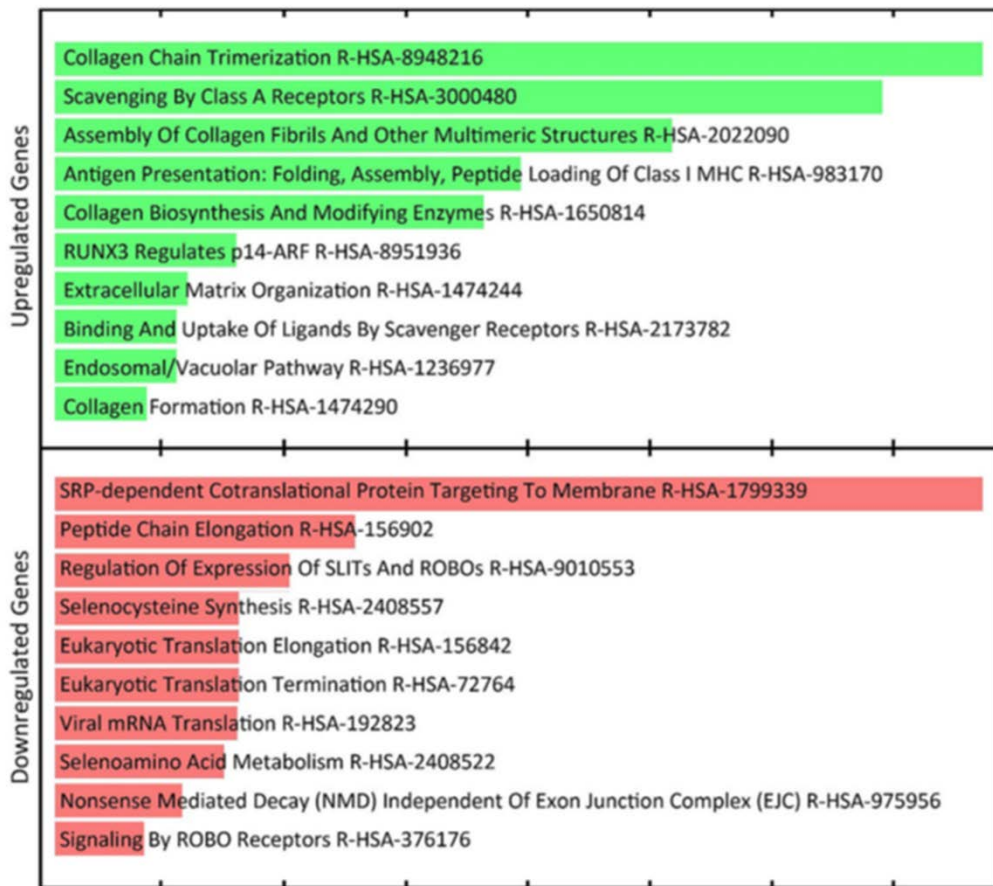
Şekil 4.1. Farklı anodizasyon voltajlarıyla oluşturulan TiO_2 yüzeylerinin SEM görüntüleri. Soldan sağa: Kontrol (düz titanyum), 20V–20V, 60V–40V ve 80V–20V yüzeyleri (ölçek çubuğu: 2 μm). V: volt, um: mikrometre.

4.2. Mezenkimal Kök Hücrelerin Transkriptomik Verileri

Belirtilen yüzeylerde 48 saat kültüre edilen MKH'lerin başlangıçta farklı yüzeylere verdiği erken biyolojik yanıtları ve bu yanıtlarla ilişkili gen düzeyindeki değişimleri ortaya koymak amacıyla transkriptom analizi gerçekleştirildi. Yapılan transkriptom analizleri, bu yüzeylerde kültüre edilen hücrelerde, ECM sentezi ve adezyonla bağlantılı genlerin ifadesini arttırdığını göstermiştir. Öte yandan, ribozomal proteinlerin ifade düzeylerinde azalma gözlemlendi. Analiz sonuçlarında toplam 119 gen ifade seviyesinin arttığı belirlenmiş olup bu genlerin büyük çoğunluğu kollajen ve ECM ile ilişkili genlerdir (örneğin COL4A1, COL3A1, COL1A2, COL6A2, TNC, EMILIN1 ve SPON2). Bu durum, hücrelerin yüzeyle olan temasının ve adezyonunun

güçlendiğini ortaya koymaktadır. Buna karşın, çoğunluğu ribozomal proteinlerden oluşan genlerin 99'nun ifadesinde azalma gözlemlendi. Anlamlı bulunan tüm genlerin listesi Ek 3'te sunulmuştur.

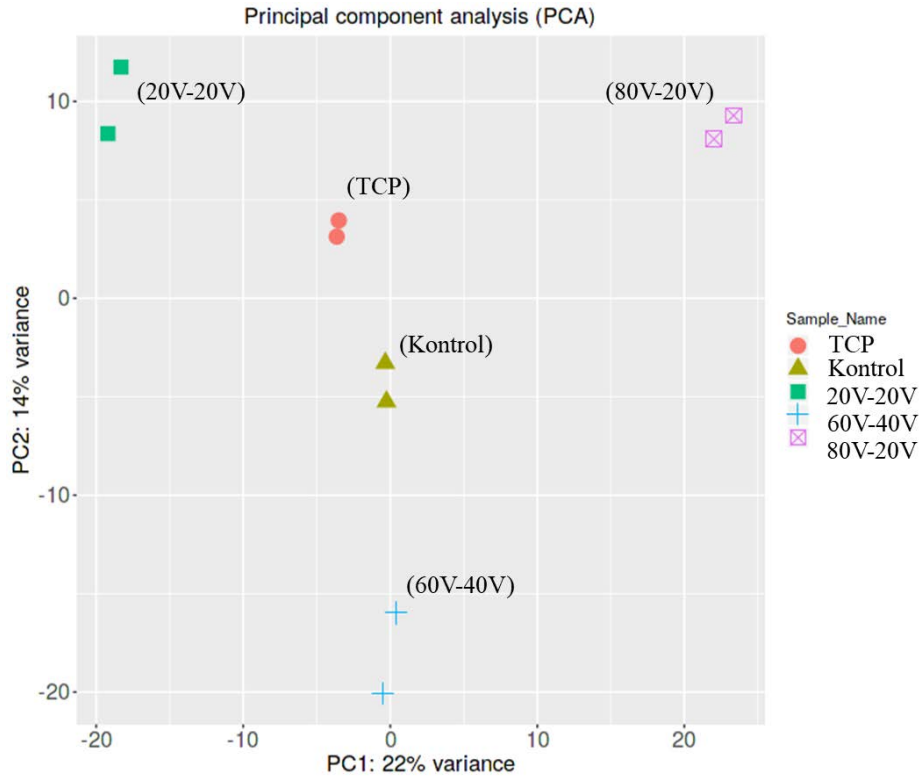
Reaktom veritabanı kullanılarak gerçekleştirilen yolak analizleri, 20V-20V ve 80V-20V yüzeylerinde kültüre edilen MKH'lerin gen ifade profillerinin karşılaştırılması sonucunda, 80V-20V yüzeyinde kollajen zincirlerinin üçlü yapı (trimerizasyon) oluşturması ile kollajen fibril ve multimerik yapıların birleşmesini kapsayan hücre dışı matriks organizasyonuna ilişkin biyolojik süreçlerin anlamlı düzeyde öne çıktığını göstermiştir. Öte yandan, ifadesi azalan genlerin, SRP aracılı membrana protein yönlendirmesi, peptit zinciri uzaması ve ökaryotik translasyon uzaması gibi protein sentezi süreçlerinde yer aldığı tespit edilmiştir (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. MKH'lerde gen ifadesine bağlı yolak değişimlerinin Reaktom analizi. Upregulated: artan, downregulated: azalan genler.

4.3. PCA Temelli Transkriptomik Değerlendirme

Transkriptom verilerine dayalı olarak gerçekleştirilen PCA (Principal Component Analysis) analizi, farklı yüzeyler üzerinde kültüre edilen mezenkimal kök hücrelerin gen ifade seviyelerine göre örnekler arası varyasyonu ortaya koymuştur (Şekil 4.3). Elde edilen PCA grafiğinde, ilk iki bileşen toplam varyansın %36'sını temsil etmektedir (PC1: %22, PC2: %14). Örneklerin yüzey gruplarına göre konumlandığı gözlenmiş ve benzer yüzeylerin birbirine yakın kümeler oluşturduğu gözlemlenmiştir. Kontrol grubu, PCA düzleminde merkez eksene yakın konumlanmıştır. 20V-20V grubu sol üst bölgede, 60V-40V grubu ise alt orta bölgede yer almıştır. 80V-20V grubu sağ üst köşede belirgin şekilde izole bir konumda bulunmuştur. TCP (*tissue culture plate*) grubuna ait örnekler, merkez bölgeye yakın ve kendi içinde kümelenmiş şekilde konumlanmıştır. Her bir örnek kümesinin konumu, yüzey temelli genetik yanıtların örnekler arasında farklılaştığını ve bazı yüzey gruplarının birbirinden ayrıştığını göstermektedir. Bu analiz, örnekler arası transkriptomik profil benzerliklerini nicel olarak değerlendirmek amacıyla kullanılmıştır. Analiz sonucunda, 80V-20V yüzeyinde kültüre edilen hücrelerin gen ifade profili, diğer gruplardan anlamlı şekilde ayrılarak daha düzenli ve stabil bir biyolojik yanıt gösterdi. Bu bulgular ışığında, 80V-20V yüzeyi, ileri aşamalarda kullanılacak yeni yüzeylerin türetilmesi için referans yüzey olarak belirlendi.



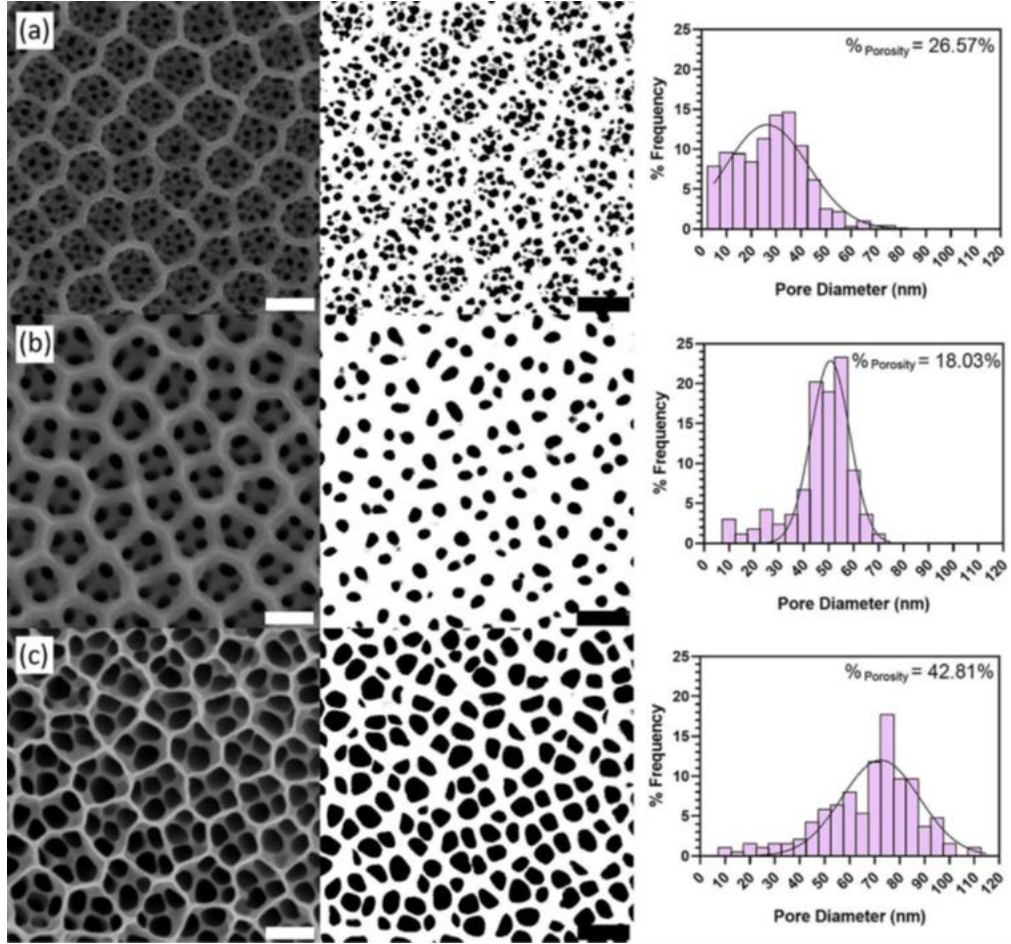
Şekil 4.3. Mezenkimal kök hücrelerin farklı yüzeylerdeki gen ifade profillerine göre gerçekleştirilen PCA analizi. V: volt, TCP: tissue culture plate, kontrol: düz titanyum.

