

**METAL KATKILI HİDROKSİAPATİT NANOKAPLAMA  
MALZEMELERİ ÜZERİNDE BÜYÜTÜLEN YAĞ DOKUSU  
KAYNAKLI MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN ADEZYON,  
CANLILIK VE OSTEOJENİK FARKLILAŞMA  
KAPASİTELERİNİN *in vitro* YÖNTEMLERLE  
DEĞERLENDİRİLMESİ**

**R. Beklem BOSTANCIOĞLU**

**Doktora Tezi**

**Biyoloji Anabilim Dalı**

**Şubat 2015**

Bu tez çalışması Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyon Başkanlığı tarafından 1104F025 numaralı doktora tez araştırma projesi ve 1306F197 numaralı teşvik projesi kapsamında desteklenmiştir.

## JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

**R. Beklem BOSTANCIOĞLU'nun “Metal Katkılı Hidroksiapatit Nanokaplama Malzemeleri Üzerinde Büyütülen Yağ Dokusu Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin Adezyon, Canlılık ve Osteojenik Farklılaşma Kapasitelerinin *in vitro* Yöntemlerle Değerlendirilmesi” başlıklı Biyoloji Anabilim Dalındaki, Doktora Tezi 09.02.2015 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.**

	<b>Adı-Soyadı</b>	<b>İmza</b>
Üye (Tez Danışmanı) :	<b>Doç. Dr. Ayşe Tansu KOPARAL</b>	.....
Üye	<b>: Prof. Dr. Engin ULUKAYA</b>	.....
Üye	<b>: Prof. Dr. Aydın DOĞAN</b>	.....
Üye	<b>: Prof. Dr. Selda KABADERE</b>	.....
Üye	<b>: Doç. Dr. Berrin TÜYLÜ</b>	.....

**Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun**  
..... tarih ve ..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

**Enstitü Müdürü**

## ÖZET

Doktora Tezi

# METAL KATKILI HİDROKSİAPATİT NANOKAPLAMA MALZEMELERİ ÜZERİNDE BÜYÜTÜLEN YAĞ DOKUSU KAYNAKLI MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN ADEZYON, CANLILIK VE OSTEOJENİK FARKLILAŞMA KAPASİTELERİNİN *in vitro* YÖNTEMLERLE DEĞERLENDİRİLMESİ

R. BEKLEM BOSTANCIOĞLU

Anadolu Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. A. Tansu KOPARAL

2015, 109 sayfa

Bu tez çalışmasında değişik kimyasal ve yüzey özelliklerine sahip metal katkılı (Zn, Ag ve Cu) hidroksiapatit (HAP) nanokaplama malzemeler üzerinde büyütülen insan yağ dokusu kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin (MKH) canlılığı ve osteoblastik farklılaşma potansiyelleri ile substrat-materyal arasındaki ilişki ve hücre davranışı incelenmiştir.

Bu amaçla biyomalzemeler üzerindeki hücre canlılığı MTT, LDH ve DNA miktar tayin yöntemleri ile belirlenmiştir. Biyomalzemeler üzerinde büyütülen MKH'lerin osteoblastik farklılaşma kapasiteleri, Alizarin Kırmızısı (AK) Boyama, Alkalen Fosfataz Spesifik Aktivitesinin (ALP) biyokimyasal olarak ölçülmesi ve Osteopontin gen ekspresyon seviyesi rt-PCR ile değerlendirilmiştir. Ayrıca MKH'lerin biyomalzemeler üzerindeki adezyonları ve hücre adezyonunun malzemelerin biyoyumluluğu üzerindeki etkisi; hücre adezyon deneyi, vinkülin ve f-aktin hücre iskelet elemanlarının immunofloresan boyanması ve ekstrasellüler matriks proteinleri ve hücre adezyon yolağında yer alan 84 adet geni içeren rt-PCR array ile incelenmiştir.

Sonuçlar genel olarak Zn, Ag ve Cu metal iyonları içeren HAP nanokaplama yüzeyler üzerinde büyütülen MKH'lerde canlılığın, herhangi bir osteojenik uyaran içermeyen ortamdaki hücrelerde osteoblastik farklılaşmanın ve hücre adezyon yeteneğinin, ticari olarak kullanılan ve hiçbir metal iyonu içermeyen HAP'e göre daha yüksek olduğunu, bu metal iyonlarının malzemenin biyoyumluluğuna katkıda bulunduğunu göstermektedir.

**Anahtar Kelimeler:** MKH, nanomateryal, biyomateryal, adezyon, osteojenik farklılaşma

**ABSTRACT**  
**PhD Dissertation**  
**ASSESSMENT OF ADHESION, VIABILITY AND OSTEOGENICALLY**  
**DIFFERENTIATION CAPACITY OF HUMAN ADIPOSE TISSUE DERIVED**  
**MESENCHYMAL STEM CELLS WHICH IS GROWN ON METAL ION (Zn, Ag**  
**and Cu) DOPED NANOHYDOXYAPATIT COATED SURFACES, BY *in vitro***  
**METHODS**

**R. BEKLEM BOSTANCIOĞLU**

**Anadolu University**

**Graduate School of Sciences**

**Biology Program**

**Supervisor: Assoc. Prof. Dr. A. Tansu KOPARAL**

**2015, 109 pages**

In this study, human adipose tissue derived mesenchymal stem cells (MSC)', that grown on metal ion (Zn, Ag and Cu) doped hydroxyapatite nano-coating surfaces which have different chemical and surface properties, viability, osteogenic differentiation capacity and interactions between substrate-material and cell behavior, were investigated.

For this purpose, viability of the cells on biomaterials were determined by MTT, LDH and DNA quantitation methods. The osteogenic differentiation capacity of MSCs which is grown on biomaterials were analyzed with Alizarin Red (AR) Staining, biochemically by Alkaline Phosphatase Specific Activity (ALP) and Osteopontin gene expression level by rt-PCR. Furthermore, adhesion of the MSCs on biomaterials and the effect of cell adhesion on biomaterials biocompatibility were detected by cell adhesion assay, immunofluorescence staining for vinculin and f-actin cytoskeleton component and rt-PCR array which including 84 extracellular matrix proteins and cell adhesion pathway genes.

The results generally demonstrates that viability of MSCs, osteogenic differentiation of the cells in without osteogenic stimulation in medium and cell adhesion capability are higher on nano-coating surfaces that including Zn, Ag and Cu metal ions than commercial HAP. This results reveal that these metal ions contribute to biocompatibility of material.

**Key Words:** MSCs, nanomaterial, biomaterial, adhesion, osteojenik differentiation

**“Bütün mümkünlerin kıyısında...”**

**T. UYAR**

## TEŞEKKÜR

Doktora sürecinin, birçok açıdan heyecan verici gelişmelerle bütün dünyanın ilgisini çeken kök hücre ve rejeneratif tıp kavramlarıyla moleküler biyolojinin engin denizinde birleştiğinde oldukça yorucu ve emek isteyen ancak bir o kadar da keyifli bir süreç olduğunu düşünüyorum. Bilimsel yeteneklerimin, kişiliğimin ve karakterimin şekillendiği bu sabır isteyen süreçte, tüm lisansüstü eğitimim ve doktora tez çalışmalarım sırasında beni maddi ve manevi her anlamda destekleyip, yolumu açan, yapmak istediklerim için beni her zaman destekleyip bana fırsat veren, en zor anlarımda gülen gözleriyle ve pozitif enerjisiyle bana umut aşılayan, doktora eğitimim sırasında Almanya'ya gitmem için beni cesaretlendirerek ve destekleyerek bana başka bir dünyanın kapılarının aralanmasını sağlayan, bir ömür boyu şükranla anacağım danışman hocam Doç. Dr. A. Tansu KOPARAL' a,

Engin bilgisi ve öngörüsüyle tecrübelerini benimle paylaşan ve beni daima olumlu sözleriyle motive eden Sayın Rektör Yardımcımız Prof. Dr. A. Savaş KOPARAL'a,

Lisansüstü eğitimim boyunca benden esirgemediği maddi ve manevi her türlü desteği, ilgisi ve sevgisiyle yanımda olan, sadece öğretmenim değil aynı zamanda ablam da olduğu, desteğini ve güvenini hep hissettirdiği için, bana olan inancıyla akademik gelişimime yaptığı sonsuz katkıları için hocam Prof. Dr. Kadriye BENKLİ' ye,

Tez çalışmam sırasında kullandığım biyomalzemelerin hazırlanması ve yaptığımız ortak çalışmalardaki her türlü desteği için On dokuz Mayıs Üniversitesi Mühendislik Fakültesi'nden Yrd. Doç. Dr. Mevlüt GÜRBÜZ'e, Anadolu Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Malzeme Mühendisliği Bölümünden doktora öğrencisi Ayşe Gül AKYÜREKLİ'ye ve özellikle Almanya'ya gidebilmem için verdiği desteği, motivasyonu ve bana olan inancı için Prof. Dr. Aydın DOĞAN'a,

Doktora eğitimim süresince önemli bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, güvenini ve ilgisini benden esirgemeyen Sayın Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Hülya SİVAS'a,

Almanya'da yaptığım araştırma sırasında bana laboratuvarını açan, her türlü bilgi ve tecrübesini benimle paylaşan, bana yeni bakış açıları kazandırıp, bu alanda bana yeni bir yol açan Dresden Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi-Centre for

Translational Bone, Joint and Soft Tissue Research'den Sayın Prof. Dr. Michael GELINSKY ve Dr. Anne BERNHARDT'a,

Çalışmalarım sırasında hiçbir zaman yardımını esirgemeyen Berlin Teknik Üniversitesi, Berlin-Brandenburg School for Regenerative Therapies'den Dr. Beren ATAÇ'a ve Dresden Teknik Üniversitesi-German Center for Neurodegenerative Diseases (DZNE)'den Dr. Çağhan KIZIL'a,

Deneylerim sırasında verdiği destek ve güler yüzü için Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Histoloji A.B.D. araştırma görevlisi Erhan ŞAHİN'e ve aynı laboratuvarı paylaştığımız arkadaşlarıma, elektron mikroskobu görüntülerin alınmasında yardımlarını esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Volkan KILIÇ'a ve Doç. Dr. M. Burçin MUTLU'ya,

Çalışmalarımı yürütmem için Anadolu Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü imkânlarından yararlanmamı sağlayan bütün Anadolu Üniversitesi Biyoloji bölümü hocalarıma ve çalışanlarına çok teşekkür ederim.

Doktora eğitimim sırasında sağladığı eşsiz olanaklar ve sunduğu imkânlarla hem bilimsel hem de sosyal anlamda gelişmemi sağlayan, 1104F075 numaralı Doktora Tez Araştırma Projesi ve 1306F197 numaralı Teşvik Projesi çerçevesinde tez çalışmalarına maddi destekleyen, doktora öğrencilerinin de maddi olarak desteklenmesine olanak sağlayarak katıldığım yurt dışı kurs ve kongrelerde edindiğim bilgi ve deneyimleri tez çalışmama uygulama fırsatı veren Anadolu Üniversitesi Rektörlüğü ve Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü ve Anadolu Üniversitesi Proje Araştırma Birimi'ne sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca bu zorlu ve uzun süreç boyunca yanımda oldukları, sabırla hayallerime ulaşmam için beni destekledikleri, bana inandıkları ve maddi manevi her türlü desteklerini hep hissettirdikleri için biricik annem Güler BOSTANCIOĞLU'na, kardeşlerim İlkem BOSTANCIOĞLU ve Görkem BOSTANCIOĞLU'na ve babam Ali BOSTANCIOĞLU'na sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

R. Beklem BOSTANCIOĞLU

Şubat 2015

## İÇİNDEKİLER

ÖZET .....	i
ABSTRACT .....	ii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER .....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xiv
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Kök Hücreler .....	4
1.1.1. Embriyonik kök hücreler .....	6
1.1.2. Yetişkin kök hücreler .....	7
1.1.2.1. İnsan adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücreler .....	9
1.2. Kemik Dokusu .....	13
1.3. Biyomalzemeler .....	15
1.3.1. Nanomalzemeler .....	16
1.3.2. Kemik uygulamaları için nanomalzemeler .....	18
1.3.3. Osteoindüksiyon ve osteointegrasyon mekanizması .....	23
1.3.4. Hidroksiapatit ve Ag, Zn, Cu metal iyonları .....	24
1.4. Adezyon Molekülleri.....	28
2. MATERYAL ve YÖNTEM.....	32
2.1. Materyal .....	32
2.1.1. Cihazlar.....	32
2.1.2. Kimyasal Maddeler .....	32
2.2. Yöntem.....	33
2.2.1. Seramik tozların üretilmesi ve kaplanması.....	33
2.2.2. Biyolojik aktivite çalışmaları .....	36
2.2.3. Hücrelerin kültür ortamında büyütülmesi .....	37
2.2.4. MTT testi .....	37



2.2.5. LDH testi .....	39
2.2.6. Picogreen boya ile hücrelerdeki dna miktarının belirlenmesi .....	40
2.2.7. MKH'lerde osteojenik farklılaşmanın uyarılması.....	41
2.2.8. Osteojenik farklılaşmanın AK boyama ile saptanması .....	41
2.2.9. Osteojenik farklılaşmanınALP ile biyokimyasal tespiti.....	42
2.2.10. Osteopontin mRNA seviyesindeki değişimin saptanması.....	43
2.2.11. Hücre adezyon deneyi .....	47
2.2.12. İmmunofloresan boyama .....	47
2.2.13. Hücre adezyonunun SEM'de incelenmesi .....	48
2.2.14. rt-PCR-array ile farklı yüzeylerde büyütülen hücrelerde adezyon ile ilgili genlerin mRNA düzeylerinin tespit edilmesi.....	48
3. BULGULAR .....	50
3.1. Metal İyon Katkılı Nanoseramik Tozların Karakterizasyonu.....	50
3.2. Farklı Metal İyonları İçeren Yüzeylerin MKH Canlılığı Üzerine Etkisinin MTT Testi İle Değerlendirilmesi .....	53
3.3. Farklı Metal İyonları İçeren Yüzeylerin Üzerindeki MKH Canlılığının LDH Testi İle Belirlenmesi .....	55
3.4. Hücrelerde DNA Miktarının Picogreen Boya ile Belirlenmesi .....	57
3.5. MKH'lerde Osteojenik Farklılaşmanın AK Boyama ile Değerlendirilmesi .....	58
3.6. MKH'lerde Osteojenik Farklılaşmanın Biyokimyasal Analizi (Alkalen Fosfataz Enzim Miktar Tayini) .....	59
3.7. Osteopontin Gen Ekspresyon Seviyesinin Tespit Edilmesi .....	61
3.8. Hücre Adezyonunun Ölçülmesi .....	62
3.9. İmmünofloresan Boyama (F-Aktin ve Vinkilün) .....	63
3.10. Taramalı Elektron Mikroskobu ile Hücre Adezyonunun İncelenmesi....	64
3.11. Hücre Adezyonunun rt-PCR array ile Değerlendirilmesi .....	64
4. TARTIŞMA.....	81
5. SONUÇ .....	97

6. KAYNAKLAR.....	98
-------------------	----

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil.1.1. Kök hücrelerin rejeneratif tıpta kullanım alanları.....	4
Şekil.1.2. Mezenkimal kök hücrelerin farklılaşma kapasiteleri.....	5
Şekil.1.3. Adipoz kökenli mezenkimal kök hücrelerin farklılaşma potansiyelleri ve kullanım alanları .....	11
Şekil.1.4. Biyomalzemelerin insan vücudundaki kullanım bölgeleri .....	20
Şekil.1.5. Kemik dokusu ve HAP'ın yapısı.....	25
Şekil.1.6. Ekstrasellüler matriksin hücre için öneminin şematik olarak gösterilmesi .....	30
Şekil.2.1. Kalsiyum fosfat esaslı HAP yapıları tozların üretim ve kaplama akış planı .....	35
Şekil.2.2. Cam lamellerin kaplanması için kullanılan sistemin kurulum şeması...36	
Şekil.2.3. MTT deneyi sırasında gerçekleşen reaksiyon.....	38
Şekil.2.4. PicoGreen boyasının topolojik formülü.....	40
Şekil.3.1.1. HAP pikine ait XRD örgü desenleri .....	50
Şekil.3.1.2. Üretilen tozların XRD örgü desenleri .....	51
Şekil.3.1.3. Üretilen tozların düşük büyütme SEM görüntüleri.....	52
Şekil.3.1.4. Üretilen tozların yüksek büyütme SEM görüntüleri.....	52
Şekil.3.1.5. Üretilen tozların tane boyut analizleri.....	53
Şekil.3.2.1. Farklı metal iyonları içeren HAP nanokaplama yüzeylerin MKH'lerin canlılığı üzerindeki etkisi (OS+) .....	54
Şekil.3.2.2. Farklı metal iyonları içeren HAP nanokaplama yüzeylerin MKH'lerin canlılığı üzerindeki etkisi (OS-) .....	54
Şekil.3.3.1. MKH'lerin nanokaplama yüzeyler üzerindeki canlılığının LDH testi ile karşılaştırılması (OS+) .....	56
Şekil.3.3.2. MKH'lerin nanokaplama yüzeyler üzerindeki canlılığının LDH testi ile karşılaştırılması (OS-) .....	56
Şekil.3.4.1. Farklı yüzeyler üzerinde büyütülen MKH'lerin DNA tayini.....	57
Şekil.3.4.2. Farklı yüzeyler üzerinde büyütülen MKH'lerin DNA tayini.....	58
Şekil.3.5.1. Farklı yüzeyler üzerindeki MKH'lerde osteoblastik farklılaşmanın AK boyama ile tespit edilmesi .....	59

Şekil.3.6.1. Hücrelerde ALP enzim miktarındaki değişime bağlı olarak osteojenik farklılaşmanın değerlendirilmesi. ....	60
Şekil.3.6.2. Hücrelerde ALP enzim miktarındaki değişime bağlı olarak osteojenik farklılaşmanın değerlendirilmesi. ....	60
Şekil.3.7.1. Osteopontin genine ait mRNA seviyesi.....	61
Şekil.3.8.1. MKH'lerin HAP nanokaplama yüzeyler üzerindeki adezyon yeteneklerinin değerlendirilmesi .....	62
Şekil.3.9.1. MKH'lerin HAP nanokaplama yüzeyler üzerindeki adezyon yeteneklerinin Vinkülin ve F-aktin hücre iskeleti elemanlarının varlığına göre değerlendirilmesi ..	63
Şekil.3.10.1. Hücelere ait SEM görüntüleri.....	63
Şekil.3.11.1. rt-PCR deneyinde ekspresyonu incelenen genlerin ekspresyon değişimlerini gösteren gen haritası .....	69

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge.1.1. Mezenkimal kök hücre belirteçleri .....	10
Çizelge.2.2. cDNA sentezi için kullanılan karışım içeriği.....	46
Çizelge.2.3. rt-PCR için miks içeriği .....	46
Çizelge.3.1.1. EDX analizi sonucuna göre tozlarda bulunan metal iyonlarının katkı yüzdeleri.....	53
Çizelge.3.10.1 rt-PCR verilerine göre 84 genin ekspresyon seviyelerinin değerlendirilmesi .....	66
Çizelge.3.10.2. rt-PCR verilerinde değerlendirilen 84 hedef genin ayrıntılı açıklaması ve gen bank numaraları.....	68

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

- EKH:** Embriyonik kök hücreler  
**MKH:** Mezenkimal kök hücreler  
**AKH:** Adipoz dokudan köken alan yetişkin kök hücreler  
**HAP:** Hidroksiapatit  
 **$\beta$ -TCP:** Beta-kalsiyum fosfat  
**İHK:** İç hücre kitlesinden  
**CFU-F:** Fibroblast kolonisi oluşturan birim (colony forming unit)  
**OD:** Optik yoğunluk/Absorbans  
**BSA:** Bovin serum albumin  
**YKH:** Yetişkin kök hücre  
**SVF:** Stromal vasküler fraksiyon  
**DBM:** Demineralize kemik matriksi  
**BMP:** Kemik morfojenik protein  
**ESM:** Ekstrasellüler matriks  
**FAK:** Fokal adezyon kinaz  
**TGF-  $\beta$ :** Dönüştürücü büyüme faktörü  $\beta$   
**bFGF:** Bazik fibroblast büyüme faktörü  
**VEGF:** Vasküler endotelyal büyüme faktörü  
**PDGF:** Trombosit kaynaklı büyüme faktörü  
**DMSO:** Dimetil Sülfoksit  
**MEM:** Dulbecco's Modified Eagle's Medium  
**EDTA:** Etilen-diamin tetra asetik asit  
**FBS/FCS:** Fetal Bovine Serum/Fetal Calf Serum  
**MTT:** 3-(4,5-dimetiliazol-2-yl)-2,5 difenil tetrazolyum bromid  
**LDH:** Laktat Dehidrogenaz  
**NaHCO<sub>3</sub>:** Sodyum bikarbonat  
**PBS:** Fosfat Tampon Çözeltisi (Phosphate buffered saline)  
**TE Buffer:** Tris EDTA buffer  
**AK:** Alizarin kırmızısı

**ALP:** Alkalen fosfataz

**MgCl<sub>2</sub>:** Magnezyum klorür

**TRITC:** Tetramethylrhodamine B isothiocyanate

**OS:** Osteojenik stimulasyon

## 1. GİRİŞ

Kök hücre kendini yenileme yeteneği olan ve farklılaşarak yeni hücreleri oluşturabilen klonal bir hücredir. Kök hücreler başlıca embriyonik kök hücreler (EKH) ve yetişkin tip kök hücreler (YKH) olmak üzere iki ana grupta incelenebilirler. Yetişkin kök hücreler, canlı organizmalarda doku ve organlarda bulunan kök hücrelerdir. Yetişkin kök hücreler kendilerini yenileme özelliklerine sahiptirler ve ihtiyaç halinde farklılaşma göstererek doku ve organların tamirini, yenilenmelerini ve yaşamlarını devam ettirmelerini sağlamaktadırlar. Son yıllarda yapılan araştırmalar birçok dokuda yetişkin kök hücre bulunduğunu göstermektedir [1]. Mezenkimal kök hücreler (MKH) yetişkin kök hücre tipidir. Stromal kökenli olmaları nedeniyle genel anlamda “destek hücresi” özelliği taşımaları, MKH’lerin tıbbın birçok alanında kullanım potansiyeli taşımasının temelini oluşturmaktadır. Doku mikroçevresinin (niş) önemli bileşenleri olmaları ve çoğunlukla immün sistem üzerine baskılayıcı özellik taşımalarından dolayı büyük ilgi uyandırmaktadırlar. Ayrıca gen aktarımı kolaylığı nedeniyle kalıtsal hastalıklarla ilgili araştırmalarda ve birçok klinik alandaki uygulamalarda da kullanılabilirler [2-8].

Organizmanın en zengin kök hücre kaynaklarından biri olan kemik iliği, MKH’ler için ana kaynak sayılmaktadır. Kemik iliği dışında birçok dokudan da MKH izole edilebilmektedir. Kemik/periost, kas dokusu, diş pulpası ve maksillofasial dokular, karaciğer, lipoaspirasyon materyalleri, kordon kanı, kordon stroması, plasenta, amniyon sıvısı, sinovial sıvı, hatta periferik kandan da adezyon özellikleri nedeniyle ayrıştırılarak çoğaltılabilmeleri mümkündür [2-5, 9, 10]. Adipoz doku (yağ doku) yetişkin kök hücreler için bol, kolay ulaşılabilir ve yenilenebilen bir kaynaktır. MKH’ler adipoz dokudan kollojenaz parçalanması ve diferansiyel santrifügasyon ile lipoemilim (liposuction) atıklarından bile izole edilebilir. Adipoz dokudan köken alan yetişkin kök hücreler (AKH) adiposit, kondrosit, miyosit, nöronal ve osteoblastik hücrelere farklılaşabilen multipotent hücrelerdir. AKH’leri akut ya da kronik olarak yaralanmış dokuların rejenerasyonu ve tamiri için kullanılabilirler. Bu hücrelerin ve etkinliklerinin tamamıyla anlaşılabilmesi için etkinliği yüksek çalışmalara ihtiyaç



duyulmaktadır [11, 12]. MKH'ler tüm bu biyolojik özellikleri nedeniyle hasarlı organ tamiri için önemli bir potansiyel oluşturmaktadır. Bu hücrelerin yaygın kullanımını zorlaştıran en önemli faktör dokularda çok az sayıda olmaları nedeniyle klinik kullanım için *in vitro* olarak çoğaltılmaları gereğidir. MKH'lerin ortopedide menisküs hasarı tamiri ve osteoporoz tedavisinden, diş hekimliğinde implantlar, kardiyolojide miyokard enfarktüsü, spinal kord yaralanmaları, plastik cerrahide yanık tedavisine kadar çok geniş potansiyel kullanım alanı bulunmaktadır [2, 5, 7, 13].

Vücudumuz kök hücrelerin farklılaşması ile oluşan bir organizmadır. Dolayısıyla kök hücrelerin üstün rejenerasyon ve farklılaşabilme yeteneklerinin, çeşitli nedenler ve hastalıklar sonucu ortaya çıkan birçok organ, doku ve hücre hasarında kaybın giderilmesi, dokunun yeniden oluşturulması ve hastalığın ortadan kaldırılması için kullanılabilmesi gerçeği birçok araştırmacının ilgisini hızla çekmiş ve özellikle kemik iliği nakilleri ile başlayan, farklı kök hücre kaynaklarını kullanan, artan hızla devam eden yoğun araştırma ve uygulamalar ortaya çıkmış ve böylece "rejeneratif tıp" kavramı gelişmiştir [6, 14, 15]. Rejeneratif tıbbın gelişmesine paralel olarak kök hücre kullanılan tedavilere ilgi hızla artmaktadır. Diğer kök hücrelerin sahip oldukları özelliklere ek olarak trans-farklılaşma kapasiteleri nedeniyle mezenkimal kök hücreler, diğerlerine göre çok daha fazla ilgi çekmektedir. Yakın zamanda yürütülen çalışma sonuçları yağ dokusunun yetişkin MKH'ler için yeni ve bol bir kaynak olabileceğini göstermektedir [13, 14, 16].

Kök hücre taşıyıcıları olarak geliştirilmiş biyomalzemeler, doku yenilenmesi için uygun mikroçevre sağlayan, alternatif doku eşdeğeri kullanışlı bir kaynak olarak kabul edilmektedir [17]. Hücrelerin ve dokuların temel fonksiyonel alt birimleri nano boyutta olduğundan nanobiyoloji ve nanoteknoloji uygulamalarının da "rejeneratif" tıpta ayrı bir önemi vardır. Kök hücreler, çok yönlü farklılaşabilme kabiliyetleri ve çoğalabilme yetenekleri nedeniyle doku mühendisliğinde ve rejenerasyonda umut verici hücre tipleridir. İnsan mezenkimal kök hücrelerinin biyolojisi, çoğalması, farklılaşması, hücre-hücre etkileşimleri, ekstrasellüler biyofaktörlerle sinyalizasyon ve transkripsiyonal ve epigenetik olaylar tarafından karmaşık bir şekilde düzenlenmektedir [18]. Son zamanlarda

artan çalışmalarla kök hücre ve biyomalzemeler interdisipliner çalışmalarda buluşmaktadır. MKH'ler ve biyomalzemelerle yapılacak çalışmalarda bu etkileşimlerin daha ayrıntılı açıklanmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

Rejeneratif tıbbı ışık tutmakta olan alanlardan bir tanesi de implant materyalleri ile ilgili çalışmalardır. Ortopedik implantlar birçok ülkede eklem hastalıkları olan kişilerin eklem fonksiyonlarını yerine getirmelerine ve ağrılarını azaltmaya yardımcı olmak amacıyla kullanılmaktadır [19, 20]. İmplantların klinik başarısı, doku çevresiyle stabil bir ara yüzey yaratılarak artırılabilir. Sert doku yerine geçecek olan uygun implant ideal olarak biyoaktif olmalı, kemik ve implant yüzeyi arasında kimyasal bir bağ oluşturmalıdır. Bu anlamda camlar, seramikler, cam-seramiklerden ve kompozitlerden oluşan materyaller biyoaktif materyallerdir. Kalsiyum fosfat seramikler ve hidroksiapatit (HAP), kemiğin yapısındaki mineral bileşimine benzer materyaller oldukları kadar biyouyumlulukları nedeniyle de üretim için ideal biyomalzemeler olarak kullanılabilirler [21].

Biyomalzeme yüzeyi ve biyolojik doku yüzeyi arasındaki ilişki kemiğin implantı kabulünde kritik bir rol oynamaktadır. Kompozisyon, kalınlık, porozite gibi spesifik yüzey özellikleri, hücreler ve implant materyali arasındaki ilişkiyi etkilemektedir. Dolayısıyla osteoblast adezyonu yüzey kimyasına ve yüzey yapısına bağlı olarak değişmektedir. Hücre adezyonu, osteoblastların proliferasyonu ve farklılaşabilmesi için kemik dokusu oluşumundan önce temel bir olaydır. Günümüzde geleneksel yöntemlerle kararlı hale getirilmiş nanomalzemelerin implant olarak kullanımı yaygınlaşmıştır. "Nanomalzeme" olarak isimlendirilen nanoboyutlu materyaller, genellikle çok küçük bileşenlerden oluşan ve en az boyutu 1-100 nm aralığında olan yapısal özelliklerle (partikül, lif ve/veya granül) tanımlanmaktadır. Nanomalzemeler, nanoboyutları nedeniyle konvensiyonel (geleneksel) malzemelerle karşılaştırıldığında yeni özellikler sergileyen; metaller, seramikler, polimerler veya kompozit malzemeler olabilirler [22, 23].

## 1.1. Kök Hücreler

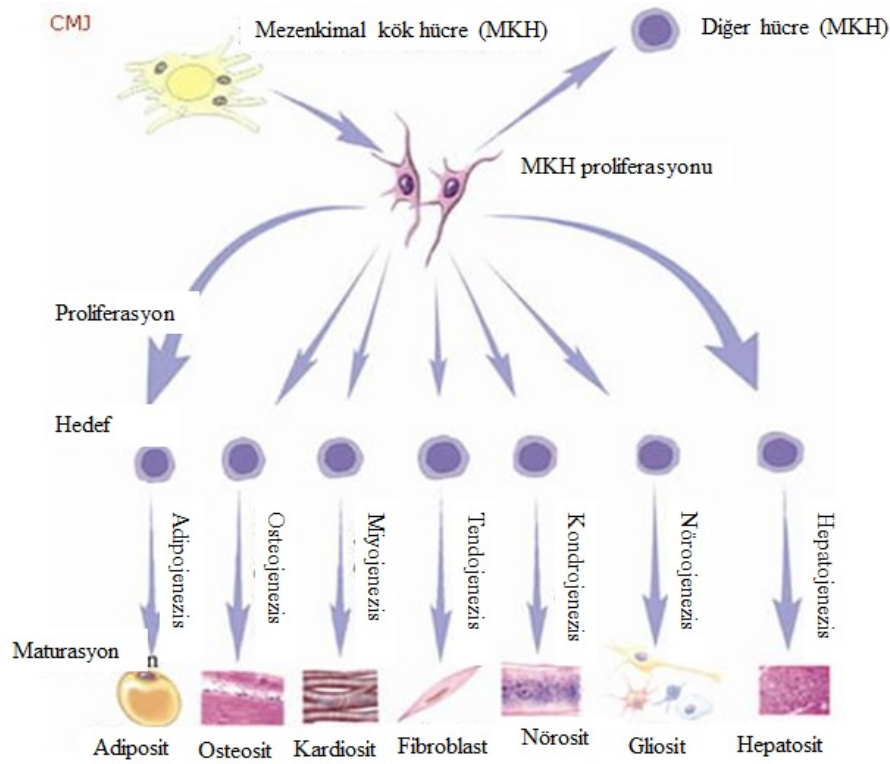
Kök hücreler, halk arasında ve bilim dünyasında biyolojideki diğer konulardan çok daha fazla ilgi uyandırmaktadır. Bunun nedenlerinden birisi kök hücrelerin birçok hayali gerçekleştirebilecek, çeşitli dejeneratif hastalıklar için yeni tedavi yolları açabilecek eşsiz özellikleridir. Kök hücre biyolojisi alanı hızla büyümesine rağmen, kök hücrenin kendi doğasında olduğu gibi karmaşıklıkları ve anlaşmazlıkları da beraberinde getirmektedir. Bu karışıklık genellikle kök hücreleri tanımlamak ve sınıflandırmak için kullanılan kendine has terimler ve tanımlarla ilgilidir. Tanımlar ve sınıflandırmalar her ne kadar sınırlayıcı olsa da, ortak bir anlam ve deneysel standardizasyon sağladıklarında yararlı olabilirler [24].



