

**MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN OSTEOJENİK
FARKLILAŞMASININ BOR KATKILI HAp-KAPLI KİTOSAN
DOKU İSKELELERİNDE İNCELENMESİ**

**INVESTIGATION OF OSTEOGENIC DIFFERENTIATION OF
MESENCHYMAL STEM CELLS ON BORON CONTAINING
HAp-COATED CHITOSAN SCAFFOLDS**

İNCİ SHIKHALİYEVA

Prof. Dr. MENEMŞE GÜMÜŞDERELİOĞLU

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim - Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Biyomühendislik Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

*Hayata karşı duruşuna hep hayran olduğum,
hayattayken desteğini ve sevgisini benden esirgemeyen,
gücünü ve varlığını hep yanımda hissettiğim, masal kahramanım
canım anneannem emektar Öğretmen Bîke İsmayılova'nın anısına...*

ETİK

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

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

beyan ederim.

31/07/2015

İNCİ SHIKHALİYEVA

ÖZET

MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN OSTEOJENİK FARKLILAŞMASININ BOR KATKILI HAp-KAPLI KİTOSAN DOKU İSKELELERİNDE İNCELENMESİ

İnci SHIKHALİYEVA

Yüksek Lisans, Biyomühendislik Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU

Temmuz 2015, 122 sayfa

Sunulan tez çalışmasının amacı, osteoindüktif özelliğe sahip bor katkıli hidroksiapatit kaplı kitosan (B-HAp/kitosan) doku iskeleleri üzerinde iki farklı kaynaktan elde edilen (kemik iliği ve yağ dokusu) mezenkimal kök hücrelerin *in vitro* osteojenik farklılaşma potansiyellerinin incelenmesidir.

Tez çalışmasının ilk aşamasında dondurarak-kurutma yöntemiyle 100 µm gözenek çapına sahip kitosan doku iskeleleri hazırlanmıştır. Ardından hazırlanan bu iskeleler, mekanik ve biyoaktif özelliklerini arttırmak amacı ile mikrodalga enerjisi yardımı ile yapay vücut sıvısı (10xSBF) ve bor katkıli yapay vücut sıvısı (B-SBF) kullanılarak sırasıyla HAp ve B-HAp ile kaplanmıştır. Çalışmanın sonraki aşamasında, adipoz doku ve kemik iliğinden mezenkimal kök hücre izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Hücre canlılığı Presto Blue analizi ile, hücre morfolojisi F-aktin/DAPI ve kristal viyole boyamaları ile incelenmiştir. Hücrelerin sağlıklı oldukları ve multipotensi özelliklerini kaybetmedikleri senesens boyaması ile gösterilmiştir. Mezenkimal kök hücrelerin multipotensi özelliklerini incelemek için

çalışmalar, büyüme ve farklılaşma ortamı olmak üzere iki farklı koşulda yürütülmüştür. Oil Red O boyaması ile hücrelerde yağ doku farklılaşmasını gösteren hücre içi yağ damlacıkları belirlenmiştir. Osteojenik farklılaşmanın göstergesi olan matris mineralizasyonu alkalın fosfataz-von Kossa (ALP/VK) boyaması ile gösterilmiş ve zamanla mineralize nodüllerin çoğaldığı tespit edilmiştir. Kondrojenik farklılaşma, Safranin O/Fast Green boyaması ile gösterilmiştir. Adipoz kökenli mezenkimal kök hücrelere özgü yüzey belirteçleri akış sitometrisi analizi ile belirlenmiştir. Böylece, çalışmada kullanılacak kemik iliği (KiMKH) ve adipoz kökenli mezenkimal kök hücrelerin (AKH) karakterizasyonu tamamlanmıştır.

Tez çalışmasının son aşamasında, izole edilen mezenkimal kök hücrelerin B-HAp/kitosan doku iskeleleri üzerindeki üreme ve osteojenik farklılaşmasının incelenmesi için durgun koşullarda *in vitro* hücre kültür çalışmaları yürütülmüştür. Doku iskeleleri üzerinde hücre canlılığı ve üremesi MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolyum bromür) analizi, hücrelerin morfolojik özellikleri ise taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile değerlendirilmiştir. Hücrelerin osteojenik farklılaşma belirteçleri olan kollajen tip I, RunX2, osteonektin ve osteopontin gen ifadeleri gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ile tespit edilmiştir. AKH'ler ile elde edilen sonuçlar bor katkılı hidroksiapatit kaplı kitosan doku iskelesinin bu hücrelerin yapışmasını, çoğalmasını ve farklılaşmasını desteklediği yönündedir. KiMKH ile yapılan çalışmaların sonuçları AKH'lerinki ile karşılaştırıldığında KiMKH'lerin iskelelere daha az sayıda tutundukları görülmüştür.

Sonuç olarak sunulan tez çalışmasında bor katkılı HAp'in özellikle AKH'lerin doku iskeleleri üzerinde üreme ve osteojenik farklılaşma potansiyelini önemli derecede etkilediği görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Bor, kitosan, hidroksiapatit, mezenkimal kök hücreler, kemik doku mühendisliği.

ABSTRACT

DEVELOPMENT INVESTIGATION OF OSTEOGENIC DIFFERENTIATION OF MESENCHYMAL STEM CELLS ON BORON CONTAINING HAp-COATED CHITOSAN SCAFFOLDS

İnci SHIKHALIYEVA

Master of Science, Bioengineering Division

Supervisor: Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU

July 2015, 122 pages

The aim of the present study is to investigate *in-vitro* osteogenic potential of mesenchymal stem cells, isolated from two different sources (bone marrow and adipose tissue), on boron doped hydroxyapatite (HAp) coated chitosan (B-HAp/chitosan) scaffolds with osteoinductive properties.

In the first part of the study, chitosan scaffolds, which have approximately 100 µm pore diameter, were prepared by freeze-drying technique. In order to enhance the mechanical and bioactive properties of the scaffolds, they were coated with HAp and B-HAp through the aid of microwave energy by using 10xSBF (simulated body fluid) and boron containing 10xSBF (B-SBF). In the following part of the study, mesenchymal stem cells were isolated from adipose tissue and bone marrow. The cell viability was evaluated by Presto Blue analysis, cell morphology was investigated by F-actin/DAPI and crystal violet staining. The cells aging and maintenance of multipotency of the cells were visualized by senescence staining. Intracellular fat droplets which show adipogenic differentiation were demonstrated

by Oil Red O staining. Matrix mineralization which shows osteogenic differentiation was visualized by alkaline phosphatase-von Kossa (ALP-VK) staining and it was detected that mineralized nodules were getting increased by time. Differentiation into the chondrogenic lineage was demonstrated by Safranin O/Fast Green staining. Specific surface markers of adipose derived mesenchymal stem cells (AdMSCs) were demonstrated by flow cytometry analysis. Thus, isolation and characterization studies of bone marrow stem cells (BMSCs) and AdMSCs used in this study were completed.

In the last part of this study, the proliferation and osteogenic differentiation of AdMSCs and BMSCs on chitosan, HAp/chitosan and B-HAp/chitosan scaffolds were investigated by *in vitro* cell culture studies, under static conditions. Cell viability and proliferation were analyzed by MTT (3-(4,5-dimethylthiazoyl-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay and morphological examination was done with scanning electron microscopy (SEM). Osteogenic differentiation markers, collagen type I, RunX2, osteonectin and osteopontin expression levels of the cells were determined using real time polymerase chain reaction (RT-PCR). The results showed that boron doped HAp coated chitosan scaffolds supported adhesion, proliferation and differentiation of AdMSCs. The results of cell culture studies showed that there were fewer BMSCs attached onto the scaffolds compared with AdMSCs.

Keywords: Boron, chitosan, hydroxyapatite, mesenchymal stem cells, bone tissue engineering.

TEŞEKKÜR

Engin bilgi birikimi ve tecrübesiyle çalışmalarımın titizlikle yürütülmesini ve sonuçlandırılmasını sağlayan, inandığım yolda başarıyla yürümem için gerekli desteği ve cesareti veren çok değerli Hocam **Prof. Dr. Menemşe Gümüşderelioğlu'na**, bu süreçte hep yanımda olduğu ve sağladığı olanaklar için sonsuz sevgi, saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamda 112M705 no'lu proje kapsamında maddi destek sağlayan TÜBİTAK'a teşekkürlerimi sunarım.

Lisans döneminden beri bana hep inanan ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen çok değerli Hocalarım **Firuze Sultanzade** ve **Sabina Omarova'ya** en içten sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam boyunca her an yanımda olarak çalışmamın yürütülmesinde, ihtiyacım olan her bilgiye ulaşmamda bana yardımcı olan, labdaki bütün sorunlarımı çözebilen sihirli güçlere sahip olan, sadece çalışma arkadaşım değil aynı zamanda sevincimi, üzüntümü, yorgunluğumu ve başarıyı paylaşan sevgili arkadaşım **Özge Ekin Tunçay'a**,

Yüksek Lisans dönemimin ilk gününden beri hiçbir sorumu yanıtsız bırakmayan, çalışmam boyunca bana hep destek olan, bitmez tükenmez enerjisi, disiplini ve pozitif davranışlarına hayran kaldığım **Arş. Gör. Merve Çapkın Yurtsever'e**,

Birlikte çalışmaktan ve vakit geçirmekten mutluluk duyduğum arkadaşlarıma; beni her zaman dinleyen ve duygularımı paylaşan su damlam **Ar. Gör. Damla Çetin Altındal'a**, güzel **Elif Sunal'a**, gülyüzlü ve sevgi dolu **Derya Kalelioğlu'na**, yolculuk arkadaşlarım olan çok tatlı **Aysu Arslan**, doğallıkları ile beni hep güldüren içi-dışı bir **Meryem Sümeyye Akdemir** ve **Bedriye Topal'a**, tanıdığım ilk günden beri hep pozitif enerji aldığım **Tuğçe Gültan'a**, notlarını benimle hep paylaşan **Gökçe Kaynak'a**, sohbet etmekten keyif aldığım **Anıl Sera Çakmak**, **Gülseren Irmak** ve **Ar. Gör. Işıl Gerçek Beşkardeş'e**, **Ar. Gör. Soner Çakmak'a** ve **Murat Şimşek'e**, hep yüzümü güldüren ve bana küçük kardeşleri gibi davranarak ilgilerini hiç eksik etmeyen sevgili arkadaşlarım **Sahar Shahirdavarpanah** ve **Farzin Sana'ya**,

Uzun yıllardır her an yanımda olan, her şeyi paylaştığım, uzakta olsa da sevgisini ve desteğini hep hissettiğim, arkadaşlığın en derinini bana yaşatan, değerlim **Dilara Hacıyeva'ya** ve varlığıyla içimi ısıtan, tatlı mı tatlı mucizem **İbrahim'e**,

Birtanecek ev arkadaşım, macera dolu günlerimin mimarı, beni hep dinleyen ve sıkıntılardan uzaklaştıran gökkuşağı ruhlum **Narmin Zeynalli'ya**, kampüsteki her üzgün anımda koşup sarıldığım, bana hep moral veren ve beni uçuran arkadaşım **Türkan Mammadova'ya**, pozitif enerji kaynağım, yüzümü hep güldüren canım arkadaşım **Abbas Alakbarov'a**,

Onlarsız hayatı düşünemediğim, varlıkları ile sorumluluk ve paylaşma hisslerini bana öğreten, hayattaki en vazgeçilmezlerim, sonsuz sevdiğim kardeşlerime; ela gözlüm, özgür ruhlum **Güler** ve bitanem, yakışıklım, büyüse bile benim için hep miniğim olan **Yusif'e**,

Beni bugünlere getiren, sevgisini esirgemeyen, her daim sorgusuz destekleyen, aldığım kararlarda hep yanımda olan canım babam **Rasul Şikhaliyev'a**, zekasına, hayata dair görüşlerine ve becerisine hayranlık duyduğum, hep örnek aldığım, benim için dünyada eşi benzeri olmayan, gösterdiği sonsuz sevgi, desteği, anlayışı ve sabrı için, sadece annem değil hayattaki en yakın arkadaşım olan **Sevinc Abdullayeva'ya**,

En içten sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
ÇİZELGELER	ix
ŞEKİLLER	x
SİMGELER ve KISALTMALAR	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Kemik Doku Mühendisliği ve Kullanılan Hücreler	4
2.1.1. Hücre Hatları	8
2.1.2. Ko-kültürler	8
2.2. Kök Hücreler	9
2.2.1. Tarihçe	9
2.2.2. Kök Hücre Çeşitleri	10
2.2.2.1. Embriyonik Kök Hücreler	11
2.2.2.2. Uyarılmış Pluripotent Kök Hücreler	11
2.2.2.3. Yetişkin Kök Hücreler	12
Diş Pulpası Kök Hücreleri	12
Hematopoetik Kök Hücreler	13
2.3. Mezenkimal Kök Hücreler (MKH)	13
2.3.1. MKH İzolasyonu	14
2.3.2. MKH Karakterizasyonu	16
2.3.2.1. MKH Farklılaşması	16
Osteojenik Farklılaşma	17
Adipojenik Farklılaşma	18
Kondrojenik Farklılaşma	19
2.3.2.2. MKH Yüzey Belirteçleri	19
2.3.3. MKH Kaynakları	22
2.3.3.1. Kemik İliği Mezenkimal Kök Hücreleri	23
2.3.3.2. Adipoz Kökenli Mezenkimal Kök Hücreler	26
2.3.4. MKH Kullanımı	27
Gen Tedavisi	30

2.4. Kemik Doku Mühendisliğinde Doku İskeleleri	30
2.4.1. Biyomalzeme Seçimi ve Özellikleri	31
Biyopolimerler.....	32
Seramikler	32
Kompozitler	34
Kitosan-Hidroksiapatit	34
2.4.2. Fabrikasyon Yöntemleri	35
2.5. Kemik Doku Mühendisliğinde Biyosinyaller.....	37
2.5.1. Bor.....	38
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR	40
3.1. Kullanılan Malzemeler.....	40
3.2. Doku İskelelerinin Üretimi	41
3.2.1. Kitosan Doku İskelelerinin Üretimi	41
3.2.2. B-HAp/kitosan ve HAp/kitosan Kompozit Doku İskelelerinin Üretimi	42
3.3. Hücre Kültür Çalışmaları.....	44
3.3.1. Mezenkimal Kök Hücre İzolasyonu.....	44
3.3.1.1. Adipoz Kökenli Mezenkimal Kök Hücre İzolasyonu (AKH)	44
3.3.1.2. Kemik İliği Mezenkimal Kök Hücre İzolasyonu (KiMKH)	45
3.4. Hücre Karakterizasyonu	46
3.4.1. Presto Blue Analizi.....	46
3.4.2. F-aktin/DAPI Boyaması	46
3.4.3. Kristal Viyole Boyaması	47
3.4.4. Senesens Boyaması.....	47
3.4.5. AKH ve KiMKH'lerin Farklılaşma Potansiyellerinin İncelenmesi	47
3.4.5.1. Osteojenik Farklılaşma	48
<i>Alkalen Fosfotaz-von Kossa Boyaması (ALP-VK)</i>	48
3.4.5.2. Adipojenik Farklılaşma.....	49
<i>Oil Red O boyama</i>	49
3.4.5.3. Kondrojenik Farklılaşma	50
<i>Safranin O/ Fast Green Boyaması</i>	51
3.4.6. Akış Sitometrisi Analizi	51
3.5. Doku İskeleleri ile Yapılan Hücre Kültür Çalışmaları.....	52
3.5.1. Doku İskelelerinin Sterilizasyonu	52

3.5.2. Fibronektin İmmobilizasyonu	52
3.5.3. Doku İskelesi Yüzeyine Bağlanan Amino Gruplarının Ninhidrin Yöntemi ile Tayini.....	53
3.5.4. Hücre Ekimi ve Osteojenik Farklılaşma	53
3.5.5. MTT Analizi.....	54
3.5.6. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi	55
3.5.7. RT-PCR Analizi.....	55
3.6. İstatistiksel Analiz	57
4. DENEYSEL SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	58
4.1. Doku İskelelerinin Üretimi ve Karakterizasyonu.....	58
4.2. Hücre Kültür Çalışmaları	67
4.2.1. AKH ve KiMKH İzolasyonu	67
4.2.2. AKH ve KiMKH Karakterizasyonu	68
4.2.2.1. Presto Blue Analizi.....	69
4.2.2.2. F-aktin/DAPI Boyaması	71
4.2.2.3. Kristal Viyole Boyaması	73
4.2.2.4. Senesens Analizi	74
4.2.2.5. Hücrelerin Farklılaşma Potansiyellerinin İncelenmesi.....	75
<i>Osteojenik farklılaşma</i>	75
<i>Adipojenik farklılaşma</i>	79
<i>Kondrojenik farklılaşma</i>	80
4.2.2.6. Akış sitometrisi analizi	82
4.2.3. Hücre Ekimi ve Osteojenik Farklılaşma	83
4.2.3.1. Doku İskelesi Yüzeyine Bağlanan Amino Gruplarının Ninhidrin Yöntemi ile Tayini.....	84
4.2.3.2. MTT Analizi.....	85
4.2.3.3. SEM Analizi	91
4.2.3.4. RT-PCR Analizleri.....	102
5. GENEL SONUÇLAR.....	107
KAYNAKLAR.....	113
ÖZGEÇMİŞ	122

ÇİZELGELER

Çizelge 2.1. Doku mühendisliğinde kullanılan temel hücre kaynakları.....	7
Çizelge 2.2. Kemik doku mühendisliğinde kullanılan biyomalzemelerin özellikleri	33
Çizelge 2.3. Kemik doku iskelesi üretim yöntemleri.....	36
Çizelge 3.1. 10XSBF çözelti reçetesi (toplam hacim 1L).....	42
Çizelge 3.2. ALP-VK boyamasında kullanılan çözeltiler.....	49
Çizelge 3.3. Safranin O/Fast Green boyamasında kullanılan çözeltiler.....	51
Çizelge 3.4. AKH'lerine ait hücre kültürü zaman çizelgesi.....	54
Çizelge 3.5. KiMKH'lerine ait hücre kültürü zaman çizelgesi.....	55
Çizelge 3.6. Polimeraz zincir reaksiyonu için primer dizileri.....	57
Çizelge 4.1. HAp ve B-HAp örneklerinde bulunan bileşenlerin oranları.....	63
Çizelge 4.2. Doku iskelelerinin yüzde gözeneklilik ve şişme değerleri.....	65
Çizelge 4.3. Presto Blue analizi sonuçları.....	69
Çizelge 4.4. Hücre kültür çalışmalarında kullanılan hücreler ve doku iskeleleri.....	84

ŞEKİLLER

Şekil 2.1. Kemik dokusunda bulunan hücreler.....	5
Şekil 2.2. MKH izolasyonunun şematik gösterimi.....	16
Şekil 2.3. Kemik iliği MKH'lerin birçok farklı hücre hattına farklılaşma potansiyeli.....	24
Şekil 2.4. Kemik iliğinin şematik gösterimi.....	25
Şekil 2.5. MKH'lerin kullanım alanları.....	28
Şekil 3.1. HAp/kitosan ve B-HAp/kitosan doku iskelesi üretiminin şematik gösterimi.....	43
Şekil 4.1. Dondurarak-kurutma yöntemi ile hazırlanmış kitosan doku iskelelerinin görüntüleri (a) etanolle stabilizasyon sonrası (b) stabilizasyon basamağını takiben yapılan dondurarak-kurutma işlemi sonrası (c) hücre kültür çalışmalarında kullanılan iskelelerin boyutu.....	59
Şekil 4.2. Mikrodalga desteği ile üretilen HAp (a) ve B-HAp (b) örneklerine ait TEM görüntüleri, HAp (c ve d) ve B-HAp (e ve f) SEM görüntüleri	62
Şekil 4.3. 1) Hücre kültür çalışmalarında kullanılan doku iskelelerinin görüntüleri: (a) Kitosan (b) HAp/kitosan (c) B-HAp/kitosan; 2) Doku iskelelerinin SEM görüntüleri: (a) Kitosan (b) HAp/kitosan ve (c) B-HAp/kitosan.....	66
Şekil 4.4. İzole edilen hücrelerin optik mikroskop görüntüleri: (a) AKH P0 20X (b) KiMKH P0 20X (c) AKH P1 20X (d) KiMKH P1 20X.....	68
Şekil 4.5. AKH üreme eğrisi.....	70
Şekil 4.6. KiMKH üreme eğrisi.....	70
Şekil 4.7. AKH'lere ait F-aktin/DAPI boyamaları (a) DAPI 20X (b) F-aktin 20X Çakışık (c)20X (d)20X.....	71
Şekil 4.8. KiMKH'lere ait F-aktin/DAPI boyamaları (P5) (a) DAPI 20X (b) F-aktin 20X Çakışık (c)20X (d)20X.....	72
Şekil 4.9. Kristal viyole ile boyanmış MKH'lerin optik mikroskop görüntüleri (a) AKH 20X (b) AKH 10X (c)KiMKH 20X (d)KiMKH 10X.....	73
Şekil 4.10. Hücrelerin senesens boyaması görüntüleri; (a) boyamadan önce AKH 20X (b) boyamadan sonra AKH 20X (c) boyamadan önce KiMKH 20X (d) boyamadan sonra KiMKH 20X.....	74

Şekil 4.11. AKH'lerin matris mineralizasyonunu gösteren ALP-VK boyamaları (P5); 14.gün - kontrol grubu (a) 20X, osteojenik farklılaşma grubu (b) 20X (c) 10X (d) 4X; 28.gün - kontrol grubu (e) 10X, osteojenik farklılaşma grubu (f) 10X (g) 10X (h) 20X.....	77
Şekil 4.12. KiMKH'lere ait ALP-VK boyamaları; 14.gün - kontrol grubu (a) 20X, osteojenik farklılaşma grubu (b) 20X (c) 10X (d) 4X; 28.gün - kontrol grubu (e) 10X osteojenik farklılaşma grubu (f) 10X (g) 10X (h) 20X.....	78
Şekil 4.13. AKH'lerde yağ damlacıklarının Oil Red O boyaması ile görüntülenmesi, 20.gün: kontrol grubu (a)10X, adipojenik farklılaşma grubu (b)20X (c)20X (d)10X (e)20X (f)20X.....	79
Şekil 4.14. KiMKH'lerde yağ damlacıklarının Oil Red O boyaması ile görüntülenmesi, P5 20.gün: kontrol grubu (a)10X, adipojenik farklılaşma grubu (b)20X (c)20X (d)10X (e)20X (f)20X.....	80
Şekil 4.15. Safranin O/Fast Green boyaması; (a) AKH kontrol grubu (b) AKH kondrojenik farklılaşma grubu; (c) KiMKH kontrol grubu, (d) KiMKH kondrojenik farklılaşma grubu.....	81
Şekil 4.16. AKH'lere ait akış sitometri analiz sonuçları (Yeşil ve mor histogramlar sırasıyla kontrol ve yüzey IgG işaretleyicilerdir).....	83
Şekil 4.17. Ninhidrin analizi sonuçları.....	84
Şekil 4.18. Kitosan+Fn, HAp/kitosan+Fn ve B-HAp/kitosan+Fn doku iskeleleri üzerinde çoğalan AKH'lere ait MTT grafiği (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık, n=3, aynı günde farklı gruplar için * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001).....	85
Şekil 4.19. Kitosan, HAp/kitosan ve B-HAp/kitosan doku iskeleleri üzerinde çoğalan AKH'lere ait MTT grafiği (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık, n=3, aynı günde farklı gruplar için * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001).....	87
Şekil 4.20. Kitosan+Fn, HAp/kitosan+Fn ve B-HAp/kitosan+Fn doku iskeleleri üzerinde çoğalan KiMKH'lere ait MTT grafiği (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık, n=3, kontrol grup kitosan ile diğer gruplar için * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001; HAp/kitosan ve B-HAp/kitosan için ● p<0.05, ●● p<0.01, ●●● p<0.001).....	89
Şekil 4.21 Kitosan, HAp/kitosan ve B-HAp/kitosan doku iskeleleri üzerinde çoğalan KiMKH'lere ait MTT grafiği (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık, n=3, kontrol grup kitosan ile diğer gruplar için *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001; HAp/ ve B-HAp/kitosan için ● p<0.05, ●● p<0.01, ●●● p<0.001).....	91
Şekil 4.22. Kitosan+Fn doku iskelesi üzerinde çoğalan AKH'lere ait SEM görüntüleri (a) 7.gün 100X, (b) 7.gün 250X, (c) 14.gün 500X, (d) 14.gün 500x, (e) 21.gün 250X, (f) 21.gün 1000X.....	92
Şekil 4.23. HAp/kitosan+Fn üzerinde çoğalan AKH'lere ait SEM görüntüleri (Sırasıyla 100x, 1000x, 3000x büyütme vermiştir).....	95

Şekil 4.24. B-HAp/kitosan+Fn üzerinde çoğalan AKH'lere ait SEM görüntüleri (Sırasıyla 100x, 1000x, 3000x büyütme verilmektedir).....	96
Şekil 4.25. Kitosan, HAp/kitosan ve B-HAp/kitosan üzerinde çoğalan AKH'lere ait 7.gün SEM görüntüleri (Sırasıyla 100x, 500x, 1000x büyütme verilmektedir).....	97
Şekil 4.26. Fibronektin immobilizasyonu yapılan doku iskeleleri üzerinde çoğalan KiMKH'lerine ait 7.gün SEM görüntüleri.....	98
Şekil 4.27. Fibronektin immobilizasyonu yapılan doku iskeleleri üzerinde çoğalan KiMKH'lere ait 14.gün SEM görüntüleri.....	99
Şekil 4.28. Fibronektin immobilizasyonu yapılan doku iskeleleri üzerinde çoğalan KiMKH'lere ait 21.gün SEM görüntüleri.....	100
Şekil 4.29. Doku iskeleleri üzerinde çoğalan KiMKH'lere ait 14.gün SEM görüntüleri.....	101
Şekil 4.30. HAp/kitosan ve B-HAp/kitosan üzerinde çoğalan AKH'lere ait bağıl kollajen-I gen ifadesi grafiği (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık, n=3, aynı günde farklı gruplar için * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001; aynı grubun farklı günleri için ● p<0.05, ●● p<0.01, ●●● p<0.001).....	102
Şekil 4.31. HAp/kitosan ve B-HAp/kitosan üzerinde çoğalan AKH'lere ait bağıl RunX2 gen ifadesi grafiği (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık, n=3, aynı günde farklı gruplar için * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001; aynı grubun farklı günleri için ● p<0.05, ●● p<0.01, ●●● p<0.001).....	104
Şekil 4.32. HAp/kitosan ve B-HAp/kitosan üzerinde çoğalan AKH'lerine ait bağıl osteopontin gen ifadesi grafiği (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık, n=3, aynı günde farklı gruplar için * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001; aynı grubun farklı günleri için ● p<0.05, ●● p<0.01, ●●● p<0.001).....	105
Şekil 4.33. HAp/kitosan ve B-HAp/kitosan üzerinde çoğalan AKH hücrelerine ait bağıl osteonektin gen ifadesi grafiği (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık, n=3, aynı günde farklı gruplar için * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001; aynı grubun farklı günleri için ● p<0.05, ●● p<0.01, ●●● p<0.001).....	106

SİMGELER ve KISALTMALAR

Simgeler

AgNO ₃	Gümüş Nitrat
CaCl ₂ ·2H ₂ O	Kalsiyum Klorür Dihidrat
CO ₂	Karbon Dioksit
H ₃ BO ₃	Borik Asit
HCl	Hidroklorik Asit
KCl	Potasyum Klorür
MgCl ₂ ·6H ₂ O	Magnezyum Klörür Hezadhidrat
Na ₂ HPO ₄	Disodyum Hidrojen Fosfat
NaCl	Sodyum Klorür
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	Sodyum Dihidrojen Fosfat Monohidrat
NaHCO ₃	Sodyum Bikarbonat
NaOH	Sodyum Hidroksit

Kısaltmalar

AKH	Adipoz Kökenli Kök Hücreler
ALP	Alkalin Fosfataz
B-HAp	Bor Katkılı Hidroksiapatit
BMP	Kemik Morfojenik Proteini
BSA	Sığır Serum Albumini
CD	Cluster of differentiation
cDNA	Komplementer Deoksi Ribonükleik Asit
DAPI	4',6-Diamidino-2-fenilindol
DBM	Demineralize Kemik Matrisi
DPKH	Diş Pulpası Kök Hücreleri

ECM	Hücre Dışı Matris
EDC	N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etil Karbodiimid Hidroklorür
EKH	Embriyonik Kök Hücre
FBS	Fötal Sığır Serum
Fn	Fibronektin
HAp	Hidroksiapatit
HKH	Hematopoetik Kök Hücreler
HMDS	Hekzametildisilazan
IBMX	3-İzobutil-1 metilksantin
IgG	İmmünoglobulin G
KiMKH	Kemik İliği Mezenkimal Kök Hücreler
KOL-I	Kollajen Tip I
MC3T3-E1	Fare Osteoblastik Hücre Hattı
MES	2-(N-Morfolin)ethansülfonik Asit Hemisodyum
MHC	Ana Doku Uyumluluğu Kompleksi
MKH	Mezenkimal Kök Hücre
MTT	3-[4,5-Dimetiltiazol-2-il]-Difeniltetrazolyum Bromür
NFT	Nötral Formalin Tamponu
NHS	N-hidroksi Süksinimid
OCN	Osteokalsin
ON	Osteonektin
OPN	Osteopontin
P/S	Penisilin/Streptomisin
PBS	Fosfat Tamponu Çözeltisi
RNA	Ribonükleik Asit
RT-PCR	Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

RunX2	Runt-ilişkili Transkripsiyon Faktörü 2
SA- β -gal	Senesens-ilişkili β -galaktosidaz
SBF	Yapay Vücut Sıvısı
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
SVF	Stromal Vasküler Fraksiyon
TCPS	Tissue Culture Polystyrene (Hücre Kültür Kabı)
TGF- β	Transformik Büyüme Faktörü
uPK	Uyarılmış Pluripotent Kök Hücreler
VK	von Kossa
YKH	Yetişkin Kök Hücreler
α -MEM	Minimum Essential Medium Alpha Modification

1. GİRİŞ

Hastalıklı veya hasarlı organ/dokuların onarılması için gereken malzemelerin yeterince uygun olmaması ve organ/doku nakli sıkıntısı, doku mühendisliği yaklaşımlarının öne çıkmasına neden olmaktadır. Doku mühendisliği için hücreler ve doku iskelelerinin tek başlarına kullanılmasının yanı sıra ikisinin kombinasyonunu içeren çeşitli yaklaşımlar da mevcuttur. En yaygın olarak kullanılan, istenilen dokuyu oluşturabilecek işlevselliğe sahip hücrelerin uygun bir malzemedan hazırlanan doku iskeleleri ile birleştirilmesiyle elde edilen hibrid sistemlerdir. Bu yaklaşımda, hasarlı bölgeye implante edilmek üzere biyouyumlu ve biyobozunur veya emilebilir doku iskeleleri üretilmekte ve iskeleler uygun hücreler ile bir araya getirilmektedir. İmplantasyon sonrası hücrelerin çoğalması ve hücre dışı matris üretmesiyle eş zamanlı olarak doku iskelesi bozunmakta ve dokuyu terk etmektedir, yeni oluşan işlevsel doku ile de doku kaybı/hasarı giderilmektedir [1].

Kemik, kendiliğinden iyileşme ve yara dokusu oluşturmadan rejenere olabilme yeteneğine sahip bir doku olsa da, bu rejenerasyon büyük hasar ve kayıplarda yetersiz kalabilmektedir. Kemik doku mühendisliğinin hedefi, doğal kemiğin yapısını ve rejenerasyon sürecini iyi bir şekilde taklit edebilmek ve üç boyutlu taşıyıcı üzerinde yeterli miktarda mineralize doku elde edebilmektir. İdeal kemik dolgu malzemesi, kemiğin defekt içine büyümesine olanak sağlayacak osteokondüktif bir matris, osteogenezin gerçekleşmesi için canlı hücreler ve hücreleri uyaracak osteoindüktif ajanlar içermelidir [2].

Doğal yapıda katyonik bir polisakkarit olan kitosanın, lizozomal enzimlerin etkisi ile parçalanabilmesi, yıkım ürünlerinin zararlı monomerler içermemesi nedeniyle fizyolojik olarak güvenilir olması, düşük immünojenite göstermesi, kemik matrisi içeriğinde bulunan glikozaminoglikanlara benzerliği, bu polimerin kemik doku mühendisliği çalışmalarında kullanımını elverişli kılmaktadır [3]. Ancak kitosanın kırılğan doğası ve yetersiz biyoaktivitesi nedeniyle kullanımı kısıtlanmaktadır [4]. Biyoaktivitesini arttırmak amacıyla doku mühendisliği uygulamalarında hidroksiapatit (HAp) ile modifiye edilen kitosan iskeleler kullanılabilir [5]. Kemik yapısının %60 oranında HAp ve %20 oranında da kollajen fiber içerdiği bilinmektedir. Kemik mineralinin kimyasal ve kristal yapısına önemli ölçüde

benzerlik gösteren, biyouyumlu, osteokondüktif ve osteoindüktif olan HAp doku iskelesi malzemesi olarak sıkça kullanılmaktadır.

Kemik doku mühendisliğinin önemli bileşenlerinden olan hücrelerin elde edilmesi için uygun bir hücre kaynağına ihtiyaç duyulmaktadır. Kendini yenileyerek yüksek çoğalma ve farklılaşma potansiyeline sahip olan kök hücreler kemik doku mühendisliğinde önemli bir hücre kaynağı olarak yer almaktadır. Özellikle, mezenkimal kök hücrelerin (MKH) hipo-immunolojik olmaları sayesinde hastanın immün sisteminden kaçabilmeleri önemli avantaj sağlamaktadır. Bu nedenle kemik doku mühendisliği çalışmalarında MKH'lerin en önemli kaynağı olan kemik iliği ve adipoz dokudan elde edilen hücreler sıklıkla tercih edilmektedir [6]. Çeşitli çalışmalarda kemik iliği ve adipoz dokudan elde edilen MKH'ler *in vitro* ve *in vivo* kemik doku mühendisliği uygulamalarında kullanılmış ve çarpıcı sonuçlar elde edilmiştir.

Kemik iliği MKH'lerin kullanımı oldukça yaygın olmasına rağmen kemik iliğinden elde edilen hücrelerin miktarı, farklılaşma potansiyelleri ve yaşam süreleri donörün yaşı ile ters orantılıdır. Üstelik, kemik iliğinden MKH elde edilmesi invaziv bir işlemdir [7]. Bu nedenlerden dolayı son yıllarda MKH izolasyonu için alternatif kaynak olan adipoz doku tercih edilmektedir. Adipoz dokudan az zamanda, nispeten daha az invaziv bir şekilde ve miktarca daha çok MKH elde edilebilmektedir [8].

Bor elementinin osteogenez ve kemik metabolizmasında önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. Aynı zamanda, belirli miktarlarda beslenme yolu ile alınan bor, birçok metabolik yolda görev almaktadır. Bor eksikliğinde kemik rejenerasyonu ve gelişiminin olumsuz etkilendiği ve kemik kaybı riskinin arttığı bilinmektedir [9].

Literatür incelendiğinde borun hücreler üzerine etkisinin araştırıldığı çok az sayıda çalışma bulunduğu görülmüştür [10-14]. Bu çalışmaların birkaçında, borun 2-boyutlu kültürlerde mezenkimal kök hücreler üzerine doğrudan etkisi incelenmektedir [10, 11]. İlgili literatürde özellikle borun, adipoz kökenli MKH'ler üzerindeki etkisini inceleyen 2-boyutlu ve 3-boyutlu bir kültür çalışmasına rastlanmamıştır.

Sunulan tez çalışmasının amacı, kemik doku rejenerasyonunu destekleyecek özelliklere sahip olan bor katkılı hidroksiapatit (B-HAp) kaplı kitosan doku iskeleleri ile kemik iliği ve adipoz kökenli mezenkimal kök hücrelerin etkileşiminin ve osteojenik farklılaşmalarının incelenmesidir. Bu hedef doğrultusunda gerçekleştirilen çalışmalar 3 ana başlık altında sunulmuştur. İlk olarak gözenekli kitosan doku iskeleleri dondurarak-kurutma yöntemi ile üretilmiş ve kitosanın yetersiz biyoaktivitesini arttırmak amacıyla mikrodalga destekli biyomimetik yöntem [15] kullanılarak HAp ve B-HAp ile kaplanmıştır. İkinci bölümde kemik iliği (KiMKH) ve adipoz kökenli (AKH) MKH izolasyonu yapılmış ve hücrelerin karakterizasyonları tamamlanmıştır. Son bölümde ise AKH ve KiMKH'lerin kitosan, HAp/kitosan ve B-HAp/kitosan doku iskeleleri üzerindeki üreme davranışları ve osteojenik farklılaşmaları hücre kültür çalışmaları ile belirlenmiştir. Konu ile ilgili literatür bilgileri, tez kapsamında gerçekleştirilen çalışmalar ve elde edilen sonuçlar devam eden bölümlerde sunulmuştur.

2. GENEL BİLGİLER

Bu bölümde, sunulan tez çalışmasının temelini oluşturan konularla ilgili olarak literatürde yer alan bilgiler 5 ana başlık altında özetlenmiştir. İlk bölümde kemik doku mühendisliğine yer verilmiş ve kemik doku mühendisliğinde kullanılan hücrelerden bahsedilmiştir. Ardından kemik doku mühendisliğinde geniş kullanıma sahip olan kök hücrelerden bahsedilmiştir. Üçüncü bölümde tez çalışmasında iki farklı çeşidi kullanılan mezenkimal kök hücrelerin (kemik iliği mezenkimal kök hücreler (KiMKH) ve adipoz kökenli mezenkimal kök hücreler (AKH)) özellikleri, izolasyonu, karakterizasyonu ve kullanım alanları detaylı bir şekilde açıklanmıştır. Dördüncü bölümde, kemik doku hasarlarının tedavisi için kullanılan doku iskeleleri ve üretim yöntemleri anlatılmıştır. Son bölümde ise kemik doku mühendisliğinde kullanılan biyosinyaller, özellikle de bor minerali hakkında temel literatür bilgileri verilmiştir.

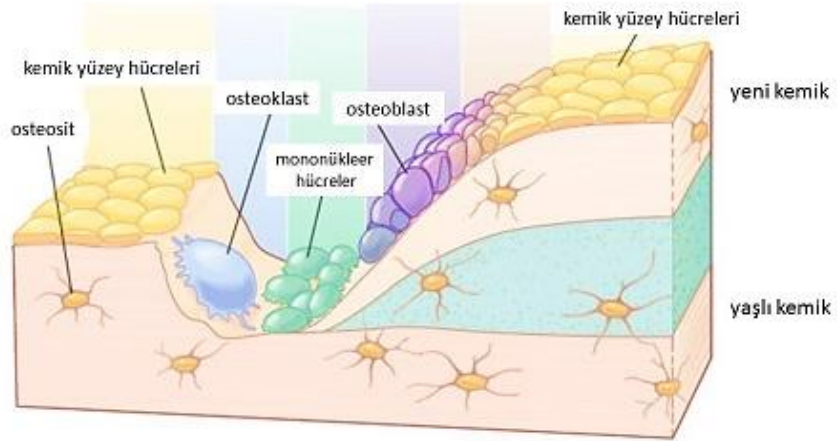
2.1. Kemik Doku Mühendisliği ve Kullanılan Hücreler

Kemik; koruma, hareket, organlara destek, kan üretimi, mineral depolanması, homeostaz ve kan pH düzenlemesi gibi insan fizyolojisinin önemli fonksiyonlarında anahtar rol oynayan ve çeşitli öncül hücrelere (mezenkimal, hematopoetik) ev sahipliği yapan dikkat çekici bir organdır.

Kemik, yeniden yapılandırma ve kendiliğinden yenilenme gibi üstün özelliklere sahiptir. Kemik dokusu, kemik hücreleri olan osteoblast, osteoklast ve osteositler tarafından sağlanmış homeostazın dinamik bir denge durumunda bulunmaktadır (Şekil 2.1).

Kemiğin yüksek rejenerasyon kapasitesi, özellikle genç insanlarda, kırıkların çoğunluğunun büyük müdahale gerektirmeden iyileşmesine olanak sağlamaktadır. Ancak, osteogenez imperfekta, osteoartrit, osteomyelit ve osteoporoz gibi hastalıklar, travmatik yaralanmalar, ortopedik ameliyatlara ve primer tümör rezeksiyonları, büyük kemik hasarları veya boşluklarına neden olmaktadır. Bu gibi durumlarda, kemik defektinin boyutuna bağlı olarak, enfeksiyon ve diğer çeşitli nedenlerden dolayı yaralı ya da hastalıklı kemiğin kendini tamir etmesi mümkün değildir [16, 17].

Kemiğin yeniden oluşumu



Şekil 2.1. Kemik dokusunda bulunan hücreler.

Genel olarak kemik rejenerasyonu aşağıdaki basamaklardan oluşmaktadır:

1. *Osteogenez*; Kemik iyileşmesinin tüm aşamalarında görülür ve hücre transferi ile kemik oluşturma kapasitesini ifade eder.

2. *Osteoindüksiyon*; Kemik oluşumunun uygun malzemeler (osteoindüktif) ile desteklenmesidir. Osteoindüktif malzemeler, kök hücrelerin osteoblastlara farklılaşmalarını ve sonrasında kemik oluşturmalarını sağlayan malzemelerdir. Bu malzemelerin en iyi bilineni demineralize kemik matrisidir (DBM). DBM biyolojik aktif sitokinlerle birlikte mezenkimal kök hücrelerin çoğalmasını, osteoblastik ve kondroblastik farklılaşmasını uyarır.

3. *Osteokondüksiyon*; MKH ve osteoblastlar gibi kemik yapıcı hücrelerin üremelerini destekleyerek, kemiğin üç boyutlu yapısının oluşması için osteokondüktif malzemelerin sağlanmasıdır.

4. *Osteopromosyon*; Kemik iyileşmesi ve rejenerasyonunun biyolojik ve mekanik kolaylaştırıcı faktörlerin etkisi ile sağlanmasıdır. Örneğin, PRP (Platelet yönünden zenginleştirilmiş plazma) içerdiği TGF- β (dönüştürücü büyüme faktörü), PDGF (kan plateletlerinden köken alan büyüme faktörü), VEGF (vasküler endotel büyüme faktörü) ve IGF (insulin-benzeri büyüme faktörü) gibi faktörlerle böyle bir etki sağlamaktadır [18, 19].

Hastalıklı ya da yaralı kemik dokularını tedavi etmek için üç temel yaklaşım bulunmaktadır:

1. Taze izole veya kültüre edilmiş hücrelerin implantasyonu; 2. *In vitro* olarak hazırlanmış hücre-iskele implantasyonu; 3. *In situ* doku rejenerasyonu [20].

Kemik doku rejenerasyonu esnasında hücrelere tutunabilecekleri uygun bir çevrenin sağlanması gereklidir. Hücre dışı matris (ECM) *in-vivo'da* bu işlevi yerine getirmektedir. Bu nedenle, doku mühendisliği yaklaşımında da ECM işlevini taklit edebilecek sistemlerin (doku iskelelerinin) geliştirilmesine çalışılmaktadır. Hücreler, büyüme faktörleri ile geçici ECM işlevini yapan sentetik malzemelere (doku iskeleleri) yerleştirilerek hasarlı bölgelere implante edilmektedir. Yeni kemik oluşunca geçici iskele bozunmakta ve vücut tarafından emilmektedir [1].

Büyük kemik hasarlarının tedavisinde kullanılacak greft materyaller, olog kemik (hastanın kendisinden alınan), allojenik kemik (bir donörden alınan), demineralize kemik matrisi ve aynı zamanda metal, seramik, polimer ve kompozit gibi geniş bir yelpazede biyomalzemeler olabilmektedir. Genellikle, altın standart olarak kabul edilen tedavi yöntemi otogreft kullanımınıdır. Bu yaklaşımda hastanın kendi vücudunun yük taşıyıcı olmayan kısmından (tipik olarak bu kolay erişilebilir iliaktır) kemik alınarak hasarlı bölgeye yerleştirilmektedir. Hastanın kendi kemiği, bağışıklık sistemi tarafından reddedilme ve hastalığa bağlı komplikasyon gibi durumları ortadan kaldırmakta ve kemik oluşturan hücrelerin doğrudan implant bölgesine göç etmesini sağlamaktadır. Ayrıca, olog kemik greftleri, osteoindüktif büyüme faktörlerinin etkisi ile mezenkimal kök hücrelerin osteojenik hücrelere farklılaşmalarını uyarmaktadırlar [21].

Genel olarak doku mühendisliğinde iki temel yaklaşım vardır: 1. İmplantasyon öncesi uygun işlevselliği sağlamak üzere *in vitro* geliştirilen yapıların kullanıldığı *ex vivo* doku mühendisliği; 2. Doku onarımı ve yenilenmesi için yapıların *in vivo* ortamda olgunlaşmaya bırakıldığı *in vivo* doku mühendisliği. Her iki yaklaşım için de üç ana bileşen gerekmektedir: uygun doku iskelesi, duyarlı hücreler ve biyosinyal molekülleri. Böylece, en klasik tanımıyla doku mühendisliği, hücre kaynağı ve üç-boyutlu doku iskelesi kombinasyonunun kullanılması ile dejenere dokunun onarımı, yenilenmesi ve rejenerasyonunu hedeflemektedir [22].

Kemik doku mühendisliğinin klinikte uygulanabilir bir yaklaşım haline gelebilmesi için çalışmalar, uygun hücre (uygun hücre seçimi, immün yanıt kontrolü), iskele (farklı tasarımlı, kimyasal bileşenli ve rezorpsiyon oranlı iskeleler test edilmeli), implant koşulları (serumsuz ortam kullanımı dahil olmak üzere hücre kültür ortamları optimize edilmeli; biyoreaktörler geliştirilmeli ve kullanılmalı), cerrahi işlemler ve hasta takibine (klinik protokoller doğrulanmalı ve standardize edilmeli) ilişkin konularda yoğunlaşmaktadır [23].

Doku mühendisliği için temel hücre kaynakları zenojenik, allojenik ve otojenik hücreleri içermektedir. Her kategori, hücrenin kök hücre (embriyonik veya yetişkin) veya daha farklılaşmış - ileri etapdaki hücre olmasına göre ayrılabilir. Doku mühendisliği çalışmalarında kullanılan temel hücre kaynakları Çizelge 2.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.1. Doku mühendisliğinde kullanılan temel hücre kaynakları.

Deneysel çalışmalar	Preklinik çalışmalar	Klinik çalışmalar
<ul style="list-style-type: none">▪ Otolog▪ Allojenik▪ Zenojenik▪ Ölümsüzleştirilmiş▪ Non-transforme klonal▪ Sarkoma	<ul style="list-style-type: none">▪ Otolog▪ Allojenik▪ Zenojenik	<ul style="list-style-type: none">▪ Otolog

Bugüne kadar yapılan çalışmalar ile, kemik onarımı ve yenilenmesinin uyarılması için, mezenkimal kök hücreler, embriyonik kök hücreler (EKH), uyarılmış pluripotent kök hücreler (uPK hücreleri), insan diş kök hücreleri gibi çeşitli hücre tipleri belirlenmiştir [24]. Multipotent mezenkimal progenitör hücreler gibi çeşitli yetişkin hücre hatları başarılı şekilde kemik ve kıkırdak doku mühendisliği yaklaşımları için kullanılmıştır. Ayrıca, genetik olarak değiştirilmiş diğer kemik ve kıkırdak hücre hatları (sarkoma hücreleri, ölümsüzleştirilmiş hücreler, dönüştürülmemiş klonal hücre hatları) geliştirilmiş ve çeşitli ortamlarda hücrelerin *in vitro* davranışlarını değerlendirmek için kullanılmıştır. Kondro-osteoprogenitör özellikleri olan hücreler periost, kemik iliği, dalak, timus, iskelet kası, adipoz doku, deri, retina, diş pulpası da dahil olmak üzere birçok dokudan izole edilmiştir [25].

Kemik matrisini hemen üretmeye başladığından ve otolog olabilme kapasitesinden dolayı primer osteoblast öncülü hücreler özellikle klinik uygulamalar için en avantajlı hücre tipi olarak sayılabilir, fakat *in vitro* olarak sınırlı çoğalma kapasitelerinden dolayı bu hücrelerin kemik doku mühendisliğinde kullanımı sınırlanmıştır. Bu hücreler, kemik parçacıklarından enzimatik ekstraksiyon ile elde edilebilmekte ve *in vitro* kültürlerde çoğaltılabilmektedir. Doğrudan primer osteoblastların kullanımı yerine osteoblastlara farklılaştırılmış MKH kullanımı daha çok tercih edilmektedir [26].

2.1.1. Hücre Hatları

In vitro olarak hücre-biyomalzeme etkileşimlerinin incelenmesi için çeşitli osteoblastik hücre hatları geliştirilmiştir. Bu hücreler kolaylıkla büyüüp çoğalabilen ancak kendi sınırlamaları olan hücrelerdir. Spontan tümörlerden türetilen osteosarkoma hücre hatları *in vitro* olarak kolaylıkla yetiştirilmekte ve sonsuz çoğalabilmekte, fakat normal bir fenotip sergilememektedir. Ayrıca, normal farklılaştırılmış insan osteoblastları ile karşılaştırıldığında osteosarkoma hücreleri çeşitli hormon ve sitokinlere anormal tepki göstermektedir. Örnek olarak; insan osteosarkoma hücresi olan MG-63 osteoblast benzeri hücreler gösterilebilir. Bu özelliklerin aşılması için Harris ve ark. [27] insan osteoblast hücrelerine oldukça benzeyen stabil olarak transfekte edilmiş insan fetal osteoblastik hücre hattı (hFOB 1.19) geliştirmiştir. MC3T3-E1 (fare kalvaryal fibroblastlarından klonlanmış hücre hattı), SAOS-2, UMR-106 gibi diğer hücre hatları da kemik doku mühendisliğinde yaygın olarak kullanılmaktadır, ancak çalışmalar için hücre seçerken türler arası farklılıklar göz önünde bulundurulmalıdır [28].

2.1.2. Ko-kültürler

Osteoblastların endotel hücreler veya osteoklast gibi diğer hücreler ile ko-kültürleri biyomimetik ortam sağlamak ve hücre-hücre iletişimi doğal kemik oluşumuna özgü olan sinyal yollarını aktive etmektedir. Bu da mineralize matrisin çoğalmasına ve tek başına yapılan osteoblast kültürü ile karşılaştırıldığında, kemik dokusunun daha iyi vaskularize olmasına neden olmaktadır. Kyriakidou ve ark. [29] tarafından yapılan çalışmada osteoblastların endotel hücrelerin çoğalmasını artırdığı ve aynı zamanda endotel hücrelerin de osteoblastların büyümesini artırdığı, ancak farklılaşmalarını azalttığı gösterilmiştir.

Kök hücreler ise kendini yenileyerek sürekli bir hücre kaynağı sağlayan ve osteojenik olarak farklılaşabilme özelliklerinden dolayı kemik doku mühendisliğinde geniş kullanıma sahip olan hücrelerdir [26].

Sunulan tez çalışması farklı kökenli kök hücreler ile gerçekleştirildiği için devam eden bölümde kök hücrelere ait daha detaylı bilgilere yer verilmiştir.

2.2. Kök Hücreler

Geleneksel olarak kök hücre, kendini yenileme, çeşitli hücre tiplerine dönüşebilme ve klon oluşturma yeteneğine sahip farklılaşmamış hücre olarak tanımlanmaktadır. Kök hücreler vücutta bulunan 200'den fazla hücre tipi için progenitör olarak kabul edilen ilkel hücrelerdir. *Kendini yenileme* potansiyeli, hücrenin farklılaşmama özelliğini koruyarak sayısız hücre döngülerinden geçme yeteneği anlamına gelir. *Potensi*, kök hücrelerin farklı potansiyellerini anlatmak için kullanılan bir kavramdır. Yumurta ve sperm hücrelerinin birleşmesi ile oluşan zigot, tek başına bir organizmayı meydana getirebilecek genetik bilgiye ve güce sahiptir. Böyle bir potansiyele sahip ilk embriyonik hücreye *totipotent* hücre denir. Döllenmeyi takip eden ilk 4-5 gün içerisinde bu hücreler, aynı güce sahip olup her biri tek başına bir organizma meydana getirebilme yeteneğindedirler. Yaklaşık beşinci gündeki blastokistin iç hücre kitlesi de (embriyonik kök hücreler) vücuttaki tüm hücrelere dönüşebilme yeteneğine sahiptir; ancak bu hücreler tek başlarına bir organizmayı oluşturamazlar. Bu nedenle bu hücrelere *pluripotent* hücre adı verilir. Bu aşamadan sonra hücreler daha özel fonksiyonlara sahip olmaya ve erişkin kök hücrelerini oluşturmaktadırlar. Daha özelleşmiş olan bu kök hücreler ise *multipotent* hücre olarak sınıflandırılmaktadır. *Unipotent* kök hücreler ise sadece bir tip hücre üretebilmekte ama kendini yenileme özelliğine sahip olduğundan dolayı kök hücre olmayan hücrelerden ayrılabilir [30, 31].