4.4. Elektrokimyasal Anodik Oksidasyon ile Türetilen Yüzeyler ve Karakterizasyonu

4.4.1. Yüzey Morfolojisi, Gözeneklilik ve Gözenek Çapı Dağılımı

Bu bölümde, farklı voltajlarla elde edilen titanyum yüzeylerin yapısal özellikleri karşılaştırılmıştır. Morfolojik değerlendirmeler SEM görüntüleriyle sunulmuş; yüzey gözenekliliği ve gözenek çapı dağılımları ise kantitatif analizlerle desteklenmiştir. Şekil 4.5'te, ikinci elektrokimyasal anodizasyon işleminde farklı gerilim değerlerinde (20V, 40V, ve 60V) titanyum yüzeylerinde nanotüp çapı ve gözenekliliği üzerine yapılan ölçümlerin SEM görüntüleri sunulmaktadır. Yüzeydeki TiO₂ kaplamalarının dağılımını belirlemek için, görüntü işleme yoluyla elde edilen gözeneklilik yüzdeleri Formül 4.1 kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\% \text{Oksit Kaplama} = 100 - \% \text{Porozite} \quad (4.1.)$$



Şekil 4.4. A) 80V–20V, B) 80V–40V ve C) 80V–60V yüzelerinin SEM görüntüleri, görüntü işleme analizleri ve gözenek çapı dağılımları. Ölçek çubuğu: 200 nm, nm: nanometre.

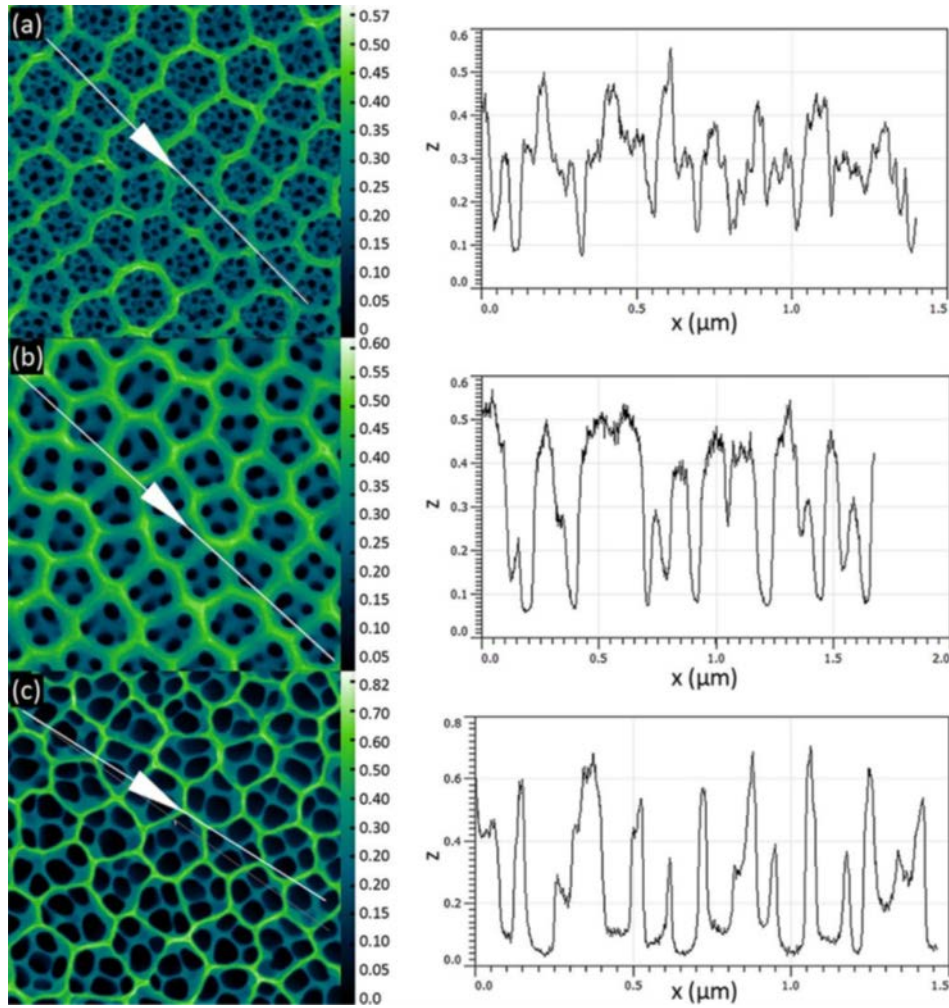
İkinci anodizasyon işleminden sonra, 20V, 40V ve 60V uygulama potansiyellerine karşılık gelen gözeneklilik değerleri sırasıyla %26,6, %18,0 ve %42,8 olarak ölçülmüştür. Gerilim artışı ile birlikte, iç nanotüplerin çaplarında da bir genişleme gözlemlenmiştir. Bu artış, sırasıyla 20V, 40V ve 60V uygulamalarında 28, 47 ve 68 nm olarak kaydedilmiştir. 40V'luk uygulamada kısa bir düşüş yaşansa da, 60V potansiyeliyle yapılan işlemlerde gözeneklilik %40'ın üzerine çıkmıştır.

Gözenek çapı dağılım grafikleri incelendiğinde, 20V uygulanan örneklerde çoğunlukla 30 nm çapında gözeneklerin olduğu, bunun yanında 10 nm ve daha küçük girintilerin hacminde belirgin bir artış gözlemlenmiştir. 40V'lık örneklerde ise

gözeneklerin %60'ından fazlası 40-60 nm arasında yoğunlaşmıştır. 60V ile yapılan anodizasyon sonrası elde edilen örneklerde ise gözenekler, genellikle 70-90 nm aralığında yer almakta olup, daha geniş bir dağılım sergilemektedir. Bu grup için ortalama gözenek çapı 68 ± 19 nm olarak hesaplanmıştır.

4.4.2. Sayısal Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM) ile Yüzey Topografya Analizi

Titanyum yüzeylerin mikro/nano ölçekli topografik yapıları, Sayısal Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM) ile incelenmiş ve çizgi profili analizleri yoluyla değerlendirilmiştir. Bu analiz sayesinde, yüzeyin belirli bir hattı boyunca yükseklik değişimleri görselleştirilmiş; böylece nanotüp çapı, derinliği ve pürüzlülük gibi parametreler sayısal olarak ortaya konmuştur. Şekil 4.6, ikinci anodizasyon işleminden sonra elde edilen yüzey çizgi profilleri ve z-yüksekliğini sunmaktadır. Hiyerarşik nanotüplerin çaplarındaki farklar ve ilk adımda 80V ile oluşturulan birincil nanotüplerin duvarlarındaki keskinlik değişiklikleri, maksimum profil değerlerinde belirgin şekilde gözlemlenmiştir. 80V-60V anodizasyonu uygulanan örneklerde yüzey desenlerinin üst noktalarındaki sivrilik artışı net bir biçimde gözlemlenmiştir.



Şekil 4.5. A) 80V–20V, B) 80V–40V ve C) 80V–60V yüzeylerine ait AFM topografik görüntüler ve çizgi profili analizleri. um: mikrometre.

4.4.3. Yüzeylerin İslanabilirlik ve Serbest Enerji Analizi

Anodizasyon işlemi sonrasında, yüzey hidrofiliğinde belirgin bir artış gözlemlenmiş olup, bu artış, düşük temas açıları ile doğrulanmıştır. Kontrol grubunda yüzey ıslanabilirliği 77° olarak ölçülürken, 80V–20V, 80V–40V ve 80V–60V uygulanan örneklerde sırasıyla 12° , 10° ve 8° olarak belirlenmiştir. Bu değişimler, yüzeyde oksit tabakası oluşumunun bir sonucu olarak ortaya çıkmaktadır. Yüzey serbest enerjisi ve bileşenlerindeki değişimler, OWKR/Fowkes yöntemiyle hesaplanarak Tablo 4.1’de gösterilmiştir. Uygulanan potansiyelin artmasıyla, yüzeyin polar bileşeninde belirgin bir yükselme gözlemlenmiştir. Oksidasyon potansiyelinin arttığı gruplarda, yüzey serbest enerjisinin polar bileşeni de artmıştır.

Tablo 4.1. OWKR/Fowkes yöntemiyle hesaplanan yüzey serbest enerji değerleri (Kontrol: düz titanyum, 80V–20V, 80V–40V ve 80V–60V). ytot: toplam yüzey serbest enerjisi, yd: apolar bileşen, yp: polar bileşen, WCA: ıslanabilirlik derecesi.

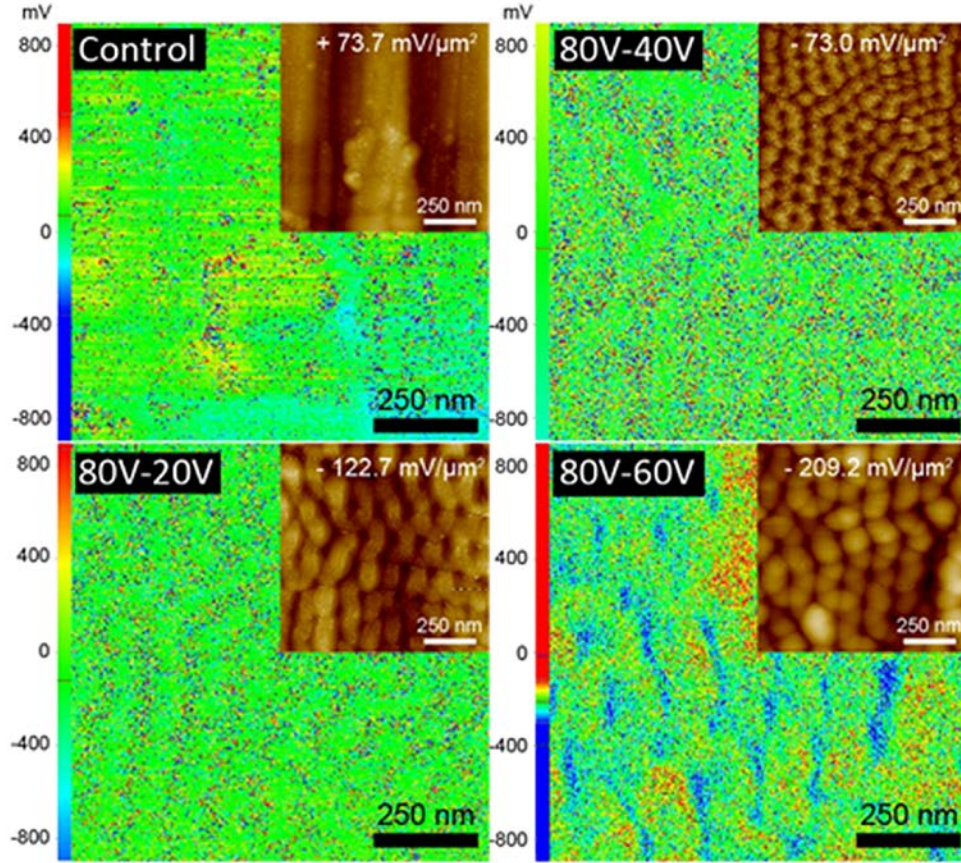
	ytot [mN m ⁻¹]	yd [mN m ⁻¹]	yp [mN m ⁻¹]	WCA (°)
Kontrol	43,8 ± 06	38,7 ± 0,6	5,0 ± 0,6	77
80V-20V	76,90 ± 1,2	48,6 ± 0,7	28,3 ± 0,7	12
80V-40V	72,9 ± 0,6	40,9 ± 0,5	31,7 ± 0,3	10
80V-60V	76,9 ± 2,1	43,7 ± 1,6	33,2 ± 0,7	8

Anodize yüzeylerin RMS (karekök ortalama kare) pürüzlülük değerleri, birbirine oldukça yakın olduğu gözlemlenmiştir. RMS değerleri, kontrol örneği için 137 nm, 80V–20V örneği için 83 nm, 80V–40V örneği için 78 nm ve 80V–60V örneği için ise 76 nm olarak ölçülmüştür. 80V–60V yüzeyi, diğer yüzeylere kıyasla, yüksek kurtosis (sivrilik) değeriyle karakterize edilen keskin uçlu bir morfoloji göstermiştir. Bu fark, Kelvin prob kuvvet mikroskobu (KPFM) ile yapılan yüzey yükü analizlerinde de net bir şekilde gözlemlenmiştir. 80V–60V yüzeyi, $-209 \text{ mV } \mu\text{m}^{-2}$ ile en yüksek negatif ortalama yüzey potansiyeline sahipken, kontrol örneği $+73 \text{ mV } \mu\text{m}^{-2}$ lik pozitif yüzey potansiyeline sahiptir. 80V–20V ve 80V–40V örnekleri ise sırasıyla -122 ve $-73 \text{ mV } \mu\text{m}^{-2}$ negatif yüzey potansiyelleri göstermektedir.