**Şekil.1.1.** Kök hücrelerin rejeneratif tıpta kullanım alanları [25].

Bu açıdan bakıldığında kök hücre fonksiyonel olarak kendi yedeğini meydana getirebilen ve aynı zamanda yenilenecek dokunun ihtiyacı olan ve farklılaşma yönünde ilerleyecek olan hücrelere dönüşebilme kapasitesindeki hücreler olarak tanımlanabilir. Daha açık ifade etmek gerekirse; daha sınırlı potansiyele sahip hücreler (farklılaşmış hücreler) oluşturmanın yanı sıra kök hücreler, kendilerinin aynısı olarak tanımlanabilecek yavru hücreler oluşturabilirler (kendini yenileme).

Embriyonik ya da fetal kök hücreler için basit ve geniş bir tanımlama belki yeterli olabilir, fakat diğer kök hücre tiplerini (yetişkin kök hücreler) tanımlamaya çalıştığımızda bu tanımlama geçerliliğini yitirmektedir. Kök hücre tanımına dahil edilmesi gereken diğer fonksiyonel parametre “potensi” ya da onun farklılaşmış hücre soyları üretme potansiyelidir. En basitçe kök hücreler a) kendini yenileme, b) farklı hücrelere farklılaşma (potensi), c) klon oluşturma (klonite) yeteneğine sahip hücreler olarak tanımlanabilir. [24, 26, 27].



Şekil.1.2. Mezenkimal kök hücrelerin farklılaşma kapasiteleri [28].

Yetişkin kök hücreler, fetal kök hücreler ve embriyo kök hücresi temel kök hücre tipleri olarak sayılabilir. Embriyonik kök hücreler ve yetişkin kök hücreler dışında kalan pluripotent kök hücreler şu şekilde de sınıflandırılabilir; epiblast kök hücreleri, embriyo karsinoma kök hücreleri, embriyo germ hücreleri ve ilkel cinsiyet hücreleri [26].

Yeni terapilerin geliştirilmesini hedefleyen kök hücre araştırmaları şaşırtıcı bir hızla ivme kazanmış ve gelişmeye devam etmektedir. Kök hücre biyolojisi

araştırmaları her ay büyük dergilerin sayfalarını kaplayan çarpıcı gelişmeler ortaya çıkaracak yeni platformlar doğurmaktadır [24].

Kök hücre çalışmalarında John Gordon ve arkadaşlarının oositleri kullanarak amfibi hücrelerinin yeniden programlanması üzerinde yaptıkları çalışmalar çok önemli bir dönüm noktasıdır ve memeli somatik hücresine ait nükleusun aynı türdeki oositin içine sokulduğunda totipotent embriyoya yeniden programlanabildiğini gösteren Ian Wilmut ve arkadaşlarının çalışmasını güçlendirmişlerdir. Martin Evans ve arkadaşları (1981) ise bir embriyodan blastosit aşamasında izole edilen hücrelerin pluripotent embriyonik kök hücrelere dönüşebildiğini göstermişlerdir. Kök hücre ile ilgili keşiflerin arasında gezinecek olursak birçok büyük bilim adamı sayabiliriz. Bunlar arasında fare ve insanlarda yetişkin hematopoetik kök hücre keşfi ile Irv Weismen dikkat çekmektedir. Farelerde kök hücre klonlama ve insan embriyonik kök hücre hattı keşfi ile James Thomson (1998) tüm bilinenleri bir potada eritmiştir. En önemlisi Shinya Yamanaka'nın (2006) dört kritik transkripsiyon faktörünü kullanarak somatik hücrelerin pluripotensi için yeniden programlanabileceğini (uyarılmış pluripotent kök hücreler) göstermesidir. Ayrıca, Arthur Caplan kemik iliğinden izole ettiği mezenkimal kök hücreleri kemik, kıkırdak ve yağ dokuya dönüştürerek, onların multipotent kapasitelerini göstermiştir [24].

### **1.1.1. Embriyonik kök hücreler (EKH)**

1981 yılında Evans ve Kaufman tarafından fare blastokistindeki, 1998 yılında ise Thomson ve ark. tarafından insan blastokistindeki iç hücre kitlesinden (İHK) veya epiblasttan ayrıştırılan hücrelerin *in vitro* ortamda çoğaltılması ile EKH elde edilmiştir. Bu hücreler tekrar blastokiste yerleştirildiklerinde *in vivo* olarak İHK'ne katılıp tüm germ hücresi türlerine farklılaşabildikleri için pluripotent olarak nitelendirilmektedirler [26, 27].

Kök hücre zincirinin en başında iki haploid gametin (spermatozoon ve oosit) bir araya gelişiyle meydana gelen zigot bulunur. Zigotun 5-6 kez bölünmesiyle blastokist oluşur. Embriyonik kök hücreler blastokist denilen 4-5

günlük embriyonun iç hücre külesinden elde edilirler. Blastokist, embriyonun rahim duvarına yerleştirilmeden önceki safhasıdır. Bu safhada embriyo 150-200 hücreden oluşan ve dış kısmında yuvarlak daire oluşturacak şekilde dizilmiş hücreler (trofektoderm) sıvı dolu bir kavite (blastosel) ve iç kısmında bir küme hücre içeren bir yapı şeklindedir. EKH'lerden hücre kültürü oluşturabilmek için blastokistin dış kısmı çıkarılır ve iç hücre külesi elde edilir. Bu hücrelerin kültüre edilmesi sonucunda pluripotent kök hücreler elde edilir. Pluripotent özelliğe sahip bir kök hücre kendini yenileme özelliğine sahiptir ve pek çok vücut hücresine dönüşebilir [29-31].

### **1.1.2. Yetişkin kök hücreler**

YKH'ler erken embriyo gelişimini tamamlamış bir organizmada bulunan kök hücreler olarak tanımlanmaktadır. Yetişkin organizmadaki çoğalan geçici hücrelerin öncüsü olan bu hücreler, hasarlanan dokuların yenilenmesinde de görev alır. YKH'lerinin, diğer tüm kök hücreler gibi iki önemli özelliği vardır. Birincisi, uzun süre kendilerini kopyalayabilme özelliğine sahiptirler. İkincisi, özel bir fonksiyonu ve morfolojisi olan spesifik bir hücreye dönüşebilirler. Kök hücreler diferansiye olmadan önce ara bir safha geçirirler. Bu safhadaki hücelere öncü veya progenitor hücre adı verilir. Fetal ve yetişkin dokudaki progenitor hücreler yarı farklılaşmışlardır ve bölünerek olgun hücelere diferansiye olabilirler, yani multipotenttirler. Yetişkin tip kök hücreler dokularda az sayıda bulunurlar. Öncelikli görevleri buldukları dokuda hücre ölümü veya doku hasarı meydana geldiğinde kısmen dokuyu tamir etmektir. Buldukları ortama göre farklı davranış gösterirler. Örneğin; hematopoetik kök hücreler olgunlaşmış kan hücrelerine dönüşmek üzere kemik iliği tarafından sürekli üretilirler. Bu hücrelerin en önemli görevleri kan hücrelerini yenilemektir. Bunun tersine ince barsaktaki kök hücreler sabittir ve fiziksel olarak oluşturdukları olgun hücrelerden kolaylıkla ayırt edilebilirler. [24, 26, 27]. YKH'ler beyin, kemik iliği, periferik kan, kan damarları, çizgili kas, deri, diş, kalp, bağırsak, karaciğer, ovaryum

epiteli, adipoz doku pankreas, karaciğer ve testis gibi birçok dokuda bulunmaktadır [32].

Bir hücrenin yetişkin tip kök hücre olarak tanımlanabilmesi için, o hücrenin organizmanın yaşamı boyunca kendini yenileyebilmesi ve klonlanabilmesi gerekir, diğer bir deyişle ihtiyaç olduğunda olgunlaşmış hücrelere dönüşebilecek, kendisiyle aynı genetik özelliklere sahip hücreler üretebilmeleridir. Dönüştüğü hücrelerin tamamıyla olgun bir hücre fenotipinde olması, bulunduğu dokuya entegre olması ve o dokuya ait fonksiyonu yerine getirebilmesi gerekir. Fenotip terimi, o hücreye ait gözlenebilen tüm özellikleri içerir. Bunlar; hücrenin şekli, diğer hücrelerle olan ilişkileri ve bulunduğu ortam, hücre yüzeyinde bulunan proteinler ve hücrenin davranışları ile ilgilidir. YKH'de gördüğümüz diğer bir özellik de plastisitedir. Örneğin, ektoderm kökenli bir kök hücrenin *in vivo* ve/veya *in vitro* ortamda uygun koşullar sağlandığında endoderm veya mezoderm kökenli hücrelere dönüşebilmesi bu hücrelerin plastisite özelliğinden kaynaklanmaktadır [26].

YKH'ler bulunduğu veya köken aldığı dokuya göre Mezenkimal Kök Hücreler (MKH) olarak da sınıflandırılabilirler. "Mezenkimal" terimi, epiblastın farklılaşmasından başlayarak embriyonun gelişmesinde ve daha sonra fetüsün yaşamında önemli yer tutan, gevşek bağ dokusu yapısındaki dokulara verilen isimdir. Bu dokuyu oluşturan hücreler fenotip olarak çevresindeki gevşek yapılı ve bol sulu hücre dışı matris ortamı içinde serbest hareket edebilen çok yüzlü, ince uzun uzantıya sahip hücrelerdir [26]. Friedenstein ve arkadaşları (1970) kemik iliğinde hematopoetik olmayan aderent bir grup öncü hücre bulunduğu ve bu hücrelerin *in vitro* ortamda fibroblast kolonisi oluşturma yeteneğine sahip olduğunu göstermişlerdir. Daha sonra tek bir koloniden ayrıştırılıp *in vitro* olarak osteoblast, adiposit ve kondrosite farklılaştığı gösterilen bu hücreler Mezenkimal Kök Hücre (MKH) olarak adlandırılmıştır [33]. Günümüzde bu hücreler için, 2008 yılında Uluslararası Hücresel Tedavi Derneği'nin (International Society for Cellular Therapy, ISCT) belirlediği CD73, CD90 ve CD105 molekülleri bulunsa da, bu belirteçlerin bu hücrelerin tüm etkinliklerini ve kökenlerini ifade etmekte yetersiz kalması nedeniyle henüz ortak bir belirteçten söz edilememektedir [26, 34].

MKH'ler, insan vücudunun özellikle damardan zengin bağ dokusu içeren dokularından elde edilmektedir. Elde edildiği doku, yaş, cinsiyet gibi parametreler MKH'lerin elde edilme miktarını ve kalitesini etkilemektedir [26].

### **1.1.2.1.İnsan adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücreler (iAKH)**

Kök hücre biliminde ortaya çıkan son gelişmelerle tasarlanan biyomalzemelerin kombinasyonu doku hasarının onarılmasında kök hücrelerin kullanılmasına olanak sağlamaktadır. Mezenkimal kök hücreler, bağ dokusunda ve postnatal organlarda bulunan mezoderm türevli hematopoetik olmayan yetişkin tip kök hücrelerdir [13]. Kemik iliği stromasından elde edilen MKH'ler uzun yıllardır osteojenik, kondrojenik, adipojenik ve endotelial hücrelere farklılaşma kapasitesi olan nedeniyle hücresel terapi ve rejeneratif tıp için en iyi çalışılmış MKH kaynağıdır [35].

Son yıllarda mezenkimal kök hücreler trabeküler kemik, sinovyum, göbek kordonu, peridontal ligament ve diğer diş dokuları, iskelet kası, kordon kanı ve deri gibi diğer dokulardan izole edilmektedir. Bu kaynaklardan elde edilen kök hücreler değerli olmasına rağmen, bu dokularda sınırlı miktarda bulunması ve elde edilen hücre sayısının azlığı, klinik ya da prelinik kullanımdan önce *ex vivo* çoğaltma ya da daha fazla manuplasyon gerektirmek gibi bazı problemleri de beraberinde getirmektedir. Aksine, mezenkimal kök hücrelerin daha fazla sayıda elde edilebildiği diğer bir popülasyonu adipoz dokuda bulunmaktadır. Adipoz kökenli kök/stromal hücreler olarak isimlendirilen ve rejeneratif tıp çalışmaları açısından son derece umut verici olan bu hücreler, 2004 İkinci Yıllık Uluslararası Yağ Uygulaması Teknolojileri Toplantısı'nda (Second Annual International Fat Applied Technology Society Meeting in 2004) rejeneratif tıp topluluğu tarafından adipoz dokuda tanımlanmıştır [13]. Ortaya çıkan kanıtlar adipoz dokunun en zengin ve en kolay ulaşılabilir MKH kaynağı olduğunu göstermektedir [36]. Bu hücrelere, adipoz kökenli kök hücresi, adipoz kökenli yetişkin kök hücresi, adipoz kökenli yetişkin stroma hücresi vb. gibi birçok farklı isim verilmiştir. Bu isimlendirme literatürde kargaşaya neden olduğu için Uluslararası Yağ Uygulama



Teknolojileri Derneği bu hücreleri adipoz kökenli kök hücreler (AKH) olarak tanımlamayı uygun görmüştür. Adipoz doku kökenli kök hücrelerin anjiyojenezi teşvik etme, büyüme hormonları salgılama, inflamatuvar süreci düzenleme ve birçok hücre tipine farklılaşabilme kapasitesi vardır [37]. Kemik iliği mezenkimal kök hücrelerinin izolasyonu oldukça ağırlı ve hasta için enfeksiyon riski içermektedir. İnsan vücudunda yaygın olarak bulunana adipoz dokudan MKH izolasyonu ise genellikle hastayı ya da vericiyi rahatsız etmeden lipoaspirasyon materyallerinden yapılabilir. Ayrıca, rejeneratif tıpta kullanımı için çok önemli bir faktör olan, elde edilecek kök hücre miktarı diğer kök hücre depolarına göre adipoz dokuda çok daha fazladır. 1 gram adipoz dokudan  $5 \times 10^3$  MKH izole edilebilir ki bu rakam eşit miktardaki kemik iliğinden elde edilen hücreye göre 500 kat daha fazladır [38]. Genellikle, hücre izolasyon protokolü, dokunun (lipoaspirat ya da parçalanmış yağ/adipoz doku) kollojenaz ile parçalanması ve yoğunluğa dayalı santrifüjlenmesini takiben stromal vasküler fraksiyon (SVF) pelletin monolayer olarak kültür kabına ekilmesi işlemlerini içerir. Yapışan (adherent) hücre populasyonu çoğaltılıp çeşitli deneylerde kullanılabilir [9, 13].

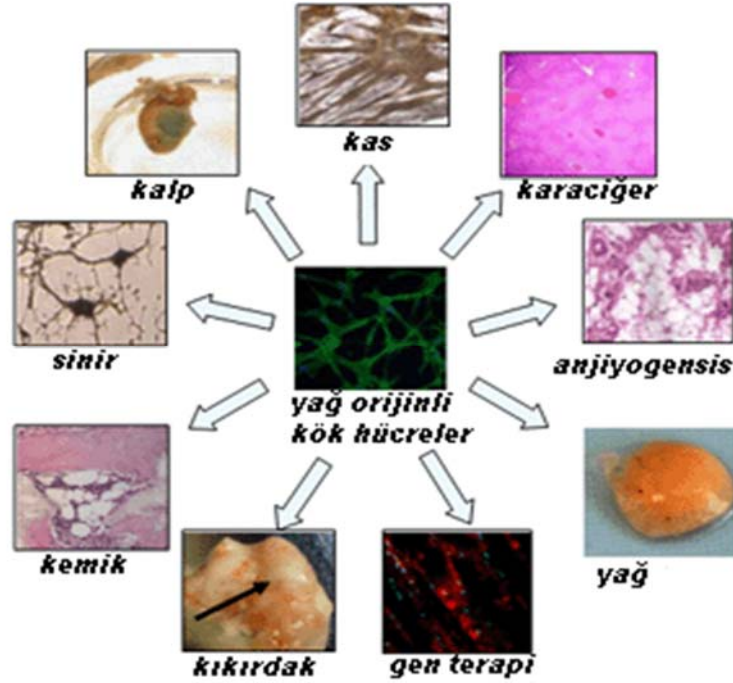
Günümüzde temel olarak MKH'lerin immünofenotiplendirmesi için kullanılan belirteçler şunlardır:

**Çizelge.1.1.** Mezenkimal kök hücre belirteçleri [10, 38, 39].

<b>Pozitif</b>	<b>Negatif</b>
CD105	CD45
CD73	CD34
CD90	CD14 veya CD11b
CD 44	CD79 $\alpha$ veya CD19
	HLA-DR

iAKH'lerle yapılan çalışmaların giderek artmasına rağmen, izolasyon ve kültür prosedürleri birçok laboratuvarda farklılık göstermektedir ve bunların standardizasyonu kalite kontrolünü artırabilir ve farklı çalışmalar arasındaki karşılaştırmayı kolaylaştırabilir. Başlangıçtaki hücre kültürü kompozisyonunu etkileyebileceği için hem izolasyon sırasında hem de hücrelerin kültüre edilmesinde kullanılan yöntemlerde ve izolasyon kalitesindeki farklılıklardan

dolayı laboratuvar çalışmalarının sonuçlarında farklılıklar görülmektedir. Hücre kültürü bazal medyumunu genellikle epidermal büyüme faktörü, fibroblast büyüme faktörü-2 ve/veya TGF-  $\beta$  ile desteklenen %10 fetal buzağı serumu içerir. Bazı protokoller ayrı başlangıç ve alt pasaj hücre yoğunluğu önermektedir. Verici yaşı, cinsiyeti, vücut kütle endeksi, etnik ve tıbbi geçmiş gibi ilk izole edilen hücre kültürü içeriğini etkileyebilecek diğer değişkenler standardize edilemeyebilir. Bu nedenle iAKH'lerin izolasyon ve kültüre edilme yöntemlerinin standardizasyonu farklı laboratuvarlardan elde edilen sonuçların tekrar edilebilirliğini ve güvenilirliğini maksimize etmek için çok önemlidir [13].



Şekil.1.3. Adipoz MKH'lerin farklılaşma potansiyelleri ve kullanım alanları [40].

Olgun adipositler dışında kalan hücreler topluluğu Stromal Vasküler Fraksiyon (SVF) olarak isimlendirilmektedir ve adipoz stromal kök hücreler, perisitler, vasküler endotel hücreler, fibroblastlar, kan kökenli hücreler ve preadipositler gibi oldukça heterojen bir hücre popülasyonu içermektedir [36]. SVF hücre popülasyonunun tam karakterizasyonu Yoshimura ve arkadaşları (2006) tarafından yapılmıştır [41]. Plastik kültür kabına yapışabilen fibroblastlar

gibi, alt pasajlanma işlemleri sırasında yapışma özelliği göstermeleri nedeniyle iAKH'ler diğer hücrelerden ayrılabilirler.

Kültüre edilen iAKH'ler yıkama işlemlerine tabii tutularak saflaştırılabilir [42]. Ayrıca iAKH'lerin izolasyonu ve spesifik alt kültürlerin saflaştırılabilmesi için spesifik hücre yüzey markırları kullanılarak immunomagnetik veya akım sitometrisine dayalı ayırım uygulanabilir. Fakat kültüre etme prosedüründe yapılabilen modifikasyonlara bağlı olarak analiz edilen yüzey markırları büyük oranda heterojenite göstermektedir [13, 42]. Hücre fenotipi pasaj numarasından ve hücre saflaştırma yöntemindeki farklılıklardan da etkilenebilir. Mitchell ve arkadaşları (2006) CD1, CD14, CD45 ve diğer markırların ekspresyonlarına bağlı olarak kullandıkları akım sitometrisinde SVF'den daha sonraki pasajlarda kaybolan hematopoetik kökenli hücreler tanımlamışlardır. Bu markırların kaybı yapışan hücreleri temsil etmediklerini göstermektedir. Ayrıca, SVF hücrelerinde izolasyonun erken basamaklarında CD13, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD166 gibi klasik stromal hücre markırları oldukça düşük seviyelerde görülmektedir ve dördüncü ya da beşinci pasajdan sonra stromal markırların seviyesinin devamlı olarak yükselerek homojen bir profil olduğu varsayılmaktadır. Buna benzer geçici bir ekspresyon örneği insan kemik iliği mezenkimal kök hücrelerinde de rapor edilmiştir. iAKH kültürlerinin karmaşıklığı çeşitli alt kültürleri karıştırarak farklı seviyedeki iAKH markırlarının ekspresyonlarının ve ayırt edici farklılaşma potansiyellerinin gösterilmesiyle Rada ve arkadaşlarının (2011) çalışmasında ortaya konulmuştur. iAKH alt kültürleri; CD29, CD44, CD49, CD73, CD90, CD105, P75 ve STRO-1 için spesifik immunomagnetik bilyeler kullanılarak izole edilmişlerdir ve kondrojenik ya da osteojenik hücre hatlarına farklılaşma potansiyelini değerlendirebilmek için bu hücrelere spesifik medyumla kültüre edilmişlerdir. İzole edilen iAKH alt kültürleri içinde STRO-1 içeren kültürler en yüksek osteojenik potansiyele sahip olanlar, CD20 ve CD105'nin ekspresse edildiği kültürler de kondrojenik farklılaşma potansiyelin en yüksek olduğu kültürlerdir. Bu bilgi açıkça göstermektedir ki; çeşitli kök hücre alt popülasyonlarından oluşan adipoz dokudan elde edilmiş SVF *in vitro* ortamda kondrojenik ve osteojenik farklılaşma profili sergilemektedir. Bu nedenle, bu alt kültürler rejeneratif tıpta kemik ve kırıkta

uygulamaları ile ilgili yapılacak çalışmalarda kullanılmak için en uygun kültürlerdir [9, 13, 38].

## 1.2. Kemik Dokusu

Kemik; organik ve inorganik elementlerden oluşmaktadır ve ağırlığının yaklaşık olarak %20'sini su molekülleri oluşturmaktadır. HAP kristalleri, osteoblastlar, osteositler, osteoklastlar, hematopoetik hücreler, kollojen lifler, kan damarları ve sinirlerden oluşan kemik, insan vücudunun en sert dokularından birisidir. Hücrelerden, liflerden ve temel maddeden oluşan bağ dokularına benzer, ancak kemikte hücre dışı matriks kalsifiye olmuştur [43, 44].

Sağlıklı yetişkin insanlarda, kemik homeostazi olduğu kadar, kemik gelişimi de çeşitli kemik hücre tipleri tarafından uyumlu bir şekilde koordine edilmektedir. Kemik gelişimi kemiğe öncülük edecek olan dokunun kıkırdak olup olmamasına göre intramembranöz ve endokondral kemikleşme olarak iki şekilde sınıflandırılır. Kondrositler kemik gelişiminin ilk aşamalarında gerçekleşen endokondral (kıkırdak içi) kemikleşme sırasında uzun kemiklerin büyümesinden sorumludurlar. Endokondral kemikleşmede fetal dönem boyunca ve postnatal yaşamda, önce kıkırdaktan oluşan bir kemik modeli şekillenir. Daha sonra bu kıkırdak model kemik dokuyla yer değiştirir. MKH'lerin kemiğin oluşacağı bölgeye gelip burada bir yoğunluk oluşturmaları ile kıkırdak model şekillenmeye başlar. Oluşan bu mezenkimal yoğunlaşma sonrasında, mezenkimal hücrelerden, kondrositler farklılaşır [45, 46].

Kafatasının yassı kemikleri ile mandibula ve klavikula kemikleri intramembranöz kemikleşme ile meydana gelir. İntramembranöz kemikleşme, kıkırdak hücrelerinin herhangi bir etkisi olmadan MKH'lerden farklılaşan osteoblastların fonksiyonel olarak kemik dokuyu oluşturmaları ile gerçekleşmektedir. Kemik ekstrasellüler matriksini depolayan osteoblastlar kemikleri oluşturan hücrelerdir. Osteoblastlar zamanla kemik matriksinde yer alan ve gerektiğinde kemik oluşumunu dengeleyen mekanik sensörler olarak iş gören osteositlere farklılaşırlar. Kemik oluşumu, kemik matriksini degrading ederek matrikse

gömülü hormonlar, sitokinler, büyüme faktörleri ve kalsiyumu serbest hale getiren kemik “resorbing” osteoklastlar tarafından dengede tutulur. Gelişim boyunca kemik oluşumunun kemik yıkımından (rezorpsiyon) fazla olması, kemik kütesinin artışıyla sonuçlanır. Kemik oluşumunun bu başlangıç aşamasının ardından, kemiğin yeniden düzenlenmesi devam eder ve homeostazis, kemik oluşumu ve kemik yıkımının sürekli olarak ayarlanmasıyla devam ettirilir. Bu hassas denge, osteoporoz gibi yaşa bağlı olarak ortaya çıkan pek çok litik kemik hastalıklarında ya da inflamasyona ve kansere bağlı kemik kaybının görüldüğü durumlarda olduğu gibi, kemik kaybını önlemek için sıkı bir kontrol gerektirmektedir. Kemik oluşumu ve yıkımı arasındaki denge büyük ölçüde osteoblast ve osteoklast öncül hücrelerinin farklılaşmasının sıkı bir kontrolüyle düzenlenmektedir. Osteoklastlar hematopoetik sistemin bir parçası olan monositik öncül hücrelerden köken alırken, osteoblastlar mezenkimal kök hücrelerden köken almaktadırlar [45, 46].

Osteoblastlara ek olarak kondrositler, adipositler, fibroblast hücreleri ve monositler de mezenkimal kök hücrelerden köken almaktadırlar. Mezenkimal öncül hücrelerin farklılaşmış ve tamamen fonksiyonel hücelere farklılaşma süreçleri anahtar transkripsiyon faktörleri ve onların kofaktörleri ile kontrol edilmektedir. Her spesifik mezenkimal kökenli hücre ona özgü transkripsiyon faktör işaretine sahip olmasının yanı sıra ortak birçok transkripsiyon faktörüne de sahiptir. Spesifiklik farklı transkripsiyon faktörü ağları arasındaki fonksiyonel işbirliğinin uyumuna ve içeriğine bağlı olarak kazanılmaktadır. C/EBP $\beta$  en az üç mezenkimal hücre hattında anahtar rol oynayan bir transkripsiyon faktörü olarak karşımıza çıkmaktadır. İlk defa adiposit hücrelerinde bir transkripsiyonel aktivatör olarak tanımlanmasına rağmen C/EBP $\beta$  kondrosit ve osteoblastların farklılaşması ve büyümesini düzenlediği ve reseptör ya da aktivatör olarak her ikisinin fonksiyonunu düzenleyebileceği de bilinmektedir. C/EBP $\beta$ 'nin bu çeşitli fonksiyonu farklı protein izoformları ve post-translasyonel C/EBP $\beta$  modifikasyonlarına bağlıdır [46].

Mezenkimal kök hücrelerin çok fazla hücre tipine farklılaşma kapasiteleri (multi-lineage) rejeneratif tıpta önemli bir odak noktasıdır. Özellikle yaşlı populasyonun çok büyük bir kısmını etkileyen dejeneratif kemik hastalıklarında alternatif bir tedavi olarak rejeneratif tıp geliştirilmektedir. Rejeneratif tıpta dejeneratif kemik hastalıkları ile ilgili olarak geliştirilmekte olan alternatif tedaviler

temel olarak kemik hastalıklarında en çok etkilenen hücre tipleri olarak kondrositleri ve osteoblastları hedef almaktadır. Monositler ve fibroid kökenli hücreler (tendon, ligament ve stromal hücreler) de MKH'lerden köken almasına rağmen, C/EBP $\beta$ 'nin bu hücrelerdeki olası fonksiyonu kesin olarak bilinmemektedir [46].

Osteojenezisin başlangıcı ve devamı için “runrelated transcription factor 2 (Runx2)” ve “transcription factor osterix (Osx)” gerekmektedir. Runx2'nin “Mitogen-activated protein kinase (MAPK)” yolağı aracılığıyla post transkripsiyonal regülasyonu “extracellular signal regulated kinases” 1 ve 2 (Erk1 ve Erk2) Runx2'nin aktivitesini artırır. Ayrıca, “bone morphogenetic protein 2” (BMP2) gibi proteinler osteojenezi artırırken, adipojenezi inhibe eder. Osteojenezin markırları arasında alkalin fosfataz ve osteokalsinin ekspresyonunda artış yer almaktadır ve olgun osteoblastlar mineralize matriks depolanmasıyla karakterize edilmektedir [47].

Alkalin fosfataz, osteokalsin, osteonektin, kollojen tip I ve osteopontin (kemik sialoprotein I) osteoblastlar tarafından ekspresse edilen en önemli genler olarak sayılabilir. Alkalin fosfataz membrana bağlı bir proteindir ve erken osteogenez işareti olarak değerlendirilmektedir. Osteokalsin kalsiyum iyonunun bağlanmasından sorumludur, ileri safha kemik oluşumunun bir işaretidir. Osteokalsinin kollojene bağlandığı ve osteoblast proliferasyonunda regülatör olarak iş gördüğü bilinmektedir. Kollojen tip I HAP'a bağlanan temel kemik matriks proteindir. Kemik sialoproteini olarak da bilinen ve aspartik asit, glutamik asit gibi asidik aminoasitler bakımından zengin olan osteopontin HAP kristalinin çekirdeklenmesinden sorumlu olduğu için kemiğin mineralleşmesinde çok büyük önem taşımaktadır. Matriksin mineralleşmesi, HAP'ın çekirdeklenmesi, hücrenin tutunması ve kalsiyuma bağlanmasında, hücre sinyalizasyonu ve kollojen bağlanmasında rol oynadığı bilinmektedir [44, 48].

### **1.3. Biyomalzemeler**

Biyomalzemelerin tıpta kullanımı uzun bir geçmişe sahiptir. Biyomalzemeye ilişkin ilk tanımlama, Williams tarafından 1987'de “biyolojik

sistemlerle etkileşebilmesi amacıyla kullanılan cansız medikal araçlar” şeklinde yapılmıştır. “Biyomalzeme” kelimesi her ne kadar 20. yüzyılın ortalarında yaşamımıza girmiş olsa da kullanımı çok daha eskilere dayanmaktadır. Biyomateryallerin tıbbi amaçlı ilk kullanımı M.Ö. 3000’li yıllarda Mısır’da ketenlerin dikişte kullanımı ve M.S. 600’de deniz kabuklularının yapay diş olarak kullanımına kadar gitmektedir [49].

Biyomalzemeler, bir biyo-ortamda istenilen fonksiyona uygun olarak tasarlanan sentetik ya da doğal malzemelerdir. 1960-1970 yıllarında ilk nesil materyallerin insan vücudunda kullanılmak üzere keşfinden sonra sentetik biyomalzemeler ilgi odağı olmaya başlamıştır. Bir vücuttaki dokunun fonksiyonunu yerine getirmek ya da iyileştirmek amacıyla üretilen bir biyomedikal implantta, materyalin mekanik özellikleri, dizaynı ve biyoyuumluluğu önem kazanmaktadır. Seçilen materyalin elastisite, süneklik, tokluk, stress vb gibi birkaç mekanik özelliği kullanım amacına uygun olmalıdır. Uygun formdaki materyalin düşük maliyetli olması ve istenilen şekli alabilmesi beklenmektedir. Uygun implant malzemesi tasarımının istenen dayanıklılık, işlevsellik ve biyolojik yanıtı sağlaması gerekir. Dayanıklılık ve işlevsellik materyalin “bulk” özelliğine bağlıken, biyolojik yanıt yüzey kimyasına, yüzey topografisine, pürüzsüzlüğe/pürüzlülüğe, yüzey yüküne ve yüzey enerjisine bağlıdır. Biyoyuumluluk, implant materyalinin herhangi bir olumsuz yanıt olmaksızın çevre dokular tarafından kabul edilmesi olarak tanımlanabilir. Bu nedenle implant materyali; toksik ve karsinojenik olmamalı, vücutta yabancı maddeye karşı hiç reaksiyona neden olmamalı ya da çok az reaksiyona neden olmalı ve kimyasal olarak stabil ya da korozyona karşı dirençli olmalıdır [50].

Bir hücrenin; farklılaşma, proliferasyon, göç, apoptoza girme ya da diğer spesifik fonksiyonları yerine getirmek için karşımıza çıkan son durumu, hücrenin bulunduğu ortam ve ESM bileşenleri ile moleküler etkileşimine karşı bir yanıtıdır [51]. Bu nedenle vücuda yerleştirilen implant materyalinin biyoyuumluluğunu sağlayacak olan fiziksel, kimyasal ve mekanik özellikleri, onunla karşılaşacak hücrenin tepkisi açısından çok önemlidir.