2.2.1. Tarihçe

Kemik iliğinde hematopoetik olmayan hücrelerin varlığı ilk kez Alman patolog Cohnheim tarafından 130 yıl önce gözlemlenmiştir. Cohnheim'ın çalışmaları, yara iyileşmesi işleminin normal bir parçası olan ve kollajen liflerini depolayan fibroblastların kaynağının kemik iliği olabilme olasılığını arttırmıştır. Kemik iliğinin stromal bölgesi sınırlarında bulunan mezenkimal kök hücreler ilk olarak Friedenstein ve Petrakova [32] tarafından öncül bir çalışmada tespit edilmiştir.

Bu çalışmada, sıçan kemik iliğinden kemik oluşturan progenitör hücreler izole edilmiştir. Bütün kemik iliği plastik kaplara yerleştirilmiş ve yapışmayan hücreler 4 saat sonra uzaklaştırılmış, böylece hematopoetik hücrelerin çoğu atılmıştır. Yapışan hücrelerin görünürde heterojenik olduklarını, fakat daha sıkı yapışan hücrelerin iğsi formda ve 2-4 hücre içeren odaklar oluşturduklarını, ayrıca bu hücrelerin 2-4 gün arasında inaktif olduklarını, sonradan hızla çoğalmaya başladıklarını belirtmişlerdir. Friedenstein ve Owen bu hücreleri osteojenik kök hücre veya kemik iliği stromal kök hücre olarak adlandırmışlardır. [33].

Friedenstein'in gözlemleri 1980'ler boyunca diğer gruplar tarafından devam ettirilmiş ve Friedenstein yöntemi ile izole edilen hücrelerin multipotansiyel özelliğe sahip oldukları ve osteoblast, kondrosit, adiposit ve hatta miyoblastlara farklılaşabildikleri ortaya çıkmıştır. Caplan [34] kemik ve kıkırdak dönüşümünün MKH aracılığı ile gerçekleştiğini ve çevre koşullarının MKH farklılaşmasını uyarmak için kritik önem taşıdığını belirtmiştir. 1990'larda MKH'in miyojenik farklılaşması gösterilmiş, Pittenger ve ark. [35] tarafından yetişkin insan MKH'in birçok farklı hücreye farklılaşabilme potansiyelini koruyarak kolonilere çoğaltılabildikleri belirtilmiştir. Daha sonra 1990'ların sonlarında Kopen ve ark. [36] MKH'in ektoderm kökenli dokuya farklılaşma kapasitesini göstermişlerdir. Yirmibirinci yüzyılın başlarında yapılan *in vivo* çalışmalar MKH'in endoderm kökenli hücrelere ve kardiyomiyositlere farklılaştıklarını ve ventriküler miyositlerin MKH'ler ile ko-kültürlerinin kardiyomiyosit farklılaşmasını uyardığını göstermiştir.

Son 20 yılda MKH'ler birçok doku ve organdan izole edilmiştir. Ayrıca, belli uyaranlar varlığında MKH'lerin inanılmaz transdiferansiyasyon kapasitesine sahip oldukları da gösterilmiştir [37].

2.2.2. Kök Hücre Çeşitleri

Pluripotent hücrelerden en iyi bilineni, blastokistten elde edilen embriyonik kök hücrelerdir (EKH). Bunlardan başka epiblast kök hücreleri (EpiKH), embriyo karsinoma hücreleri (EKaH) ve ilkel cinsiyet hücreleri (İCH) ve bundan türetilmiş olan embriyonik germ hücreleri (EGH) diğer pluripotent hücrelerdir [38].

2.2.2.1. Embriyonik Kök Hücreler

EKH'ler pluripotent hücrelerdir ve üç germ tabakasının herhangi bir hücrelerine farklılaşma yeteneğine sahiptir, ancak bu hücreler tropoektoderm olmadan yeni embriyo üretemez. Bununla birlikte, EKH'leri farklı yapan özelliklerinden biri de uzun süre kültür içerisinde farklılaşmamış halde kalabilme yetenekleridir. Ayrıca EKH'ler yüksek telomeraz düzeyine sahiptirler ve bu da onların yetişkin kök hücrelere göre daha dayanıklı olmalarını sağlamaktadır. Böylece, EKH hem terapötik doku rejenerasyonu, hem de araç olarak gen tedavisi için oldukça uygundur [39].

EKH'lerin osteojenik hücrelere farklılaşmasını gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Bir yandan bu hücrelerin *in vitro* sınırsız büyüme potansiyeli, erişebilirliği ve genetik manipülasyon kolaylığı kemik doku mühendisliği için avantaj sağlarken, diğer taraftan kültür sırasında ve transplantasyonda, tümörojenik farklılaşma gibi bir risk taşımaktadırlar [26]. Bilindiği gibi embriyonik kök hücreler hayvanlara implante edildikten sonra teratoma ve teratokarsinomalara yol açabilmekte ve bu yanlış gelişen potansiyel EKH'lerin klinik kullanımı için büyük bir problem teşkil etmektedir. Üstelik transplante edilen EKH'ler organlarda normal işlevlerini sergileyemeyebilir ve immün yanıtı neden olabilirler [40]. Ayrıca, insan embriyonik kök hücrelerinin kullanımını etkileyen etik sorunlar da klinik uygulamayı sınırlayan problemlerden biridir [41].

2.2.2.2. Uyarılmış Pluripotent Kök Hücreler

Uyarılmış pluripotent kök hücreler (uPK hücreleri) doğal olarak pluripotent olmayan hücreden bir dizi spesifik gen ifadesinin indüksiyonu ile yapay olarak türetilmiş pluripotent kök hücrelerdir. uPK hücreleri ilk kez 2006 yılında fare fibroblastlarında Oct4, Sox2, Klf4, ve Myc transkripsiyon faktörlerinin yeniden programlanması yolu ile elde edilmiştir ve düşük verimli de olsa, somatik hücrelerin embriyonik kök hücrelerin bulunduğu pluripotent düzeye getirilebileceği gösterilmiştir [42]. Yaklaşık bir yıl sonra aynı yöntem kullanılarak farklılaştırılmış insan somatik hücreleri uPK hücrelerine dönüştürülmüş [43] ve aynı yıl farklı transkripsiyon faktörleri kullanılarak insan hücre dizileri oluşturulmuştur [44]. Araştırmalar insan uPK hücre özelliklerinin insan EKH özelliklerine benzer olduğunu göstermiş ve bu benzerliğin sadece morfoloji, gen ekspresyonu ve yüzey antijenleri açısından değil

aynı zamanda *in vitro* farklılaşma potansiyeli ve pluripotensi özellikleri açısından da olduğu belirlenmiştir. Ancak, onkogenlerin entegre olması nedeni ile tümör oluşumu özel dikkat ve araştırma gerektirmektedir. Buna ek olarak, kemik doku mühendisliğinde kullanılmak üzere klinik olarak güvenli uPK hücreleri üretmek için viral olmayan indüksiyon yöntemlerinin geliştirilmesi büyük önem taşımaktadır [24].

2.2.2.3. Yetişkin Kök Hücreler

Erken embriyo gelişimini tamamlamış bir organizmada bulunan multipotent kök hücreler *yetişkin kök hücreler* (YKH) olarak adlandırılmaktadır. Yetişkin organizmadaki çoğalan ve geçici hücrelerin öncüsü olan bu hücreler hasarlanan dokuların yenilenmesinde görev alır. Bu hücreler bazen somatik kök hücreler, bazen de dokuya özgü kök hücreler olarak da isimlendirilir. Yetişkin kök hücrelere özgü olan *plastisite* kavramı Ferrari ve ark. [45] yaptığı çalışma ile ortaya çıkmıştır. Bu çalışmada, farede kemik iliği kökenli miyojenik progenitörlerin dejenere kas tamirinde kullanımı anlatılmıştır. Plastisite, bir hücrenin kendi kimliğini bir organdan diğer organa geçirme yeteneği olarak adlandırılmaktadır [39].

Günümüzde üzerinde en çok çalışılan YKH tipleri hematopoetik kök hücreler (HKH), mezenkimal kök hücreler (MKH), nöral kök hücreler (NKH), diş pulpası kök hücreleri ve endotel kök/öncü hücreleridir. Bunlar dışında beyin, kalp, karaciğer, akciğer, pankreas, göz, burun, kulak gibi organlarda da yetişkin kök hücreler bulunmaktadır [38].

Diş Pulpası Kök Hücreleri

Bugüne kadar, beş farklı insan diş kök/progenitör hücresi izole edilmiş ve karakterize edilmiştir: diş pulpası kök hücreleri (DPKH), süt dişi kök hücreleri (SDKH), periodontal ligament kök hücreleri (PDLKH), apikal papilla kök hücreleri (APKH) ve dental folikül öncü progenitör hücreleri (DFÖH). Bu post-natal popülasyonlar kendini yenileme kapasitesi ve çoklu farklılaşma potansiyeli gibi mezenkimal kök hücre nitelikleri taşımaktadır [46]. İlk diş kök hücresi Grontos ve ark. [47] tarafından insan pulpa dokusundan izole edilmiş ve postnatal dental pulpa kök hücresi olarak adlandırılmıştır. Dental pulpa kök hücreleri mezenkimal kök hücre popülasyonudur. Bu hücrelerin odontoblast benzeri hücrelere, pulpa fibroblastlarına, endotel hücrelere, adipositlere ve nöral-benzeri hücrelere

farklılaşma potansiyeline sahip oldukları ortaya çıkmıştır. Daha sonra DPKH'lerin osteojenik, kondrojenik ve miyojenik olarak farklılaşabildikleri bulunmuştur. Dekametazon, gliserolfosfat ve inorganik fosfat varlığında DPKH'lerin odontoblast-benzeri hücrelere farklılaşabildikleri ve alkalın fosfataz enzimi ifade edebildikleri gözlemlenmiştir. Bu farklılaşmaya kollajen matrisinin depolanması ve mineralizasyonu da eşlik etmektedir [48].

DPKH'ların, osteojenik ortamda başarılı bir biçimde osteojenik farklılaştığı gösterilmiştir. Ayrıca, DPKH'lerin farelere *in vivo* nakli ile osteosit içeren kemik dokusu oluşturulmuştur. Son kemik doku mühendisliği çalışmaları, DPKH'lerin üç boyutlu iskeleler ile bir kombinasyon halinde kullanılabilme potansiyelini göstermiştir [24].

Hematopoetik Kök Hücreler

Kemik iliğinde kök hücrelerin iki ana çeşidi bulunmaktadır: HKH ve MKH. Yetişkin kemik iliği kökenli HKH'ler eritrosit, trombosit ve beyaz kan hücreleri de dahil olmak üzere tüm kan hücreleri için prekürsor olarak kabul edilmektedir. Buna ek olarak, HKH'ler fibrosit ve endotelial prekürsor hücrelerine de dönüşmektedir. Olgun kırmızı kan hücreleri ve onların progenitörleri hariç, hematopoetik hücrelerin ortak özellikleri CD45 yüzey belirtecini ifade etmeleridir. HKH kendini yenileme kapasitesi ve pluripotensi ile karakterize edilmektedir. HKH'ler kemik iliği aspiratı ve kordon kanı ünitelerinden izole edilebilmektedir [49-51].

2.3. Mezenkimal Kök Hücreler (MKH)

MKH'ler, özellikle buldukları dokuları oluşturan hücrelere farklılaşabilme ve onlara has olan kendilerini yenileyebilme yeteneklerinden dolayı, hücre bazlı tedaviler için potansiyel hücre kaynağı olarak büyük heyecan ve umut vaat etmektedirler. Çocuklarda osteogenez imperfekta tedavisi uygulamaları, hematopoetik geri kazanım ve kemik doku rejenerasyonu stratejileri dahil olmak üzere hücresele terapötik stratejilerin birçok tipinde etkinlik gösteren MKH'ler kolaylıkla bir kök hücre kaynağı olarak kabul edilebilir. Daha da önemlisi, bu hücreler, hastaların kendilerinden doğrudan elde edilebilmekte, böylece allojenik dokunun immün reddi ile ilgili komplikasyonları ortadan kaldırmaktadırlar. Farklılaşmamış hücreler olarak karakterize edilen, mezodermal farklılaşma potansiyeline ve yüksek çoğalma kapasitesine sahip olma gibi özelliklerinden

dolayı birçok yetişkin dokuda bulunan MKH'ler klinik uygulamalarda doku hasarlarının rejenerasyonu için tercih edilen bir kök hücre kaynağı olmaktadır. Yetişkin dokularda bulunan MKH'ler bir kök hücre popülasyonunu temsil ederek izole edilebilmekte, kültürde çoğaltılabilmekte, *in vivo* ve *in vitro* olarak tanımlanabilmektedir. MKH'ler adiposit, osteosit ve kondrositlere kolayca farklılaşabilmekte, kültürde embriyonik veya hematopoetik hücreleri destekleyebilmektedirler. Ayrıca, endotel, nöral, düz kas, iskelet miyoblastları ve kardiyak miyosit hücrelerinin fenotipik özelliklerini ifade edebildiklerine dair çalışmalar bulunmaktadır [52, 53].

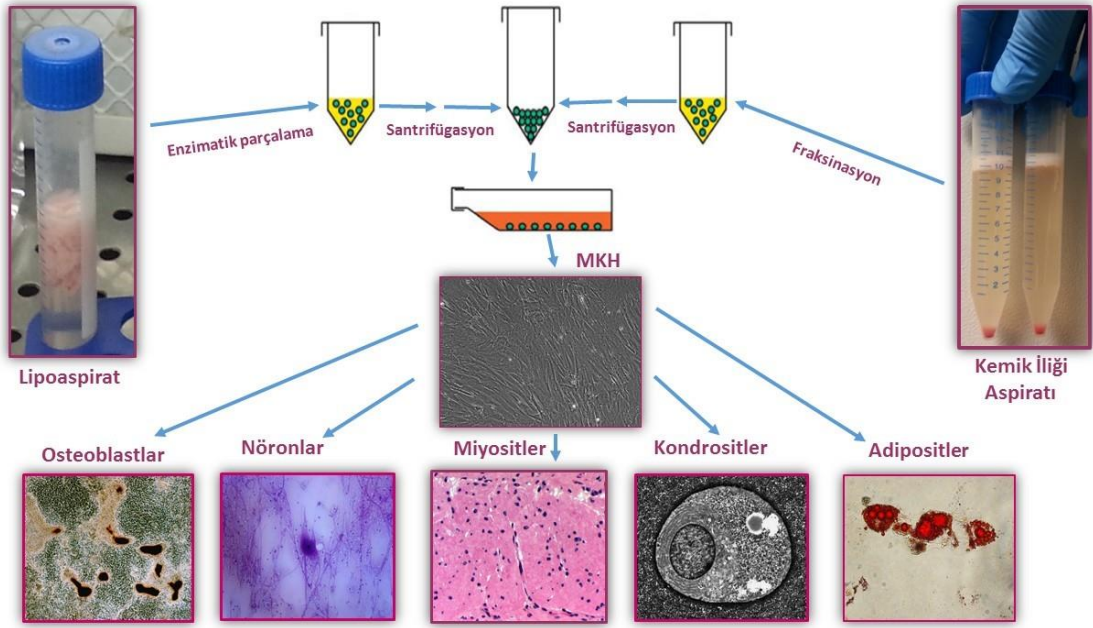
Rejeneratif tıp ve doku mühendisliğinde kullanılabilme potansiyelinden dolayı MKH'ler büyük ilgi uyandırmaktadır. Mezenkimal kök hücrelerin terapötik değerini gösteren hem klinik öncesi, hem de klinikte birçok çalışmalar bulunmaktadır. Kemik iliğinin toplam çekirdekli hücrelerinin küçük bir bölümünü temsil eden bu hücreler, standart hücre kültürü teknikleri kullanılarak kültüre edilebilir ve çoğaltılabilirler [54].

2.3.1. MKH İzolasyonu

MKH'in en büyük avantajı hastalardan doğrudan alınabilmeleri ve böylece allojenik dokulardan kaynaklanabilecek immün reddin ve enfeksiyonun ortadan kalkmasıdır. Ancak MKH'lerin tedavide kullanılabilmesi için hücrelerin belirli sayılarda çoğaltılması gerekmektedir [55]. MKH'ler genel olarak kemik iliğinden elde edilirler. İnsanda genellikle iliak kanattan alınan kemik iliği aspiratından elde edilirler. Ayrıca tibia ve femurlardan ya da torasik ve lumbal omurgadan da elde edilebilirler. Büyük hayvanlarda benzer bölgelerden alınırken, kemirgenlerde ise daha çok tibia ve femurlardan alınır. Toplam ilik hücreleri arasında oldukça düşük sayıda bulunmalarına karşın, standart hücre kültür teknikleri kullanılarak çoğaltılabilirler. Kemik iliğinden elde edilen çekirdekli hücrelerin, genç erişkin dönemde 1/10,000, erişkinde 1/250,000'i ve 80 yaşından sonra da 1/2,000,000'i ancak MKH'dir. Kemik iliğinin iliak kanattan aspirasyonu veya kemik iliği biyopsilerini takiben yoğunluk gradyan santrifüjlemesinden sonra kemik iliği mononükleer katmanından kemik iliği mezenkimal kök hücreler (KiMKH) elde edilir. Kemik iliği kök hücreleri yüzeye bağımlı olma özelliklerine göre, plastiğe yapışan mezenkimal kök hücreler ve yapışmayan hematopoetik kök hücreler olarak ikiye ayrılmaktadır. MKH'in bu özelliği kullanılarak FBS ve besi ortamı ile

hücre kültür flasklarında 48-72 saat 37°C sıcaklıkta, %5 CO₂ içeren inkübatörlerde inkübe edilirler. Bu süre sonunda süpernatant ve plastiğe yapışmayan hücreler uzaklaştırılır. Geriye kalan plastiğe yapışmış hücreler kültüre edilmeye devam edilir. Hücreler flask tabanının %75'ini kaplayınca tripsinizasyon yapılarak yapışan hücrelerin yüzeyden ayrılması sağlanır. Daha sonra hücreler flask yüzeylerine taze besi ortamları ile ekilir. Pasaj sonrası yeterli sayıda hücre elde edilir. Kullanıma hazır hale gelen hücreler daha sonra çalışılmak üzere dondurularak -80°C ile -196°C'de (sıvı azot) saklanır. Kemik iliğinin alınması için mevcut yöntemler, özellikle birkaç millitreden daha büyük hacimlerde donör için nispeten sakıncalı ve ağırlı olabilmektedir. Bu nedenle mezenkimal kök hücreler için alternatif kaynaklar aranmaktadır.

Adipoz doku da stromal vasküler fraksiyonda (SVF) multipotent MKH popülasyonu bulundurmaktadır. Adipoz kökenli kök hücreler dokudan liposakşın veya abdominoplastik yöntem ile elde edilebilmektedir. Hücre fraksiyonunu izole etmek için en sık kullanılan yöntem homojenizasyon, enzimatik parçalanma ve diferansiyel santrifügasyon, ardından hücrelerin SVF pelletinden ayrılmasını içermektedir. Kök hücre kaynağı olarak adipoz dokunun avantajlarından biri, hücre toplama sırasında minimal morbidite ile kolay erişilebilirliğidir. Ayrıca, büyük miktarlarda elde edilebilen adipoz doku, kemik iliği aspiratları ile kıyaslandığında daha çok sayıda kök hücre sağlamaktadır. Fibroblast benzeri koloniler için klonojenik deneyler sonucu çekirdekli hücrelerin %1-3'ünün AKH olduğu tespit edilmiştir, bu da kemik iliğinin 100-500 katı kadar yüksektir [56-58]. MKH'lerin kemik iliği ve adipoz dokudan izolasyonu şematik olarak Şekil 2.2'de gösterilmiştir.



Şekil 2.2. MKH izolasyonunun şematik gösterimi.

2.3.2. MKH Karakterizasyonu

Hücresel tedavilerde kullanılacak kök hücre özelliklerine yönelik kriterler şu şekildedir: 1. Plastiğe yapışma; 2. Standart farklılaşma koşullarında *in vitro* osteoblast, adiposit ve kondrositlere farklılaşma; 3. Kök hücre popülasyonunun $\geq\%95$ CD105, CD 73 ve CD90 yüzey belirteçlerini ifade etmesi ve $\leq\%2$ CD45, CD34, CD14 ya da CD11b, CD79 α ya da CD19 ve HLA class II ifade etmemesidir [59]. Bununla birlikte, hücreler bu kriterlere uygun olsalar dahi, sonuçlar yapay *in vitro* gözlemlere dayandıklarından dolayı yapılan birçok araştırma klinik uygulamalar için tamamen yararlı olamamıştır. Özellikle immünolojik belirteçler için yapılan *in vitro* kültür çalışmaları MKH'lerin immünofenotiplerinin bu kültürlerde yapay olarak değişmesi nedeniyle *in vivo* daki davranışlarını yansıtmada yetersiz kalmaktadır [60].

2.3.2.1. MKH Farklılaşması

MKH'nin multipotent özelliğini tanımlamak için bu hücrelerin *in vitro* ortamda en az üç farklı hücre serisine (genellikle adiposit, osteosit ve kondrosit) farklılaşmasının gösterilmesi gerekmektedir.

Osteojenik Farklılaşma

MKH'lerin osteojenik uyarımı için öncelikle hücrelerin kültür kabında neredeyse %70-80 yoğunluğa ulaşması beklenir. Osteojenik farklılaşmayı uyarmak için kullanılan klasik yöntem β -gliserolfosfat, askorbik asit ve deksametazon ile hücreleri ortalama 3-4 hafta kültüre etmektir. Bunlara ek olarak vitamin D3, TGF- β 3 ve BMP de kullanılabilir. Bu bileşenlerin bulunduğu tek tabaka kültürde hücreler, alkalın fosfataz (ALP) aktivitesinin regülasyonu ve kalsiyum açısından zengin mineralize hücre dışı matris depolamasıyla osteoblastik morfoloji göstermektedirler [54].

Sentetik glükokortikoid olan *deksametazonun* kök hücre farklılaşmasında transkripsiyon etkinliğini artırdığı düşünülmektedir. Ayrıca deksametazon RunX2 bağımlı genin ifadesinin artırılmasında rol oynayarak osteojenik farklılaşmayı uyarır. Ancak deksametazonun yüksek dozları osteoblastik etkinliği baskılar ve glukokortikoide bağlı osteoporozu ortaya çıkartır. Deksametazonun kollajen sentezine negatif etkisi hücre çoğalmasını olumsuz yönde etkiler. Bu etki ortama askorbik asit eklenmesi ile ortadan kaldırılır [61, 62]. Walsh ve ark. [63] MKH'leri deksametazonun 10 pM - 1 μ M arasındaki dozlarında inkübe etmiş ve kritik derişimin 10 nM olduğunu belirlemişlerdir.

Askorbik asit veya C vitamini kollajen sentezinde kofaktör olarak görev yapar, hücre döngüsü ve mitoz ile ilişkili genlerin ifadesini artırır. Askorbik asitin dezavantajı kültür ortamlarında hızlıca bozunarak sabit düzeyde tutulamamasıdır. Bu nedenle kültür koşullarında daha uzun süre etki gösterebilen askorbik asit 2-fosfat kullanımı tercih edilir. Askorbik asitin kullanım dozu 50-500 μ M arasındadır [64].

Kalsiyum ve fosfat iyonları hücreler arası matrisin mineralizasyonu için oldukça önemlidir. Enzimatik olarak alkalın fosfataz (ALP) tarafından hidrolize edilen *β -gliserofosfat* inorganik fosfat kaynağı olarak görev yapar. Ayrıca β -gliserofosfat matris minerallerinin yapımında, laktat oluşumunda, ALP etkinliğinde, protein ve fosfolipid sentezinin artmasında önemli rol oynar ve böylece osteojenik farklılaşmayı uyarır. *In vitro* osteojenik farklılaşma için kullanılan β -gliserofosfat dozu 5-10 mM arasındadır [65].

MKH'ler osteoblastlara farklılaşırken fibroblast benzeri yapılardan kübik şekle dönüşürler ve hücreler arası matris elemanlarından özellikle tip I kollajeni sentezlerler. Daha sonra çöküntü ve nodüller oluşturarak kemikleşmenin başlangıcını ortaya çıkarırlar. Osteojenik farklılaşma Alizarin kırmızısı ve von Kossa boyama yöntemleri ile gösterilebilir. Artan ALP'ye bağlı olarak kalsiyum birikimleri de ortaya çıkar. ALP'nin enzim etkinliği ve kalsiyum artışı kolorimetrik analizler ile ölçülebilir [62]. Osteojenik farklılaşma sırasında kemiğe ilişkin genlerin ifadesi artmaktadır. Bunların başında osteorix (Osx), kollajen tip I α -1 (KOL-I α -1), osteokalsin (OCN) ve kemik sialoprotein (BSP) gelir. Genellikle TGF β 1, RunX2, ALP, KOL-I α -1 ve BMP2 osteoblastik farklılaşmanın erken belirteçleri olarak kabul edilirken, osteonektin (ON) ve osteopontin (OPN) daha ileri süreçlerde ifade edilir [66].

Adipojenik Farklılaşma

Adipojenik farklılaşmayı etkinleştirmek için MKH'ler deksametazon, izobutilmetilksantin (IBMX), insülin ve indometazin ile kültüre edilmelidir. Bunlara ek olarak tiroid hormonu olan T3, askorbik asit-2-fosfat ve bazik FGF de kullanılabilir.

IBMX varlığında MKH'ler büyük lipid vakuelleri oluşturan adiposit haline gelmektedirler. MKH'lerin adipojenik farklılaşması, nükleer reseptör, transkripsiyon faktörü, peroksitom çoğaltıcı ve aktive edici reseptör (PPAR- γ) ve yağlı asit sintetazı tarafından indüklenmektedir [67].

MKH'nin adipojenik uyarımı için öncelikle hücrelerin kültür kabında neredeyse tam yoğunluğa ulaşması gerekir. MKH yağ hücresine dönüşürken fibroblastik formunu kaybederek küreselleşir ve büyümeye başlar. Sitoplazmada yağ damlacıkları ortaya çıkar, fibronektin, laminin ve kollajen tip I, III, IV, V ve VI gibi hücre dışı matris proteinlerinin sentezi gerçekleşir [68].

Adipojenik farklılaşmayı göstermek için ışık mikroskobu ile görüntülemek üzere Oil Red O boyaması yapılır.

Kondrojenik Farklılaşma

Kondrojenik farklılaşma, üç boyutlu kültürde (pelet), deksametazon, askorbik asit ve TGF- β süper ailesinin bir üyesinin bulunduğu bir ortamda etkinleşmektedir. Hücreler bu ortamla muamele edildiğinde hızlıca fibroblastik morfolojilerini kaybetmekte, küresel biçime dönüşmekte ve kırıkdağa özel bir sıra hücre dışı matris bileşenlerini ifade etmeye başlamaktadır. Bu, glikozaminoglikanların hızlı sentezini ve hücre morfolojisinde büyük değişiklikleri içermektedir. Hücreler kollajen tip II'nin oluşturduğu ağısı ve bol miktarda matris ile çevrelenir. Bu oluşumlar Alcian mavisi, Toluidin mavisi ve Safranin O gibi histokimyasal boyalar ile gösterilir. Ayrıca, kondrojenezin erken döneminde kondroitin sülfat sülfasyonunun düzeninde değişiklikler gözlemlenmektedir. Erken kültürde 4- ve 6-sülfatlı türlerin oranı neredeyse eşitken, 8 gün sonra kondroitin-6-sülfat oranı dört kat yüksek olmaktadır. TGF- β 1, TGF- β 2 ve TGF- β 3 bu süreçleri indüklemeye yeteneğine sahiptirler, ancak kondrojenezin etkinleştirmesinde TGF- β 2 ve TGF- β 3, TGF- β 1'den daha etkilidir. Bu etki izoformların kemikteki miktarı, kırık kallus oluşumu ve yara iyileştirmedeki rolleri ile ilgili olabilmektedir. Farklılaşma sırasında TGF- β 3 varlığında MKH'ler agregan, link protein, fibromodulin, kırıkdağ oligomerik matris proteini, dekorinin, tip II kollajen ve kondroaderin, yani normal eklem kırıkdağ matrisinin tüm bileşenlerini sentezlemektedir [69].

2.3.2.2. MKH Yüzey Belirteçleri

Kök hücreler, belirli bir doku içinde genellikle çok düşük bir konsantrasyonda bulunmaktadır. Onları diğer hücre popülasyonlarından ayırt etmek için her hücre tipine göre farklı olan yüzey belirteçlerinden yararlanılmaktadır [70].

Fenotipik olarak MKH'ler bir dizi yüzey belirteçlerini ifade etmektedir. Ancak bunların hiçbiri onlara özgü değildir. Genellikle, yetişkin insan MKH'leri hematopoetik yüzey belirteçleri olan CD45, CD34, CD14 ve CD11 ifade etmemektedirler. Aynı zamanda, eş uyarıcı moleküller olan CD80, CD86, CD40 ve yapışma molekülleri olan CD31 (platelet/endotel hücre yapışma molekülü [PECAM] -1), CD18 (lökosit fonksiyonu ile ilişkili antijen-1 [LFA-1]) ya da CD56 (nöronal hücre yapışma molekülü-1) da ifade etmemektedirler. Ancak, CD105 (SH2), CD73 (SH3/4) , CD44, CD90 (Thy-1), CD71 ve Stro-1, ve yapışma molekülleri olan CD106 (vasküler hücre yapışma molekülü [VCAM]-1), CD166

(aktif lökosit hücre yapışma molekülü [ALCAM]), hücreler arası yapışma molekülü (ICAM)-1, ve CD29 ifade edebilmektedirler. Diğer canlı türlerinden elde edilen MKH'ler, insan hücrelerinde bulunan yüzey belirteçlerinin aynısını her zaman ifade etmemektedirler. Örneğin, insan ve sıçan MKH'leri üzerinde CD34 ifadesi gözlemlenirken, bazı kaynaklarda kemirgen hücreleri üzerinde değişken CD34 ifadesi olduğu belirtilmiştir. Genel olarak, bütün MKH'lerin hematopoetik belirteç CD45 ve endotel hücre belirteci CD31'den yoksun oldukları kabul edilmiştir. Doku kaynağı, izolasyon ve kültivasyon yöntemlerinin farklılıkları ve elde edildikleri türlerin çeşitliliğinden kaynaklı olarak birçok yüzey belirtecinin değişken ifadesi gözlemlenmektedir. Örneğin, insan adipoz dokusu, işlenmiş lipoaspirat (PLA) hücreleri adı verilen multipotent kök hücre kaynağıdır ve kemik iliği MKH'leri gibi *in vitro* olarak birçok farklı hücre hattına farklılaşabilmektedirler. Ancak, belirli belirteçlerin ifadesinde bazı farklılıklar mevcuttur: CD49d, PLA hücreleri yüzeyinde ifade edilirken MKH'lerde yoktur. Kanda bulunan mezenkimal öncü hücreler (BMPCs) kemik iliği MKH'leri ile benzer belirteçleri ifade etmekte ve aynı şekilde osteoblast ve adipositlere farklılaşabilmektedirler. Kanda dolaşan mezenkimal öncü olan ve dokulara göç edebilen bu hücreler, fibrositlerden ayrı bir populasyon olarak görülmektedirler. Fibrositler CD45 ve CD34 ifade etmekte ve miyoblastlara farklılaşabilmektedirler, oysa kan kökenli mezenkimal öncü hücreleri CD34 negatif olarak görülmüşlerdir [33].

Stro-1'in non-hematopoetik progenitör insan kemik iliği hücreleri antikoru olduğu tespit edilmiştir. SB-10 antikorunun da farklılaşmamış MKH'leri ile ilgili bir antijenle reaktif olduğu gösterilmiştir. Bu antijen, hücrelerin osteojenik farklılaşma yoluna girmesi ve ALP'nin ifadesi ile kaybolmaktadır. SB-10 antijeni, CD166 (aktif lökosit-hücre yapışma molekülü - ALCAM) olarak tanımlanmış ve tam mekanizması belli olmasa da, osteojenik farklılaşmanın ilerlemesinde rol oynadığı düşünülmektedir. SH-2 antikoru, TGF- β endoglin reseptörü (CD105) üzerindeki bir epitop ile reaksiyona girmektedir. Baskın olarak endotel hücreleri ile ilişkili olmasına rağmen CD105 insan MKH'leri için immünomanyetik seçme yönteminde kullanılmıştır. SH-3 ve SH-4 antikorumları membrana bağlı ekto-5a-nükleotidazın üzerinde bulunan farklı epitopları tanımaktadırlar. SH-2 gibi bu antikorumlar da hematopoetik hücreler ve osteositlerle reaksiyona girmemektedirler [54]. Majumdar ve ark. [71] MKH'lerin, hücre-hücre bağlanmasında ve hücre-ECM etkileşimlerinde önemli

potansiyeli olan hücre yapışma moleküllerini büyük bir spektrumda ifade ettiklerini tespit etmiştir. MKH'ler yüksek oranda $\alpha 1$, $\alpha 5$, $\beta 1$, düşük oranda $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 6$, αV , $\beta 2$, $\beta 4$ ifade etmekte ve αL , $\alpha 4$, $\beta 2$ integrinlerini ifade etmemektedirler. İnsan MKH'leri HLA-ABC ifade etmekte ve HLA-DR ifade etmemekte, ancak HLA-DR interferon- γ ile muamele sonrası aktif hale gelmektedir. Bogenrieder ve Herlyn'in [72] çalışmalarında MKH'ler integrin ifadelerinin hasarlı bölgelerle etkileşebileceğini ve özelleşmiş matris moleküllerini bağlamada rol oynayabileceğini belirtmişlerdir.

Yeni izole edilmiş SVF (stromal vasküler fraksiyon) AKH (CD31⁻, CD34^{+/-}, CD45⁻, CD90⁺, CD105⁻, CD146⁻), endotel (progenitör) hücreleri (CD31⁺, CD34⁺, CD45⁻, CD90⁺, CD105⁻, CD146⁺), vasküler düz kas hücreleri veya perisitler (CD31⁻, CD34^{+/-}, CD45⁻, CD90⁺, CD105⁻, CD146⁺), ve hematopoetik hücrelerde (CD45⁺) bulunan heterojenik hücre populasyonu içermektedir. İlerleyen pasajlardaki AKH'ler ile karşılaştırıldığında, yeni izole edilmiş SVF hücreleri ve erken pasaj AKH'ler yüksek seviyede CD117 (c-kit), insan lökosit antijeni-DR (HLA-DR) ve CD34 gibi kök hücre ile bağlantılı belirteçleri, daha düşük seviyede CD73, CD90, CD105, CD166, CD13, CD44, CD63, CD29 ($\beta 1$ integrin) ve stromal hücre belirteçleri ifade etmektedir. AKH'in ilerleyen pasajlarında CD34 ifadesinin düşüşü tam olarak bilinmese de, CD34 ifadesinin kültürde 20 hafta boyunca muhaza edilebildiğine dair çalışmalar bulunmaktadır. Üstelik, yapılan çalışmalar CD34⁺ AKH'in daha yüksek çoğalma kapasitesine sahipken, CD34⁻ AKH'lerin yapışma özelliklerinin daha iyi olduğunu göstermiştir. AKH'lerin, KiMKH ve perisitlerle birçok ortak yüzey belirteçleri bulunmaktadır. AKH tarafından ifade edilen perisit belirteçleri, düz kas β -aktin, trombosit türevli büyüme faktörü (PDGF), reseptör- β ve reseptör-b ve nöro-gliyal proteoglikan 2 iken, AKH ve KiMKH'in ortak belirteçleri ise CD13, CD29, CD44, CD58 ve CD166 olarak belirlenmiştir [73].

Yapılan bir çalışmada AKH, KiMKH ve UCB-kökenli MKH'lerin ifade ettikleri yüzey belirteçleri karşılaştırılmıştır. Bütün hücreler, endoglin reseptörü olan CD105, hücre dışı matris proteini CD90, yüzey enzimi ekto-59-nükleotidaz CD73, aktive lökosit hücre yapışma molekülü CD166, β -integrin CD29 ve hiyalüronat reseptörü CD44 ifade etmiştir. Hematopoetik hücre kontaminasyonu gözlemlenmemiş ve akış sitometrisi analizinde lipopolisakarid reseptörü CD14, lökosit ortak antijeni CD45 ve endotel hücre belirteci CD31 gibi hematopoetik belirteçler negatif sonuç

vermiştir. Hematopoetik progenitör hücre belirteci olan CD34 ifadesi yüzdeleri farklılık göstermiştir: KiMKH %2.16±2.48, UCB-kökenli MKH %10.52±10.58, AKH %10.37±8.37. Akış sitometrisi analizi CD117 (c-kit) belirtecinin değerlendirme için karmaşık bir belirteç olduğunu göstermiştir. AKH %98.11±3.06 tam pozitif, KiMKH ve UCB-kökenli MKH pozitif-negatif arası boyama göstermiştir [74].

MKH'nin en önemli avantajı bu hücrelerin hipo-immünojenik olmaları ve hastanın immün sisteminden kaçabilmesidir. Bu da MKH'leri bağışıklık sistemi reddi riski taşıyan allojenik transplantasyon için uygun hale getirmiştir. MKH'ler önemli doku uygunluk kompleksi olan MHC sınıf I moleküllerini düşük oranda ifade etmekte (en düşük fetal, yetişkinlerde daha fazla), MHC sınıf II moleküllerini ise hücre yüzeylerinde ifade etmemektedir. Ayrıca farklılaşma sonrası da MKH'ler non-immünojenik kalmaya devam etmektedirler [22].

2.3.3. MKH Kaynakları

Günümüzde kök hücrelerin vücudumuzdaki farklı dokularda bulunduğu bilinmektedir. Farklı kaynaklardan elde edilen MKH'ler birçok biyolojik özellikleri paylaşmakta, fakat bazı farklılıklar barındırmaktadırlar. MKH kaynağı kemik iliği, adipoz doku, saç folikülleri (kökleri) ve subkutan kafa dokusu gibi yetişkin dokular, periodontal ligament, timus ve dalak, plasenta, göbek kordon kanı, fetal kemik iliği gibi doğum öncesi dokular, kan, akciğer ve karaciğerdir. Hematopoetik hücreler gibi MKH'ler de periferik kanda bulunmaktadır. Kemik iliği doku homeostazında yer alan mezenkimal kaynak görevi görmektedir ve MKH'lerin sirkülasyonunu da desteklemektedir [75].

Kern ve ark. [7] kemik iliği, adipoz doku ve göbek kordonundan MKH izolasyonu gerçekleştirmiş ve bu hücrelerin morfolojisini, izolasyon başarı oranını, koloni frekansını, büyüme potansiyelini, çoklu farklılaşma kapasitelerini ve immün fenotiplerini karşılaştırmıştır. Bu kaynaklardan elde edilen MKH'lerin morfoloji ve immün fenotipleri ile ilgili anlamlı farklılıklar gözlenmemiştir. Kemik iliği ve adipoz doku kökenli MKH'lerde izolasyon başarı oranı %100 iken, kordon kanı kökenli MKH'lerde %63 olarak görülmüştür. En yüksek koloni frekansı AKH'lerde, en düşük ise kordon kanı MKH'lerde olmuştur. Ancak, kordon kanı MKH'leri daha uzun kültüre edilme ve yüksek çoğalma kapasitesine sahipken, KiMKH'leri en düşük kültüre edilme ve çoğalma kapasitesi göstermiştir. Kemik iliği ve adipoz

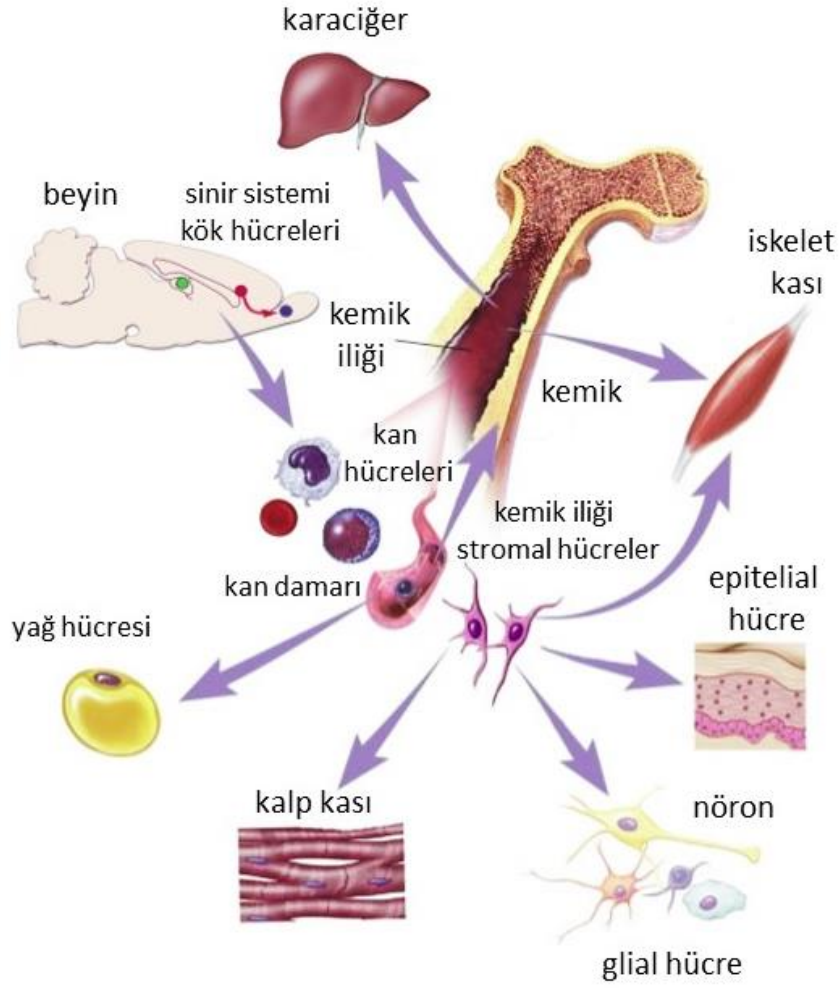
kökenli MKH'lerin aksine kordon kanı MKH'leri adipojenik farklılaşma kapasitesi göstermemiş, ancak hepsi osteojenik ve kondrojenik farklılaşma göstermiştir [7] Farklılaşma potansiyelleri *in vivo* deneyler kullanılarak dental pulpadan izole edilmiş MKH'lerin, KiMKH'leri ile aynı koşullarda büyütülüp nakledildiklerinde, kemikten çok, dentine farklılaşma eğilimi olduğu gösterilmiştir [76].

Stanko ve ark. [77] tarafından yapılan çalışmada kemik iliği, adipoz doku, dental pulpa ve kordon kanı kökenli MKH'ler karşılaştırılmıştır. Bu dokulardan izole edilmiş MKH'lerin gen ekspresyonunda farklılık gözlemlenmemiştir. Dental pulpa MKH'de ise KiMKH'ne oranla E-kaderin, GSC, Sox2 gibi genlerin ifadesi yüksek, Sox17, Oct3/4 ise düşük olarak görülmüştür. İlginç bir şekilde, kemik iliği ve adipoz kökenli MKH'lerde pasaj ilerlemesi ile osteojenik farklılaşma potansiyelleri düşüş gösterirken, dental pulpa MKH'lerde artış görülmüştür.

2.3.3.1. Kemik İliği Mezenkimal Kök Hücreleri

Kemik iliği stromal hücreleri yaşam boyu kemik döngüsünden sorumludur. Kemik iliği yüksek çoğalma yeteneği ve farklılaşma kapasitesine sahip olan MKH kaynağı olarak en çok kullanılan doku olarak kabul edilmiştir (Şekil 2.3.).

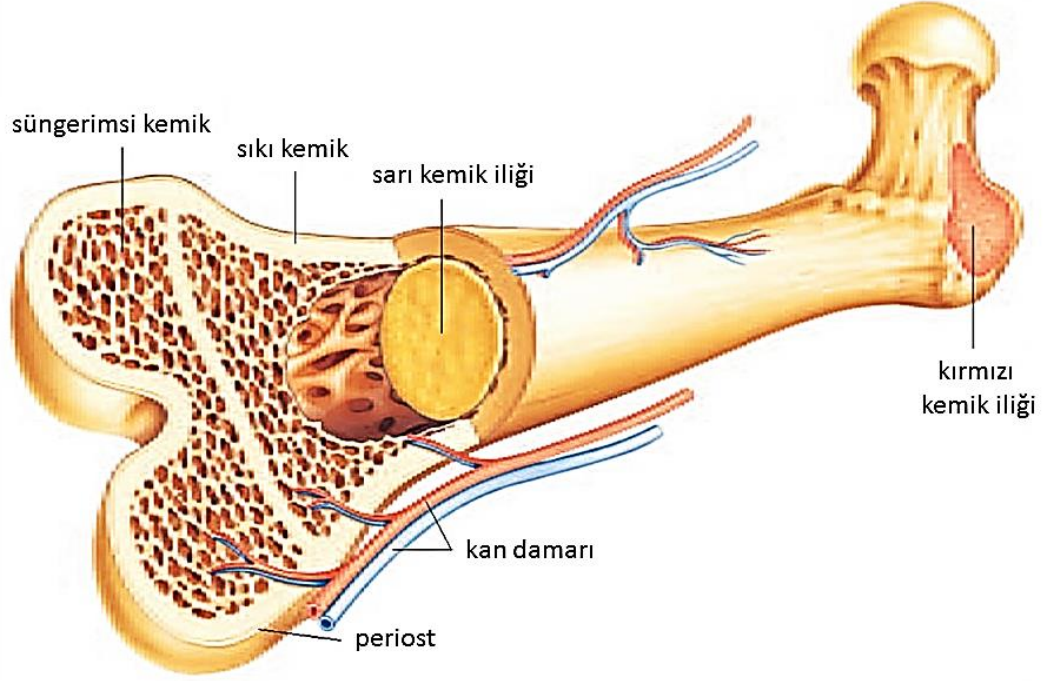
Ayrıca, nispeten basit olan aspirasyon prosedürü kullanılmaya başladıktan sonra kemik iliği erişilebilen bir osteojenik hücre kaynağı olmuştur. Üstelik, bu yöntem kalvarium, periost ya da trabeküler kemikten biyopsi ile osteojenik hücre alınması ile karşılaştırıldığında daha az invazivdir [78].



Şekil 2.3. Kemik iliği MKH'lerin birçok farklı hücre hattına farklılaşma potansiyeli.

Kemik iliği, önemli rejeneratif fonksiyonları gerçekleştiren vücuttaki birçok kemiğin merkezi boşluğunda bulunan süngerimsi bir dokudur. Kemik iliğinin iki türü vardır: kırmızı ilik ve sarı ilik. Kırmızı iliğin hematopoetik dokusunda hemotopoez yani kan hücrelerinin üretilmesi gerçekleşmektedir. Kemik iliğın stroması sarı ilik içermekte ve hemotopoez ile ilgili olmayan bütün dokulardan oluşmaktadır. Bu dokular kan damarları olan sinusoidler, adipositler, osteoblastlar ve fibroblastları içermektedir [70]. Kemik iliği şematik olarak Şekil 2.4'te gösterilmiştir.

Kemik iliği hücrelerinin %0.01'ini çekirdekli hücreler oluşturmaktadır. Bu miktarın %0.001'ini ise kemik iliği mezenkimal kök hücreleri oluşturmakta, bu da kemik iliğinin HKH'lerden 10 kat daha az miktarda KIMKH içerdiğini göstermektedir [49]. Kemik iliğinin iki ayrı kök hücre sistemi içerdiği kabul edilmiştir: CD45⁺ HKH ve CD45⁻ MKH. HKH'ler CD45 gibi CD34, CD133, CD117 yüzey belirteçlerini ifade etmektedirler.



Şekil 2.4. Kemik iliğinin şematik gösterimi.

MKH'ler kemik iliği stromasında bulunan daha karmaşık hücrelerdir. Ayrıca adipoz dokudan, göbek kordon kanında, farelerde hatta karaciğer, akciğer ve böbreklerde de bulunmaktadır. MKH'ler fibroblast benzeri morfoloji ile karakterize edilmekte ve STRO-1, CD90 ve CD106 gibi belirteçleri ifade etmekte, ancak CD34, CD45 ve CD133 belirteçlerini ifade etmemektedirler. Yapılan ilk çalışmalarda MKH'lerin saf osteojenik oldukları düşünülmekte olmasına rağmen daha sonra onların osteoblast, adiposit ve kondrosit gibi bağ dokusu hücrelerine farklılaşabildikleri gösterilmiştir [70].

Kemik iliği, multipotent MKH'ler için ana kaynak olsa da kemik iliğinden bu hücrelerin elde edilmesi invaziv bir işlemdir ve elde edilen MKH'lerin miktarı, farklılaşma potansiyelleri ve maksimum yaşam süreleri donörün yaşı arttıkça düşmektedir. Bu nedenlerden dolayı MKH izolasyonu için alternatif kaynaklar aranmaktadır [7].

Kemik iliği stromasının kültürleri %0.01'den daha az oranda MKH içerdiklerinden dolayı kültürlerde sıfırıncı ve üçüncü pasajlar arasında heterojen olan hücreler ileri pasajlarda saflaşır ve ancak bu aşamada tanımlanırlar. Bu süreç kültür ortamında bulunan istenmeyen hücrelerin uzaklaşması için gerekli olan süredir [38].

KiMKH'leri birçok hastalığı tedavi etmek için güçlü bir aday olarak kabul edilmektedir. Öncül klinik çalışmalar, KiMKH nörolojik bozukluklar üzerine yararlı etkileri olduğunu göstermiştir. KiMKH sinirin yeniden oluşumunu kolaylaştırmakta, diyabetik nöropati ve multipl sklerozu iyileştirmekte, felç sonrası fonksiyonel iyileşmeye yardımcı olduğu düşünülmektedir [79].

Kemik iliği aspiratları tarafından üretilen hücre kolonilerinin sayısı kemik iliğinde MKH sıklığını belirlemek için kullanılabilir. Birçok çalışmada bu koloni oluşturan fibroblast birimi (CFU-F) *in vivo* KiMKH frekansının yaşa bağlı değişikliğini test etmek için kullanılmıştır. Ayrıca çalışmalarda “genç” ve “yaşlı” KiMKH arasında immünofenotipler, proliferasyon, farklılaşma, bağışıklık-mödülyasyon kapasiteleri, gen ifadesi, göç ve yapışma potansiyelleri karşılaştırılmıştır. 2006 yılında Sethe ve ark. [80] bu çalışmaların çoğunu kapsayan ve elde edilen çelişkili sonuçları inceleyen ve yorumlayan bir çalışma yayınlamıştır. Sonuç olarak, çalışmaların çoğunda insan ve kemirgenlerde CFU-F sıklığında kemik iliğinin biyolojik yaşı ile bir düşüş olduğu bildirilmiştir. Daha sonraki çalışmalar da bu yorumlara katılmış ve bu durumun senesense olan yüksek duyarlılık ile ilgili olabileceğini ileri sürmüşlerdir.

Preklinik çalışmalar için hayvan modelleri geliştirilmiş ve bu amaçla KiMKH'leri sıçan, fare, kedi, köpek, babun, tavşan, domuz, keçi, koyun ve insan gibi birçok memeliden başarılı şekilde izole edilmiştir [81, 82].