KPFM renk haritalarına göre (Şekil 4.7), 80V–20V, 80V–40V ve 80V–60V örneklerinde yüzey yüklerinin homojen bir şekilde dağıldığı, ancak işlenmemiş kontrol örneği yüzeyinde morfolojik kusurlar ve heterojen yüzey topografisi nedeniyle yük dağılımının heterojen olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca, negatif potansiyelin özellikle nano-oyuklar ve gözeneklerde daha yoğun olduğu gözlemlenmiştir. Ancak, yük dağılımının kesin konumu hakkında yeterli veri elde edilememiştir. Yine de, porozite artışı ve oksit tabakasındaki sivri duvarların varlığı, yük yoğunluğunda belirgin bir artışa neden olmuştur.

Yüzey potansiyelinde ise voltaja bağlı olarak kademeli bir artış gözlemlenmiştir. Anodize edilen yüzeylerde, negatif ortalama yüzey potansiyeli 80V–

20V grubunda $-122,7 \text{ mV } \mu\text{m}^{-2}$, 80V–40V grubunda $-73,7 \text{ mV } \mu\text{m}^{-2}$ ve 80V–60V grubunda $-209,2 \text{ mV } \mu\text{m}^{-2}$ olarak belirlenmiştir. Bu artış, özellikle daha kalın amorf oksit tabakalarına sahip gruplarda daha belirgin hale gelmiştir. Kontrol grubunda ise pozitif ortalama yüzey potansiyeli $+73 \text{ mV } \mu\text{m}^{-2}$ olarak ölçülmüştür.



Şekil 4.6. Kontrol, 80V–20V, 80V–40V ve 80V–60V yüzeylerine ait KPFM ile elde edilen yüzey potansiyeli dağılımları ve ilgili AFM topografik görüntüleri (görüntü alanı: $1 \mu\text{m}^2$). um: mikrometre, mV: mili volt, nm: nanometre.

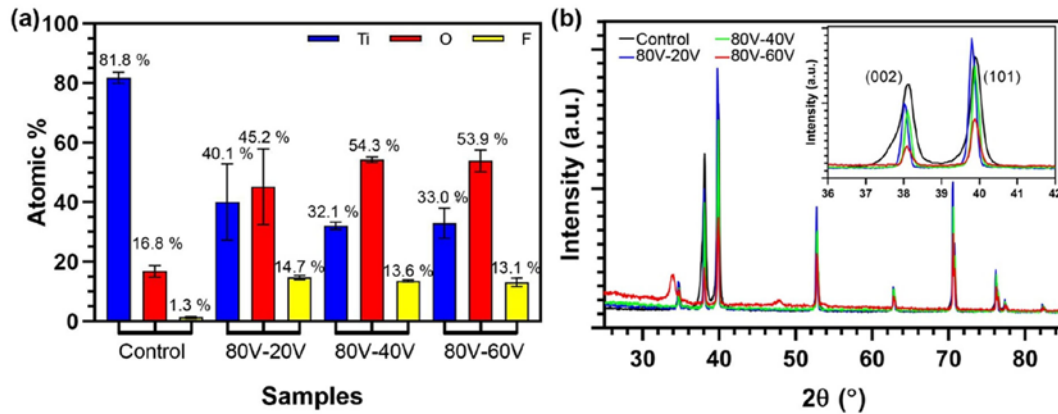
4.4.4. Yüzey Kimyasının Analizi

Enerji dağılımlı X-ışını spektroskopisi (EDS) analizleri, numunelerin yüzey bileşimini belirlemek amacıyla her bir örnek üzerinde beş farklı noktadan ölçüm alınarak gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.8a). Kontrol grubunda yüzey, %81,82 titanyum (Ti), %16,84 oksijen (O) ve %1,34 flor (F) atomik yüzdeleriyle karakterize edilmiştir. Anodizasyon işleminin ardından, özellikle oksijen oranlarında belirgin bir artış gözlenmiştir. Oksijen yüzdesi 80V–20V grubunda %45,2'ye, 80V–40V grubunda

%54,3'e ve 80V–60V grubunda %53,9'a ulaşmıştır. Bu artışlar, yüzeyde oluşan oksit katmanının varlığına işaret etmektedir.

F elementine ait atomik yüzdelere ise 80V–20V, 80V–40V ve 80V–60V gruplarında sırasıyla %14,7, %13,6 ve %13,1 olarak ölçülmüştür. Potansiyel artışına rağmen, flor oranlarında belirgin bir artış gözlemlenmemiştir. Elde edilen değerler, elektrolit içeriğinden gelen flor iyonlarının, anodizasyon süreci ve sonrasında gerçekleştirilen durulama adımlarında çözünerek yüzeyde sabit bir düzeyde kaldığını göstermektedir. Flor yüzdesinde gözlenen benzerliklere karşın, farklı numunelerdeki yüzey topografisine bağlı olarak yük dağılımlarında çeşitlilik tespit edilmiştir.

Tüm anodize gruplarda, amorf titanya katmanının titanyum elektrotu üzerinde oluşumu, XRD spektrumlarının işlem görmemiş kontrol örnekleriyle karşılaştırılmasıyla doğrulanmıştır (Şekil 4.8b). Kristalin TiO_2 fazlarına ait belirgin bir pike rastlanmamıştır. Ancak 80V–60V grubunda, diğer gruplara kıyasla daha kalın bir oksit tabakasına işaret eden amorf bölgede genişleme ve Ti(002) ile Ti(101) zirvelerinde yoğunluk azalmaları belirlenmiştir. Bu örnekte, 37° altında bulunan amorf bölgenin büyüklüğü ve pik kayması, oksit tabakasının kalınlaştığını göstermektedir.

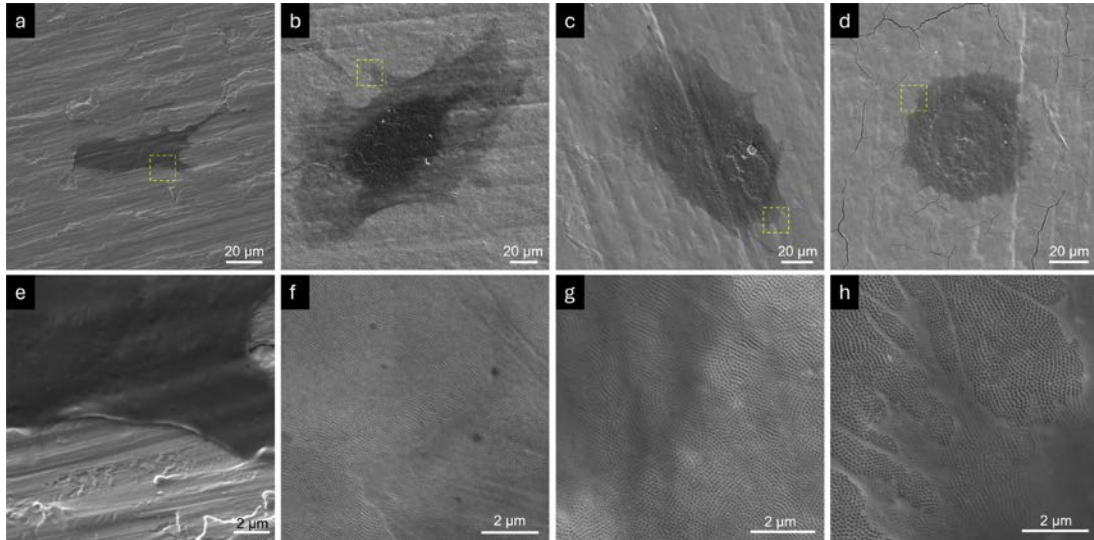


Şekil 4.7. A) Kontrol (düz titanyum) ve modifiye yüzeylerin EDS ile belirlenen atomik Ti, O ve F yüzdeleri; B) aynı örneklere ait XRD spektrumları (Kontrol: siyah, 80V–20V: mavi, 80V–40V: yeşil, 80V–60V: kırmızı). V: volt, Ti: titanyum, O: oksijen, F: flor.

4.5. Modifiye Titanyum Yüzeylerin Mezenkimal Kök Hücre Davranışları Üzerindeki Etkileri

4.5.1. Taramalı Elektron Mikroskobu ile Hücre Yayılım Davranışının Değerlendirilmesi

SEM görüntüleri, hücrelerin yüzeye yapışma sonrası etkileşim biçimlerini değerlendirmek amacıyla kullanılmıştır (Şekil 4.9). Şekil 4.9e'de kontrol grubuna ait yüzey-hücre arayüzünde anlamlı bir etkileşim izlenmemiştir. Buna karşılık, anodize edilen yüzey gruplarında aktin filamentlerinin belirgin şekilde organize olduğu gözlemlenmiş, bu durum sitoskeleton oluşumunun başladığını göstermektedir (Şekil 4.9f-h). Kontrol yüzeyinde hücrelerin yayılım yetenekleri sınırlı kalmış, hücre sınırları belirgin daralma eğilimi göstermiştir. Ancak yüzey modifikasyonları sonrası hücre yayılımının arttığı, substrat üzerindeki nanopatternlerin belirginleştiği ve hücresel yapıların daha ince formda gözlemlendiği tespit edilmiştir. Özellikle 80V-60V yüzeyinde hücrelerin filopodyal uzantılarının yüzey boyunca çok yönlü ve aktif biçimde geliştiği açıkça görülmüştür.



Şekil 4.8. A) Kontrol (düz titanyum), B) 80V-20V, C) 80V-40V, D) 80V-60V yüzeylerinde hücre tutunma davranışı; ilgili bölgelerin yüksek büyütmeli SEM görüntüleri (E-H) hücre-yüzey etkileşiminin detaylı gösterimi. V: volt, um: mikrometre.

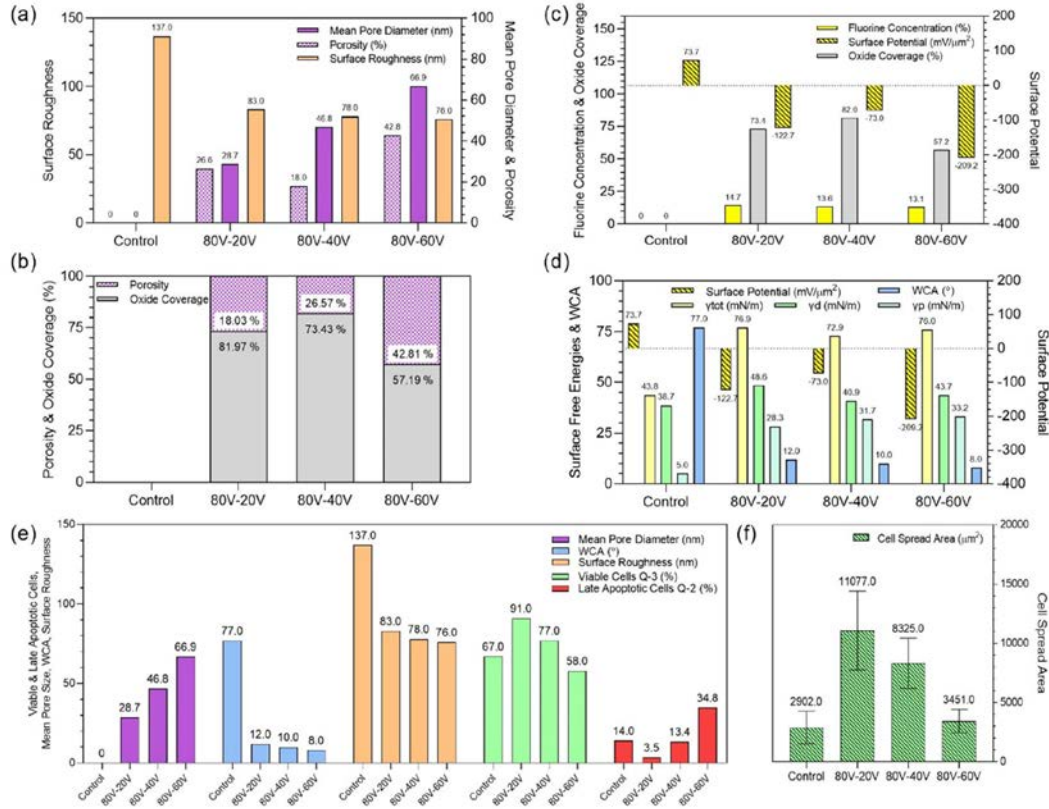
4.5.2. Hücre–Titanyum Yüzey Etkileşimlerinin Grafikselleştirilmesi

Elektrokimyasal anodizasyon sonrası elde edilen yüzeylerin yapısal özellikleri kapsamlı biçimde değerlendirilmiştir (Şekil 4.9). Anodizasyon işlemi, kontrol yüzeyine kıyasla RMS değerlerini ve su temas açısını (WCA) doğrudan azaltmıştır (Şekil 4.9a). Voltaj arttıkça, örneklerde daha büyük ortalama gözenek çapına sahip, poroz yapılar oluşmuştur. Şekil 4.9b’de grupların yüzeylerindeki porozite düzeyleri ve oksit kaplama oranları karşılaştırılmıştır. Hiyerarşik gözeneklerin alt kısmında biriken negatif yüklü $[\text{TiF}_6]^{2-}$ kalıntıları, ikinci anodizasyon adımında uygulanan voltajla değişmiştir (Şekil 4.9c). Bu iyonik kalıntı nedeniyle, anodize yüzeylerde yüzey potansiyelinin pozitiften negatife kaydığı gözlemlenmiştir. Florin oranları gruplar arasında benzer olsa da, oksit kaplama yüzdesindeki farklılıklar nedeniyle yüzey potansiyellerinde anlamlı değişiklikler meydana gelmiştir. En yüksek negatif yüzey potansiyeli ve en düşük oksit kaplama oranı, 80V–60V grubunda tespit edilmiştir.