### 1.3.1. Nanomalzameleler

Nanoteknoloji alanı, son yıllarda insanların yaşam standardını yükseltebilmek amacıyla farklı sektörlerde çok sayıda uygulamalarda kullanılarak dünya üzerinde hızlı bir şekilde büyümeye devam etmektedir. Malzeme boyutundaki küçülme, yapıya farklı ya da ekstra olarak pek çok özellik katmaktadır. Yüzey alanının artması ve malzemenin boyutunun düşmesinden dolayı ön plana çıkan kuantum etkilerine bağlı olarak nano yapıların özellikleri normal boyutlu yapılarınkinden farklılıklar gösterebilir. Bunların başında elektriksel, mekanik, kimyasal ve optik özellikler gelmektedir. Bu özelliklerden dolayı elektronik, optik, diagnostik, ilaç gelişimi, implantlar, biyosensörler, görüntüleme gibi endüstriler ve ayrıca güneş kremleri, tekstil, kozmetik, spor ve aksesuarlar gibi tüketici ürünleri de nanoteknolojinin kapsamı içerisine girmektedir [52].

Nanobiyolojiyi ve nanoteknoloji uygulamalarını anlamak “rejeneratif” tıpta önemlidir. Çünkü nano boyuttaki materyaller hücrelerin ve dokuların temel fonksiyonel alt birimleridir. Kök hücreler, çok yönlü farklılaşabilme kabiliyetleri ve çoğalabilme yetenekleri nedeniyle doku mühendisliğinde ve rejenerasyonda umut verici bir hücre tipidir. Doku mühendisliğinde temel gereklilik yeniden üretilecek dokunun üç boyutluluğudur. Kemik doku mühendisliği ve yenilenmesinde, MKH’lerin uygulanması ve nanomalzeme iskeleler yaşanan zorluklara yeni bir cevap olarak kullanılabilir. MKH’lerin biyolojisi; çoğalması, farklılaşması; hücre-hücre etkileşimleri, ekstrasellüler biyofaktörlerle sinyalizasyon ve transkripsiyonal ve epigenetik olaylar tarafından karmaşık bir şekilde düzenlenmektedir [18].

Nanomalzeme olarak isimlendirilen nanoboyutlu materyaller, genellikle çok küçük bileşenlerden oluşan ve/veya en az bir boyutu 1-100 nm aralığında olan yapısal özelliklerle (partikül, lif ve/veya granül) tanımlanmaktadır. Nanomalzemeler; nanoboyutları nedeniyle konvensiyonel materyallerle karşılaştırıldığında yeni özellikler sergileyen metaller, seramikler, polimerler veya kompozit materyaller olabilirler. Nanomalzeme bilimi, onların çekirdek ve yüzey özellikleri, geleneksel çekirdek materyal davranışını yönetmeyen kuantum



fenomeninden etkilenen materyallerin birleşiminin atomik seviyede kontrol edildiği bir yaklaşımdır [22].

Biyomoleküllerin tanımlanmış göze çarpan yetenekleri, nanomalzemelerin eşsiz özellikleriyle birleştirildiğinde; yeni doku yerine konan biyosensörler, hassas teşhis sistemleri ve kontrollü ilaç dağıtım sistemleri gibi biyolojik elektroniklerle performansı büyük ölçüde yönlendirebilirler. Bu formların yanı sıra, biyomedikal uygulamalar için geliştirilen birçok modifiye teknikle yapılan nanokaplamalar, nanofilmler ve nanoyapılı yüzeyler de bulunmaktadır. Nanomalzemelerin çok geniş bir uygulama alanı bulunmaktadır [22].

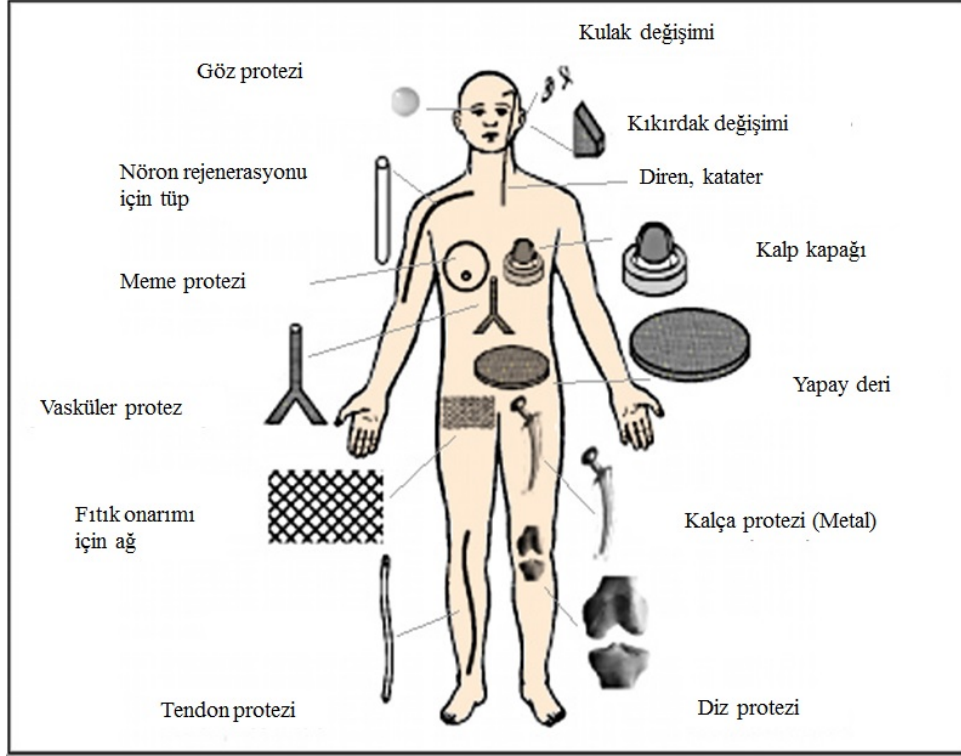
Canlı dokular nano boyutta moleküler mekanizmalarla çalıştığından, canlı dokularla entegre olarak tasarlanacak malzemelerin de nano boyutta olması, doğayı taklit ederek dokunun istediği cevabı verebilmesi gerekmektedir. Osteoblastların vücutta karşılaştığı doku, çalışmalarda kullanılan mikron boyutundaki yüzeyler değil, nano yapılardan oluşan kemiktir. Yaşamın ana parçaları olan proteinler, lipidler, nükleik asitler ve karbonhidratlar nanometrik boyutta işlem görmektedirler. İdeal yüzey üretmedeki çabalar bu nedenle çoğu zaman yetersiz kalmaktadır. Tüm bu sebepler göz önüne alındığında nano boyutta özelliklere sahip yüzeylere ihtiyaç duyulmaktadır. Araştırmacılar son yıllarda bu ihtiyaca cevap verebilmek için nano yapıları taklit edebilen malzemeler üretmeye çalışmaktadırlar. Yapılan çalışmalar metaller, polimerleri kompozitler ve seramikler gibi farklı kimyasal özellikteki nano boyutlu malzemelerin mikron boyuttaki malzemelere göre daha iyi osteoindüksiyon sağladığını göstermektedir [53, 54].

### **1.3.2. Kemik uygulamaları için nanomalzemeler**

Yaşam kalitesinin iyileştirilmesi, düzenli bir şekilde artırılabilmesi ve buna bağlı olarak daha uzun yaşam beklentisi, zarar görmüş ve/veya çalışmayan organların onarımıyla ilgili taleplerdeki artışı da beraberinde getirmektedir. Kemik doku rejenerasyonu ortopedik ve kraniofasiyal cerrahi alanında hala önemli bir zorluk olarak karşımıza çıkmaktadır. Travma, tümörler, enfeksiyonlar,

biyokimyasal hastalıklar ve anormal iskelet gelişimi gibi nedenlerle ortaya çıkan kemik defektlerinin onarımı klinikte sıklıkla uygulanan cerrahi örnekleridir. Bu ameliyatların çoğu için grefting malzemelere ihtiyaç duyulmaktadır [20]. Çoğu patolojik durumda otogreftlerin ve allogreftlerin başarısızlıkları araştırmacıları, biyouyumluluk, biyoçözünürlük ve osteoindüktivite gibi spesifik özelliklerle kemik onarımını ya da rejenerasyonunu teşvik etme özelliğine sahip yeni biyomalzemeler araştırmaya itmektedir [13].

Genel olarak kemik-grefting malzemeleri otogreftler (aynı bireyde bir yerden başka bir sahaya nakledilen greft) ve allogreftler (aynı türden farklı bireyler arasındaki greft nakli) olarak iki ana gruba bölünebilir. Özellikle otolog kemiğin kullanıldığı doğal kemik greftleri, ameliyat sonrasında immunojenik reaksiyon gelişmediği ve osteojenite (kemik iliğindeki kemik oluşturan hücre kaynağı), osteoindüktivite (greft içerisindeki kemik morfogenetik proteinler (BMP) aracılığıyla mezenkimal kök hücrelerin osteojenik farklılaşmaya doğru yönlendirilmesi) ve osteokondaktivite açısından çok iyi bir biyolojik performans gösterdiklerinden dolayı hala kemik onarımı ve rejenerasyonu için altın standart olarak düşünülmektedir. Başarılı kemik rejenerasyonu için birçok gerekliliği karşılamasına rağmen otolog kemik greftlerinin kullanımı bazı önemli sakıncaları da beraberinde getirmektedir. Greftin elde edilmesi donörde ölüme, kronik operasyon sonrası ağrıya, hipersensitiviteye ve enfeksiyona yol açabilecek ilave bir cerrahi işlem gerektirmektedir. Otogreftlerin kullanımındaki diğer önemli sakınca ise az miktarda elde edilebilmesidir. Otolog kemiğin aksine, allojenik ve ksenojenik (farklı türler arasındaki greft nakli) greftler daha çok miktarda elde edilebilir ve hastada başka bir ameliyat gerektirmez. Buna rağmen allogenetik kemiğin immunojenik reaksiyona neden olmaması için liyofilizasyon, irradyasyon ve dondurularak kurutma gibi işlemlere girerek bütün immunojenik proteinlerden arındırılması gerekmektedir. Bu işlemler allogreftlerin osteoindüktivite ve osteokondüktivite üzerine negatif etki bırakmaktadır [13, 20].



**şekil.1.4.** Biyomalzemelerin insan vücudundaki kullanım bölgeleri [55].

Doğal kemik greftlerinin yukarıda bahsedilen sakıncalarından dolayı çok sayıda sentetik greft geliştirilmektedir. Kimyasal bileşimlerine göre kemik greftleri; titanyum ve onun alaşımları, paslanmaz elik ve kobalt-krom alaşımları gibi metalik implantlar; kalsiyum fosfat, alümina, karbon ve cam seramikler gibi seramikler; polimetil metakrilat, poliüretan, ultra yüksek moleküler ağırlıklı polietilen, silikon ve polilaktid gibi polimerler ve kalsiyum fosfat-seramik kaplı metalik implantlar ve polimer-seramik kompozitler gibi ilk üç grubun kompozitleri olmak üzere dört ana gruba ayrılabilir. Sentetik kemik greftleri kolaylıkla elde edilebilir ve hiçbir antijenik reaksiyona neden olmadan kullanım amacına uygun olarak rahatlıkla kullanılabilirler. Buna rağmen bu greftlerin biyolojik performansları kemik büyümesinin başlatılması ve desteklenmesi açısından doğal kemik greftlerinde elde edilen sonuçlara göre oldukça düşüktür [20].

Sentetik biyomalzemelerin biyolojik performansını otolog kemiklerde elde edilen performansa yaklaştırabilmek için “doku mühendisliği” adı verilen yeni bir

interdisipliner araştırma alanı geliştirilmiştir. Langer ve Vacanti (1993) doku mühendisliğini, bir dokunun fonksiyonunu geliştirmek, devam ettirmek ya da tamir etmek amacıyla biyolojik bir materyal geliştirmek için mühendislik ve yaşam bilimlerinin ilkelerini uygulanan disiplinler arası bir çalışma alanı olarak tanımlamışlardır [13, 20]. Doku mühendisliği temelde 3 ana teknolojiye dayanmaktadır; kök hücre teknolojisi, büyüme faktörü teknolojisi ve biyomalzeme teknolojisi [49]. Terapotik stratejilerin temel hedefi travma, enfeksiyon, tümörlü bölgenin alınması, iskelet anomalileri ya da kemiğin avasküler nekrozu, kırık kemiğin kaynamaması ve osteoporoz gibi rejeneratif süreci tehlikeye düşürecek durumlardaki büyük kemik defektlerinde iskeletin yeniden yapımında kemiğin rejenerasyonudur. Kemik iyileşmesini uyaran ya da komplikasyonları azaltan ya da tedavi eden stratejiler uzun yaşam beklentisi ve dünyadaki yaşlı nüfusundaki artış nedeniyle gittikçe önem kazanmaktadır. Kemik doku rejenerasyonu ile ilgili olarak yeni dokuyu oluşturmak için iki ana strateji uygulanmaktadır; a) kemik uyarıcı maddelerin kullanımı ile kemik oluşumunun kimyasal olarak stimülasyonu, b) osteojenik hücre/doku ve bir biyomalzemedan oluşan doku iskelesi gibi hibrit (melez) implantlar ile kemik dokusunun yeniden yapımı. Hem büyüme faktörleri bazlı hem de hücre temelli doku mühendisliği yapılarının kemik oluşumunu artırma kapasitesine sahip olduğu gösterilmesine rağmen ortopedik olarak implante edildiklerindeki biyolojik performansları büyük ölçüde taşıyıcı yapıya sahiptir. Doku mühendisliği tekniği de bazı sakıncalara sahiptir. Rekombinant büyüme faktörlerinin üretimi, biyopsinin alınması ve taşınması ve otolog hücrelerin kültüre edilmesi doku mühendisliğindeki zaman, para ve emek tüketen bazı faktörler olarak karşımıza çıkmaktadır [13, 20].

Kemik yerine geçecek materyalin içeriği ve yapısı mühendislik ilkeleriyle birleştirildiğinde zarar görmüş dokunun doğal biyolojik yanıtını kullanarak kemik hücrelerinin göçüne, proliferasyonun ve farklılaşmasının, ayrıca vaskülarizasyonun artmasına olanak sağlamalıdır. Günümüzde kullanılan *in vitro* kemik oluşum modelleri embriyonel gelişim sırasında rol oynadığı bilinen, rejenerasyon sürecinde hücrel farklılaşmayı ve fonksiyonları uyarmakta kullanılan aynı faktörleri temel alan fikre dayanmaktadır. Kemik oluşumunu destekleyecek bir çevre için hücre çevresinde ve ekstrasellüler matriks arasında

kuvvetli bir etkileşime, biyokimyasal ve biyofiziksel sinyallerin oldukça karmaşık olan kombinasyonuna ihtiyaç duyulmaktadır. Sinyalizasyonun kompleksliği moleküler ve fiziksel faktörlerin zamansal ve konumsal olarak değişimiyle kemik morfojenini etkilemektedir. Tüm bu karmaşık durumlar bilim insanlarını; biyomalzeme, hücre ve büyüme faktörleri arasında daha kompleks etkileşimler içeren yapıları düşünmeye itmektedir [13].

Kemik oluşumu için en uygun biyomalzeme kemik proteinleri ve HAP gibi osteokondüktif materyallerden yapılmış olanlardır. Mekanik özellikleri doğal kemiğin yüke dayanım kapasitesine benzer olmalı, böylece osteojenezi uyarabilmelidir. Matriks birikimini ve hücre infiltrasyonunu kolaylaştıran büyük bileşik porlara sahip ve pürüzlü iç yüzeyi ile hücre yapışmasını teşvik edebilmelidir. Ayrıca, vaskülarizasyon için anatomik olarak doğru şekilde biçimlendirilmiş anizotropik yapıda olmalıdır. Biyomalzemeler hücre fonksiyonları düzenleyen, yara iyileşmesini hızlandıran ve patalojiyi koruyan büyüme faktörleri ya da ilaçlar gibi biyoaktif moleküllerin dağıtımını kontrol etmeli ve bünyesinde barındırabilmelidir [13].

Osteoindüksiyon 20. yüzyılın başlarında, implantasyonun ardından ektopik olarak doku ekstraktlarında ve cansız (devitalize) dokuda bulunmuştur. O zamanlar çok az tutarlı sonuç elde edilmiş olmasına rağmen bu sürece dahil olan elementler az da olsa biliniyordu [20]. İmplant materyalleri kimyasal yapılarına bağlı olarak vücuda yerleştirildiklerinde kemiğe farklı şekillerde bağlanırlar. Örneğin titanyum ve alaşımından yapılmış materyaller yüzeyde oluşan oksit tabakası nedeniyle biyoinert tipte (Yeni kemiğin doğrudan implant yüzeyinde meydana gelmesi ve kemik yapımının implanttan kemiğe doğru olması) osteointegrasyon meydana getirirler. Titanyum diğer metallerle oranla daha üstün biyoyumlulukta olmasına rağmen osteoindüksiyon kapasitesi kalsiyum fosfat yapısındaki materyallere oranla oldukça düşüktür. İmplantın vücuda yerleştirilmesini takiben gerçekleşen osteointegrasyon mekanizmaları malzemenin karakterine bağlı olarak biyoinert tip dışında biyotoler tip (Yeni kemik üretiminin eski kemik yüzeylerinde olması ve kemik yapımının kemikten implanta doğru olması) ve biyoaktif tipte (kemikle implant arasındaki fizikokimyasal bağlantı) de olabilir [53].

Yapılan birçok çalışma kalsifikasyonun ve buna bağılı olarak kalsiyum fosfatın osteoindüksiyon sürecinde çok önemli bir rol oynayabileceğini ortaya çıkarmaktadır [20]. Pürüzlülük gibi topografik özelliklerin yanı sıra, yüzey kimyasındaki ve/veya kristal yapısındaki değişikliklerin kemik hücresinin fonksiyonlarını değişik şekillerde etkileyeceği bilinmektedir [22]. Yüzeyin hidrofiliği ve serbest yüzey enerjisi gibi faktörler, implantın hücre dışı sıvı veya kan ile karşılaştığında hücre yapışmasını yönlendirecek biyomakromoleküllerin absorpsiyonunu etkilemektedir. Bu nedenle yüzeyde hücre yapışmasını (adezyon), çoğalmasını ve hücre dışı matriks üretimini uyaracak, kontrollü protein absorpsiyonu ve konformasyonu oluşturacak bir yüzey kimyası çok önemlidir [53].

### **1.3.3. Osteoindüksiyon ve osteointegrasyon mekanizması**

Günümüzde biyomalzemelerle osteoindüksiyonun tam mekanizması hala büyük ölçüde bilinmemektedir. Ayrıca, BMP'ler ve biyomalzemelerle olan osteoindüksiyonun mekanizmasının aynı olup olmadığı da tam olarak bilinmemektedir. BMP'ler ve biyomalzemelerle osteoindüksiyonda 3 farklılık açıkça görülmektedir: a) BMP-uyarılı kemik çoğunlukla endokondriyal yol aracılığı ile oluşurken, biyomalzeme tarafından uyarılan kemik daima intramembranöz olarak oluşmaktadır, b) kemirgenler gibi küçük hayvanlarda kemik nadiren biyomalzeme tarafından uyarılabilirken, BMP'ler ile kolaylıkla uyarılabilmektedir, c) biyomalzemelerde periferde kemik asla gözlenmezken, BMP'ler tarafından oluşturulan kemik yumuşak doku taşıyıcı yüzeyden uzakta olsa bile düzenli olarak taşıyıcı dışında oluşmaktadır [20].

Osteoindüktif biyomateryalin potansiyel etkisini maksimum seviyeye çıkartmak için osteoindüksiyon olgusu 3 ayrı mekanizmada incelenebilir; Urist (1965) tarafından tanımlandığı gibi bir osteoindüktif material ilk olarak mezenkimal tipte osteoprogenitör hücreleri kendisine çekebilme ve barındırabilme yeteneğinde olmalıdır. İkincisi, MKH'leri kemiği oluşturacak osteoblastlara farklılaştırma kapasitesine sahip olmalıdır. Son olarak da, ideal osteoindüktif

materyalin ektopik kemik oluşumunu uyarma yeteneğinde olması beklenmektedir [56].

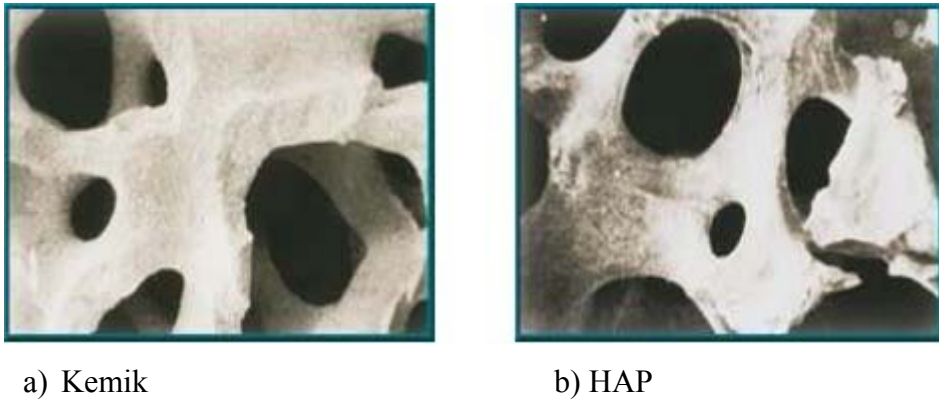
Biyomalzemeler tarafından oluşturulan osteoindüksiyon süreci tam olarak hala büyük oranda bilinmiyor olmasına rağmen birçok grup tarafından biyomalzemelerin osteoindüksiyon oluşturabilmesi için makro yapı, mikro yapı ve kimyasal kompozisyon terimleri açısından özel gereksinimleri olduğu gösterilmiştir. Kalsiyum fosfat seramiklerle kemik uyarılması, düz seramik yüzeylerde hiç gözlenmemiştir. Bütün osteoindüktif seramikler porlu bir makro yapıya ya da iyi tanımlanmış bir konkavite içeren bir mikro yapıya sahiptir. Kemik oluşumu daima porların ya da konkav kısımların iç kısımlarında meydana gelmekte, porlu implantların periferinde asla gözlenmemektedir. Son zamanlarda osteoindüksiyonun meydana gelmesi için, kemiğin paketlenmiş mikropartiküller arasındaki boşluklarda ektopik olarak da oluşabileceği biyomalzemede makroporların bulunmasının çok önemli olmadığı rapor edilmiştir. Cam-seramik, alümina-seramik, polimerik sünger ve titanyum gibi porlu bir makroyapıya sahip malzemelerin hepsinin osteoindüktif etkisi olduğu rapor edilmiştir. Titanyum implantlar kullanılan teknik nedeniyle kompleks bir makro yapıya sahip ektopik kemik oluşumunu uyarmaktadır. Aynı porlu malzeme, ipliksi bir formda üretildiğinde daha basit porlu bir yapıya sahip olmakta ve osteoindüktif özellik göstermemektedir [20].

“Osteointegrasyon” terimi ise ilk olarak 1977 yılında Branemark tarafından, canlı kemik ile implant yüzeyi arasındaki yapısal ve fonksiyonel bağlantıyı ifade etmek amacıyla kullanılmıştır [57]. Histolojik olarak implant materyali etrafında fibroz doku kılıfı olmaması implantın osteointegre olarak kabul edilmesinin şartıdır. Bazı araştırmacılar osteointegrasyonu pozitif bir doku cevabının sonucu değil, negatif doku cevabının olmaması olarak tanımlamaktadırlar [53].

### 1.3.4. Hidroksiapatit (HAP) ve Ag, Zn, Cu metal iyonları

İmplantların klinik başarısı doku çevresiyle stabil bir ara yüzey yaratılarak daha iyi hale getirilebilir. Sert doku yerine geçecek olan uygun implant ideal olarak biyoaktif olmalı, kemik ve implant yüzeyi arasında kimyasal bir bağ oluşturmalıdır. Bu anlamda, camlar, seramikler, cam-seramiklerden ve kompozitlerden oluşan malzemeler biyoaktif materyallerdir. Dünyada son otuz yıl içinde artan oranlarda, kemik ve dişlerin defekt, çatlak ve boşluklarının doldurulması ve tedavisinde, göz ve kulak implantlarında, omurga bozuklukları için hazırlanan destekleyici materyallerde kalsiyum fosfat esaslı biyoseramik protezler kullanılmaya başlanmıştır [44, 58]. 1920 yılında, Albee insanlarda kalsiyum fosfatla yapılan ilk başarılı tıbbi uygulamayı rapor etmiştir. 1975 yılında ise Nery ve arkadaşları bu seramiklerle hayvanlarda yapılan ilk diş uygulamasını rapor etmiştir [58].

Hidroksiapatit [ $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ ] kemiğin yapısında doğal olarak bulunan, kemik oluşumunu artıran biyouyumlu, osteokondüktif, biyoaktif, korozyona ve enfeksiyona dayanıklı inorganik bir malzemedir [44]. Kalsiyum fosfatın en stabil formudur. Kemiğin ana bileşeni (%60-65) olan HAP, osteokondüksiyonu uyarır [59]. Katyonik doğası sayesinde hücre kültürü çalışmalarında asidik çevre oluşumunu engellediği bilinmektedir. Ayrıca kemik iliği mezenkimal hücrelerinin tutunmasını, çoğalmasını ve farklılaşmasını desteklediği belirtilmiştir [44].



Şekil.1.5. Kemik dokusu ve HAP'ın yapısı [21].



Kemik rejenerasyonu çeşitli sinyal moleküllerinin, büyüme faktörlerinin ve hasarlı bölgedeki hücrelerin dahil olduğu çok karmaşık bir olaylar bütünüdür. Doğal kemik rejenerasyonunun aksine kemik doku mühendisliğinde, kemik iyileşmesini uyarmak için biyolojik olarak çözünebilir matris materyalleri tercih edilmektedir. Bu malzemeler biyoçözünür olmalı, doğal olarak porlu yapıda olmalı, osteouyarıcı ve osteokondüktif özellikleri ile biyouyumlu olmalı ve hastada immunojenik yanıt oluşturmamalıdır. Özellikle diş implantı olarak kullanılan ve ortopedik implantasyon için uygun olan HAP, implantasyonun ardından aşamalı olarak konak kemik ile yer değiştirir [59].

ESM üretimini yönlendirmesine bağlı olarak kemik oluşumunu hızlandırmasından dolayı HAP kökenli biyomalzemeler; tümörler, kistler gibi kemik hastalıklarında olduğu kadar artroplastisite, kranoplastisite ve osteotomi gibi çeşitli kemik hasarlarının tedavisinde kullanılmakta ve hastaların yaşam kalitesinin artırılması, iyileşme süresinin kısaltılması gibi hedeflerle yapılan araştırmalarda da akla gelen ilk malzemeler olmaktadır [60]. İmplant materyallerinin mekanik özellikleri ile ilgili son çalışmalar, nanokristal yapıdaki HAP'in *in vitro* ortamda osteoblast proliferasyonunu ve adezyonunu artırdığını göstermektedir [54, 59]. Kalsiyum fosfat seramikler ve HAP, kemiğin yapısındaki mineral bileşimine benzer materyaller oldukları kadar biyouyumlulukları nedeniyle de üretim için ideal biyomateryaller olarak kullanılabilirler. HAP, kemik ve diş gibi dokulara doğrudan bağlanabilir ve dokunun büyümesini artırabilir [21, 48]. Klinik kullanım için ideal materyal sadece iyi biyouyumluluğa değil, aynı zamanda mekanik güce ve biyolojik yolla parçalanabilme yeteneğine de sahip gözenekli seramik materyaller olabilir. Bu bakımdan HAP, istekleri karşılayabilecek mekanik özelliklerin oluşturulması için gerekli nitelikleri de taşımaktadır [48].

Son yıllarda, biyomalzemelerin antimikrobiyal kapasitesinin artırılması ve stabilitesi için inorganik antibakteriyal ajanların kullanımı oldukça ilgi uyandırmaktadır. Seramik malzemeler içerisine gömülerek hareketsiz hale getirilmiş metaller arasında düşük toksisiteye sahip ve en yüksek antibakteriyal özellik gösterenler gümüş, bakır ve çinkodur. Bu metal iyonlarının doğal olarak antibakteriyal özellikte oluşu, onların kemik doku mühendisliğinde

biyomalzemelerin sentezlenmesi sırasında kullanım potansiyelini artırmaktadır [59, 61]. HAP, biyoyumluluğu ve gümüş iyonu ile yüksek katyon değişim oranı nedeniyle kemik hasarlarının tedavisinde oldukça yaygın olarak kullanılan ana malzeme olarak karşımıza çıkmaktadır [61].

Biyomühendislik açısından bakıldığında gümüş elementi, düşük konsantrasyonlarda geniş spektrumda antibakteriyal özelliğinin yanısıra, çok iyi biyoyumluluk göstermesi ve yüksek stabilizasyon kapasitesi gibi birçok avantaja sahiptir. Bilimsel literatürde gümüşün kullanıldığı birçok uygulama bulunmaktadır. Virusler, bakteriler, mantarlar vb. gibi çok geniş alandaki mikroorganizmalara karşı güçlü antibakteriyal özelliğiyle gümüş nanopartiküllerinin özellikleri oldukça geniş ölçüde tanımlanmıştır. Bu nedenle gümüş nanopartikülleri; yara kaplama malzemesi, doku iskelesi, deri bağıışı, hastanelerdeki materyallerin sterilizasyonu, medikal kateterler, doğum kontrol aletleri, cerrahi aletler, kemik protezleri, yapay diş ve kemik kaplama malzemeleri gibi bir çok uygulamada kullanılmaktadır [61]. Yakın zamanlarda gümüş nanopartiküller giyim ve yiyecek endüstrisinde bakteri büyümesini sınırlamak için uygulanmaktadır [62]. Literatürde gümüş nanopartikülleri ile ilgili birçok çalışma bulunmasına rağmen, gümüş katkılı HAP nano tozlarının biyoyumluluğunun ayrıntılı bir şekilde çalışılmamış olduğu görülmektedir ve hücresel ve moleküler seviyedeki toksisitesiyle ilgili ciddi bilgi eksikliği bulunmaktadır. Bu malzemelerin antibakteriyal özelliği ile ilgili yapılmış ayrıntılı ilk çalışmalardan birisi Ciobanu ve arkadaşlarının (2011) çalışmasıdır [61].

Çinko, insan vücudunda bulunan esensiyel bir elementtir ve yüzlerce biyolojik enzimin, transkripsiyon faktörünün yapısı için oldukça önemlidir. FSH (Folikül stimüle edici hormon) ve LH (Luteinize edici hormon) ile bağlantılı rolü nedeniyle üreme fonksiyonu açısından önemlidir. Çok çeşitli aktiviteleri düzenleyen çinko parmak izi proteinlerinin DNA'ya bağlanması için gereklidir. Alkol dehidrogenaz enziminin, laktik dehidrogenaz karbonik anhidraz enziminin, ribonükleazın, DNA polimerazın ve antioksidaz çinko süperoksit dismutaz enzimlerinin yapısında bulunur. Aşırı alımı kansızlığa ya da kemik oluşumunun azalmasına neden olabilir. Çinko, hücredeki biyolojik fonksiyonuna bağlı olarak hızlıca absorbe edilebildiği için bakıra göre daha az zararlıdır [63]. Çinkonun,

kemik oluşumunun desteklenmesi ve kemik rezorbsiyonunun baskılanması için esansiyel bir iz element olduğu rapor edilmiştir. Bu nedenle Zn içeren apatitin ortopedi için yararlı olabileceği düşünülmektedir [64].

Bakır insan ve hayvan dokularında bulunan diğer bir esansiyel elementtir. İnsan vücudu yaklaşık olarak 1-3 mg/kg bakır içermektedir. Bakırın adenozin trifosfat üretimi, hücrenin yaşamını devam ettirebilmesi, eritropoez ve miyelin sentezi gibi birçok fizyolojik süreçte kritik bir bileşen olduğu bilinmektedir. Ayrıca, kandan demir taşınmasını düzenleyen ferroksidaz enzim sistemi Cu içerir ve depolanan demir salınımını kolaylaştırır. Tirozinaz enzimlerinin, sitokrom C oksidazın, askorbik asit oksidazın ve antioksidant enzim çinko süperoksit dismutazın yapısal elementidir. Bakır eksikliği anemiye ve nörolojik semptomlara neden olabilir. Aşırı bakır alımı ise karaciğer bozukluklarına neden olabilir [63, 65].