2.3.3.2. Adipoz Kökenli Mezenkimal Kök Hücreler

Yağ doku son derece özelleşmiş bağ dokusudur. Memelilerde yağ doku üç farklı şekilde bulunmaktadır: beyaz yağ doku, kahverengi yağ doku ve kemik iliği yağ dokusu. Beyaz ve kahverengi yağ dokusu vücudu yalıtma ve yumuşak tutma görevini üstlenir ancak her ikisinin de farklı işlevleri vardır. Kahverengi yağ dokusu yüksek damarlanmadan dolayı rengini almış ve buna uygun olarak adlandırılmıştır. Kahverengi yağ dokusu vücutta ısı kaynağı olarak görev yapmaktadır. Yaşlanma süreci gerçekleşirken kahverengi yağ dokusu gitgide yerini beyaz yağ dokusuna bırakır. Bu dokunun esas işlevi, vücut için enerji kaynağı sağlamaktır. Yağ dokusunun primer hücre bileşeni adiposit olarak adlandırılan hücrelerdir. Olgun adipositler adipoz dokunun hücre popülasyonunun sadece %40-60'ını oluşturmaktadır. Olgun adipositlerin sitoplazması yaklaşık %90 lipid içermektedir.

Adipoz dokuda bulunan diğler hücre bileşenleri stromal-vasküler hücreleri olan yumuşak kas hücreleri, endotel hücreler, fibroblastlar, kan hücreleri ve preadipositlerdir. İskelet kası ve kemik iliğı gibi diğler hücre kaynakları ile karşılaştırıldığında adipoz kökenli kök hücrelerin elde edilmesi daha az invaziv ve daha az zaman alan bir işlemdir [8, 83, 84].

Adipoz dokudan kollajenaz parçalanması ile izole edilen plastiğeye uyumlu hücre popülasyonunu tanımlamak için çeşitli isimler kullanılmış ve bu farklı isimlerin kullanımı literatürde önemli kargaşaya yol açmıştır. Uluslararası Yağ Doku Uygulaması Teknolojileri Derneğı bu sorunu gidermek için izole edilmiş, plastiğeye uyumlu multipotent hücre popülasyonunu tanımlamak için “adipoz-kökenli kök hücre” (AKH) terimini kabul etmiştir [85].

AKH'ler terapötik uygulamalar için umut vaat eden, multipotent özellikte ve adipoz dokunun parçalanması sonucu izole edilen mezenkimal kök hücre popülasyonudur. Parçalanma sonucu eritrosit, lökosit, endotel ve mezenkimal gibi heterojen hücreler içeren stromal vasküler fraksiyon (SVF) oluşmaktadır. Farklı çalışmalarda SVF hücrelerinin CD34⁺ ifadesinin %80'den %3.5'a kadar değıştiğı belirtilmiştir [86, 87].

2.3.4. MKH Kullanımı

Tedavi edilmesi zor hastalıklar olan dejeneratif ve ilerleyici hastalıklarda MKH kullanımı sık sık gündeme gelmektedir. Hücresel tedavilerde otojenik yada allojenik kök hücrelerin lokal yada sistemik olarak uygulanması söz konusudur. MKH'in çeşitli alanlarda tedavi uygulamaları bulunmaktadır (Şekil 2.5). Bu uygulama alanları içerisinde kardiovasküler sistem hastalıkları, miyokart infarktı, periferik arter hastalıkları, akciğler fibrozisi, spinal kord yaralanmaları, dermatolojik hastalıklar, kas iskelet sistemi ve periferik sinir hastalıkları en yaygın olanlarıdır [88].

MKH'lerin osteosit öncü hücreleri olduğı bilinmektedir. Bu özelliğı ile MKH osteogenez imperfekta ve fibröz displazi gibi iskelet hastalıkları tedavisinde kullanılmaya uygun görülmüştür. Klinik öncesi çalışmalarda, hayvan modellerine nakledilen MKH'lerin alıcı kemik ve kaslara entegre olduğı gözlenmiştir.



Şekil 2.5. MKH'lerin kullanım alanları.

Hastalara saflaştırılmış allojenik MKH'ler enjekte edilmiş, hücreler hasta kemiğine entegre olmuş ve burada osteoblastlara çoğalarak total kemik mineral yoğunluğunun artmasını sağlamıştır [89]. Enfeksiyon, tümör, travma, yetersiz kan dolaşımı veya post-enfeksiyon sonucu ortaya çıkan büyük kemik hasarları oldukça önemli problemlerdendir. Bu gibi durumlarda, MKH'in kemik hasarlarının tedavisinde kullanımı önerilmektedir. Granero-Molto [90] tarafından yapılmış fare modelinde sistematik uygulama sonrasında KiMKH'lerin rejenerasyonu başlatmak üzere kırık bölgesine doğru hareket ettiklerini göstermiştir. Ayrıca, bu hücrelerin kırık bölgesinde doku iyileşmesini uyardığı, lokal ve sistemik inflamasyon miktarının azalmasına aktif olarak katkıda bulunduğu görülmüştür. MKH'lerin kırık bölgesinde kemik hücrelerine farklılaştığı ve parakrin faktörler yardımıyla angiogenezi uyardığı gözlemlenmiştir [91].

Gonçalves [92] MKH'in distrofin eksikliğini tamamlayabildiğini, Nemeth ve ark. [93] ise MKH'in makrofaj aktivitesinin modülasyonu ile model hayvanlarının sağkalım oranını arttırdığını belirtmiştir. Bu nedenlerden dolayı, bu hücrelerin Duchenne müsküler distrofi (DMD) için terapötik uygulamada kullanılabileceği öngörülmüştür.

Kıkırdak rejenerasyonu ve doku mühendisliğinde de MKH kullanımı yüksek potansiyel göstermiş ve başarılı olmuştur. Kıkırdak hasarlarının onarımında MKH'lerin kullanıldığı cerrahi stratejilerden biri subkondral kemiğin mikro kırık oluşturma yöntemidir. Bu teknik, MKH da dahil olmak üzere kemik iliği elemanlarının yara bölgesine göçünü sağlamaktadır. Sonuç olarak, yara dokusu olsa bile gelişmiş onarım yanıtı oluşturulmaktadır. Aynı zamanda MKH'ler hücrel tedavilerde doğrudan farklılaşmamış veya *in vitro* kıkırdağa farklılaşmış şekilde (taşıyıcı matrisle ya da matrissiz) ortak alana enjeksiyon yolu ile kullanılmaktadır. Kemik ve kıkırdak dokularının onarımının yanı sıra MKH'ler tendon, ligament gibi diğer kas-iskelet dokularının onarımında da kullanılabilir.

Birçok MKH naklinin belirgin malin (kötü huylu) transformasyon oluşturmamasına rağmen aksini düşündüren kanıtlar da olmuştur. Rubio ve ark. [94] standart kısa süreli (6-8 hafta) *in vitro* kültürlerin güvenli görüldüğünü, ancak uzun dönemli kültürlerde (4-5 ay) MKH'lerin spontan transformasyona uğrayabildiklerini işaret etmişlerdir. MKH'lerin bağışıklık sistemini baskılama yeteneği bu hücreleri kanser gibi hastalıkların tedavisinde kullanıma yöneltmektedir. Murin melanoma tümör modeli kullanılarak MKH hattı (C3H10T1/2) ve B16 melanoma hücrelerinin deri altı ko-transplantasyonunun MKH'lerin B16 hücrelerinin büyümesini desteklediği gözlemlenmiştir. Ancak, tümörü teşvik edici bu etki sıçan MKH hattı (MPC1cE) ile sıçan kolon karsinoma hücrelerinin jelatin matrislerinde ko-kültürü sırasında görülmemiştir. Böylece, MKH'in tümör hücrelerinin büyümesini önleyici etkisi gözlemlenmiştir [22].

Klinik kullanım için MKH'leri oldukça önemli kılan 4 özellik bulunmaktadır: 1. doku yaralanması sonrasında damar (intravenöz) içine enjekte edildiğinde inflamasyon bölgesini bulma yeteneği; 2. çeşitli hücre tiplerine farklılaşma potansiyeli; 3. inflamasyonu inhibe eden ve yaralı hücrelerin kurtarılmasını uyarabilen birçok biyolojik aktif molekülü salgılama yeteneği; 4. immünojenite eksikliği ve immünomodulator fonksiyonlarını gerçekleştirme yeteneği [95].

Gen Tedavisi

Gen tedavisi, en genel tanımıyla, hücrenel bir işlevi değiştirmek amacıyla genetik bilgiyi taşıyan nükleik asitlerin (DNA veya RNA) hücrelere aktarımıdır. Doku mühendisliğinde hücrelerin çoğalmasını, farklılaşmasını ve matris sentezini uyararak, ayrıca dokuda meydana gelen bazı katabolik süreçlerin ve inflamasyonun durdurulmasına yönelik biyosinyal moleküllerin kültür ortamına eklenmesi gerekmektedir. Yapılan çalışmalar, biyosinyal moleküllerin rekombinant moleküller halinde kültür ortamına verilmesi yerine, hücrelere gen terapi yöntemiyle aktarılmasının yumuşak doku yenilenmesi, kemik oluşumu, kırık ve kemik iyileşmesi gibi rejeneratif süreçlerin gerçekleşmesi için daha etkili olduğunu göstermektedir [96].

Genellikle gen tedavisinde kullanılan iki strateji vardır: viral transdüksiyon ve nonviral transfeksiyon ve her iki strateji *in vivo* ve *ex vivo* gerçekleştirilebilir. Kemik ve kırık dokusu mühendisliğinde en çok uygulanan gen terapi örneği MKH'lerin BMP genleri ile transdüksiyon/transfeksiyonudur. BMP'ler MKH'lerin osteojenik farklılaşma regülasyonu ve kemik oluşumu sırasında kemik matrisi üretiminde önemli rol oynamaktadır. Büyüme faktörlerinin kısa yarılanma sürelerinin üstesinden gelmek için MKH'ler *in vitro* ve *in vivo* sürekli protein ekspresyonu için BMP genleri ile transfekte edilir [51].

2.4. Kemik Doku Mühendisliğinde Doku İskeleleri

Kemik en yaygın nakledilen dokulardan biridir ve dünyada her yıl 2.2 milyon kemik grefti uygulanmaktadır [97]. Travma, tümör, deformite, dejenerasyon ve yaşlanan nüfus sadece cerrahinin ilerleyişine değil, aynı zamanda kemik implantlarının geliştirilmesine de neden olmuştur. Geleneksel gözenekli sentetik iskeleler metal, polimer, seramik ya da kompozit biyomalzemelerden yapılmakta ve tasarımlarında doğal hücrelerin ve doğal dokunun özellikleri dikkate alınmamaktadır. Bu nedenle, bu sentetik iskeleler genellikle onları çevreleyen hastanın doku ve hücreleri ile iyi entegre olamamakta, bu da mekanik uyumsuzluk, olumsuz cerrahi sonuçları ve diğer olumsuz özelliklere neden olmaktadır.

İdeal doku iskelesi, hücre dışı matrisi mümkün olduğu kadar taklit etmelidir. Doğal dokularda bulunan hücre dışı matris hücre yapışması, çoğalması ve farklılaşmasını desteklemektedir. Doku iskeleleri de hastanın hücreleri ile etkileşim

sırasında hücre ve doku davranışlarının düzenlenmesi ve kontrolü için avantajlı bağlanma noktaları oluşturmalı, uygun biyokimyasal ve nano/mikro-ölçekli yüzey topografilerine sahip olmalıdır [98]. Buna ek olarak, iskeleler aynı zamanda biyoyumlu olmalı, ev sahibi dokunun entegrasyonunu sağlamak için biyobozunur olmalı, doğal kemikte bulunan makro yapılara benzer yapılara sahip olmalı ve kemiğin çok boyutlu hiyerarşik yapısını taklit etmelidir. Fiziksel ve kimyasal olarak biyomimetik olmanın yanı sıra, ideal doku iskelesi zamansal ve mekaniksel olarak kontrollü bir şekilde biyoaktif molekülleri (örneğin, hücre dışı matris üretimi ve doku entegrasyonu için BMP, TGF- β ve diğerleri) veya ilaçları (örneğin, sepsis veya kanser rekürrensi gibi istenmeyen biyolojik yanıtı önlemek için antibiyotikler, sisplatin vs.) salım yeteneğine sahip olmalıdır.

Sonuç olarak sentetik kemik doku iskelesi: 1. Hasarlı bölgeye geçici mekanik destek sağlamalı, 2. Osteoid birikimi için bir substrat olarak işlev göstermeli, 3. Vaskülarizasyon ve kemik büyümesi için gözenekli bir mimarisi olmalı, 4. Kemik hücresinin iskele içine göçünü teşvik etmeli, 5. Osteojenik farklılaşmayı desteklemeli (osteoinduksiyon), 6. İskele-hasta doku entegrasyonuna yönelik hücrel aktiviteyi artırmalı (osteointegrasyon), 7. Kemik gelişimi için kontrollü bir şekilde bozunarak yük transferini kolaylaştırmalı, 8. Toksik olmayan bozunma ürünleri üretmeli, 9. Aktif kronik inflamatuvar yanıt teşvik etmemeli, 10. Biyoaktivitesini kaybetmeden sterillenebilmeli ve 11. İyileşmeyi hızlandırmak ve patolojiyi önlemek için kontrollü bir şekilde biyoaktif molekül veya ilaçları taşıyıp salabilmelidir [17, 97].

2.4.1. Biyomalzeme Seçimi ve Özellikleri

Kemik doku rejenerasyonu için güncel biyomalzemeler genel olarak organik ve inorganik malzemeler olarak sınıflandırılabilir. Bu malzemeler, hem doğal olarak elde edilmekte, hem de sentetik bileşenlerden oluşabilmektedir. β -trikalsiyum fosfat, hidroksiapatit (HAp) ve biyoaktif camlar gibi inorganik malzemeler, kemiğin kendi inorganik elementlerinin yapı ve bileşenlerine benzerliklerinden dolayı kemik doku mühendisliğinde uzun zamandır tercih edilmektedir. İnorganik biyomalzemelerin avantajları, osteokondüktif olmaları ve basınca karşı dayanıklılıklarıdır. Bu malzemelerin en önemli eksikliği ise kırılma doğaya sahip olmalarıdır.

İnorganik malzemelere alternatif olarak doğal olarak meydana gelen ya da kimyasal olarak sentezlenebilen organik polimerler gösterilebilir. Doğal kaynaklardan elde edilen biyopolimerlerden bazıları hiyalüronik asit, selüloz, ipek, aljinat ve kitosandır. Genel olarak, bu polimerler kendi yapıları içinde hücre yapışma ve göçünü sağlayan biyoyumluluk ile karakterize edilmektedirler. Doğal kaynaklı polimerlerin en önemli dezavantajları, işleme ve saflaştırma zorlukları ve immünojenite ile ilgili kaygılar yaratmalarıdır. Sentetik olarak elde edilen organik materyaller, organik ve inorganik bileşenler içeren kemik dokusunun mekanik özelliklerine sahip olabilmektedir [16]. Çizelge 2.2'de kemik doku mühendisliğinde biyomalzemelerin özellikleri daha ayrıntılı olarak açıklanmıştır.

Biyopolimerler

Biyobozunur polimerler kemik doku mühendisliğinde sıkça kullanılmaktadır. Bu polimerlerin en önemli avantajı vücut tarafından emilmeden önce fonksiyonel ömrü boyunca doku büyümesi ve biçimlenmesini desteklemesidir. Kollajen, kitosan ve hiyaluronik asit gibi doğal polimerler düşük immünojenik potansiyele sahiptir. Sentetik polimerler, kontrol edilebilen biyobozunma oranları, kolayca üretilebilme ve şekillendirilebilme gibi avantajlara sahiptir. Hem doğal, hem de sentetik polimerler biyobozunur olduklarından dolayı rejeneratif tıp için doku iskelesi olarak kullanılabilir [99].

Seramikler

Kemik doku mühendisliğinde seramiklerin doku iskelesi olarak öncelikli kullanım nedeni biyoyumluluktur. Kemiğin kompozit yapısını taklit etmek amacıyla, doğal ve sentetik polimerlerden üretilen doku iskeleleri, alümina, zirkonyum, kalsiyum fosfat ve biyocam gibi biyoseramiklerle bir arada kullanılmış ve doku iskelelerinin yapısına katılan biyoaktif seramiklerin doku iskelelerinin osteokondüktif özelliğini arttırdığı belirtilmiştir [100]. Birçok mevcut seramikten en sık kullanılanlar kalsiyumfosfat (CaP) grupları olan HAp ve trikalsiyum fosfat (TCP)'lardır. HAp ve TCP oktakalsiyum fosfat biyoaktif yapıda biyoseramikler olup kemiğe yüksek oranda bağlanma kapasitesine sahiptirler. Metal ve polimerlere göre seramikler, yüksek sertlik değerleri nedeniyle çok düşük aşınma oranlarına sahiptir [1].

Çizelge 2.2. Kemik doku mühendisliğinde kullanılan biyomalzemelerin özellikleri.

Biyomalzeme	Avantajları	Dezavantajları	Sık Kullanılanlar	Kullanım Alanları
<p>BiyoPolimerler</p>  <p>Doğal</p> <p>Sentetik</p>	<ul style="list-style-type: none"> • esneklik • düşük yoğunluk • adheziv özellikleri implantasyonu kolaylaştırır 	<ul style="list-style-type: none"> • zamanla parçalanma • elastiklik ve viskoelastiklik özellikleri kullanımlarını sınırlamaktadır 		<p>cerrahi iplikler, kan damarı protezleri, yapay tendon ve bağlar (teflon, PET), burun, kulak, elmacık kemiği, hücre transplantasyon uygulamaları, etken madde salım sistemi olarak kullanılabilenler, kemik dolgu maddesi (PMMA), kataterler (Teflon, poliüretan), yapay kalp (poliüretan), lensler (PMMA)</p>
	<ul style="list-style-type: none"> • ECM yapısına olan benzerlik • yüksek biyouyumluluk • biyobozunurluk 	<ul style="list-style-type: none"> • düşük mekanik dayanım • immünojenite • işleme zorluğu • patojen aktarım riski 	Kitosan, fibrin, kollajen, aljinat, jelatin, ipek	
	<ul style="list-style-type: none"> • kontrol edilebilir fiziksel özellikler • kolay işlenebilirlik • fabrikasyonları kolay • çeşitlilik • modifikasyona uygun yapı 	<ul style="list-style-type: none"> • biyouyumlu olmamaları • saf, katkı maddeleri içermeyen polimer bulma zorluğu (safsızlık) 	PLA, PGA, PLGA, PEG, hidrojel, PVC, Teflon (PTFE)	
Metaller	<ul style="list-style-type: none"> • yüksek dayanım • yüksek korozyon direnci • yüksek aşınma direnci • kolay sterilenebilmeleri 	<ul style="list-style-type: none"> • işleme zorluğu • yüksek elastisite modülü • düşük biyouyumluluk • yüksek yoğunluk • biyolojik ortamda korozyona uğramaları 	titanyum, Ti-Ni alaşımları, alümina, paslanmaz çelik, Co-Cr alaşımları	ortopedik birleştiriciler, diş implantları (titanyum, alümina), eklemler (titanyum), kalp kapakçıkları (paslanmaz çelik)
BiyoSeramikler	<ul style="list-style-type: none"> • iyi biyouyumluluk • inerttirler • yüksek korozyon direnci • yüksek mekanik dayanım 	<ul style="list-style-type: none"> • düşük mekanik özellikleri • düşük esneme özellikleri • yüksek yoğunluk • fabrikasyon zorluğu • biyobozunur özellikte olmamaları 	HAp, kalsiyum fosfatlar alumina, zirkonya, cam ve cam seramikler	kalça protezleri, diş implantları, derialtı sistemler, kemikte oluşan şekil bozuklukları tedavisinde
Kompozitler	<ul style="list-style-type: none"> • biyouyumluluk • inerttirler • korozyona dayanıklı • yüksek gerilme direnci 	<ul style="list-style-type: none"> • fabrikasyon zorluğu 	HAp/Kitosan	kalp kapakçıkları, diz kapağı implantları

Kompozitler

Doku mühendisliği uygulamalarında HAp ile modifiye edilen kitosan, doku iskelesi malzemesi olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Kitosan ve türevlerinin biyoyumlu, biyobozunur ve kalıplanabilir olduğu ve hücre yapışmasını destekleyen kimyasal bileşime sahip olduğu görülmüştür [5].

Kemik doku mühendisliğinde kullanılan malzemeler arasında HAp ve onun türevleri, örneğin β -trikalsiyum fosfat (β -TCP), MKH'in osteojenik indüksiyonu için en yaygın kullanılan doku iskelesi malzemesidir. Birden fazla malzemedan oluşan kompozit iskelelerin, fiziksel ve biyolojik olarak tek malzeme bazlı iskelelerden daha üstün olduğu bilinmektedir. Bunun nedeni, kompozitlerin özelliklerinin çeşitli malzemeleri farklı oranda karıştırarak programlı olarak değiştirilebilmesidir [22].

Kitosan-Hidroksiapatit

Kitosan biyobozunurluğu, biyoyumluluğu, antibakteriyal özelliği ve yara iyileşmesinde görev alması sayesinde doku mühendisliği uygulamalarında öne çıkan bir biyomalzemedir. Kitosanın doku mühendisliğinde kullanılmasının en önemli nedenlerinden biri de kolaylıkla işlevselleştirilebilmesidir. Kitosanda bulunan reaktif primer aminler ve primer/sekonder hidroksil grupları, peptid veya amino asitler gibi yan grupların eklenmesi için uygundur, bu da kitosanın doku mühendisliği uygulamaları için optimize edilmesinde önemli rol oynamaktadır. Ayrıca kitosan ve türevleri yeni doku oluşumu ile toksik ve inflamatuvar etki yaratmayarak bozduklarından kompozit iskeleler için oldukça cazip adaylardır [101, 102].

Hidroksiapatit, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ kimyasal yapısına sahip olup, kemik doku uygulamalarında sıklıkla kullanılan bir biyoseramiktir. Hidroksiapatit, doğal kemik yapısında bulunan kalsiyum mineral formundadır ve mükemmel biyoyumluluğa sahiptir. Ayrıca hidroksiapatit, yüksek biyoaktif ve osteokondüktif özelliklere sahiptir [103]. Tang ve ark. [104] doğal HAp ve kitosan kompozitinin mükemmel osteokondüktifliğe ve iyi bir doku biyoyumluluğuna sahip olduğunu göstermiş ve yapay kemik implantları ve destek malzemeleri için bu kompozitleri önermiştir. Jayabalan ve ark. [105] kalsine HAp nanopartikülleri içeren nanokompozitlerin hem biyoyumlu hem de osteouyumlu olduklarını göstermiştir.

Ayrıca, HAp kompozitleri kemik greft malzemelerinin biyouyumluluk ve mekanik özelliklerinin iyileşmesini sağlamaktadır. Swetha ve ark. [106] kitosan, jelatin ve nHAp (nano) içeren kitosan-jelatin iskeleleri hazırlamıştır. nHAp varlığında bu iskelelerin osteoblastik hücre yapışma ve yayılmasını arttırdığı gösterilmiştir.

Zang ve ark. [107] elektroçirme yöntemi ile yapılmış doğal mineralize nanofiberlerin yapısal özelliklerine sahip nanokompozit HAp/kitosan nanofiberleri hazırlamıştır. Bu kompozit fiberler, HAp'in mükemmel osteoiletkenliğine bağlı olarak kitosan doku iskelelerine göre önemli ölçüde kemik oluşumunu uyarmıştır. Bu da hücre çoğalması, mineral birikimi ve morfoloji gözlemleri ile kanıtlanmıştır. Biyokompozitlerin nHAp içermeleri, osteoblastların erken dönemlerde çoğalmasında, geç dönemlerde ise farklılaşmasında etkili olmuştur. Sonuç olarak, bu fiberlerin kemik doku mühendisliği uygulamaları için büyük bir potansiyel içerdiği vurgulanmıştır.

2.4.2. Fabrikasyon Yöntemleri

İdeal kemik doku iskeleleri belirtilen özelliklerde olmalıdır: 1. hücrelerin tutunması, iskele derinliğine göç edebilmesi ve çoğalması için birbirlerine bağlantılı gözenekler; 2. oksijen ve besinlerin doku iskelesinin derinliklerine kadar ulaşabilmesi ve atık ürünlerin kolayca uzaklaşabilmesini sağlayacak gözenek yapısı; 3. hücre yapışması ve çoğalması için yüksek afinite ve biyouyumluluk; 4. hasar bölgesine uygun şekle sahip olması; 5. uygun mekanik güç ve biyobozunurluk. İdeal kemik doku iskelesi üretimi için çeşitli fabrikasyon yöntemleri geliştirilmektedir. Bu yöntemler ile ilgili bilgiler Çizelge 2.3'de özetlenmiştir.

Çizelge 2.3. Kemik doku iskelesi üretim yöntemleri.

Üretim Yöntemi	AVANTAJLARI	DEZAVANTAJLARI	Gözenek Boyutu μm	Gözeneklilik %	Kullanılan Polimerler
Dondurarak Kurutma	<ul style="list-style-type: none"> ✓ yüksek gözenekli yapı ✓ yüksek bağlantılı gözenekler ✓ gözenek boyutunun dondurma oranı ile kontrolü 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ küçük gözenek çapı 	ortalama 15-35 μm	< 90	Kollajen, kitosan, aljinat, PLGA
Eriyik Kalıplama	<ul style="list-style-type: none"> ✓ makro yapının kontrolü ✓ gözeneklilik ve gözenek boyutunun bağımsız kontrolü 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ amorf olmayan polimerler için yüksek işleme sıcaklığı 	50-500 μm	< 80	PLGA
Membran Laminasyonu	<ul style="list-style-type: none"> ✓ makro yapının kontrolü ✓ gözeneklilik ve gözenek boyutunun bağımsız kontrolü 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ düşük mekanik özellik ✓ çözücünün uzaklaştırılması ✓ üretim süresinin uzunluğu ✓ gözenekler arası zayıf bağlantı 	30-300 μm	< 85	
Çözücü Dökümü/ Parçacık Uzaklaştırma	<ul style="list-style-type: none"> ✓ farklı boyutlarda gözenek çapı ✓ yüksek gözeneklilik ✓ ayarlanabilir kristalinite 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ düşük mekanik özellik ✓ porojen ve çözücülerin yeterince uzaklaşmaması ✓ sınırlı membran kalınlığı 	30-300 μm	20-50	PLLA
Faz Ayırımı	<ul style="list-style-type: none"> ✓ biyoaktif ajanlarla etkileşime uygun ✓ yüksek gözenekli yapı ✓ ayarlanabilir şekil, büyüklük ve mekanik özellik 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ mikro yapının kontrolünde yetersiz olması ✓ düşük üretim verimi ✓ farklı boyutlarda gözenek elde etmek için elverişsiz olması ✓ çözücü uzaklaştırma problemi 	< 200 μm	< 97	Sentetik biyopolimerler
Uç-boyutlu Baskı Tekniği (3-DP)	<ul style="list-style-type: none"> ✓ yüksek gözeneklilik ✓ kolay işleme ✓ yüksek yüzey alanı, hacim oranı ✓ gözenekler arası yüksek bağlantı ✓ farklı polimerleri işleyebilme 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ toksik organik çözücülerin kullanımı ✓ küçük gözenek çapı ✓ zayıf mekanik dayanım 	45-150 μm	< 60	Dekstran, jelatin, agaroz, aljinat, PLLA, PLGA
Elektro-Eğirme	<ul style="list-style-type: none"> ✓ düşük maliyet ✓ ayarlanabilir şekil, büyüklük ve mekanik özellik ✓ çok çeşitli polimer kullanabilme özelliği ✓ düzenlenmiş nanofiber üretimi 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ organik çözücülerin kullanılması ✓ üç-boyutlu yapıların üretiminde elverişsiz olması 			PEO, kollajen
Eriterek Birikim Modellemesi (FDM)	<ul style="list-style-type: none"> ✓ yüksek gözeneklilik ✓ yüksek yüzey alanı, hacim oranı ✓ gözenekler arası yüksek bağlantı ✓ çözücü kullanımı gerektirmez ✓ gözenek boyutunun bağımsız kontrolü 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ yüksek işleme sıcaklığı ✓ sınırlı sayıda polimer için uygun ✓ farklı yönlerde gözenek oluşturma kısıtlı ✓ farklı geometride üretim zorluğu 	>150	48-77	PCL, PCL/HAP, PCL/TCP, PET/PBT

2.5. Kemik Doku Mühendisliğinde Biosinyaller

Doku rejenerasyonu stratejileri genellikle 3 kategoride incelenmektedir:

1. Hücrelerin ilgili dokuya doğrudan enjeksiyonu veya sistematik dolaşımı;
2. Üç-boyutlu bir doku yapısı oluşturmak üzere hücrelerin iskele ile kombinasyonu sonrası implantasyon; 3. Hücre migrasyonu, büyümesi ve farklılaşmasını uyararak küçük molekül ağırlıklı ilaç, protein ve oligonükleotidler gibi sinyal moleküllerinin doku iskelelerinden salınması. Bu sinyal molekülleri şu şekilde gruplandırılmıştır:

1. Hücre bölünmesini uyararak mitojenler, 2. Birçok işlevi olan ancak genellikle çoğalmayı uyararak özellikleri ile tanımlanan büyüme faktörleri, 3. Doku yapısının oluşumunu kontrol eden morfogjenler [19].

Büyüme faktörleri, biyolojik ortamda spesifik hücrelere yanıt olarak cevap veren, çözünür yapıdaki sinyal polipeptidlerdir. Büyüme faktörü sinyali ile alınan hücrelere tepki, spesifik hücre kümelerinin canlılığı, migrasyon üzerinde kontrol, farklılaşma veya çoğalması gibi birçok hücre işlemine neden olabilir. Büyüme faktörlerinden TGF- β süper ailesinin memelilerde 30'dan çok üyesi bilinmektedir. Bunlardan, TGF-izoformları, kemik morfogenetik proteinler (BMP), büyüme farklılaşma faktörleri (GDF), aktivinler, inhibitörler ve anti-Müllerian hormonu (AMH) tanımlanmıştır [108].

Kemik doku mühendisliği için iskelelere yüklenmiş kemik morfogenetik proteinleri (BMP-2 ve BMP-7) gibi büyüme faktörleri hücre farklılaşması ve doku büyümesini uyarmaktadır. TGF- β , MKH'nin potansiyel kemotaktik uyarıcısıdır ve MKH, preosteoblast, kondrosit ve osteoblast hücrelerinin çoğalmasını artırmaktadır. Aynı zamanda kollajen, proteoglikanlar, osteopontin, osteonektin ve alkalik fosfatase gibi hücre dışı matris proteinlerinin üretimini de indüklemektedir. Biosinyal moleküllerinin yanı sıra, kemik iyileşmesi ve rejenerasyonu sürecinde çeşitli elementler de yer almaktadır. Bu elementlerden kemik doku mühendisliği için büyük önem taşıdığı düşünülenlerden biri de Bor'dur [14, 109].

2.5.1. Bor

Bor, organizmalarda önemli bir mikrobeseleyicidir ve osteogenezde büyük bir rol oynamaktadır. Besinle alınan bor steroid hormonların, kalsiyum, magnezyum ve vitamin D gibi çeşitli mikrobeseinlerin metabolizmasını, aynı zamanda birçok metabolik enzimin aktivitesini etkilemektedir. Bor, steroid hormonlar ile etkileşerek kalsiyum kaybının ve kemik demineralizasyonunun önlenmesine katılır. Ayrıca bor, vitamin D eksikliği olan hayvanlarda büyümeyi uyarır ve vitamin D eksikliğinden dolayı ortaya çıkan mineral metabolizmasındaki olumsuzlukları hafifletir. Sıçan ve civcivlerde bor takviyesinin kemik gücünü arttırdığı görülmüştür. Bor, plazma lipid seviyesinin ve beyin fonksiyonlarının gelişiminde de rol oynamaktadır. Üstelik borun çeşitli metabolik faaliyetlere etkisi bilinmektedir. Diğer besin maddeleri ile etkileşiminin yanı sıra borun, borik asit şeklinde sıçanlarda kemik yapısı ve kalınlığını güçlendirdiği gösterilmiştir. Doğada bor, borik asit ve borat olarak bulunmakta ve besinsel olarak meyve, sebze ve baklagiller tüketilerek vücuda alınabilmektedir [13, 110].

Borun insan ve memeli metabolizmasındaki rolü ve mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Ancak, borun optimal sağlık için gerekli olduğu ve aynı zamanda embriyogenez, kemik büyümesi, immün ve psikomotor fonksiyonlarda hayati rol aldığı sıçanlarda gösterilmiştir [111]. Ayrıca, bordan yoksun beslenmede hem kemik, hem de diş büyümesinin etkilendiği bilinmektedir. Nielsen ve ark. [112] sıçanların beslenmesindeki, günlük 3 mg/kg olan borun (borik asit formunda) eksikliğinde kemik hacim fraksiyonunun önemli derecede azaldığını göstermiştir. Bor eksikliğinde anormal kemik büyümesi ve bozuk gelişme olduğu bilinmektedir. Bunlar dışında, borik asit periodontal inflamasyonun azaltılmasında ve alveolar kemik kaybının engellenmesinde rol oynamaktadır [9].

Hakkı ve ark. [13] borik asitin MC3T3-E1 fare osteoblastik hücre hattının hücre çoğalmasını, mineralizasyon düzeyini ve kollajen tip I, osteokalsin gibi kemik büyümesi ile ilgili mRNA düzeyini arttırdığını belirtmiştir. Ayrıca, hücre sağkalım oranının 1000 ng/mL borik asit muamelesinde azaldığı bulunmuştur.

Grubumuz tarafından daha önce yapılan çalışmalarda borun, MC3T3-E1 preosteoblastik hücre hattının farklılaşması üzerine etkileri değerlendirilmiştir. İlk çalışmada bor-katkılı nanopartikül yüklü kitosan doku iskeleleri kullanılmış ve

elde edilen bulgular ile borun osteoindüktif bir ajan olarak kullanılabilceği gösterilmiştir [113]. Diğer bir çalışmada ise, mikrodalga destekli biyomimetik yöntemle üretilen bor katkılı hidroksiapatit kaplı kitosan doku iskelelerinin, hücrelerin farklılaşmasını desteklediği ve mineralizasyonunu arttırdığı belirlenmiştir [114]. Sonuç olarak, bor katkılı doku iskelelerinin kemik doku mühendisliği uygulamaları için uygun biyomalzemeler olabileceği düşünülmüştür.

Son zamanlarda birçok çalışma borun kemik doku mühendisliği için biyosinyal molekülü olarak kullanılma potansiyeline sahip olduğu gösterilmiştir. Gorustovich ve ark. [115] sıçan tibiasının intramedüller kanalına implante edildiğinde bor ile modifiye edilmiş 45S5 biyoaktif camların partiküllerinin 45S5 camlara göre kemik oluşumunu daha çok geliştirdiği görülmüştür.

Borat biyoaktif camların *in vitro* hücre çoğalmasının ve farklılaşmasının yanı sıra *in vivo* doku infiltrasyonunu da desteklediği gösterilmiştir. Ayrıca, kemik enfeksiyonu tedavisinde borat biyoaktif camların ilaç salım sistemleri için kullanılabilceği de bilinmektedir. Borat biyoaktif camlarla ilgili en büyük endişe ise ozelti içinde (BO₃)³⁻ gibi serbest bor iyonlarının toksik etkisinin olma ihtimalidir [116].

Ying ve ark. [10] borun, borik asit şeklinde farklı konsantrasyonlarının (0,1, 10, 100 ve 1000 ng/mL) insan KiMKH zerine etkisini incelemiştir. Kültür boyunca 1, 10 ve 100 ng/mL borik asit gruplarında kontrole göre hücre sayısında hafif bir düşüş görülmüş, ayrıca 1000 ng/mL borik asit konsantrasyonunda kontrole göre KiMKH sayısı anlamlı şekilde azalmıştır. KiMKH'lerin ALP aktivitesinde 1 veya 1000 ng/mL konsantrasyonlarında kontrole göre anlamlı bir fark görülmemiştir. 1 ve 10 ng/mL borik asitle muamele edilmiş gruplarda kontrole göre kalsiyum birikimlerinde artış görülmüş, 100 ve özellikle 1000 ng/mL konsantrasyonlarında kalsiyum birikimlerinde anlamlı şekilde azalma görülmüştür. dördüncü ve yedinci günlerde ALP ve OCN ifadesinin 10 ve 100 ng/mL borik asitle kültüre edilen KiMKH'lerde oldukça yüksek olduğu belirlenmiştir.

Böylece, bütün çalışmalar göz önünde bulundurularak bor katkılı doku iskelelerinin osteojenik farklılaşmayı uyarabilme potansiyeline sahip olduğu ve kemik doku mühendisliğinde hücre bazlı yapıların osteojenik kapasitesini arttırmak için umut verici bir yaklaşım olabileceği düşünülebilir [10].

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Sunulan tez çalışması kapsamında, kemik doku rejenerasyonunda kullanılmak üzere dondurarak-kurutma yöntemiyle kitosan doku iskeleleri üretilmiştir. Daha sonra bu doku iskeleleri, hidroksiapatit (HAp) ve bor katkılı hidroksiapatit (B-HAp) ile kaplanarak kompozit doku iskeleleri elde edilmiştir. Çalışmanın ikinci aşamasında kemik iliği ve adipoz dokudan mezenkimal kök hücre izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Ardından doku iskelelerinin kemik doku mühendisliğindeki kullanım potansiyellerini araştırmak ve kök hücre – doku iskelesi etkileşimlerini gözlemek amacıyla *in vitro* hücre kültür çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Karakterizasyonları tamamlanan adipoz kökenli mezenkimal kök hücre (AKH) ve kemik iliği mezenkimal kök hücreleri (KiMKH) ile durgun koşullarda hücre kültür çalışmaları yürütülmüş ve *in vitro* kemik doku oluşumuna yönelik bulgular elde edilmiştir. Bu bölümde tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen deneysel çalışmalara ait ayrıntılı bilgilere yer verilmiştir.

3.1. Kullanılan Malzemeler

Doku iskelesi üretiminde kullanılan %75-85 deasetilasyon derecesine sahip kitosan Sigma (Almanya) firmasından alınmıştır. Kitosanı çözmek için kullanılan asetik asit Riedel de Haen (A.B.D.) ve doku iskelelerinin stabilizasyonu için kullanılan etanol (%96) Colony Sugar Mills (Pakistan) firmasından satın alınmıştır. Yapay vücut sıvısı (SBF) hazırlanmasında kullanılan tuzlardan sodyum klorür (NaCl), potasyum klorür (KCl), kalsiyum klorür dihidrat ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), magnezyum klorür heksahidrat ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) ve sodyum dihidrojen fosfat monohidrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) Merck (Almanya) firmasından, borik asit (H_3BO_3) BDH Chemicals Ltd (İngiltere) firmasından, sodyum hidroksit (NaOH), sodyum bikarbonat (NaHCO_3) ve 2,2-dihidroksi indan-1,3-dion (Ninhidrin) Merck (Almanya) firmasından temin edilmiştir.

Hücre kültür çalışmalarında kullanılan AKH ve KiMKH'leri, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Araştırma ve Yetiştirme Ünitesi'nden alınan 2-5 aylık erkek Sprague-Dawley sıçanlardan izole edilmiştir. Bu aşamada, Hacettepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan alınan 2015-32 karar numaralı izin çerçevesinde çalışmalar yürütülmüştür **[Ek-1]**. Hücrelerin çoğaltılması ve kültüründe kullanılan Minimum Essential Medium Alpha

Modification (α -MEM) Biochrom (Almanya), Dulbecco fosfat tampon çözeltisi (DPBS) ve gentamisin Lonza (İsviçre), Tripsin/EDTA (%0.01 tripsin/10 nM EDTA), fetal sığır serumu (FBS) ve penisilin-streptomisin (P/S) Sigma (Almanya), amfoterisin-B ise Hyclone (A.B.D.) firmalarından satın alınmıştır. Farklılaşma çalışmaları için kullanılan β -gliserol fosfat, L-askorbik asit, deksametazon, 3-izobutil-1-metilksantin (IBMX), insulin, indometazin ve TGF- β 3 Sigma (Almanya) firmasından temin edilmiştir. Hücre canlılığının takibinde kullanılan 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-difenilterazolyum bromür (MTT), Presto Blue, isopropanol ve HCl (%37) Sigma (Almanya) firmasından satın alınmıştır. Hücre karakterizasyonu çalışmaları için kullanılan kristal viyole BDH Chemicals Ltd. (İngiltere), fast green, safranin O, aseton, metanol ve glüteraldehit Sigma firmasından (Almanya), hekzametildisilazan (HMDS) ve formalin Merck'den (Almanya) satın alınmıştır. Hücre morfolojilerini göstermek amacıyla kullanılan 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) ve Alexa Fluor 488 Phalloidin konjuge F-aktin antikoru ve hücrelerden RNA izolasyonunda kullanılan Trizol Invitrogen (A.B.D.) firmasından satın alınmıştır. Fibronektin Sigma (Almanya) firmasından temin edilmiştir.

3.2. Doku İskelelerinin Üretimi

Dondurarak-kurutma yöntemi ile hazırlanan kitosan doku iskeleleri üzerine bor katkılı hidroksiapatit kaplama yapılmış ve aynı koşullarda hidroksiapatit kaplama da yapılarak iki tür kompozit iskele elde edilmiştir. Çalışmada 3 farklı doku iskelesi hazırlanmıştır. Bunlar 1. Kitosan 2. HAp/kitosan ve 3. B-HAp/kitosan olup aşağıda üretimleri hakkında ayrıntılı bilgi verilmiştir.

3.2.1. Kitosan Doku İskelelerinin Üretimi

Öncelikle 0.2 M asetik asit çözeltisi kullanılarak %2'lik (w/v) kitosan (%75-85 deasetilasyon derecesi) çözeltisi hazırlanmıştır. Elde edilen çözelti, safsızlıklarından arındırılmak üzere filtreden geçirilmiş ve 24-gözlü Petri kaplarına (İsviçre) dökülerek -20°C'de dondurulmuştur (1-2 gün). Bu aşamadan sonra kitosan doku iskeleleri, liyofilizatör (Christ, Almanya) kullanılarak -80°C'de "dondurarak-kurutma" işlemine tabi tutulmuştur (4-5 gün). Bu yöntemde iskeleler içerisindeki buz kristalleri liyofilize edildiğinden, içsel bağlantılara sahip gözenekli bir yapı elde edilmiştir. Elde edilen kitosan doku iskelelerinin stabilizasyonu için

iskeleler, %96'lık (v/v) etanol çözeltisi içerisinde 2 gün, %70'lik (v/v) etanol çözeltisi içerisinde ise 1 saat bekletilmiştir. Hücre kültür çalışmaları için iskeleler 2 mm x 9 mm boyutlarında kesilmiştir.

3.2.2. B-HAp/kitosan ve HAp/kitosan Kompozit Doku İskelelerinin Üretimi

Biyomimetik yöntemle HAp/kitosan ve B-HAp/kitosan kompozit doku iskelelerinin üretilmesi için 10xSBF ve bor katkılı 10xSBF (B-SBF) çözeltileri hazırlanmış ve kitosan doku iskelelerinin kaplanması mikrodalga enerjisi yardımı ile sağlanmıştır. 10xSBF insan kan plazmasındaki kalsiyum ve fosfat iyon derişimlerinin 10 katına sahiptir ve böylece Ca/P çekirdeklenmesi daha hızlı gerçekleşmektedir. Çizelge 3.1'de çalışma kapsamında hazırlanan 10xSBF çözelti reçetesi verilmiştir.

Çizelge 3.1. 10XSBF çözelti reçetesi (toplam hacim 1L).

Bileşenler	Ekleme sırası	Miktar (g)	Derişim (mM)
NaCl	1	58.443	1000.00
KCl	2	0.373	5.00
CaCl ₂ •2H ₂ O	3	3.675	25.00
MgCl ₂ •6H ₂ O	4	1.016	5.00
NaH ₂ PO ₄ •H ₂ O	5	0.250	3.62
NaHCO ₃	6	0.084	10.00

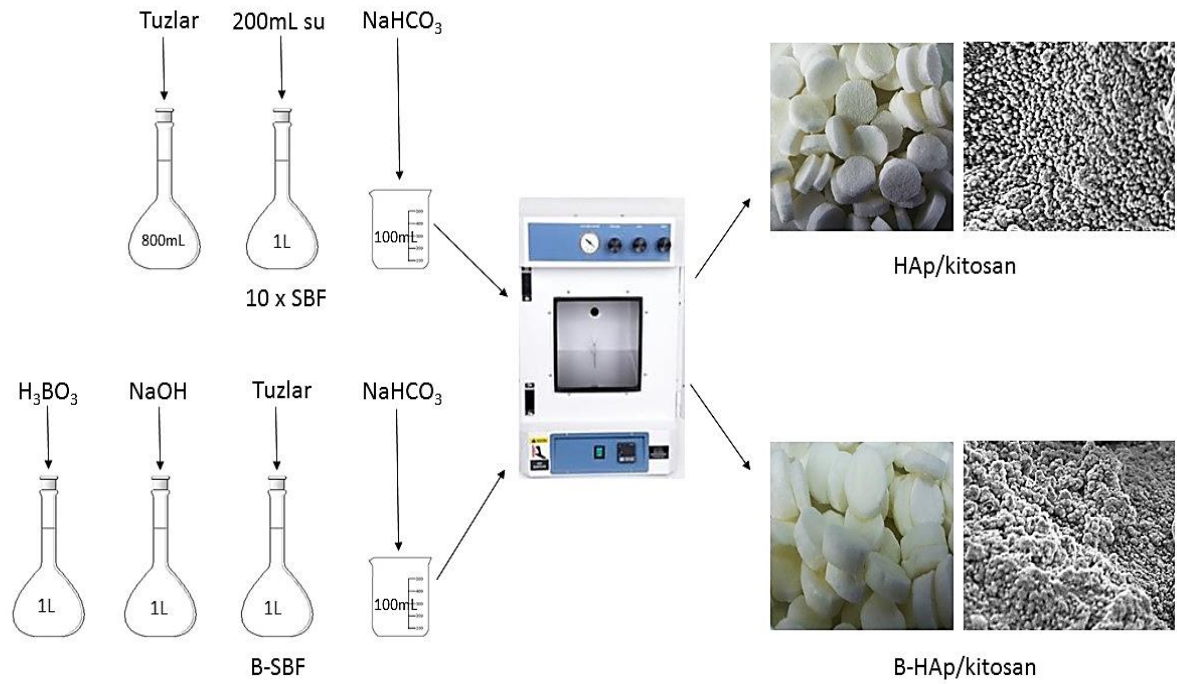
10xSBF çözeltisinin hazırlanması için sırasıyla ilk beş tuz 800 mL ultra saf su içinde çözülmüş ve daha sonra hacim ultra saf su ile 1 L'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan bu stok çözelti çöktürme öncesine kadar 4°C'de saklanabilir.

B-SBF çözeltisinin hazırlanması için 1 L ultra saf suda 10 g borik asit çözülmüştür. B-SBF pH'sının çökeltme pH aralığında olması çok önemlidir. Bu dengenin bozulmaması için 10 M NaOH eklenmiştir. Ardından Çizelge 3.1.'de belirtilen ilk beş tuz bu çözelti içerisinde sırasıyla çözülmüştür. Hazırlanan bu stok çözelti kaplama öncesine kadar 4°C'de saklanabilir.

Kaplama öncesi 2 mm x 9 mm boyutlarında kesilmiş kitosan iskeleler seçilen SBF stok çözeltisi içerisinde vakum etüvünde (Thermo Scientific, Lindberg Blue, ABD) çöktürülmüştür. Daha sonra 100 mL SBF içerisine NaHCO₃ ilave edilmiş ve 7 iskele/100 mL SBF olacak şekilde doku iskeleleri SBF çözeltisine konulmuştur.

Kitosan doku iskelelerinin, HAp ve B-HAp ile kaplanması için uygun koşullar grubumuz tarafından daha önceden yapılan çalışmalar kapsamında belirlenmiştir [15, 114]. Hazırlanan iki tür SBF ile yapılan kaplamalarda mikrodalga (Milestone, İtalya) uygulaması aynı koşullarda gerçekleştirilmiştir. HAp ve B-HAp kaplama 600 W ve her biri 30 saniyelik 9 tekrar (30sx9) olarak ve bu işlem 4 defa tekrarlanarak kaplama yapılmıştır.

Her bir kaplama sonrasında istenmeyen fazlar, 3 dk %96 (v/v) etanol, 2x3 dk ultra saf su ile yıkanarak uzaklaştırılmış ve doku iskeleleri tekrar SBF ortamına alınarak diğer kaplamaya geçilmiştir. Son kaplamanın ardından 15 dk etanol ve 2x15 dk ultra saf su ile yıkama yapılarak tüm doku iskeleleri -20°C'de dondurulmuş ve liyofilizatörde kurutulmuştur. Şekil 3.1'de dondurarak-kurutma yöntemi ile hazırlanan kitosan doku iskelelerinin mikrodalga enerjisi yardımıyla HAp ve B-HAp ile kaplama işlemi şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 3.1. HAp/kitosan ve B-HAp/kitosan doku iskelesi üretiminin şematik gösterimi.

3.3. Hücre Kültür Çalışmaları

Hücre kültür çalışmalarında, adipoz kökenli mezenkimal kök hücreler (AKH) ve kemik ilgi mezenkimal kök hücreler (KiMKH) olmak üzere iki farklı hücre kullanılmıştır.

3.3.1. Mezenkimal Kök Hücre İzolasyonu

Günümüzde, kök hücrelerin izolasyonu için birçok farklı yaklaşım bulunmaktadır. İzolasyon yöntemi belirlenirken öncelikle hücre kaynağının tipi, yani hangi dokudan izole edileceğine dikkat edilmelidir.

İzolasyondan önce dokuların taşınması için PBS içerisinde %0.4 (v/v) P/S içeren taşıma ortamı hazırlanmıştır. İzolasyon sırasında kullanılacak bütün malzemeler otoklav yardımıyla steril edilmiştir. Çalışmada kullanılan AKH ve KiMKH'lerin izolasyonu için 2-5 aylık erkek Sprague-Dawley sıçanlar periton bölgesinden yapılan ketamin/ksilazin (2:1) karışımı anestezik ile uyutulmuştur. Dış yüzey sterilizasyonunun sağlanması için sıçan %70'lik (v/v) etanol ile silinmiş ve steril cerrahi örtü üzerine sırt üstü yatırılan sıçan el ve ayaklarından sabitlenmiştir. Karın alt bölgesinden steril pens ile tutularak sivri uçlu makas ile sıçan derisi kaldırılmıştır. Ardından subkutan yağlar temiz pens yardımı ile taşıma ortamı bulunan tüpe alınmıştır. Karın bölgesi açıldıktan sonra ovaryum etrafındaki gonodal yağlar ve böbrek arkası yağ dokuları, taşıma ortamı bulunan tüplere alınmıştır. Yağ dokuları alındıktan sonra, arka bacaklar vücuda bağlı olduğu bölgeden epifizlere zarar verilmeden çıkartılmıştır. Eklem bölgesinden ayakları kesilmiş ve kemikler mümkün olduğu kadar makas yardımı ile kaslardan temizlenmiştir. Kemikler taşıma ortamı bulunan tüpe alınmıştır. Kemik dokusu taşıma ortamı içerisinde 4°C'de bekletilebilmektedir (1-2 saat).

3.3.1.1. Adipoz Kökenli Mezenkimal Kök Hücre İzolasyonu (AKH)

Taşıma ortamı içerisinde bulunan yağ dokuları yeni tüplere aktarılmış ve 2 kere çalkalanarak PBS (pH:7.4) ile yıkanmıştır (yıkama Petri kaplarında da yapılabilmektedir). Doku parçaları Petri kapları içerisinde pens ve bistüri yardımı ile daha küçük parçalara ayrılmıştır. Küçük doku parçaları pens yardımı ile %0.075 (w/v) kollajenaz (PBS içinde) içeren tüplere alınmıştır. Dokuların parçalanması için 1 saat boyunca %5 CO₂ etüvünde 37°C'de bekletilmiştir. Bekleme sırasında 3 kere 15-20 dk aralıklarla alınıp vortekslenmiştir. Bir saat sonra tüpler etüvden

alınmış ve kollajenaz etkisini inhibe etmek için tüpe PBS eklenmiştir (kollajenaz miktarının yaklaşık 2 katı). Enzimatik işlem sonucunda heterojen bir hücre popülasyonu süspansiyon halinde elde edilmektedir. Hücre pelletini ayırmak için tüp 1800 rpm'de 5 dk santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrasında süpernatant atılmış, hücreler ortamla dağıtılmış ve 1000 rpm'de 5 dk santrifüjlenmiştir. Bu yıkama işlemi bir kere daha tekrarlanmıştır. Süpernatant dökülüp, besi ortamı ile hücreler toplandıktan sonra 0.70 µm filtreden geçirilmiştir. Ardından 1000 rpm'de 5 dk santrifüjlenmiştir. Süpernatant uzaklaştırılmış, hücreler 5 mL ortam ile dağıtılarak 25 cm²'lik flaslara aktarılmıştır. Kültürasyona 37°C'de %5 CO₂ etüvünde (Heraeus Instruments, Almanya) devam edilmiştir.