EDS ve XRD analizleri, oksit tabakasının kalınlığının 80V–20V’den 80V–60V’a doğru arttığını göstermektedir. Yüzey serbest enerjisindeki artış ve WCA’daki azalma, yüzey potansiyeli ile ilişkilidir (Şekil 4.9d). Anodize yüzeylerde, MKH hücrelerinin yayılma alanları, kontrol grubuna göre belirgin bir artış göstermektedir (Şekil 4.9e). En düşük hücre canlılığı, yüksek porozite ve güçlü elektrostatik çekimin etkisiyle 80V–60V örneğinde tespit edilmiştir. Buna karşın, 80V–20V ve 80V–40V gruplarında, hücrelerin oksit tabakasına tutunabildiği yüzey alanlarının artmasıyla hücre canlılığı, kontrol grubuna kıyasla anlamlı düzeyde daha yüksek bulunmuştur.

Hücre yayılımı, bireysel hücrelerin kapladığı alan üzerinden sayısal olarak değerlendirilmiş ve Şekil 4.9f’de grafikselleştirilmiştir. Hiyerarşik tübüler yapıya sahip tüm anodize gruplarda, tek hücre yayılım alanında artış tespit edilmiştir. 80V–20V ve 80V–40V örneklerinde, kontrol grubuna kıyasla anlamlı düzeyde artış gözlemlenirken, 80V–60V grubunda hücre yayılım alanında azalma kaydedilmiştir.

Yüksek büyütme görüntülerde bu yüzeyde sınırlı sayıda filopodya uzantıları gözlemlenmiştir. En yüksek yüzey yükü, 80V–60V örnek grubunda gözlemlenmiştir.

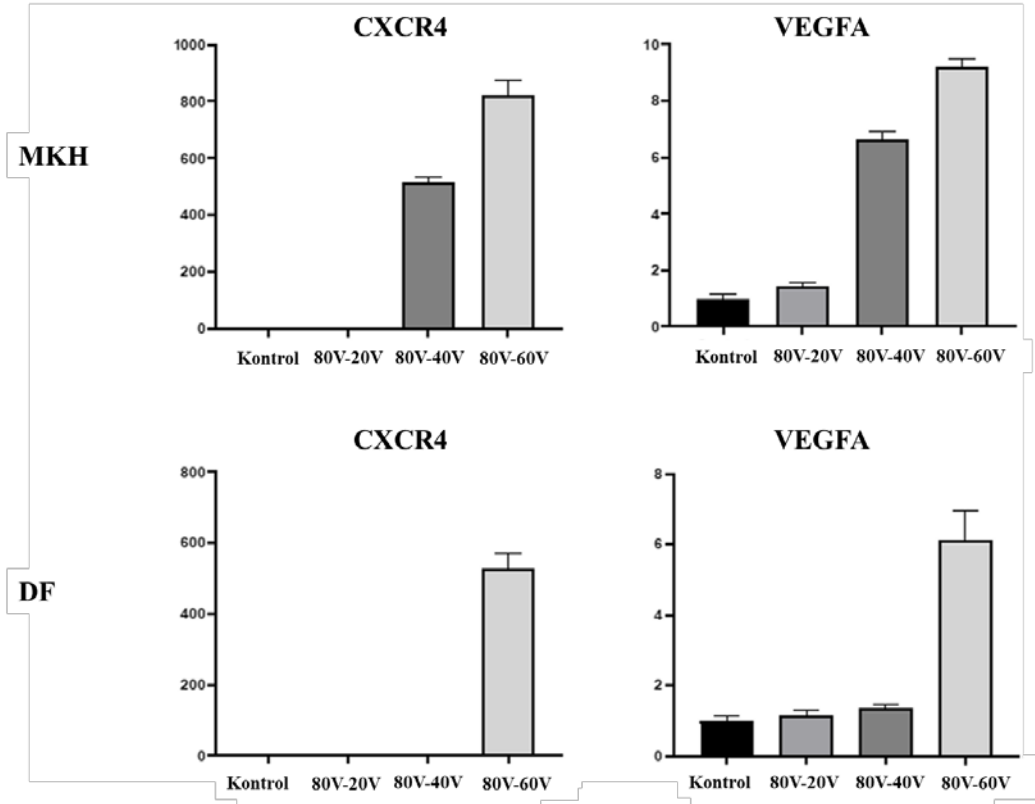


Şekil 4.9. Anodize titanyum yüzeylerin fizikokimyasal özellikleri ve hücresel yanıtlarının karşılaştırmalı analizi: A) Ortalama gözenek çapı, yüzey pürüzlülüğü ve porozite, B) Porozite ve oksit kaplama yüzdeleri, C) Flor konsantrasyonu, oksit kaplama ve yüzey potansiyeli, D) Yüzey potansiyeli, yüzey serbest enerjisi bileşenleri ve su temas açısı, E) Yüzey parametreleri ile canlı/geç apoptoz hücre oranları; F) Ortalama hücre yayılım alanları. V: volt, WCA: ıslanabilirlik derecesi.

4.6. Nanotopografik Yüzeylerin Rejenerasyonla İlgili Genlerin İfadesine Etkisi

Nano düzeydeki yüzey değişikliklerinin, MKH'lerin fonksiyonu için kritik bazı genlerin mRNA seviyeleri üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. Şekil 4.8'de, farklı yüzeylerde kültürlenen hücrelerde CXCR4 (kemokin reseptör tipi 4) ve VEGFA (vasküler endotelial büyüme faktörü A) genlerinin ifade düzeyleri qRT-PCR yöntemi ile belirlenmiştir (Şekil 4.10). CXCR4 ifadesinde, 80V–20V yüzeyinden 80V–40V ve

80V–60V yüzeylerine geçildiğinde artış kaydedilmiştir. Benzer şekilde, VEGFA ifadesi, 80V–20V yüzeyinde en düşük seviyede ölçülmüş; voltajın artmasıyla 80V–40V ve 80V–60V uygulamalarında gen ifade düzeylerinde artış gözlenmiştir. Her iki genin en yüksek gen ifade seviyesi 80V–60V uygulamasında kaydedilmiştir.

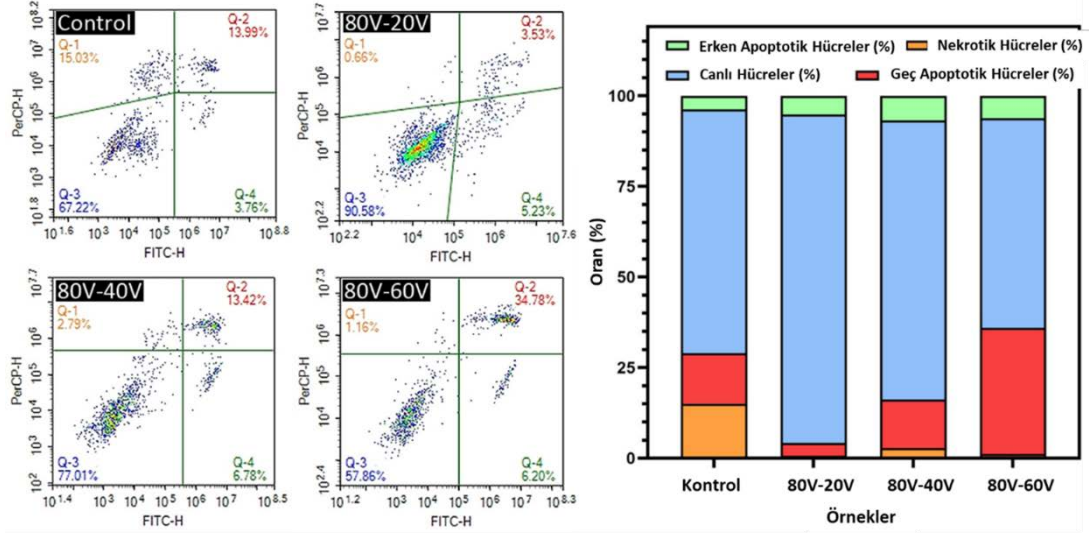


Şekil 4.10. Farklı yüzeylerde kültüre edilen MKH ve DF'lara ait CXCR4 ve VEGFA genlerinin relatif mRNA ifadesi seviyeleri. Kontrol: düz titanyum, V: volt.

4.7. MKH'lerin Canlılık Analizi: Akım Sitometrisi

Akım sitometrisi, farklı nanoy yüzeylerde ile kültüre edilen MKH'lerin canlılık durumu, nekroz ve apoptoz oranlarını belirlemek amacıyla kullanılmıştır (Şekil 4.11). Kültüre edilen hücrelerin canlılık oranları ve reaktif oksijen türleri (ROS) üretimi, akım sitometrisiyle analiz edildi. Kontrol yüzeyinde hücrelerin %68'i canlı olarak tespit edildi. 80V–20V yüzeyinde hücre canlılığı %90, 80V–40V yüzeyinde %77, 80V–60V yüzeyinde ise %57 olarak belirlendi. Nekrotik hücre oranı 80V–20V yüzeyinde %0,66 seviyesinde ölçüldü. Erken apoptoz oranı yüksek voltajlı yüzeylerde

artış göstermiş; 80V–60V örneğinde bu oran %6,2 olarak kaydedilmiştir. Aynı yüzeyde geç apoptoz oranı %34,78 olarak ölçülmüştür.



Şekil 4.11. Dört farklı yüzeyde kültüre edilen MKH'lere ait canlılık analizleri: akım sitometrisi dağılım grafikleri (sol) ve hücre popülasyon oranları (sağ). Kontrol: düz titanyum, FITC-H: Annexin, PerCP-H: PI, V: Volt.

5. TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında, iki aşamalı elektrokimyasal anodik oksidasyon yöntemiyle farklı nanotopografik özellikler sergileyen TiO₂ yüzeyler elde edilmiş ve bu yüzeylerin stromal hücre davranışları üzerindeki etkileri çok yönlü olarak değerlendirilmiştir. Özellikle 80V–20V potansiyeli ile elde edilen, çok ölçekli ve örgü benzeri topografyaya sahip yüzey, ilk aşamada üretilen yüzeyler arasında transkriptomik profil ve PCA sonuçları açısından dikkat çekici bir ayrışma göstermiştir. Bu yönüyle, erken biyolojik yanıtların değerlendirilmesinde öne çıkan bir yüzey olarak belirlenmiş; ancak çalışmanın ilerleyen aşamalarında türetilen yüzeyler arasında biyolojik potansiyeli daha yüksek yüzeyler gözlemlenmiştir.

Transkriptom analizlerinde, 80V–20V yüzeyinde kültüre edilen mezenkimal kök hücrelerde, başta COL4A1, COL3A1, COL1A2, TNC, SPON2 gibi kollajen zinciri bileşenleri olmak üzere toplam 119 genin anlamlı şekilde arttığı tespit edilmiştir. Bu genlerin büyük çoğunluğunun ekstraselüler matriks (ECM) sentezi, organizasyonu ve hücrel adezyon ile doğrudan ilişkili olması, yüzey-topografya uyaranlarının genetik düzeyde güçlü bir karşılık bulduğunu göstermektedir. Benzer şekilde, Testa ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen bir transkriptom çalışmasında, 3 boyutlu niş ortamında kültüre edilen MKH'lerde ECM ile ilişkili birçok genin anlamlı düzeyde artış gösterdiği bildirilmiştir. [64].

Reaktom yolak analizleri, bu artışın yalnızca gen düzeyinde değil, aynı zamanda kollajen trimerizasyonu, fibril oluşumu ve ECM yeniden yapılanması gibi koordineli biyolojik süreçlerde kümелendiğini ortaya koymuştur. Bu, hücrelerin sadece temas ettikleri yüzeyi algılamakla kalmayıp, bu topografik bilgiye karşı fonksiyonel bir yeniden yapılandırma sürecine girdiklerini göstermektedir. Yapılan bir çalışmada, kollajen içeren ECM bileşenleriyle etkileşim sonrası MKH'lerde integrin-aracılı sinyal yollarının aktive olduğu ve bunun ECM yeniden yapılanma süreçlerini tetiklediği literatürde ortaya konmuştur [65]. ECM kompozisyonu kadar, hücrenin ECM ile kurduğu etkileşim de büyük önem taşımaktadır. Kollajenin *Wharton Jelly* kaynaklı MKH'ler de çoğalma, yüzey belirteçleri, adezyon, göç, kendini yenileme ve farklılaşma yetenekleri üzerine olan etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, kollajen ile

zenginleştirilmiş 3D kültür sistemlerinde MKH'lerin hem kollajen genlerinde hem de adezyonla ilişkili genlerde anlamlı düzeyde artış gösterdiği görülmüştür [66].