#### **1.4. Adezyon Molekülleri**

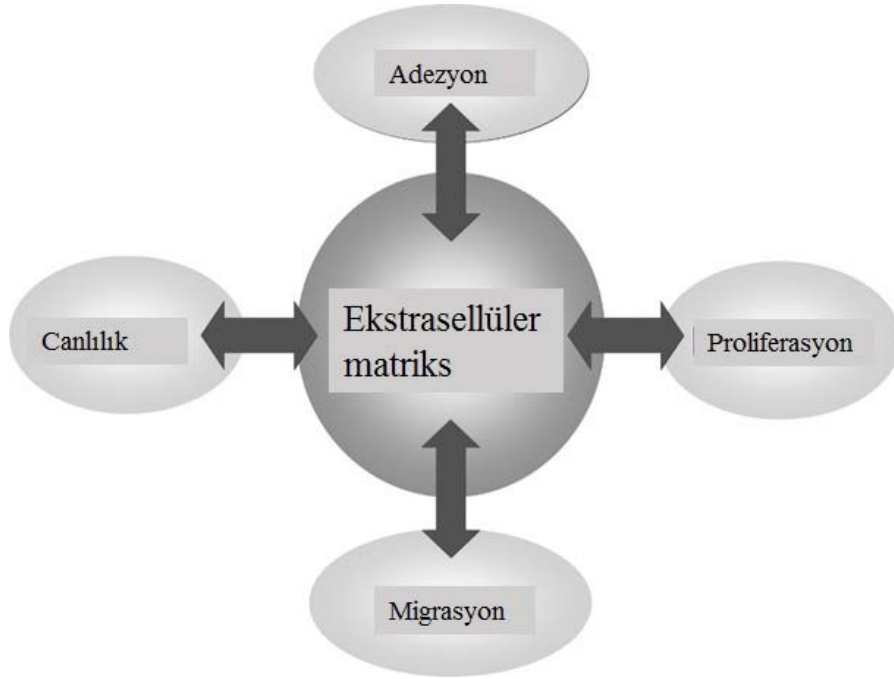
İmplantın başlangıçtaki başarısı, implant etrafındaki osteojeneze ya da diğer bir deyişle osteoblastların implant yüzeyine hızlı ve güzel bir şekilde yapışmasına bağlı olarak değişebilir [66]. Biyomalzeme mühendisliğinde implant materyallerinin hazırlanması sırasında, kök hücre kaderinin belirlenmesinde integrin sinyalizasyonu ve hücre iskeleti organizasyonu tarafından regüle edilen hücre matriks etkileşimi bir rehber olarak iş görebilir [67]. Osteoblastların implant materyaline başlangıçtaki yapışması ile ilgili şu anki bilgilerimiz hala yetersizdir [66]. Ancak hücreler malzemenin yüzeyine temas ettiklerinde hücre davranışının yüzeyin topografyası, kimyası ve enerjisine bağlı olarak değiştiği bilinmektedir. Bu hücre dışı faktörler hücre membranında spesifik reseptörlere bağlanarak bir reaksiyon başlatırlar ve bu da hücre çoğalması ve farklılaşmasını uyuracak bir takım gen ve proteinlerin ekspresyonuyla ya da inaktivasyonuyla sonuçlanır [48]. Substrat üzerindeki hücre davranışı integrin aracılı hücre iskeletine ve fokal adezyon kinaz (FAK), vinkülin ve aktin filamentler gibi sinyal transdüksiyon moleküllerine bağlı olarak açıklanabilir. FAK ve vinkülin, fokal adezyonun

sitoplazmik domainine dâhildirler ve hücre yüzeyinde bulunan integrinlerden gelen sinyalleri hücre iskeleti aktin filamentlerine iletmekten sorumludurlar. FAK fosforile olmuş bir moleküldür ve ekspresse edilmesi için ekstrasellüler matriks (ESM) ve integrinler arasında bir etkileşim olması gerekmektedir. Vinkülin, çeşitli bağlanma bölgeleri ile (talin-, paksilin,  $\alpha$ -aktinin ve aktin bağlanma bölgeleri ile) çok önemli bir yapısal bileşendir ve bu hiyerarşideki bağlantı moleküllerinden biridir. Aktin, mikrofilamentlerin yapısal bir bileşenidir ve aktin filamentler talin,  $\alpha$ -aktinin, vinkülin ya da tensin aracılığıyla integrinlere bağlanır. Mikrofilamentlerin birleşimi stres filamentlerini meydana getirir [66]. Aktin filamentler, mikrotübüller ve ara filamentler; memeli hücrelerinde hücre iskeletini oluşturan 3 ana tip protein filamentidir. Hücre iskeleti filamentlerinin oluşumu ökaryotik hücrelerde dinamik bir olaydır ve hücre iskeleti düzenlenmesi farklı fiziksel özelliklere ulaşmak için yeniden organizasyonu gerektirmektedir. Polimerize aktinler (F-aktin) iki iplikçikli sarmal aktin monomerlerinden (G aktin) oluşurlar. Kendiliğinden birleşme ve hücre iskeleti filamenlerinin dinamik yapısı hücre migrasyonu, proliferasyon ve hücre şeklinin sağlanabilmesi ve sürdürülebilmesinin kontrolüne katkıda bulunmaktadır. F-aktin ağının organizasyonu ESM'den integrin-aktin bağlantısı aracılığıyla ve kaderin-aktin kompleksi aracılığıyla hücre-hücre bağlantılarından sinyaller dağıtarak üç boyutlu hücre şeklinin sürekliliğini sağlar. F-aktinler mekanik güce karşı hassastırlar ve aktin hücre iskeleti oluşumu doku oryantasyonu, vaskülarizasyon ve kök hücre farklılaşması gibi gelişim sırasındaki morfolojik olaylar için kritik rol oynamaktadır. F-aktin, üç boyutlu hücre iskeletinin oluşmasında çok kritik bir rol oynamaktadır ve F-aktin depolimerazasyonu MKH'lerin farklılaşma yönünü değiştirmektedir [67].

Kemik ve diş implantlarının klinik başarısı, implant materyalinin hücre farklılaşması, matriks üretimi ve minerilizasyonu olduğu kadar hücre yapışmasını etkileyen özellikleriyle de yakından ilişkilidir. Hücresel proliferasyon ve farklılaşmada hücre-substrat bağlantısının önemli olduğu bilinmektedir.

İntegrin aracılıklı hücre iskeleti ve sinyal transdüksiyon moleküllerinin hiyerarşik modelinde, integrinler önce yüzeydeki ligandlarla agregat oluştururlar ve daha sonra FAK ve tensinin fokal agregasyonu ile integrin bağlanması

meydana gelir. Daha sonra, ekstrasellüler matriks tarafından integrinlerin kullanımını vinkülin,  $\alpha$ -aktinin (aktin filamentlere çapraz bağlanan, vinküline ve sitoplazmik yüzeyden integrine bağlanan bir homodimer) talinin akümülyasyonunu uyarır. Son olarak, tirozin fosforilasyonu hücre iskeleti proteinlerinin (aktin, mikrofilamentlerin yapısal bileşeni) ve sinyal moleküllerinin akümülyasyonu ile sonuçlanır. Ayrıca, aktin filamentlerin birleşmesiyle mikroskopta gözlenebilen stres filamentleri oluşur [66].



Şekil.1.6. Ekstrasellüler matriksin hücre için önemini şematik olarak gösterilmesi [68].

Gronowicz ve McCarty (1996), Saos-2 hücrelerinin bir substrata bağlandıklarında çeşitli integrin alt ünitelerinin hücre yüzeyinde görüldüğünü, fibronektin ve kollojen gibi proteinlerin adezyondan önce nasıl görüldüklerini ve sonuç olarak integrine bağlandıklarını göstermişlerdir. Bir fibronektin yüzey üzerinde büyütüldüklerinde NIH 3T3 hücrelerinde FAK bulunmuştur. Fakat süspansiyon halindeki hücrelerde FAK bulunmaz. Bu nedenle FAK, ESM ve integrinlerin etkileşimi ve ekspresyonu için gereklidir [66].

Vinkülin, integrin aracılı hücre iskeleti moleküllerinin düzenlenmesinde görev alan bağlantı moleküllerinden birisidir. Çeşitli bağlanma bölgeleri ile (talın-

, paksilin,  $\alpha$ -aktinin ve aktin bağlanma bölgeleri ile) çok önemli bir yapısal bileşendir. Gilmore ve Burridge (1996), fosfatidil-inizitol 4-fosfat-5-OH kinaz aktivasyonu ile daha sonra vinkülinin bağlanmasıyla, vinkülin baş-kuyruk ayrışması ile sonuçlanan, GTP bağlı protein Rho'nun fosfatidil-inizitol 4,5-bifosfat üretimini artıran bir model geliştirmişlerdir. Bu ayrışma, vinkülinin hem talin hem de aktin bağlanma bölgelerinde meydana gelir ve vinkülinin hem taline, hem de aktine bağlanmasıyla sonuçlanır [66].

TRITC-işaretli phalloidine ile aktin boyama, normalde hücre hareketi, yayılması ve şeklinin değerlendirilmesinde sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. Genel olarak, aktin filamentlerin stabilizasyonunda tirozin fosforilasyonu oldukça önemlidir. Fokal adezyonlar stress filamentlerinin oluşmasında görev alırlar [66].

Birçok araştırmacı hücre hareketinin ya da morfogenezinin, materyalin yüzey kimyası ya da yüzey topografisine çok güçlü bir şekilde bağlı olduğunu savunmaktadır [66]. Osteojenik hücreler de membrana çeşitli bağlanma proteinleri ile tutunurlar. Bunlardan en iyi bilineni integrinlerdir. Yukarıda anlatıldığı gibi integrinler, fibronektin, vitronektin, laminin ve kollojen gibi ekstrasellüler matris proteinlerinin ligandlarına özel bağlanma bölgeleri içerirler. İntegrin reseptörleri bu proteinlerin ligandlarına bağlanarak hücre dışı sinyalleri hücreye taşıyarak çeşitli kimyasal olayları başlatırlar. Bu mekanizmalar da hücre pH'ını ve kalsiyum konsantrasyonunu değiştirerek proteinkinaz aktivasyonunu başlatırlar. Böylece hücre içi haberleşme trafiği başlayarak hücre migrasyonu, çoğalması ve farklılaşması gerçekleşir [53].

Hücrelerin implant materyaline iyi derecede tutunması sadece kimyasal ve topografik özelliğine değil aynı zamanda da nanoboyuttaki HAP kristalleri içermesine bağlı olarak da değişiklik gösterebilir. Nanoboyuttaki HAP'in hücre adezyon molekülleriyle daha kolay etkileşim sağlaması nedeniyle hücre adezyonunu artırabilir. Serum proteinlerinin nanokompozitlere daha yüksek derecede tutunmasının hücre tutunmasını artırdığı bilinmektedir [48].

Bu nedenle bu çalışmada, değişik kimyasal ve yüzey özelliklerine sahip metal katkılı (Ag, Cu ve Zn) HAP nanokaplama malzemeler üzerinde büyütülen ve farklılaştırılan insan yağ dokusu kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin (iMKH) başlangıçtaki yüzeye yapışmaları ve daha sonraki davranışları, hücrelerin

farklılaşma seviyeleri ile vinkülin ve aktin filamentlerin hiyerarşisi ve adezyon yolağında rol alan genler temel alınarak karşılaştırılmış ve değerlendirilmiştir.

## **2. MATERYAL ve YÖNTEM**

### **2.1. Materyal**

#### **2.1.1. Cihazlar**

Soğutmalı ve yüksek devirli santrifüj (Heraus), soğutuculu masa üstü santrifüj (ependorf tüpler için, Ependorf), kuru hava sterilizatörü (Nüve), otoklav (Sanyo), derin dondurucu (-20, -86) (Liebherr, Thermo), buzdolabı (Ariston, Sanyo, Leibherr), CO<sub>2</sub> inkübatörü (Heraus), steril kabin (Heraus), sıvı azot kapları (Thermo Scientific), otomatik pipetler (Ependorf), kar-buz makinesi (Scotsman), su banyosu (Clifton), eliza cihazı (ELx808-IU/Bio-Tek, SpectraMax M2/Molecular Devices), floresan mikroskop (Olympus BX51), Inverted Mikroskop (IX71 Olympus), 12 Kanallı mikropipet (ependorf), dağıtıcı pipet (Eppendorf), kaba terazi (Velp Scientific), hassas terazi (Ohaus), damla spektrofotometre cihazı (GE Healthcare, Nanovue), rt-PCR cihazı (Corbett/Qiagen), thermal cyler cihazı (Palm Cycler), plaka çalkalayıcı (GFL), sonikatör (Sonorex Digital 10P), vortex, manyetik karıştırıcı (Ikamag), pipet tabancası (Ependorf Easypet), ph metre (Thermo Scientific Orion Star A211), Taramalı Elektron Mikroskobu (Zeiss).

#### **2.1.2. Kimyasal maddeler**

İnsan yağ dokusu kökenli mezenkimal kök hücre (American Type Culture Collection, PCS-500-011), Penisilin/Streptomisin (Gibco, 15140-122), Fungizone (Gibco, 15290-026), Growth Kit-Low Serum (ATCC, PCS-500-040), MSC Basal Medium (ATCC, PCS-500-030), FBS (HyClone, for hMSC-SH30070.03), bFGF (Sigma, F0291),  $\alpha$ -MEM Modification (HyClone, SH30568.01), MTT (Sigma, M5655), DMSO DNase-RNase free (Sigma, D8418), DMSO (Sigma, 41640) tripsin (Sigma, T4174) LDH kit (Promega, G1781), PBS tablet (Sigma, D5652), Triton-X-100 (Sigma, T8787), PicoGreen® (Molecular Probes, P7581), Dekametazon (Sigma, D8893), Askorbik asit 2-fosfat (Sigma, A8960),  $\beta$ -gliserofosfat (Sigma, G9422), Alizarin kırmızısı (Sigma, A5533), Dietanolamin



(Sigma, D8885), MgCl<sub>2</sub> (Sigma, M0250), Trizma hidroklorid (Sigma, T3253) P-nitrofenilfosfat tablet (Sigma, N2765), RNA izolasyon kiti (Qiagen RNeasy Plus RNA isolation kit, 74134), Reverse transkriptaz (rt) enzimi (Qiagen,205313), Gene özgü primerler (18SrRNA, Osteopontin) (Primer Design, HK PP HU 600), rt-PCR Ekstrasellüler matriks yolağı array (Qiagen, PAHS-013ZR RT<sup>2</sup> Profiler<sup>™</sup> PCR Array), Poli-l-lizin (Sigma, P4707), Kollojen I (Sigma, C3867), Fibronektin (Sigma, F0556), laminin-I (Sigma, L2020), BSA (Sigma, A9418), Formaldehit (Sigma, F8775), Kristal viyole (Riedel-de Hean, 32675), SDS (Sigma, L4390), Nonidet P-40 (Sigma, 74385), Tetramethylrhodamine B isothiocyanate (TRITC)-labelled phalloidin (Sigma, P1951), Tavşan serumu (Sigma, R9131), Anti-vinculin (Santa Cruz, SC73614), Flourosein-izosiyanat bağılı sekonder anti-fare (Zymed, 61-6411), DAPI (4'6-diamidino-2 fenilindol) (Sigma, D9542), Preparat kapama solüsyonu (Invitrogen, 8110 ClearMount<sup>™</sup> Mounting Solution), Antikor dilue edici solüsyon (Invitrogen-03118), Su banyosu antibakteriyel solüsyonu (Aquaresist vwr Prolabo, 462-700).

## **2.2. Yöntem**

### **2.2.1. Metal iyon katkılı kalsiyum fosfat esaslı seramik tozların üretilmesi ve kaplanması**

Metal iyon katkısı içeren seramik tozların sentezlenmesi ve yuvarlak cam lameller üzerine elektro püskürtme yöntemi ile kaplanması Anadolu Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Malzeme Bilimi ve Mühendisliği Bölümü Laboratuvarlarında Prof. Dr. Aydın DOĞAN yönetiminde Yrd. Doç. Dr. Mevlüt GÜRBÜZ ve doktora öğrencisi Ayşe Gül AKYÜREKLİ tarafından yapılmıştır.

Tez çalışmasında kullanılan tozların üretimine ve kaplanmasına ilişkin akış diyagramı Şekil.2.1.'de verilmiştir. Metal iyon katkılı kalsiyum fosfat esaslı tozlar yaş kimyasal yöntem kullanılarak üretilmiştir. Bu yönteminde ilk olarak kalsiyum hidroksit tozlar saf su içerisinde homojen olarak karıştırılmıştır. Sonrasında, metal iyonları saf suda mikser yardımıyla tamamen çözülerek ve çözeltinin içerisine eklenerek süspansiyon hazırlanmıştır. Yapının HAP yapıda olması için

ortofosforik asit (OFA) oldukça yavaş damlatılarak hem pH ayarlaması hem de malzemelerin kimyasal reaksiyona girmesi sağlanmıştır. Kalsiyum fosfat yapısına yakın bir yapı oluşturmak için pH belli bir değerde sabitleninceye kadar karıştırmaya devam edilmiş ve oluşan çözelti filtreden geçirilerek 80°C’de etüvde kurutulmuştur. Kurutulan tozlar kırııcıdan geçirilerek toz haline getirilmiştir. Tozların mikro yapı, kimyasal analizi, faz analizi ve boyutları taramalı elektron mikroskobu (SEM), enerji saçılımlı X-ışını (EDX), X-ışını difraktometresi ve tane boyut ölçüm cihazı ile yapılmıştır. Tozların kaplanması için alkol bazlı (etanol ve metanol gibi) sıvılar kullanılarak yaklaşık 20gr<sub>toz</sub>/L<sub>alkol</sub> olacak şekilde süspansiyonlar hazırlanmış ve yaklaşık 10 saat öğütülmüştür. Öğütülen tozlar basınçlı hava sprey (püskürtme) yöntemiyle cam lameller üzerine oldukça ince kaplanmıştır. Kaplama sonrasında biyolojik aktivite çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

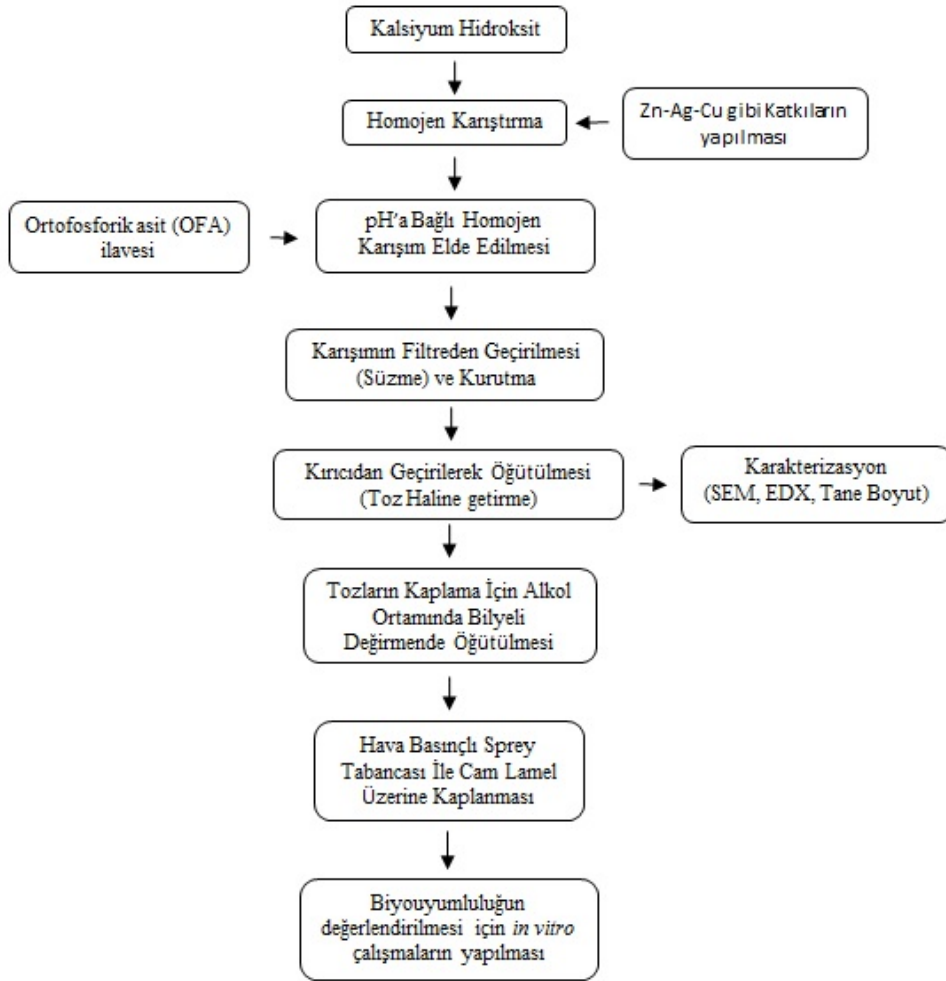
#### **Kullanılan Yöntemler;**

- ❖ Yaş kimyasal yöntemler kullanılarak metal iyon katkılı seramik toz sentezleme çalışmaları,
- ❖ Farklı boyutlarda toz üretimi için öğütme parametrelerinin belirlenmesi ve kararlı süspansiyonların elde edilmesi,
- ❖ Yüzeyle uygun kaplama tekniklerinin geliştirilmesi (Elektro püskürtme) ve kaplama çalışmaları (Elektro püskürtme yönteminde kullanılan voltaj, akış hızı, altlık elektrot arası mesafe ve kaplama süresinin optimizasyonu),
- ❖ Karakterizasyon çalışmaları (SEM, XRD, XRF, EDX vs.) ve sonuçlarına göre proses modifikasyonları,
- ❖ Tozun mikrobiyolojik testleri

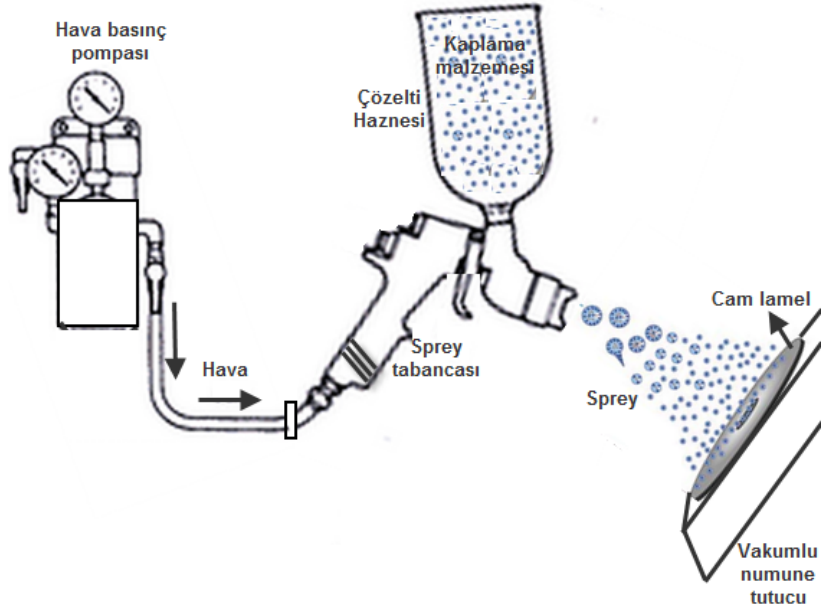
#### **İncelenen parametreler;**

- ❖ Tane boyut analizi (zeta sizer)
- ❖ Yüzey yükü ölçümü (zeta sizer)
- ❖ Kararlılık için sedimentasyon testleri
- ❖ Toz/kaplama morfolojisi ve kimyasal analizler (Elektron Mikroskopları, SEM, EDX)

- ❖ Kystal yapı ve faz analizi (XRD)
- ❖ Mikrobiyolojik testler



Şekil.2.1. Kalsiyum fosfat esaslı HAP yapılı tozların üretim ve kaplama akış planı



Şekil.2.2. Cam lamellerin kaplanması için kullanılan sistemin kurulum şeması.

### 2.2.2. Biyolojik aktivite çalışmaları

1306F197 Numaralı teşvik projesi kapsamında 2 vial “İnsan yağ dokusu kaynaklı mezenkimal kök hücre (Human adiposed derived mesenchymal stem cell) (iMKH)” ve yetiştirilebilmesi için gerekli büyüme faktörlerini içeren kit ile medyumundan satın alınmış ve hücreler büyüme faktörleri ilave edilen medyumda büyütülerek deney için yeterli sayı elde edilene kadar beklenmiştir. Pasaj 4’e gelen hücreler;

- ❖ Lamel (Kontrol)
- ❖ Kollojen kaplı lamel (Kontrol)
- ❖ HAP-Ticari
- ❖ HAP-Ag
- ❖ HAP-ZAg
- ❖ HAP-ZAgCu

malzemeleri ile kaplanmış lamellere ekilerek MTT testi ile sitotoksosite ölçümü, LDH aktivite ölçümü, DNA miktar tayini, alizarin kırmızısı ile mikroskobik olarak osteoblast farklılaşması tayini, alkalen fosfataz enzim miktar tayini, hücre adezyon deneyi, immunofloresan boyama (vinkülin ve f-actin), osteopontin ve adezyon yolağında yer alan 86 adet genin mRNA seviyelerinin rt-PCR ile tespit edilmesi için deneye alınmıştır. Hücreler ekilmeden önce kullanılacak olan nano malzeme ile kaplanmış yüzeyler plakalara yerleştirilerek etilen dioksit ile steril edilmiştir.

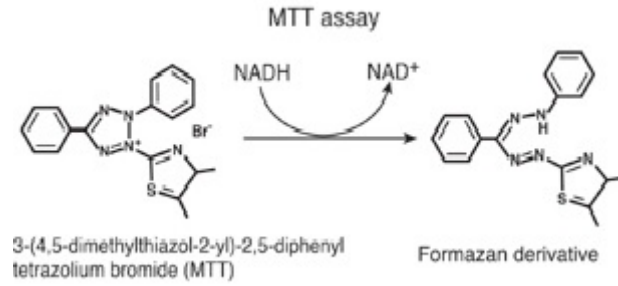
### **2.2.3. Hücrelerin kültür ortamında büyütülmesi**

Çalışmada kullanılan iMKH'ler ATCC (American Type Culture Collection) hücre bankasından 1306F197 No'lu teşvik projesi kapsamında satın alınmıştır. Hücreler, bankanın önerisi doğrultusunda ikinci kez pasajlanma zamanına kadar %1 Penisilin/Streptomisin, % 0.5 Fungizone, ATCC Growth Kit-Low Serum (%2) içeren ATCC MSC Basal Medium içerisinde %95'lik hava ve %5 CO<sub>2</sub>'li gaz ortamında, 37 °C'deki CO<sub>2</sub> inkübatöründe kültüre edilmiştir. Daha sonra inaktive edilmemiş %10 FBS, %1 Penisilin/Streptomisin, %0,5 Fungizone ve 5 ng/ml bFGF içeren  $\alpha$ -MEM Modification medyum içerisinde pasaj 4'e kadar büyütülmüşler ve yeterli sayıya erişen hücreler deneye alınmışlardır. Her 3-4 günde bir medyum, taze medyum ile değiştirilmiştir.

### **2.2.4. MTT testi**

Test maddelerinin sitotoksitesinin belirlenmesinde MTT testi uygulanmıştır. Genellikle hücre canlılığını ölçmek için kullanılan bir tarama yöntemi olan MTT deneyi, ilk kez yaklaşık 30 yıl önce Mosmann tarafından tanımlanmıştır [69]. Direk ve hızlı bir şekilde başlıca mitokondrilerde bulunan dehidrogenazların (süksinat dehidrogenaz) aktivitesini ölçer. Sarı renkli suda çözünebilen tetrazolium tuzunun (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-

diphenyltetrazolium bromide (MTT)) mor renkli çözünmeyen formazon tuzuna dönüşümüne dayalı, hızlı ve hassas kalorimetrik bir testtir. Tetrazoliumun formazona dönüşüm ürünleri NADP ve NADPH'ın indirgenmesi ile oluşur. NADH dehidrogenazlar primer olarak solunum siklusunun enerji üretim reaksiyonunda (glikoliz, TCA siklusu ve oksidatif fosforilasyon) görev alırlar. NADPH dehidrogenaz ise primer olarak biyosentezdeki indirgeyici reaksiyonda görev alır. MTT yönteminde canlı hücrelerin mitokondrial dehidrogenazı tetrazolium halkasını böler ve MTT sitotoksite yöntemi hücrenin, tetrazolium tuzunu formazon ürününe çevirebilme yeteneğini ölçer. Hücrenin canlılığı (metabolik aktivitesi) kaybolduğu zaman mitokondrial fonksiyon azalır ve sonuç olarak tetrazolium tuzunun formazon ürününe çevirebilme yeteneği azalır. Formazon miktarı birçok hücre hattında hücre sayısı ile orantılı olarak oluşur. Bu nedenle MTT testi hücre canlılığının ve çoğalmasının ölçülmesinde kullanılır [70, 71].



**Şekil.2.3.** MTT deneyi sırasında gerçekleşen reaksiyon [72].

İnsan mezenkimal kök hücreleri (iMKH), Thoma lamı ile sayılarak 24 kuyucuklu plakalara  $4 \times 10^4$  hücre/kuyu olacak şekilde, 8 paralel olarak ekilmiştir. Her üç günde bir medyum taze medyum ile değiştirilmiştir. 1. gün, 7. gün, 21. gün ve 28. günlerde besiyerleri uzaklaştırılarak, MTT ilavesi yapılarak test maddelerinin hücre çoğalmasına olan etkileri saptanmıştır. Hücreler  $5 \text{ ml}^{-1}$  MTT stok çözeltisi ile 2 saat  $\text{CO}_2$  inkübatöründe inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre sonunda MTT içeren besiyerleri kuyucuklardan uzaklaştırılmış ve her kuyucuğa 1000  $\mu\text{l}$  DMSO ilave edilip, 5 dakika beklendikten sonra plakalardaki hücrelerin

optik dansiteleri ELISA cihazında 570 nm. dalga boyunda okutulmuştur. Hücre ekilmemiş kuyucuklar blank olarak kullanılmıştır. Deneyler 3'er kez tekrar edilmiştir.

### 2.2.5. LDH testi

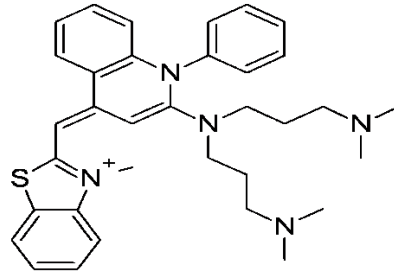
Kullanılan yüzeylerin MKH canlılığı üzerindeki etkilerinin belirlenmesinde ikinci bir analiz olarak LDH testi uygulanmıştır. Laktat Dehidrogenaz Testi (LDH testi) bir protein deneyidir [73]. Kültür hücrelerinde LDH enzimi iki yolla ölçülebilir; birinci yolda hücreler tarafından kullanılan medyumdaki laktat dehidrogenaz ölçümü yapılabilir, ikinci bir yol ise kültür hücrelerinin liziz edilerek hücre içerisindeki laktat dehidrogenaz enziminin ölçülmesidir. Güvenilirliği, hızı ve basit olması bu testin özellikleridir. Hücre içi LDH kaybı ilerleyen aşamalarda hücre membranında meydana gelen hasara bağlı olarak hücre ölümünün bir belirtecidir. Laktat dehidrogenaz, laktik asiti NAD<sup>+</sup> varlığından pirüvik asite dönüştüren enzimdir. Laktik asit hücre bütünlüğünün bozulması ile ortaya çıkar. Yani kültüre edilmiş hücrelerin ölümü ile hücre membran bütünlüğü bozulur ve sitoplazma içeriği dışarı çıkar.