3.3.1.2. Kemik İliği Mezenkimal Kök Hücre İzolasyonu (KiMKH)

Taşıma ortamında bulunan kemikler tekrar PBS (pH:7.4) çözeltisi içeren Petri kabına aktararak 2 kere yıkanmıştır. Femur ve tibia kemikleri ayrılmıştır. Ardından, kemikler steril makas ve bistüri yardımı ile üzerinde kazıma işlemi yapılarak kas tabakasından olabildiğince temizlenerek PBS içeren başka bir Petri kabına aktarılmıştır. Daha sonra, insülin enjektörleri hücre kültür ortamı ile doldurularak hazırlanmıştır. Kemikler hemostat yardımı ile tutularak epifiz uçları makas ile kesilmiştir. Epifiz ucu kesilen kemiğin ilik boşluğundan insülin enjektörü içerisindeki hücre kültür ortamı basınçla akıtılmıştır. Tüm kemik iliğinin alınmış olduğundan emin olununcaya kadar işlem devam ettirilmiştir. Tüm kemik ilikleri aynı tüpe toplanmış ve 1000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi sonrası süpernatant dökülerek hücreler besi ortamı ile süspansiyon edilmiş ve tekrar 1000 rpm'de 5 dk santrifüjlenmiştir. Süpernatant dökülmüş ve bir üst basamaktaki yıkama işlemi tekrarlanmıştır. Ardından hücreler 5 mL ortam ile dağıtılarak 25 cm²'lik flaslara aktarılmıştır. Kültüre edilen hücreler, %95 nem ve %5 CO₂ içeren inkübatörde tutulmuştur. Steril ortam gerektiren tüm işlemler laminar akış kabini (Bioair, Type II Laminar Akış Kabini, İtalya) gerçekleştirilmiştir. Her pasajda stok yapılmak üzere hücreler dondurulmuştur. Beşinci pasajda hücrelerin karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir.

3.4. Hücre Karakterizasyonu

Hücrelerin canlılığı ve metabolik aktiviteleri Presto Blue analizi ile belirlenmiştir. Hücre canlılığının yanı sıra hücre morfolojisinin takibi için kristal viyole ve F-aktin/DAPI boyamaları yapılmıştır. Hücrelerin yaşlanma periyoduna girip girmediği senesens kiti kullanılarak analiz edilmiştir.

3.4.1. Presto Blue Analizi

İzole edilen AKH ve KiMKH'lerin canlılığı ve mitokondriyal aktiviteleri kültür süresinde farklı zamanlarda yapılan Presto Blue analizi ile belirlenmiştir. Bunun için hücreler 24-gözlü Petri kaplarına 5000 hücre/cm² olacak şekilde ekilmiştir. Kültürün 1., 3., 5., 7., 9., 11., 13., 15., 17., ve 19. günlerinde kültür ortamı çekildikten sonra her bir göze 50 µL Presto Blue ve 450 µL besi ortamı eklenmiştir. Hücreler 2 saat 37°C'de inkübe edildikten sonra renk değiştiren ortamdan 200 µL alınıp 96-gözlü kültür kaplarına aktarılmış, optik yoğunluk 600 nm referans olmak üzere 570 nm'de mikropilaka okuyucu (Asys UVM 340) ile belirlenmiştir. Hücreler üzerinde kalan Presto Blue çözeltisi uzaklaştırıldıktan sonra 1 kez steril PBS ile yıkama yapılmış, hücreler üzerine taze besi ortamı eklenerek kültüre devam edilmiştir.

3.4.2. F-aktin/DAPI Boyaması

F-aktin/DAPI boyaması için 4-gözlü kültür kaplarına beşinci pasajdaki hücreler ekilmiştir. Hücreler yüzeyi kapladıktan sonra üzerlerindeki besi ortamı uzaklaştırılmış ve PBS ile 2x5 dk yıkama yapılmıştır. Yıkama sonrası %4 (v/v) formalin (PBS içerisinde) ile 20 dk fiksasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Fiksasyon sonrası 3x5 dk PBS ile yıkama yapılmıştır. Ardından, membran geçirgenliğini sağlamak için hücreler %0.1 (v/v) Triton X-100 ile (PBS ile hazırlanmıştır) 10 dk muamele edilmiş ve %1 (w/v) sığır serum albümin (BSA) içeren PBS (PBS-A) ile 3x5 dk yıkama yapılmıştır. Ardından hücreler %1 (w/v) PBS-A çözeltisi içerisinde hazırlanmış Alexa Fluor 488 Phalloidin konjuge F-aktin antikoru (%1'lik, v/v) ve 1/1000 oranında DAPI ile 30 dk oda sıcaklığında karanlıkta inkübe edilmiştir. İşlemi takiben 3 kez PBS-A ile yıkama yapılmıştır ve floresan mikroskobu (Olympus IX71, A.B.D) kullanılarak hücreler görüntülenmiştir.

3.4.3. Kristal Viyole Boyaması

Kristal viyole boyaması için hücreler 6-gözlü Petri kaplarına 5000 hücre/cm² olacak şekilde ekilmiştir. Hücreler yüzeyi kapladıktan sonra kültür kabında bulunan besi ortamı uzaklaştırılmış ve PBS ile 2 kere yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Daha sonra 1:1 (v/v) oranında aseton/metanol karışımı ile, 4°C'de 20 dk fiksasyon işlemi yapılmıştır. Fiksasyon işleminin ardından %20'lik (v/v) metanol çözeltisinde (PBS içinde) hazırlanan %0.5'lik (w/v) kristal viyole çözeltisi hücrelerin üzerine eklenmiş ve 30 dk bekletilmiştir. Son olarak boyanan hücreler akan suyun altında yıkanmış ve optik mikroskop altında morfolojik gözlem gerçekleştirilmiştir.

3.4.4. Senesens Boyaması

Normal büyüme koşullarında hücreler, lizozomda lokalize olan β -galaktosidaz enzimi üretmektedirler. Yaşlanma sırasında hücrelerin lizozomal kütlesi çoğalmaktadır, bu da β -galaktosidazın daha yüksek bir seviyede üretimine neden olmakta ve senesens-ilişkili β -galaktosidaz (SA- β -gal) olarak adlandırılmaktadır. Böylece yaşlanmış hücrelerin tespiti lizozomal β -galaktosidaz aktivitesinin artış düzeyi ile belirlenebilmektedir [117]. Senesens kiti (Abcam, ABD) kullanılarak SA- β -gal pozitif hücreler mavi-yeşil olarak boyanabilmekte ve optik mikroskopla görüntülenebilmektedir.

Senesens tayini için hücreler 24-gözlü Petri kaplarına 5000 hücre/cm² olacak şekilde ekilmiştir. Hücreler yüzeyi kapladıktan sonra besi ortamı uzaklaştırılmış ve PBS (pH:7.4) ile 1 kere yıkama yapılmıştır. Ardından her göze 250 μ L fiksatif çözelti eklenmiş ve 10-15 dk oda sıcaklığında bekletilmiştir. Fiksasyon işlemi sonrası 2 kere PBS ile yıkama yapılmıştır. Ardından boyama çözeltisi hazırlanmıştır. Hazırlanan karışım gözlere eklenmiş ve 1 gece 37°C inkübe edildikten sonra optik mikroskop ile görüntülenmiştir.

3.4.5. AKH ve KiMKH'lerin Farklılaşma Potansiyellerinin İncelenmesi

Mezenkimal kök hücrelerin önemli özelliklerinden biri *in vitro* ortamda birden fazla hücre serisine farklılaşabilmeleridir. Bu özelliklerinin belirlenmesi için osteojenik, adipojenik ve kondrojenik farklılaşma çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

3.4.5.1. Osteojenik Farklılaşma

Osteojenik farklılaşma için 12-gözlü Petri kaplarına pasaj 5'de olan AKH ve KiMKH'ler 5000 hücre/cm² olacak şekilde %10 FBS ve %1.2 antibiyotik (P/S, amfoterisin, gentamisin) içeren α -MEM ile ekilmiştir. Hücreler %70-80 doygunluğa ulaştıklarında besi ortamları %10 FBS, %1.2 antibiyotik, 25 μ M L-askorbik asit, 5 mM β -gliserol fosfat ve 10nM deksametazon içeren α -MEM'den oluşan osteojenik ortam ile değiştirilmiştir. Kontrol grubu olarak %10 FBS (v/v) ve %1.2 antibiyotik (P/S, amfoterisin-B, gentamisin) içeren α -MEM'de kültüre edilmeye devam edilen hücreler kullanılmıştır.

Osteojenik farklılaşma çalışması 28 gün devam ettirilmiştir. Hücrelerin ortamı her 3-4 günde bir yarı yarıya tazelenmiştir. Kültürün 14. ve 28. günlerinde ALP/von Kossa boyaması yapılmıştır.

Alkalin Fosfotaz-von Kossa Boyaması (ALP-VK)

Hücrelerin osteoblastik farklılaşması ve kalsiyum birikimlerini görüntülemek üzere ALP/VK boyaması yapılmıştır. Osteoblastlar için alkalik fosfotaz (ALP) ekspresyonu erken farklılaşma belirteci olarak kabul edilmektedir. ALP enzim aktivitesinin yüksek olduğu bölgeler kültür kaplarında kırmızı olarak boyanmaktadır. VK boyama osteoblastların geç farklılaşma aşamasında mineralize nodüllerin oluşumunu görüntülemek için yapılmaktadır. Boyama sonrasında farklılaşan hücreler kahverengi ya da siyah renkte görünürler [118, 119]. Boyama işleminde kullanılan çözeltilerin bileşimleri Çizelge 3.2'de verilmiştir. Çalışmada, belirlenen hücre kültür süreleri sonunda hücreler üzerindeki ortam uzaklaştırılmış ve soğuk PBS ile yüzey yıkanmıştır. Ardından %10'luk (v/v) soğuk nötral formalin tamponunda 15 dk fiksasyon yapılmıştır. Tüm tampon uzaklaştırılarak, yüzey bir kere distile su ile yıkanmış ve 15 dk distile suda bekletilmiştir. Beklerken taze substrat hazırlanmış ve filtrelenmiştir. Distile su uzaklaştırıldıktan sonra hazırlanan taze substrat eklenerek 45 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası yüzey 4 kez distile su ile yıkanmıştır. Distile su uzaklaştırılarak % 2.5'luk (w/v) gümüş nitrat çözeltisi ile 30 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası gümüş nitrat çözeltisi uzaklaştırılarak 3 kez distile su ile yıkama yapılmıştır.

Mineralizasyonun daha belirgin görünmesi için örnekler 5 dk UV ışığı altında bekletilebilir. Örnekler ışık mikroskobu altında incelenmiştir.

Çizelge 3.2. ALP-VK boyamasında kullanılan çözeltiler.

Çözelti	Bileşim	Miktar
%10 Nötral formalin tamponu 1 L	Formalin/Formaldehit	100 mL
	Na ₂ HPO ₄	16 g
%2.5 Gümüş nitrat çözeltisi 100 mL	AgNO ₃	2.5 g
	Distile su	100 mL
Taze substrat 50 mL	Naftol AS MX-PO4	0.005 g
	N,N-Dimetilformamid	200 µL
	Tris-HCl MW=157.6 pH 8.3 0.2M	25 mL
	Red violet LB tuzu	0.03 g
	Distile su	25 mL

Not:Naftol DMF içinde çözülür. Ardından Tris-HCl ve distile su ilave edilir. Hazırlanan karışıma Red Violet LB tuzu eklenir. Kullanılmadan hemen önce filtrelenir.

3.4.5.2. Adipojenik Farklılaşma

Adipojenik farklılaşma için AKH ve KiMKH'ler 5000 hücre/cm² olacak şekilde %10 FBS ve %1.2 antibiyotik (P/S, amfoterisin-B, gentamisin) içeren α-MEM ile 12-gözlü Petri kaplarına ekilmiştir. Hücreler %90-100 doyumluğa ulaştıklarında besi ortamları %10 FBS, %1.2 antibiyotik, 0.25 mM IBMX, 25 µM indometazin, 0.25 µM deksametazon ve 5 µM insulin α-MEM'den oluşan adipojenik ortam ile değiştirilmiştir. Adipojenik farklılaşma çalışması 20 gün devam ettirilmiştir. Kontrol grubu olarak %10 FBS ve %1.2 antibiyotik içeren α-MEM'de kültüre edilmeye devam edilen hücreler kullanılmıştır. MKH'ler adipositlere farklılaşırken sitoplazmalarında yağ damlacıkları oluşmaktadır. Hücrelerin adipositlere farklılaşmalarının incelenmesi ve yağ birikimlerini görüntülemek üzere kültürün 14. ve 20. günlerinde Oil Red O boyaması yapılmıştır.

Oil Red O boyama

Oil Red O, trigliseridleri boyamak için kullanılan, yağda çözünen bir boya olan lizokromdur. Boyama sonrası yağ damlacıkları kırmızıya boyanmaktadır.

Stok çözeltisi, 0.7 g Oil Red O 200 mL izopropanol içinde, 1 gece karıştırıcıda bekletilerek hazırlanmıştır. Tamamen çözündükten sonra 0.2 µm filtreden geçirilerek 4°C'ye kaldırılmıştır.

Çalışma çözeltisi, 6 mL Oil red O stok çözeltisi üzerine 4 mL distile su eklenerek ve oda sıcaklığında 20 dk bekletilerek hazırlanmıştır. Kullanılmadan önce 0.2 µm filtreden geçirilmiştir.

Belirlenen hücre kültür süreleri sonunda hücreler üzerindeki ortam tamamen çekilmiş ve hücre yüzeyi PBS ile yıkanmıştır (2 dk). Hücrelerin yüzeyini kapatacak kadar %10 (v/v) formalin eklenerek (PBS içerisinde hazırlanmıştır) 30 dk oda sıcaklığında bekletilmiştir. Fiksasyon sonrası %10'luk (v/v) formalin çekilerek distile su ile 1 kez yıkama yapılmıştır (2 dk). Yıkama sonrası hücrelerin yüzeyini kapatacak kadar %60 (v/v) isopropanol (distile su içerisinde hazırlanmıştır) eklenerek 5 dk oda sıcaklığında bekletilmiştir. Ardından isopropanol çekilerek Oil red O çalışma çözeltisi eklenmiş ve 5-7 dk boyunca oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Inkübasyon sonunda Oil red O çalışma çözeltisi çekilerek distile su ile hücreler iyice yıkanmıştır. En son 1 mL distile su eklenerek Oil Red O boyama ışık mikroskobu altında incelenmiştir.

3.4.5.3. Kondrojenik Farklılaşma

Kondrojenik farklılaşma için AKH ve KiMKH'ler 2.5×10^5 hücre/tüp olarak 15 mL'lik tüplere %10 FBS ve %1.2 antibiyotik içeren α -MEM ile ekilmiştir. Hücre pelletleri oluştuğunda besi ortamları %10 FBS ve %1.2 antibiyotik, 10^{-7} M deksametazon, 25 µM L-askorbik asit ve 10 ng/mL TGF- β 3 içeren α -MEM'den oluşan kondrojenik besi ortamı ile değiştirilmiştir. Kondrojenik farklılaşma çalışması 28 gün devam ettirilmiştir. Kontrol grubu olarak %10 FBS ve %1.2 antibiyotik içeren α -MEM'de kültüre edilmeye devam edilen hücre pelletleri kullanılmıştır. Her 3-4 günde bir tüplerdeki besi ortamı yarı yarıya tazelenmiştir. Kültürün 28. günü kondrojenik farklılaşmayı görüntülemek üzere örnekler alınmıştır. Örneklerin her biri Tissue Freezing Medium (Leica) içerisine gömülmüş ve sıvı azotta 1-2 dk bekletilerek dondurulmuştur. Kesit alınana kadar -80°C saklanan örnekler kriyostat cihazı ile 8-10 µm kalınlığında kesilerek lam üzerine alınmıştır. Kesitler boyamaya kadar -80°C'de saklanabilir. Kıkırdak farklılaşması Safranin O ve Fast Green boyaları ile gösterilmiştir.

Safranin O/Fast Green Boyaması

Boyama işleminde kullanılacak çözeltiler Çizelge 3.3'de sıralanmıştır.

Çizelge 3.3. Safranin O/Fast Green boyamasında kullanılan çözeltiler.

Çözelti	Bileşen	Miktar
%0.02 Fast Green	Fast green	0.05 g
	Distile su	250 mL
%1 Safranin O	Safranin O	2.5 g
	Distile su	250 mL
%1 Asetik asit	%70 Etanol	100 mL
	Asetik asit	1 mL
%10 Nötral formalin tamponu (NFT)	Formalin/Formaldehit	100 mL
	Na ₂ HPO ₄	16 g
	NaH ₂ PO ₄ • H ₂ O	4 g
	Distile su	1 L

Örnekler -80°C'den alınarak %10'luk (v/v) NFT ile 10 dk oda sıcaklığında fiksasyon yapılmıştır. Ardından PBS ile 2 kere yıkama yapılmıştır. Yıkama sonrası %0.02 (w/v) Fast Green ile 2 dk muamele edilmiştir. Ardından %1'lik (v/v) asetik asite daldırılıp 10-15 saniye tutulmuştur. Sonra %1'lik (w/v) Safranin O ile 10 dk muamele edilmiştir. Daha sonra 3 kez distile su ile yıkama yapılmıştır. Yıkama sonrası örnekler 2 kere ksilene daldırılmıştır. Ardından ksilen bazlı kapatıcı (Richard-Allan Scientific™ Cytoseal™ XYL/Thermo Scientific) ile kapatılarak mikroskop altında incelenmiştir.

3.4.6. Akış Sitometrisi Analizi

Karakterizasyon basamağının son işlemi olarak tez kapsamında kullanılan dördüncü pasajdaki AKH'lere akış sitometrisi analizi yapılmıştır. Analiz, Kocaeli Üniversitesi Kök Hücre ve Gen Tedavileri Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde (KÖGEM) yaptırılmıştır. Mezenkimal kök hücrelerde bulunması ve bulunmaması gereken yüzey antijenlerinden bazıları pozitif antijenler CD90, CD73, CD105 ve negatif antijenler CD34, CD45, CD11b olarak belirlenmiş ve akış sitometrisi analizi ile varlıkları gösterilmiştir.

3.5. Doku İskeleleri ile Yapılan Hücre Kültür Çalışmaları

Doku iskelelerinin kemik doku mühendisliğindeki kullanım potansiyellerini araştırmak ve MKH-iskele etkileşimlerini gözlemlemek amacıyla *in vitro* hücre kültürü çalışmaları gerçekleştirilmiştir. İzole edilen AKH ve KiMKH önce flasklarda çoğaltılmış, kültür ortamı olarak %15 FBS, %1.2 antibiyotik (penisilin-streptomisin, amfoterisin-B, gentamisin) içeren α -MEM besi ortamı kullanılmıştır. Yeterli hücre sayısına ulaşıldığında pasaj 5'deki hücreler iskelelere ekilmek üzere yüzeyden kaldırılmıştır.

3.5.1. Doku İskelelerinin Sterilizasyonu

Çalışmada kullanılan 3 grup doku iskelesinin (kitosan, HAp/kitosan ve B-HAp/kitosan) her biri ultra saf su ile hazırlanmış %70'lik (v/v) etanol içerisinde vakum etüvünde çöktürülerek 2 saat oda sıcaklığında bekletilmiştir. Ardından doku iskeleleri, yapıdaki etanolü uzaklaştırmak amacıyla steril PBS ile 3x5 dk yıkanmıştır. Yıkama sonrası doku iskeleleri kültür kaplarına yerleştirilerek her iki yüzeyi 45 dk UV ışığı altında bekletilmiş ve böylece sterilizasyon işlemi tamamlanmıştır. Hücre ekiminden önce steril edilen iskeleler %10 FBS, %1.2 antibiyotik içeren α -MEM şartlandırma ortamı içerisinde serum proteinleri ile etkileşmeleri için 1 gece %95 nem ve %5 CO₂ içeren inkübatörde tutulmuştur.

3.5.2. Fibronektin İmmobilizasyonu

Hücre tutunmasını arttırmak amacı ile doku iskelelerine fibronektin (Fn) immobilizasyonu yapılmıştır. Hücre kültürü çalışmaları fibronektin immobilize edilen ve edilmeyen olmak üzere iki grup iskele ile gerçekleştirilmiştir. İmmobilizasyon işleminde kullanılan çözeltiler aşağıda sıralanmıştır.

0.1 M MES çözeltisi

MES (4-Morpholineethanesulfonic acid sodium salt)	0.65 g
Ultra saf su	30 mL

2 mM EDC ve 5mM NHS çözeltisi

EDC (1-Ethyl-3-(3 dimethylaminopropyl) carbodiimide)	0.00767 g
NHS (N-hydroxysuccinimide ester)	0.0115 g
MES çözeltisi	20 mL

EDC ve NHS, proteinlerin karboksil grupları ile reaksiyona girerek aktive olmalarına neden olmaktadır. MES çözeltisi ultra saf suda hazırlandıktan sonra EDC/NHS bu çözelti içerisinde çözülmüştür. Hazırlanan çözelti laminar akışlı kabin içerisinde 0.20 µ filtreden geçirilerek sterillemiştir. 100 µg/mL Fn, EDC/NHS içeren steril MES çözeltisine eklenmiş ve 20 dk oda sıcaklığında çalkalamalı inkübatörde karıştırılmıştır. Ardından hazırlanmış olan protein çözeltisi, kitosan yüzeyinde bulunan amino grupları ile reaksiyonu gerçekleştirmek üzere iskele başına 100 µL olacak şekilde, sterilizasyonu tamamlanmış doku iskelelerine ilave edilmiştir. Fn bağlanması için doku iskeleleri 4 saat oda sıcaklığında laminar akışlı kabin içerisinde bekletilmiştir. 4 saat sonunda 8x5 dk steril PBS ile yıkama yapılmıştır. Yıkama sonrası Fn bağlanmış doku iskeleleri %10 FBS, %1.2 antibiyotik içeren α-MEM şartlandırma ortamı içerisinde serum proteinleri ile etkileşmeleri için 24 saat %95 nem ve %5 CO₂ içeren inkübatörde bekletilmiştir.

3.5.3. Doku İskelesi Yüzeyine Bağlanan Amino Gruplarının Ninhidrin Yöntemi ile Tayini

Fibronektin immobilizasyonunun başarılı bir şekilde gerçekleştiğini tayin etmek için ninhidrin yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntem ile iskele yüzeylerine bağlanan amino grupların varlığı belirlenmektedir [120]. Bu işlem için etanol (%100) içerisinde 1 mol/L derişiminde ninhidrin çözeltisi (w/v) hazırlanmıştır. Fibronektin immobilize edilen ve edilmeyen iskeleler ninhidrin çözeltisi ile 1 dk süreyle muamele edilmiştir. Ardından iskeleler koyu cam şişelere konularak 70°C'deki su banyosunda 10 dk süreyle bekletilmiştir. Daha sonra, her bir örneğin üzerine 2 mL THF ve 2 mL izopropanol eklenerek ultrasonik karıştırıcı yardımı ile örneklerin iyice çözünmesi sağlanmıştır. Her bir örneğin, UV-VIS Double Beam PC (Labomed, Inc. ABD) ile 560 nm dalga boyunda absorban değerleri ölçülmüştür.

3.5.4. Hücre Ekimi ve Osteojenik Farklılaşma

Fibronektin immobilizasyonundan 24 saat sonra hücre ekimine geçilmiştir. Hücreler, 50 µL besi ortamı içerisinde, 2.5x10⁵ hücre/mL hücre yoğunluğu olacak şekilde doku iskelelerine ekilmiş ve CO₂ inkübatöründe kültüre edilmiştir.

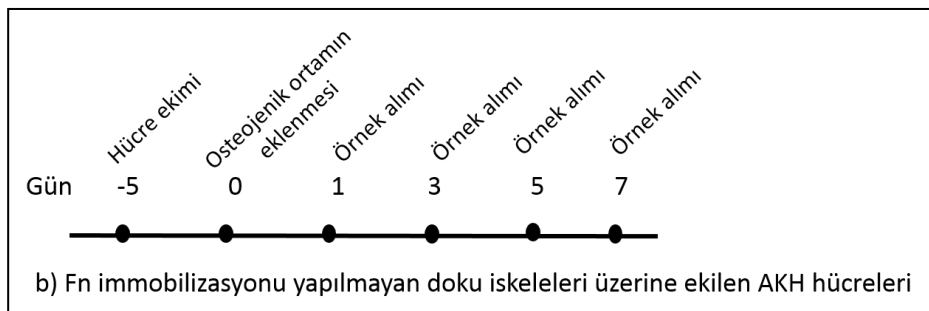
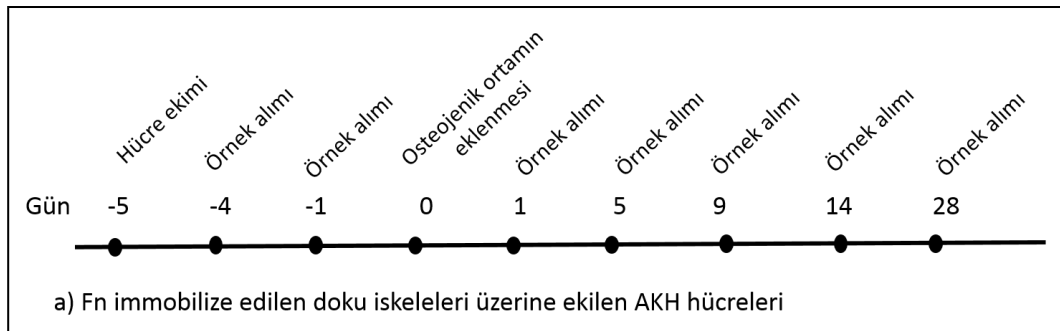
Kültürün 5. günü doku iskelelerinin üzerinde bulunan ortam çekilmiş ve yerine %10 FBS, %1.2 antibiyotik, 25 µM L-askorbik asit, 5 mM β-gliserol fosfat ve 10 nM deksametazon içeren α-MEM'den oluşan osteojenik farklılaşma

ortamı konulmuştur. Kültür süresi boyunca iskelelerin, içerisinde bulunduğu ortam 2-3 günde bir yarı yarıya değiştirilerek tazelenmiştir. Osteojenik farklılaşma çalışması 28 gün devam ettirilmiştir.

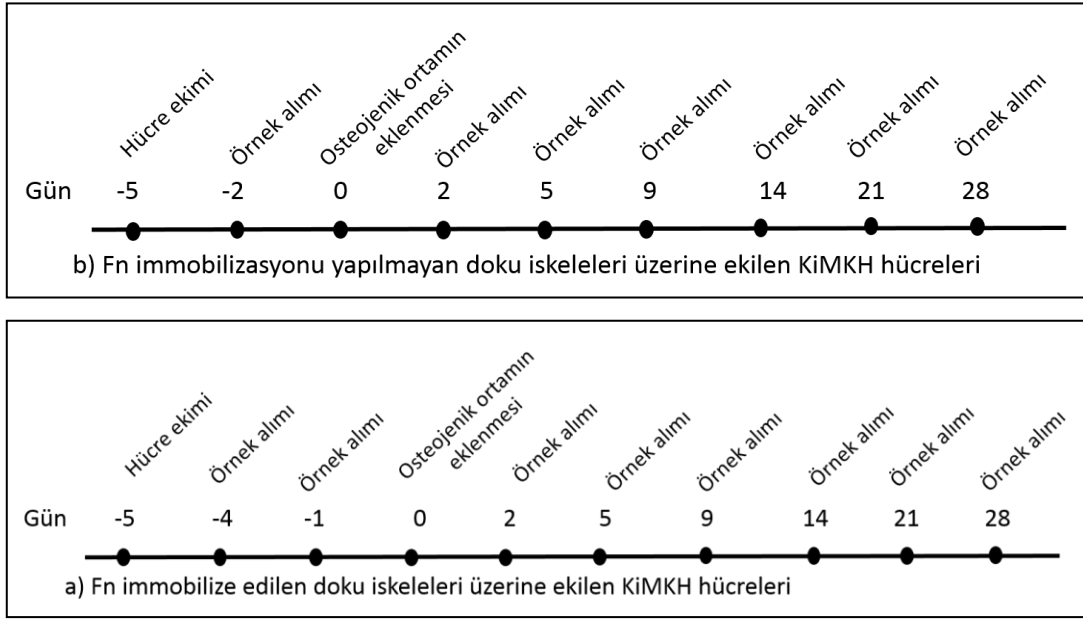
3.5.5. MTT Analizi

AKH ve KiMKH hücrelerinin doku iskeleleri üzerindeki canlılığı ve mitokondriyal aktiviteleri MTT analizi ile kültür süresinin farklı zamanlarında belirlenmiştir. Canlı hücrelerin mitokondrisinde sarı renkli MTT çözeltisi, mitokondriyal dehidrogenaz enzimi ile mor renkli formazan kristallerine dönüştürülmektedir. Oluşan formazan kristallerinin çözünmesiyle elde edilen çözelti absorbansı hücre canlılığı ile doğru orantılıdır. MTT analizi için kültür ortamı iskeleden uzaklaştırıldıktan sonra her bir göze 600 µL serumsuz besi ortamı ve 60 µL MTT çözeltisi (2.5 mg/mL PBS) eklenmiştir. Hücreler 37°C'de 3 sa boyunca inkübe edilmiş, daha sonra doku iskeleleri üzerindeki ortam uzaklaştırılmış ve iskeleler başka bir 24 gözlü kültür kabına aktarılmıştır. Her bir göze 400 µL 0.04 M HCl içeren isopropanol çözeltisi eklenerek oluşan formazan kristallerinin çözünmesi sağlanmıştır. Elde edilen mor renkli çözeltiden 200 µL alınarak, 690 nm referans olmak üzere 570 nm'de mikropilaka okuyucu ile optik yoğunluk belirlenmiştir.

Çizelge 3.4. AKH'lerine ait hücre kültürü zaman çizelgesi.



Çizelge 3.5. KiMKH'lerine ait hücre kültürü zaman çizelgesi.



3.5.6. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi

Hücrelerin doku iskelelerindeki morfolojilerini ve hücre-doku iskelesi, hücre-hücre etkileşimlerini belirlemek için, kültürün osteojenik ortam eklenmeden önceki gün ve osteojenik ortam eklendikten sonra 4., 7., 14. ve 21. günlerinde, SEM (Zeiss Evo 50, Almanya) görüntüleri alınmıştır. Örneklerin hazırlanması için öncelikle doku iskeleleri üzerindeki kültür ortamı uzaklaştırılmış ve iskeleler iki kez (2 dk) PBS (pH=7.4) ile yıkanmıştır. Daha sonra doku iskeleleri % 2.5'lik (v/v) glutaraldehit çözeltisi ile 30 dk boyunca muamele edilmiş ve böylece hücrelerin fiksasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Örnekler analize kadar PBS içerisinde 4°C'de saklanmıştır. SEM analizinden önce, doku iskeleleri PBS ile yıkanmış ve iskeleler sırasıyla %30, %50, %70, %90 ve %100'lük (v/v) etanol çözeltilerinde 2'şer dk bekletilerek dehidrasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. İskeleler daha sonra hekzametildisilazan (HMDS) içerisinde 5 dk bekletilmiştir. Örnekler, oda sıcaklığında bir gün kurutulduktan sonra altın-paladyum ile kaplanmış ve SEM görüntüleri alınmıştır.

3.5.7. RT-PCR Analizi

Doku iskeleleri üzerinde kültüre edilen hücrelerin osteojenik farklılaşmasını gen ifadesi düzeyinde belirlemek için RunX2, KOL-I, β -aktin, osteopontin (OPN) ve osteonektin (ON) ekspresyon seviyeleri gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) (Roche, Almanya) ile belirlenmiştir.

Kültürün 14. ve 28. günlerinde doku iskeleleri kültür ortamından alınarak steril Eppendorf tüplerine (1.5 mL) yerleştirilmiş, her bir örneğin üzerine 1 mL Trizol eklenerek mikromakas yardımı ile örnekler parçalanmış, 25-30 s vortekslenmiş ve oda sıcaklığında 30 dk bekletildikten sonra -80°C'ye alınmıştır. RNA izolasyonu gerçekleştirileceği zaman örnekler çözünmesi için yaklaşık 30 dk oda sıcaklığında bekletilmiş ve bu süre içinde iki kere vortekslenmiştir. Daha sonra örneklerin üzerlerine 200 µL kloroform eklenmiş, çalkalanmış ve oda sıcaklığında 3 dk inkübe edilmiştir. Sonrasında, örnekler 4°C'de 10 dk 13,000 rpm'de santrifüjlenmiş ve üstteki sulu faz yeni bir Eppendorf tüpüne aktarılmıştır.

Üzerinden toplanan sıvı faza eşit olacak şekilde %70'lik etanol eklenmiş ve hafifçe vortekslenildikten sonra RNeasy spin kolonlara aktarılmıştır. 4°C'de 15 s 13,000 rpm'de santrifüjlenmiştir. Daha sonra RNeasy mini kit kullanılarak gerekli basamaklar tamamlanmış ve spin kolona 30 µL RNase-free su eklenerek santrifüjlenmiş ve RNA yeni bir Eppendorf tüpünde toplanmıştır. cDNA sentezi öncesi RNA konsantrasyonları NanoDrop2000c (Thermo Scientific) ile ölçülmüştür.

cDNA sentezi için Applied Biosystems Kit cDNA (ABD) kiti kullanılmıştır. RT-PCR analizi, SolisBioDyne 5xHot FirePol® EvaGreen®qPCRMix Plus (Estonya) kiti kullanılarak LightCycler®NanoInstrument (Roche, Almanya) cihazında yapılmıştır. cDNA sentezi reverse transkripsiyon ile 40°C'de 120 dk'da gerçekleştirilmiştir. Ardından, PCR analizi, aktivasyon basamağı 95°C'de 15 dk'da, uzatma basamağı 95°C'de 15 s, 60°C'de 20s, 72°C'de 20 s ve ayrılma basamağı 60°C'de 4s ve 95°C'de 20 s olmak üzere 45 döngüde gerçekleştirilmiştir.

“Housekeeping gen” olarak β-aktin kullanılmıştır. Yapılan analizin sonuçları bağıl gen ekspresyonu olarak verilmiştir. Tüm veriler $2^{-\Delta\Delta CT}$ metoduna göre hesaplanmış, HAp/kitosan doku iskelesi üzerindeki hücrelerin ilgili gen ekspresyon seviyeleri temel alınarak, B-HAp/kitosan grubu ise bunun katları şeklinde değerlendirilmiştir. Çalışmada kullanılan genlerin primer dizileri Çizelge 3.6'da verilmiştir.

Çizelge 3.6. Polimeraz zincir reaksiyonu için primer dizileri.

<i>Kollajen I</i>	Forward primer 5'-CAAGATGTGCCACTCTGACT-3'
	Reverse primer 5'-TCTGACCTGTCTCCATGTTG-3'
<i>β-aktin</i>	Forward primer 5'-GTGCTATGTTGCCCTAGACTTCG-3'
	Reverse primer 5'-GATGCCACAGGATTCCATACCC-3'
<i>RunX2</i>	Forward primer 5'-GCATGGCCAAGAAGACATCC -3'
	Reverse primer 5'-CCTCGGGTTTCCACGTCTC -3'
<i>Osteopontin</i>	Forward primer 5'-CACTTTCACTCCAATCGTCCCTAC-3'
	Reverse primer 5'-ACTCCTTAGACTCACCGCTCTTC-3'
<i>Osteonektin</i>	Forward primer 5'-ACAAGCTCCACCTGGACTACA-3'
	Reverse primer 5'-TCTTCTTCACACGCAGTTT-3'

3.6. İstatistiksel Analiz

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

4. DENEYSEL SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Bu bölümde, tez kapsamında yapılan deneysel çalışmalardan elde edilen sonuçlar sunulmuş ve ortaya çıkan bulgular üzerine tartışmalar yapılmıştır. Öncelikle, kemik doku mühendisliği uygulamalarında kullanılmak üzere kitosan doku iskelelerinin ve mikrodalga yardımıyla HAp/kitosan ve B-HAp/kitosan kompozit doku iskelelerinin üretimi ve karakterizasyonu için yapılan çalışmaların sonuçları sunulmuştur. Ardından, hücre kültür çalışmalarında kullanılacak olan sıçan kemik iliği ve adipoz doku kökenli mezenkimal kök hücrelerin izolasyonu ve karakterizasyonu ile ilgili sonuçlara yer verilmiştir. Üçüncü bölümde mezenkimal kök hücreler ile durgun koşullarda *in vitro* ortamda yürütülen hücre kültür çalışmalarının sonuçlarına değinilmiştir.

4.1. Doku İskelelerinin Üretimi ve Karakterizasyonu

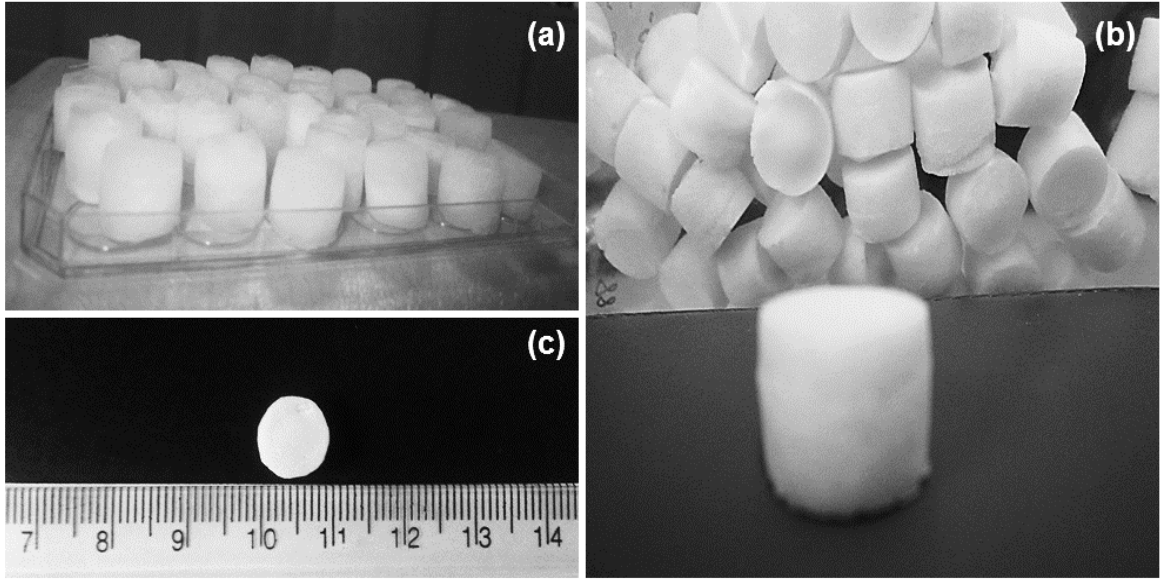
Sunulan tez çalışmasında kitosan doku iskeleleri ve HAp/kitosan, B-HAp/kitosan kompozit doku iskeleleri hazırlanmıştır. Bu bölümde doku iskelelerinin üretimi ve karakterizasyonundan bahsedilmiştir.

4.1.1. Kitosan Doku İskelelerinin Üretimi

Kitosan, eklem bacaklıların kabuklarının ekstraksiyonu ile kitin eldesi ve ardından kitinin deasetilasyonu ile üretilmektedir. Kitosanın, deasetilasyon derecesi (% 40-98) ve molekül ağırlığı (25-2000 kDa) üretim koşullarına bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. Yüksek deasetilasyon derecesine sahip olan kitosanın hücrelerin mitojenik aktivitesini arttırdığı bilinmektedir. Kitosan, birçok metal iyonlarına karşı yüksek düzeyde afinite göstermekte ve kompleks oluşturabilmektedir. Ayrıca, kitosan; biyobozunurluğu, biyoyumluluğu, alkali çözeltilerdeki stabilitesi, toksik olmaması, antibakteriyal özelliği ve yara iyileşmesinde görev alması nedeniyle doku mühendisliği uygulamalarında öne çıkan bir biyomalzemedir. Kitosanın sahip olduğu bu üstün özellikler göz önüne alınarak, sunulan tez çalışmasında doku iskelelerinin ana malzemesi olarak %75-85 deasetilasyon derecesine sahip kitosandan yararlanılmıştır.

Doku mühendisliği çalışmalarında kitosan doku iskeleleri gaz köpükleştirme, dondurarak-kurutma, faz ayırımı ve çözücü dökümü/parçacık uzaklaştırma gibi çeşitli yöntemlerle hazırlanmaktadır. Sunulan tez çalışmasında gözenekli kitosan doku iskeleleri dondurarak-kurutma yöntemi ile hazırlanmıştır.

Bu yöntem, homojen gözenekliliğin elde edilmesi, üretim koşullarının kolay ve ucuz olması gibi avantajlara sahiptir. Dondurarak-kurutma yönteminde, dondurma basamağında, çözelti içerisinde buz kristalleri oluşmakta, ardından oluşan kristaller sublimasyon ile uzaklaştırılarak içsel bağlantılara sahip gözenekli yapılar elde edilmektedir. Doku iskelelerinin üretimi, grubumuz tarafından önceden belirlenmiş olan ve Bölüm 3.2.1’de açıklanan koşullarda gerçekleştirilmiştir [102]. Üretim sırasında elde edilen kitosan doku iskelelerinin görüntüleri Şekil 4.1’de verilmiştir.



Şekil 4.1. Dondurarak-kurutma yöntemi ile hazırlanmış kitosan doku iskelelerinin görüntüleri (a) etanolle stabilizasyon sonrası (b) stabilizasyon basamağını takiben yapılan dondurarak-kurutma işlemi sonrası (c) hücre kültür çalışmalarında kullanılan iskelelerin boyutu.

4.1.2. HAp ve B-HAp Üretimi ve Karakterizasyonu

Hidroksiapatit kemik mineralinin doğal bileşenidir ve kemik onarımı ve güçlendirilmesi için greft malzeme olarak kullanılmaktadır. Klinik çalışmalar HAp çimentosunun biyolojik olarak uyumlu ve enfeksiyonlara karşı dayanıklı olduğunu göstermiştir. Aynı zamanda, HAp ile kaplanan implantların başarı oranının yükseldiği bilinmektedir.

Kotobuki ve ark. [121] yaptıkları çalışmada plazma sinterleme yöntemi ile HAp seramiği üretmişlerdir. Bu seramiklerin, sıçan kemik iliği MKH'lerinin tutunması, üremesi ve farklılaşmasını desteklediğini tespit etmişlerdir.

Zhao ve ark. [122] yaptıkları çalışmada HAp/kitosan-jelatin 3-boyutlu gözenekli iskelelerini faz ayırımı yöntemi ile üretmişler ve HAp'in insan MKH'lerinin mikroçevre oluşumu üzerine etkisini ve 3-boyutlu doku gelişimini *in vitro* olarak incelemişlerdir. Kitosan-jelatin kompozitinde HAp varlığının MKH tutunmasını ve 3-boyutlu gözenekli iskelelerde uzun dönemde üreyip büyümelerini desteklediği belirtilmiştir. Bu kompozit doku iskeleleri üzerinde üreyen MKH'lerin osteojenik farklılaşma kapasitelerinin arttığı ve bu hücrelere özgü olan multipotensi özelliklerini sürdürdükleri görülmüştür.

HAp ve B-HAp üretimi mikrodalga enerjisinden faydalanarak biyomimetik olarak yapay vücut sıvısında çöktürme yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Yapay vücut sıvısı (simulated body fluid, SBF), insan kan plazmasındaki değerlere benzer iyon konsantrasyonları içeren süper doygun yarı kararlı bir çözeltilidir. Yapay vücut sıvısının doygunluk seviyesine bağlı olarak kalsiyum fosfat (Ca/P) çekirdeklenmesi ve çökmesi yavaş gerçekleşmektedir [123]. Bu durum göz önünde bulundurularak, sunulan tez çalışmasında kan plazmasına göre 10 kat daha fazla kalsiyum ve fosfat konsantrasyonu içeren 10xSBF benzeri çözeltilinin kullanılması kararlaştırılmıştır. 10xSBF benzeri kalsiyum fosfat çözeltisi Maviş ve ark. [124] tarafından belirlenen ve Bölüm 3.2.2'de verilen reçeteye göre hazırlanmıştır.

SBF ile HAp üretimi oda sıcaklığında 2-6 saat sürede gerçekleşirken [124], mikrodalga ışınması varlığında dakikalar içerisinde gerçekleştirilmiştir. Bu sonuç, mikrodalga ile dışarıdan verilen enerji yardımıyla atomik hareketin hızlandırılması ve difüzyon bariyerinin düşürülmesi ile elde edilmiştir. Böylece, HAp oluşum mekanizması sırasındaki ara basamakların atlanması sağlanmıştır. Sonuç olarak, kemik yapısını taklit eden hızlı, kolay ve etkin bir biçimde yüksek miktarlarda biyoyumlu kemik benzeri hidroksiapatit yapısı elde edilmiştir. Kısaca, mikrodalga enerjisinin SBF içerisindeki iyonlar ile etkileşimi sonucu istenmeyen fazların oluşumunun engellenmesi ve kısa sürede HAp yapısının elde edilmesi gerçekleştirilmiştir [15].

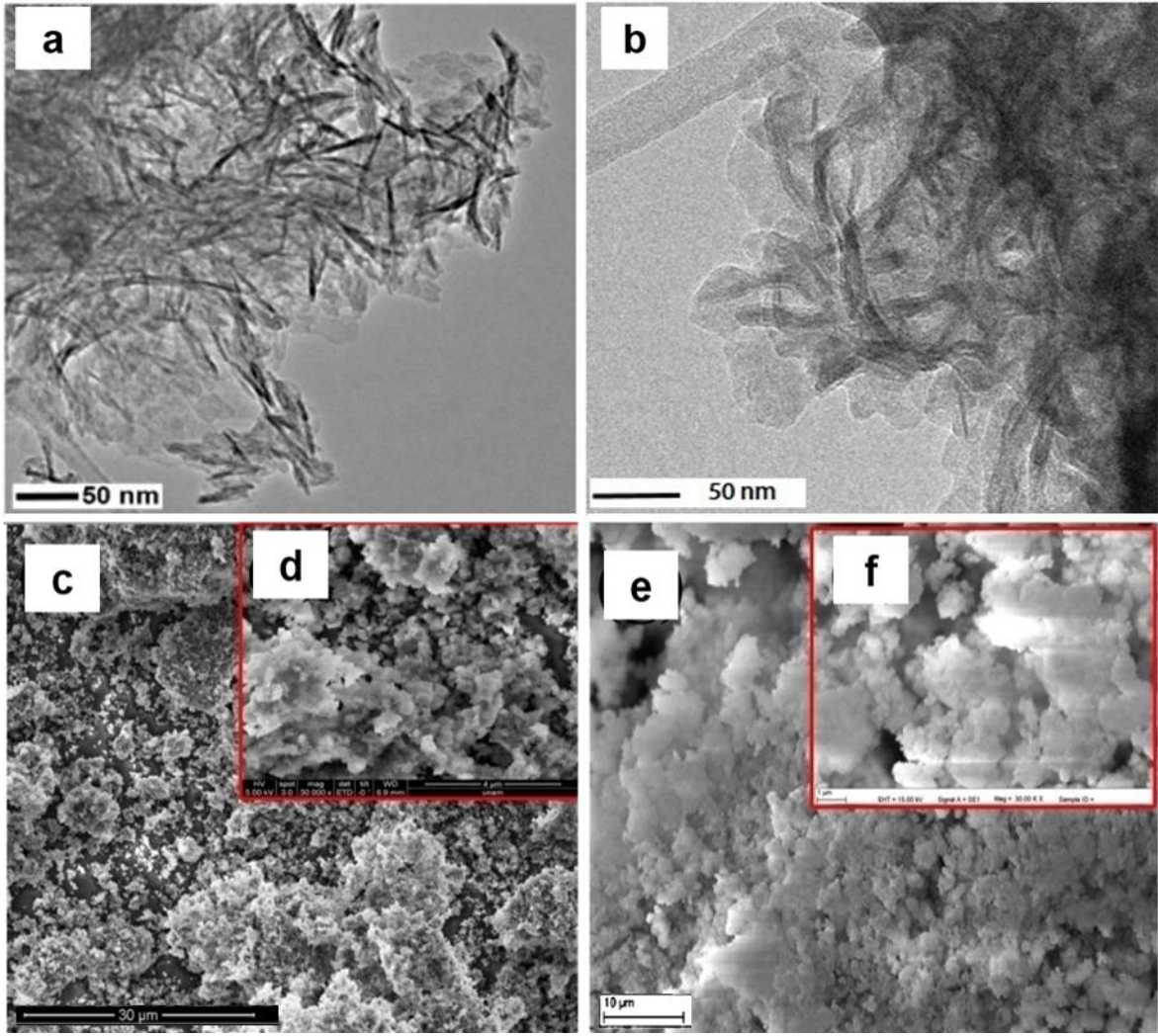
Borun osteoindüktif etkilere sahip olduğu ve hücrelerin osteojenik farklılaşmasını desteklediği bilinmektedir. Kemikler üzerindeki etkisinin moleküler mekanizması daha tam olarak bilinmese de, borun hücre dışı matris mineralizasyonundan sorumlu kalsiyum birikimini arttırdığı düşünülmektedir [11].

Son yıllarda yapılan çalışmalarda borun, hidroksiapatitin yapısına katılarak kullanılması gündeme gelmiştir. Literatüre bakıldığında, bor katkılı hidroksiapatitin farklı kimyasal yöntemler ile sentezlendiği çalışmalar mevcutken, hücreler ile olan etkileşimini belirleyen bir çalışmaya rastlanılmamaktadır. Ternane ve ark. [125] yaptıkları çalışmada katı hal reaksiyonu ile, Nakamura ve ark. [126] ise ultrasonik spreylendirme yöntemi ile bor katkılı HAp sentezlemişler ve bu biyomalzemenin kanser tedavisinde kullanabileceğini belirtmişlerdir.

Sunulan tez çalışmasında HAp üretiminde olduğu gibi bor katkılı HAp üretiminde de daha önce bahsedilen birçok avantajlara sahip olan mikrodalga yardımı ile biyomimetik olarak SBF'den çöktürme yöntemi tercih edilmiştir. Yeterli düzeyde borun HAp yapısına katılması amacı ile SBF'ye borik asit (10 mg/mL) ilavesi yapılmış (B-SBF) ve gerekli pH değerleri (6.5-7.4) sağlandıktan sonra, mikrodalga yardımı ile B-HAp'in çökmesi sağlanmıştır.

Üretilen HAp ve B-HAp örneklerinin karakterizasyonları daha önce grubumuz tarafından yapılmıştır [15, 114]. HAp ve B-HAp örneklerinin morfolojileri ve kristal yapıları TEM görüntüleri ile belirlenmiştir. Şekil 4.2 a'da görüldüğü gibi HAp nanopartikülleri iğne benzeri morfolojiye sahiptir. Şekil 4.2 b incelendiğinde ise bor katkısıyla birlikte bu nanopartiküllerin çubuk benzeri görünüm alarak kristal yapılarının değiştiği görülmektedir. Ayrıca, HAp'in partikül boyu ortalama 40-50 nm iken, B-HAp'in partikül boyu 20-30 nm'ye kadar küçülmüştür.

HAp ve B-HAp örneklerinin morfolojileri TEM görüntülerinin yanı sıra SEM görüntüleri ile de incelenmiştir. Şekil 4.2 c, d, e ve f'de verilmiş toz halindeki HAp ve B-HAp'in görüntüleri incelendiğinde, örneklerin bir araya gelerek kümeler oluşturdukları ve yapıları arasında morfolojik farklılıkların olduğu görülmektedir. Fotoğraflar, çöktürme sırasında ara fazların oluşmadığını ve tuz kristallerinin yapılan yıkamalar sonucu ortamdaki uzaklaştığını göstermektedir.