PCA analizi sonuçlarına göre, 80V–20V yüzeyinde elde edilen örnekler, diğer gruplardan belirgin şekilde ayrılan bir transkriptomik profil sergilemiştir. Bu yüzeyin, kontrol ve diğer voltaj gruplarına kıyasla daha kompakt bir kümelenme göstermesi, hücrelerin bu yüzeyde ortak ve güçlü bir biyolojik yanıt geliştirdiğini desteklemektedir. Bu nedenle, bu yüzey erken değerlendirme amacıyla referans alınmıştır.

Öte yandan, hücrelerin enerji kullanımına ilişkin stratejik adaptasyonlarını gösteren önemli bir bulgu da toplam 99 ribozomal genin anlamlı şekilde azalmış olmasıdır. Bu genlerin büyük kısmının ribozomal proteinlerle ve protein sentezi süreçleriyle ilişkili olduğu belirlenmiştir. Bu durum, hücrelerin yeni oluşturulan hiyerarşik TiO₂ yüzeye adaptasyonu sırasında protein üretim kapasitesini geçici olarak azaltarak enerji yönetimini daha verimli kılmaya çalıştıklarını düşündürmektedir. Hücrelerin bu yanıtı, özellikle ilk temas evresinde, hayati fonksiyonlarını sürdürebilmek amacıyla enerji kullanımını yeniden düzenlemeye yönelik fizyolojik bir strateji olabilir. Bu bulgumuzla paralel olarak bir çalışmada, MKH'ler farklı nanotopografik yüzeylerde kültüre edilmiş ve gen ifade düzeyleri incelenmiştir [67]. Araştırmada, ribozomal protein genlerinin anlamlı şekilde azaldığı ve bu değişikliğin metabolik stres yanıtı kapsamında, hücrelerin enerji harcamalarını azaltmak üzere geliştirdiği bir adaptasyon olduğu bildirilmiştir [67]. Bunun yanı sıra, translasyon sürecinin SRP (sinyal tanıma parçacığı) aracılı membran hedefleme ve peptid zinciri uzaması gibi farklı basamaklarında da baskılanma tespit edilmiştir. Bu, protein sentezi üzerindeki kontrolün yalnızca ribozomal düzeyde değil, aynı zamanda ko-translasyonel yönlendirme aşamasında da yürütüldüğünü göstermektedir. SRP kompleksinin translasyonel yükün azaltılması yoluyla hücre içi enerji dengesine katkı sağladığı daha önce gösterilmiştir [68]. Bu bulgular, özellikle hiyerarşik topografyaların, hücrelerin genetik yanıtları üzerinde çok boyutlu düzenleyici etkiler yarattığını göstermesi açısından önemlidir. Hücresel metabolizmanın yeniden düzenlenmesiyle ilgili bir diğer çalışmada, farklı nanotopografik yüzeylerde kültüre edilen stromal hücrelerde protein senteziyle ilişkili genlerin baskılandığı (RPLP0,

RPS6 gibi), bunun enerji tasarrufu ve mikroçevresel uyum açısından önemli bir biyolojik strateji olduğu ortaya konmuştur [67]. Bu da, translasyonel baskılanmanın yalnızca yüzeye yanıt değil, aynı zamanda işlevsel bir yeniden yapılandırma amacı taşıdığını göstermektedir.

İlk verilerden elde edilen bulgular ışığında gerçekleştirilen ikinci anodizasyon sonrasında elde edilen gözeneklilik ve nanotüp çapı verileri, farklı gerilimlerin titanyum yüzeyindeki nanotüp morfolojisini nasıl etkilediğini açıkça ortaya koymaktadır. 20V, 40V ve 60V uygulamaları ile elde edilen sonuçlar, yüzeydeki nanotüp yapılarının belirgin bir şekilde farklılaştığını göstermektedir.

Gözeneklilik açısından; 60V uygulaması ile elde edilen yüzeyler, %42,8'lik bir gözeneklilik değerine ulaşırken, 20V ve 40V uygulamaları sırasıyla %26,6 ve %18,0 gözeneklilik değerleri ile bu değer in oldukça altında kalmaktadır. Bu bulgu, uygulanan elektriksel yükün arttıkça yüzeydeki gözenekliliğin de arttığını göstermektedir. Özellikle 60V uygulamasında, yüksek gerilim nedeniyle nanotüp yapılarının daha büyük ve daha geniş gözenekler oluşturduğu ve bu sayede yüzeyin daha açık ve geçirgen hale geldiği anlaşılmaktadır. Benzer bir çalışmada, farklı anodizasyon gerilimlerinin TiO₂ filmlerinin morfolojisi üzerindeki etkileri incelenmiştir [44]. Çalışmada, 60V gerilimle yapılan anodizasyonda ortalama 96,81 nm çapında ve %39,54 gözeneklilik oranına sahip nanotüpler elde edilmiştir [44]. Bu bulgu, 60V anodizasyonu ile ulaşılan %42,8'lik yüksek gözeneklilik değeriyle örtüşmekte ve artan gerilimin gözenek çapı ve açıklığı üzerinde doğrudan etkili olduğunu desteklemektedir. Ayrıca, yüksek gerilimlerde gözenek yapısında morfolojik bozulmaların başladığı bildirilmiş ki bu, verilerimizde gözlemlenen yüksek geçirgenlikli ancak dikkatle optimize edilmesi gereken yapıların varlığını açıklamaktadır. Aynı şekilde, Pasikhani ve arkadaşları tarafından yapılan bir başka çalışmada da, uygulanan gerilim arttıkça TiO₂ nanotüp dizilerinin çaplarında ve tabaka kalınlıklarında lineer bir artış gözlemlenmiş, bu değişimlerin yüzey özelliklerini ve fonksiyonel performansı doğrudan etkilediği vurgulanmıştır [69]. Bu çalışmanın bulguları, bizim 20V, 40V ve 60V uygulamalarına karşılık gelen çap ve gözeneklilik verilerimizle tutarlı olup, yüzey morfolojisinin kontrollü biçimde yönlendirilmesinde

elektriksel gerilimin kritik bir parametre olduğunu bir kez daha ortaya koymaktadır [69].

Nanotüp çapı açısından yapılan ölçümler de benzer bir eğilim sergilemektedir. 60V uygulamasında, nanotüp çapı ortalama 68 nm'ye ulaşırken, 40V ve 20V uygulamalarında bu çap sırasıyla 47 nm ve 28 nm olarak ölçülmüştür. Bu sonuçlar, elektriksel potansiyelin arttıkça nanotüp çapında da artış olduğunu doğrulamaktadır. 40V uygulamasında, kısa süreli bir düşüş gözlemlense de, 60V ile yapılan işlemde çapın belirgin şekilde genişlediği ve gözenekliliğin artmasıyla orantılı olarak nanotüp yapılarının daha büyük çaplara sahip olduğu gözlemlenmiştir. Farklı anodizasyon voltajlarının etkisini inceleyen başka bir çalışmada, 30V ile 50V arasındaki voltaj aralığında TiO₂ nanotüplerin çaplarında düzenli bir artış gözlemlenmiştir [70]. Her ne kadar çalışmada kesin çap değerleri yer almasa da "alan indüklemeli çözünme" mekanizmasıyla açıklanan bu artışın, bizim verilerimizle aynı yönde olduğu ve voltajın artmasıyla birlikte oluşan güçlü elektrik alanının, oksit çözünme hızını artırarak daha geniş çaplı nanotüp yapılarına yol açtığı görülmüştür [70]. Birlikte, bu veriler, voltaj artışının nanotüp çapı üzerindeki belirleyici rolünü net biçimde ortaya koymakta ve yüzey morfolojisinin kontrollü mühendisliği için anodizasyon geriliminin hassas bir parametre olduğunu vurgulamaktadır.

Gözenek çapı dağılımı açısından da önemli farklılıklar görülmektedir. Uygulanan anodizasyon voltajı arttıkça, elde edilen TiO₂ yüzeylerde gözenek çapında belirgin bir genişleme gözlemlenmiştir. 20V uygulanan örneklerde, gözeneklerin çoğunluğu 30 nm civarındadır, bunun yanı sıra 10 nm ve daha küçük gözenekler de belirginleşmektedir. 40V uygulamasında, gözeneklerin %60'ı 40-60 nm arasında dağılırken, 60V'luk örneklerde, gözeneklerin çoğunluğu 70-90 nm gibi daha geniş bir aralıkta dağılmakta ve yüzeydeki yapısal açıklık belirgin şekilde artmaktadır. Bu eğilim, iki aşamalı anodizasyonla elde edilen TiO₂ yüzeylerde yapılan başka bir çalışmayla da benzerlik göstermektedir [44]. Çalışmada, 40V uygulamasında yaklaşık 96,8 nm, 60V'da ise 104,4 nm gözenek çapı ölçülmüş; voltaj artışının gözenek genişliği üzerindeki doğrudan etkisi vurgulanmıştır [44]. Bu, yüksek gerilim ile yapılan anodizasyonun yüzeyde daha büyük çaplı ve daha geniş çaplı gözeneklerin oluşumuna yol açtığını göstermektedir.

AFM analizleri, 60V anodizasyon uygulanan yüzeylerde, nanotüplerin hem çap olarak daha büyük hem de uç noktalarında daha sivri bir morfoloji sergilediğini göstermektedir. Bu yüzeylerde gözlenen sivrilik artışı, yalnızca yapısal büyümeyi değil, aynı zamanda yüzey topografisindeki keskinliğin de arttığını göstermektedir. Daha düşük gerilimlerde (20V ve 40V) ise yüzeyler daha düz ve nanotüp yapılar daha küçük çaplı, yoğun, belirginliği düşük bir morfolojidedir. Gözlemlenen bu morfolojik farklılıklar, voltaj artışının nanotüp yapılarının geometrik düzeni ve keskinliği üzerinde belirleyici etkiler oluşturduğunu bildiren literatürle paralellik göstermektedir [71, 72]. Bu farklılıklar, uygulanan voltajın yalnızca çap üzerinde değil, aynı zamanda nanotüplerin geometrik keskinliğinde de belirleyici bir rol oynadığını ortaya koymaktadır.

Bu morfolojik bulgulara ek olarak, yüzeylerin elektriksel özellikleri de Kelvin prob kuvvet mikroskobu (KPFM) ile incelenmiştir. Farklı voltajlarla anodize edilen örnekler arasında yapılan karşılaştırmada, 80V-60V yüzeyinde en yüksek negatif yüzey potansiyeli değerlerini gösterdiği belirlenmiştir. Bu durum, yüzeyin elektriksel karakteristiğinin hücrelerin yüzeye tutunma ve yayılma dinamikleri üzerinde etkili olabileceğini düşündürmektedir. Özellikle artan negatif yüzey potansiyelinin, hücre adezyonunu destekleyerek biyouyumluluk açısından avantaj sağlayabileceği ortaya koyulmaktadır.

Elektrokimyasal anodizasyon ile elde edilen yüzeylerin SEM görüntüleri, titanya nanotüplerinin oluşumunu ve bu yapıların çapı ile porozite değerlerini detaylı şekilde ortaya koymaktadır. Yüzeyler arasında yapılan karşılaştırmalar, özellikle 80V–60V yüzeyinin daha yüksek porozite oranlarına sahip olduğunu ve nanotüplerin iç yapısının daha belirgin olduğunu göstermektedir. Bu yapısal değişiklikler, yüzeyin hidrofiliğini artırmış ve yüzey serbest enerjisinde anlamlı bir artışa yol açmıştır. Yüksek voltajlardaki yüzey serbest enerjisindeki artış, fibronektin, vitronektin ve laminin gibi ECM proteinlerinin hücrelere tutunma ve yayılma için daha iyi adsorbe edilmesini desteklemektedir. Ancak, yüksek voltajın sonucunda ortaya çıkan pürüzlü ve keskin yüzey profilleri, hücre ölümünü arttırdığı için yapışma ve hücre canlılığı parametreleri arasında bir denge kurulmalıdır. 80V–60V yüzeyinde, hücrelerin yüzeye tutunmak yerine hareket ettiği ve filopodya uzantılarının daha az geliştiği

gözlemlenmiştir [73, 74]. Bu durum, yüzeydeki artmış pürüzlülük ve sivri yüzey profiliyle uyumludur. Hücre yayılımındaki bu azalma, oksit tabakasının kalınlığındaki değişikliklerden kaynaklanmaktadır. 80V–20V ve 80V–40V yüzeylerinde ise, hücreler daha güçlü bir yayılma eğilimi göstermiş ve mikrofilamentlerin doğrusal bir şekilde yoğunlaşmasıyla hücre içi iskeletin geliştiği gözlemlenmiştir. Böylece, yüzeyin daha uygun bir mikroçevre sunduğunu, hücrelerin migrasyon aşamasında olduklarını ve yayılmalarını hızlandırdıklarını göstermektedir. Filopodya kullanarak mikroçevreyi tarayan hücreler, daha iyi bir tutunma sağlamak amacıyla migrasyona geçiş yapmaktadır.