LDH testi Bernhardt ve ark.'nın (2010) kullandığı metod ve kit protokolü (Promega, G1781) takip edilerek uygulanmıştır [74]. 24'lük plakalarda,  $4 \times 10^4$  hücre/kuyu olacak şekilde, 8 paralel olarak, 7 gün, 21 gün ve 28 gün inkübe edilen hücrelerin üzerinden besiyerleri uzaklaştırılmış ve bir kez PBS solüsyonu ile yıkanan hücreler -80°C' dondurucuya kaldırılmıştır. 28 günlük inkübasyonun ardından derin dondurucudan çıkartılan hücreler 20 dakika buz üzerinde çözümleri için bekletilmiştir. Kit içerisinde bulunan liziz solüsyonunun her kuyucuğa eklenmesinin ardından plakalar içerisinde buz bulunan sonikatör içerisine yerleştirilerek yaklaşık 50 dakika sonikasyon banyosuna bırakılmıştır ve daha sonra lizatlar pipetlenerek tüp içerisine toplanmıştır. Daha sonra her örnek için 96'lük plakalara 50 µl hücre lizatı ve 50 µl sübstrat eklenerek çalkalayıcı üzerinde, karanlık ortamda, oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edilmiştir. 30 dakika sonunda 50 µl stop solüsyon eklenerek LDH ölçümü ELISA cihazında 490

nm filtre kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Her örneğin ölçümü için en az iki kuyucuk kullanılmış ve deneyler 3'er kez tekrar edilmiştir. Verilerin analizinde elde edilen tüm sonuçların ortalamaları karşılaştırılmalı olarak değerlendirilmiştir. Elde edilen verilerin anlamlılıkları TTest uygulanarak belirlenmiştir. Anlamlılık değeri olarak  $p < 0.05$  kabul edilmiştir.

### 2.2.6. Picogreen boya ile hücrelerdeki DNA miktarının belirlenmesi

Picogreen çift iplikli DNA miktarının belirlenmesi amacı ile kullanılan ultra hassas fluoresan bir boyadır. Küçük miktarlardaki DNA miktarlarının belirlenmesi ve ölçülmesinde oldukça etkilidir. İlaç ve etken madde araştırmaları sırasında hücrelerdeki DNA miktarlarındaki değişikliğin ölçülmesinde kullanılan temel moleküler yöntemlerden biridir. Nükleik asit miktarı, 96'lık plakalarda 485-535 nm dalga boyundaki absorbans ölçülmektedir. En önemli avantajı çok küçük miktarlardaki örneklerden bile çok hassas sonuçlar elde edilebilmesidir [74, 75].



Şekil.2.4.PicoGreen boyasının topolojik formülü [76].

DNA miktar tayin deneyi Bernhardt ve ark.'nın (2010) kullandığı metoda göre yapılmıştır [74]. LDH testinde olduğu gibi, 24'lük plakalarda,  $4 \times 10^4$  hücre/kuyu olacak şekilde, 8 paralel olarak, 1 gün, 7 gün, 21 gün ve 28 gün inkübe edilen hücrelerin üzerinden besiyerleri uzaklaştırılmış ve bir kez PBS solisyonu ile yıkanan hücreler  $-80^\circ\text{C}$ ' dondurucuya kaldırılmıştır. 28. günlük inkübasyonun ardından derin dondurucudan çıkartılan hücreler 20 dakika buz üzerinde çözümleri için bekletilmiştir. %1 liziz solisyonun (%1 Triton-X-100



içeren PBS solisyonu) her kuyucuğa eklenmesinin ardından plakalar içerisinde buz bulunan sonikatöre yerleştirilerek yaklaşık 50 dakika sonikasyon banyosuna bırakılmıştır ve daha sonra lizatlar pipetlenerek tüp içerisine toplanmıştır. Daha sonra her örnek için 96'lık plakalara 10 µl hücre lizatı ve 1:800 oranda TE Buffer (Tris EDTA) ile sulandırılmış PicoGreen® (Molecular Probes, P7581) boyadan 190 µl eklenerek 5 çalkalayıcı üzerinde inkübe edilmiş (karanlık ortamda) ve floresan okuma yapabilen ELISA cihazında 485/535 nm filtre kullanılarak ölçüm gerçekleştirilmiştir. Her örneğin ölçümü için en az iki kuyucuk kullanılmış ve deneyler 3'er kez tekrar edilmiştir. Hücre sayısı kalibrasyon eğrisi olarak kullanılan belli hücre sayısındaki kontrol kuyucuklarında bulunan DNA içeriğine göre hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçların istatistiksel değerlendirmeleri Microsoft Office Excell kullanılmıştır. Verilerin analizinde elde edilen tüm sonuçların ortalamaları karşılaştırılmalı olarak değerlendirilmiştir. Elde edilen verilerin anlamlılıkları TTest uygulanarak belirlenmiştir. Anlamlılık değeri olarak  $p < 0.05$  kabul edilmiştir.

#### **2.2.7. Kültür ortamındaki MKH'lerde osteojenik farklılaşmanın uyarılması**

Kültüre edilmiş hücrelerin farklılaştırılması için Bernhardt ve ark.'nın (2010) kullandığı yöntem uygulanmıştır [74]. Hücreler %10 FBS,  $10^{-8}$  M deksametazon, 0,05 mM askorbik asit 2-fosfat, 10 mM  $\beta$ -gliserofosfat içeren farklılaşma kokteyli varlığında kültüre edilmişlerdir. Medyum her 3-4 günde bir yenilenmiştir. 1, 7, 21, ve 28 günler sonunda örnekler sonraki biyokimyasal analizler için dondurulmuş ya da boyamalar için fikse edilmiştir.

### **2.2.8. Osteojenik farklılaşmanın alizarin kırmızı boyama ile saptanması**

Osteoblast hücrelerinin farklılaşması ve kalsiyum birikim metabolizması üzerine olan etkileri alizarin kırmızısı (AK) boyama ile mikroskopik olarak tespit edilmiştir. Bu amaçla farklılaşması uyarılmış olan hücreler 28. günün sonunda 24 kuyucuklu plakalardaki hücreler üzerinden medyum dikkatli bir şekilde uzaklaştırılarak, hücreler % 70'lik soğuk etanol ile oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilmiş, süre sonunda alkol dikkatlice uzaklaştırılmış, 2 kez 5 dk distile su ile yıkanmıştır. Ardından su uzaklaştırılıp hücreleri kaplayacak şekilde % 0,1' lik AK eklenerek 30 dk inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra AK'sı alınıp 4 defa distile su ile yıkanarak mikroskop altında incelenmiştir [77]. Deneyle 3'er kez tekrar edilmiştir.

### **2.2.9. Osteojenik farklılaşmanın alkalen fosfataz enzimi ile biyokimyasal tespiti**

Kültüre edilmiş hücrelerde osteojenik farklılaşmanın biyokimyasal olarak ölçümü için alkalen fosfataz enzim miktar tayin testi kullanılmış ve ALP enzimi Bernhardt ve ark.'nın (2010) yöntemine göre ölçülmüştür [74]. LDH ve Picogreen deneylerinde olduğu gibi, 24'lük plakalarda,  $4 \times 10^4$  hücre/kuyu olacak şekilde, 8 paralel olarak, 7 gün, 21 gün ve 28 gün inkübe edilen hücrelerin üzerinden besiyerleri uzaklaştırılmış ve bir kez PBS solüsyonu ile yıkanan hücreler  $-80^{\circ}\text{C}$  dondurucuya kaldırılmıştır. 28 günlük inkübasyonun ardından derin dondurucudan çıkartılan hücreler 20 dakika buz üzerinde çözünmeleri için bekletilmiştir. %1 lizis solüsyonun (%1 Triton-X-100 içeren PBS solüsyonu) her kuyucuğa eklenmesinin ardından plakalar içerisinde buz bulunan sonikatöre yerleştirilerek yaklaşık 50 dakika sonikasyon banyosuna bırakılmıştır ve daha sonra lizatlar pipetlenerek tüp içerisine toplanmıştır. Daha sonra her örnek için 96'lık plakalara 20 µl hücre lizatı eklenmiş ve 100 µl ALP substrat solüsyon (20 ml ALP substrat buffer (0,1 M dietanolamin, %1 triton-X-100, 1mM MgCl<sub>2</sub>, ph

9,8) içerisinde çözülmüş 1 adet p-nitrofenilfosfat tablet) eklendikten sonra hızlıca çalkalandıktan sonra 30 dakika 37 °C’de ALP enziminin pNpp’yi paranitrofenole dönüştürmesi için beklenmiştir. Her örneğin ölçümü için en az iki kuyucuk kullanılmış ve deneyler 3’er kez tekrar edilmiştir. 30 dakika sonra reaksiyonu durdurmak için 80 µl 1N NaOH eklenerek reaksiyon durdurulmuş ve yine kısaca çalkandıktan sonra 405 nm dalga boyunda ölçüm gerçekleştirilmiştir. Hücre sayısı kalibrasyon eğrisi olarak kullanılan belli hücre sayısındaki kontrol kuyucuklarında bulunan DNA içeriğine göre, ALP aktivitesi ise DNA miktarına bağlı olarak belirlenen hücre sayısına bağlı olarak hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçların istatistiksel değerlendirmeleri Microsoft Office Excell kullanılmıştır. Verilerin analizinde elde edilen tüm sonuçların ortalamaları karşılaştırılmalı olarak değerlendirilmiştir. Elde edilen verilerin anlamlılıkları TTest uygulanarak belirlenmiştir. Anlamlılık değeri olarak  $p < 0.05$  kabul edilmiştir.

#### **2.2.10. Osteopontin mRNA seviyesindeki değişimin moleküler olarak saptanması**

“Real time PCR” floresan boyalar kullanılarak gerçek zamanlı olarak DNA’ların belirlenmesi ve miktarının gösterilmesi tekniğidir. Metabolik hastalıkların tedavilerinde uygun ilaçların seçimi için yapılan çalışmalarda yaygın olarak kullanılan yöntemlerle karşılaştırıldığında, sonuçların uygulanan diğer yöntemlerle uyumluluğunun moleküler düzeyde belirlenmesi, elde edilen verilerin hızla değerlendirilmesi ve hastalara bir tedavi olarak sunulması açısından oldukça önemlidir. Bu açıdan Real-time PCR oldukça hassas, çok karmaşık olan genetik bilginin yorumlanmasına olanak sağlayan bir yöntemdir. Özellikle normalizasyon için uygun bir internal kontrol seçimi ekspresse edilen genetik bilginin yorumlanmasında oldukça önemlidir [78]. rt-PCR, yüksek hassasiyeti nedeniyle değişik hücre hatlarında, dokularda, proliferatif durumlarda, tedavilerde, kanserli dokuların ilerleme derecelerinin araştırılmasına kadar çok değişik durumlarda kullanılmaktadır [79]. Floresan boya miktarının ölçümü esasına dayanan bu deneylerde belli bir diziyeye bağlı kalmadan tüm çift iplikli DNA molekülüne

bağlanan floresan boyalar ya da belirlenmiş bir PCR ürünü üzerindeki spesifik bir diziye bağlanabilen oligonükleotit hibridizasyon problemleri kullanılabilir. Dizi spesifik floresan problemler, oldukça yüksek hassasiyete sahip floresanlar ile işaretli dizi spesifik problemlerdir. Reaksiyon içerisinde sadece spesifik hedef mevcut ise floresan artışı gözlenir. Bu reaksiyonlarda ürünün belirlenmesi için “melting curve” analizine genellikle ihtiyaç duyulmaz. Bu hassas dizi spesifikliğinden dolayı primer dimerleri gibi ürünlere bağlı ekstra görüntüler elde edilmeyecektir.

Bu çalışmada Osteopontin mRNA seviyesinin ölçülmesi sırasında her bir hücre grubundan standart yöntemle total RNA izolasyonu yapılmıştır. RNA'lar daha önceki deney sonuçları göz önünde bulundurularak farklılaşma medyumunu içermeyen (OS-) medyumda cam lamel (kontrol), kollojen (kontrol), poli-l-lizin (kontrol), HAP-Ticari, HAP-Ag, HAP-ZAg ve HAP-ZAgCu ile kaplanmış yüzeyler üzerinde 14 gün boyunca büyütülen MKH'lerden elde edilmiştir. Gen ekspresyonu ve durağanlığı 18S r-RNA geninin ekspresyon seviyesiyle karşılaştırılmıştır. mRNAların elde edilmesinde Qiagen RNeasy Plus RNA izolasyon kiti kullanılmış ve kit protokolü takip edilmiştir. Elde edilen RNA'dan reverse transkriptaz (rt) enzimi kullanılarak cDNA sentezlenmiştir. Her örnekten 1 µg RNA kullanılarak cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. Genlere özgü olarak seçilen primerlerle, hücre örneklerinden elde edilen cDNA'lar amplifiye edilmiş ve referans gene oranlanarak relatif olarak miktarları saptanmıştır. Real-Time PCR deneyleri planlanırken, DNA'ya özgül bağlanan primer problemlerin kullanılmasına karar verilmiş ve primerler “non-specific” bağlanmayı engelleyecek şekilde dizayn edilmiştir. Deneylerde kullanılan primer dizileri şu şekildedir;

Osteopontin: Reverse 5'-GAGGTGATAGTGTGGTTTATGGA-3',

Forward 5'-TGATGTCCTCGTCTGTAGCA-3',

18SrRNA: Reverse 5' TCCTTGGATGTGGTAGCCG-3',

Forward 5'ATCAACTTTCGATGGTAGTCG-3'

Deney sonuçlarının analizi sırasında rölatif miktar tayini yapılmıştır. Rölatif miktar tayini hedefin konsantrasyonunun belli bir referansın konsantrasyonuna oranı olarak ifade edilir. Bu metot ile hedef ve referans genin konsantrasyonlarını belirleyebilmek için her ikisine ait standart eğrilerin kullanımına ihtiyaç duyulur. Çalışmamızda real time PCR sonuçlarımızı yorumlarken, hedef genlerimizin konsantrasyon değerini referans genin konsantrasyon değerine oranlayarak elde ettiğimiz sonuçların kontrol grubuna göre ne kadar değiştiği incelenmiştir.

### **RNA izolasyonu**

1. Kaplanmış malzemelerin bulunduğu lamellerin üzerine ekilen iMKH'ler, 24 saat hücrelerin yapışması için inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra osteojenik farklılaşma faktörleri içeren ve içermeyen medyumda 14 gün boyunca farklılaşma için bekletilmişlerdir.

2. 14. günün sonunda hücreler, PBS solisyonu, PBS-EDTA solisyonu, tripsin yardımı ile santrifüj tüpüne toplanmış, 1250 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiş, süpernatant uzaklaştırılmıştır.

3. Hücrelerin üzerine Buffer RTL plus + Beta merkaptotanol karışımı konarak yavaş yavaş pipetlenmiş ve genomik DNA'yı tutan kolonlara konularak 10 000 rpm'de 1,5 dakika santrifüj edilmiştir. Böylece genomik DNA kolonda kalır.

4. Alttaki genomik DNA'nın bulunmadığı lizatın üzerine 350 µl %70'lik etanol ekleyerek pipetlenmiş ve pembe renkli kolonlara konarak 10 000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiştir.

5. Altta kalan sıvı atılarak kolona 700 µl RW1 eklenmiş, 15 sn 10 000 rpm de santrifüj edilmiş ve sıvı yine dökülmüştür.

6. Pembe kolonların üzerine 500 µl Buffer RPE konulmuş, 14 000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiştir.

7. Daha sonra pembe kolonlar yeni bir toplama tüpünün üzerine koyularak Aynı işlem tekrarlanarak 14 000 rpm'de 3 dakika santrifüj edilmiştir.

8. Kolon yeni bir toplama tüpüne koyulur, hiçbir Őey eklemeyen kuruması için 14 000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiştir.

9. Kolon yeni temiz ependorf tüpü içerisine yerleŐtirildikten sonra üzerine 40 l RNase Free Water tam orta kısıma gelecek Şekilde dikkatlice eklenmiş ve 10 000 rpm'de 1,5 dakika santrifüj edilmiştir.

10. Üstteki kolon atılarak, altta kalan RNA'lar nano dropta ölçülmüş ve real time PCR için işlem yapılına kadar -80 C'de saklanmıŐtır.

#### **RNA konsantrasyonunun hesaplanması**

RNA'nın miktarı ve saflığını belirlemek amacıyla izole edilen RNA nanodrop cihazında ölçülmüş 1 ngr DNA ya ulaŐacak Şekilde DNase, RNase free su ile dilue edilmiştir.

#### **cDNA sentezi**

cDNA sentezi için, toplam hacim 20  l olacak Şekilde reaksiyon hazırlanmış ve cDNA sentez iŐlemi palm cyclers cihazında yapılmıştır.

**Çizelge.2.1.** cDNA sentezi için kullanılan karışım içeriği

<i><b>Karışım</b></i>	<i><b>Miktar( �l )</b></i>
Quantiscript reverse transcriptase	1
Quantiscript reverse transcriptase Buffer	4
Reverse transcriptase primer mix	1
RNA	14
<b>Toplam</b>	<b>20</b>

**Çizelge.2.2.** rt-PCR için miks içeriği.

<i><b>Karışım</b></i>	<i><b>Miktar( �l )</b></i>
Primer prob	10
Master Mix	1
RNase Free Water	4
cDNA	5
<b>Toplam</b>	<b>20</b>

Elde edilen sonuçların istatistiksel değerlendirmeleri Microsoft Office Excell kullanılmıştır. Verilerin analizinde elde edilen tüm sonuçların ortalamaları karşılaştırılmalı olarak değerlendirilmiştir.

### **2.2.11. Hücre adezyon deneyi**

Adezyon deneyi Ozeki ve ark. tarafından (2006) tarafından belirtildiği gibi yapılmıştır. Deney için, 24 kuyucuklu plakalar 1 gece +4 derecede belirli konsantrasyonlardaki poli-l-lizin ve kollojen I (%0.01), fibronektin (20 µg/ml) ve laminin-I (10-12 µg/ml) hücre adezyon molekülleri ve ekstraselüler matriks proteinleri ile kaplanmıştır. Plakalar %0.1 BSA (Bovin serum albumin) içeren medyum ile 60 dk non-spesifik adezyonu engellemek amacıyla CO<sub>2</sub> inkübatöründe bekletilmiştir. Ardından 4x10<sup>5</sup> hücre/ml oranında hücre içeren medyum 24'lü plakaya ekilerek ve 30-40 dk inkübe edilmiştir. Yapışmamış hücreler çalkalayıcı ile çalkalandıktan sonra %0,1 BSA içeren medyum ile yıkanarak uzaklaştırılmıştır. Substrata bağlanmış hücrelerin sayısını belirlemek için %1'lik formaldehitte fikse edilen hücreler %1 kristal viyole solüsyonu ile boyanarak, %2 SDS ile çözünür hale getirildikten sonra 562 nm dalga boyunda eliza cihazında okutulmuştur. Elde edilen sonuçların istatistiksel değerlendirmeleri Microsoft Office Excell kullanılmıştır. Verilerin analizinde elde edilen tüm sonuçların ortalamaları karşılaştırılmalı olarak değerlendirilmiştir. Elde edilen verilerin anlamlılıkları TTest uygulanarak belirlenmiştir. Anlamlılık değeri olarak  $p < 0.05$  kabul edilmiştir. Pozitif kontrol olarak poly-L-lisin ile kaplanmış lamel kullanılmıştır.

### **2.2.12. İmmunofloresan boyama**

Hücrelerin biyomalzemeler ile kaplanmış lameller üzerindeki adezyon yeteneğindeki değişimin tespit edilebilmesi için hücreler ayrıca F-aktin ve vinkulin spesifik antibodi ile immun flouresan işaretleme yapılarak analiz

edilmiştir. İmmun işaretleme için; hücreler %3,7 formaldehit ile 10 dk oda sıcaklığında fikse edilmiş, %0,02 BSA ile 3 kere 5'er dakika yıkanmış ve %1 Nonidet P-40 ile 10 dk muamele edilen hücrelerin membranı parçalanmıştır. Bunun ardından spesifik olmayan antikor bağlanmalarını engellemek için %0,02 BSA ile 10 dk bekletilmiştir. Daha sonra hücreler F-actin boyama için 1 saat 5 mg/ml tetramethylrhodamine B isothiocyanate (TRITC)-labelled phalloidin ile boyanmıştır. 3 kez %0,02 BSA ile yıkamanın ardından hücreler 1 saat 37 °C'de tavşan serumu (1:10) ile inkübe edilmiştir. Hücreler daha sonra anti-vinculin (1:30) ile 1 saat 37 °C'de muamele edilmiş ve 3 kez %1 BSA ile yıkandıktan sonra flourosein-izosiyanat bağlı sekonder anti-fare (1:50) ve 1 mg/ml DAPI (4'6-diamidino-2 fenilindol) ile 1 saat 37 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. Boyanan hücreler Olympus BX50 U-UHK floresan ataçmanlı mikroskopta gözlenmiştir.

### **2.2.13. Hücre adezyonunun taramalı elektron mikroskopunda (SEM) incelenmesi**

Yüzeyler üzerine ekilen hücreler 24 saat sonra PBS solisyonu ile yıkanarak %5 gluteraldehit ile 30 dk +4 °C'de fikse edilmiştir. Daha sonra örnekler kurutma amacı ile (Suyun uzaklaştırılması) sırasıyla 10'ar dakika %10, %30, %50, %70, %96 ve %99,9'luk alkol serisinden geçirilmiş ve kurumaya bırakılmıştır. Elektron mikroskobu görüntüsü alınmadan hemen önce altın-paladyum ile kaplanmıştır (25 mA-1 dk).

### **2.2.14. rt-PCR-array ile farklı yüzeylerde büyütülen hücrelerde adezyon ile ilgili genlerin mRNA düzeylerinin tespit edilmesi**

Real-Time PCR sistemleri, reaksiyondaki PCR ürünü miktarı ile sistem içerisinde kullanılan belirleyici bir floresan boyadan alınan boya miktarı arasındaki orantı esasına dayalı olarak çalışmaktadır. Floresan boya miktarının ölçümü esasına dayanan bu sistemlerde belli bir diziye bağlı kalmadan tüm çift



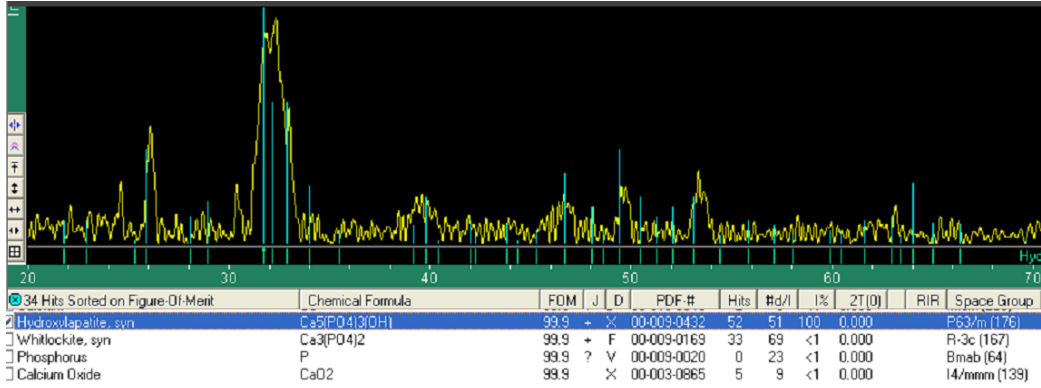
iplikli DNA molekülüne bağlanan flörasan boyalar ya da belirlenmiş bir PCR ürünü üzerindeki spesifik bir diziye bağlanabilen oligonükleotit hibridizasyon problemleri kullanılır. Dizi spesifik olmayan floresan boyalar çift iplikli DNA'nın tamamına bağlanabilme özelliği taşıyan etidyum bromid benzeri boyalardır. Real-Time PCR sistemlerinde kullanılan boya SYBR Green I'dir. SYBR Green I, onun emisyon özelliğini önemli ölçüde arttıran bir solüsyon içerisinde bulunduğu DNA molekülüne bağlanır. PCR boyunca amplifiye olan ürün miktarı ile doğru orantılı olarak SYBR Green I'in sinyali artacaktır.

Her bir hücre grubundan standart yöntemle total RNA izolasyonu yapılmıştır. mRNA'ların elde edilmesinde Qiagen RNeasy RNA izolasyon kiti kullanılmış ve kit protokolü takip edilmiştir. Elde edilen RNA'dan reverse transkriptaz (rt) enzimi kullanılarak cDNA sentezlenmiştir. Her örnekten 1 µg RNA kullanılarak cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. Genlere özgü olarak seçilen primerlerle, hücre örneklerinden elde edilen cDNA'lar amplifiye edilmiş ve referans gene oranlanarak relatif olarak miktarları saptanmıştır. Real-Time PCR deneyleri planlanırken, DNA'ya özgül olmadan bağlanan SYBR Green boyası kullanılmasına karar verilmiş ve primerler "non-specific" bağlanmayı engelleyecek şekilde dizayn edilmiştir. PCR-arrayde kullanılacak olan genler hücre adezyonunda rol oynayan 84 adet genlerdir. Bu genler hazır olarak 96 lık plaka halinde satın alınmıştır.

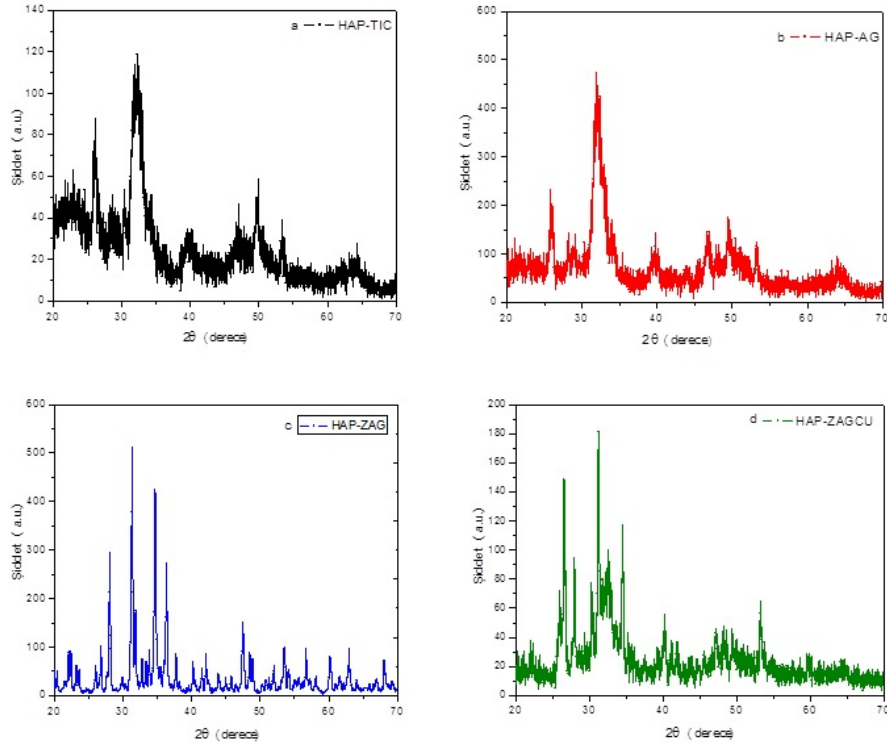
### 3. BULGULAR

#### 3.1. Metal İyon Katkılı Nanoseramik Tozların Karakterizasyonu

Şekil 3.1.1’de HAP’a ait XRD örgü desenleri şablon olarak verilmiştir. Şekilde mavi çubuklar HAP’a ait piklerin yerlerini vermektedir. İki-teta 30-35° arasındaki desenler HAP’ın esas difraksiyonudur. Şekil.3.1.2/a-d de ise çalışmada kullanılan sentezlenmiş tozların XRD örgü desenleri verilmiştir. Yapılan analizlerden görüldüğü üzere özellikle esas difraksiyon aralığına bakıldığında üretilen tozların tamamının HAP yapıda olduğu görülmektedir. Şekil.3.1.2/a-b-d’de ki toz XRD’leri tozlara ısıtma işlem uygulanmadığı için sentez sonrası daha karmaşık (gürültülü) paternler vermiştir. Ayrıca bazı kompozisyonlar için az miktarda tanımlanamayan fazlarda bulunmaktadır. Şekil.3.1.2/c’de ise üretim sonrası ısıtma işlem gerektirdiğinden kristallenme artacağından daha düzgün XRD örgü deseni elde edilmiştir.

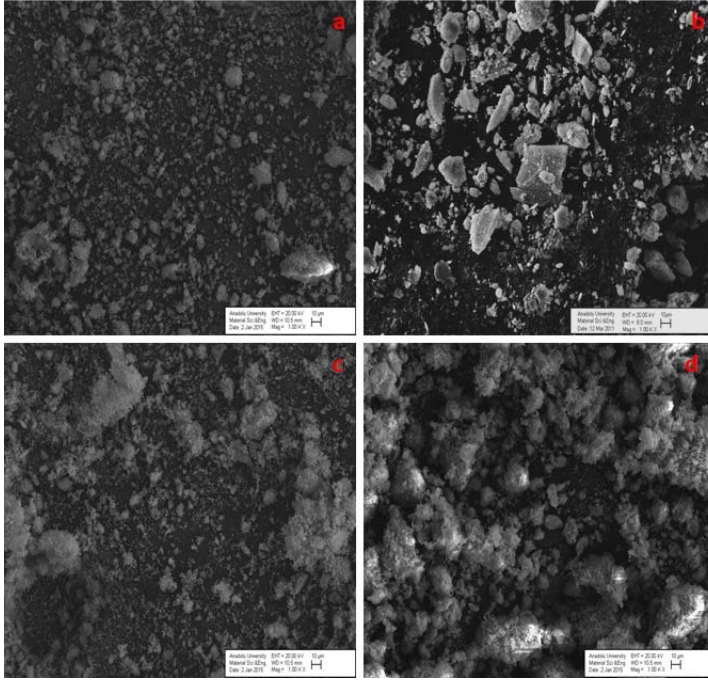


Şekil.3.1.1. HAP pikine ait XRD örgü desenleri

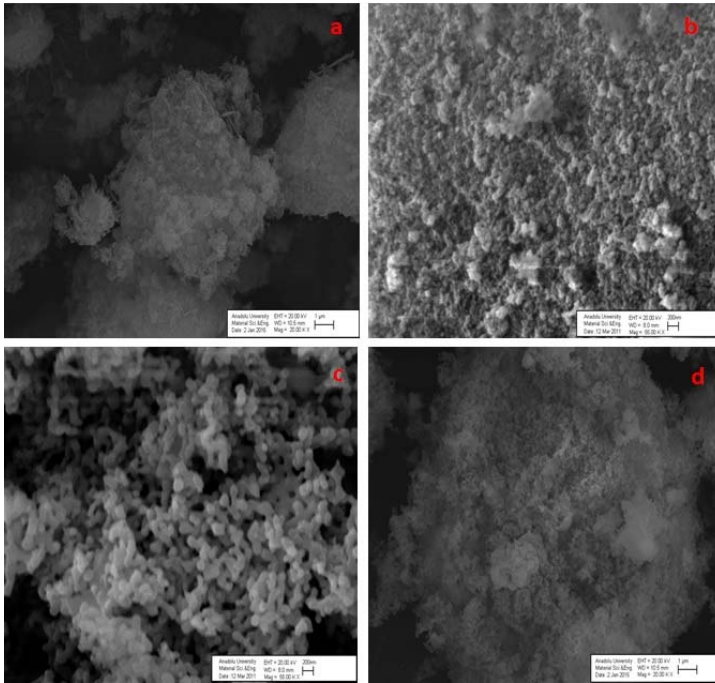


**Şekil.3.1.2.** Üretilen tozların XRD örgü desenleri: a) HAP-Tic, b) HAP Ag, c) HAP-ZAg, d) HAP-ZAgCu

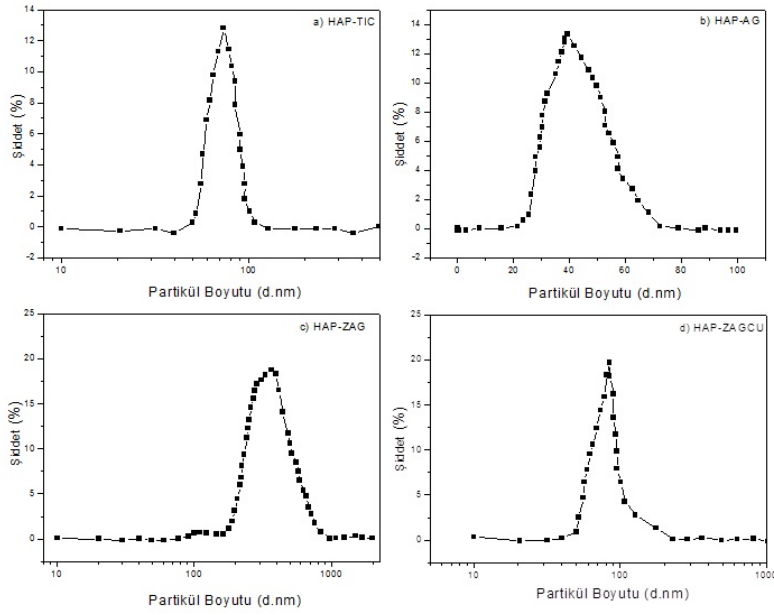
Şekil.3.1.3 ve Şekil.3.1.4'de ise üretilen tozların düşük ve yüksek büyütmedeki taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizleri verilmiştir. Şekil.3.1.3/a-d'de üretim sonrası tozların görüntülerine bakıldığında tozların kurutmadan dolayı topaklandığı görülmektedir. Şekil.3.1.4/a-d'de ise yüksek büyütmelerde tozların birincil boyutları net bir şekilde görülmektedir. Şekil.3.1.3/a-b-d için üretilen tozların 100 nm'den küçük topaklara sahip olduğu görülmekte olup, Şekil.3.1.5'de tane boyut dağılım grafiğinde genel olarak ortalama boyutunun 30-100 nm arasında değiştiği belirlenmiştir. HAP-ZAg kodlu tozun ise ısıl işlemden dolayı taneler arası boyun verdiği (Şekil.3.1.3/c) ve boyutunun 300-400 nm (Şekil.3.1.5/c) arasında değiştiği görülmektedir.