Şekil 4.2. Mikrodalga desteği ile üretilen HAp (a) ve B-HAp (b) örneklerine ait TEM görüntüleri, HAp (c ve d) ve B-HAp (e ve f) SEM görüntüleri.

Üretilen B-HAp'in yapısındaki B, Ca ve P, HAp'in yapısındaki Ca ve P oranları endüktif eşleşmiş plazma optik emisyon spektrometresi (ICP-OES) ile belirlenmiştir. Doğal kemiğin ağırlıkça %34.8'i Ca iyonundan, %15.2'si ise P iyonundan oluşmaktadır ve Ca/P molar oranı yaklaşık 1.71 civarındadır. Stokiyometrik hidroksiapatit ise %39.6 Ca, %18.5 P iyonu içerir ve Ca/P oranı yaklaşık 1.67'dir. Çizelge 4.1'de B-HAp ve HAp örneklerinin yapısında bulunan bileşenlerin oranlarına ait veriler görülmektedir.

Doğal kemik yapısındaki apatitte bulunan %4-8 karbonat içeriği ile karşılaştırıldığında, mikrodalga ile üretilen hidroksiapatit yapısının karbonat içeriği açısından kemik yapısı ile benzerlik gösterdiği belirlenmiştir (Çizelge 4.1).

B-HAp yapısındaki karbonat içeriğinin azalmasının nedeni, CO_3^{2-} iyonlarının ortamda bulunan BO_3^{3-} iyonları ile yarışmalı olarak OH^- ya da PO_4^{3-} iyonları ile yer değiştirmesidir.

Çizelge 4.1. HAp ve B-HAp örneklerinde bulunan bileşenlerin oranları.

	Ca (%) (w/w)	P (%) (w/w)	B (%) (w/w)	CO_3^{2-} (%) (w/w)	Ca/P (Molar oran)
HAp	31.50±0.40	15.10±0.30	---	7.15±0.28	1.61
B-HAp	28.10±0.30	15.55±0.40	1.15±0.10	4.30±0.10	1.40

4.1.3. Kompozit Doku İskelelerinin Üretimi

Kitosan sınırlı biyoaktiviteye sahip olduğu için doğal kemik yapısında bulunan biyoaktif hidroksiapatit ile kompozit oluşturularak kullanılmaktadır. Hidroksiapatitin, kitosanın polimer yapısı içerisine katılması biyoaktiviteyi arttırmak açısından oldukça avantajlıdır. HAp/kitosan kompozitlerinin geliştirilmesi için birçok çalışma yapılmıştır [15, 107]. HAp/kitosan kompozitleri genellikle polimer çözeltileri içerisine HAp tozlarının karıştırılması ile veya HAp ile kaplama şeklinde üretilmekte, ya da iskele üretimi sırasında HAp nanokristalleri oluşturulmaktadır. Kaplama için kullanılan yapay vücut sıvısından homojen apatit çekirdeklenmesi için gerekli bariyer çok yüksektir, heterojen çekirdeklenme için ise tetikleyecek bir uyarı gereklidir. Bu nedenle SBF ile yapılan kaplama çalışmalarının çoğunda, kaplamanın etkinliğinin artırılması için tetraetil orto-silikat (TEOS) gibi çekirdeklendirici ajan kullanılarak ek işlemler gerçekleştirilmektedir.

SBF ile kaplama yapılırken literatürden farklı olarak mikrodalga enerjisinden faydalanılmıştır. Mikrodalga enerjisi kitosan yapısında bulunan OH^- ve NH_2^+ gibi fonksiyonel grupları uyararak bu gruplar üzerinden kalsiyum ve fosfat iyonlarının bağlanmasını sağlamaktadır. Böylelikle, kitosanın fonksiyonelleştirilmesine ya da herhangi bir kimyasal işlem uygulanmasına gerek kalmamaktadır. Kitosan mikrodalgaya maruz kaldığında, yapısında bulunan OH^- ve NH_2^+ gibi fonksiyonel gruplar mikrodalga enerjisini absorblayarak dielektrik ısınmaya neden olurlar. Bu yüksek enerji OH^- ve NH_2^+ bağlarının kırılmasını ve böylece radikal uçların oluşmasını sağlar. Ayrıca kitosan bu yüksek enerjiyi belirli bir bölgede depolayamayacağından, enerji hızla SBF içerisindeki su ve iyonlara aktarılmakta ve bu enerji aktarımı da çekirdeklenmeyi uyarmaktadır.

Mikrodalga enerjisinin sağladığı bir diğer avantaj da mikrodalğanın HAp'in çökmesi için gerekli Gibbs serbest enerjisini düşürmesi ve böylelikle kitosanın aktive olmuş bölgelerinde çekirdeklenmeyi artırarak kaplama süresini kısaltmasıdır. Sonuç olarak mikrodalga enerjisi ile kısa sürede daha etkin bir kaplama elde etmek mümkündür. Ayrıca, bu yöntemle hidroksiapatit ya da bor kaplama, doku iskelesinin sadece üst yüzeyinde kalmamakta gözeneklerin iç bölgelerinde de homojen bir şekilde dağılmaktadır [15].

Osteogenezde önemli bir rol oynayan bor, literatürde sınırlı sayıda çalışmada doku iskelesi yapısına katılmıştır. Wu ve ark. [14] yaptıkları çalışmada bor içeren gözenekli biyoaktif cam doku iskelelerini sentezlemiş ve doku iskeleleri üzerinde osteoblastların davranışlarını incelemişlerdir. Borun, kemik hücreleri ve kemik doku büyümesi üzerindeki etkisinin konsantrasyonuna bağlı olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca, borun doku iskeleleri içine katılmasının osteoblastların KOL-1 ve RunX2 genlerinin ifadesini yükselttiğini belirtmişlerdir.

Sunulan tez çalışmasında grubumuz tarafından daha önce belirlenen ve Bölüm 3.2.2'de bahsedilen koşullarda HAp'in osteokondüktif ve borun osteoindüktif etkileri birleştirilerek biyomimetik yöntemle kitosan doku iskelelerinin kaplanması sağlanmış ve bor katkılı kompozit doku iskeleleri (B-HAp/kitosan) üretilmiştir [114].

4.1.4. Doku İskelelerinin Karakterizasyonu

Hücre kültür çalışmalarında kullanılan doku iskeleleri 2 mm kalınlığa ve 9 mm çapa sahip olacak şekilde hazırlanmıştır. Şekil 4.3 (1)'de çalışma kapsamında üretilen doku iskelelerine ait görüntüler verilmiştir.

Görüntüler incelendiğinde yapılan HAp ve B-HAp kaplamanın (Şekil 4.3 (1) b ve c) iskelede daha yoğun ve sıkı bir görüntüye neden olduğu belirlenmiştir.

Kitosan, HAp/kitosan ve B-HAp/kitosan doku iskelelerinin yüzey morfolojileri SEM görüntüleri ile değerlendirilmiştir. Şekil 4.3 (2) a'da üretilen kitosan doku iskelelerinin içsel bağlantılara sahip gözenekli yapıda olduğu görülmektedir.

Kompozit doku iskelelerinin SEM görüntülerine bakıldığında hem HAp/kitosan (Şekil 4.3 (2) b), hem de B-HAp/kitosan (Şekil 4.3 (2) c) doku iskelelerinin tamamen apatit yapı ile kaplandığı görülmüştür. Ayrıca, elde edilen kaplamanın hem çap, hem de kalınlık boyunca oldukça homojen olduğu belirlenmiştir.

Doku iskelelerinin gözeneklilik değerleri incelendiğinde en yüksek gözenekliliğin kitosan iskeleye ait olduğu görülmektedir (Çizelge 4.2). Kompozit iskeleler kendi aralarında karşılaştırıldığında B-HAp/kitosan iskelenin gözenekliliğinin HAp/kitosan iskeleden daha fazla olduğu görülmüştür. Bu farkın, B-HAp/kitosan kaplamanın yapısındaki apatitin daha küçük kristallerden oluşmasından kaynaklandığı sonucuna varılmıştır. Böylece gözenekler daha az kapanmış ve gözeneklilik daha az etkilenmiştir. Yüksek gözenek hacmi ve boyutuna sahip iskelelerde deformasyona uğrayacak alan büyüdüğünden, kompozit yapılarda gözenekliliğin bir miktar azalması mekanik dayanımın artmasına neden olmaktadır. İskelelerin ortalama gözenek çapı 100-150 µm olarak belirlenmiştir. Genel olarak tüm iskeleler değerlendirildiğinde, %80 ve üzeri gözenekliliğin iskele içine hücre penetrasyonunu, besin ve metabolit için gerekli olan kütle aktarımını sağlayabilecek düzeyde olduğu belirlenmiştir.

Doku iskelelerinin şişme oranları Eşitlik 4.1. kullanılarak kuru temelde belirlenmiştir

$$\text{Şişme oranı} = (W - W_0) / W_0 \quad (4.1)$$

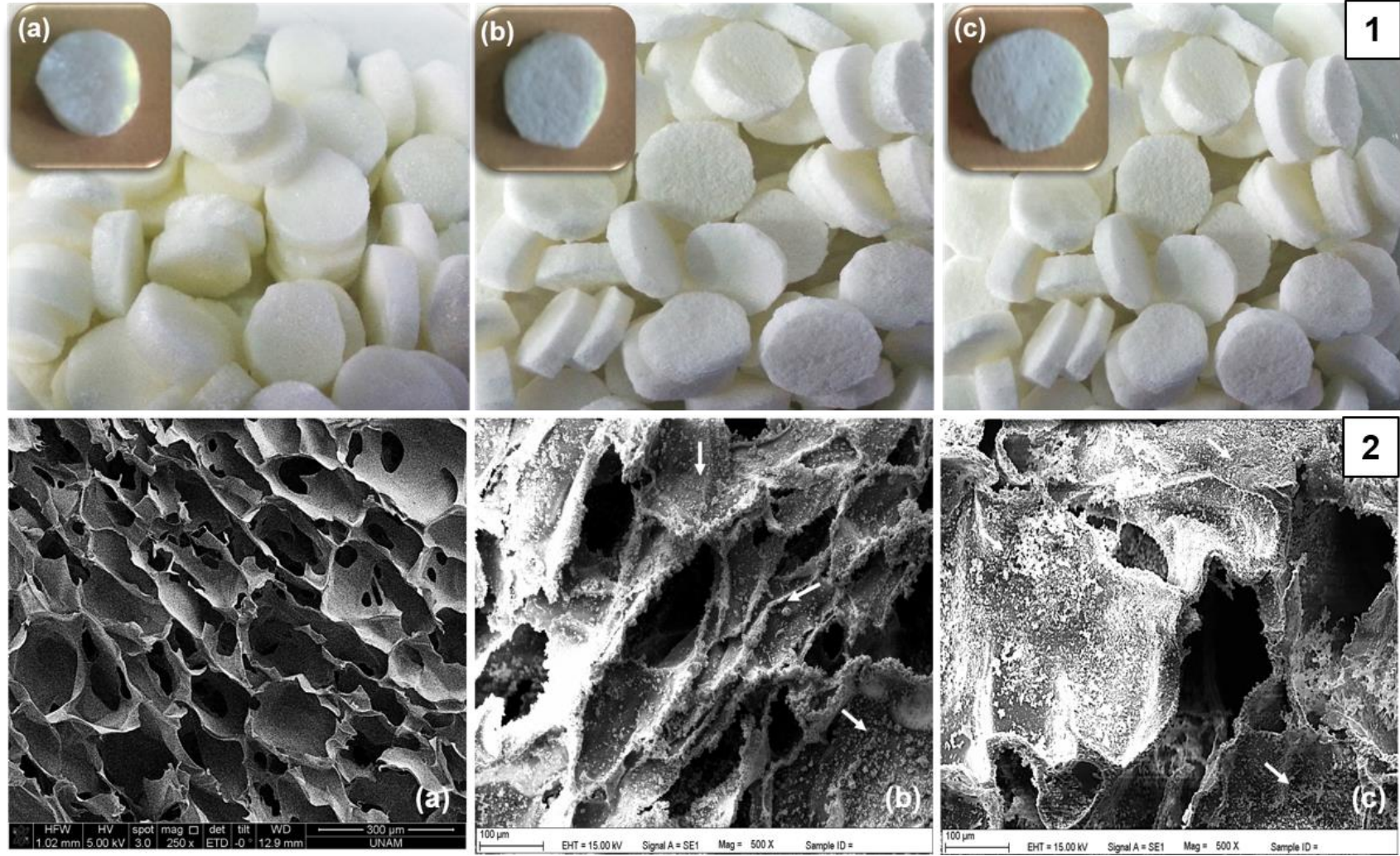
Eşitlikteki W kitosan iskelenin yaş ağırlığını, W_0 ise kuru ağırlığını göstermektedir. Denge şişme oranları incelendiğinde, HAp/kitosan doku iskelesinin şişme oranının kitosan doku iskelesine benzer olduğu, ancak B-HAp/kitosan doku iskelesinin şişme oranının kitosan doku iskelesine göre yaklaşık olarak %20 daha az olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.2). Denge şişme oranının azalmasında, HAp kristallerine (40-50 nm) göre daha küçük çaplarda oluşan bor katkılı hidroksiapatit kristalleriyle (20-30 nm), kitosan doku iskelesinde daha homojen ve sıkı bir kaplama yapılabilmesinin etkisi olduğu düşünülmüştür.

ICP-OES sonuçlarından yola çıkılarak her bir doku iskelesinde bulunan bor miktarı yaklaşık 20 µg olarak belirlenmiştir.

Doku iskelelerinin karakterizasyon çalışmaları sentezlenen iskelelerin kemik doku mühendisliği açısından uygun kriterlere sahip olduğunu göstermiştir [114].

Çizelge 4.2. Doku iskelelerinin yüzde gözeneklilik ve şişme değerleri.

Doku İskelesi	Gözeneklilik (%)	Denge Şişme Oranı
Kitosan	89.50±1.03	34.90±1.90
HAp/kitosan	81.90±0.76	33.19±1.73
B-HAp/kitosan	85.70±2.57	28.91±1.41



Şekil 4.3. 1) Hücre kültür çalışmalarında kullanılan doku iskelelerinin görüntüleri: (a) Kitosan (b) HAp/kitosan (c) B-HAp/kitosan; 2) Doku iskelelerinin SEM görüntüleri: (a) Kitosan (b) HAp/kitosan ve (c) B-HAp/kitosan.

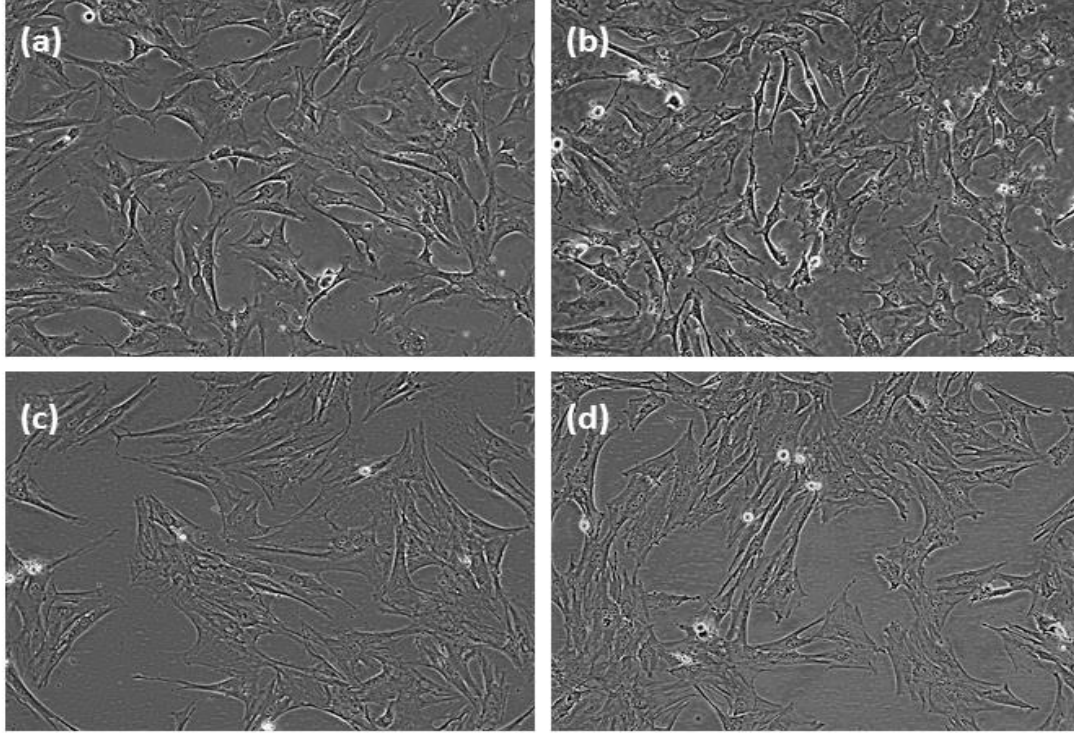
4.2. Hücre Kültür Çalışmaları

Hücre kültür çalışmalarında iki farklı dokudan mezenkimal kök hücre (AKH ve KiMKH) izolasyonu yapılmış ve bu hücrelerin karakterizasyonları tamamlanmıştır. Tez kapsamında sentezlenen kitosan, HAp/kitosan ve B-HAp/kitosan doku iskeleleri kullanılarak, AKH ve KiMKH'ler ile 28 gün boyunca durgun koşullarda hücre kültür çalışmaları yapılmıştır. Kültür süresince yapılan analizler ile mezenkimal hücrelerin hazırlanan doku iskeleleri üzerindeki canlılıkları, morfolojileri ve osteoblastik farklılaşmaları incelenmiştir. Bor katkılı hidroksiapatit kaplı kitosan iskelenin farklılaşmaya etkisi diğer iskeleler ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

4.2.1. AKH ve KiMKH İzolasyonu

Çalışma kapsamında kullanılacak olan kemik iliği ve adipoz doku kökenli mezenkimal kök hücrelerin izolasyonu ve karakterizasyonu literatür bilgisi ışığında gerçekleştirilmiştir. Sprague-Dawley sıçanların adipoz dokusundan izole edilen AKH'ler ve kemik iliği aspiratından izole edilen KiMKH'ler flasklarda kültüre edilmiş ve bu hücrelerin seçici olarak plastik yüzeylere yapışma özelliğinden yararlanılmıştır. Böylece, mezenkimal kök hücreler yüzeye tutunma özellikleri ile süspanse olarak üreyen hematopoetik kök hücrelerden ayrılmıştır. Hematopoetik hücreler ise yıkamalar ile ortamdan uzaklaştırılmıştır. AKH'lerin 1/3 pasaj oranında yaklaşık olarak 3 gün, KiMKH'lerin ise yaklaşık olarak 5 gün içerisinde yüzeyi kapladıkları gözlenmiştir. Çalışma planına göre hücreler 1/2 ya da 1/3 oranında pasajlanmıştır. Şekil 4.4'de gösterilen optik mikroskop görüntülerinde hücrelerin kültür kabının yüzeyine tutunup yayıldıkları ve fibroblast benzeri iğsi bir morfoloji sergiledikleri belirlenmiştir. Kültürde her iki hücre de pasaj 0'da (P0) morfolojik olarak benzer özellikler göstermiştir. AKH'ler KiMKH'lere göre daha ince iğsi yapı sergilerken pasaj oranı ilerledikçe AKH'ler yüzeye mekik şeklinde daha fazla yayılmış, KiMKH'ler ise pasaj 0'daki morfolojilerine benzer özelliklerini sürdürmüşlerdir (Şekil 4.4).

Wagner ve ark. [127] adipoz doku, kemik iliği ve göbek kordon kanından MKH izolasyonu yapmış ve her 3 farklı MKH'nın iğsi bir morfolojiye sahip olduğunu belirtmiştir. Gun-Il ve ark. [128] yaptıkları çalışmada AKH'ın %80-90 doygunluğa KiMKH'den birkaç gün daha erken ulaştığını belirtmiştir. Elde edilen sonuçlar literatür ile karşılaştırıldığında izole edilen hücrelerin benzer özellikler gösterdiği belirlenmiştir.



Şekil 4.4. İzole edilen hücrelerin optik mikroskop görüntüleri: (a) AKH P0 20X (b) KiMKH P0 20X (c) AKH P1 20X (d) KiMKH P1 20X

4.2.2. AKH ve KiMKH Karakterizasyonu

Adipoz dokudan ve kemik iliğinden izole edilen mezenkimal kök hücrelerin karakterizasyon çalışmaları pasaj 5'de gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, hücrelerin morfolojileri ve iskelet organizasyonun belirlenmesi için kristal viyole ve F-aktin/DAPI boyamaları yapılmış, hücreler optik ve floresan mikroskop altında incelenmiştir. Presto Blue analizi ile hücrelerin kültür kaplarındaki üreme davranışları ortaya koyulmuştur. Ayrıca, hücrelerin, kalsiyum birikimleri ALP/VK boyamaları ile, yağ birikimleri Oil Red O boyaması ile, kıkırdak farklılaşması Safranin O/Fast Green boyaları ile gösterilmiş ve akış sitometrisi ile fenotipik karakterleri belirlenmiştir. Senesens analizi ile hücrelerin yaşlanmadıkları ve multipotensi özelliklerini kaybetmedikleri gösterilmiştir. Akış sitometrisi analizi ile AKH'lere özgü yüzey belirteçleri belirlenmiştir.

4.2.2.1. Presto Blue Analizi

Adipoz dokudan ve kemik iliğinden izole edilen mezenkimal kök hücrelerin proliferasyonu ve metabolik aktiviteleri 28 gün boyunca Presto Blue analizi ile takip edilmiştir.

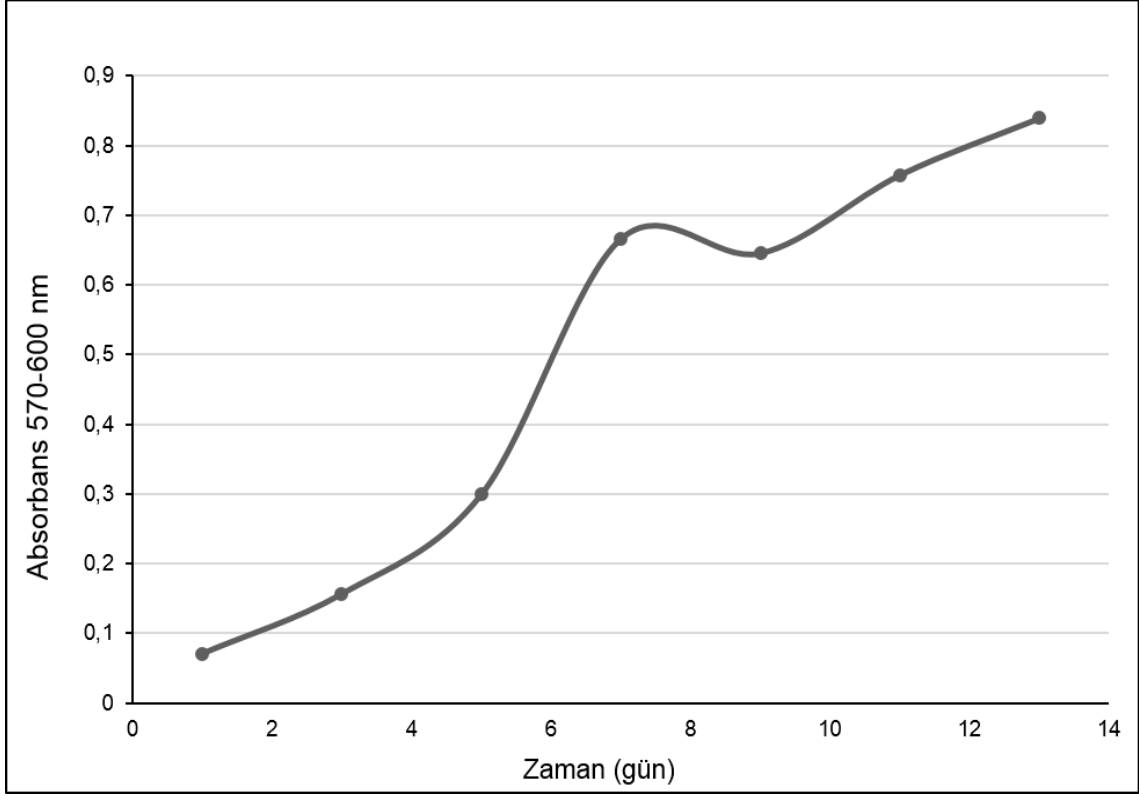
AKH ve KiMKH için oluşturulan kalibrasyon eğrileri **EK-2** ve **EK-3**'te verilmiştir. Kalibrasyon eğrisinde absorbans değerlerine karşılık gelen hücre sayıları Çizelge 4.3'de belirtilmiştir. Absorbans değeri hücre canlılığını belirlemede kullanılan Presto Blue analizi yapılarak belirlenmiştir. AKH'ler aynı yoğunlukta KiMKH'lere göre daha yüksek absorbans vermiştir. Bu da AKH'lerde mitokondriyal aktivitenin daha yüksek olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.3. Presto Blue analizi sonuçları.

HÜCRE SAYISI	ABSORBANS	
	AKH	KiMKH
125 000	0.60	0.30
62500	0.30	0.18
31250	0.17	0.08
16125	0.08	0.04
8000	0.05	0.03
4000	0.02	0.02

AKH ve KiMKH'lerin üreme özelliklerinin belirlenmesi için TCPS yüzeylere ekilen hücrelerin üreme grafiği çizilmiş ve AKH ve KiMKH'lerin spesifik büyüme hızları logaritmik faz olarak kabul edilen 3. ve 7. günler arasında hesaplanmıştır. AKH'lerin ikilenme süresi 44 saat, özgül üreme hızı 0.0157 sa^{-1} , KiMKH'lerin ikilenme süresi ise 48 saat, özgül üreme hızı 0.0142 sa^{-1} olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar, AKH'lerin doyumluğa KiMKH'lerine göre daha erken ulaşmalarını kanıtlar niteliktedir. Hücrelerin üreme eğrileri Şekil 4.5 ve 4.6'da verilmiştir.

Literatüre bakıldığında adipoz kökenli ve kemik iliği MKH'lerin ikilenme sürelerinin erken pasajlarda 40-48 saat arası olduğu tespit edilmiştir [81, 129].



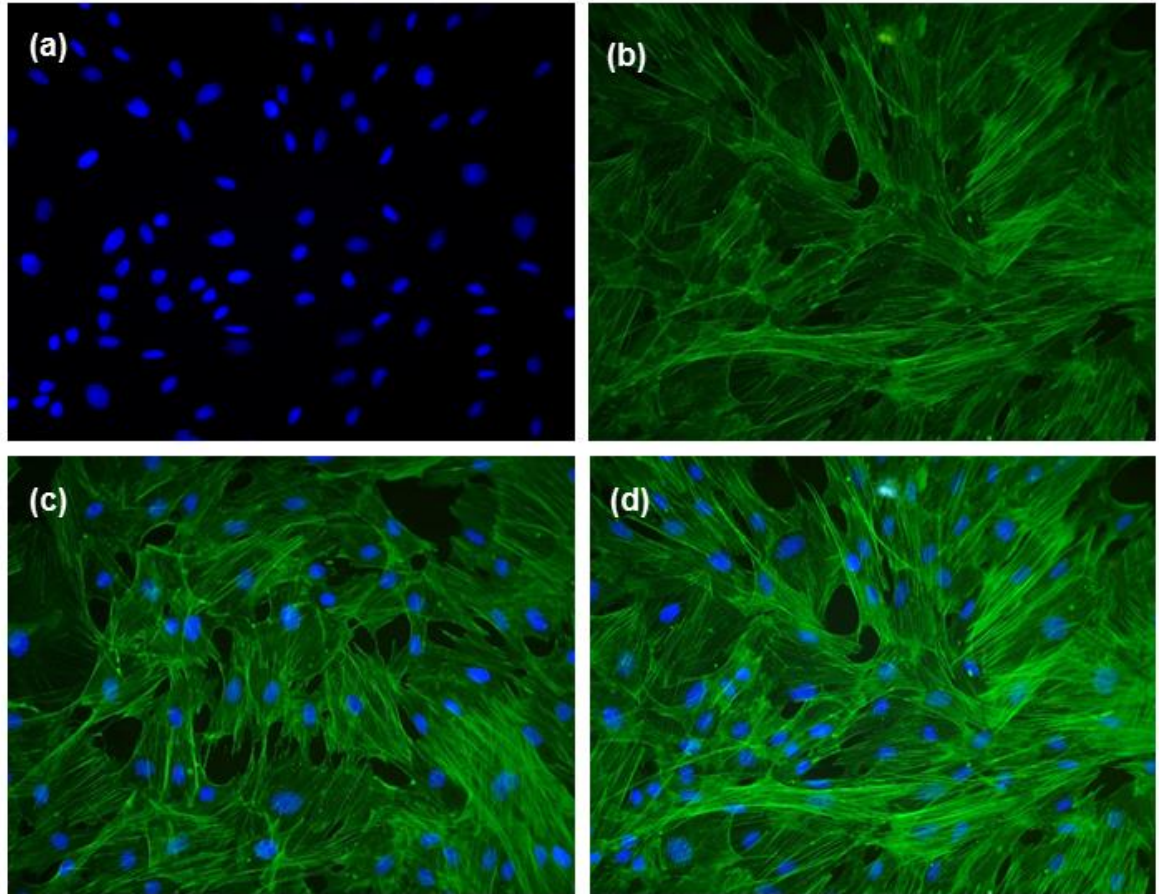
Şekil 4.5. AKH'lerin üreme eğrisi.



Şekil 4.6. KiMKH'lerin üreme eğrisi.

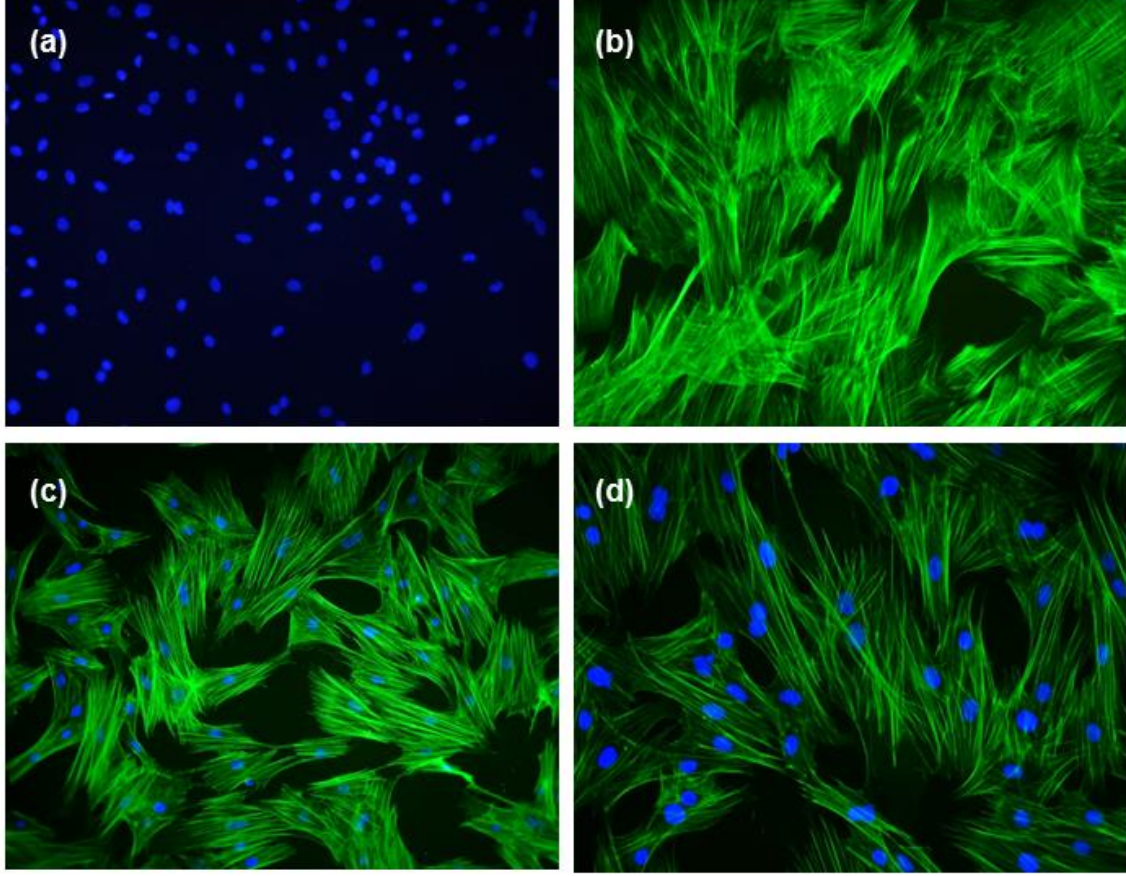
4.2.2.2. F-aktin/DAPI Boyaması

Hücre morfolojilerinin belirlenmesi amacıyla, immünohistolojik analizler yapılmıştır. Aktin filamentler, hücre yüzey şeklinin oluşumunda görev alan hücre iskeletindeki önemli yapılardır. Bu boyama tekniğinde kullanılan Alexa Fluor 488 Phalloidin, plazma zarı ilişkili F-aktin işaretleyicidir ve floresan mikroskobu altında hücre iskeletinin yeşil renkte görünmesine neden olmaktadır. DAPI ise hücre çekirdeğini boyayan bir ajandır ve hücre çekirdeklerinin, floresan mikroskop altında mavi renkte görünmesini sağlar. AKH'lere yapılan ikili boyama sonucunda çekilen floresan mikroskobu fotoğrafları Şekil 4.7'de görülmektedir. Hücreler iğsi bir görünüm sergilemiş ve tipik fibroblastik morfoloji gözlenmiştir. Ayrıca, bütün hücrelerin çekirdek bütünlüklerini korudukları da görülmüştür (Şekil 4.7 a).



Şekil 4.7. AKH'lere ait F-aktin/DAPI boyamaları (a) DAPI 20X (b) F-aktin 20X, çakışık görüntüler (c) 20X (d) 20X.

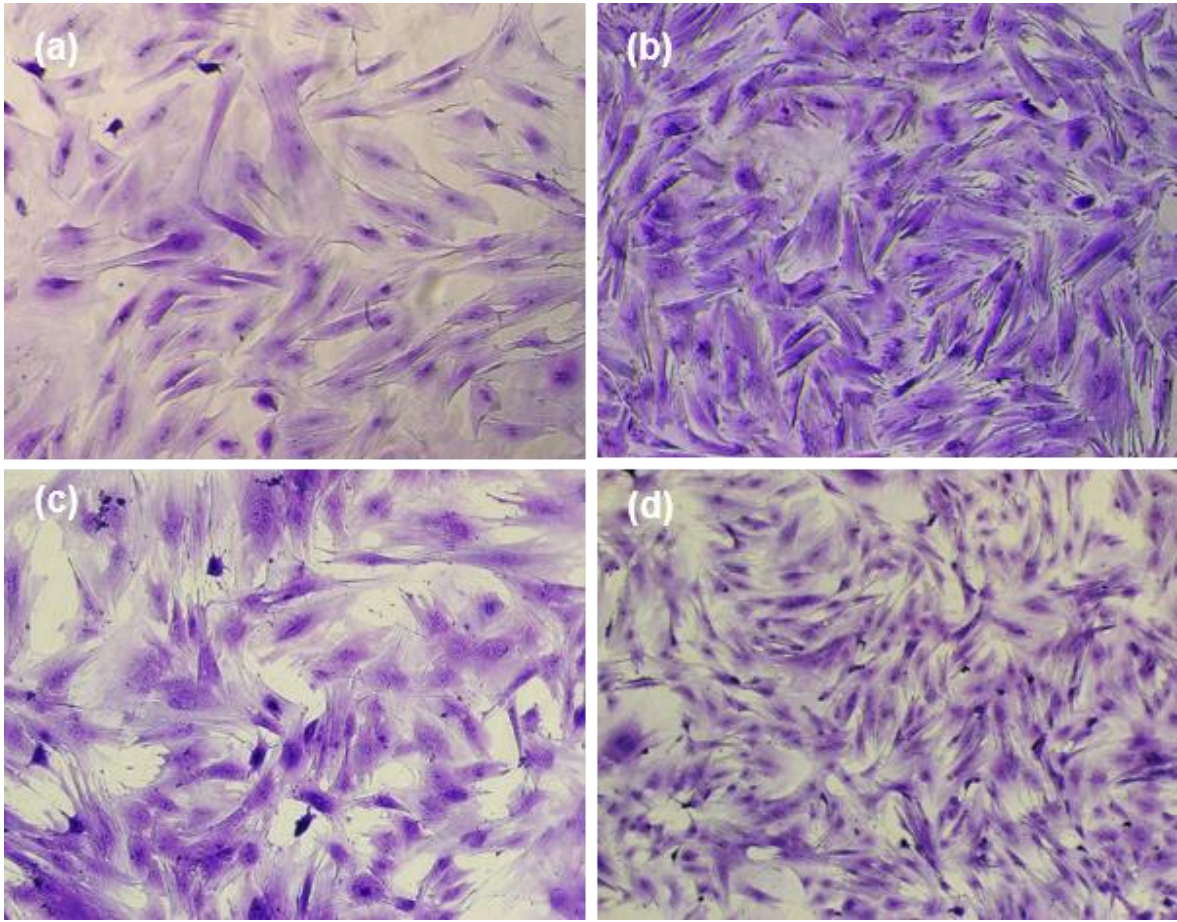
KiMKH'lerin F-aktin/DAPI görüntüleri Şekil 4.8'de verilmiştir. Şekil 4.8 a'da bütün hücrelerin çekirdek bütünlüklerini korudukları görülmektedir. Hücrelerin gelişmiş bir hücre iskeletine sahip olduğu Şekil 4.8 b'de sergilenmektedir. Ayrıca, hücrelerin fibroblastik morfolojiye sahip oldukları gözlemlenmektedir (Şekil 4.8 c ve d).



Şekil 4.8. KiMKH'lere ait F-aktin/DAPI boyamaları (a) DAPI 20X (b) F-aktin 20X, çakışık görüntüler (c) 20X (d) 20X.

4.2.2.3. Kristal Viyole Boyaması

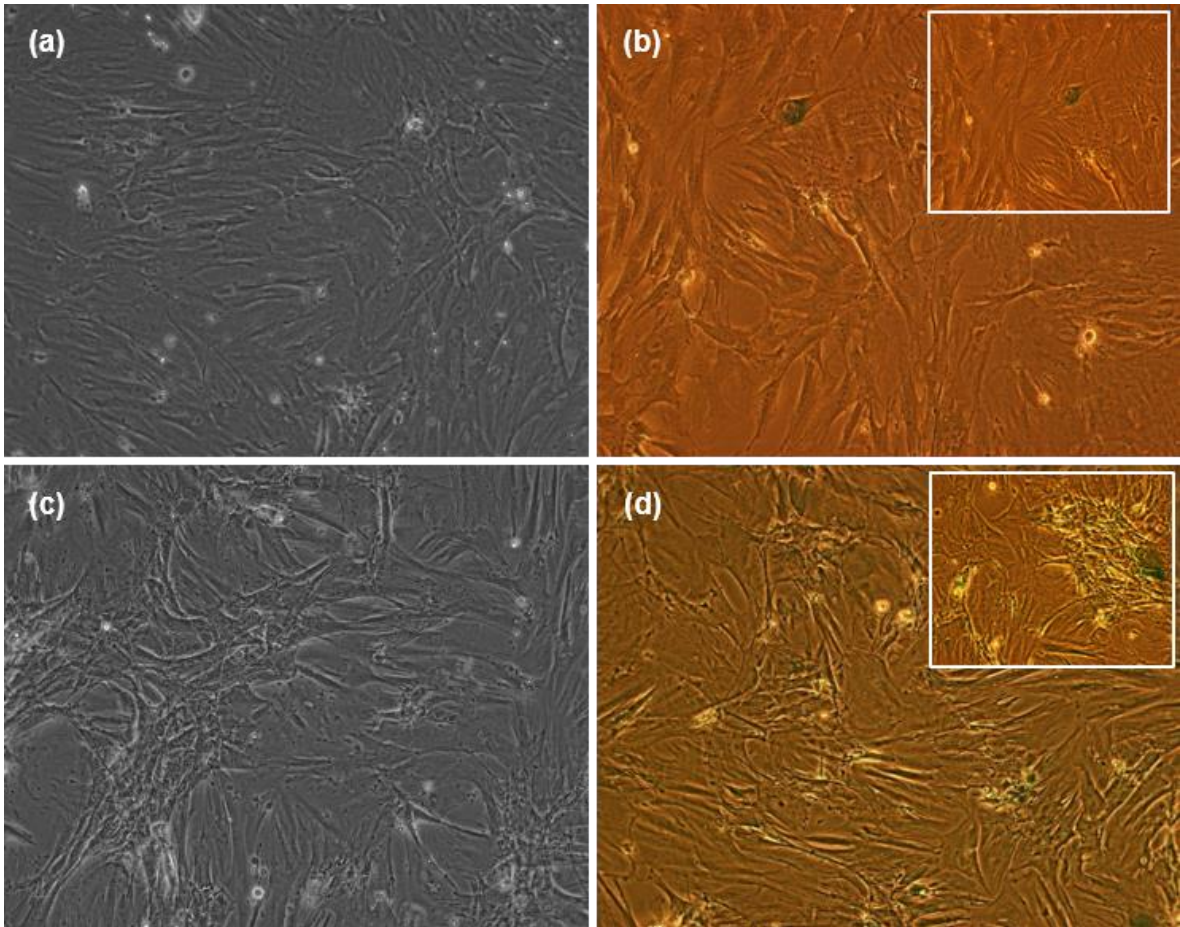
Çalışma kapsamında F-aktin/DAPI boyamalarına ek olarak hücre morfolojisinin belirlenmesi için kristal viyole boyamaları da gerçekleştirilmiştir. Kristal viyole boyamasında hücre iskeletleri açık mora, hücre çekirdekleri ise koyu mora boyanmıştır. Görüntüler optik mikroskop kullanılarak alınmıştır. Şekil 4.9'da da görüldüğü gibi hem AKH'ler, hem de KiMKH'ler fibroblastik morfoloji sergilemişlerdir. Böylece, kristal viyole boyamasının F-aktin/DAPI ile boyanmış hücre fotoğraflarını doğrular nitelikte olduğu görülmüştür.



Şekil 4.9. Kristal viyole ile boyanmış MKH'lerin optik mikroskop görüntüleri (a) AKH 20X (b) AKH 10X (c) KiMKH 20X (d) KiMKH 10X.

4.2.2.4. Senesens Analizi

In vitro hücre kültürü çalışmalarında, hücreler çoğalarak kültür kabının tüm yüzeyini kapladığında hücre çoğalması durmaktadır. Bu durum 'kontakt inhibisyon' olarak tanımlanır. Proliferasyonları duran hücrelerin kültürlerine devam edildiğinde, bir süre sonra ölüme gittikleri görülmektedir. Kültürde MHK'lerin replikatif yaşlanma fenotipleri elde edildikleri dokuya göre değişmektedir. Ayrıca, MHK'nin *in vitro* yaşlanması multipotensi özelliğine paraleldir [130].



Şekil 4.10. Hücrelerin senesens boyaması görüntüleri; (a) boyamadan önce AKH 20X (b) boyamadan sonra AKH 20X (c) boyamadan önce KiMKH 20X (d) boyamadan sonra KiMKH 20X.

In vitro kültürde beşinci pasajdaki AKH ve KiMKH'lere, hücreler yüzeyi tamamen kapladıklarında senesens boyaması yapılmıştır. Senesens kiti ile SA- β -gal pozitif hücreler mavi-yeşil olarak boyanmaktadır ve Şekil 4.10 (b ve d) görüldüğü gibi sadece birkaç hücrede boyanma görülmüştür. Bu sonuçlar hücrelerin sağlıklı olduklarını ve multipotensi özelliklerini kaybetmediklerini göstermektedir.

4.2.2.5. Hücrelerin Farklılaşma Potansiyellerinin İncelenmesi

Mezenkimal ve Doku Kök Hücre Komitesi tarafından belirlenen kriterlere göre mezenkimal kök hücrelerin sahip olması gereken 3 temel özellik bulunmaktadır:

1. Plastik yüzeylere tutunabilme;
2. Uygun yüzey antijenlerinin ifadesi;
3. Multipotent farklılaşma yeteneği [59].

Adipoz dokudan ve kemik iliğinden izole edilen MKH'ler adipojenik, osteojenik ve kondrojenik ortamlarda kültüre edilmiş ve çeşitli boyamalar ile bu hücrelerin farklılaşma potansiyelleri ortaya koyulmuştur.

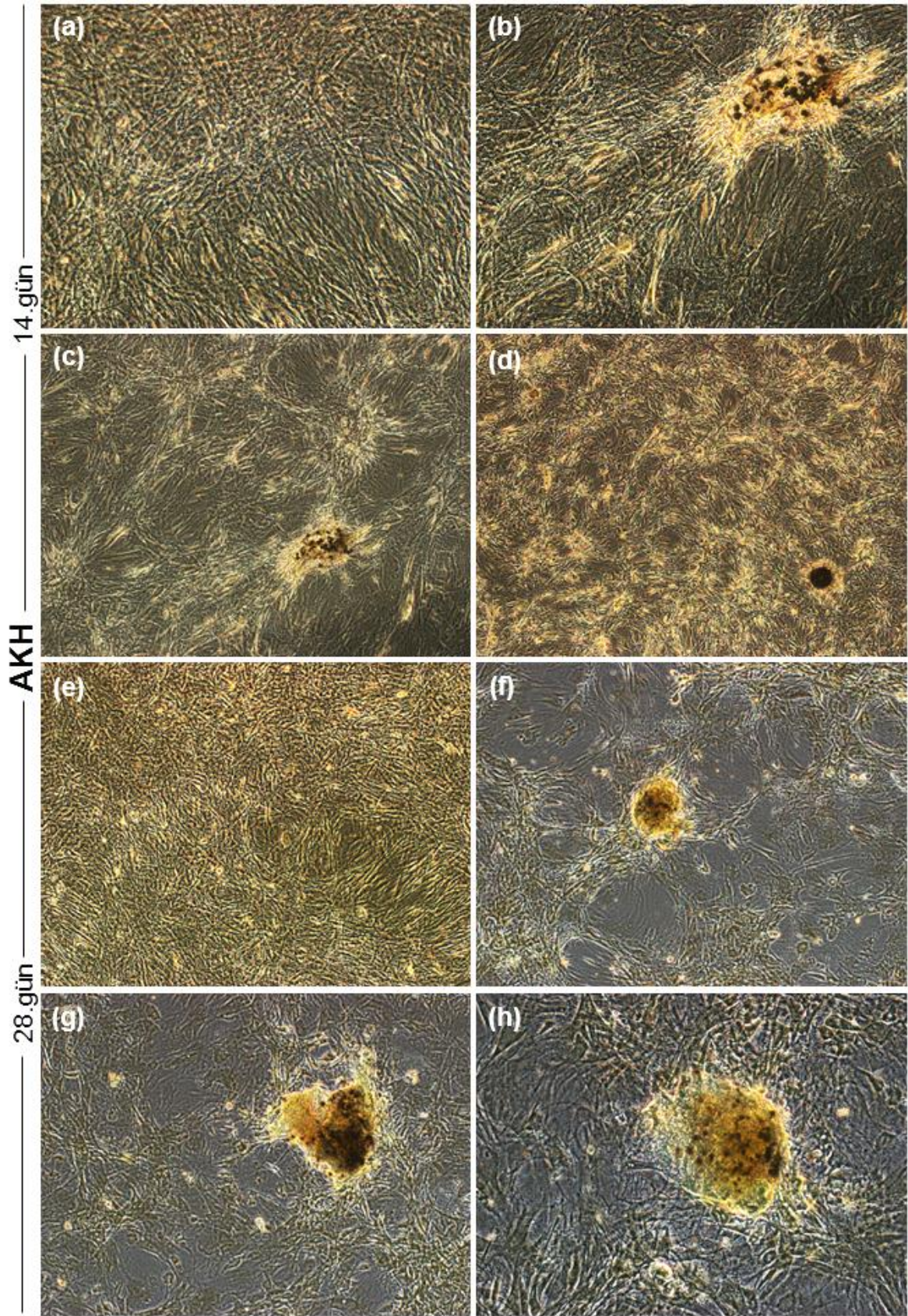
Osteojenik farklılaşma

Osteojenik farklılaşma, kültür ortamına eklenen dekzametazon, askorbik asit ve β -gliserol fosfat ile uyarılmıştır. Kültürün ilk haftasından sonra, kalsiyum birikimine bağlı olarak nodül benzeri yapılar oluşmaya başlamış ve oluşan nodüllerin miktarı zamana bağlı olarak artış göstermiştir. Osteojenik farklılaşmanın belirteçlerinden biri de matris mineralizasyonudur. Matris mineralizasyonunu görüntülemek için kullanılan boyalar, hücre içi mineralize kristallere bağlanarak, hücreler tarafından oluşturulan kalsiyum fosfat yapılarının varlığını ortaya koymaktadır. AKH ve KiMKH'lerin matris mineralizasyonu ALP-von Kossa (ALP-VK) boyamaları ile belirlenmiştir. Kültürün 14. ve 28. günlerinde yapılan boyamalar optik mikroskop altında görüntülenmiş ve Şekil 4.11 ve 4.12'de sunulmuştur.

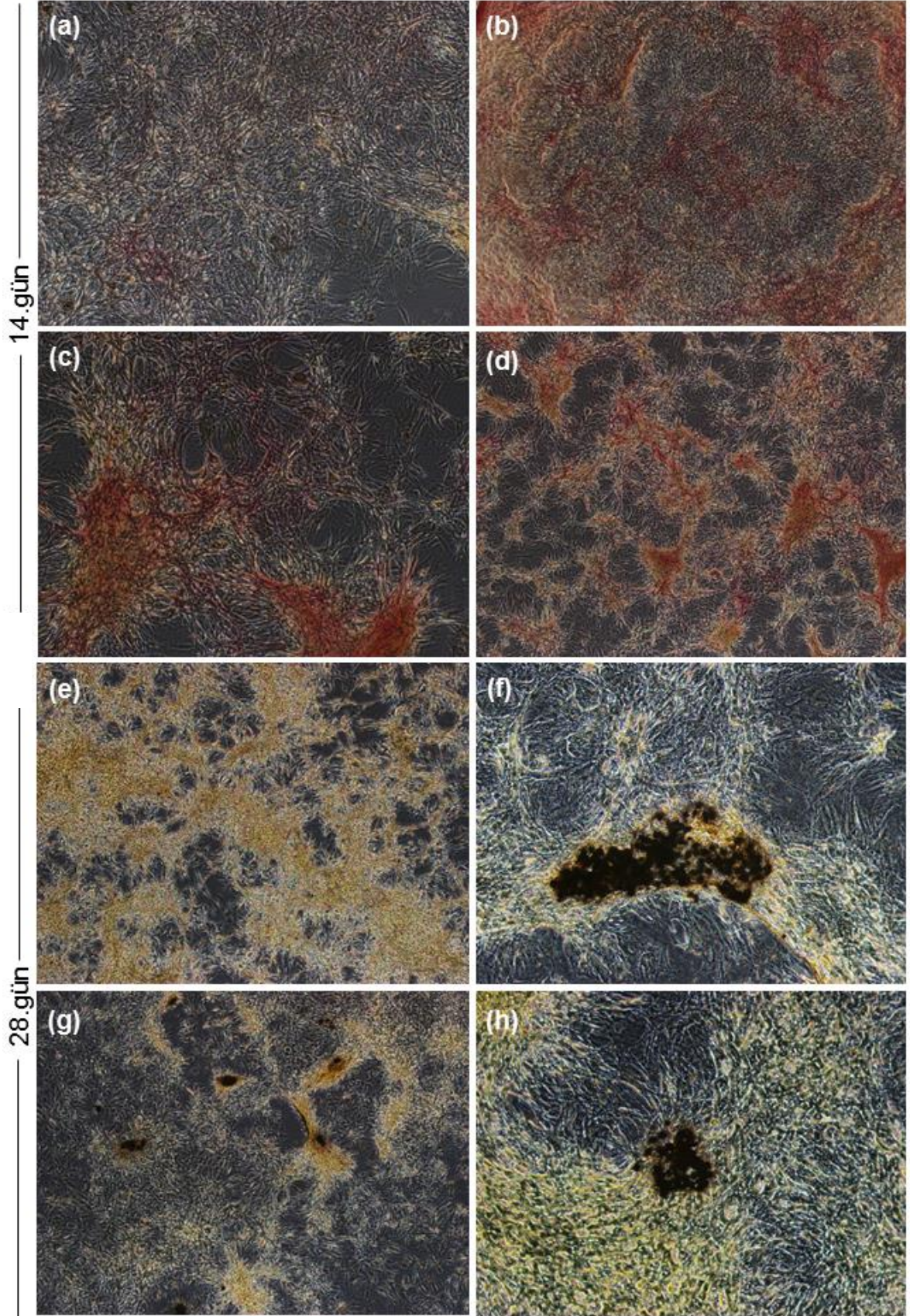
Kontrol grubunda AKH'lerin boyanma sonrası (Şekil 4.11 a ve e) mineralizasyonunu işaret eden herhangi bir boyanma görülmezken, osteojenik farklılaşma ortamı varlığında, hücreler arasında nodüller ve siyah-kahverengi mineralizasyon bölgeleri tespit edilmiştir (Şekil 4.11 b, c ve d). Kültürün ilerleyen günlerinde ise nodüllerin miktarında artış gözlemlenmiştir (Şekil 4.11 f, g ve h). Ancak ALP enzim aktivitesinin göstergesi olan kırmızıya boyanan bölgeler görülmemiştir.