Morfolojik ve elektriksel özelliklerin yanı sıra, elektrokimyasal anodizasyonun hücresel düzeydeki etkileri qRT-PCR analizleri ile araştırılmıştır. Hücre göçü, doku rejenerasyonu, anjiyogenez gibi hücre kaderinin belirlenmesinde kritik rol oynayan CXCR4 ve VEGFA genlerinin ifadeleri, hem MKH'ler hem de dermal fibroblastlar üzerinde karşılaştırmalı olarak değerlendirildi. Bulgular, yüzey voltajındaki artışla birlikte özellikle MKH'lerde bu genlerin ifadesinde anlamlı bir yükseliş olduğunu ortaya koymuştur. MKH'lerde CXCR4 gen ifadesi, yüzey voltajı arttıkça belirgin şekilde artmış ve 80V–60V yüzeyinde en yüksek düzeye ulaşmıştır. Yüzeyin nano-yapısal özelliklerine bağlı olarak hücre göçünde kilit bir rol oynayan CXCR4 düzeyindeki bu artış, hücrelerin çevresel sinyallere yanıt olarak daha yüksek hareket kapasitesi geliştirdiğini göstermektedir. Bu durum, özellikle doku rejenerasyonu veya yaralanma sonrası iyileşme gibi süreçlerde, MKH'lerin hedef bölgelere etkin şekilde yönlendirilebilmesi açısından önemlidir. CXCR4 geni, SDF-1 (stromal hücre kaynaklı faktör-1) sinyaline duyarlılığı artırarak hücrelerin hedef dokuya yönelimini kolaylaştırır. Literatürde yapılan çalışmalarda da, MKH'lerde CXCR4'ün artan ifadesi, hücrelerin hedef dokulara yönelimini ve göç kapasitesini anlamlı şekilde artırdığını gösterilmiştir [75].

Benzer şekilde, VEGFA gen ifade düzeyleri de özellikle 80V–40V ve 80V–60V yüzeylerinde belirgin şekilde yükselmiştir. Anjiyogenez sürecinde önemli rol oynayan bu genin yüksek voltajla modifiye edilen yüzeylerde artması, MKH'lerin bu ortamlarda damar oluşumunu destekleyici özelliklerini artırabildiğini ortaya koymaktadır. Literatürde, MKH'lerin salgıladığı VEGFA'nın, endotel progenitör

hücrelerin endotel hücre fenotipine yönelmesini desteklediği ve bu yolla anjiyogeneze önemli katkı sağladığı belirtilmiştir. Nitekim bir çalışmada, MKH kaynaklı VEGFA'nın, endotel hücrelerinde tomurcuklanma davranışını artırarak yeni damar oluşumunu belirgin biçimde desteklediği rapor edilmiştir [76].

Genetik düzeyde incelenen bu yanıtlar, MKH'lerin yüzey morfolojisine duyarlılığının yalnızca moleküler düzeyde değil, aynı zamanda hücresel düzeyde de işlevsel çıktılar doğurduğunu göstermektedir. qRT-PCR analizleri, MKH'lerin yüzey topografisine karşı çeşitli tepkiler verdiğini ortaya koymuş; özellikle yüksek voltajlı yüzeylerin rejeneratif süreçlerde görev alan genleri aktive ettiği görülmüştür. Bu durum, yüzey modifikasyonlarının hücre tipi ve hedef fonksiyona göre farklı düzeylerde biyolojik etki oluşturabileceğine işaret etmektedir. Ayrıca, bu moleküler değişimlerin hücre morfolojisiyle de örtüştüğü belirlenmiştir. Nitekim migrasyon aşamasındaki MKH'lerde, özellikle 80V-60V yüzeyinde, SEM görüntülerinde belirgin filopodi uzantıları ve yönelimli hücre yayılımı gözlemlenmiştir. Bu morfolojik özellikler, hücrelerin çevreyle etkileşiminde artış ve ECM üretiminde yükselişle birlikte yorumlandığında, söz konusu yüzeylerin MKH'lerin biyolojik aktivitesini destekleyerek rejeneratif kapasitelerini artırabileceği sonucunu güçlendirmektedir.

Yüzey modifikasyonlarının MKH'lerin hücresel morfoloji ve sağkalım üzerindeki etkileri, hücre yayılma alanlarının ve apoptoz oranlarının değerlendirilmesiyle incelenmiştir. Özellikle, 80V-60V modifikasyonunun, hücre yayılma alanlarında anlamlı bir azalma ve apoptoz oranlarında belirgin bir artışla ilişkilendirildiği gözlemlenmiştir. Bu bulgular, yüzey şartlarının hücre tepkileri üzerindeki kritik etkilerini vurgulamaktadır. Benzer şekilde titanyum diş implantlarına uygulanan yüzey modifikasyonlarının osteointegrasyonu nasıl etkilediğine dair yapılan bir çalışmada, modifikasyonların hücre bağlanmasını ve tutunmasını arttırdığı görülmüştür [77].

Elektrokimyasal anodizasyonla elde edilen farklı yüzey topografilerinin, MKH'lerin canlılık ve ölüm süreçlerine etkisi akım sitometrisi ile değerlendirilmiştir. Hücrelerin canlılık düzeyleri, reaktif oksijen türleri (ROS) üretimi, nekroz ve apoptoz oranları yüzey voltajına göre karşılaştırmalı olarak analiz edilmiştir. Elde edilen veriler, hücre-topografya etkileşiminin yalnızca adezyon ya da gen ifade düzeyinde

değil, aynı zamanda hücrel yaşam-ölüm dengesi üzerinde de belirleyici rol oynadığını ortaya koymaktadır. 80V–20V yüzeyinde canlılık oranının %90'a ulaşması, bu yüzeyin hücrel mikroçevre açısından en uygun topografiyi sunduğunu ve biyolojik uyumluluğun en üst seviyede olduğunu göstermektedir. Buna karşılık, 80V–60V yüzeyinde canlılık oranının %57'ye kadar düşmesi ve eş zamanlı olarak geç apoptoz oranının %34,78'e ulaşması, bu yüzeyin MKH'ler için stres oluşturan bir ortam yarattığını ortaya koymaktadır. Yüzeydeki yüksek pürüzlülük ve genişleyen gözenek yapısı, hücreleri yalnızca apoptoza yönlendirmekle kalmamış; aynı zamanda hücrelerin bu mikroçevreyi elverişsiz bularak alternatif yanıtlar geliştirmesine de neden olmuş olabilir. Bu noktada dikkat çekici bir bulgu, aynı yüzeyde CXCR4 gen ifadesinde en yüksek düzeye ulaşmış olmasıdır. Literatürde, CXCR4/SDF-1 ekseninin, özellikle stres altındaki mezenkimal hücrelerde kemotaktik göç yanıtlarını aktive ettiği ve hücrelerin buldukları ortamdan uzaklaşmalarını kolaylaştırdığı bilinmektedir [78]. Bu açıdan değerlendirildiğinde, canlılıkta gözlenen düşüş yalnızca hücre ölümüyle açıklanamayabilir; bir kısmı yüzeyden ayrılarak göç etmiş olabilir. Bu yorum, hücrelerin yalnızca yapışma ve yayılım gibi statik davranışlara değil, aynı zamanda mikroçevre koşullarına bağlı olarak yer değiştirme eğilimi gösterebileceğini ortaya koymaktadır. Dolayısıyla, hücre-topografya etkileşimi; sadece canlılık ya da apoptoz aktivasyonu gibi ayrı uçlarda değil, aynı zamanda hücrelerin yüzeyden uzaklaşmasını da kapsayan daha geniş bir yanıt spektrumuyla değerlendirilmeli, yüzey tasarımları buna göre optimize edilmelidir. 80V–60V yüzeyinde eş zamanlı gözlemlenen düşük canlılık, yüksek geç apoptoz ve artan CXCR4 ifadesi, bu yapının hücrel bütünlük ve stabilite açısından sınırda bir profil sunduğunu açıkça göstermektedir. Bu tür yüzeyler, rejeneratif potansiyelin artırılmasını hedeflerken, hücrel stres yanıtlarını tetiklemeyecek şekilde dengelenmelidir.

Bu çalışma, elektrokimyasal anodizasyon ile modifiye edilen yüzey topografilerinin, canlılık, gen ifade profilleri ve fonksiyonel davranışları üzerinde çok yönlü etkiler oluşturduğunu ortaya koymuştur. Elde edilen bulgular, yüzey morfolojisinin yalnızca fiziksel bir yapı özelliği olmanın ötesinde, hücrel yanıtları belirleyen biyolojik bir sinyal kaynağı olarak işlev görebileceğini göstermektedir. Anodizasyon voltajı arttıkça gözeneklilik ve rejenerasyonla ilgili genlerin ifadesi (CXCR4, VEGFA) artarken; hücre canlılığı azalmış, apoptoz oranı artmıştır. KPFM,

EDS ve temas açısı ölçümleriyle elde edilen karakterizasyon verileri, yüzey potansiyeli ve oksit örtücülüğü arasındaki ters ilişkiyi ortaya koymuştur: yüksek poroziteye rağmen düşük oksit örtücülüğü, yük dağılımının homojenliğini engellemiş ve hücre davranışlarında stres temelli değişimlere yol açmıştır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

6.1. Sonuçlar

- Elektrokimyasal anodizasyonla elde edilen farklı yüzey morfolojileri, MKH'lerin genetik, morfolojik ve fonksiyonel yanıtlarını belirgin şekilde etkilemiştir.
- 80V–20V yüzeyi, düzenli topografyası, yüksek oksit örtücülüğü, düşük yüzey pürüzlülüğü ve optimum negatif potansiyeli sayesinde protein adsorpsiyonu ve hücre yayılımı açısından dengeli bir yüzey olarak öne çıkmıştır.
- 80V–60V yüzeyi ise, yüksek porozite, spiky morfoloji, en negatif yüzey potansiyeli ve kalın oksit tabakası ile ilk tutunma açısından güçlü bir ortam sunsa da, aşırı elektrostatik çekim ve artmış mekanik stres nedeniyle hücrelerin migrasyon davranışa geçmesine ve geç apoptoz oranlarının artmasına neden olmuştur.
- ECM ve kollajenle ilişkili genlerin ifadeleri, modifiye yüzeylerde anlamlı şekilde artmıştır.
- Protein sentezine ilişkin genlerin ifadesinde azalma, bu durumun enerji tasarrufu amaçlı hücrel bir yanıt olabileceği düşünülmüştür.
- Anodizasyon voltajı arttıkça, nanotüp çapı ve gözeneklilik değerlerinde belirgin artış kaydedilmiştir.
- Yüksek voltajla elde edilen yüzeylerde CXCR4 ve VEGFA gen ifadeleri artarken, hücre canlılığı azalmış ve geç apoptoz oranı yükselmiştir.
- 80V–60V yüzeyi, biyolojik aktiviteyi artırsa da hücrel stres ve potansiyel göç davranışıyla ilişkilendirilmiştir.
- Yüzey morfolojisi, hücrelerin yapışma, yayılım ve mikroçevreye adaptasyon kapasitelerini doğrudan etkilemiştir.
- Hücre-topografya etkileşimi; yüzey kimyası, elektriksel yük ve mekanik özellikler bir arada değerlendirilerek kapsamlı biçimde analiz edilmiştir.

6.2. Öneriler

- Anodizasyon parametreleri, yüzey biyoyumluluğu ve hücre canlılığı göz önünde bulundurularak optimize edilmeli ve bu yüzeylerin stromal hücre davranışı üzerindeki uzun vadeli etkileri incelenmelidir.
- Rejenerasyonla ilişkili genlerin, yüzeyin biyolojik etkinliğini artırabilir; ancak bu etkinliğin hücre canlılığını destekleyecek şekilde düzenlenmesi yararlı olacaktır.
- CXCR4 ve VEGFA gibi genlerdeki artışın işlevsel sonuçları, hücre göçü ve anjiyogenez gibi modellerde daha ayrıntılı araştırılmalıdır.
- Doku mühendisliği uygulamaları için tasarlanacak yüzeyler, hücre stresi oluşturmada istenen biyolojik yanıtı verecek şekilde geliştirilmelidir.