Şekil.3.1.3. Üretilen tozların düşük büyütme SEM görüntüleri: a) HAP-Tic, b) HAP-Ag, c) HAP-ZAg, d) HAP-ZAgCu



Şekil.3.1.4. Üretilen tozların yüksek büyütme SEM görüntüleri: a) HAP-Tic, b) HAP-Ag, c) HAP-ZAg, d) HAP-ZAg-Cu



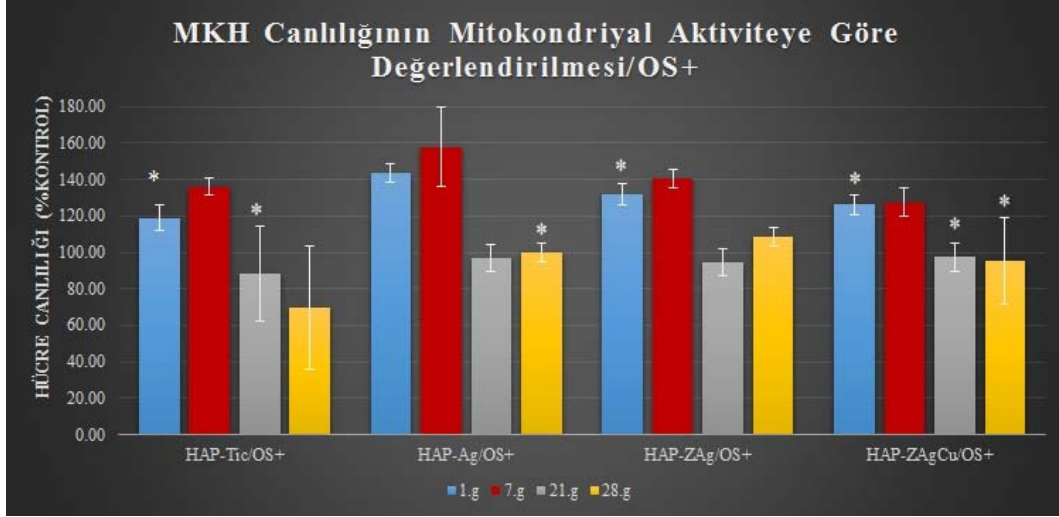
**Şekil.3.1.5.** Üretilen tozların tane boyut analizleri: a) HAP-Tic, b) HAP-Ag, c) HAP-ZAg, d) HAP-ZAgCu

**Çizelge.3.1.1.** EDX analizi sonucuna göre tozlarda bulunan metal iyonlarının katkı yüzdeleri.

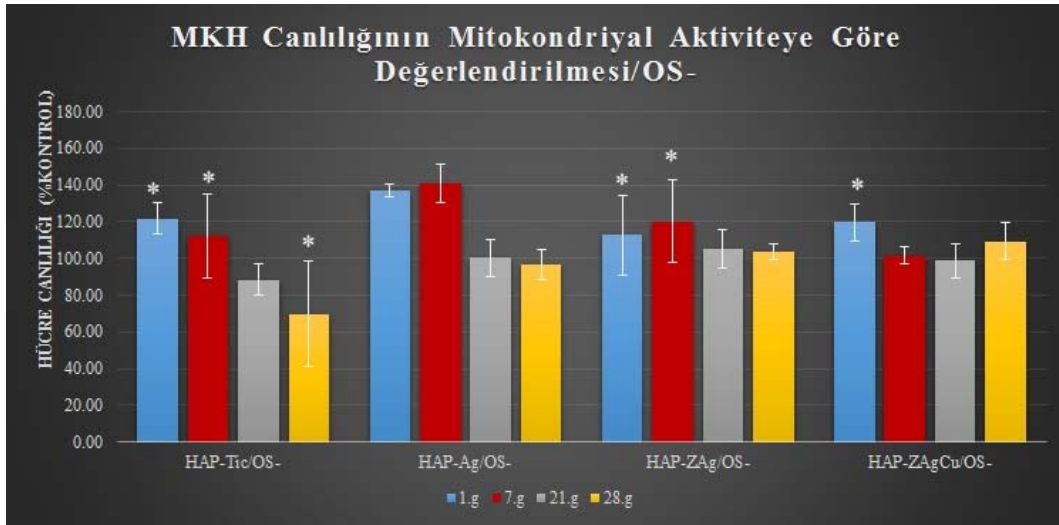
TOZ KODU	EDX (Tozlarda Bulunan Metalik Katkılar)					
	Atomik%			Ağırlıkça %		
	Ag	Zn	Cu	Ag	Zn	Cu
HAP-Tic	-	-	-	-	-	-
HAP-Ag	0.8-1	-	-	3-4	-	-
HAP-ZAg	0.8-1	7-8	-	3-4	16-18	-
HAP-ZAgCu	0.6-0.8	3.5-4.5	0.3-0.5	2-2.5	12-14	0.7-1

### 3.2. Farklı Metal İyonları İçeren Yüzeylerin MKH Canlılığı Üzerine Etkisinin MTT Testi İle Değerlendirilmesi

Lamel (Kontrol), HAP-Ticari, HAP-Ag, HAP-ZAg, HAP-ZAgCu nano tozları ile kaplanmış lamellere ekilerek osteojenik farklılaşma kokteyli içeren (OS+) ve içermeyen (OS-) medyumda büyütülen hücrelerin canlılığı 1., 7., 21. ve 28. günlerde mitokondriyal dehidrogenaz aktivitesine dayalı MTT deneyi ile belirlenmiştir. Sonuçlar Şekil.3.2.1 ve Şekil.3.2.2’de gösterilmektedir.



**Şekil.3.2.1.** Farklı metal iyonları içeren HAP nanokaplama yüzeylerin MKH'lerin canlılığı üzerindeki etkisi. Ölçümler 1., 7., 21. ve 28. günlerde osteojenik kokteyl içeren (OS+) medyumda büyütülen hücrelerde yapılmıştır. Kontrol grubu 100 olarak kabul edilmiştir. \* kontrole göre anlamlı grupları ifade etmektedir.  $p < 0.05$  kabul edilmiştir.



**Şekil.3.2.2.** Farklı metal iyonları içeren HAP nanokaplama yüzeylerin MKH'lerin canlılığı üzerindeki etkisi. Ölçümler 1., 7., 21. ve 28. günlerde osteojenik kokteyl içermeyen (OS-) medyumda büyütülen hücrelerde yapılmıştır. Kontrol grubu 100 olarak kabul edilmiştir. \* Kontrole göre anlamlı grupları ifade etmektedir.  $p < 0.05$  kabul edilmiştir.

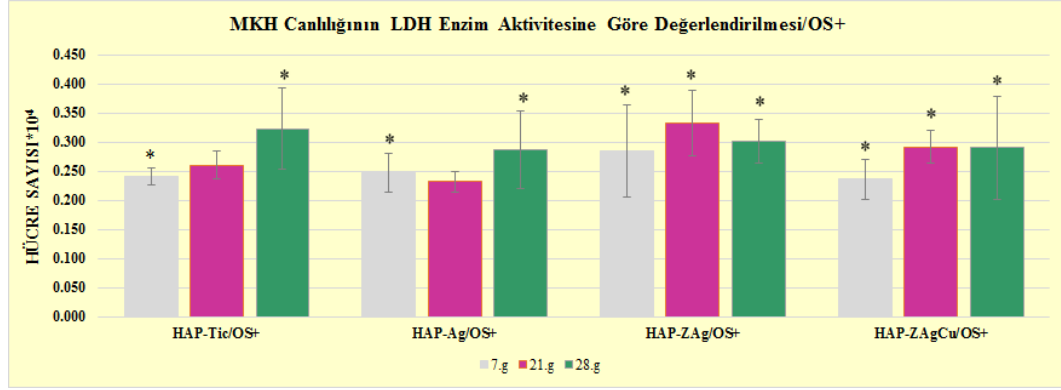
OS+ ve OS- medyumda, farklı metal iyonları içeren yüzeyler üzerinde büyütülen hücrelerden elde edilen sonuçların birbirine yakın olduğu görülmektedir. Her iki grupta da HAP-Ticari üzerinde büyütülen hücrelerdeki canlılığın zamana bağlı olarak azaldığı, 28. günde kontrole göre hücre canlılığında her iki grupta da %30 oranında bir düşüş olduğu görülmektedir. HAP-Ag kaplı yüzeylerde büyütülen hücrelerin canlılığının OS- ve OS+ medyumda sırasıyla 1. gün %35-45, 7. gün %40-60 oranında arttığı gözlenmiştir. HAP-ZAg kaplı yüzeyler OS+ grup hücrelerin canlılığını kontrole göre 1. ve 7. günlerde sırasıyla %30-40 oranında, OS- grup hücrelerin canlılığını kontrole göre 1. ve 7. günlerde sırasıyla %12-20 oranında artırmıştır. HAP-ZAgCu kaplı yüzeylerin hücreler üzerinde toksik bir etki bırakmadığı, 1. ve 7. gün kontrol grubuna göre %30 oranında canlılığı artırdığı görülmektedir. HAP-Ag, HAP-ZAg ve HAP-ZAgCu yüzeylerinin 21. ve 28. günlerde hücre canlılığı üzerindeki etkisinin yaklaşık olarak kontrole aynı seviyede olduğu görülmektedir.

### **3.3. Farklı Metal İyonları İçeren Yüzeyler Üzerindeki MKH Canlılığının LDH Testi İle Belirlenmesi**

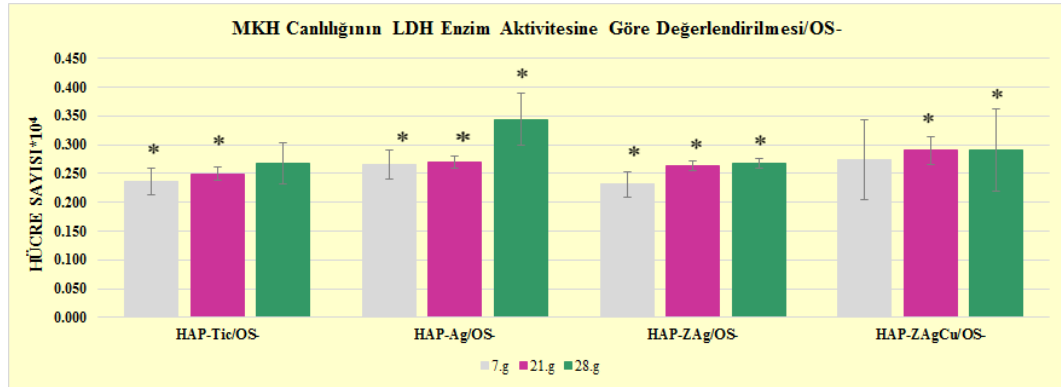
Farklı metal iyonları içeren nano yüzeylerin hücre canlılığı üzerindeki etkisi ayrıca laktat dehidrogenaz enzim varlığına bağlı olarak gerçekleştirilen LDH testi ile de değerlendirilmiştir. Bu amaçla farklı yüzeyler üzerinde OS+ ve OS- medyum içerisinde 7., 21. ve 28. günlerde hücreler materyal metod kısmında belirtilen yöntemle göre liziz edilerek hücre içeriğindeki laktat dehidrogenaz enzimi varlığında gerçekleşen reaksiyona bağlı olarak oluşan renk değişimi kolorimetrik olarak eliza cihazında ölçülmüş, birbirinden bağımsız olarak hazırlanan gruplardan elde edilen veriler istatistiksel olarak değerlendirilmiş ve Şekil.3.3.1 ile Şekil.3.3.2’de görülen sonuçlar elde edilmiştir.

Sonuçlar hem OS+, hem de OS- medyum içerisinde büyütülen hücrelerin laktat dehidrogenaz enzim varlığına bağlı olarak bütün yüzeylerdeki hücre canlılığının bir miktar arttığını göstermektedir. Farklı metal içeren grupların etkisi arasında belirgin bir farklılık görülmemektedir. OS- gruptaki canlı hücre

miktarının 28. gün sonunda 7. gündeki değerlere yakın olduğu görülmektedir. Sonuçlar MTT sonuçlarına paralel olarak malzemelerin herhangi bir toksik etki göstermediğini doğrulamaktadır.



**Şekil.3.3.1.** Mezenkimal kök hücrelerin farklı metal iyonları içeren HAP nanokaplama yüzeyleri üzerindeki canlılığının LDH testi ile karşılaştırılması. Ölçümler 7., 21. ve 28. günlerde osteojenik kokteyl içeren (OS+) medyunda büyütülen hücrelerde yapılmıştır. \* Kontrolle göre anlamlı grupları ifade etmektedir.  $p < 0.05$  kabul edilmiştir.



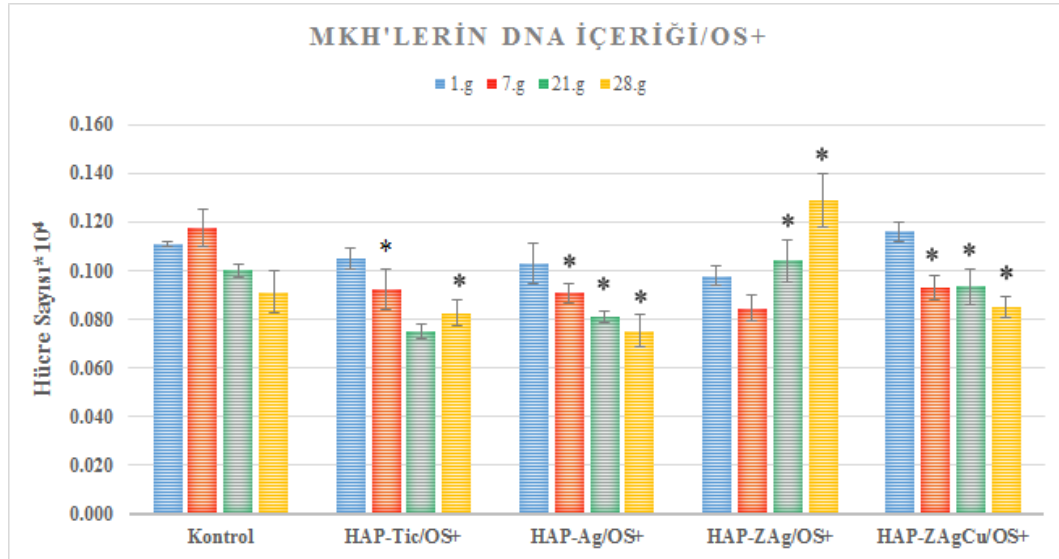
**Şekil.3.3.2.** Mezenkimal kök hücrelerin farklı metal iyonları içeren HAP nanokaplama yüzeyleri üzerindeki canlılığının LDH testi ile karşılaştırılması. Ölçümler 7., 21. ve 28. günlerde osteojenik kokteyl içeren (OS-) medyunda büyütülen hücrelerde yapılmıştır. \* Kontrolle göre anlamlı grupları ifade etmektedir.  $p < 0.05$  kabul edilmiştir.



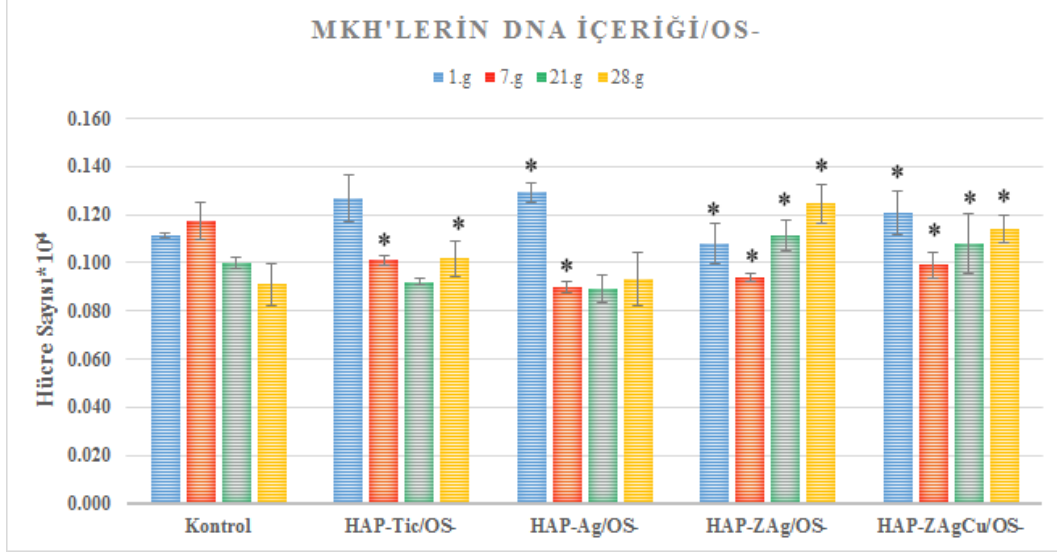
### 3.4. Hücrelerde DNA Miktarının Picogreen Boya ile Belirlenmesi

Hücre canlılığı çift iplikli DNA'ya bağlanabilme özelliği olan Picogreen boya ile de değerlendirilmiştir. Oldukça hassas bir yöntem olan DNA miktar tayin yöntemi kullanılarak MTT ve LDH testlerinden elde edilen sonuçlar doğrulanmaya çalışılmıştır.

Elde edilen verilere göre kontrol grubunda 1. gün 0.111 olarak görülen değer, 28. gün sonunda 0.91'e düştüğünü göstermektedir. Aynı şekilde her iki grupta da (OS+ ve OS-), HAP-Ticari, HAP-Ag, HAP-ZAgCu grubundan elde edilen verilerin birbirine ve kontrole oldukça yakın olduğu görülmektedir. Fakat HAP-ZAg yüzeyi üzerinde büyütülen MKH'lerin çift iplikli DNA miktarında her iki grupta da 28. günün sonunda kontrol grubuna göre %40 oranında bir artış meydana gelmiştir.



Şekil.3.4.1. Farklı yüzeyler üzerinde 1, 7, 21 ve 28 gün boyunca OS+ medyumda büyütülen MKH'lerin DNA tayini. \* Kontrole göre anlamlı grupları ifade etmektedir.  $p < 0.05$  kabul edilmiştir.

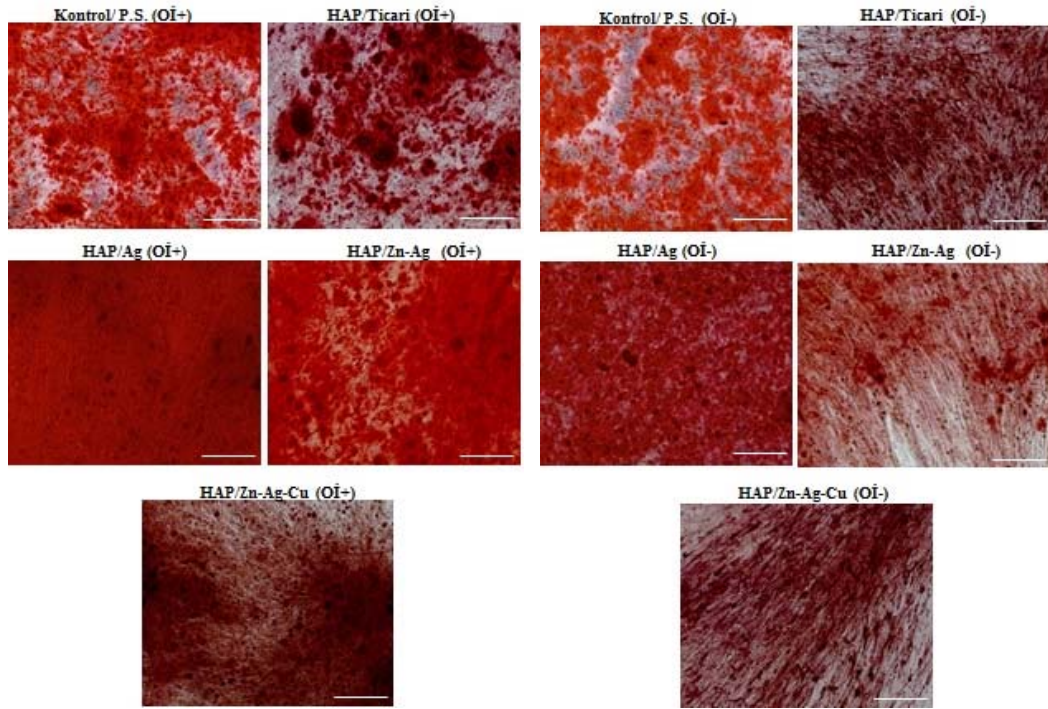


**Şekil.3.4.2.** Farklı yüzeyler üzerinde 1, 7, 21 ve 28 gün boyunca OS- medyumda büyütülen MKH'lerin DNA tayini. \* Kontrolle göre anlamlı grupları ifade etmektedir.  $p < 0.05$  kabul edilmiştir.

### 3.5. MKH'lerde Osteojenik Farklılaşmanın Alizarin Kırmızısı Boyama ile Değerlendirilmesi

24 kuyucuklu plakalara yerleştirilen HAP-Ticari, HAP-Ag, HAP-ZAg ve HAP-ZAgCu nano tozları ile kaplanmış cam lameller üzerinde 28 gün boyunca osteojenik kokteyl içeren ve içermeyen iki ayrı grup olarak büyütülen MKH'lerdeki osteojenik farklılaşma alizarin kırmızısı boyama ile incelenmiştir. Alizarin kırmızısı, ekstrasellüler matriksteki kalsiyum birikimine bağlı olarak osteojenik farklılaşmayla birlikte artan kalsiyum miktarına bağlı olarak boyanan hücreleri göstermektedir. Boyama sonuçları Şekil.3.5.1'de gösterilmiştir.

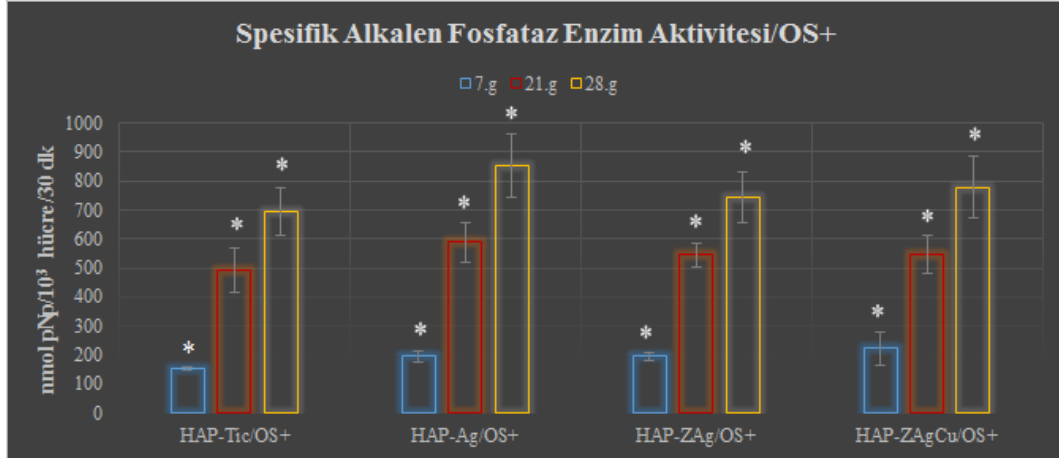
OS+ grupta bulunan MKH'lerin bütün yüzeyler üzerinde kontrol grubuna göre daha iyi boyandığı görülmektedir. Ticari HAP'la kıyaslandığında ise metal iyon içeren grupların daha iyi sonuç verdiği söylenebilir. OS- gruba ait sonuçlarda da kontrol grubu ile karşılaştırıldığında özellikle HAP-ZAgCu üzerinde büyütülen hücrelerdeki boya yoğunluğunun oldukça fazla olduğu göze çarpmaktadır.



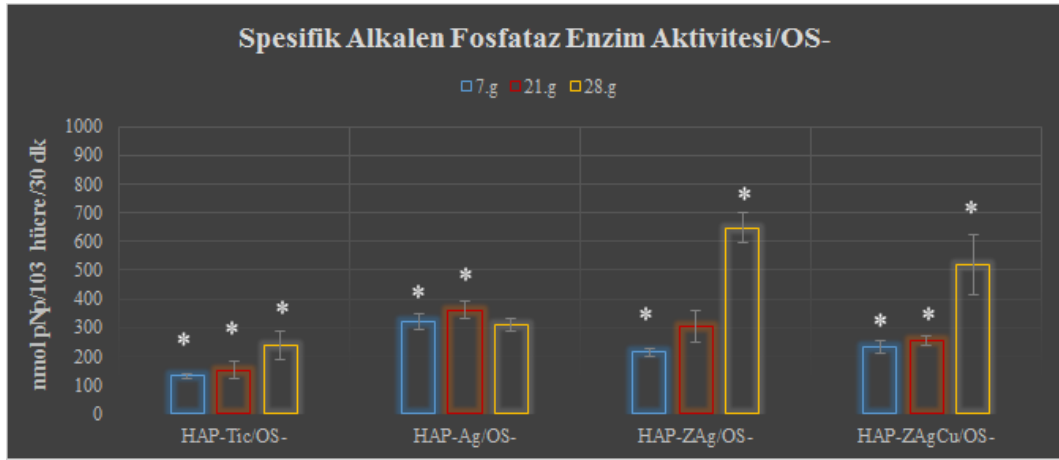
**Şekil.3.5.1** Farklı yüzeyler üzerinde OS+ ve OS- medyumda büyütülen MKH'lerde, 28. günün sonunda osteoblastik farklılaşmanın alizarin kırmızısı boyama ile tespit edilmesi. Fotoğraflar 4X objektif ile çekilmiştir.

### 3.6. MKH'lerde Osteojenik Farklılaşmanın Biyokimyasal Analizi (Alkalen Fosfataz Enzim Miktar Tayini)

MKH'lerin farklı metal iyonları içeren yüzeyler üzerinde osteojenik farklılaşma potansiyelleri biyokimyasal olarak Alkalen fosfataz enzim miktarının kolorimetrik olarak ölçülmesiyle 7., 21. ve 28. günlerde değerlendirilmiştir. Sonuçlar Şekil 3.6.1 ve Şekil 3.6.2'de gösterilmiştir. Zamana bağlı olarak enzim miktarının dolayısıyla osteojenik farklılaşmanın da arttığını görülmektedir. Değerler birbirine yakın olsa da OS+ grupta, HAP-Ag üzerinde büyütülen hücrelerin 28. günde sahip olduğu alkalen fosfataz enziminin HAP-Tic'ye göre %20 daha fazla olduğu tespit edilmiştir. OS- grupta ise HAP-ZAg ve HAP-ZAgCu yüzeylerinin farklılaşmayı HAP-Tic'ye göre yaklaşık olarak %170 oranında daha fazla uyardığı görülmektedir.



**Şekil.3.6.1** Farklı metal iyonları içeren HAP nanokaplama yüzeyler üzerinde OS+ medyunda büyütülen hücrelerde, 28. günün sonunda alkalen fosfataz enzim miktarındaki değişime bağlı olarak osteojenik farklılaşmanın değerlendirilmesi. \* Kontrole göre anlamlı grupları ifade etmektedir.  $p < 0.05$  kabul edilmiştir.



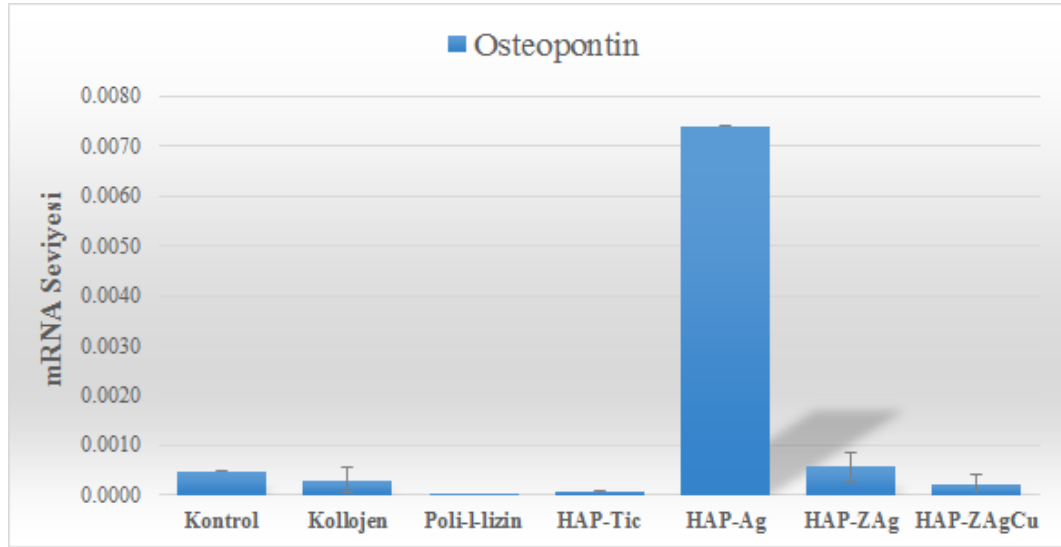
**Şekil.3.6.2** Farklı metal iyonları içeren HAP nanokaplama yüzeyler üzerinde OS- medyunda büyütülen hücrelerde, 28. günün sonunda alkalen fosfataz enzim miktarındaki değişime bağlı olarak osteojenik farklılaşmanın değerlendirilmesi. \* Kontrole göre anlamlı grupları ifade etmektedir.  $p < 0.05$  kabul edilmiştir.

### 3.7. Osteopontin Gen Ekspresyon Seviyesinin Tespit Edilmesi

MKH'lerdeki osteojenik farklılaşma mRNA seviyesinde Osteopontin geninden ekspresse edilen mRNA'ların seviyesinin rt-PCR ile ölçülmesiyle de ayrıca incelenmiştir.

Literatürden elde edilen bilgiler ışığında 14 gün süre ile cam lamel (kontrol), kollojen (kontrol), poli-l-lizin (kontrol), HAP-Ticari, HAP-Ag, HAP-ZAg ve HAP-ZAgCu ile kaplanmış yüzeyler üzerinde büyütülen hücrelerden total RNA izolasyonu yapılmış ve Osteopontin ile VEGF genlerindeki ekspresyon seviyeleri incelenmiştir.

Farklılaşma kokteyli içermeyen medyum ile HAP-Ag yüzeyinde büyütülen MKH'lerin osteojenik olarak oldukça iyi bir şekilde uyarıldığı ve farklılaştığı görülmektedir.

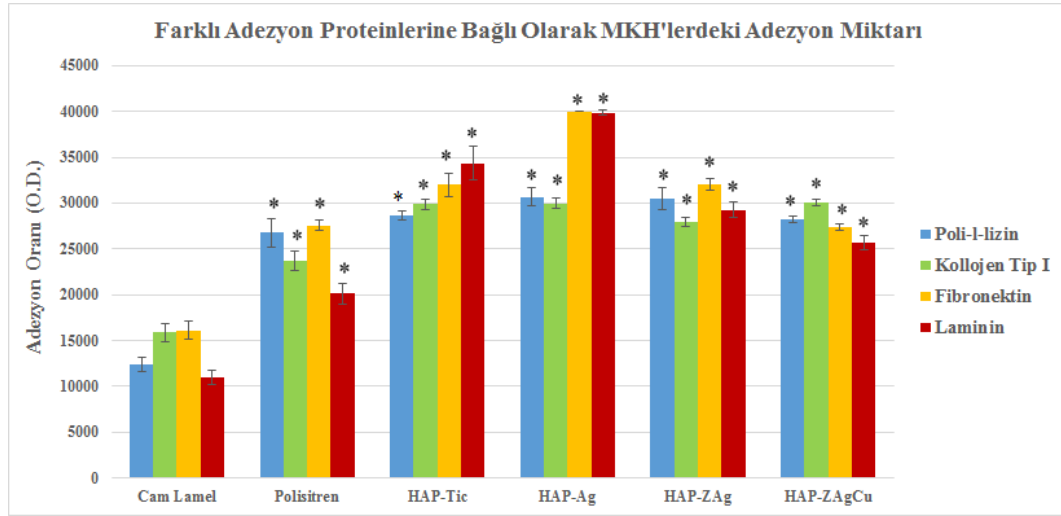


Şekil.3.7.1. Osteopontin genine ait mRNA seviyesi.