ALP aktivitesi, kemik farklılaşmasının erken bir göstergesi olduğu için, kültürün başında daha yüksek olması, ilerleyen günlerde ise azalması ve kalsiyum birikimlerinin ortaya çıkması beklenilmektedir [35].

KiMKH'lerin boyama görüntüleri incelendiğinde kültürün 14. gününde kontrol grubunda (Şekil 4.12 a) ALP aktivitesi çok az görülürken, osteojenik ortam ile indüklenen hücre grubuyla karşılaştırıldığında oldukça yüksek düzeyde ALP aktivitesi gözlenmiştir (Şekil 4.12 b, c ve d). Kültürün 28. gününde AKH'lerde görüldüğü gibi kontrol grubunda (Şekil 4.12 e) mineralizasyonu işaret eden herhangi bir boyanma gerçekleşmezken, osteojenik farklılaşma ortamı varlığında, hücreler arasında nodüller ve siyah-kahverengi mineralizasyon bölgeleri tespit edilmiştir (Şekil 4.12 f, g ve h). Bütün bu sonuçlar, AKH ve KiMKH'lerin kemiğe farklılaşma potansiyeline sahip olduğunu kanıtlar niteliktedir.



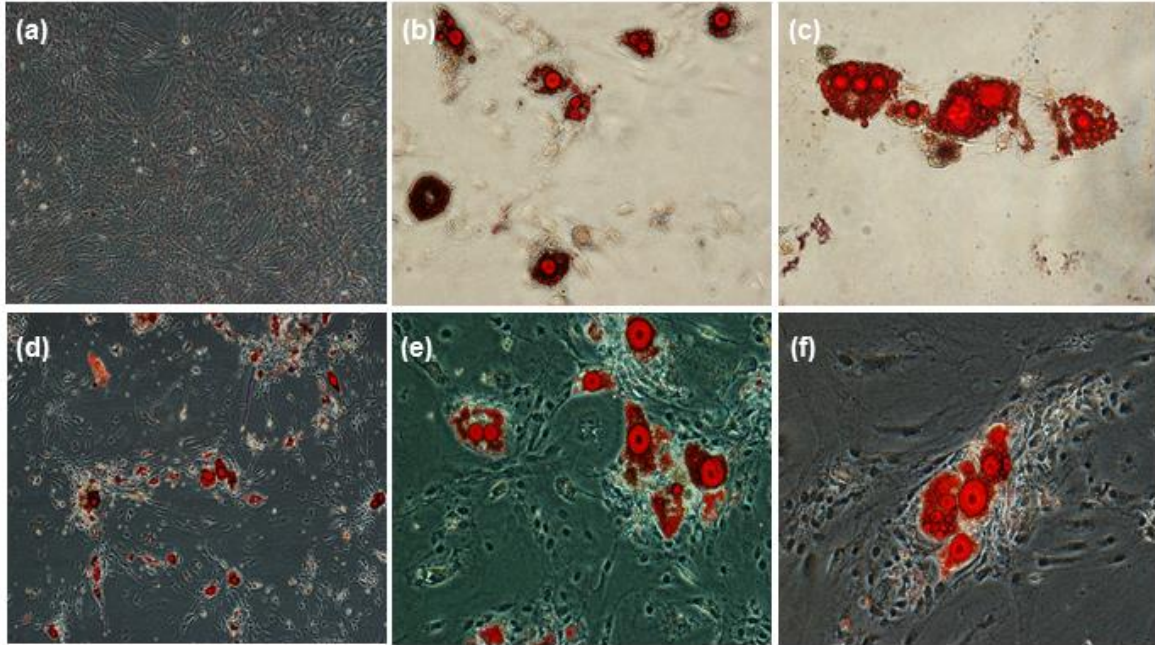
Şekil 4.11. AKH'lerine ait ALP-VK boyamaları: 14.gün - kontrol grubu (a) 20X, osteojenik farklılaşma grubu (b) 20X (c) 10X (d) 4X; 28.gün - kontrol grubu (e) 10X, osteojenik farklılaşma grubu (f) 10X (g) 10X (h) 20X.



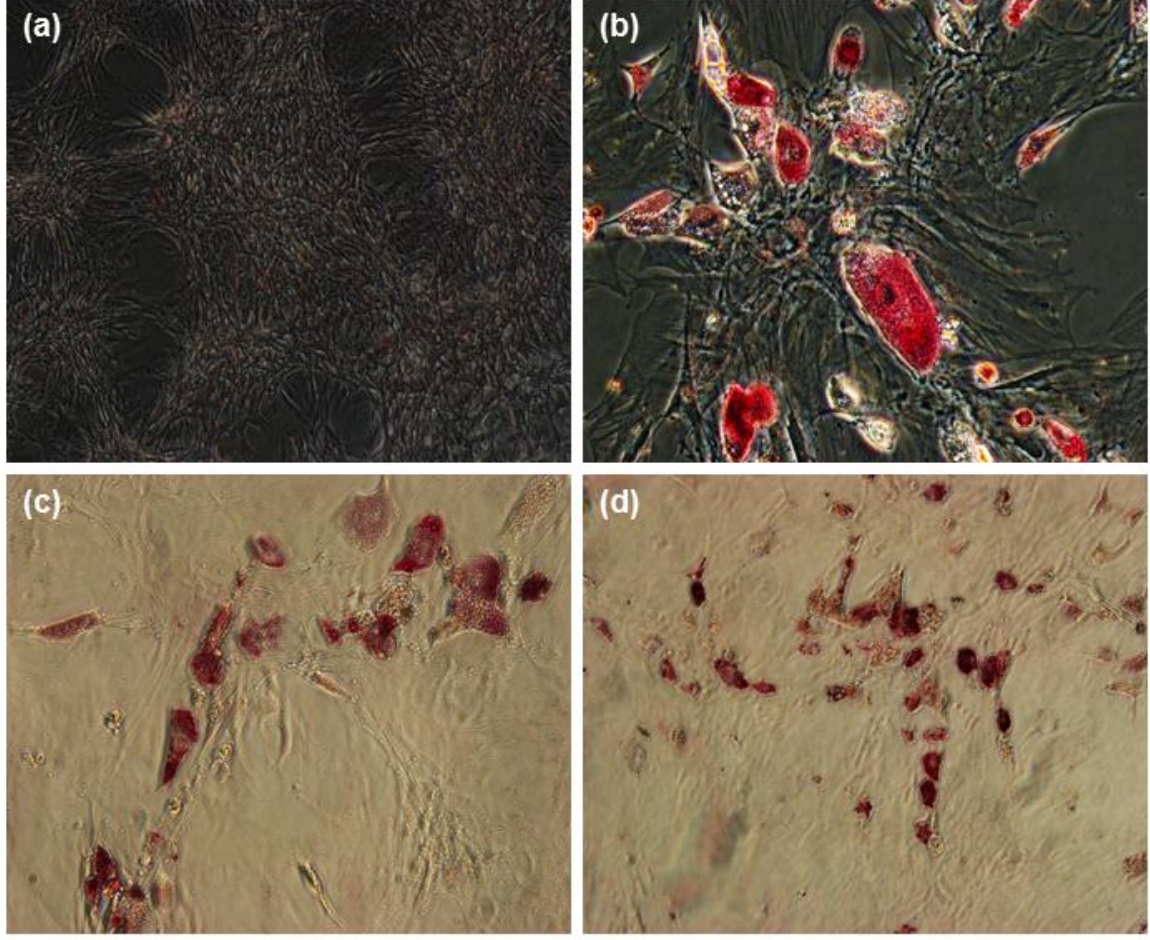
Şekil 4.12. KIMKH'lere ait ALP-VK boyamaları: 14.gün - kontrol grubu (a) 20X, osteojenik farklılaşma grubu (b) 20X (c) 10X (d) 4X; 28.gün - kontrol grubu (e) 10X osteojenik farklılaşma grubu (f) 10X (g) 10X (h) 20X.

Adipojenik farklılaşma

Adipojenik farklılaşma, kültür ortamına eklenen IBMX, deksametazon, insulin ve indometazin ile uyarılmıştır. AKH'ler %80 doygunluğa ulaştıktan sonra, KiMKH'ler ise yüzeyi kapladıktan sonra adipojenik farklılaşma ortamına alınmıştır. Hücreler içerisinde lipidce zengin vakuoller ikinci haftadan itibaren belirlemeye başlamıştır. Kültürün ilerleyen günlerinde lipid vakuolleri büyümeye devam etmiş ve hücrelerin içerisinde doldurmuştur. Kültürün 20. gününde gerçekleştirilen boyamalarda, kontrol grubunda herhangi bir boyanma görülmezken, adipojenik ortamda kültüre edilen hücreler Oil Red O ile boyanmış ve kırmızı lipid damlacıkları görüntülenmiştir (Şekil 4.13 ve 4.14) AKH ve KiMKH'leri karşılaştırıldığında köken aldıkları doku nedeni ile AKH'lerde yağ damlacıkları daha belirgin olarak gözlemlenmiştir.



Şekil 4.13. AKH'lerde yağ damlacıklarının Oil Red O boyaması ile görüntülenmesi, 20.gün: kontrol grubu (a) 10X, adipojenik farklılaşma grubu (b) 20X (c) 20X (d) 10X (e) 20X (f) 20X.



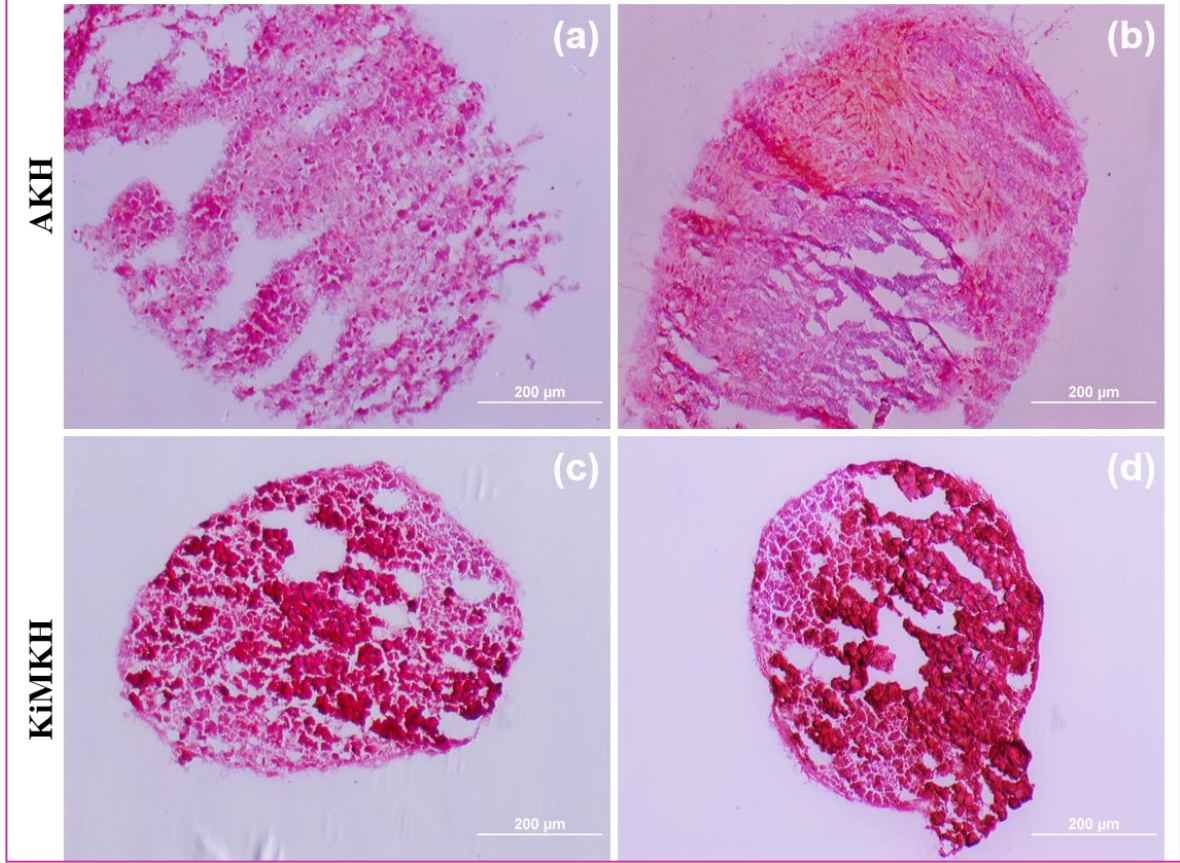
Şekil 4.14. KiMKH'lerde yağ damlacıklarının Oil Red O boyaması ile görüntülenmesi, 20.gün: kontrol grubu (a) 10X, adipojenik farklılaşma grubu (b) 20X (c) 20X (d) 10X (e) 20X (f) 20X.

Kondrojenik farklılaşma

Kondrojenik farklılaşmanın sağlanması için hücreler deksametazon, L-askorbik asit ve TGF- β 3 içeren farklılaşma ortamında kültüre edilmiştir. Kültürün 28. gününde yapılan Safranin O/Fast Green boyamaları ile AKH ve KiMKH'lerin kondrojenik farklılaşması gösterilmiştir (Şekil 4.15). Safranin O boyaması, kondrojenik farklılaşmada matrisin proteoglikan sentezinin derecesini değerlendirmek üzere yapılmaktadır. Boyama sonucu glikozaminoglikanların (GAG) birikim bölgeleri kırmızıya boyanmaktadır.

AKH'lerin boyama görüntüleri incelendiğinde kondrojenik ortam ile muamele edilen grupta kırmızıya boyanan bölgeler görülmektedir. (Şekil 4.15 b). Ayrıca kontrol grubuyla kıyaslandığında (Şekil 4.15 a) hücre pelletlerinin bütünlüğünün korunduğu görülmekte, bu da hücrelerin sağlıklı olduğunu ve hücre dışı matrisin sentezlendiğini göstermektedir.

Gun-Il ve ark. [128] yaptıkları çalışmada AKH'lerin belirgin proteoglikan üretimi göstermediğini ve Safranin O/Fast Green boyaması sonucunda kondrojenik ortam muamelesi gören AKH'leri ile büyüme ortamındaki hücreler arasında çok az bir fark gözlemlendiğini belirtmişlerdir.



Şekil 4.15. Safranin O/Fast Green boyaması; (a) AKH kontrol grubu (b) AKH kondrojenik farklılaşma grubu; (c) KiMKH kontrol grubu, (d) KiMKH kondrojenik farklılaşma grubu.

KiMKH'lerin boyama sonucu incelendiğinde kondrojenik farklılaşma grubunda (Şekil 4.15 d) kontrol grubuna (Şekil 4.15 c) göre oldukça fazla boyanma gözlenmektedir.

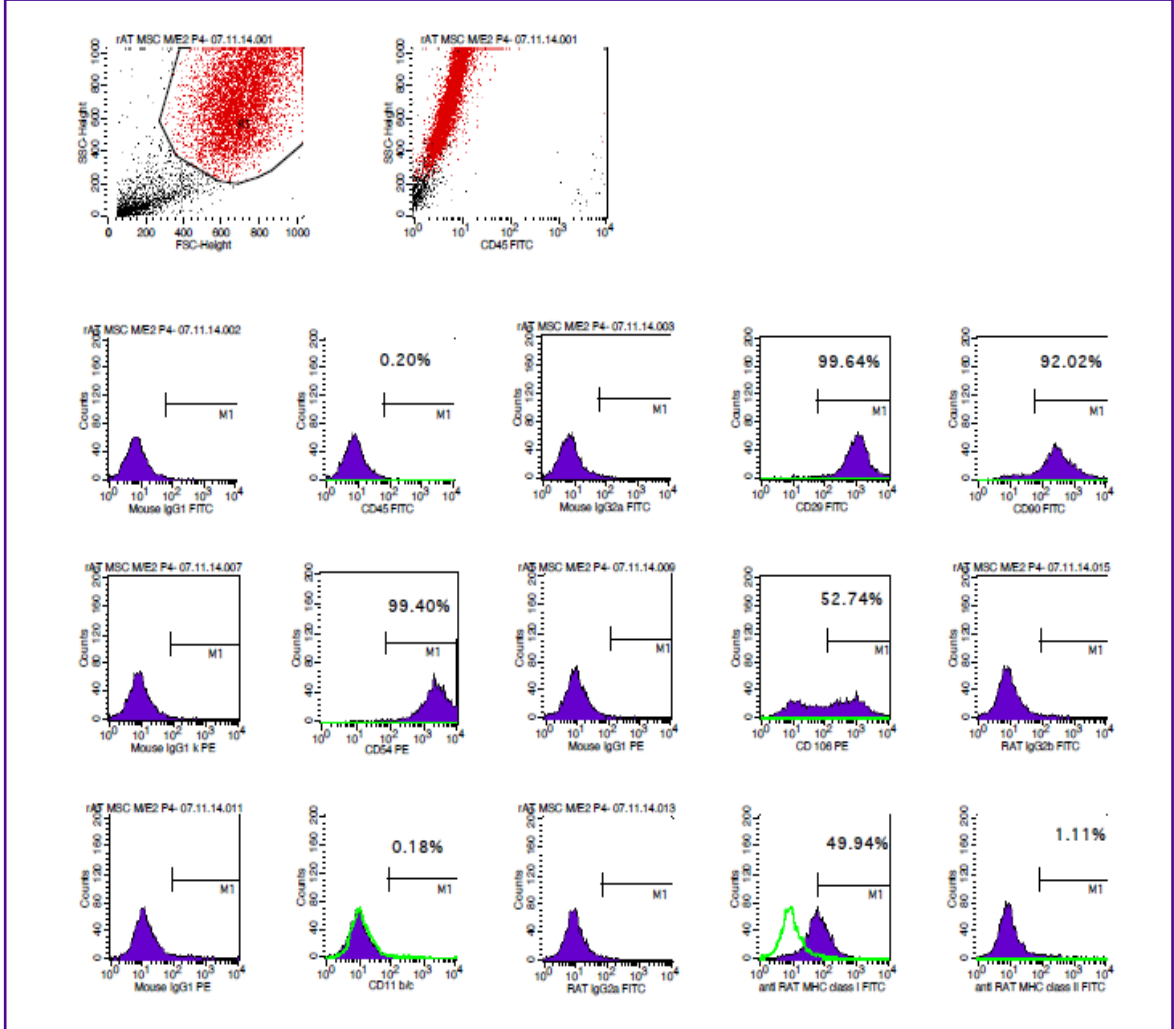
Indrawattana ve ark. [131] insan kemik iliği kökenli MHK'ler ile yaptıkları çalışmada, Safranin O/Fast Green boyama sonucu kondrojenik grupta daha fazla boyanma olduğunu belirtmişlerdir.

4.2.2.6. Akış sitometrisi analizi

Hücrelerin kök hücrelere özgü yüzey antijenlerini taşıyıp taşımadığını kontrol etmek için akış sitometrisi analizinden faydalanılmıştır. Akış sitometrisinde hücre süspansiyonu, lazer ışığı ile aydınlatılan bir bölümden geçirilmekte ve ışık saçılımı, floresan emisyonu gibi özellikler dijital sinyallere dönüştürülmektedir. Oluşan sinyaller, hücrelerin büyüklük ya da granülaritelerine bağlı olabileceği gibi, hücreye bağlanan çeşitli florokromlar ile hücrenin yüzey antijenleri, DNA içeriği, enzim aktiviteleri, hücre membran potansiyeli ve canlılığı hakkında da bilgi edinilebilmektedir. Bu yöntemde ileri saçılım kanal (forward scatter channel, FSC) dedektörü hücrenin boyutu hakkında bilgi verirken, yana saçılım kanal (side scatter channel, SSC) dedektörü, hücrenin granüler içeriği hakkında bilgi sunmaktadır. AKH'lerin akış sitometrisi analizinde, FSC ve SSC dedektörlerinden elde edilen sinyaller verilmiştir (Şekil 4.16). Grafikte tek çekirdekli hücre özelliğine sahip olan hücre grubu ve böylece hücre süspansiyonunda bulunan lenfosit ya da granülosit gibi hücrelerin IgG işaretlenme oranları değerlendirme dışı bırakılmıştır. Diğer grafikte CD45 antijeni ile yapılan işaretleme sonucu, SSC dedektöründen elde edilen sinyaller değerlendirilmiştir. Bu grafikte kırmızı işaretlenmiş hücrelerin grafiğin sol üst bölümünde bulunması, hücrelerin CD45 negatif olduğunu göstermektedir. Yeşil renk kontrol, mor ise yüzey IgG işaretleyicilerden alınan sonuçları ifade etmektedir. Yeşil ve mor histogramların çakışması, negatif işaretleme, yani hücrenin ilgili yüzey antijenini ifade etmediğini göstermektedir. Pozitif durumda ise mor histogramın, kontrolün sağ tarafında bulunması gerekmektedir [132].

Dominici ve ark. [59] MKH'lerin fenotipik karakterini şu şekilde belirtmiştir; fenotip pozitif antijenler ($\geq 95\%$): CD105, CD73, CD90 ve fenotip negatif antijenler ($\leq 2\%$): CD45, CD34, CD14, CD11b. Kern ve ark. [7] yaptıkları çalışmada farklı kökenli kök hücrelerin yüzey belirteçleri ifadesini karşılaştırmış ve adipoz dokudan izole edilen MKH'lerin $\geq 90\%$ CD29, CD90 ifade ettiklerini belirtmişlerdir. Ayrıca, kordon kanı (70.0 ± 23.6) ve kemik iliği (66.3 ± 22.7) MKH'leri tarafından ifade edilen CD106 yüzey belirteçinin adipoz kökenli MKH'lerden (30.3 ± 18.6) daha yüksek olduğunu tespit etmişlerdir. Strem ve ark. [133] AKH'lerin yüksek düzeyde CD54 ifade ettiklerini belirtmişlerdir. MKH'ler önemli doku uygunluk kompleksi olan MHC sınıf I moleküllerini düşük oranda ifade etmekte, MHC sınıf II moleküllerini ise hücre

yüzeylerinde ifade etmemektedirler [22]. AKH'lerin literatürle uyumlu bir şekilde CD29, CD90, CD54, CD106 ve MHC sınıf I belirteçleri için pozitif olduğu görülmüş, CD45, CD11b ve MHC sınıf II antijenleri için ise oldukça düşük işaretlenme oranları bulunmuştur (Şekil 4.16).



Şekil 4.16. AKH'lere ait akış sitometri analiz sonuçları (Yeşil ve mor histogramlar sırasıyla kontrol ve yüzey IgG işaretleyicilerdir).

Akış sitometrisi ile elde edilen veriler ışığında, AKH'lerin yüksek saflıkta olduğu ve mezenkimal hücelere uygun yüzey antijenlerini ifade ettikleri belirlenmiştir.

4.2.3. Hücre Ekimi ve Osteojenik Farklılaşma

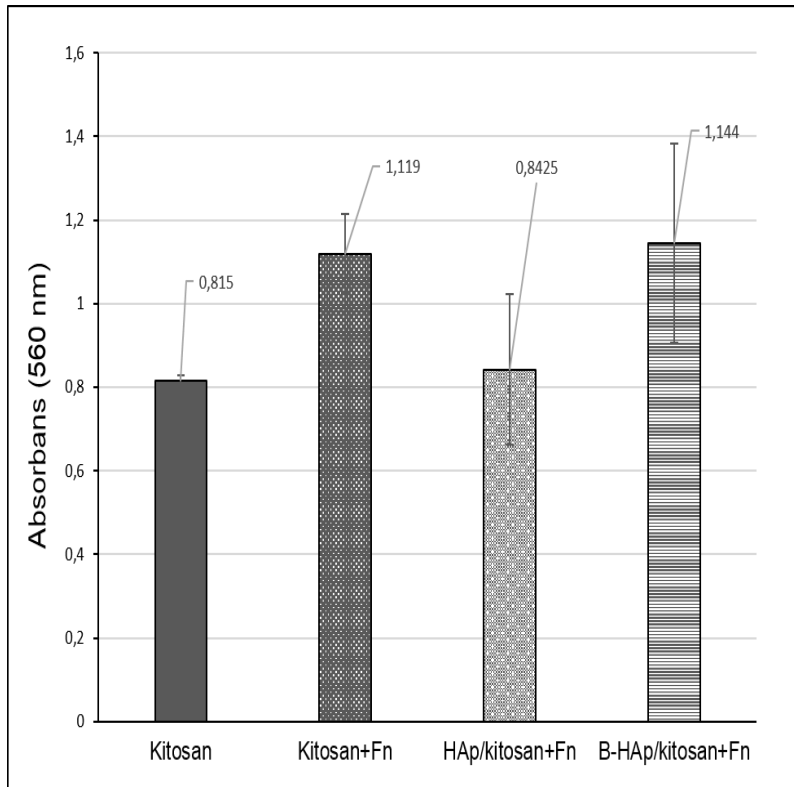
Hücre kültür çalışmaları fibronektin (Fn) immobilize edilen ve edilmeyen olmak üzere 2 grup iskele ve 2 farklı MKH (AKH ve KiMKH) ile yürütülmüştür.

Çizelge 4.4. Hücre kültür çalışmalarında kullanılan hücreler ve doku iskeleleri.

Hücreler	İskeleler	
	Fibronektinli	Fibronektinsiz
AKH	Kitosan+Fn	Kitosan
KiMKH	HAp/kitosan+Fn	HAp/kitosan
	B-HAp/kitosan+Fn	B-HAp/kitosan

4.2.3.1. Doku İskelesi Yüzeyine Bağlanan Amino Gruplarının Ninhidrin Yöntemi ile Tayini

Doku iskelelerine bağlanan amino gruplarının tayini, ninhidrin yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Aminlenen kitosan, HAp/kitosan ve B-HAp/kitosan, ninhidrin ile etkileştirildiği zaman mor renk almışlardır. Aminoliz işlemi uygulanmayan doku iskeleleri ise, renk değişimi göstermemişlerdir. Renk değişimlerinin absorbans değerleri ise UV-vis spektrofotometre (Labomed, Inc., ABD) ile ölçülmüştür. İskelelerden okunan absorbans değerlerinin boş kitosan doku iskelesinin absorbans değerinden daha yüksek oluşu aminoliz işleminin gerçekleştiğini göstermektedir (Şekil 4.17).

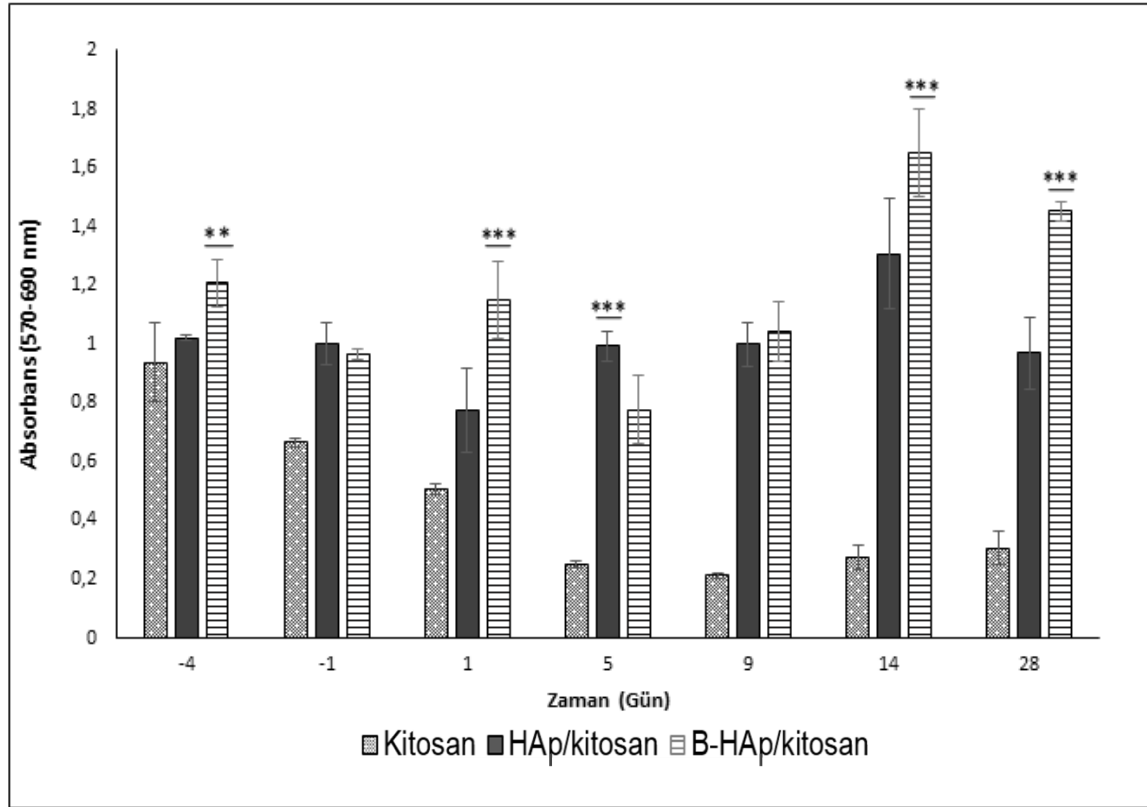


Şekil 4.17. Ninhidrin analizi sonuçları.

4.2.3.2. MTT Analizi

Kitosan+Fn, HAp/kitosan+Fn, B-HAp/kitosan+Fn doku iskelelerinde kültüre edilen AKH ve KiMKH'lerin üreme davranışları ve mitokondriyal aktiviteleri 28 günlük inkübasyon süresince kültürün belirli günlerinde yapılan MTT analizi ile belirlenmiştir (Çizelge 3.4 a). MTT analizi sonucu elde edilen veriler 570 nm'de belirlenen optik yoğunluk değerleri olarak verilmiştir.

Hücre ekimi sonrası AKH'ler tüm doku iskelelerine tutunmuş ve çoğalmaya devam etmiştir. Şekil 4.18'de -4.gün olarak ifade edilen kültürün birinci gününde tutunmayı en çok destekleyen grubun B-HAp/kitosan+Fn olduğu belirlenmiştir ($p < 0.01$). Ancak kitosan+Fn grubunda hücresel aktivitenin kültürün ilerleyen günlerinde hızla azaldığı gözlemlenmiştir. İskelede Fn varlığına rağmen kitosanın hücre tutunmasını ve çoğalmasını desteklemediği görülmüştür.



Şekil 4.18. Kitosan+Fn, HAp/kitosan+Fn ve B-HAp/kitosan+Fn doku iskeleleri üzerinde çoğalan AKH'lere ait MTT grafiği (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık, $n=3$, aynı günde farklı gruplar için * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

Şekil 4.18'de -1 olarak ifade edilen hücre ekiminden sonraki 4. gün bütün iskelelerin hücre canlılığında azalma görülmüştür. İskeleler arasında hücre canlılığı açısından anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p > 0.05$). Hücre besi ortamı bu

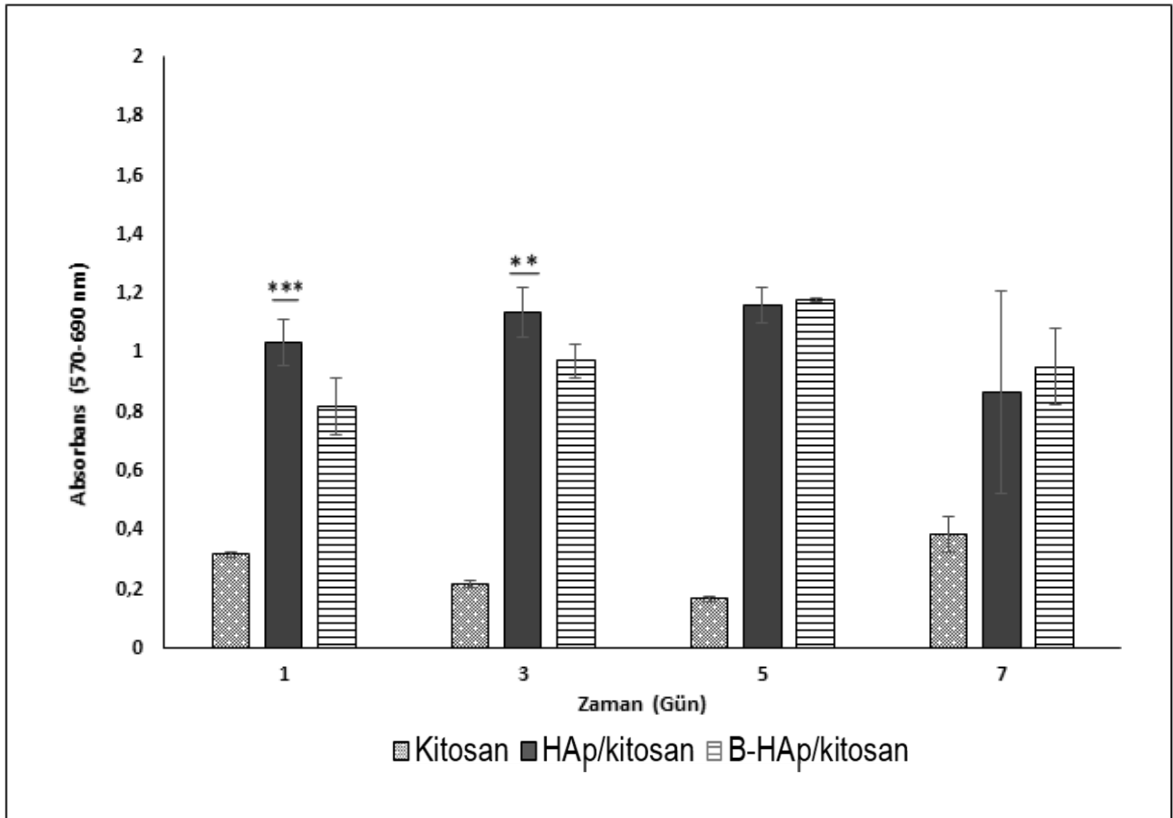
günden sonra osteojenik ortam ile değiştirilmiştir. Osteojenik ortam ilavesinden sonraki ilk günde (1) HAp/kitosan+Fn ve kitosan+Fn iskelelerinde hücre canlılığında azalma devam ederken en yüksek hücre canlılığına B-HAp/kitosan+Fn iskelede ulaşılmıştır ($p<0.001$). Kültürün 5. gününde kontrol grubu olan kitosan iskele ile diğer iskeleler arasında hücre canlılığında anlamlı farklılık gözlenmiştir. Ayrıca HAp/kitosan+Fn iskeledeki hücre canlılığı B-HAp/kitosan+Fn iskeleden daha yüksek bulunmuştur ($p<0.001$). Kültürün 9. gününde HAp/kitosan+Fn ve B-HAp/kitosan+Fn iskeleleri arasında hücre canlılığı açısından anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p>0.05$). Kültürün 14. gününde HAp/kitosan+Fn ve B-HAp/kitosan+Fn iskeledeki hücre canlılığı, HAp/kitosan+Fn iskeleye göre anlamlı derecede artmıştır ($p<0.001$). Kültürünün 28. gününde kitosan iskeledeki hücre canlılığında hafif bir artış görülürken, HAp/kitosan+Fn ve B-HAp/kitosan+Fn iskelelerdeki hücre canlılığında azalma görülmüştür. Ancak, B-HAp/kitosan+Fn iskeledeki hücre canlılığı diğer iskelelere göre oldukça yüksek bulunmuştur ($p<0.001$). Genel olarak MTT verileri incelendiğinde, her üç grupta da osteojenik ortam eklendikten sonra ilk haftanın sonunda absorbans değerleri düşmüştür. Hücre proliferasyonu ile farklılaşması arasında ters bir ilişki olduğu bilinmektedir. Bu nedenle hücre üremesindeki bu azalış, hücrelerin farklılaşmaya gittiği şeklinde yorumlanabilir. Ardından, 14. güne kadar kitosan iskele absorbansı düşmeye devam ederken, B-HAp/kitosan+Fn ve HAp/kitosan+Fn iskelelerinin absorbans değerleri yükselmeye başlamıştır. Bu da hücrelerin osteojenik farklılaşmaya doğru giderken canlılıklarını koruduklarının göstergesidir. 14. günde hücre canlılığı B-HAp/kitosan+Fn ve HAp/kitosan+Fn iskelelerinde en yüksek değerine ulaşmış ve 14. günden sonra hücre canlılığı her iki grupta da kontak inhibisyona bağlı olarak, azalma göstermiştir. Sonuç olarak hücrelerin üç grup iskelede de tutunduğu, fakat kitosan iskelede üremedikleri belirlenmiştir. Ancak B-HAp/kitosan+Fn ve HAp/kitosan+Fn iskelelerinde hücrelerin oldukça iyi çoğaldıkları ve en yüksek üreme hızını B-HAp/kitosan+Fn iskelede gösterdikleri belirlenmiştir. Genel olarak HAp/kitosan+Fn ve özellikle B-HAp/kitosan+Fn doku iskelelerinde 28 günlük kültür süresi boyunca hücrelerin optik yoğunluklarının artış göstermesi hücrelerin logaritmik fazda olduklarının göstergesidir.

Aday ve Gümüşderelioğlu'nun [100] MC3T3-E1 hücreleri ile yaptığı çalışmada da SBF kullanılarak HAp kaplanmış kitosan iskeledeki hücrelerin üreme hızlarının ilk

10 günde, kitosan iskeleyle göre çok daha fazla olduğu görülmüştür. Ayrıca yapıya biyomimetik yol ile oluşturulan HAp katılmasının iskelenin osteoindüksiyonunu ve osteokondüksiyonunu artırdığı, ayrıca serum proteinlerinin HAp etkisi ile iskele yüzeyine tutunmasını artırdığı belirtilmiştir. Gurubumuz tarafından yapılan bir çalışmada, bor enkapsüle edilmiş kitosan nanopartikül yüklü doku iskelesinin MC3T3-E1 hücrelerinin tutunmasını ve çoğalmasını desteklediği belirlenmiştir [113].

AKH'lerin doku iskelelerine Fn immobilizasyonu olmadan tutunup çoğaldıklarını tespit etmek için AKH'ler ile 1 haftalık deneme çalışması yapılmıştır.

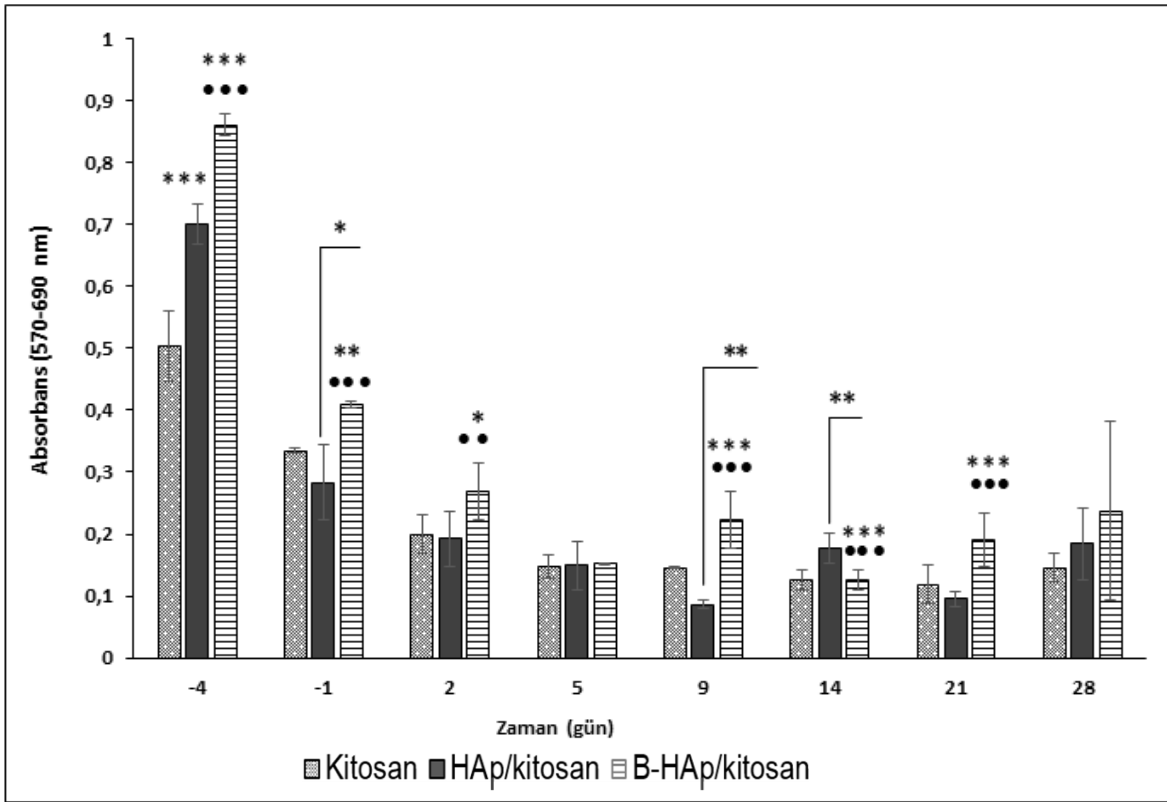
Fibronektinsiz iskeleler üzerinde üreyen AKH'lerin üreme davranışları ve mitokondriyal aktiviteleri 7 günlük inkübasyon süresince kültürün 1, 3, 5 ve 7. günlerinde yapılan MTT analizi ile belirlenmiştir (Çizelge 3.4 b). MTT analizi sonucu elde edilen veriler 570 nm'de belirlenen optik yoğunluk değerleri olarak Şekil 4.19'da verilmiştir.



Şekil 4.19. Kitosan, HAp/kitosan ve B-HAp/kitosan doku iskeleleri üzerinde çoğalan AKH'lere ait MTT grafiği (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık, n=3, aynı günde farklı gruplar için * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001).

Hücre ekiminden sonra her 3 grup iskelenin de tutunmayı desteklediği görülmektedir. Ancak kitosan grubunda diğer gruplara göre tutunma oldukça düşüktür ve kitosan+Fn grubunda olduğu gibi hücresel aktivitenin kültürün ilerleyen günlerinde azaldığı gözlemlenmiştir. Kültürün birinci gününde HAp/kitosan iskeledeki hücre canlılığı B-HAp/kitosan iskeleden anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0.001$). Kültürün üçüncü gününde HAp/kitosan ve B-HAp/kitosan grupları arasındaki hücre canlılığı farkı azalmış, ancak HAp/kitosan iskeledeki hücre canlılığı B-HAp/kitosan iskeleden yine de fazla olarak bulunmuştur ($p<0.01$). Kültürün 5. ve 7. günlerinde HAp/kitosan ve B-HAp/kitosan üzerindeki hücrelerin mitokondriyal aktiviteleri arasında önemli bir fark görülmemiştir ($p>0.05$). Genel olarak MTT verileri incelendiğinde HAp/kitosan ve B-HAp/kitosan gruplarında ilk 5 gün boyunca hücrelerin metabolik aktivitesinin arttığı gözlemlenmiştir. Kültürün devamında 7. günde her iki grubun da absorbans değerleri düşmüş, ancak B-HAp/kitosan doku iskelelerinin değerleri diğer gruplara göre daha yüksek olarak bulunmuştur. Sonuç olarak AKH'lerin Fn immobilizasyonu olmadan da HAp/kitosan ve B-HAp/kitosan iskelerine tutunup üredikleri söylenebilir, ancak daha uzun kültür süresinde hücre canlılığının korunacağı tartışılabilir.

Kitosan+Fn, HAp/kitosan+Fn, B-HAp/kitosan+Fn iskeleleri üzerindeki KiMKH'lerin canlılıkları da 28 günlük inkübasyon süresince kültürün belirli günlerinde yapılan MTT analizi ile belirlenmiştir (Çizelge 3.5 a). Sonuçlar günlere karşı optik yoğunluk değeri olarak Şekil 4.20'de verilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde hücre ekiminden sonra KİMKH'lerin tüm iskelelere tutunduğu görülmektedir. Şekil 4.20'de -4 olarak ifade edilmiş hücre ekiminden sonraki birinci günde kontrol grubu olan kitosan+Fn'ne göre HAp/kitosan+Fn ve B-HAp/kitosan+Fn iskelelerine daha fazla hücre tutunduğu görülmektedir ($p<0.001$). Tutunmayı en çok destekleyen grubun ise B-HAp/kitosan+Fn olduğu belirlenmiştir ($p<0.01$).



Şekil 4.20. Kitosan+Fn, HAp/kitosan+Fn ve B-HAp/kitosan+Fn doku iskeleleri üzerinde çoğalan KiMKH'lere ait MTT grafiği (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık, n=3, kontrol grup kitosan ile diğer gruplar için * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001; HAp/kitosan ve B-HAp/kitosan için • p<0.05, •• p<0.01, ••• p<0.001).

Hücre ekiminden 5 gün sonra hücreler osteojenik ortama alınmıştır. Osteojenik ortama alınmadan bir gün önce (-1) bütün iskelelerin hücre canlılığında azalma görülmüş ve iskeleler arasında hücre canlılığı açısından en yüksek değere B-HAp/kitosan+Fn iskelede ulaşılmıştır (p<0.001), en düşük hücre canlılığı ise HAp/kitosan+Fn iskelede gözlemlenmiştir. Osteojenik kültürün 2. gününde hücre canlılığında azalma devam ederken, HAp/kitosan+Fn ve kitosan+Fn iskelesi arasında anlamlı bir fark görülmemiştir (p>0.05). Ancak, kitosan+Fn (p<0.05) ve HAp/kitosan+Fn (p<0.01) iskelelerin hücre canlılığı B-HAp/kitosan+Fn iskelesinden düşük bulunmuştur. Kültürün 5. gününde iskeleler arasında hücre canlılığı açısından anlamlı bir fark gözlenmemiştir (p>0.05). 5. gün ile 9. gün arasında iskelelerin hücre canlılığında anlamlı bir fark görülmemiş, fakat B-HAp/kitosan+Fn iskelelerde diğer gruplara göre artış gözlenmiştir (p<0.001). Ondördüncü günde en yüksek hücre canlılığına HAp/kitosan+Fn iskelelerde ulaşılmıştır. Yirmibirinci ve yirmisekizinci günlerde en yüksek hücre canlılığına B-HAp/kitosan+Fn iskelesinde ulaşılmıştır. Genel olarak MTT sonuçları incelendiğinde her üç grup iskelede de KiMKH sadece ekimden sonra ilk gün yüksek tutunma göstermiş, ilerleyen

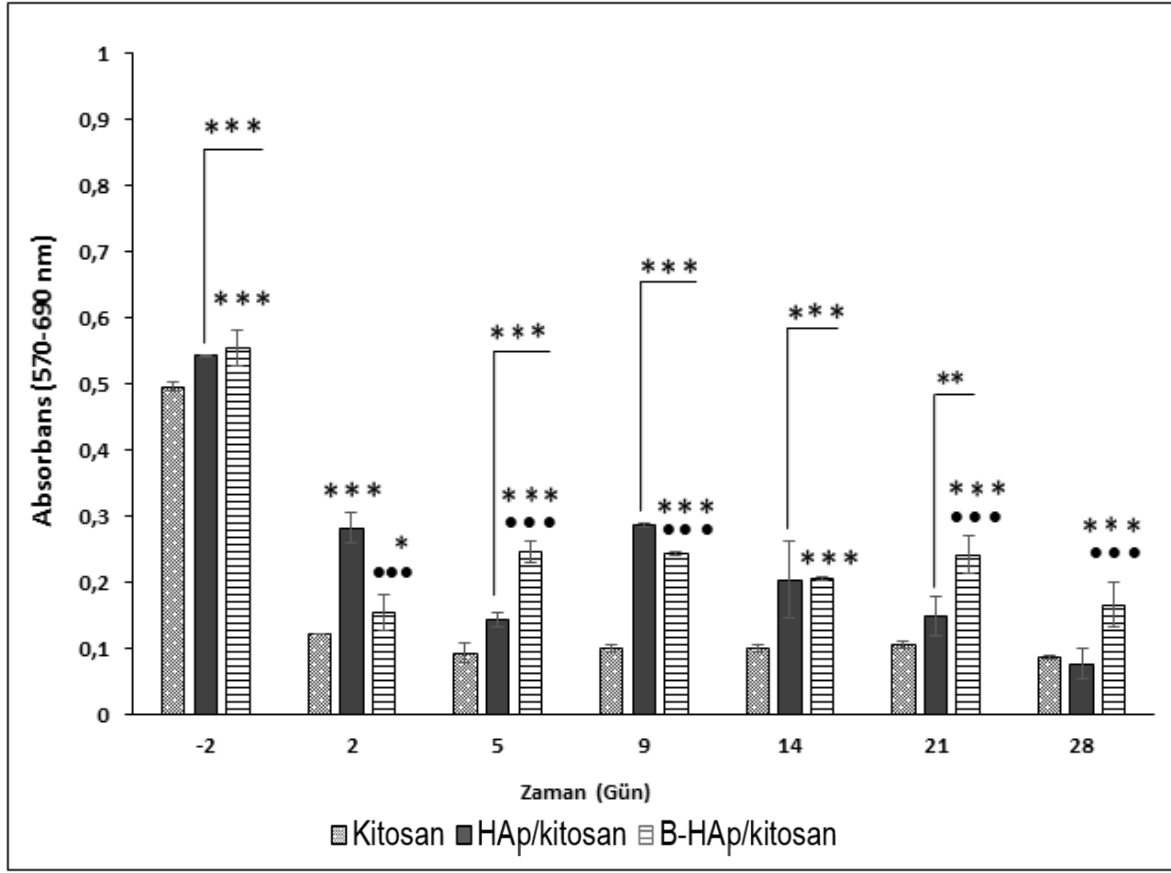
günlerde ise tutunup yayılamayan hücrelerin yıkamalar ile uzaklaşması nedeniyle absorbansta hızlı bir düşüş tespit edilmiştir. Ancak, bütün analizler değerlendirildiğinde genel olarak B-HAp/kitosan+Fn iskelesinde hücre canlılığının en yüksek olduğu görülmektedir.

Yeh ve ark. [134] yaptıkları çalışmada TCPS yüzeyinde fibroblastik morfoloji sergileyen MKH'lerin kitosan üzerinde 16 saate kadar tutduklarını, ardından sferoid oluşturdıklarını belirtmişler. Sferoid MKH'lerin ise 24 saate kadar canlılığını koruduklarını gözlemlemişlerdir.

KiMKH'lerin Fn immobilizasyonu yapılmayan doku iskeleri üzerindeki üreme davranışları ve mitokondriyal aktiviteleri 28 günlük inkübasyon süresince belirli günlerde yapılan MTT analizi ile takip edilmiştir (Çizelge 3.5 b). MTT analizi sonucu elde edilen veriler 570 nm'de belirlenen optik yoğunluk değerleri olarak Şekil 4.21'de verilmiştir.

Sonuçlar incelendiğinde hücre ekiminden sonra KiMKH'lerin tüm iskelelere tutunduğu görülmektedir. Şekil 4.21'de -2 olarak ifade edilmiş kültürün hücre ekiminden sonraki ikinci gününde kontrol grubu olan kitosan göre HAp/kitosan ve B-HAp/kitosan iskelelerine daha fazla hücre tutunduğu görülmektedir ($p<0.001$) ve tutunmayı en çok destekleyen grubun ise B-HAp/kitosan olduğu gözlemlenmiştir ($p<0.01$).