7. KAYNAKLAR

1. Engel, E., et al., *Nanotechnology in regenerative medicine: the materials side*. Trends Biotechnol, 2008. **26**(1): p. 39-47.
2. Luo, J., et al., *The influence of nanotopography on cell behaviour through interactions with the extracellular matrix - A review*. Bioact Mater, 2022. **15**: p. 145-159.
3. Discher, D.E., D.J. Mooney, and P.W. Zandstra, *Growth factors, matrices, and forces combine and control stem cells*. Science, 2009. **324**(5935): p. 1673-7.
4. Jafari, S., et al., *Biomedical Applications of TiO(2) Nanostructures: Recent Advances*. Int J Nanomedicine, 2020. **15**: p. 3447-3470.
5. da Silva Meirelles, L., P.C. Chagastelles, and N.B. Nardi, *Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues*. J Cell Sci, 2006. **119**(Pt 11): p. 2204-13.
6. Wei, X., et al., *Mesenchymal stem cells: a new trend for cell therapy*. Acta Pharmacol Sin, 2013. **34**(6): p. 747-54.
7. Barnhoorn, M.C., et al., *Stromal Cells in the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease*. J Crohns Colitis, 2020. **14**(7): p. 995-1009.
8. Pittenger, M.F., et al., *Mesenchymal stem cell perspective: cell biology to clinical progress*. NPJ Regen Med, 2019. **4**: p. 22.
9. Vining, K.H. and D.J. Mooney, *Mechanical forces direct stem cell behaviour in development and regeneration*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2017. **18**(12): p. 728-742.
10. Wong, S.W., et al., *Matrix biophysical cues direct mesenchymal stromal cell functions in immunity*. Acta Biomater, 2021. **133**: p. 126-138.
11. Liu, Z., et al., *ECM stiffness affects cargo sorting into MSC-EVs to regulate their secretion and uptake behaviors*. J Nanobiotechnology, 2024. **22**(1): p. 124.
12. Dominici, M., et al., *Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement*. Cytotherapy, 2006. **8**(4): p. 315-7.
13. Hass, R., et al., *Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC*. Cell Commun Signal, 2011. **9**: p. 12.
14. Pittenger, M.F., et al., *Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells*. Science, 1999. **284**(5411): p. 143-7.
15. Lyu, Z., et al., *Cause and consequence of heterogeneity in human mesenchymal stem cells: Challenges in clinical application*. Pathol Res Pract, 2024. **260**: p. 155354.
16. Suliman, S., et al., *Impact of humanised isolation and culture conditions on stemness and osteogenic potential of bone marrow derived mesenchymal stromal cells*. Sci Rep, 2019. **9**(1): p. 16031.

17. Cesnik, A.B. and U. Svajger, *The issue of heterogeneity of MSC-based advanced therapy medicinal products-a review*. Front Cell Dev Biol, 2024. **12**: p. 1400347.
18. Uccelli, A., L. Moretta, and V. Pistoia, *Mesenchymal stem cells in health and disease*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(9): p. 726-36.
19. Barkholt, L., et al., *Risk of tumorigenicity in mesenchymal stromal cell-based therapies--bridging scientific observations and regulatory viewpoints*. Cytotherapy, 2013. **15**(7): p. 753-9.
20. Squillaro, T., G. Peluso, and U. Galderisi, *Clinical Trials With Mesenchymal Stem Cells: An Update*. Cell Transplant, 2016. **25**(5): p. 829-48.
21. Vizoso, F.J., et al., *Mesenchymal Stem Cell Secretome: Toward Cell-Free Therapeutic Strategies in Regenerative Medicine*. Int J Mol Sci, 2017. **18**(9).
22. Mazo, M., et al., *Mesenchymal stem cells and cardiovascular disease: a bench to bedside roadmap*. Stem Cells Int, 2012. **2012**: p. 175979.
23. Shu, L., et al., *Treatment of severe COVID-19 with human umbilical cord mesenchymal stem cells*. Stem Cell Res Ther, 2020. **11**(1): p. 361.
24. Astasov-Frauenhoffer, M., et al., *Effects of nanomodified titanium surfaces considering bacterial colonization and viability of osteoblasts and fibroblasts*. J Biomed Mater Res A, 2024. **112**(12): p. 2160-2169.
25. Zareidoost, A., et al., *The relationship of surface roughness and cell response of chemical surface modification of titanium*. J Mater Sci Mater Med, 2012. **23**(6): p. 1479-88.
26. Yim, E.K., et al., *Nanotopography-induced changes in focal adhesions, cytoskeletal organization, and mechanical properties of human mesenchymal stem cells*. Biomaterials, 2010. **31**(6): p. 1299-306.
27. Humphries, J.D., A. Byron, and M.J. Humphries, *Integrin ligands at a glance*. J Cell Sci, 2006. **119**(Pt 19): p. 3901-3.
28. Geiger, B., J.P. Spatz, and A.D. Bershadsky, *Environmental sensing through focal adhesions*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2009. **10**(1): p. 21-33.
29. Sun, Z., S.S. Guo, and R. Fassler, *Integrin-mediated mechanotransduction*. J Cell Biol, 2016. **215**(4): p. 445-456.
30. Dupont, S., et al., *Role of YAP/TAZ in mechanotransduction*. Nature, 2011. **474**(7350): p. 179-83.
31. Trappmann, B., et al., *Extracellular-matrix tethering regulates stem-cell fate*. Nat Mater, 2012. **11**(7): p. 642-9.
32. Liu, Y., et al., *TiO₂ nanotubes regulate histone acetylation through F-actin to induce the osteogenic differentiation of BMSCs*. Artif Cells Nanomed Biotechnol, 2021. **49**(1): p. 398-406.
33. Yan, Y., et al., *Enhanced osteogenic differentiation of bone mesenchymal stem cells on magnesium-incorporated titania nanotube arrays*. Colloids Surf B Biointerfaces, 2019. **179**: p. 309-316.

34. Anselme, K., et al., *The interaction of cells and bacteria with surfaces structured at the nanometre scale*. Acta Biomater, 2010. **6**(10): p. 3824-46.
35. Dalby, M.J., et al., *The control of human mesenchymal cell differentiation using nanoscale symmetry and disorder*. Nat Mater, 2007. **6**(12): p. 997-1003.
36. Kahrizi, M.S., et al., *Recent advances in pre-conditioned mesenchymal stem/stromal cell (MSCs) therapy in organ failure; a comprehensive review of preclinical studies*. Stem Cell Res Ther, 2023. **14**(1): p. 155.
37. Kilian, K.A., et al., *Geometric cues for directing the differentiation of mesenchymal stem cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(11): p. 4872-7.
38. McMurray, R.J., et al., *Nanoscale surfaces for the long-term maintenance of mesenchymal stem cell phenotype and multipotency*. Nat Mater, 2011. **10**(8): p. 637-44.
39. Lai, P.L., et al., *Efficient Generation of Chemically Induced Mesenchymal Stem Cells from Human Dermal Fibroblasts*. Sci Rep, 2017. **7**: p. 44534.
40. Fadzil, A.F.b.A., et al., *Role of surface quality on biocompatibility of implants - A review*. Annals of 3D Printed Medicine, 2022. **8**.
41. Anselme, K., *Osteoblast adhesion on biomaterials*. Biomaterials, 2000. **21**(7): p. 667-81.
42. Zhuang, Y., et al., *Real Role of Fluoride Ions in the Growth of Anodic TiO₂ Nanotubes*. The Journal of Physical Chemistry C, 2024. **128**(13): p. 5741-5748.
43. Ribeiro, B., et al., *On Growth and Morphology of TiO₂ Nanotubes on Ti6Al4V by Anodic Oxidation in Ethylene Glycol Electrolyte: Influence of Microstructure and Anodization Parameters*. Materials (Basel), 2021. **14**(10).
44. Yılmaz, O., et al., *Effect of time and voltage on the morphology of TiO₂ films produced by anodization*. Journal of the Australian Ceramic Society, 2024. **60**(3): p. 809-822.
45. Ribeiro, B., et al., *On Growth and Morphology of TiO₂ Nanotubes on CP-Ti by Anodic Oxidation in Ethylene Glycol Electrolyte: Influence of Electrolyte Aging and Anodization Parameters*. Materials (Basel), 2022. **15**(9).
46. Ghani, T., et al., *Effect of Processing Temperature on the Morphology and Crystal Structure of Anodic TiO₂ Nanotubes*. Journal of Electronic Materials, 2019. **49**(3): p. 1881-1888.
47. Roy, P., S. Berger, and P. Schmuki, *TiO₂ nanotubes: synthesis and applications*. Angew Chem Int Ed Engl, 2011. **50**(13): p. 2904-39.
48. Gulati, K., et al., *Anodized anisotropic titanium surfaces for enhanced guidance of gingival fibroblasts*. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2020. **112**: p. 110860.
49. Roy, M., A. Bandyopadhyay, and S. Bose, *Induction Plasma Sprayed Nano Hydroxyapatite Coatings on Titanium for Orthopaedic and Dental Implants*. Surf Coat Technol, 2011. **205**(8-9): p. 2785-2792.
50. Doadrio, A.L., et al., *Use of anodized titanium alloy as drug carrier: Ibuprofen as model of drug releasing*. Int J Pharm, 2015. **492**(1-2): p. 207-12.

51. Hou, Y., et al., *Effects of titanium nanoparticles on adhesion, migration, proliferation, and differentiation of mesenchymal stem cells*. Int J Nanomedicine, 2013. **8**: p. 3619-30.
52. Lorenzetti, M., et al., *Electrokinetic Properties of TiO₂ Nanotubular Surfaces*. Nanoscale Res Lett, 2016. **11**(1): p. 378.
53. Kulkarni, M., et al., *Protein interactions with layers of TiO₂ nanotube and nanopore arrays: Morphology and surface charge influence*. Acta Biomater, 2016. **45**: p. 357-366.
54. Zhao, L., et al., *The influence of hierarchical hybrid micro/nano-textured titanium surface with titania nanotubes on osteoblast functions*. Biomaterials, 2010. **31**(19): p. 5072-82.
55. Shin, D.H., et al., *Wettability changes of TiO₂ nanotube surfaces*. Nanotechnology, 2011. **22**(31): p. 315704.
56. Pollock, J.D., *Gene expression profiling: methodological challenges, results, and prospects for addiction research*. Chem Phys Lipids, 2002. **121**(1-2): p. 241-56.
57. Wang, Z., M. Gerstein, and M. Snyder, *RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics*. Nat Rev Genet, 2009. **10**(1): p. 57-63.
58. Han, S., et al., *Transcriptomic analysis of human endometrial stromal cells during early embryo invasion*. Ann Med, 2021. **53**(1): p. 1758-1771.
59. Stark, R., M. Grzelak, and J. Hadfield, *RNA sequencing: the teenage years*. Nat Rev Genet, 2019. **20**(11): p. 631-656.
60. Rai, R., et al., *RNA-seq Analysis Reveals Unique Transcriptome Signatures in Systemic Lupus Erythematosus Patients with Distinct Autoantibody Specificities*. PLoS One, 2016. **11**(11): p. e0166312.
61. Ross, E.A., et al., *Nanotopography reveals metabolites that maintain the immunomodulatory phenotype of mesenchymal stromal cells*. Nat Commun, 2023. **14**(1): p. 753.
62. McMurray, R.J., M.J. Dalby, and P.M. Tsimbouri, *Using biomaterials to study stem cell mechanotransduction, growth and differentiation*. J Tissue Eng Regen Med, 2015. **9**(5): p. 528-39.
63. Zhou, Y., et al., *Metascape provides a biologist-oriented resource for the analysis of systems-level datasets*. Nat Commun, 2019. **10**(1): p. 1523.
64. Testa, C., et al., *Whole transcriptomic analysis of mesenchymal stem cells cultured in Nichoid micro-scaffolds*. Front Bioeng Biotechnol, 2022. **10**: p. 945474.
65. Novoseletskaia, E.S., P.V. Evdokimov, and A.Y. Efimenko, *Extracellular matrix-induced signaling pathways in mesenchymal stem/stromal cells*. Cell Commun Signal, 2023. **21**(1): p. 244.
66. Hiew, V.V. and P.L. Teoh, *Collagen Modulates the Biological Characteristics of WJ-MSCs in Basal and Osteoinduced Conditions*. Stem Cells Int, 2022. **2022**: p. 2116367.

67. Beijer, N.R.M., et al., *Dynamic adaptation of mesenchymal stem cell physiology upon exposure to surface micropatterns*. Sci Rep, 2019. **9**(1): p. 9099.
68. Kellogg, M.K., et al., *SRPassing Co-translational Targeting: The Role of the Signal Recognition Particle in Protein Targeting and mRNA Protection*. Int J Mol Sci, 2021. **22**(12).
69. Pasikhani, J.V., N. Gilani, and A.E. Pirbazari, *The effect of the anodization voltage on the geometrical characteristics and photocatalytic activity of TiO₂nanotube arrays*. Nano-Structures & Nano-Objects, 2016. **8**: p. 7-14.
70. Zhang, W., et al., *Kinetic analysis of the anodic growth of TiO₂ nanotubes: effects of voltage and temperature*. Journal of Materials Chemistry C, 2019. **7**(45): p. 14098-14108.
71. Seçkin, E. and M. Ürgen, *A kinetic model for determining morphology transitions and growth kinetics of titania nanotubes during anodization of titanium in ethylene glycol based electrolytes*. Surface and Coatings Technology, 2021. **409**.
72. Das, C., et al., *Nb doped TiO₂ nanotubes for enhanced photoelectrochemical water-splitting*. Nanoscale, 2011. **3**(8): p. 3094-3096.
73. Hou, Y., et al., *Surface Roughness Gradients Reveal Topography-Specific Mechanosensitive Responses in Human Mesenchymal Stem Cells*. Small, 2020. **16**(10): p. e1905422.
74. Hou, Y., et al., *Surface Roughness and Substrate Stiffness Synergize To Drive Cellular Mechanoresponse*. Nano Lett, 2020. **20**(1): p. 748-757.
75. Cheng, Z., et al., *Targeted migration of mesenchymal stem cells modified with CXCR4 gene to infarcted myocardium improves cardiac performance*. Mol Ther, 2008. **16**(3): p. 571-9.
76. Mayer, H., et al., *Vascular endothelial growth factor (VEGF-A) expression in human mesenchymal stem cells: autocrine and paracrine role on osteoblastic and endothelial differentiation*. J Cell Biochem, 2005. **95**(4): p. 827-39.
77. Jemat, A., et al., *Surface Modifications and Their Effects on Titanium Dental Implants*. Biomed Res Int, 2015. **2015**: p. 791725.
78. Ma, J., et al., *Osteogenic capacity of human BM-MSCs, AT-MSCs and their co-cultures using HUVECs in FBS and PL supplemented media*. J Tissue Eng Regen Med, 2015. **9**(7): p. 779-88.