### 3.8. Hücre Adezyonunun Ölçülmesi

Hücrelerin farklı yüzeyler üzerindeki adezyon miktarlarını belirlemek için poli-l-lizin, kollojen tip I, fibronektin ve laminin ile kaplanan cam lamel, polistiren plaka, HAP-Tic, HAP-Ag, HAP-ZAg, HAP-ZAgCu yüzeyleri üzerine ekilen hücreler 30 dakikalık inkübasyonun ardından fikse edilerek kristal viyole ile boyanmış ve eliza cihazında kolorimetrik renk değişimi ölçülmüştür. Ölçümlere ait sonuçlar Şekil.3.8.1’de verilmiştir.

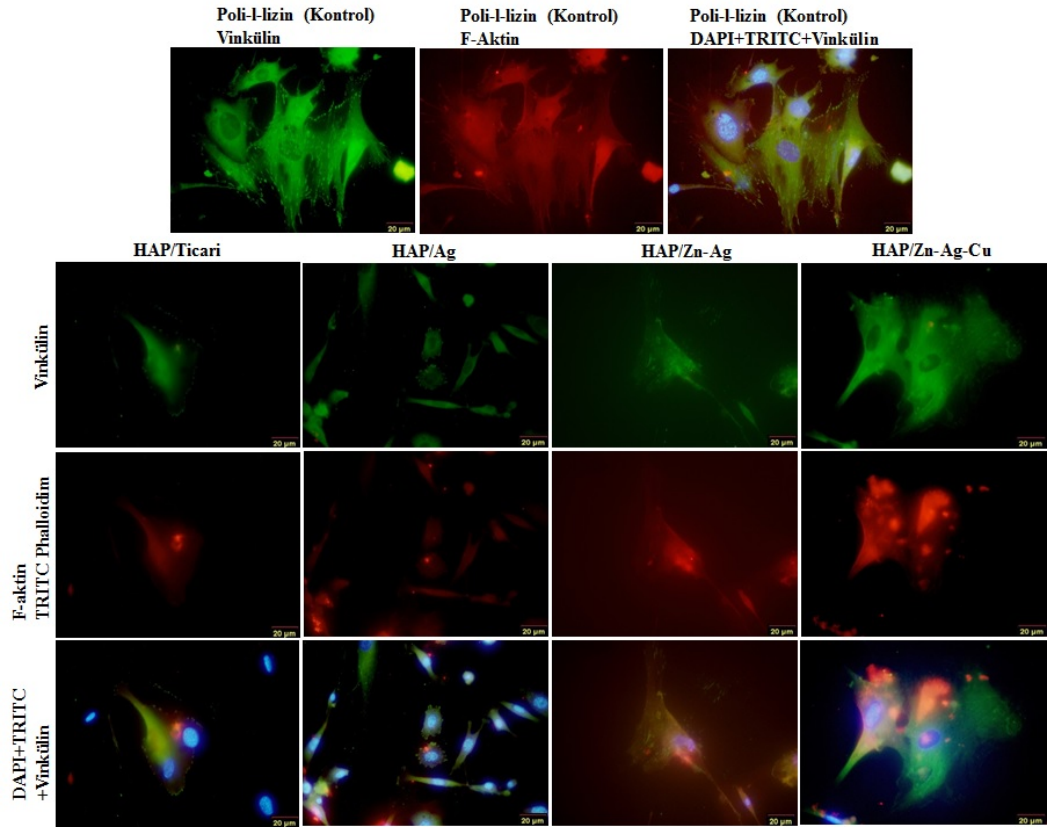
Özellikle hücre-matriks arasında etkin rol oynayan fibronektin ve laminin proteinleri ile bağlanan hücre sayısının HAP-Ag kaplı yüzeylerde oldukça yüksek olduğu görülmektedir. Deney sonuçları HAP-Tic, HAP-ZAg ve HAP-ZAgCu ile kaplanmış yüzeylere yapışan hücre sayısının yaklaşık olarak birbirine yakın olduğunu göstermektedir. Cam lamel ve polistiren plakaya yapışan hücre sayısı diğer yüzeylere göre oldukça düşüktür.



**Şekil.3.8.1.** Mezenkimal kök hücrelerin farklı metal iyonları içeren HAP nanokaplama yüzeyler üzerindeki adezyon yeteneklerinin değerlendirilmesi. \* Kontrolle göre anlamlı grupları ifade etmektedir.  $p < 0.05$  kabul edilmiştir.

### 3.9. İmmüno Floresan Boyama (F-Aktin ve Vinkülün)

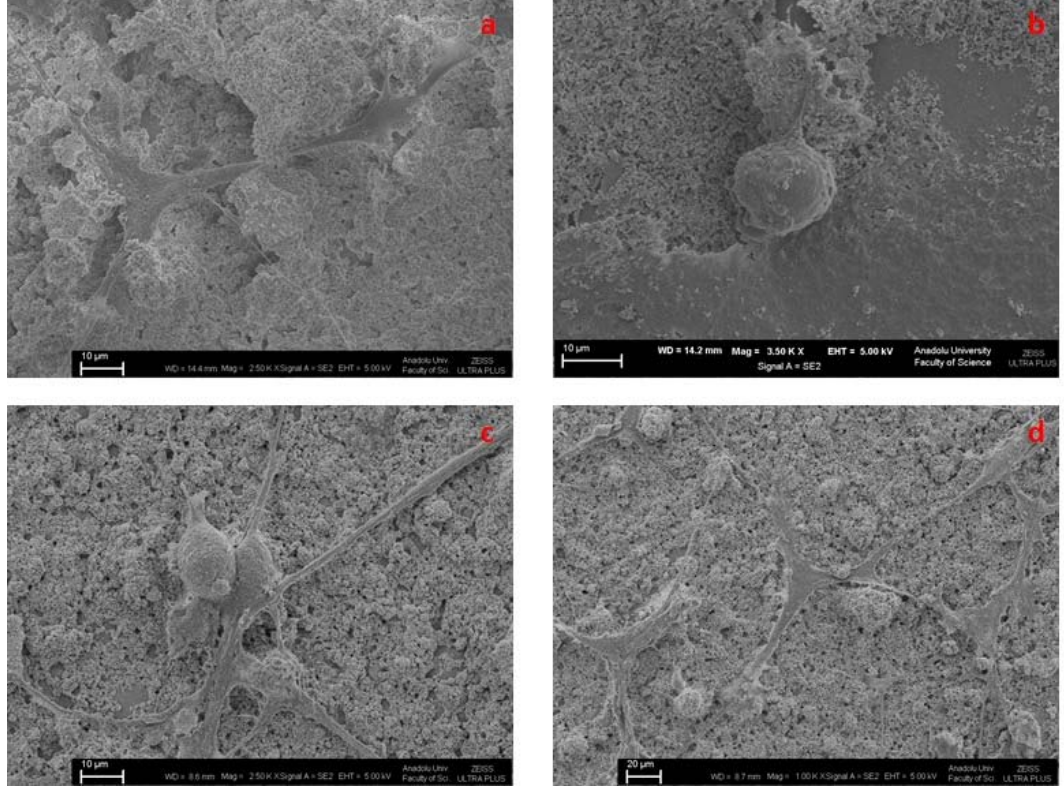
Hücre adezyonu ayrıca hücre iskeleti elemanları olan Vinkülün ve F-aktin spesifik boyamalar ile de değerlendirilmiştir. Boyamalara ait fotoğraflar Şekil.3.9.1’de verilmiştir. HAP ile kaplanmış yüzeylerin ışık geçirgenliği cam lamellere göre daha az olduğu için hücre iskeleti elemanlarının tam olarak görüntülenmesi mümkün olmamıştır. Ancak özellikle HAP-Tic ve HAP-Ag yüzeyleri üzerinde büyüyen hücrelerdeki vinkülün elemanları hücre sınırlarını belirleyecek şekilde görülmektedir. Hücrelerin kontrol grubunda olduğu gibi HAP-ZAg ve HAP-ZAgCu kaplı yüzeylerde oldukça iyi adezyon göstererek geniş bir yüzeye yayıldıkları görülmüştür.



**Şekil.3.9.1.** Mezenkimal kök hücrelerin farklı metal iyonları içeren HAP nanokaplama yüzeyler üzerindeki adezyon yeteneklerinin Vinkülün ve F-aktin hücre iskeleti elemanlarının varlığına göre değerlendirilmesi.



### 3.10. Taramalı Elektron Mikroskobu ile Hücre Adezyonunun İncelenmesi



Şekil.3.10.1. Hücelere ait SEM Görüntüleri a) HAP-Tic, b) HAP-Ag, c) HAP-ZAg, d)HAP-ZAgCu.

### 3.11. Hücre Adezyonunun rt-PCR array ile Değerlendirilmesi

MKH'lerin cam lamel, kollojen, HAP-Tic, HAP-Ag, HAP-ZAg ve HAP-ZAgCu ile kaplanmış yüzeyler üzerindeki adezyonları, ekstrasellüler matris ve adezyon molekülleri yolağında yer alan 84 hedef gen ve 5 referans gen üzerinde real time PCR array deneyi ile incelenmiştir. Çalışma kapsamında her bir grupta ikişer örnek olmak üzere 5 deney grubuna ait örnekler değerlendirilmiştir. Analizde kullanılan qPCR verileri  $\Delta\Delta C_t$  yöntemiyle hesaplanmıştır.

Verilerin dağılımına genel olarak bakıldığında farklı durumlarda farklı hücresel tepkilerin verildiği gözlemlenmektedir. Her bir gruptaki örneklerin gen ifadesi profili açısından ne derece tutarlı olduklarını anlamak adına bir korelasyon



analizi yapılarak aşağıdaki dendogram oluşturulmuştur. Buna gore, HAP-Ag, HAP-ZAgCu ve Kollojen gruplarındaki rnekle deneysel açıdan benzer ve tutarlı sonuçlar vermiştir, bu nedenle bu rneklere ait analiz sonuçlarının diğer gruplara kıyasla daha tutarlı olması beklenmektedir.

Anlatımı her bir grup için artan ve azalan genler, artma ve azalma miktarlarına gore sıralanarak aşağıda listelenmiştir. Herhangi bir genin artıp azalmasına ilişkin değerlendirme, o gene ait ifade miktarının kontrol verilerine gore *en az* iki kat fazla veya az olmasına gore yapılmıştır ve aşağıdaki tablolarda gen ifadesi ***artan*** veya ***azalan*** olarak gosterilmiştir.

Çizelge.3.11.1. rt-PCR verilerine göre 84 genin ekspresyon seviyelerinin değerlendirilmesi.

Anlatımı Artan ↑ ve Azalan ↓ Genler					
	Kollojen	HAP-Tic	HAP-Ag	HAP-ZAg	HAP-ZAgCu
ACTB	-	-	-	-	-
ADAMTS1	-	-	-	-	-
ADAMTS13	-	-	↑ (3,36)	↑ (74,80)	-
ADAMTS8	↑ (3,98)	-	↑ (4,35)	↓ (2,86)	↓ (2,83)
B2M	-	-	-	-	-
CD44	-	-	-	-	-
CDH1	↑ (2,45)	↑ (2,07)	↑ (2,07)	↓ (2,54)	↑ (7,12)
CLEC3B	-	-	↓ (2,64)	-	-
CNTN1	↑ (4,18)	↑ (18,06)	-	↑ (1618,57)	-
COL11A1	↑ (49,33)	↑ (24,11)	↑ (23,70)	↑ (23,91)	↑ (20,84)
COL12A1	-	-	↓ (4,76)	-	↓ (2,11)
COL14A1	↑ (19,31)	↑ (8,92)	↑ (2,43)	↑ (3,29)	-
COL15A1	-	-	↑ (5,69)	-	↓ (2,57)
COL16A1	-	-	-	-	-
COL1A1	-	-	↓ (3,52)	-	↓ (2,01)
COL4A2	↑ (83,99)	↑ (65,34)	↑ (48,31)	↑ (99,00)	↑ (80,59)
COL5A1	-	-	↓ (4,81)	-	↓ (3,88)
COL6A1	-	-	↓ (2,91)	-	↓ (2,12)
COL6A2	-	↓ (2,64)	↓ (3,37)	-	↓ (2,24)
COL7A1	-	-	↓ (4,08)	-	↓ (2,10)
COL8A1	↑ (75,01)	↑ (35,86)	↑ (7,10)	↑ (14,10)	↑ (17,61)
CTGF	-	↓ (2,40)	-	↓ (2,33)	-
CTNNA1	-	-	-	-	-
CTNNB1	-	-	-	-	-
CTNND1	↑ (2,18)	-	-	-	-
CTNND2	-	↑ (4270,49)	-	-	↑ (10,12)
ECM1	-	-	-	-	-
FN1	-	-	-	-	-
GAPDH	-	-	-	-	-
HAS1	-	-	-	↓ (2,90)	↓ (2,81)
HGDC	↑ (10,76)	-	-	-	-
HPRT1	-	-	-	-	-
ICAM1	-	-	↓ (2,51)	-	-
ITGA1	-	-	-	↑ (2,70)	-
ITGA2	↑ (2,22)	↑ (3,52)	↑ (2,29)	↑ (6,29)	↑ (2,35)
ITGA3	-	-	-	-	-
ITGA4	-	↓ (2,13)	↓ (3,34)	-	↓ (2,56)
ITGA5	-	-	-	-	-
ITGA6	-	-	-	↑ (10,02)	-
ITGA7	-	↓ (2,70)	↓ (3,18)	↓ (8,12)	↓ (2,44)
ITGA8	↓ (2,07)	-	↓ (29,46)	-	-
ITGAL	-	-	↓ (2,64)	-	-
ITGAM	-	-	-	↑ (81,25)	-
ITGAV	-	-	-	-	-
ITGB1	-	-	-	↓ (2,16)	↓ (2,13)
ITGB2	↑ (35,18)	↑ (3,87)	-	↑ (1636,17)	↑ (66187,61)

Çizelge.3.11.1. (devam) rt-PCR verilerine göre 84 genin ekspresyon seviyelerinin değerlendirilmesi.

ITGB3	-	-	-	-	-
ITGB4	-	-	↓ (3,25)	↓ (2,40)	-
ITGB5	-	-	-	-	↓ (2,47)
KAL1	↓ (2,99)	↓ (3,62)	↓ (3,83)	↓ (7,39)	↓ (7,66)
LAMA1	-	-	-	-	↑ (2,13)
LAMA2	-	-	-	-	↓ (2,83)
LAMA3	↓ (8,98)	↑ (5,91)	↓ (10,37)	↓ (10,06)	↓ (16,38)
LAMB1	-	-	↓ (3,26)	↓ (4,05)	↓ (2,69)
LAMB3	↓ (7,32)	-	↓ (4,51)	↓ (5,32)	↓ (6,05)
LAMC1	-	-	↑ (68,35)	-	-
MMP1	-	-	↑ (9,80)	-	-
MMP10	-	-	↑ (66,52)	↑ (105,89)	↑ (2,15)
MMP11	-	-	-	↓ (2,07)	↓ (3,08)
MMP12	-	-	-	-	↑ (9,28)
MMP13	-	-	↓ (7,09)	↑ (111,59)	↑ (50,15)
MMP14	-	-	↓ (4,87)	↓ (2,42)	↓ (3,88)
MMP15	-	-	↓ (2,00)	↑ (19,30)	↑ (152,29)
MMP16	↑ (22,99)	-	-	-	↑ (11,80)
MMP2	-	-	-	-	↓ (2,05)
MMP3	-	-	↑ (2,87)	-	-
MMP7	↑ (19,19)	↑ (10698,66)	-	↑ (2548,24)	↑ (8570,26)
MMP8	-	↑ (3,11)	↓ (8,47)	↑ (2,37)	-
MMP9	↑ (4,30)	↑ (2,73)	-	↑ (6,82)	-
NCAM1	↑ (10,90)	↑ (2,06)	-	↑ (6,01)	-
PECAM1	-	-	-	-	↓ (2,08)
RPLP0	-	-	-	-	-
SELE	↑ (16,29)	↓ (2,10)	↓ (2,86)	↑ (2,67)	↑ (2,03)
SELL	↑ (6,09)	↓ (2,40)	↓ (2,83)	↓ (10,06)	↓ (8,75)
SELP	↑ (78,65)	↑ (6123,08)	-	↑ (3,21)	↓ (3,13)
SGCE	-	↑ (2,54)	-	-	-
SPARC	-	-	↓ (2,44)	-	-
SPG7	-	↑ (3,30)	↓ (3,88)	-	-
SPP1	-	↑ (6,02)	↑ (9,11)	↑ (2,44)	↑ (3,65)
TGFBI	-	-	-	-	-
THBS1	-	-	↓ (4,21)	-	-
THBS2	-	-	↓ (2,03)	-	-
THBS3	-	↑ (5,04)	↓ (2,24)	↓ (2,54)	-
TIMP1	-	-	-	-	-
TIMP2	-	↑ (2,19)	-	-	↓ (2,00)
TIMP3	-	-	-	-	-
TNC	-	-	-	-	-
VCAM1	↑ (28,63)	↓ (2,29)	↓ (4,85)	-	-
VCAN	-	-	-	↓ (2,37)	↓ (2,73)
VTN	-	-	↓ (2,79)	-	-

**Çizelge.3.11.2.** rt-PCR verilerinde değerlendirilen 84 hedef genin ayrıntılı açıklaması ve gen bank numaraları.

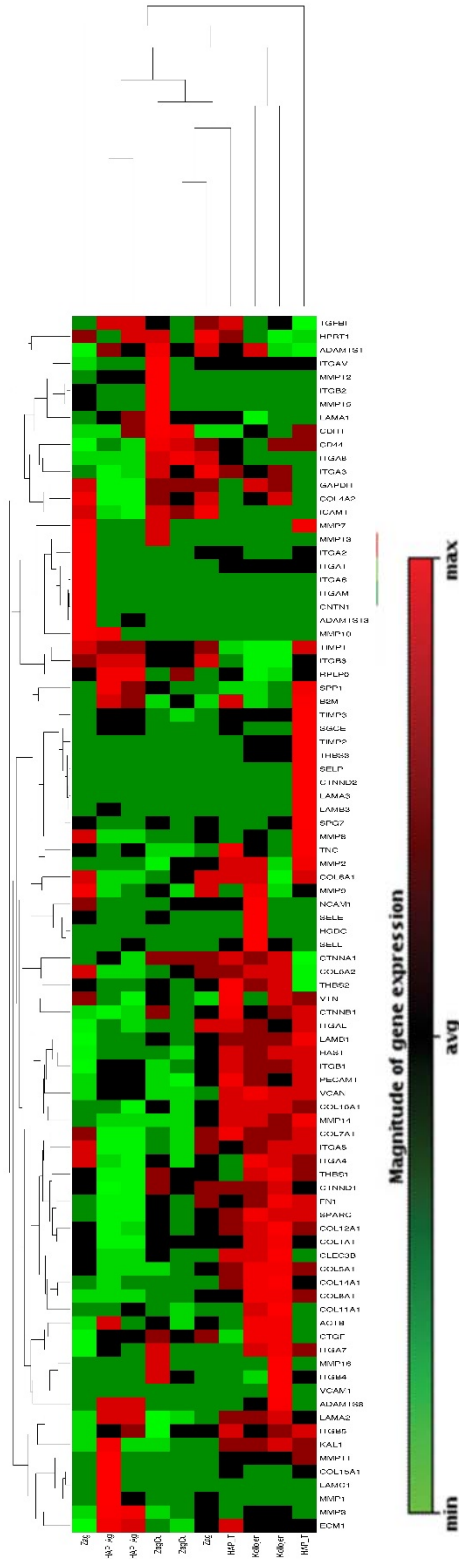
<b>GenBank</b>	<b>Sembol</b>	<b>Açıklama</b>
NM_006988	<b>ADAMTS1</b>	ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 1
NM_139025	<b>ADAMTS13</b>	ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 13
NM_007037	<b>ADAMTS8</b>	ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 8
NM_000610	<b>CD44</b>	CD44 molecule (Indian blood group)
NM_004360	<b>CDH1</b>	Cadherin 1, type 1, E-cadherin (epithelial)
NM_003278	<b>CLEC3B</b>	C-type lectin domain family 3, member B
NM_001843	<b>CNTN1</b>	Contactin 1
NM_080629	<b>COL11A1</b>	Collagen, type XI, alpha 1
NM_004370	<b>COL12A1</b>	Collagen, type XII, alpha 1
NM_021110	<b>COL14A1</b>	Collagen, type XIV, alpha 1
NM_001855	<b>COL15A1</b>	Collagen, type XV, alpha 1
NM_001856	<b>COL16A1</b>	Collagen, type XVI, alpha 1
NM_000088	<b>COL1A1</b>	Collagen, type I, alpha 1
NM_001846	<b>COL4A2</b>	Collagen, type IV, alpha 2
NM_000093	<b>COL5A1</b>	Collagen, type V, alpha 1
NM_001848	<b>COL6A1</b>	Collagen, type VI, alpha 1
NM_001849	<b>COL6A2</b>	Collagen, type VI, alpha 2
NM_000094	<b>COL7A1</b>	Collagen, type VII, alpha 1
NM_001850	<b>COL8A1</b>	Collagen, type VIII, alpha 1
NM_001901	<b>CTGF</b>	Connective tissue growth factor
NM_001903	<b>CTNNA1</b>	Catenin (cadherin-associated protein), alpha 1, 102kDa
NM_001904	<b>CTNNB1</b>	Catenin (cadherin-associated protein), beta 1, 88kDa
NM_001331	<b>CTNND1</b>	Catenin (cadherin-associated protein), delta 1
NM_001332	<b>CTNND2</b>	Catenin (cadherin-associated protein), delta 2 (neural plakophilin-related arm-repeat protein)
NM_004425	<b>ECM1</b>	Extracellular matrix protein 1
NM_002026	<b>FN1</b>	Fibronectin 1
NM_001523	<b>HAS1</b>	Hyaluronan synthase 1
NM_000201	<b>ICAM1</b>	Intercellular adhesion molecule 1
NM_181501	<b>ITGA1</b>	Integrin, alpha 1
NM_002203	<b>ITGA2</b>	Integrin, alpha 2 (CD49B, alpha 2 subunit of VLA-2 receptor)
NM_002204	<b>ITGA3</b>	Integrin, alpha 3 (antigen CD49C, alpha 3 subunit of VLA-3 receptor)
NM_000885	<b>ITGA4</b>	Integrin, alpha 4 (antigen CD49D, alpha 4 subunit of VLA-4 receptor)
NM_002205	<b>ITGA5</b>	Integrin, alpha 5 (fibronectin receptor, alpha polypeptide)
NM_000210	<b>ITGA6</b>	Integrin, alpha 6
NM_002206	<b>ITGA7</b>	Integrin, alpha 7

**Çizelge.3.11.2. (devam)** rt-PCR verilerinde değerlendirilen 84 hedef genin ayrıntılı açıklaması ve gen bank numaraları

NM_003638	<b>ITGA8</b>	Integrin, alpha 8
NM_002209	<b>ITGAL</b>	Integrin, alpha L (antigen CD11A (p180), lymphocyte function-associated antigen 1; alpha polypeptide)
NM_000632	<b>ITGAM</b>	Integrin, alpha M (complement component 3 receptor 3 subunit)
NM_002210	<b>ITGAV</b>	Integrin, alpha V (vitronectin receptor, alpha polypeptide, antigen CD51)
NM_002211	<b>ITGB1</b>	Integrin, beta 1 (fibronectin receptor, beta polypeptide, antigen CD29 includes MDF2, MSK12)
NM_000211	<b>ITGB2</b>	Integrin, beta 2 (complement component 3 receptor 3 and 4 subunit)
NM_000212	<b>ITGB3</b>	Integrin, beta 3 (platelet glycoprotein IIIa, antigen CD61)
NM_000213	<b>ITGB4</b>	Integrin, beta 4
NM_002213	<b>ITGB5</b>	Integrin, beta 5
NM_000216	<b>KAL1</b>	Kallmann syndrome 1 sequence
NM_005559	<b>LAMA1</b>	Laminin, alpha 1
NM_000426	<b>LAMA2</b>	Laminin, alpha 2
NM_000227	<b>LAMA3</b>	Laminin, alpha 3
NM_002291	<b>LAMB1</b>	Laminin, beta 1
NM_000228	<b>LAMB3</b>	Laminin, beta 3
NM_002293	<b>LAMC1</b>	Laminin, gamma 1 (formerly LAMB2)
NM_002421	<b>MMP1</b>	Matrix metalloproteinase 1 (interstitial collagenase)
NM_002425	<b>MMP10</b>	Matrix metalloproteinase 10 (stromelysin 2)
NM_005940	<b>MMP11</b>	Matrix metalloproteinase 11 (stromelysin 3)
NM_002426	<b>MMP12</b>	Matrix metalloproteinase 12 (macrophage elastase)
NM_002427	<b>MMP13</b>	Matrix metalloproteinase 13 (collagenase 3)
NM_004995	<b>MMP14</b>	Matrix metalloproteinase 14 (membrane-inserted)
NM_002428	<b>MMP15</b>	Matrix metalloproteinase 15 (membrane-inserted)
NM_005941	<b>MMP16</b>	Matrix metalloproteinase 16 (membrane-inserted)
NM_004530	<b>MMP2</b>	Matrix metalloproteinase 2 (gelatinase A, 72kDa gelatinase, 72kDa type IV)
NM_002422	<b>MMP3</b>	Matrix metalloproteinase 3 (stromelysin 1, progelatinase)
NM_002423	<b>MMP7</b>	Matrix metalloproteinase 7 (matrilysin, uterine)
NM_002424	<b>MMP8</b>	Matrix metalloproteinase 8 (neutrophil collagenase)
NM_004994	<b>MMP9</b>	Matrix metalloproteinase 9 (gelatinase B, 92kDa gelatinase, 92kDa type IV collagenase)
NM_000615	<b>NCAM1</b>	Neural cell adhesion molecule 1
NM_000442	<b>PECAM1</b>	Platelet/endothelial cell adhesion molecule
NM_000450	<b>SELE</b>	Selectin E
NM_000655	<b>SELL</b>	Selectin L
NM_003005	<b>SELP</b>	Selectin P (granule membrane protein 140kDa, antigen CD62)

**Çizelge.3.11.2. (devam)** rt-PCR verilerinde değerlendirilen 84 hedef genin ayrıntılı açıklaması ve gen bank numaraları

NM_003919	<b>SGCE</b>	Sarcoglycan, epsilon
NM_003118	<b>SPARC</b>	Secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectin)
NM_003119	<b>SPG7</b>	Spastic paraplegia 7 (pure and complicated autosomal recessive)
NM_000582	<b>SPP1</b>	Secreted phosphoprotein 1
NM_000358	<b>TGFBI</b>	Transforming growth factor, beta-induced, 68kDa
NM_003246	<b>THBS1</b>	Thrombospondin 1
NM_003247	<b>THBS2</b>	Thrombospondin 2
NM_007112	<b>THBS3</b>	Thrombospondin 3
NM_003254	<b>TIMP1</b>	TIMP metalloproteinase inhibitor 1
NM_003255	<b>TIMP2</b>	TIMP metalloproteinase inhibitor 2
NM_000362	<b>TIMP3</b>	TIMP metalloproteinase inhibitor 3
NM_002160	<b>TNC</b>	Tenascin C
NM_001078	<b>VCAM1</b>	Vascular cell adhesion molecule 1
NM_004385	<b>VCAN</b>	Versican
NM_000638	<b>VTN</b>	Vitronectin
NM_001101	<b>ACTB</b>	Actin, beta
NM_004048	<b>B2M</b>	Beta-2-microglobulin
NM_002046	<b>GAPDH</b>	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
NM_000194	<b>HPRT1</b>	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1
NM_001002	<b>RPLP0</b>	Ribosomal protein, large, P0
SA_00105	<b>HGDC</b>	Human Genomic DNA Contamination
SA_00104	<b>RTC</b>	Reverse Transcription Control
SA_00104	<b>RTC</b>	Reverse Transcription Control
SA_00104	<b>RTC</b>	Reverse Transcription Control
SA_00103	<b>PPC</b>	Positive PCR Control
SA_00103	<b>PPC</b>	Positive PCR Control
SA_00103	<b>PPC</b>	Positive PCR Control



**Şekil.3.11.1.** rt-PCR deneyinde ekspresyonu incelenen genlerin ekspresyon değişimlerini gösteren gen haritası. Renk değişimleri; kırmızı artan ekspresyonu, yeşil azalan ekspresyonu, siyah ise kontrol grubuyla aynı seviyedeki gen ekspresyonlarını göstermektedir.

Buna göre ekspresyonu artan genler şu şekilde sıralanmaktadır (Kalın olarak işaretlenenler tüm gruplarda artan ortak genleri göstermektedir.):

*Kollojen*; ADAMTS8, CDH1, CNTN1, **COL11A1**, **COL14A1**, **COL4A2**, **COL8A1**, CTNND1, HGDC, **ITGA2**, **ITGB2**, MMP16, **MMP7**, MMP9, NCAM1, SELE, SELL, SELP, VCAM1.

*HAP-Ticari*; CDH1, CNTN1, **COL11A1**, **COL14A1**, **COL4A2**, **COL8A1**, CTNND2, **ITGA2**, **ITGB2**, LAMA3, **MMP7**, MMP8, MMP9, NCAM1, SELP, SGCE, SPG7, **SPP1**, THBS3, TIMP2.

*HAP-Ag*; ADAMTS13, ADAMTS8, CDH1, **COL11A1**, **COL14A1**, COL15A1, **COL4A2**, **COL8A1**, **ITGA2**, LAMC1, MMP1, MMP10, MMP3, **SPP1**.

*HAP-ZAg*; ADAMTS13, CNTN1, **COL11A1**, **COL14A1**, **COL4A2**, **COL8A1**, ITGA1, **ITGA2**, ITGA6, ITGAM, **ITGB2**, MMP10, MMP13, MMP15, **MMP7**, MMP8, MMP9, NCAM1, SELE, SELP, **SPP1**.

*HAP-ZagCu*; CDH1, **COL11A1**, **COL4A2**, **COL8A1**, CTNND2, **ITGA2**, **ITGB2**, LAMA1, MMP10, MMP12, MMP13, MMP15, MMP16, **MMP7**, SELE, **SPP1**.

Ekspresyonu artan genler arasında bütün gruplarda ortak olanlar; COL11A1 (Collagen, type XI, alpha 1), COL14A1 (Collagen, type XIV, alpha 1), COL4A2 (Collagen, type IV, alpha 2), COL8A1 (Collagen, type VIII, alpha 1), ITGA2 (Integrin, alpha 2 (CD49B, alpha 2 subunit of VLA-2 receptor)), ITGB2 (Integrin, beta 2 (complement component 3 receptor 3 and 4 subunit)), MMP7 (Matrix metalloproteinase 7 (matrilysin, uterine)) ve SPP1 (Secreted phosphoprotein 1) genleridir.

**COL11A1** (Collagen, type XI, alpha 1) geni; ESM bağlanmasında görev alır, ESM yapısal bileşenidir ve özellikle kollojen fibrillerinin organizasyonu ile ossifikasyon süreçlerinde rol almaktadır. **COL14A1** (Collagen, type XIV, alpha 1) geni; kollojen bağlanmasında görev alır, ESM yapısal bileşenidir ve özellikle kollojen fibrillerinin organizasyonu, dokulardaki hücre sayısı homeostasisi, hücre-hücre adezyon gibi olaylarda görev almaktadır. **COL4A2** (Collagen, type IV, alpha 2) geni; ESM yapısal bileşenidir, anjiyogenez ve TGF- $\beta$  uyarısına hücresel cevabın verilmesi gibi oldukça önemli olaylarda görev alır.