Kültürün beşinci gününde iskeleler osteojenik ortama alınmıştır. Osteojenik kültürün 2. gününde (2) hücre canlılığında azalma görülmüş, en yüksek hücre canlılığına ise HAp/kitosan iskelede ulaşılmıştır. Kültürün 5. gününde (5) kitosan iskeleler ile diğer gruplar arasında anlamlı derece fark görülmüştür ($p<0.001$). Ayrıca, en yüksek hücre canlılığına B-HAp/kitosan iskelede ulaşılmış ($p<0.001$) ve 2. güne göre hücre canlılığında artış görülmüştür. HAp/kitosan iskelede 5. günle 9. gün arasında iskelelerin hücre canlılığında anlamlı bir artış görülmüştür. Kültürün 9. gününde kontrol grubu olan kitosan göre diğer iki grubun hücre canlılığı anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0.001$). Kültürün 14. ve 21. günlerinde hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir. Yirmisekizinci günde bütün grupların hücre canlılığında azalma görülmüştür.



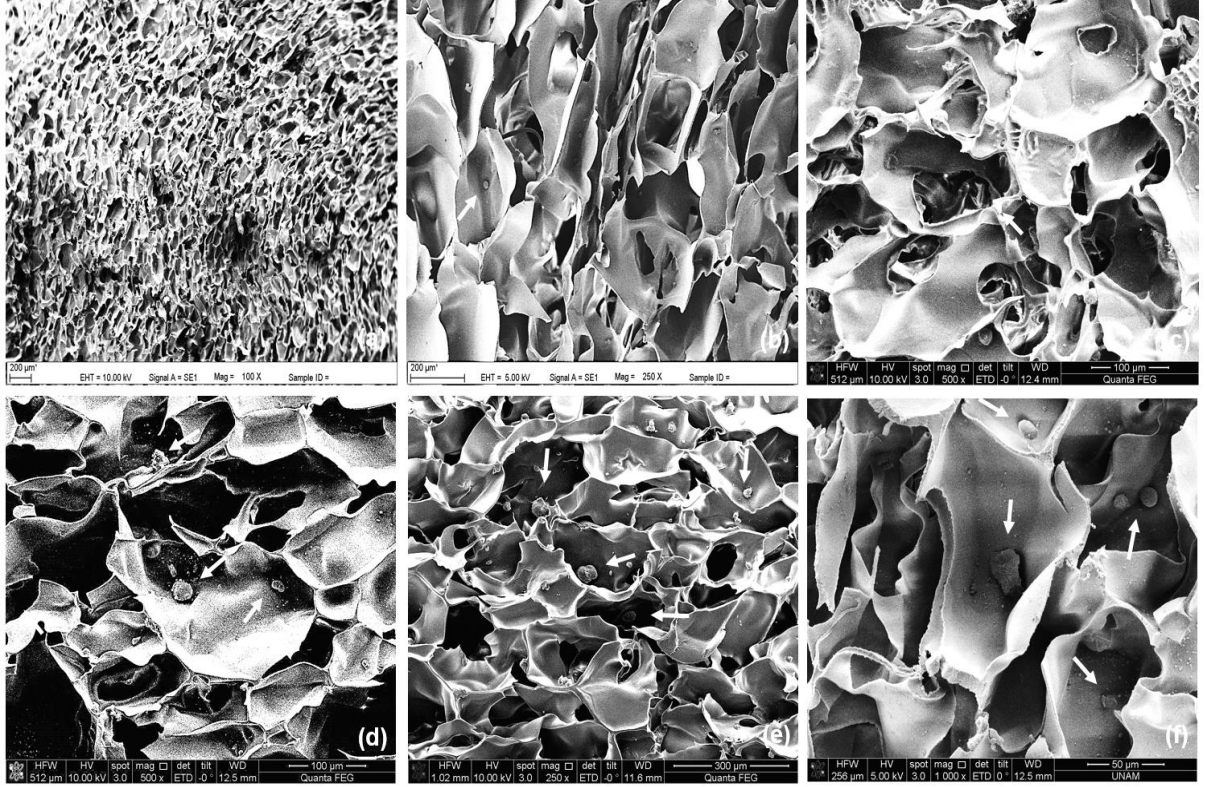
Şekil 4.21. Kitosan, HAp/kitosan ve B-HAp/kitosan doku iskeleleri üzerinde çoğalan KiMKH'lere ait MTT grafiği (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık, n=3, kontrol grup kitosan ile diğer gruplar için * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001; HAp/ ve B-HAp/kitosan için • p<0.05, •• p<0.01, ••• p<0.001).

Genel olarak MTT sonuçları incelendiğinde her üç grup iskelede de KiMKH'lerin ekimden sonra, ilk gün yüksek tutunma gösterdiği, ancak ilerleyen günlerde tutunup yayılamayan hücreler yıkamalar ile uzaklaştığından absorbansın düştüğü belirlenmiştir. Analiz sonucu değerlendirildiğinde ise B-HAp/kitosan+Fn grubunda hücre canlılığının en yüksek olduğu görülmüştür.

4.2.3.3. SEM Analizi

Hücrelerin doku iskelesinin yüzeyine tutunması ve yayılması, hücre çoğalması ve farklılaşması açısından önemlidir. Bu nedenle kitosan bazlı iskeleler ile hücreler arasındaki etkileşim ve hücrelerin morfolojileri SEM analizi ile incelenmiştir. Şekil 4.22'de açıkça görüldüğü gibi az sayıda hücre kitosan iskele yüzeyine tutunmuş ve bu hücrelerde küresel morfoloji sergilemişlerdir. Kitosan doku iskelelerine ait SEM görüntüleri, MTT analiz sonuçlarını destekler niteliktedir.

Literatür incelendiğinde kitosan doku iskelesinin kök hücre yapışmasını desteklemediğini belirten çalışmalara rastlanmıştır [134, 135]. Bu sorunun üstesinden gelmek için Fn immobilizasyonu yapılmış ancak istenilen sonuç elde edilememiştir.



Şekil 4.22. Kitosan+Fn doku iskelesi üzerinde çoğalan AKH'lere ait SEM görüntüleri (a) 7.gün 100X, (b) 7.gün 250X, (c) 14.gün 500X, (d) 14.gün 500x, (e) 21.gün 250X, (f) 21.gün 1000X.

HAp/kitosan+Fn doku iskelerinin AKH'lerin tutunmasını ve çoğalmasını desteklediği Şekil 4.23'de açıkça görülmektedir. Hücrelerin HAp/kitosan+Fn doku iskelerinin yüzeyine tutundukları, yayıldıkları ve sitoplazmik uzantıları ile birbirleri ile temas kurdukları Şekil 4.23 b, c, ve f'de görülmektedir. Ayrıca Şekil 4.23 e ve i'den de görüldüğü gibi AKH'ler sadece iskele yüzeyinde kalmamış, hücre ekimi sonrasında içsel bağlantılı gözeneklerden iskelenin iç bölgelerine doğru yayılmaya devam etmişlerdir. MTT sonuçlarına paralel olarak SEM fotoğraflarında da 14. günde hücre yoğunluğunun diğer günlere nazaran arttığı görülmektedir. Ayrıca 14. ve 21. günlerde hücrelerin, salgıladıkları hücre dışı matris miktarının artması nedeniyle iskele yüzeyini tamamen kapladıkları gözlenmiştir (Şekil 4.23 g ve j). Kültürün 14. ve 21. günlerinde iskele yüzeyinde kollajen fiberlerinin oluşmaya başladığı belirgin bir şekilde görülmektedir (Şekil 4.23 h, i ve k).

B-HAp/kitosan+Fn iskelelerinin sırasıyla 4., 7., 14. ve 21. günlere ait SEM görüntüleri incelendiğinde, doku iskelesinde hücre yoğunluğunun arttığı açıkça görülmektedir (Şekil 4.24 a, d, g ve j). Ayrıca, 14. günde hücrelerin membranlarında, osteoblastik farklılaşmaya gittiklerini gösteren mineralizasyon kümelerinin oluşumu gözlenmiştir (Şekil 4.24 i). Kültürün 14. ve 21. günlerde hücrelerin sentezledikleri hücre dışı matris yapısıyla gözenekleri doldurdukları ve iskele yüzeyini tamamen kapladıkları gözlemlenmiştir (Şekil 4.24 g ve j). Hücrelerin nano boyutta kollajen fiberleri ürettikleri Şekil 4.24 k ve l'de belirgin bir şekilde görülmektedir.

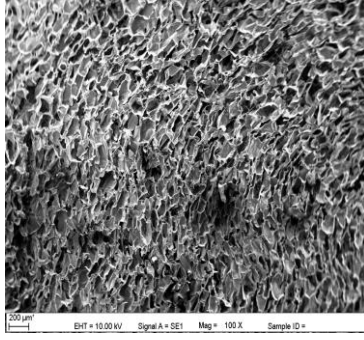
MTT analizi sonuçları ve SEM görüntüleri değerlendirildiğinde, hidroksiapatit yapısına biyomimetik yöntem ile katılmış olan borun AKH'lerde herhangi bir negatif etkiye neden olmadığı, hatta diğer gruplara göre hücre yapışması ve çoğalmasını daha iyi desteklediği görülmüştür. Bu etkinin nedeninin, yapı içine katılan borun ya da borat iyonlarının, apatitin kafes yapısını değiştirmesi olabileceği gibi, asıl etkinin kemik benzeri apatitten gerçekleşen bor iyonları salımından kaynaklanan osteoindüktif etkiye bağlı olabileceği de düşünülmektedir. Sonuç olarak HAp/kitosan+Fn ve B-HAp/kitosan+Fn doku iskelelerinin AKH'lerin tutunmasını, yayılmasını, çoğalmasını desteklediği ve osteoblastik farklılaşma süresini hızlandırdığı belirlenmiştir.

Fn immobilizasyonu yapılmamış doku iskeleleri ile hücreler arası etkileşim ve hücrelerin morfolojileri kültürün 7. gününde SEM analizi ile incelenmiştir. SEM görüntüleri incelendiğinde kitosan+Fn iskelelerde olduğu gibi kitosan doku iskelesinin de AKH yapışmasını desteklemediği görülmüştür (Şekil 4.25 a, b ve c). Hücrelerin çok az tutundukları, yayılamadıkları ve MKH'ler için tipik olan içi morfoloji yerine küresel morfoloji sergiledikleri görülmektedir (Şekil 4.25 c).

HAp/kitosan üzerinde kültüre edilen hücrelerin görüntüleri Şekil 4.25 d, e ve f'de verilmiştir. Hücrelerin iskeleye tutundukları, iskelenin gözenekleri boyunca geniş bir alanda yayıldıkları ve içsel bağlantılı gözeneklere doğru göç ettikleri Şekil 4.25 e ve f'de görülmektedir. Ancak fibronektin immobilize edilmiş doku iskeleleri ile karşılaştırıldığında daha az sayıda hücre görülmüştür.

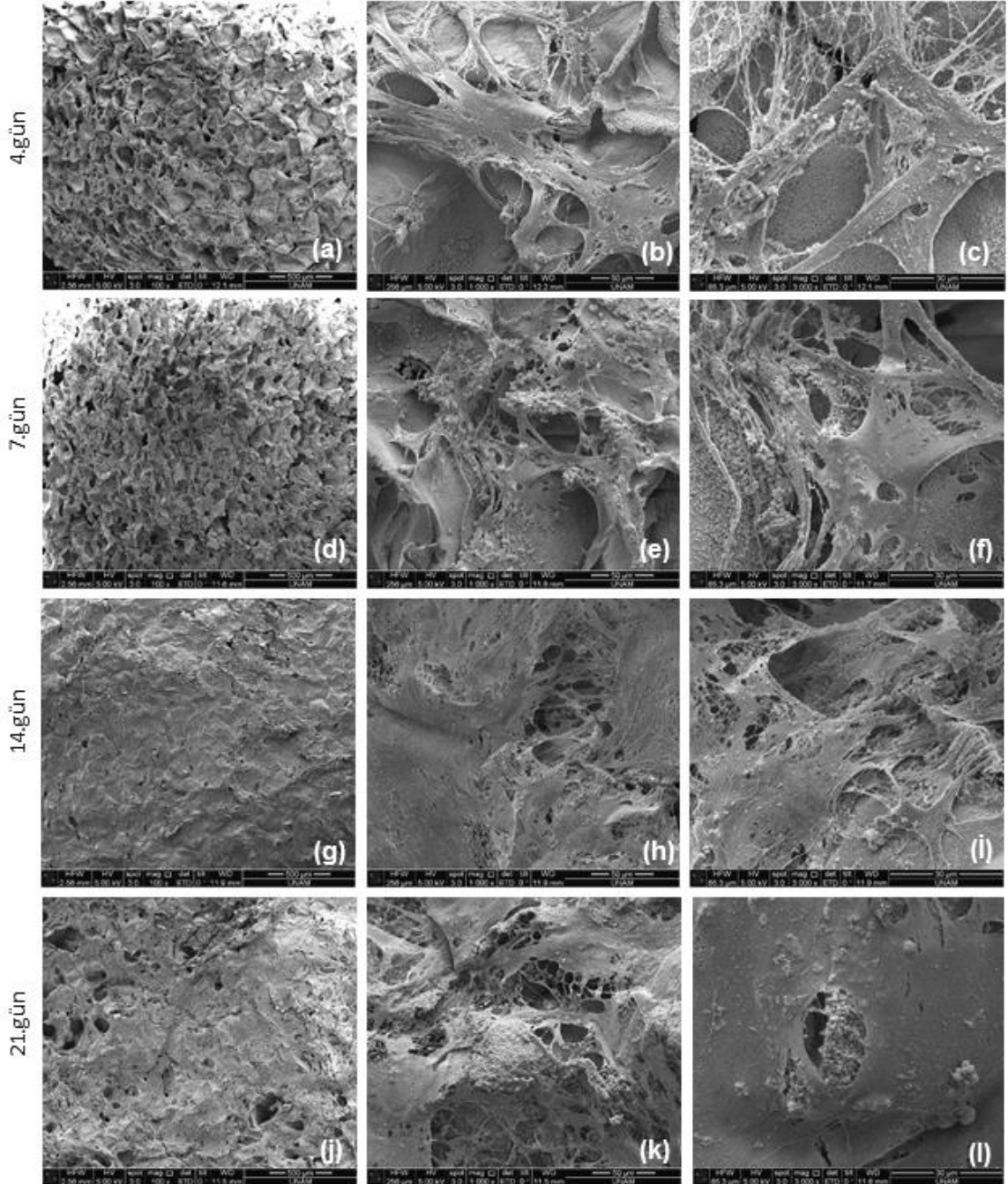
B-HAp/kitosan üzerinde kültüre edilen hücrelerin de doku iskelesinin iç bölgelerine doğru yayıldıkları görülmektedir (Şekil 4.25 i). Hücrelerin nano boyuttaki uzantıları ile gözenek duvarları boyunca köprüler oluşturarak üç boyutlu şekilde çoğaldıkları Şekil 4.25 h ve i'de açıkça görülmektedir. SEM görüntülerinden, MTT sonuçları ile paralel bir şekilde kültürün birinci haftasında hücre yoğunluğunun HAp/kitosan ve B-HAp/kitosan iskelelerinde oldukça yüksek olduğu görülmektedir (Şekil 4.25 d, g). Kültürün 7.gün sonuçları fibronektin immobilize edilmiş doku iskeleleri ile karşılaştırıldığında hücre yoğunluğunun hemen hemen aynı olduğu görülmektedir.

KiMKH'lerin fibronektin immobilize edilmiş doku iskeleleri ile olan etkileşimlerinin görüntülenebilmesi için kültürün 7., 14. ve 21. günlerinde SEM analizi gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.26, 4.27 ve 4.28 a'da açıkça görüldüğü gibi hücreler kitosan iskele yüzeyine oldukça az sayıda tutunmuş ve küresel morfoloji sergilemişlerdir. Yedinci gün SEM görüntüleri incelendiğinde KiMKH'lerin HAp/kitosan+Fn doku iskelelerine tutundukları, fakat tam yayılamadıkları görülmektedir (Şekil 4.26 b). MTT sonuçlarına paralel olarak en iyi hücre tutunması B-HAp/kitosan+Fn doku iskelelerinde gözlemlenmiştir (Şekil 4.26 c). Hücrelerin yüzeye yayıldıkları ve sitoplazmik uzantıları ile birbirleri ile temas kurdukları Şekil 4.26 e ve f'de görülmektedir. Ayrıca Şekil 4.26 d'den de görüldüğü gibi KiMKH'ler sadece iskele yüzeyinde kalmamış, içsel bağlantılı gözeneklerden iskelenin iç bölgelerine doğru yayılmaya devam etmişlerdir. Kültürün 14.gün SEM fotoğrafları incelendiğinde hücrelerin membranlarında, osteoblastik farklılaşmaya gittiklerini gösteren mineral birikimleri gözlemlenmiştir (Şekil 4.27 c, e). Hücrelerin daha geniş bir alanda yayıldıkları, hücre dışı matris yapılarının gelişmiş oldukları ise Şekil 4.27 e ve f'de açıkça görülmektedir. Kültürün 21. gününde iskele yüzeyinde nano boyutta kollajen fiberlerinin oluşmaya başladığı belirgin bir şekilde görülmektedir (Şekil 4.28 c ve d).

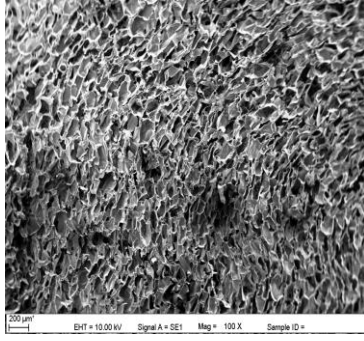


Kitosan

HAp/KİTOSAN

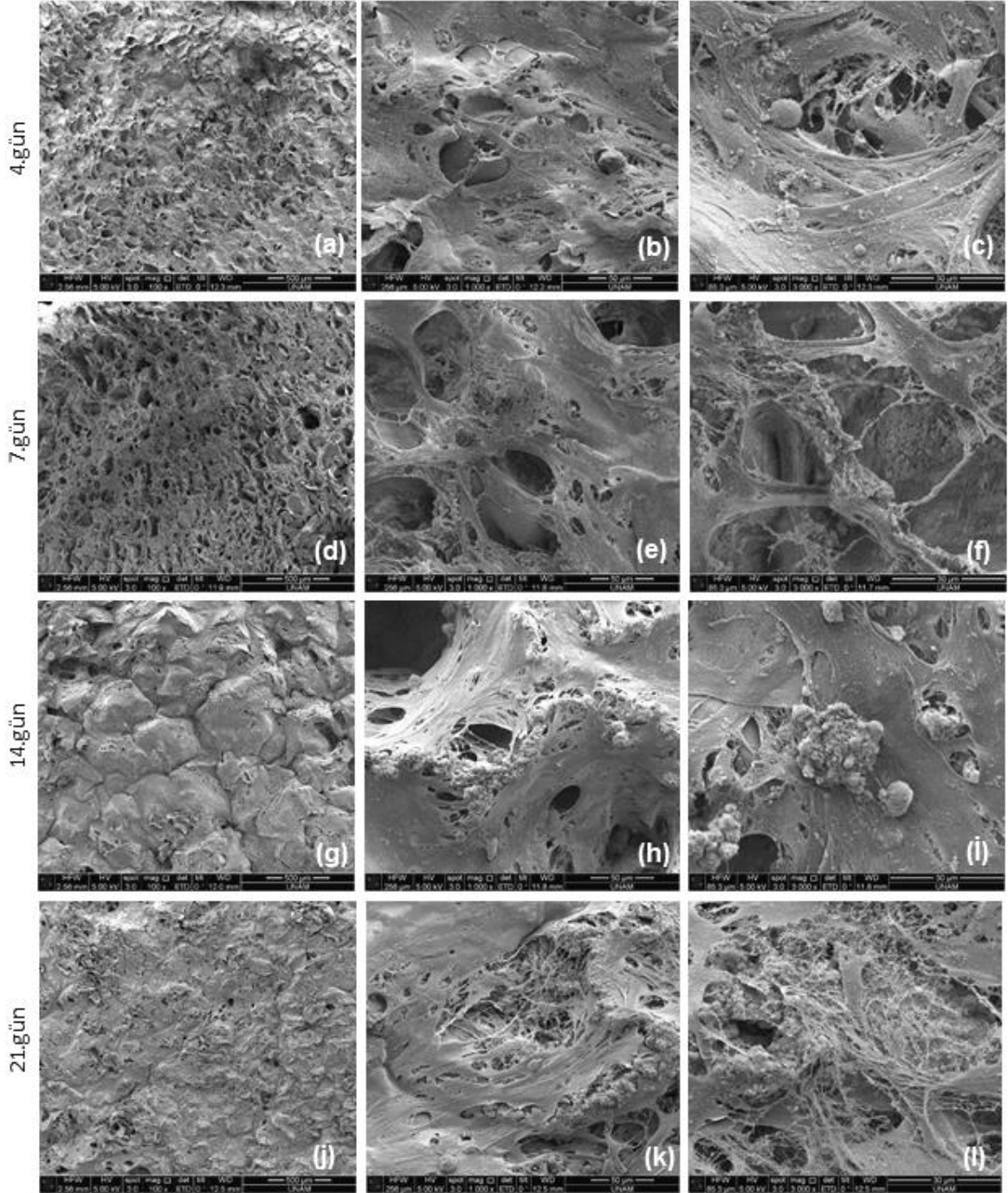


Şekil 4.23. HAp/kitosan+Fn üzerinde çoğalan AKH'lere ait SEM görüntüleri (Sırasıyla 100x, 1000x, 3000x büyütme verilmektedir).

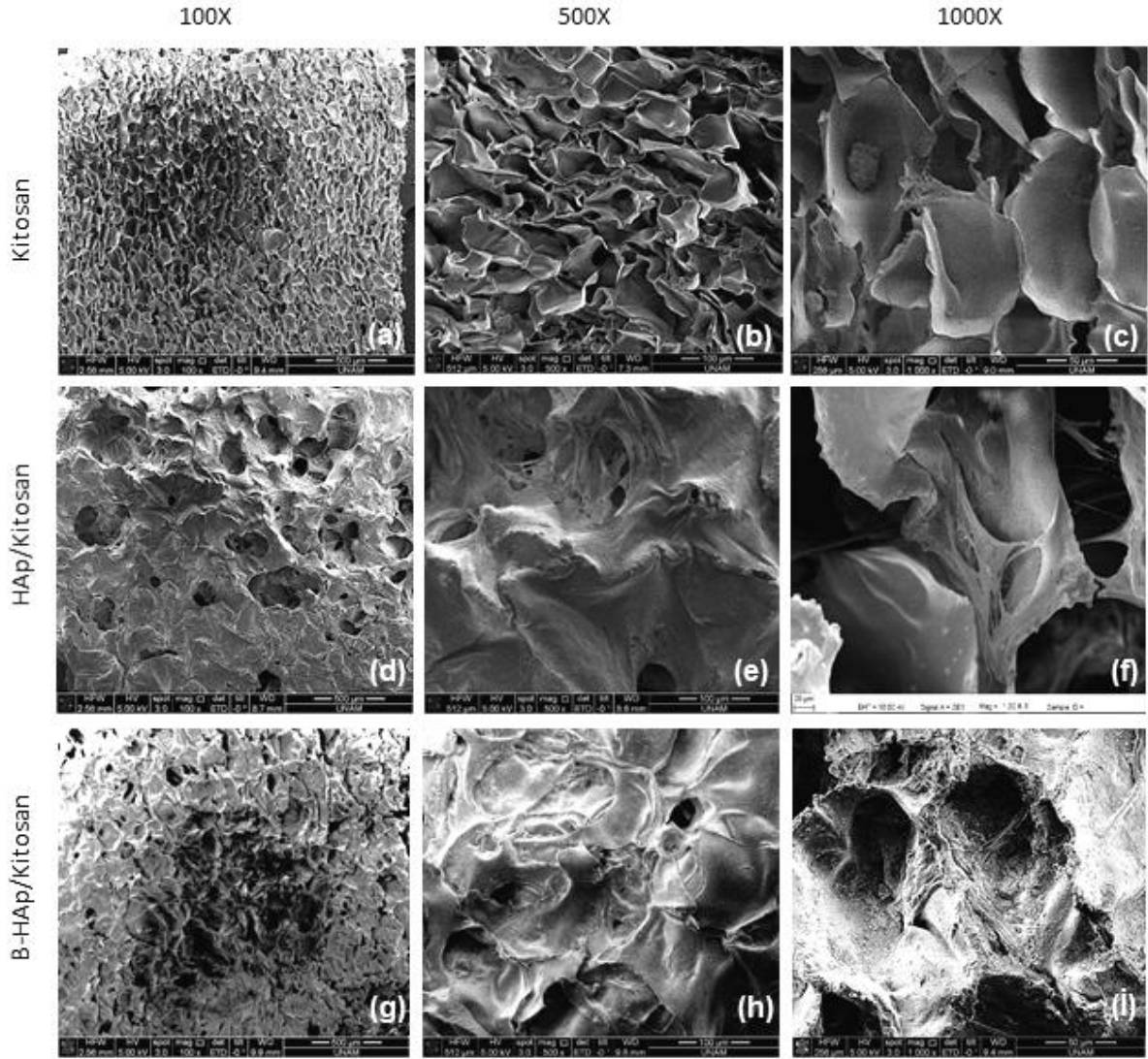


Kitosan

B-HAp/KITOSAN

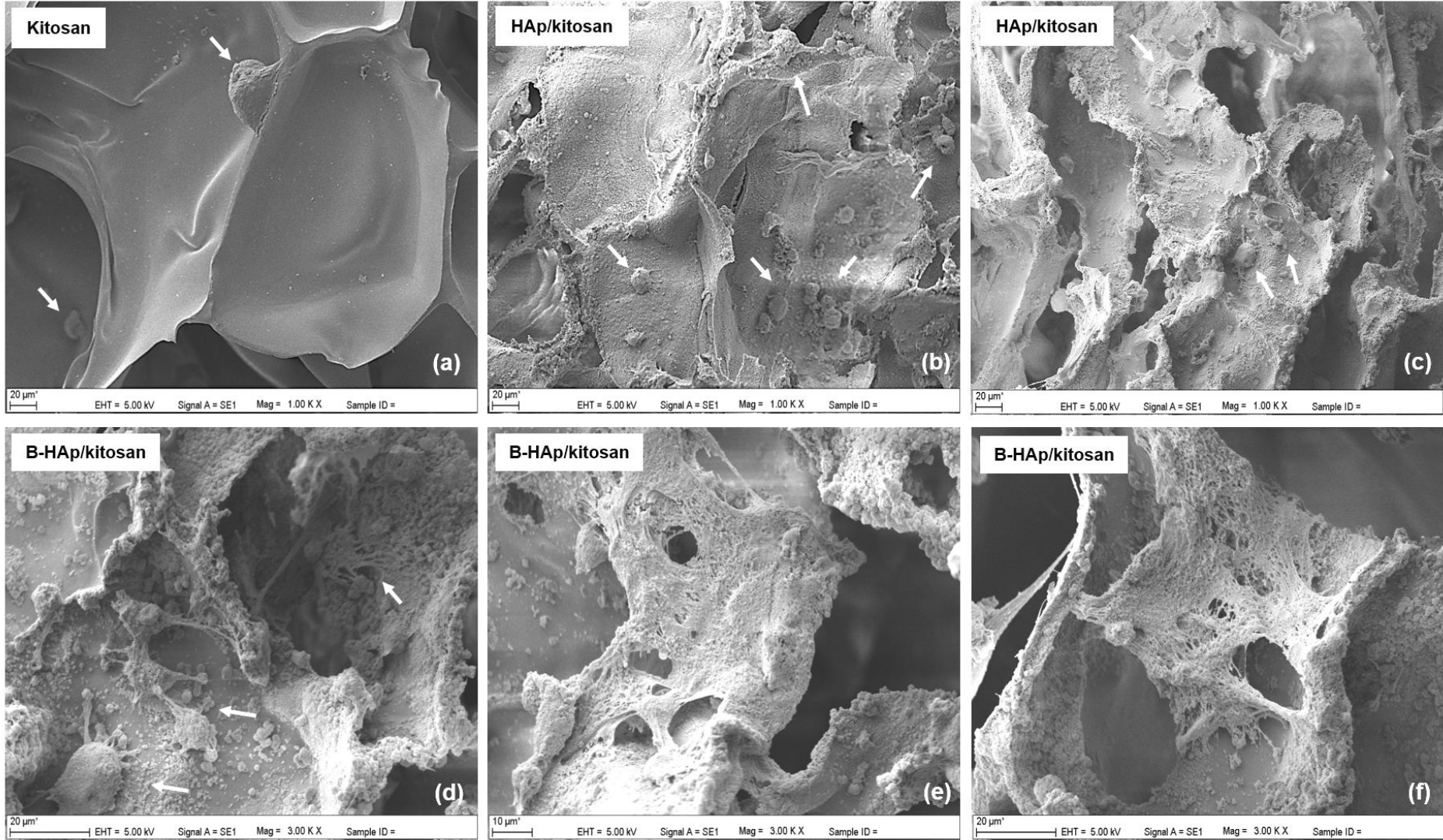


Şekil 4.24. B-Hap/kitosan+Fn üzerinde çoğalan AKH'lere ait SEM görüntüleri (Sırasıyla 100x, 1000x, 3000x büyütme vermiştir).

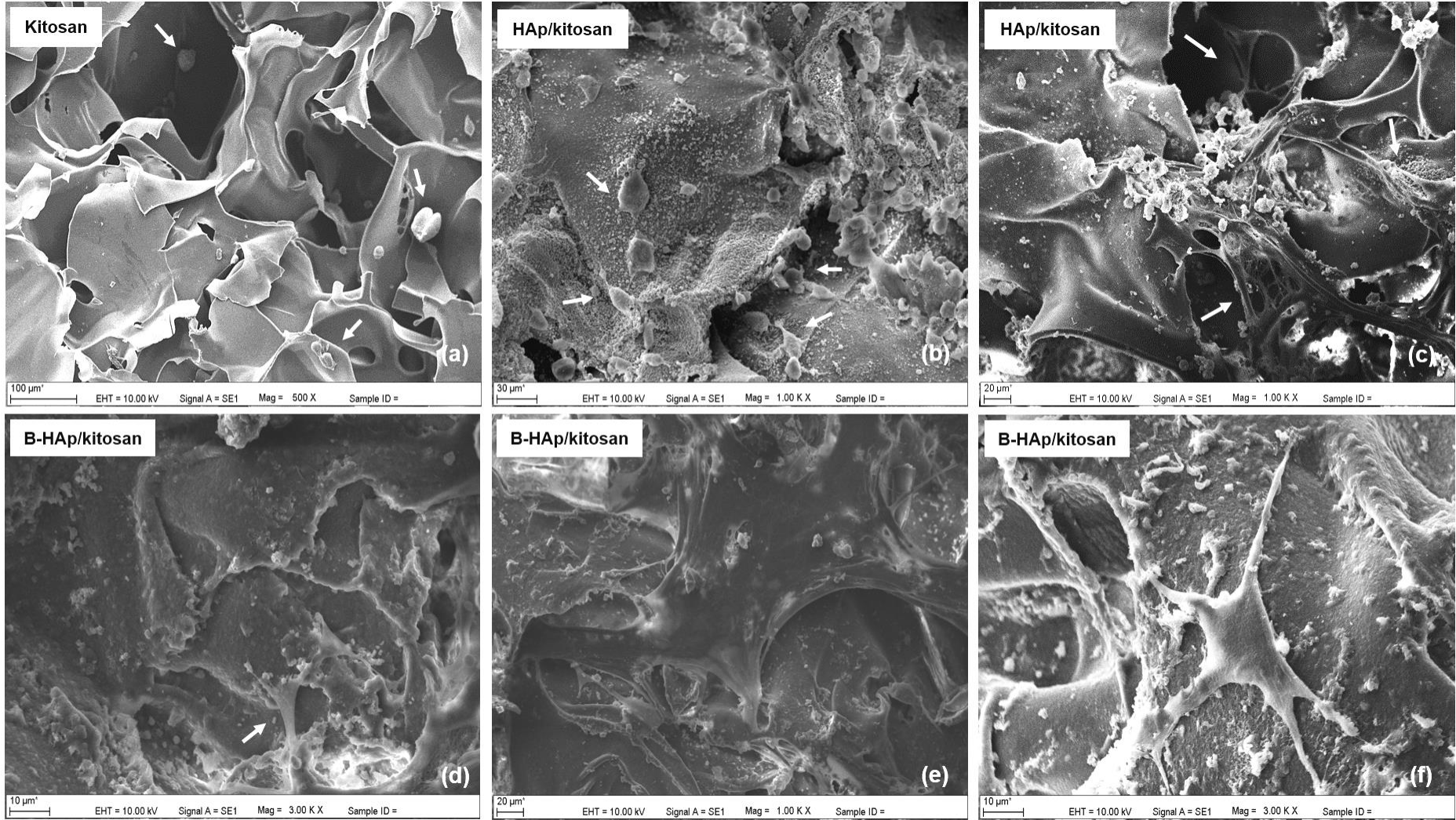


Şekil 4.25. Kitosan, HAp/kitosan ve B-HAp/kitosan üzerinde çoğalan AKH'lere ait 7.gün SEM görüntüleri (Sırasıyla 100x, 500x, 1000x büyütme verilmektedir).

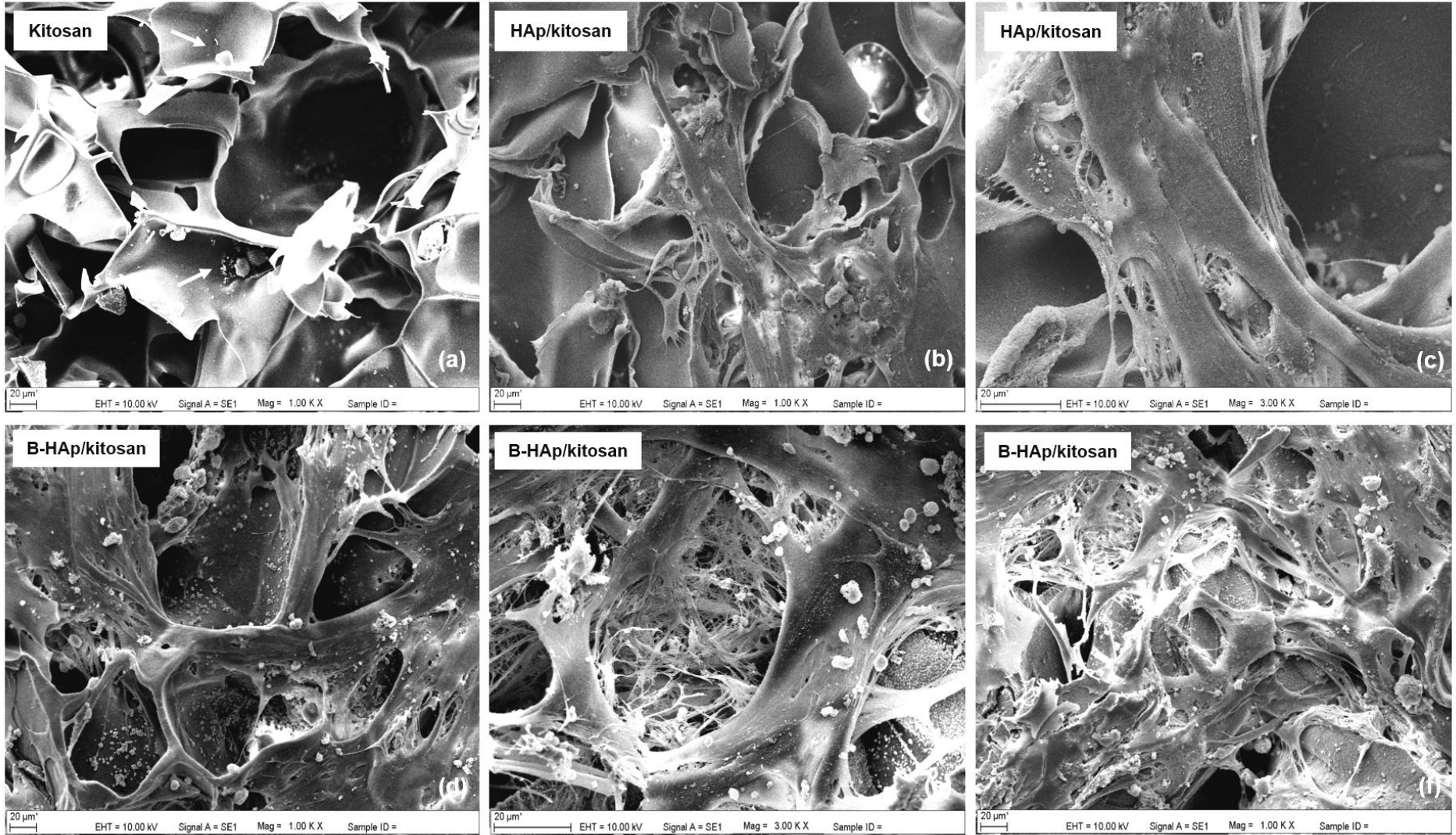
Fibronektin immobilizasyonu yapılmamış doku iskeleleri üzerinde üreyen KiMKH'lerin morfolojileri ve hücre-iskele etkileşimleri kültürün 14. gününde SEM analizi ile incelenmiştir. SEM görüntüleri incelendiğinde Fn'siz kitosan doku iskelesinin KiMKH'lerin yapışmasını desteklemediği, hücrelerin çok az miktarda tutundukları ve küresel morfoloji sergiledikleri görülmektedir (Şekil 4.29 a). HAp/kitosan ve B-HAp/kitosan üzerinde kültüre edilen KiMKH'lerin iskelelere tutunup, yayılıp ve çoğaldıkları görülmektedir (Şekil 4.29 b, c, d, e ve f). Ayrıca, Şekil 4.29 c'de hücrelerin özellikle HAp üzerine tutundukları açıkça görülmektedir.



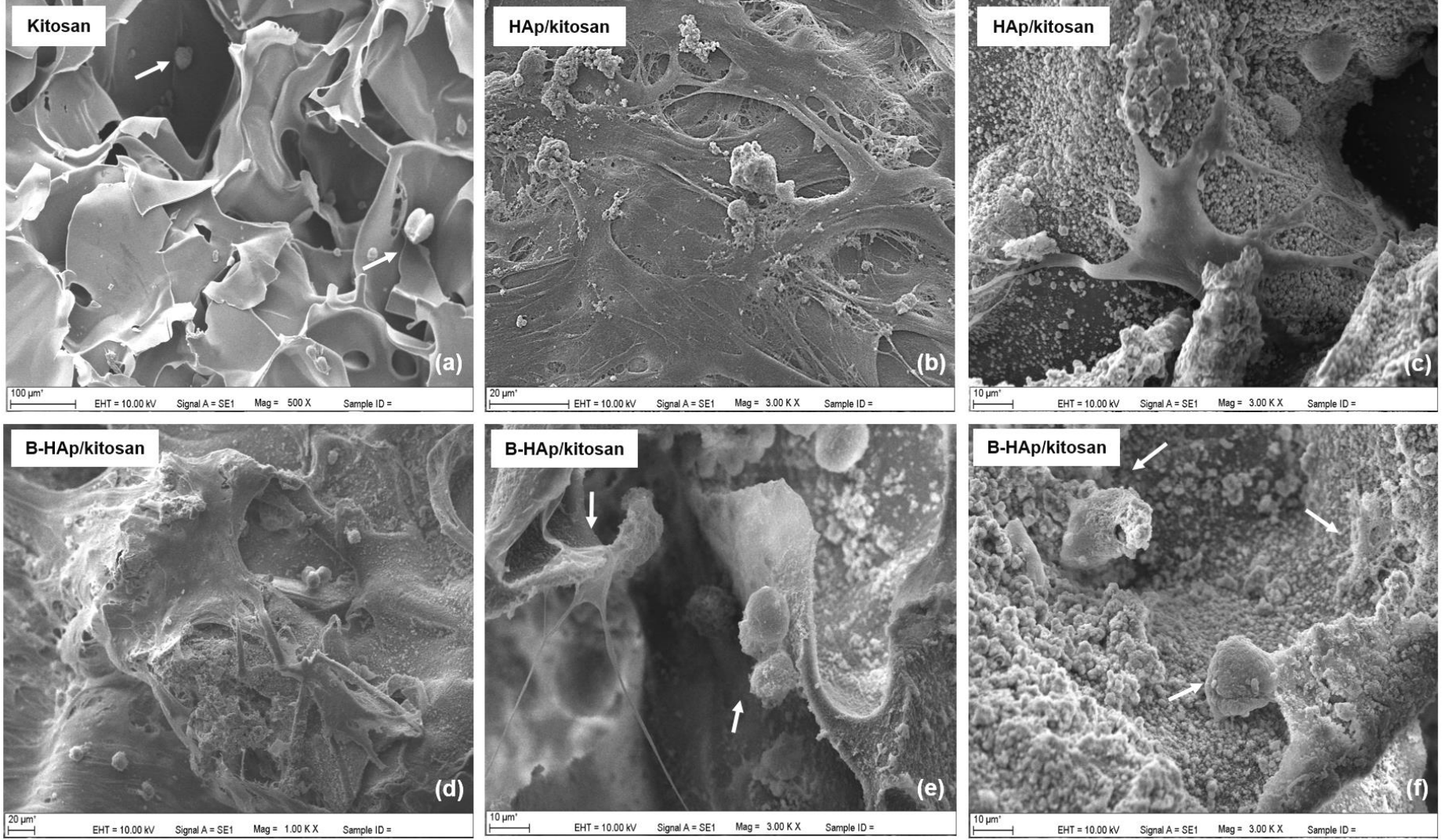
Şekil 4.26 Fibronektin immobilizasyonu yapılan doku iskeleleri üzerinde çoğalan KimKH'lerine ait 7.gün SEM görüntüleri.



Şekil 4.27. Fibronektin immobilizasyonu yapılan doku iskeleleri üzerinde çoğalan KiMKH'lere ait 14.gün SEM görüntüleri.



Şekil 4.28. Fibronektin immobilizasyonu yapılan doku iskeleleri üzerinde çoğalan KiMKH'lere ait 21.gün SEM görüntüleri.

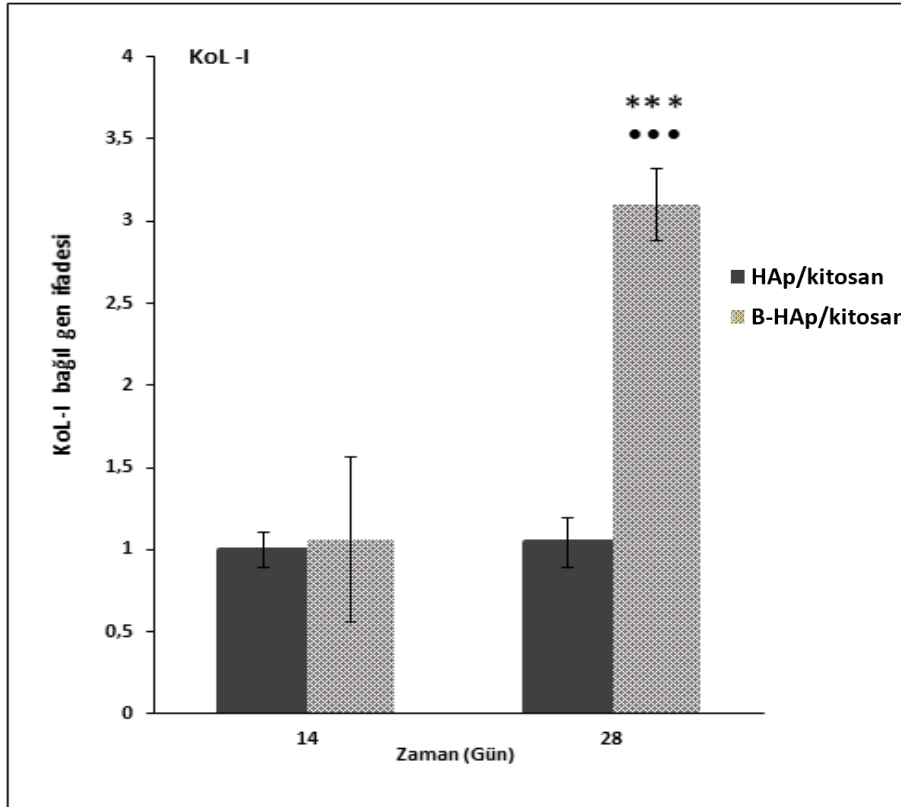


Şekil 4.29. Doku iskeleleri üzerinde çoğalan KiMKH'lere ait 14.gün SEM görüntüleri.

4.2.3.4. RT-PCR Analizleri

Osteojenik farklılaşma sırasında kollajen-I (KOL-I), osteonektin (ON), kemik sialoproteini, osteopontin (OPN) ve osteokalsin (OCN) gibi genlerin ifadelerinde artış gözlenmektedir [66]. Sunulan tez çalışması kapsamında iskeleler üzerine ekilen hücrelerin osteoblastik farklılaşmasının belirlenmesi amacıyla hücrelerdeki KOL-I, RunX2, ON ve OPN gen ifadeleri RT-PCR analizi ile belirlenmiştir. RT-PCR sonuçları mRNA ekspresyonunda HAp/kitosan grubundaki değerlerin kat artışı olarak gösterilmiştir. Kitosan iskelelerin RT-PCR analizleri yeterli sayıda hücre tutunması gerçekleşmediğinden yapılmamıştır.

Kollajen kemiğin temel yapılarından biridir ve mekanik dayanımını sağlamaktadır. Kemik hücre dışı matrisinin yaklaşık % 90'ını KOL-I'den oluşmaktadır. Yeni kemiğin oluşumu sırasında öncelikli olarak hücreler çoğalmakta ve çoğalan osteoblastlar KOL-I salgılamaktadır.



Şekil 4.30. HAp/kitosan ve B-HAp/kitosan üzerinde çoğalan AKH'lere ait bağıll kollajen-I gen ifadesi grafiği (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık, n=3, aynı günde farklı gruplar için * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001; aynı grubun farklı günleri için • p<0.05, •• p<0.01, ••• p<0.001)

Doku iskeleleri üzerindeki hücrelerin KOL-I gen ifadeleri incelendiğinde (Şekil 4.30) 14. günde HAp/kitosan ve B-HAp/kitosan iskeleler arasında anlamlı bir fark olmadığı görülmektedir. Yirmisekizinci gün değerleri kendi içinde değerlendirildiğinde gen ifade seviyesi B-HAp/kitosan grubunda HAp/kitosan grubundan yaklaşık olarak 3 katına çıktığı görülmüştür. B-HAp/kitosan grubunda KOL-I gen ifadesi 14. gün ile karşılaştırıldığında ise 28. günde oldukça yüksek olduğu görülmektedir ($p < 0.001$).

Hakkı ve ark. [13] yaptıkları çalışmada borik asitin, moleküler düzeyde mineralizasyonu artırdığını belirtmişlerdir. Borun farklı konsantrasyonlarının MC3T3-E1 hücrelerinin gen ifadelerine etkisini incelemişler ve kültürün 8. gününde borla muamele edilen grup diğer bütün gruplarla karşılaştırıldığında KOL-I seviyesinin oldukça yükseldiğini gözlemlemişlerdir.

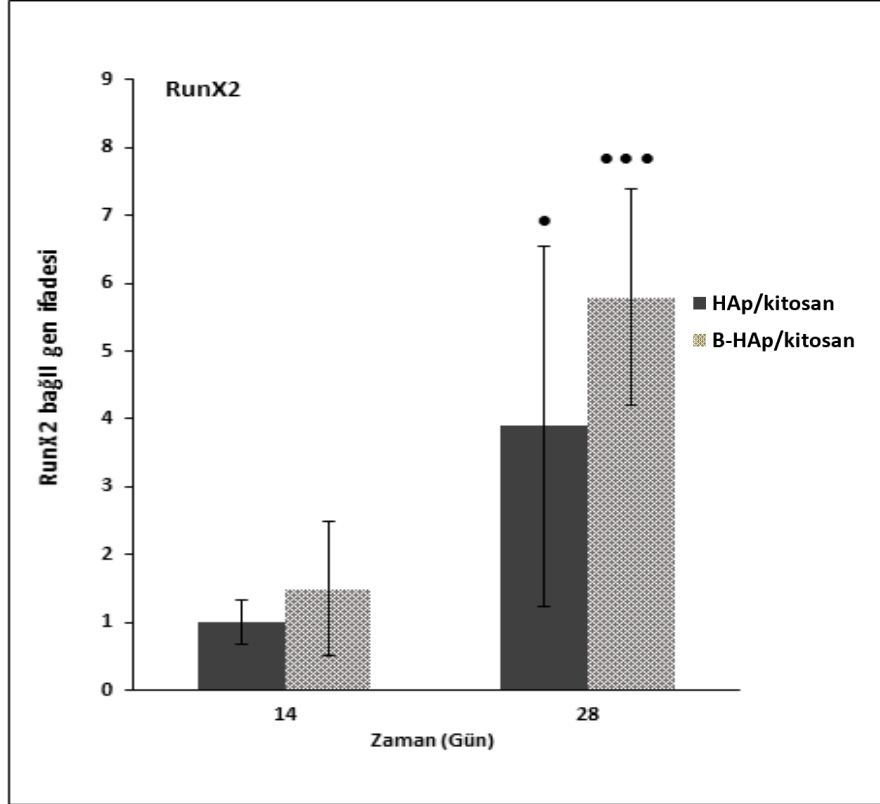
Demirci ve ark. [12] borun (NaB formunda) farklı konsantrasyonlarının insan diş germ kök hücrelerinin (hTGSCs) canlılığı üzerine etkilerini araştırmışlardır. hTGSC hücrelerinin NaB ile muamelesinin KOL-I gen ifadesini önemli derecede arttırdığını tespit etmişlerdir.

RunX2 mezenkimal kök hücrelerin olgunlaşmamış osteoblastlara farklılaşmasını indüklemekte ve osteoblast farklılaşmasının erken evrelerinde önemli kemik matrisi genlerinin gen ifadesini başlatmaktadır. Normal olarak, RunX2 osteoblastların olgunlaşmasını engeller ve kemik gelişiminin ilerleyen aşamalarında RunX2 gen ifadesi azalır.

Şekil 4.31 incelendiğinde doku iskelelerindeki hücrelerin RunX2 gen ekspresyonun kültürün ilerleyen günlerinde her iki grupta da arttığı görülmektedir. Grupların farklı günlerindeki değerler karşılaştırıldığında HAp/kitosan iskelede daha az artış görülürken ($p < 0.05$), B-HAp/kitosan iskelede belirgin bir farklılık gözlenmiştir ($p < 0.001$). B-HAp/kitosan iskelenin RunX2 ifadesi her iki günde de HAp/kitosan iskeleden daha yüksek olduğu görülmektedir.