8. EKLER

EK-1. Tez Çalışması Orijinallik Raporu

NANOTOPOGRAFINİN STROMAL HÜCRE DAVRANIŞI ÜZERİNE ETKİSİNİN MOLEKÜLER DÜZEYDE ARAŞTIRILMASI

ORIJİNALLIK RAPORU

%5 BENZERLİK ENDEKSİ	%5 İNTERNET KAYNAKLARI	%3 YAYINLAR	%2 ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ
--------------------------------	----------------------------------	-----------------------	-------------------------------

BİRİNCİL KAYNAKLAR

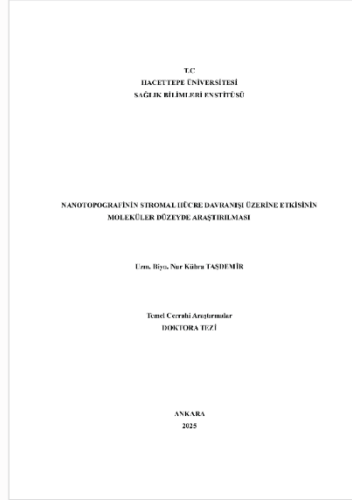
1	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	%2
2	openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	%1
3	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	<%1
4	openaccess.hacettepe.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
5	Submitted to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) Öğrenci Ödevi	<%1
6	Harun Hızlısoy, Serhat Al, Nurhan Ertuş Onmaz, Yeliz Yıldırım et al. "Farklı Kesimhanelerden İzole Edilen Campylobacter Türlerinin Virülans Genleri, Antibiyotik Duyarlılık Profilleri ve Moleküler Karakterizasyonu", Mikrobiyoloji Bulteni, 2020 Yayın	<%1

EK-2. Dijital Makbuz**Dijital Makbuz**

Bu makbuz ödevinizin Turnitin'e ulaştığını bildirmektedir. Gönderiminize dair bilgiler şöyledir:

Gönderinizin ilk sayfası aşağıda gönderilmektedir.

Gönderen: Nur Kûbra Taşdemir
Ödev başlığı: NANOTOPOGRAFİNİN STROMAL HÜCRE DAVRANIŞI ÜZERİNE E...
Gönderi Başlığı: NANOTOPOGRAFİNİN STROMAL HÜCRE DAVRANIŞI ÜZERİNE E...
Dosya adı: NANOTOPOGRAFİNİN_STROMAL_HÜCRE_DAVRANIŞI_ÜZERİNE...
Dosya boyutu: 3.24M
Sayfa sayısı: 76
Kelime sayısı: 13,296
Karakter sayısı: 90,882
Gönderim Tarihi: 08-Tem-2025 03:56ÖS (UTC+0300)
Gönderim Numarası: 2711920851



EK-3. Anlamlı Gen Listesi ($p \leq 0.05$)

Gen Sembolü	Gen Sembolü	Gen Sembolü
COL1A1	COL1A2	FN1
COL3A1	IGFBP4	FTH1
EEF1A1	COL6A2	CTSD
GAS6	FAU	ACTB
FTH1P8	SH3BGRL3	MT2A
THBS1	TGFBI	GPC1
RPS20	CD63	EMILIN1
COL16A1	RPL19	NAGLU
FKBP8	ACTG1	POSTN
RPS4X	SLC35B2	RPL35A
ANXA2	RPS11	RPLP2
HSP90B1	HTRA1	GAPDH
RPL11	MT-CO2	RPL37
HSP90AA1	VIM	CERCAM
RPL41	P3H3	MXRA8
HSPA8	FKBP10	SHISA5
COL6A1	RPLP0	ITGB1
ARPC5	MCRIP1	HLA-C
RAC1P2	PPP1R14B	RPL4
COL5A1	SULF1	MSN
RPL34	PPP1R14BP3	LMNA
B2M	PLEC	ABCF1
MFGE8	UBC	TMEM119
TAPBP	UBA52	CCND1
SQSTM1	COL4A2	TPM2
AC138932.1	HNRNPA1	CCDC80
MYL6	MMP14	GNA11
PCDHGC3	RPL38	RPS12
YWHAE	PHLDA3	CD320

CLTC	CALU	RPS18
ATP9A	NUPR1	RPS16
CD59	CDKN1A	CYR61
R3HDM4	NAP1L1	SERPINH1
SSR1	TUBA1A	UBB
RPS6	CTHRC1	EEF1G
NBPF9	BRI3	VCAN
TMEM132A	SERPINB2	AUP1
TCF7	INF2	TMSB10
FBN1	SERF2	SPARC
COX8A	IFNGR2	RPS2
ENO1	MFSD10	FLNA
AC010970.1	TNKS1BP1	ITGB1P1
LAMTOR5	ATP5MD	ENPP1
HSPA1A	HSPA1A	AC006538.2
RPL27A	AC126755.2	COL4A1
DOCK5	ATG101	DGCR2
NNMT	SSR3	RNH1
TM2D3	ADGRA2	RPL13
DSTN	CLIC4	TUBG1
NDUFC2-KCTD14	SERPINE2	TXNDC5
RPS24	ZNF219	DGCR6L
SRXN1	RPL12	MAT2A
RRP1B	IFNGR2	HSPA5
TPM1	SLC38A10	CRYAB
TKFC	CCDC85B	C1orf122
EIF1	CHPF2	NQO1
KIAA1191	SELENOH	AC099336.2
PTK7	AC068580.4	CCNB1
SLC35E2B	FKRP	SSC5D
RPL7	RPL23A	AC073896.1

STAMBP	RPL18AP3	HAS2
RPL29	FAM129B	CWC25
CAP1	PPIAP22	RPL17
DAG1	CAV1	SIK1B
CDC42SE1	CCDC92	IGSF8
TGM2	RPL32	DUSP23
COMT	MDH2	CAP2
SLC39A1	C6orf89	OPTN
PLSCR3	MYOF	GPX1
DYNC1H1	GNAS	CALR
CALM1	NBL1	AL590867.2
NUS1	SEC31A	PMEPA1
NCKAP1	SEM1	NACA
RPS26	OLFML2A	SPATA7
FBXO31	TXNRD1	SPON2
AC118553.2	TNFRSF12A	ZNF664
SREBF1	EIF3L	METTTL26
MED29	SLC52A2	PDIA3
RALBP1	BRD2	SLC17A9
SRP9	SEC22B	GPC6
PITPNM1	RDH11	SPCS2
KCNK15	LRP10	RPN2
ISLR	RPL23	LIG3
LAMC1	SUN2	CERS2
B2M	ATP5F1C	FEM1B
DYNLL1	CYB561A3	WISP2
CHPF	LAMA4	KAT14
OAZ2	SH3GL1	RAN
TNC	EIF4G2	NLGN2
RNF187	NSA2	COX6C
TRIM65	CYBRD1	PRDX2

ZNF771	RAC1	RPS8
DUSP14	GDF5	CNPY2
NELFB	HMOX1	PPIC
QSOX1	TGFB1	CMTR1
AC004922.1	NONO	MTRNR2L12
PXDC1	ZNF316	MED13L
TTYH3	FASN	ITGB3
SEC24D	MAFK	CTGF
LGALS3BP	CAPG	TWF2
TMBIM6	DDAH2	NDUFA8
CALM2	CRIM1	CTNS
PRKAR1A	PRR5L	SNX3
BTG3	DDR1	GNL1
AC270282.1	OSR1	HLA-A
NRXN2	RGL2	PUSL1
KANK1	TNKS2	DIS3
TPX2	ASPH	TCEAL8
PTGFRN	AC243948.1	RPS3A
PGK1	ATP2B4	HDLBP
DOK1	NBPF14	MTRNR2L1
RPL14	LDOC1	CDK11B
PLAC9	TXN2	BIRC6
FBLIM1	SPCS3	MRFAP1
ACTR1A	CYBA	CHMP1A
ZNF460	ARFRP1	PFDN5
RPL39	NSMAF	MAP1A
UGCG	GPALPP1	SUPT4H1
DDAH1	HSPA1B	CHMP7
TAGLN	DCBLD2	RAB18
RAB43	SHC2	ARHGDI A

EK-4. Yayınlanmış Makale

Aşağıda, tez kapsamında hazırlanan ve *Journal of the Royal Society Interface* dergisinde yayımlanmış olan makalenin ilk sayfa görüntüsü sunulmuştur. Makalenin tam metni, <https://doi.org/10.1098/rsif.2024.0642> adresinden erişilebilir.

INTERFACE

Hierarchical TiO₂ nanotube arrays enhance mesenchymal stem cell adhesion and regenerative potential through surface nanotopography

Research



Cite this article: Tasdemir NK, Kilicarslan B, Imren G, Karaosmanoglu B, Taskiran EZ, Bayram C. 2025 Hierarchical TiO₂ nanotube arrays enhance mesenchymal stem cell adhesion and regenerative potential through surface nanotopography. *J. R. Soc. Interface* 22:

Received: 15 September 2024
Accepted: 28 January 2025

Subject Category:

Life Sciences—Engineering interface

Subject Areas:

bioengineering, biomaterials, nanotechnology

Keywords:

mesenchymal stem cells, nanotopography, titanium dioxide, electrochemical anodization, tissue engineering, regenerative medicine

Authors for correspondence:

Ekim Z. Taskiran

e-mail: e

Cem Bayram

e-mails:

Electronic supplementary material is available online at:

Nur Kubra Tasdemir¹, Bogac Kilicarslan^{2,3}, Gozde Imren^{1,4}, Beren Karaosmanoglu⁴, Ekim Z. Taskiran^{1,4} and Cem Bayram^{2,3}

¹Department of Medical and Surgical Research, Hacettepe University, Institute of Health Sciences, Ankara, Turkey

²Department of Nanotechnology and Nanomedicine, Graduate School of Science and Engineering, ³Advanced Technologies Application and Research Centre, and ⁴Department of Medical Genetics, Faculty of Medicine, Hacettepe University, Ankara, Turkey

ORCID iD: BK, 0000-0001-5564-4813; EZT, 0000-0001-6040-6625; CB, 0000-0001-8717-4668

The concept of preconditioning mesenchymal stem cells (MSCs) under different stress conditions or with bioactive molecules is introduced to optimize their therapeutic potential. This study investigates the physicochemical effect of hierarchical TiO₂ nanotube arrays, a versatile and easy-to-prepare nanosurface, on MSC behaviour. By precisely controlling the nanotopography through anodization, we demonstrate the significant influence of surface properties on MSC adhesion, proliferation and differentiation. Electrostatic interactions between surface charge and proteins play a crucial role in these cellular responses. In addition, preconditioning MSCs under specific conditions enhances their therapeutic potential by optimizing paracrine signalling and homing properties. Higher surface charges and increasing spiky character of surface roughness of titania samples after anodization at 60 V significantly upregulated chemokine receptor type 4 (CXCR4) and vascular endothelial growth factor A (VEGFA), indicating the enhanced migratory and angiogenic potential of MSCs. The study reveals the mechanotransductive effects of nanotopography on MSC differentiation, suggesting that tailored surface features can direct cellular fate. These findings highlight the potential of hierarchical TiO₂ nanotube arrays as a promising platform for regenerative medicine, offering a novel approach to improve tissue engineering and therapeutic outcomes.

1. Introduction

Advances in biomedical sciences have led to new therapeutic approaches such as tissue engineering, regenerative medicine and cell therapy. In this context, stromal cells play a crucial role in these processes as they form and structure connective tissue in the body [1]. Mesenchymal stem cells (MSCs) are preferred for tissue repair due to their differentiation capacity, paracrine signalling and secretion of various molecules, including extracellular vesicles. These mechanisms critically treat inflammatory and degenerative diseases through the 'homing' phenomenon [2,3]. In addition, mesenchymal stem/stromal cells and the extracellular matrix (ECM) components they secrete adapt to their environment by influencing cell adhesion, spreading and differentiation [4,5]. An innovation in this field is the concept of preconditioned MSCs. This concept enhances the repair functions of MSCs by exposing them to various stress conditions or bioactive molecules, optimizing their

THE ROYAL SOCIETY
PUBLISHING

© 2025 The Author(s). Published by the Royal Society. All rights reserved.

9. ÖZGEÇMİŞ