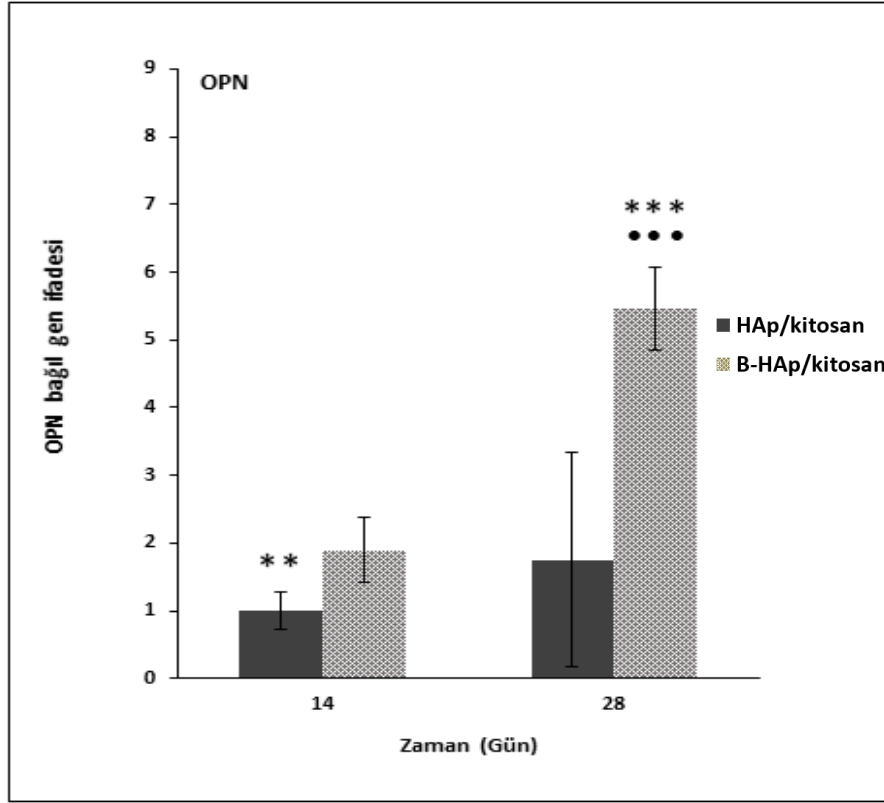
Wu ve ark. [14] bor içeren gözenekli biyoaktif cam doku iskeleler üzerinde osteoblastların davranışlarını incelemişlerdir. İskeleye katılan borun RunX2 gen ifadesini arttırdığını belirlemişlerdir. Borun, kemik sağlığı için temel bir element olduğunu, kemik hücreleri ve kemik doku büyümesi üzerindeki etkisinin konsantrasyonuna bağlı olduğunu belirtmişlerdir.

Ayrıca, Hakkı ve ark. [13] bor iyonlarının düşük konsantrasyonlarda (<100ng/mL) RunX2 gen ekspresyonunu ve mineralize nodüllerin oluşumunu arttırdığını tespit etmiştir. Tez çalışmasında RunX2 gen ifadesinin sürekli artışının kök hücrelerin daha geç dönemde osteoblastik farklılaşmaya gitmesinden kaynaklandığı söylenebilir.



Şekil 4.31. HAp/kitosan ve B-HAp/kitosan üzerinde çoğalan AKH'lere ait bağıllı RunX2 gen ifadesi grafiği (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık, n=3, aynı günde farklı gruplar için * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001; aynı grubun farklı günleri için ● p<0.05, ●● p<0.01, ●●● p<0.001).

Osteopontin hücre dışı matris bileşeni ve kemiğin yeniden yapılandırılmasında rol oynayan önemli bir aracı proteindir. Osteojenik farklılaşmanın geç dönemlerinde mineral kristallerinin büyümesini inhibe ederek negatif düzenleyici olarak görev yapar. Osteopontin ekspresyonu osteojenik indüksiyondan 2 hafta sonra yükselir [136, 137].



Şekil 4.32. HAp/kitosan ve B-HAp/kitosan üzerinde çoğalan AKH'lerine ait bağıl osteopontin gen ifadesi grafiği (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık, n=3, aynı günde farklı gruplar için * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001; aynı grubun farklı günleri için • p<0.05, ●● p<0.01, ●●● p<0.001).

Osteopontin ekspresyon seviyeleri incelendiğinde (Şekil 4.32) 28. günde her iki grupta da gen ekspresyon seviyesinin 14. günden daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Grupların farklı günlerindeki değerler karşılaştırıldığında HAp/kitosan iskelede anlamlı bir artış görülmezken ($p>0.05$), B-HAp/kitosan iskelede belirgin bir farkla gen ekspresyon seviyesi artmıştır ($p<0.001$). Kültürün 28. gün değerleri kendi içinde değerlendirildiğinde B-HAp/kitosan gruptaki gen ifadesi HAp/kitosan grubundan anlamlı ölçüde fazladır ($p<0.001$).

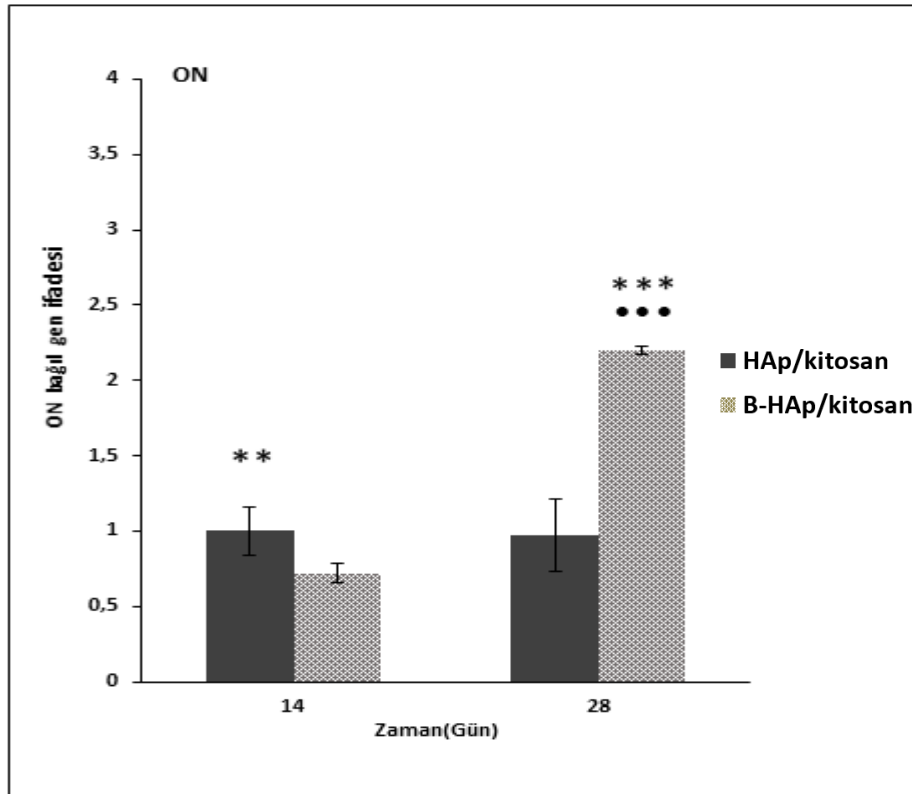
Sonuç olarak B-HAp/kitosan iskelenin OPN ifadesi her iki günde de HAp/kitosan iskeleden daha yüksek olduğu görülmektedir.

Tunçay Ö.E. [114] tarafından gerçekleştirilen çalışmada da B-HAp/kitosan ve HAp/kitosan gruplarında 28. günde osteopontin ifadesi 14. güne göre anlamlı derecede yükselmiştir. Her iki günde de B-HAp/kitosan grubundaki OPN ifadesi HAp/kitosan'dan daha yüksektir (Şekil 4.35).

Osteojenik farklılaşmanın ileri süreçlerinde ifade edilen osteonektin, kemik matrisinde osteoblastlar tarafından üretilen en bol kollajensiz proteindir. Osteonektin, yüksek afiniteye sahip iki iyonik kalsiyum bağlama bölgesi içermekte, kollajen tip I ve hidroksiapatite afintesinden dolayı kalsifikasyona aracılık edebilmektedir [66].

Osteonektin ifadesinde 14.günde gruplar arasında anlamlı bir fark gözlenmezken, 28. günde HAp/kitosan grubuna göre, B-HAp/kitosan grubu 3 kat fazla olduğu gözlenmektedir ($p<0.001$). B-HAp/kitosan grubunun farklı günlerdeki ON ifadesine bakıldığında 28. günde anlamlı derecede fazla olduğu belirlenmiştir ($p<0.001$) (Şekil 4.33).

Taşlı ve ark. [11] yaptıkları bir çalışmada NaB'ın farklı konsantrasyonunu uyguladıkları hTGSC hücrelerinde gen ifadelerini incelenmişlerdir. NaB ile muamele edilen hücrelerde mineralizasyonun ve osteonektin gen ifadesinin daha yüksek olduğunu gözlemlemişlerdir.



Şekil 4.33. HAp/kitosan ve B-HAp/kitosan üzerinde çoğalan AKH hücrelerine ait bağıt osteonektin gen ifadesi grafiği (İstatistiksel olarak anlamlı farklılık, $n=3$, aynı günde farklı gruplar için * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$; aynı grubun farklı günleri için • $p<0.05$, •• $p<0.01$, ••• $p<0.001$).

5. GENEL SONUÇLAR

Sunulan tez çalışmasında mikrodalga yardımı ile hazırlanmış bor katkılı kitosan-HAp kompozit doku iskelelerinin kemik iliği ve adipoz dokudan elde edilen mezenkimal kök hücrelerin osteojenik farklılaşması üzerine etkisi hücre kültür çalışmaları ile incelenmiştir. Farklılaşma ortamlarındaki biyokimyasal ajanların MKH'ler için konsantrasyonları optimize edilmiştir. Deneysel çalışmalar sonucunda elde edilen önemli bulgular aşağıda özetlenmiştir.

- ✓ Çalışmanın ilk aşamasında dondurarak-kurutma yöntemi ile gözenekli ve içsel bağlantıları olan kitosan doku iskeleleri hazırlanmıştır. Kitosan doku iskelelerinin osteoindüktif özelliğini arttırarak kemik doku oluşumunu desteklemesi amacıyla iskeleler grubumuzca önceki çalışmalarda belirlenen koşullarda (600 W güç; 30sx9 tekrar) mikrodalga destekli biyomimetik yöntem kullanılarak kemik benzeri HAp ve B-HAp ile kaplanmıştır.
- ✓ Kitosan bazlı doku iskelelerinin yüzey ve kesit morfolojileri SEM analizi ile incelenmiş ve iskelelerin yüzeyindeki HAp ve B-HAp kaplamanın varlığı gösterilmiştir.
- ✓ Kemik iliği aspiratından ve adipoz dokudan enzimatik olarak mezenkimal kök hücre izolasyonu yapılmıştır. Hücrelerin morfolojileri F-Aktin/DAPI ve kristal viyole boyamaları ile incelenmiştir. Hücre proliferasyonu ve metabolik aktiviteleri Presto Blue analizi ile takip edilmiştir. Presto Blue grafiği ve kalibrasyon eğrisi kullanılarak hücrelerin özgül üreme hızı ve ikilenme süresi hesaplanmıştır. Hücrelerin sağlıklı oldukları ve yaşlanmadıkları senesens boyaması ile belirlenmiştir.
- ✓ Mezenkimal kök hücrelerin multipotensi özellikleri osteojenik, kondrojenik ve adipojenik farklılaşmalar ile belirlenmiştir. Osteojenik farklılaşma ALP/vonKossa, kondrojenik farklılaşma Safranin O/Fast Green, adipojenik farklılaşma ise Oil Red O boyaması ile görüntülenmiştir.
- ✓ Osteojenik farklılaşmanın belirteçleri olan ALP aktivitesi ve mineralize nodüller ALP/vonKossa boyaması ile görüntülenmiştir. Boyamalar, osteojenik kültürün 14. ve 28. günlerinde gerçekleştirilmiştir. Osteojenik farklılaşmanın erken göstergelerinden olan ALP aktivitesi AKH'lerde görülmezken KiMKH'lerinde oldukça belirgin bir boyanma gerçekleşmiştir.

- Osteojenik kültürün geç evresinde hem AKH, hem de KiMKH'lerde mineralize nódüllerin oluşumu görüntülenmiştir.
- ✓ Safranin O/Fast Green boyaması ile kondrojenik farklılaşmanın belirteci olan glikozaminoglikanların varlığı tespit edilmiştir. Kültürün 28. gününde elde edilen kesitler ile yapılan boyamalarda KiMKH'lerde AKH'lere göre daha belirgin bir boyanma olduğu gözlemlenmiştir.
 - ✓ Adipojenik farklılaşmanın belirlenmesi için Oil Red O boyaması yapılmıştır. Adipojenik kültürün birinci haftasından sonra hücreler içerisinde lipidce zengin vakuoller belirmeye başlamış ve kültürün ilerleyen günlerinde lipid vakuolleri büyümeye devam etmiştir. Yirminci günde gerçekleştirilen boyamalarda, adipojenik ortamda kültüre edilen hücrelerin Oil Red O ile pozitif boyanmasıyla kırmızı lipid damlacıkları görüntülenmiştir. AKH'lerde KiMKH'lere göre daha fazla lipid vakuolleri tespit edilmiştir.
 - ✓ Hücrelerin kök hücrelere özgü yüzey antijenlerini taşıyıp taşımadığını kontrol etmek için dördüncü pasajdaki AKH'lere akış sitometrisi analizi yapılmıştır. AKH'ler için CD29, CD90, CD54, CD106 ve MHC sınıf I belirteçleri için pozitif olduğu, CD45, CD11b ve MHC sınıf II antijenlerin ise oldukça düşük olduğu oranları tespit edilmiştir.
 - ✓ Hücre tutunmasını arttırmak amacı ile doku iskelelerine fibronektin immobilizasyonu yapılmıştır. Fibronektin immobilizasyonunun başarılı bir şekilde gerçekleştiğini belirlemek için ninhidrin yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntem ile iskele yüzeylerine bağlanan amino grupların varlığı belirlenmiştir. Hücre kültürü çalışmaları fibronektin immobilize edilen ve edilmeyen olmak üzere farklı iskeleler ile gerçekleştirilmiştir.
 - ✓ AKH'ler ile gerçekleştiren hücre kültür çalışmaları kapsamında yapılan MTT ve SEM analizlerinde hücrelerin iki farklı iskele yüzeyine de tutunduğu, ancak kitosan iskele yüzeyinde tutunup, çoğalmadıkları görülmüştür. HAp/kitosan ve B-HAp/kitosan iskelelerin hücrelerin tutunmasını ve çoğalmasını desteklediği görülmüş, osteoblastik farklılaşmanın gerçekleştiği hücre üzerindeki mineralize yapıların görüntülenmesiyle de belirlenmiştir.

- ✓ AKH'lerin fibronektin immobilizasyonu olmadan kitosan bazlı iskelelere tutunup ürediklerini tespit etmek için de çalışmalar yapılmıştır. Sonuçlar MTT ve SEM analizleri ile takip edilmiştir. Hücrelerin her üç iskele yüzeyine tutunduğu, fakat kitosan+Fn iskelede olduğu gibi kitosan iskelede de çoğalmadıkları belirlenmiştir. HAp/kitosan ve B-HAp/kitosan iskelelerde hücrelerin tutunup, içsel gözeneklere doğru yayılarak üç boyutlu çoğaldıkları belirlenmiştir.
- ✓ AKH'lerin osteoblastik farklılaşması RT-PCR analizi ile incelenmiştir. Bu amaçla 14. ve 28. günlerde kollajen-I (KOL-I), RunX2, osteonektin (ON) ve osteopontin (OPN) genlerinin ekspresyon seviyeleri belirlenmiştir. KOL-I gen ifadesi 28. günde B-HAp/kitosan grupta HAp/kitosan iskeleye göre daha yüksek bulunmuştur. RunX2 gen ifadesi 28. günde HAp/kitosan grubuna göre B-HAp/kitosan grubunda yüksek çıkmıştır. Geç dönem osteoblastik farklılaşma belirteci olan osteonektin 28. günde B-HAp/kitosan iskelesinde en yüksek değere ulaşmıştır. Farklılaşmanın son basamağında ortaya çıkan osteopontin seviyeleri incelendiğinde 28. günde her iki grupta da gen ekspresyon seviyesinin 14. günden daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Ancak en yüksek OPN seviyesi 28. günde B-HAp/kitosan iskeleye aittir.
- ✓ KiMKH hücreleri ile yapılan doku iskelesi çalışmalarda ise hem Fn bağlı hemde Fn bağlı olmayan gruplarda yeterli sayıda hücre tutunması gerçekleşmemiştir. Ancak Fn immobilize doku iskelelerinde daha fazla hücrenin tutunduğu SEM analizi ile gösterilmiştir. En yüksek hücre canlılığına B-HAp/kitosan doku iskelelerinde ulaşıldığı MTT analizi ile gösterilmiştir.

Çalışmaların sonucunda bor katkılı hidroksiapatitin mezenkimal kök hücrelerin canlılığı ve osteojenik farklılaşması üzerine önemli derecede etkisinin olduğu gösterilmiştir. Hidroksiapatitin osteokondüktif etkisinin borun osteoindüktif etkisi ile güçlendirilmesinin farklı kökenli mezenkimal kök hücrelerin osteojenik farklılaşmasını uyarabileceği belirlenmiştir.

EK-1
ETİK KURUL



HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU

06100 Sıhhiye-Ankara
Telefon: 0 (312) 305 1090-1082 • Faks: 0 (312) 310 0580
www.etikkurul.hacettepe.edu.tr/index_hdk.php

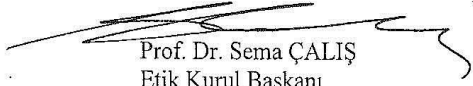
Sayı: 52338575 - 53

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURUL KARARI

TOPLANTI TARİHİ : 14.04.2015 (SALI)
TOPLANTI SAYISI : 2015/04
DOSYA KAYIT NUMARASI : 2015/32
KARAR NUMARASI : 2015/32-04
ARAŞTIRMA YÜRÜTÜCÜSÜ : Prof.Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU
HAYVAN DENEYLERİNDEN
SORUMLU ARAŞTIRMACI : Özge Ekin TUNÇAY
YARDIMCI ARAŞTIRMACILAR : İnci ŞİHALİYEVA
ONAYLANAN HAYVAN TÜRÜ ve : 6 adet sıçan
SAYISI

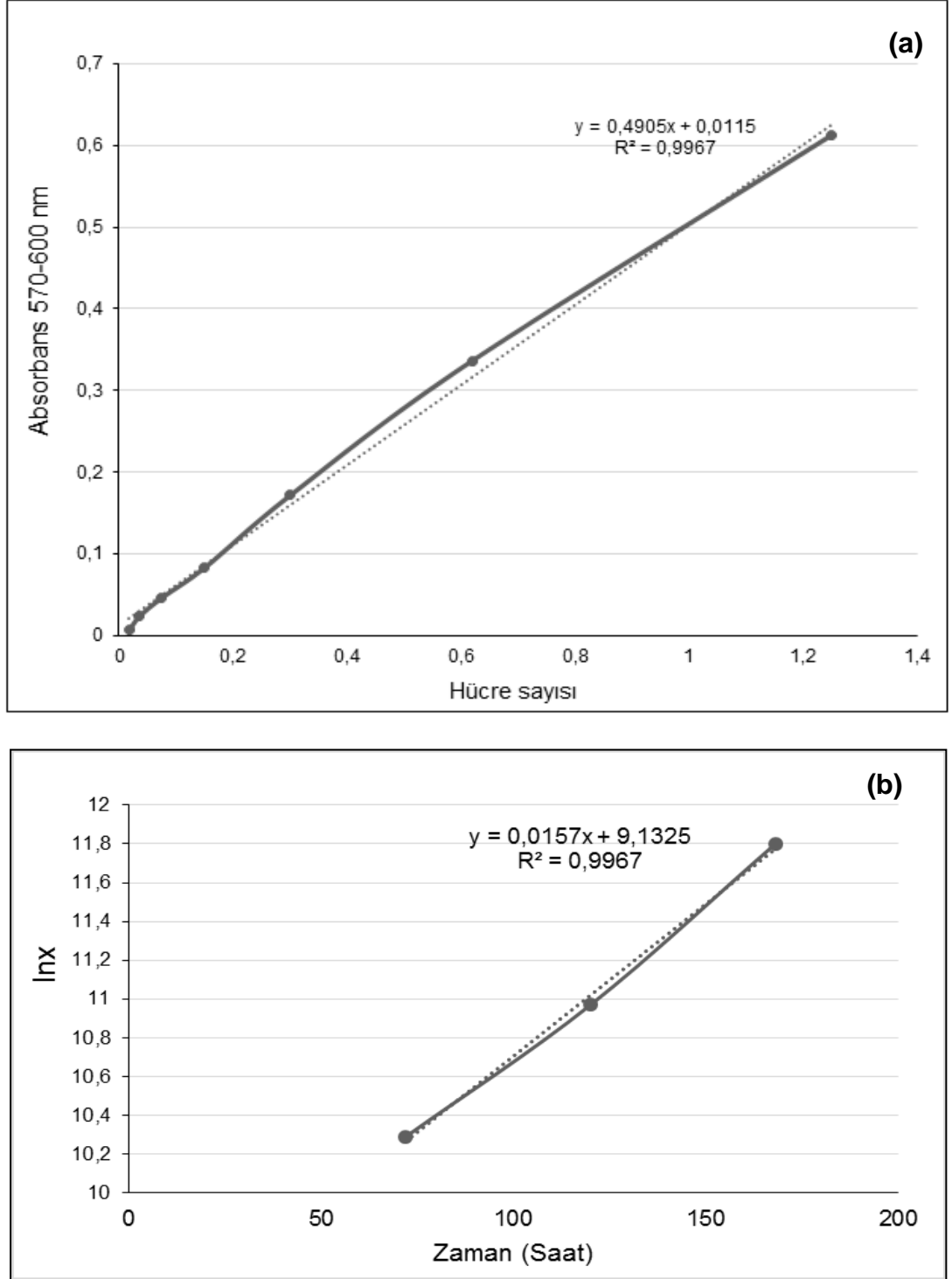
Üniversitemiz Fen Fakültesi Biyomühendislik Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof.Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU'nun araştırma yürütücüsü olduğu 2015/32 kayıt numaralı "*Mezenkimal Kök Hücrelerin (MKH) Osteojenik Farklılaşmasının Bor Katkılı HAP- Kaplı Kütosan Doku İskelelerinde İncelenmesi*" isimli çalışma Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi'ne göre uygun bulunarak oy birliği ile onaylanmasına karar verilmiştir.

Sorumlu araştırmacı deneylere başlangıç tarihini Etik Kurula bildirmekle yükümlüdür


Prof. Dr. Sema ÇALIŞ
Etik Kurul Başkanı

EK-2 AKH Kalibrasyon Eğrisi ve $\ln x$ -t Grafiği

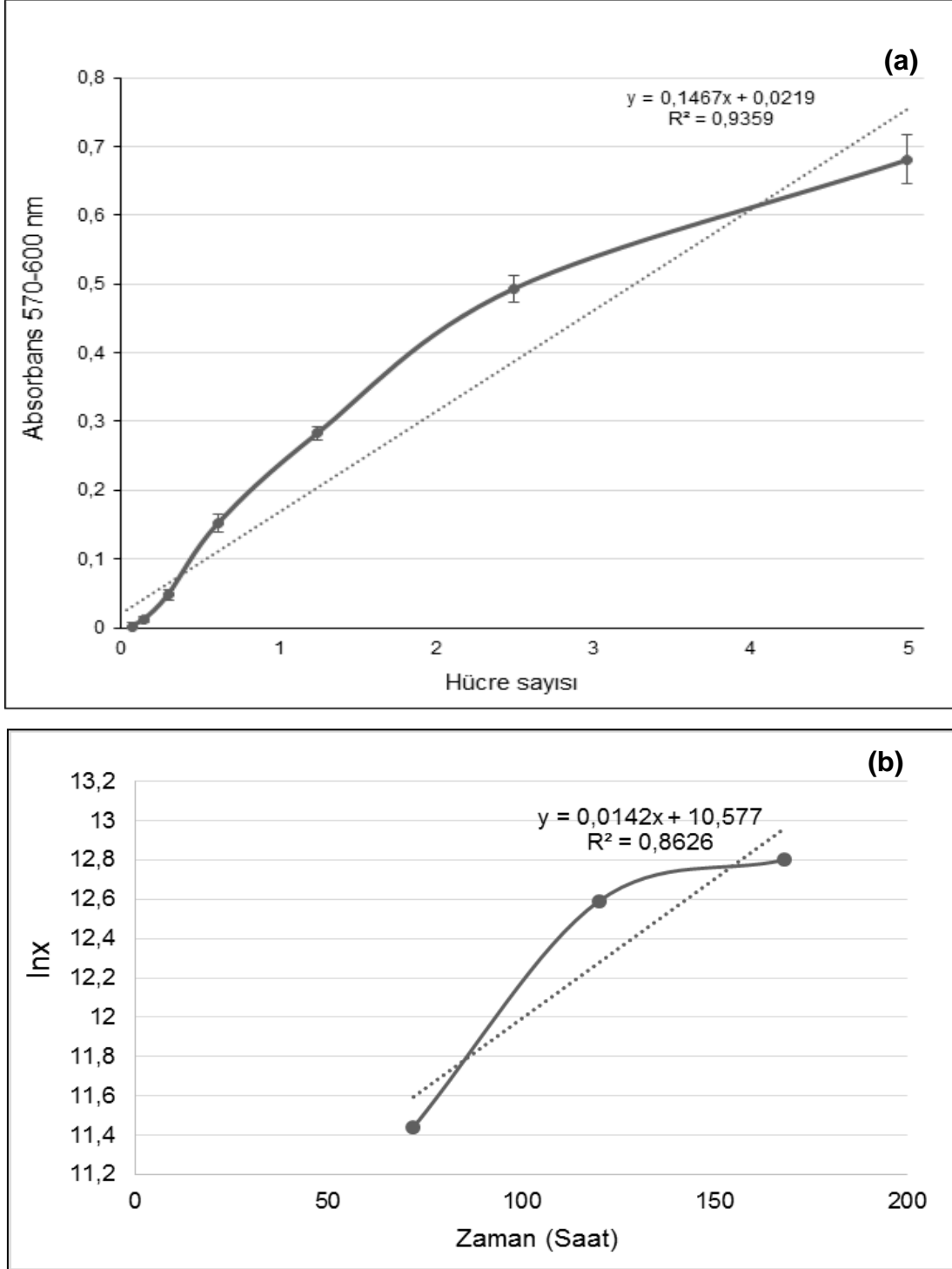
Bölüm 3.4.1’de anlatılan Presto Blue analizi sonucu elde edilen AKH kalibrasyon eğrisi, ikilenme süresi ve özgül üreme hızının hesaplanmasında kullanılan $\ln x$ -t grafiği Şekil 1’de verilmiştir.



Şekil 1. Presto Blue analizi sonucu elde edilen AKH kalibrasyon eğrisi (a) ve özgül üreme hızı ve ikilenme süresinin hesaplanmasında kullanılan $\ln x$ -t grafiği (b)

EK-3 KiMKH Kalibrasyon Eğrisi ve $\ln x$ -t Grafiği

Bölüm 3.4.1'de anlatılan Presto Blue analizi sonucu elde edilen KiMKH kalibrasyon eğrisi, ikilenme süresi ve özgül üreme hızının hesaplanmasında kullanılan $\ln x$ -t grafiği Şekil 2'de verilmiştir.



Şekil 2. Presto Blue analizi sonucu elde edilen KiMKH kalibrasyon eğrisi (a) ve özgül üreme hızı ve ikilenme süresinin hesaplanmasında kullanılan $\ln x$ -t grafiği (b)

KAYNAKLAR

- [1] Gümüşderelioğlu, M., Doku mühendisliğinde nanoteknoloji, *Tübitak Yayınları*, Bilim ve Teknik Özel Eki, **2007**.
- [2] Huri, P.Y., N. Hasırcı, and V. Hasırcı, Bone tissue engineering, *Archives Medical Review Journal*, 19, 4, 206-219, **2010**.
- [3] Uslu, B. and S. Arbak, Doku mühendisliğinde kitosanın kullanım alanları, *Acıbadem Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 1, **2010**.
- [4] Teng, S.-H., et al., Three-layered membranes of collagen/hydroxyapatite and chitosan for guided bone regeneration, *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 87B, 1, 132-138, **2008**.
- [5] Akman, A.C., et al., Bfgf-loaded ha-chitosan: A promising scaffold for periodontal tissue engineering, *J Biomed Mater Res A*, 92, 3, 953-62, **2010**.
- [6] Baksh, D., L. Song, and R.S. Tuan, Adult mesenchymal stem cells: Characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy, *J Cell Mol Med*, 8, 3, 301-16, **2004**.
- [7] Kern, S., et al., Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue, *Stem Cells*, 24, 5, 1294-301, **2006**.
- [8] Shu, W., et al., Comparing the biological characteristics of adipose tissue-derived stem cells of different persons, *J Cell Biochem*, 113, 6, 2020-6, **2012**.
- [9] Demirer, S., et al., Effects of boric acid on experimental periodontitis and alveolar bone loss in rats, *Arch Oral Biol*, 57, 1, 60-5, **2012**.
- [10] Ying, X., et al., Effect of boron on osteogenic differentiation of human bone marrow stromal cells, *Biol Trace Elem Res*, 144, 1-3, 306-15, **2011**.
- [11] Tasli, P.N., et al., Boron enhances odontogenic and osteogenic differentiation of human tooth germ stem cells (htgscs) in vitro, *Biol Trace Elem Res*, 153, 1-3, 419-27, **2013**.
- [12] Demirci, S., et al., Boron increases the cell viability of mesenchymal stem cells after long-term cryopreservation, *Cryobiology*, 68, 1, 139-146, **2014**.
- [13] Hakki, S.S., B.S. Bozkurt, and E.E. Hakki, Boron regulates mineralized tissue-associated proteins in osteoblasts (mc3t3-e1), *J Trace Elem Med Biol*, 24, 4, 243-50, **2010**.
- [14] Wu, C., et al., Proliferation, differentiation and gene expression of osteoblasts in boron-containing associated with dexamethasone deliver from mesoporous bioactive glass scaffolds, *Biomaterials*, 32, 29, 7068-78, **2011**.
- [15] Kaynak, G., Mikrodalga destekli çapraz bağlanma/çökeltme reaksiyonları ile kitosan-ha doku iskelelerinin hazırlanması ve kemik doku mühendisliğinde kullanımının araştırılması, Yüksek Lisans, Hacettepe Üniversitesi, Biyomühendislik, Ankara, **2012**.

- [16] Shrivats, A.R., M.C. McDermott, and J.O. Hollinger, Bone tissue engineering: State of the union, *Drug Discov Today*, 19, 6, 781-6, **2014**.
- [17] Porter, J.R., T.T. Ruckh, and K.C. Popat, Bone tissue engineering: A review in bone biomimetics and drug delivery strategies, *Biotechnol Prog*, 25, 6, 1539-60, **2009**.
- [18] Kraus, K.H. and C. Kirker-Head, Mesenchymal stem cells and bone regeneration, *Vet Surg*, 35, 3, 232-42, **2006**.
- [19] Lee, K., E.A. Silva, and D.J. Mooney, Growth factor delivery-based tissue engineering: General approaches and a review of recent developments, *J R Soc Interface*, 8, 55, 153-70, **2011**.
- [20] Griffith, L.G. and G. Naughton, Tissue engineering-current challenges and expanding opportunities, *Science*, 295, 5557, 1009-1014, **2002**.
- [21] Stevens, B., et al., A review of materials, fabrication methods, and strategies used to enhance bone regeneration in engineered bone tissues, *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 85, 2, 573-582, **2008**.
- [22] Alexander, P.G., et al., Mesenchymal stem cells in musculoskeletal tissue engineering, 1171-1199, **2014**.
- [23] Mastrogiacomo, M., et al., Tissue engineering of bone: Search for a better scaffold, *Orthodontics & Craniofacial Research*, 8, 4, 277-284, **2005**.
- [24] Amini, A.R., C.T. Laurencin, and S.P. Nukavarapu, Bone tissue engineering: Recent advances and challenges, 40, 5, 363-408, **2012**.
- [25] Meyer, U. and H.P. Weismann, *Bone and cartilage engineering*, 4. **2006**.
- [26] Cartmell, S., Rupani, and Balint, Osteoblasts and their applications in bone tissue engineering, *Cell Health and Cytoskeleton*, 49, **2012**.
- [27] S.A., H., et al., Development and characterization of a conditionally immortalized human fetal osteoblastic cell line, *Journal of Bone and Mineral Research*, 10, 178-86, **1995**.
- [28] Liu, X., et al., Influence of substratum surface chemistry/energy and topography on the human fetal osteoblastic cell line hfob 1.19: Phenotypic and genotypic responses observed in vitro, *Biomaterials*, 28, 31, 4535-50, **2007**.
- [29] Kyriakidou, K., et al., Dynamic co-seeding of osteoblast and endothelial cells on 3D-polycaprolactone scaffolds for enhanced bone tissue engineering, *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 23, 3, 227-243, **2008**.
- [30] Avasti, S., et al., Stem cell: Past, present and future- a review article, *Internet Journal of Medical Update*, 3, **2008**.
- [31] Murrell, W., et al., Multipotent stem cells from adult olfactory mucosa, *Dev Dyn*, 233, 2, 496-515, **2005**.
- [32] Friedenstein, A.J., S. Piatetzky, II, and K.V. Petrakova, Osteogenesis in transplants of bone marrow cells, *J Embryol Exp Morphol*, 16, 3, 381-90, **1966**.

- [33] Chamberlain, G., et al., Concise review: Mesenchymal stem cells: Their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing, *Stem Cells*, 25, 11, 2739-2749, **2007**.
- [34] Caplan, A.I., Mesenchymal stem cells, *Journal of orthopaedic research*, 9, 5, 641-650, **1991**.
- [35] Pittenger, M.F., et al., Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells, *Science*, 284, 5411, 143-147, **1999**.
- [36] Kopen, G.C., D.J. Prockop, and D.G. Phinney, Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96, 19, 10711-10716, **1999**.
- [37] Farini, A., et al., Clinical applications of mesenchymal stem cells in chronic diseases, *Stem Cells Int*, 2014, 306573, **2014**.
- [38] Can, A., *Kök hücre*, Ankara. 715, **2014**.
- [39] Sanders, R.C., Jr., et al., Stem cell research, *Paediatr Respir Rev*, 7, 2, 135-40, **2006**.
- [40] Czyz, J. and A.M. Wobus, Embryonic stem cell differentiation: The role of extracellular factors, *Differentiation*, 68, 4-5, 167-174, **2001**.
- [41] Couch, K.A., J. Lane, and D. Black, Point/counterpoint, *Journal of Policy Analysis and Management*, 31, 3, 706-707, **2012**.
- [42] Yamanaka, S., A fresh look at ips cells, *Cell*, 137, 1, 13-7, **2009**.
- [43] Takahashi, K. and S. Yamanaka, Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors, *Cell*, 126, 4, 663-76, **2006**.
- [44] Yu, J., et al., Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells, *Science*, 318, 5858, 1917-1920, **2007**.
- [45] Ferrari, G., et al., Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors, *Science*, 279, 5356, 1528-1530, **1998**.
- [46] Huang, G.T.-J., S. Gronthos, and S. Shi, Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. Those from other sources: Their biology and role in regenerative medicine, *Journal of Dental Research*, 88, 9, 792-806, **2009**.
- [47] Gronthos, S., et al., Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells, *Journal of cellular physiology*, 189, 1, 54-63, **2001**.
- [48] Scheller, E.L., J. Chang, and C.Y. Wang, WNT/catenin inhibits dental pulp stem cell differentiation, *Journal of Dental Research*, 87, 2, 126-130, **2008**.
- [49] Wu, Y., R.C. Zhao, and E.E. Tredget, Concise review: Bone marrow-derived stem/progenitor cells in cutaneous repair and regeneration, *Stem Cells*, 28, 5, 905-15, **2010**.
- [50] Kim, J. and P. Hematti, Harnessing regenerative and immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells in transplantation medicine, 163-175, **2014**.

- [51] Lanza, R., R. Langer, and J. Vacanti, *Principles of tissue engineering*. 1344, **2007**.
- [52] Gimble, J.M., A.J. Katz, and B.A. Bunnell, Adipose-derived stem cells for regenerative medicine, *Circ Res*, 100, 9, 1249-60, **2007**.
- [53] Pittenger, M.F. and B.J. Martin, Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics, *Circ Res*, 95, 1, 9-20, **2004**.
- [54] Barry, F.P. and J.M. Murphy, Mesenchymal stem cells: Clinical applications and biological characterization, *Int J Biochem Cell Biol*, 36, 4, 568-84, **2004**.
- [55] Kulterer, B., et al., Gene expression profiling of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow during expansion and osteoblast differentiation, *BMC Genomics*, 8, 70, **2007**.
- [56] Bauer-Kreisel, P., A. Goepferich, and T. Blunk, Cell-delivery therapeutics for adipose tissue regeneration, *Adv Drug Deliv Rev*, 62, 7-8, 798-813, **2010**.
- [57] Fraser, J.K., et al., Fat tissue: An underappreciated source of stem cells for biotechnology, *Trends Biotechnol*, 24, 4, 150-4, **2006**.
- [58] Fibbe, W.E., Mesenchymal stem cells. A potential source for skeletal repair, *Annals of the Rheumatic Diseases*, 61, suppl 2, ii29-ii31, **2002**.
- [59] Dominici, M., et al., Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The international society for cellular therapy position statement, *Cytotherapy*, 8, 4, 315-7, **2006**.
- [60] Baker, N., L.B. Boyette, and R.S. Tuan, Characterization of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in aging, *Bone*, 70, 37-47, **2015**.
- [61] Hamidouche, Z., et al., Priming integrin alpha5 promotes human mesenchymal stromal cell osteoblast differentiation and osteogenesis, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 44, 18587-91, **2009**.
- [62] Song, I.H., A.I. Caplan, and J.E. Dennis, *In vitro* dexamethasone pretreatment enhances bone formation of human mesenchymal stem cells in vivo, *J Orthop Res*, 27, 7, 916-21, **2009**.
- [63] Walsh, S., et al., High concentrations of dexamethasone suppress the proliferation but not the differentiation or further maturation of human osteoblast precursors in vitro: Relevance to glucocorticoid-induced osteoporosis, *Rheumatology*, 40, 1, 74-83, **2001**.
- [64] Fernandez-Merino, M., et al., Vitamin c is an ideal substitute for hydrazine in the reduction of graphene oxide suspensions, *The Journal of Physical Chemistry C*, 114, 14, 6426-6432, **2010**.
- [65] Chang, Y.L., C.M. Stanford, and J.C. Keller, Calcium and phosphate supplementation promotes bone cell mineralization: Implications for hydroxyapatite (HAp)-enhanced bone formation, *Journal of biomedical materials research*, 52, 2, 270-278, **2000**.

- [66] Zhu, J.-X., et al., Temporal and spatial gene expression of major bone extracellular matrix molecules during embryonic mandibular osteogenesis in rats, *The Histochemical Journal*, 33, 1, 25-35, **2001**.
- [67] Yang, D.C., et al., Camp/pka regulates osteogenesis, adipogenesis and ratio of rankl/opg mrna expression in mesenchymal stem cells by suppressing leptin, *PLoS One*, 3, 2, e1540, **2008**.
- [68] Kubo, Y., et al., Organization of extracellular matrix components during differentiation of adipocytes in long-term culture, *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*, 36, 1, 38-44, **2000**.
- [69] Birmingham, E., G. Niebur, and P. McHugh, Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells is regulated by osteocyte and osteoblast cells in a simplified bone niche, **2012**.
- [70] Chippendale, T.W.E., et al., Isolation of mesenchymal stem cells from bone marrow aspirate, 115-123, **2011**.
- [71] Majumdar, M.K., et al., Characterization and functionality of cell surface molecules on human mesenchymal stem cells, *Journal of biomedical science*, 10, 2, 228-241, **2003**.
- [72] Bogenrieder, T. and M. Herlyn, Axis of evil: Molecular mechanisms of cancer metastasis, *Oncogene*, 22, 42, 6524-36, **2003**.
- [73] Mizuno, H., M. Tobita, and A.C. Uysal, Concise review: Adipose-derived stem cells as a novel tool for future regenerative medicine, *Stem Cells*, 30, 5, 804-810, **2012**.
- [74] Rebelatto, C., et al., Dissimilar differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, and adipose tissue, *Experimental Biology and Medicine*, 233, 7, 901-913, **2008**.
- [75] Krampera, M., et al., Mesenchymal stem cells for bone, cartilage, tendon and skeletal muscle repair, *Bone*, 39, 4, 678-83, **2006**.
- [76] Strioga, M., et al., Same or not the same? Comparison of adipose tissue-derived versus bone marrow-derived mesenchymal stem and stromal cells, *Stem Cells Dev*, 21, 14, 2724-52, **2012**.
- [77] Stanko, P., et al., Comparison of human mesenchymal stem cells derived from dental pulp, bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord tissue by gene expression, *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, 158, 3, 373-7, **2014**.
- [78] Meijer, G.J., et al., Cell-based bone tissue engineering, *PLoS Med*, 4, 2, e9, **2007**.
- [79] Jing, Z., et al., Rat bone marrow mesenchymal stem cells improve regeneration of thin endometrium in rat, *Fertil Steril*, 101, 2, 587-94, **2014**.
- [80] Sethe, S., A. Scutt, and A. Stolzing, Aging of mesenchymal stem cells, *Ageing Res Rev*, 5, 1, 91-116, **2006**.
- [81] Tropel, P., et al., Isolation and characterisation of mesenchymal stem cells from adult mouse bone marrow, *Exp Cell Res*, 295, 2, 395-406, **2004**.

- [82] Huang, Y.-Z., et al., Species variation in the spontaneous calcification of bone marrow-derived mesenchymal stem cells, *Cytotherapy*, 15, 3, 323-329, **2013**.
- [83] Gomillion, C.T. and K.J. Burg, Stem cells and adipose tissue engineering, *Biomaterials*, 27, 36, 6052-63, **2006**.
- [84] Casteilla, L. and C. Dani, Adipose tissue-derived cells: From physiology to regenerative medicine, *Diabetes & Metabolism*, 32, 5, 393-401, **2006**.
- [85] Bunnell, B.A., et al., Adipose-derived stem cells: Isolation, expansion and differentiation, *Methods*, 45, 2, 115-20, **2008**.
- [86] Astori, G., et al., "In vitro" and multicolor phenotypic characterization of cell subpopulations identified in fresh human adipose tissue stromal vascular fraction and in the derived mesenchymal stem cells, *J Transl Med*, 5, 55, **2007**.
- [87] Locke, M., V. Feisst, and P.R. Dunbar, Concise review: Human adipose-derived stem cells: Separating promise from clinical need, *Stem Cells*, 29, 3, 404-11, **2011**.
- [88] Meirelles Lda, S., et al., Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells, *Cytokine Growth Factor Rev*, 20, 5-6, 419-27, **2009**.
- [89] Galderisi, U. and A. Giordano, The gap between the physiological and therapeutic roles of mesenchymal stem cells, *Med Res Rev*, 34, 5, 1100-26, **2014**.
- [90] Granero-Moltó, F., et al., Regenerative effects of transplanted mesenchymal stem cells in fracture healing, *Stem Cells*, 27, 8, 1887-1898, **2009**.
- [91] Sutton, M.T. and T.L. Bonfield, Stem cells: Innovations in clinical applications, *Stem Cells Int*, 2014, 516278, **2014**.
- [92] Gonçalves, M.A., et al., Human mesenchymal stem cells ectopically expressing full-length dystrophin can complement duchenne muscular dystrophy myotubes by cell fusion, *Human molecular genetics*, 15, 2, 213-221, **2006**.
- [93] Nemeth, K., et al., Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E2-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production, *Nature medicine*, 15, 1, 42-49, **2009**.
- [94] Rubio, D., et al., Spontaneous human adult stem cell transformation, *Cancer research*, 65, 8, 3035-3039, **2005**.
- [95] Wang, S., X. Qu, and R.C. Zhao, Clinical applications of mesenchymal stem cells, *J Hematol Oncol*, 5, 19, **2012**.
- [96] Karagöz, G., *Mezenkimal kök hücrelerin BMP-6 geni aktarımı ile kırık dokusuna farklılaşması*, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2011**.

- [97] Saiz, E., et al., Perspectives on the role of nanotechnology in bone tissue engineering, *Dent Mater*, 29, 1, 103-15, **2013**.
- [98] Wu, S., et al., Biomimetic porous scaffolds for bone tissue engineering, *Materials Science and Engineering: R: Reports*, 80, 1-36, **2014**.
- [99] Liu, Y., J. Lim, and S.H. Teoh, Review: Development of clinically relevant scaffolds for vascularised bone tissue engineering, *Biotechnol Adv*, 31, 5, 688-705, **2013**.
- [100] Aday, S. and M. Gümüşderelioğlu, Bone-like apatite-coated chitosan scaffolds: Characterization and osteoblastic activity, *Polymer Composites*, 31, 8, 1418-1426, **2010**.
- [101] Levengood, S.L. and M. Zhang, Chitosan-based scaffolds for bone tissue engineering, *J Mater Chem B Mater Biol Med*, 2, 21, 3161-3184, **2014**.
- [102] Tıǧlı, R.S., A. Karakeçili, and M. Gümüşderelioğlu, In vitro characterization of chitosan scaffolds: Influence of composition and deacetylation degree, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 18, 9, 1665-1674, **2007**.
- [103] Demirtaş, T.T., A.G. Karakeçili, and M. Gümüşderelioğlu, Hydroxyapatite containing superporous hydrogel composites: Synthesis and *in-vitro* characterization, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 19, 2, 729-735, **2008**.
- [104] Tang, Y., et al., Preparation of uniform porous hydroxyapatite biomaterials by a new method, *Applied Surface Science*, 254, 17, 5359-5362, **2008**.
- [105] Jayabalan, M., et al., Effect of hydroxyapatite on the biodegradation and biomechanical stability of polyester nanocomposites for orthopedic applications, *Acta Biomaterialia*, 6, 3, 763-775, **2010**.
- [106] Swetha, M., et al., Biocomposites containing natural polymers and hydroxyapatite for bone tissue engineering, *Int J Biol Macromol*, 47, 1, 1-4, **2010**.
- [107] Zhang, Y., et al., Electrospun biomimetic nanocomposite nanofibers of hydroxyapatite/chitosan for bone tissue engineering, *Biomaterials*, 29, 32, 4314-22, **2008**.
- [108] Poorgholi Belverdi, M., et al., Comprehensive analysis of tgf-beta and bmp receptor interactomes, *Eur J Cell Biol*, 91, 4, 287-93, **2012**.
- [109] Tsiridis, E., N. Upadhyay, and P. Giannoudis, Molecular aspects of fracture healing: Which are the important molecules, *Injury*, 38 Suppl 1, S11-25, **2007**.
- [110] Devirian, T.A. and S.L. Volpe, The physiological effects of dietary boron, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43, 2, 219-231, **2003**.
- [111] Pan, H.B., et al., Strontium borate glass: Potential biomaterial for bone regeneration, *J R Soc Interface*, 7, 48, 1025-31, **2010**.
- [112] Nielsen, F.H., Is boron nutritionally relevant, *Nutr Rev*, 66, 4, 183-91, **2008**.

- [113] Gümüşderelioğlu, M., et al., Encapsulated boron as an osteoinductive agent for bone scaffolds, *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 31, 120-128, **2015**.
- [114] Tunçay, Ö.E., Biyomimetik yöntemle bor katkılı doku iskelelerinin geliştirilmesi ve kemik doku mühendisliğindeki etkinliklerinin araştırılması, Yüksek Lisans, Hacettepe Üniversitesi, Biyomühendislik Anabilim Dalı, Ankara, **2013**.
- [115] Gorustovich, A.A., et al., Histomorphometric study of alveolar bone healing in rats fed a boron-deficient diet, *Anat Rec (Hoboken)*, 291, 4, 441-7, **2008**.
- [116] Rahaman, M.N., et al., Bioactive glass in tissue engineering, *Acta Biomater*, 7, 6, 2355-73, **2011**.
- [117] Eccles, M. and C.G. Li, Senescence associated β -galactosidase staining 2, **2012**.
- [118] Tsuang, Y.-H., et al., Journal of orthopaedic surgery and research, *Journal of orthopaedic surgery and research*, 1, 7, **2006**.
- [119] Yazid, M.D., et al., Determination of the differentiation capacities of murines' primary mononucleated cells and mc3t3-e1 cells, *Cancer Cell Int*, 10, 42, **2010**.
- [120] Tigli, R.S., et al., Cellular behavior on epidermal growth factor (EGF)-immobilized PCL/gelatin nanofibrous scaffolds, *J Biomater Sci Polym Ed*, **2010**.
- [121] Kotobuki, N., et al., Observation of osteogenic differentiation cascade of living mesenchymal stem cells on transparent hydroxyapatite ceramics, *Biomaterials*, 26, 7, 779-785, **2005**.
- [122] Zhao, F., et al., Effects of hydroxyapatite in 3-D chitosan–gelatin polymer network on human mesenchymal stem cell construct development, *Biomaterials*, 27, 9, 1859-1867, **2006**.
- [123] Tas, A.C. and S.B. Bhaduri, Rapid coating of Ti6Al4V at room temperature with a calcium phosphate solution similar to 10 \times simulated body fluid, *Journal of materials research*, 19, 09, 2742-2749, **2004**.
- [124] Mavis, B., et al., Synthesis, characterization and osteoblastic activity of polycaprolactone nanofibers coated with biomimetic calcium phosphate, *Acta Biomaterialia*, 5, 8, 3098-3111, **2009**.
- [125] Ternane, R., et al., Introduction of boron in hydroxyapatite: Synthesis and structural characterization, *Journal of alloys and compounds*, 333, 1, 62-71, **2002**.
- [126] Nakamura, M., Z. Zhuang, and M. Aizawa. *Fabrications of boron-containing apatite ceramics via ultrasonic spray-pyrolysis route and their surface properties*. in *Key Engineering Materials*. 2013. Trans Tech Publ.
- [127] Wagner, W., et al., Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood, *Experimental hematology*, 33, 11, 1402-1416, **2005**.

- [128] Im, G.I., Y.W. Shin, and K.B. Lee, Do adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have the same osteogenic and chondrogenic potential as bone marrow-derived cells, *Osteoarthritis Cartilage*, 13, 10, 845-53, **2005**.
- [129] Izadpanah, R., et al., Biologic properties of mesenchymal stem cells derived from bone marrow and adipose tissue, *Journal of cellular biochemistry*, 99, 5, 1285-1297, **2006**.
- [130] Fehrer, C. and G. Lepperdinger, Mesenchymal stem cell aging, *Experimental gerontology*, 40, 12, 926-930, **2005**.
- [131] Indrawattana, N., et al., Growth factor combination for chondrogenic induction from human mesenchymal stem cell, *Biochemical and biophysical research communications*, 320, 3, 914-919, **2004**.
- [132] Çakmak, A.S., Biyofiziksel ve biyokimyasal uyarılarla desteklenmiş doku iskeleleri üzerinde mezenkimal kök hücrelerin osteojenik farklılaşması, Doktora, Hacettepe Üniversitesi, Biyomühendislik Anabilim Dalı, Ankara, **2014**.
- [133] Strem, B.M., et al., Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells, *The Keio journal of medicine*, 54, 3, 132-141, **2005**.
- [134] Yeh, H.-Y., et al., Substrate-dependent gene regulation of self-assembled human msc spheroids on chitosan membranes, *BMC Genomics*, 15, 1, 10, **2014**.
- [135] Huang, G.-S., et al., Spheroid formation of mesenchymal stem cells on chitosan and chitosan-hyaluronan membranes, *Biomaterials*, 32, 29, 6929-6945, **2011**.
- [136] Huang, J.I., et al., Chondrogenic potential of progenitor cells derived from human bone marrow and adipose tissue: A patient-matched comparison, *Journal of orthopaedic research*, 23, 6, 1383-1389, **2005**.
- [137] Ogawa, R., et al., Osteogenic and chondrogenic differentiation by adipose-derived stem cells harvested from GFP transgenic mice, *Biochemical and biophysical research communications*, 313, 4, 871-877, **2004**.

ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı : İnci Shıkhaliyeva
Doğum Yeri : Göyçay/Azərbaycan
Medeni Hali : Bekar
E-posta : inci.shikhaliyeva@gmail.com

Eğitim

Lise : 5 numaralı okul (2006)
Lisans : Bakü Devlet Üniversitesi, Biyoloji Bölümü (2010)
Yüksek Lisans : Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyomühendislik Anabilim Dalı
Doktora : -

Yabancı Dil ve Düzeyi

İngilizce (ileri), Rusça (ileri)

İş Deneyimi

–

Deneyim Alanları

Doku mühendisliği, biyomalzemeler, hayvan hücre kültürleri, kök hücreler, ekoloji.

Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi

TÜBİTAK PROJESİ, Proje No: 112M705, Mikrodalga desteği ile biyomimetik hidroksiapatit (HAp)-bor katkılı HAp oluşumu ve kitosan-HAp kemik doku iskelelerinin geliştirilmesi, 200,000 TL.

Tezden Üretilmiş Yayınlar

–

Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar

4th International Conference on Tissue Science and Regenerative Medicine/Poster.