**COL8A1** (Collagen, type VIII, alpha 1) geni de anjiyojenez, hücre adezyonu, ESM organizasyonu, hücre-substrat adezyonunun pozitif regülasyonu gibi süreçlerde rol oynamaktadır. **ITGA2** (Integrin, alpha 2 (CD49B, alpha 2 subunit of VLA-2 receptor)) geninin kollojen bağlanması, kollojen ilişkili hücre-matriks adezyonu, integrin aracılı hücre adezyonu, laminin bağlanması, hücre proliferasyonu, hücre-substrat adezyonu, hormon uyarılarına verilen hücresel cevap, protein lokalizasyonun belirlenmesi, ESM organizasyonu, kollojen bağlanmasının pozitif regülasyonunda görev yapar. **ITGB2** (Integrin, beta 2 (complement component 3 receptor 3 and 4 subunit)) geninin hücre adezyonunda molekül bağlanması sırasında, glikoprotein bağlanmasında, metal iyon bağlanmasında, hücre-hücre adezyonu, hücre-hücre sinyalizasyonu, apoptotik süreç, hücre-matriks adezyonu, endotel hücre migrasyonu, inflamatuvar yanıt, anjiyojenezin pozitif regülasyonu ve hücre şeklinin regülasyonu gibi olaylarda görev aldığı bilinmektedir. **MMP7** (Matrix metalloproteinase 7 (matrilysin, uterine)) geni; çinko iyonu bağlanması, hücre proliferasyonunun regülasyonu, yara iyileşmesi, ESK organizasyonu ve bazı süreçlerde ESM bileşenlerinin yıkımına katılırlar. **SPP1** (Secreted phosphoprotein 1) hidroksiapatite yüksek afinite ile bağlanma özelliği göstermektedir ve osteopontin ya da kemik sialoprotein I olarak da isimlendirilmektedir. Sitokin aktivitesi, ESM bağlanması, biyomineral doku gelişimi, hücre adezyonu, ESM organizasyonu, inflamatuvar yanıt, osteoblast farklılaşması, kemik resorpsiyonunun ve hücre-substrat adezyonunun pozitif regülasyonu gibi birçok süreçte görev almaktadır [80].

Grupları ortak genler dışında artan genler açısından incelediğimizde ise (her bir genin fonksiyonu diğer yüzeylerde de artan aktivite göstermesi durumunda sadece ilk kez anıldığı yerde ayrıntılı olarak açıklanmıştır);

*Kollojen;* **ADAMTS8** (ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 8); ADAMTS (bir trombospondin motifi ile disintegrin ve metalloproteinaz) protein ailesinin bir üyesini kodlar. Heparin bağlanması, integrin bağlanması, çinko iyon bağlanması, metalloproteinaz aktivitesi, metalloendopeptidaz aktivitesi gibi fonksiyonları vardır. Hücre proliferasyonunun negatif düzenlenmesi, fosfat iyonlarının transmembran transport ve proteoliz olaylarında görev yapar. **CDH1** (Cadherin 1, type 1, E-cadherin (epithelial)); bu

gen kaderin süper familyasından klasik bir kaderin genidir. Genin kodladığı protein kalsiyum bağımlı hücre-hücre adezyonundan sorumlu bir glikoproteindir. Beta-katenin, gama katenin, glikoprotein, kalsiyum bağlama fonksiyonları vardır. Adherens bağlantı organizasyonu, apoptotik süreç, hücre bağlantı oluşumu, plazma membranında hücre adezyon moleküllerinin oluşumu, ESM organizasyonu, **plazma membranındaki adezyon molekülleri aracılığıyla homofilik hücre adezyonu**, nükleustan gelen transkripsiyon faktörlerin düzenlenmesi gibi süreçlere katılır. **CNTN1** (Contactin 1); bu gen tarafından kodlanan protein immünoglobulin süper ailesinin bir üyesidir. Hücre adezyonunda görev alan glikozilfosfatidil inositol bağımlı nöronal membran proteini. Karbonhidrat ve glikoprotein bağlanmasından sorumludur. Notch sinyalizasyon yolağı, hücre adezyonu, sodyum iyon transportunun pozitif regülasyonu gibi süreçlere katılır. **CTNND1** (Catenin (cadherin-associated protein), delta 1); Armadillo protein ailesinin bir üyesini kodlar ve hücreler arasındaki adezyon ve sinyal transdüksiyonunda görevlidir. Kaderin bağlanması, protein bağlanması, proteinkinaz bağlanması ve reseptör bağlanması gibi fonksiyonları vardır. Wnt sinyalizasyon yolağında, adherens bağlantı organizasyonunda, hücre adezyonu, hücre bağlantı kurulumu, hücre-hücre bağlantı organizasyonu, **VEGF reseptör sinyalizasyonu** gibi süreçlere katılır. **MMP16** (Matrix metalloproteinase 16 (membrane-inserted)); MMP proteinleri doku oluşumu gibi doğal fizyolojik süreçler sırasında ESM'nin yıkılmasından sorumlu proteinlerdir. Çoğu MMP inaktif olarak salınır ve ekstrasellüler proteinazlar parçalandığında aktive olurlar. Kalsiyum iyon bağlanması, enzim aktivatör aktivitesi, metalloproteinaz aktivitesi, çinko iyon bağlanması gibi görevleri vardır. Kondrosit proliferasyonu, Embriyonik kronofasiyal kemik gelişimi, endokondriyal ossifikasyon, ESM organizasyonu, proteoliz süreçlerine katılır. **MMP9** (Matrix metalloproteinase 9 (gelatinase B, 92kDa gelatinase, 92kDa type IV collagenase)); Matriks metalloproteinaz protein ailesinden olan bu protein de kollojen bağlanması, endopeptidaz aktivitesi, metalloendopeptidaz aktivitesi ve çinko iyon bağlanması fonksiyonlarına sahiptir. Katabolik kollojen süreci, hücre farklılaşması, ESM organizasyonu, **ossifikasyon**, apoptozun pozitif regülasyonu, proteoliz, **iskelet sistemi gelişimi** süreçlerine katılır. **NCAM1** (Neural cell adhesion molecule 1);

immünoglobulin süper ailesi üyesi olan bir hücre adezyon proteinini kodlayan bu gen gelişim sırasında hücre-matriks etkileşiminde olduğu kadar hücre-hücre etkileşimine de dahil olur. Hücre adezyonu, ESM organizasyonu, sitokin aracılı sinyalizasyon yolağında görev alır. **SELE** (Selectin E); sitokin uyarılı endotelial hücrelerde bulunan bir protein kodlayan bu gen vasküler hücre hattındaki hücre adezyonuna aracılık eder. Oligosakkarid, fosfolipaz, protein, sialik asit bağlanması ve transmembran sinyal reseptör aktivitesiyle ilgili görevleri vardır. Aktin filamentleri ile ilgili süreçler, kan koagülasyonu, kalsiyum aracılı sinyalizasyon, plazma membranındaki adezyon molekülleri aracılığıyla heterofilik hücre-hücre adezyonu, inflamatuvar yanıt, interlökin-1 e yanıt gibi süreçlere dahil olur. **SELL** (Selectin L); adezyon/yerleşme reseptörleri ailesine bağlı bir hücre yüzey adezyon molekülünü kodlamaktadır. Bu genin ürünü hücre adezyon moleküllerinin bağlanmasıyla görevli olması bakımından oldukça önemlidir. **SELP** (Selectin P (granule membrane protein 140kDa, antigen CD62)); kalsiyum bağımlı protein bağlanması, glikoprotein bağlanması, glikosfingolipid bağlanması, heparin bağlanması, lipopolisakkarid bağlanması, oligosakkarid bağlanması, sialik asit bağlanması gibi görevleri vardır. Hücre adezyonu, kan koagülasyonu, inflamatuvar yanıt, platelet aktivasyonu, integrin aktivasyonun düzenlenmesi, plazma membranındaki adezyon proteinleri aracılığıyla heterofilik hücre-hücre adezyonu süreçlerine katılır. **VCAM1** (Vascular cell adhesion molecule 1); bu gen bir hücre yüzey sialoglikoproteinini kodlamaktadır. Hücre adezyon moleküllerinin bağlanması, integrin bağlanması gibi görevlerin yanı sıra, yaşlanma, hücre kemotaksisi, hücre-matriks adezyonu, VEGF uyarılarına cevap, TNF uyarılarına cevap, ESM organizasyonu, sitokin aracılı sinyalizasyon yolağı gibi süreçlerde de yer alır [80].

*HAP-Ticari*; **CDH1** (Cadherin 1, type 1, E-cadherin (epithelial)), **CNTN1** (Contactin 1), **CTNND2** (Catenin (cadherin-associated protein), delta 2 (neural plakophilin-related arm-repeat protein)); armadillo/beta-katenin süper ailesinden adhezif bağlantı ilişkili bir protein kodlamaktadır. Bu gen tarafından kodlanan protein E-kaderin hepatosit büyüme faktörü stimülasyonu ile E-kaderin bazı adherens bağlantılarının bozulmasına katkıda bulunur. Temel olarak protein bağlanması görevini üstlenir. Hücre adezyonu, sinaptik plastisitenin düzenlenmesi

süreçlerine katılır. **LAMA3** (Laminin, alpha 3); bu gen tarafından kodlanan protein laminin ailesine ait bir proteindir. Lamininler alfa, beta ve gaba alt ünitelerinden oluşan heterotrimerik proteinlerdir. Lamininler bazal membranın oluşumu ve fonksiyonu için esansiyeldir ve hücre migrasyonu ve mekanik sinyal transdüksiyonunun düzenlenmesinde ilave fonksiyonları vardır. Bu gen tarafından bir alfa alt ünite kodlanır ve keratinosit büyüme faktörü, epidermal büyüme faktörü, insülin benzeri büyüme faktörünün de aralarında olduğu epitelyal mezenkimal regülatörlere cevap verir. Hücre adezyonu, hücre bağlantılarının yerleşimi, ESM organizasyonu, hemidesmozom kurulumu, hücre adezyonunun ve hücre migrasyonun regülasyonu süreçlerinde rol alır. **MMP8** (Matrix metalloproteinase 8 (neutrophil collagenase)); MMP ailesinden olan bu gen Katabolik kollojen prosesi, hücre farklılaşması, ESM organizasyon, proteolizis süreçlerine dahil olur ve kalsiyum iyon bağlanması, çinko iyon bağlanması gibi fonksiyonları vardır. **MMP9** (Matrix metalloproteinase 9 (gelatinase B, 92kDa gelatinase, 92kDa type IV collagenase)), **NCAM1** (Neural cell adhesion molecule 1), **SELP** (Selectin P (granule membrane protein 140kDa, antigen CD62)), **SGCE** (Sarcoglycan, epsilon); sarkoglikan ailesinin epsilon üyesini kodlamaktadır. Sarkoglikanlar ekstrasellüler matriksdeki aktin hücre iskeletine bağlanan distrofin-glikoprotein kompleksinin bileşenleri olan transmembran proteinleridir. Ailenin diğer üyeleri sadece kas hücrelerinde ekspresyon olurken, epsilon sarkoglikanların ekspresyon alanları çok daha geniştir. Kalsiyum iyon bağlanmasında görev alırken, hücre-matriks adezyonu sürecine dahil olurlar. **SPG7** (Spastic paraplegia 7 (pure and complicated autosomal recessive)); AAA ailesinden mitokondriyal metalloproteinaz proteinini kodlayan bu gen proteolizis, protein katlanması, organel biyogenezi, membran trafiği, intrasellüler motilite gibi hücresel süreçlerde rol oynamaktadır. Ayrıca çinko iyon bağlanmasında ve ATP bağlanmasında da görev alır. Proteolizis ve mitokondri organizasyonuna da katılır. **THBS3** (Thrombospondin 3); trombospondin ailesine bağlı bir gendir. Bu aile proteinleri hücre-hücre ve hücre-matriks etkileşiminde aracılık eden adheziv glikoproteinlerdir. **TIMP2** (TIMP metalloproteinase inhibitor 2); matriks metalloproteinazların doğal inhibitörü olan bu TIMP gen ailesinden bir protein kodlar. MMP'lerin inhibisyonuna ek olarak endotel hücrelerin proliferasyonunu

baskılamaktadırlar. Integrin bağlanması, metal iyon bağlanması, protein bağlanması, enzim aktivasyon aktivitesi, metalloendopeptidaz inhibitör aktivitesi ve protein bağlanması gibi görevleri vardır. Yaşlanma, organik maddelere hücre sel yanıt, ESM organizasyonu, hücre proliferasyonunun ve endopeptidaz aktivitesinin negatif düzenlenmesi, sitokinlere, ilaçlara ve hormonlara yanıt, MAPK kaskatının pozitif regülasyonu gibi proseslere katılır [80].

*HAP-Ag*; **ADAMTS13** (ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif, 13); kalsiyum iyon bağlanması, integrin, metalloendopeptidaz, protein ve çinko iyon bağlanması gibi görevleri olmakla birlikte, hücre-matriks adezyonu, metabolik süreçteki hücre sel proteinlerle ilgili proses, glikoprotein metabolik süreci, proteoliziz, interferon gama, interlökin-4, TNF ve toksik maddelere yanıt gibi olaylara da katılır. **ADAMTS8** (ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif, 8), **CDH1** (Cadherin 1, type 1, E-cadherin (epithelial)), **COL15A1** (Collagen, type XV, alpha 1); bağ doku stromasında bazal membranda lokalize olan tip XV kollojenin alfa zincirini kodlayan bu gen ESM'nin yapısal bileşimi için çok önemlidir. Anjiyojenez, hücre adezyonu, hücre farklılaşması ve sinyal transdüksiyonunda görev yapar. **LAMC1** (Laminin, gamma 1 (formerly LAMB2)); lamininler, bazal membranda ana nonkollojenöz bileşenlerden olan ESM glikoproteinleridir. Hücre adezyonu, farklılaşması, migrasyon, sinyalizasyon metastaz gibi pek çok biyolojik sürece dahil olurlar. Bu gen ürünü hücre migrasyonu, hücre adezyonu, ESM organizasyonu, hemidesmozom oluşumu, hücre yayılımı-substrat adezyonu gibi süreçlerde görev yapar. **MMP1** (Matrix metallopeptidase 1 (interstitial collagenase)); kalsiyum ve çinko iyon bağlanması, endopeptidaz ve metalloendopeptidaz aktivitesi gibi görevleri vardır. Kan koagülasyonu, hücre sel proteinlerin metabolik süreci, ESM organizasyonu, proteoliziz süreçlerine dahil olur. **MMP10** (Matrix metallopeptidase 10 (stromelysin 2)); kalsiyum ve çinko iyon bağlanması, metalloendopeptidaz aktivitesi yanında ESM organizasyonu, hücre migrasyonun düzenlenmesi gibi olaylarda yer alır. **MMP3** (Matrix metallopeptidase 3 (stromelysin 1, progelatinase)) da aynı şekilde kalsiyum ve çinko iyon bağlanması, endopeptidaz ve metalloendopeptidaz aktivitesi gibi fonksiyonlara sahiptir. Nitrik okside hücre sel cevap, ESM organizasyonu, protein

oligomerizasyonu, proteoliziz ve hücre migrasyonun düzenlenmesi süreçlerinde de görev almaktadır [80].

*HAP-ZAg*; **ADAMTS13** (ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif, 13), **CNTN1** (Contactin 1), **ITGA1** (Integrin, alpha 1); kollojen ve lamininin bir hücre-yüzey reseptörü olan protein kodlamaktadır. Kollojen, metal iyon, protein, protein fosfataz ve reseptör bağlanmasında, kollojen bağlı hücre-matriks adezyonunda rol oynar. MAPK aktivasyonu, kan koagülasyonu, ESM organizasyonu, integrin aracılı sinyalizasyon, hücre proliferasyonun negatif regülasyonu gibi olaylara da dahil olur. **ITGA6** (Integrin, alpha 6); bu genin ürünleri olan proteinler hücre yüzey proteinleridir ve hücre yüzeyindeki sinyalizasyona ve hücre adezyonuna katıldıkları bilinmektedir. İntegrin, laminin, metal iyon bağlanması olaylarında iş görürler. Hücre-matriks adezyonu, hücre-substrat adezyonu, hücre-substrat bağlantılarının kurulması, ekstrasellüler uyarılara cevap, filopodyum oluşumu, apoptotik sürecin pozitif düzenlenmesi gibi önemli süreçlere dahil olurlar. **ITGAM** (Integrin, alpha M (complement component 3 receptor 3 subunit)); glikoprotein, heparin, metal iyon, protein bağlanması ve protein heterodimerizasyon aktiviteleri vardır. Hücre adezyonu, ESM organizasyonuna dahil olurlar. **MMP10** (Matrix metallopeptidase 10 (stromelysin 2)), **MMP13** (Matrix metallopeptidase 13 (collagenase 3)); diğer MMP'lerde olduğu gibi kalsiyum iyon bağlanması, kollojen bağlanması, çinko iyon bağlanması gibi fonksiyonlarla birlikte **kemik minerilizasyonu, kemik morfogenezi**, katabolik kollojen prosesi, endokondriyal ossifikasyon, ESM organizasyonu ve proteoliziz süreçlerinde de görev alır. **MMP15** (Matrix metallopeptidase 15 (membrane-inserted)); kalsiyum, protein ve çinko iyon bağlanması, enzim aktivatör aktivitesi ve metalloendopeptidaz fonksiyonları vardır. Hücre proteinlerin modifikasyonunda, katabolik kollojen prosesinde, ESM organizasyonunda, proteolizizde görev alırlar. **MMP8** (Matrix metallopeptidase 8 (neutrophil collagenase)), **MMP9** (Matrix metallopeptidase 9 (gelatinase B, 92kDa gelatinase, 92kDa type IV collagenase)), **NCAM1** (Neural cell adhesion molecule 1), **SELE** (Selectin E), **SELP** (Selectin P) [80].

*HAP-ZAgCu*; **CDH1** (Cadherin 1, type 1, E-cadherin (epithelial)), **CTNND2** (Catenin (cadherin-associated protein), delta 2 (neural plakophilin-

related arm-repeat protein)), **LAMA1** (Laminin, alpha 1); ESM'nin yapısal bileşenidir. Protein ve reseptör bağlanmasında iş görür. Ayrıca hücre adezyonu, hücre yüzey reseptör sinyalizasyonu, hücre göçünün düzenlenmesi, doku gelişimi gibi süreçlere katılır. **MMP10** (Matrix metalloproteinase 10 (stromelysin 2)), **MMP12** (Matrix metalloproteinase 12 (macrophage elastase)); kalsiyum ve çinko iyon bağlanması, endopeptidaz ve metalloendopeptidaz aktivitesi gibi fonksiyonları vardır. Diğer MMP'lerin de rol aldığı ortam MMP aktiviteleri dışında yara iyileşmesi sürecine katılır. **MMP13** (Matrix metalloproteinase 13 (collagenase 3)), **MMP15** (Matrix metalloproteinase 15 (membrane-inserted)), MMP16 (Matrix metalloproteinase 16 (membrane-inserted)), **SELE** (Selectin E) [80].

Gruplarda kontrole göre ekspresyonu azalan genler ise;

**Kollojen;** ITGA8 (HAP-Ag grubunda da azalmış), KAL1 (bütün gruplarda azalmış), LAMA3 (HAP-Tic dışındaki bütün gruplarda azalmış), LAMB3 (HAP-Tic dışındaki bütün gruplarda azalmış).

**HAP-Tic;** COL6A2 (HAP-Ag ve HAP-ZAgCu grubunda da azalmış), CTGF (HAP-ZAg grubunda da azalmış), ITGA4 (HAP-Ag ve HAP-ZAgCu grubunda da azalmış), ITGA7 (kollojen hariç hepsinde azalmış), KAL1 (bütün gruplarda azalmış), SELE (HAP-Ag grubunda da düşmüş), SELL (kollojen hariç hepsinde azalmış), VCAM1 (HAP-Ag grubunda da seviyesi düşmüş).

**HAP-Ag;** CLEC3B (diğer gruplarda seviyesinde bir değişim olmamış), COL12A1 (HAP-ZAgCu grubunda da azalmış), COL1A1 (HAP-ZAgCu grubunda da azalmış), COL5A1 (HAP-ZAgCu grubunda da azalmış), COL6A1 (HAP-ZAgCu grubunda da azalmış), COL6A2 (HAP-ZAgCu grubunda da azalmış), COL7A1 (HAP-ZAgCu grubunda da azalmış), ICAM1 (diğer gruplarda seviyesinde bir değişiklik olmamış), ITGA4 (HAP-Ag ve HAP-ZAgCu gruplarında da azalmış), ITGA7 (kollojen grubu hariç bütün gruplarda azalmış), ITGA8 (kollojen grubunda da seviyesinde azalma olmuş), ITGAL (bir tek bu grupta seviyesi düşmüş), ITGB4 (HAP-ZAg grubunda da azalmış), KAL1 (bütün gruplarda azalmış), LAMA3 (HAP-Tic grubu dışındaki bütün gruplarda azalmış), LAMB1 (HAP-ZAg ve HAP-ZAgCu grubunda da azalmış), LAMB3 (HAP-Tic

dışındaki bütün gruplarda azalmış), MMP13 (bu grupta azalırken HAP-ZAg ve HAP-ZAgCu gruplarındaki seviyesi artmış), MMP14 (HAP-ZAg ve HAP-ZAgCu gruplarında da azalmış), MMP15 (bir tek bu grupta düşmüş), MMP8 (bir tek bu grupta düşmüş), SELE (HAP-Tic grubunda da seviyesi azalmış), SELL (kollojen hariç bütün gruplarda azalmış), SPARC (bir tek bu grupta düşmüş), SPG7 (bir tek bu grupta düşmüş), THBS1 (bir tek bu grupta düşmüş), THBS2 (bir tek bu grupta düşmüş), THBS3 (HAP-ZAg'da da azalmış), VCAM1 (HAP-Tic'de de düşmüş), VTN (bir tek bu grupta düşmüş).

**HAP-ZAg;** ADAMTS8 (HAP-ZAgCu grubunda da seviyesi azalmış), CDH1 (diğer bütün gruplarda artarken burada azalmış), CTGF (HAP-Tic grubunda da seviyesi düşmüş), HAS1 (HAP-ZAgCu grubunda da azalmış), ITGA7 (kollojen grubu hariç hepsinde azalmış), ITGB1 (HAP-ZAgCu grubunda da azalmış), ITGB4 (HAP-Ag grubunda da seviyesi düşmüş), KAL1 (bütün gruplarda azalmış), LAMA3 (HAP-Tic dışındaki bütün gruplarda azalmış), LAMB1 (HAP-Ag ve HAP-ZAgCu gruplarında da seviyesinde düşüş meydana gelmiş), LAMB3 (HAP-Tic dışındaki bütün gruplarda azalmış), MMP11 (HAP-ZAgCu grubunda da azalmış), MMP14 (HAP-ZAg ve HAP-ZAgCu gruplarında da azalmış), SELL (kollojen hariç bütün gruplarda azalmış), THBS3 (HAP-Ag grubunda da düşmüş), VCAN (HAP-ZAgCu grubunda da azalmış).

**HAP-ZAgCu;** ADAMTS8 (HAP-ZAg grubunda da seviyesi azalmış), COL15A1 (HAP-Ag grubunda seviyesi artmış), COL12A1-COL1A1-COL5A1-COL7A1--COL6A1 (HAP-Ag grubunda da seviyesi düşmüş), COL6A2 (HAP-Ag ve HAP-ZAg gruplarında da seviyesi düşmüş), HAS1- ITGB1 (HAP-ZAg grubunda da düşmüş), ITGA4 (HAP-Tic ve HAP-Ag gruplarında da düşmüş), ITGA7 (kollojen hariç bütün gruplarda azalmış), ITGB1 (HAP-ZAg grubunda da düşmüş), KAL1 (bütün gruplarda azalmış), LAMA2 (bir tek bu grupta düşmüş), LAMA3 (HAP-Tic dışındaki bütün gruplarda azalmış), LAMB1 (HAP-Ag ve HAP-ZAg gruplarında da seviyesi azalmış), LAMB3 (HAP-Tic dışındaki bütün gruplarda azalmış), MMP11 (HAP-ZAgCu grubunda da azalmış), MMP14 (HAP-ZAg ve HAP-ZAgCu gruplarında da azalmış), MMP2 (bir tek bu grupta düşmüş), PECAM1 (bir tek bu grupta düşmüş), SELL (kollojen hariç bütün gruplarda



azalmıř), SELP (bir tek bu grupta dūřmūř), TIMP2 (bir tek bu grupta dūřmūř),  
VCAN (HAP-ZAg grubunda da azalmış).

#### 4. TARTIŞMA

Yaklaşık 50 yıl önce biyomalzemelerle yapılan ilk çalışmalarla birlikte hayatımıza giren rejeneratif tıp, kök hücre ve biyomühendislik alanları her geçen gün yapılan çalışmalarla ihtiyacı karşılamaya bir adım daha yaklaşmakla birlikte özellikle bu tezin konusu olan kemik biyomühendisliği ve implant materyalleri ve bunların tedavideki yansımaları göz önünde bulundurulduğunda her ne kadar osteointegre implantlarla tedavi kavramı çoğunlukla başarılı bir yaklaşım olarak kabul edilse de, implantasyon sırasında yaşanan sıkıntılardan, hastanın implantı kabulüne, daha sonra implantın vücut içerisindeki kalma süresine ve oluşan immünolojik yanıt ile enfeksiyon riskine bakıldığında çoğunlukla hastanın yaşam kalitesini düşürmesi nedeniyle problem oluşturmaktadır. Ayrıca diyabet ve radyoterapi gibi medikal engelleri bulunan hastalarda implant uygulanmasının sakıncalı olduğu bilinmektedir [53]. Bu nedenle hala osteoindüktif ve osteointegrasyonu hızlandıracak antibakteriyal malzemelerin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Literatürden elde edilen veriler incelendiğinde açıkça görülmektedir ki, aynı malzeme tipiyle farklı laboratuvarlarda yapılan birçok çalışma sonucu farklılık göstermektedir. Bu, malzemelerin hazırlanış biçimindeki farklılıktan kaynaklandığı gibi biyouyumluluk için kullanılan test yöntemleri ve kullanılan hücreye bağlı olarak da değişmektedir. Ayrıca hücrelerin implant yüzeyinde verdiği tepki ve bu sırada gerçekleşen moleküler olaylar henüz tam anlamıyla anlaşılammış olduğundan hücrenin tepkisi ile ilgili yapılacak çalışmalar ve literatürde yer alacak bilgiler bu alanda yapılacak çalışmalarını hızlandırmak ve doğru sonuçlara daha kısa sürede ulaşabilmek için oldukça önem taşımaktadır.

Bu çalışma, değişik kimyasal ve yüzey özelliklerine sahip metal katkı (Ag, Cu ve Zn) HAP nanokaplama malzemeler üzerinde büyütülen iMKH'lerinin canlılığı ve osteoblastik farklılaşma potansiyelleri ile substrat-materyal arasındaki ilişkiyi ve hücre davranışını incelemektedir.

Biyolojik aktivitesi yüksek bir biyomalzemenin tasarımı ve biyouyumluluğunun tespiti sırasında yapılacak çalışmalarda malzemenin uyumluluğunun belirlenmesi için sorulacak pek çok önemli soruya yanıt aramak

gerekmektedir. Bu tez çalışmasında HAP kökenli Zn, Ag ve Cu metal iyonları içeren seramik tozların kemik implant materyali olarak kullanım potansiyelinin değerlendirilebilmesi için sorulabilecek sorulardan en önemlileri olduğunu düşündüğümüz bir kaç noktaya cevap aramaya çalışılmıştır.

- Kullanılacak metal iyon katkılı nano seramik malzemeler MKH üzerinde herhangi bir toksik etki gösteriyor mu?

- Çalışmada kullanılan metal iyon katkılı HAP malzemeler günümüzde yaygın kullanıma sahip olan ticari HAP'e göre ne gibi avantaja sahiptir?

- Kullanılan biyomalzeme üzerinde büyütülen hücrelerin farklılaşma kapasitelerinde ve hızlarında bir değişiklik görülüyor mu?

- Malzemeler üzerinde hücreler adezyon gösteriyor mu?

- Yapılan çalışmalar bundan sonra yapılacak çalışmalara nasıl yol gösterecek?

**- Kullanılacak metal iyon katkılı nano seramik malzemeler MKH üzerinde herhangi bir toksik etki gösteriyor mu?**

Biyolojik olarak zararlı maddelere maruz kalan hücrelerde bazı morfolojik değişiklikler görülebilir, hücre büyüme oranı değişebilir, hücre ölümü ve hücre parçalanması görülebilir. Bu nedenle, hücre canlılığını göstermek deneysel farmakoloji çalışmalarında zorunludur. Biyomalzemeler geliştirilirken sorulacak ilk soru malzemenin toksik olup olmadığıdır. İncelenen malzemenin sitotoksitesini ve hücre canlılığını değerlendirmek için çeşitli yollar bulunmaktadır. 1) Mitokondriyal aktiviteyi ölçmek, 2) Hücre membran bütünlüğünü değerlendirmek, 3) Sağlıklı DNA miktarını analiz etmek bunlardan bazılarıdır. Mitokondriyal aktivitedeki değişiklikler MTT (3-(4,5-dimethyl-2-thiazol)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) kullanılarak belirlenebilir [70]. Hücre membran bütünlüğü ise laktat dehidrogenaz enzim miktarı ile değerlendirilebilir. Hücrelerdeki kırılmamış, çift iplikli DNA miktarı ise DNA'ya

bağlanan spesifik boyalar yardımıyla tespit edilebilir. Bu tez çalışmasında MKH'lerin Zn, Ag ve Cu metal iyonları içeren nanoseramik yüzeyler üzerindeki proliferatif aktiviteleri ve kullanılan malzemelerin toksisitesi MTT, LDH ve Picogreen yöntemleri ile incelenmiştir.

Gümüş, uzun yıllardır dezenfektan olarak bilinmekte ve memeli hücrelerine düşük toksisite gösterirken, çok geniş spektrumda antibakteriyal özelliğe sahip olması nedeniyle oldukça önemli bir metal iyonudur. HAP kaplamaların Ag ile birleştirilmesinde en yaygın teknik, AgNO<sub>3</sub> içerisine daldırılan HAP'ın, zaman içerisinde HAP içerisindeki Ca iyonu ile Ag iyonunun karşılıklı değişimine dayanmaktadır. Ag iyonunun düşük miktarları antibakteriyal etki gösterirken, yüksek miktarları toksik olabilir. Bu nedenle, hazırlanacak malzemelerdeki Ag konsantrasyonunun sitotoksik etki bırakmayacak optimum antibakteriyal özellik gösterecek şekilde ayarlanması kritik öneme sahiptir [61].

MTT testinden elde edilen sonuçlara bakıldığında 1. ve 7. günlerde HAP-Tic yüzeyindeki hücrelerin canlılığında kontrole göre artış meydana gelirken 21. ve 28. günlerde kontrole göre hücre sayısının yaklaşık olarak %30 oranında azaldığı görülmektedir. Benzer şekilde HAP-Ag, HAP-ZAg ve HAP-ZAgCu yüzeylerinde hücrelerin hücre canlılığı 1. ve 7. günlerde kontrole göre artış göstermişken 21. ve 28. günlerde kontrol seviyesinde kalmıştır. Aynı durum hem OS+, hem de OS- gruplar için geçerlidir. HAP-Tic üzerindeki hücrelerde görülen kontrole oranla %30 oranındaki düşüş zamana bağlı olarak toksik bir etkiye bağlı olarak ortaya çıkmış olabileceği gibi bu düşüş Ticari HAP'ın MKH'lerde farklılaşmayla birlikte değişen hücre metabolizmasına bağlı olarak mitokondriyal dehidrogenaz aktivitesinin düşmesine de bağlı olabilir. Ancak metal iyon katkılı yüzeyler üzerinde büyütülen hücrelerde 21. ve 28. günlerde ölçülen OD değerleri kontrolle aynı seviyede görülmektedir. İlk hafta elde edilen sonuçlara göre daha düşük bir seviye elde edilmesi zamana bağlı olarak gerçekleşen osteojenik farklılaşmaya bağlı olarak açıklanabilir. Düşük proliferasyon oranı bariz olarak hücrelerin farklılaşmaya gittiğini gösterdiği bilinmektedir [48].

LDH deneyinden elde edilen sonuçlara bakıldığında bütün yüzeylerden elde edilen verilerin kontrolle ve birbiriyle yaklaşık olarak aynı seviyede olduğu görülmektedir. Zamana bağlı olarak belirgin bir değişim olmamıştır. HAP-Ag ile

kaplanmış yüzeyler üzerindeki hücrelerden LDH enzim varlığıyla bağlantılı olarak elde edilen hücre canlılığını gösteren OD değerlerinin OS- grupta diğer tüm gruplara ve OS+ gruptaki HAP-Ag değerlerine göre biraz daha yüksektir.

Metal iyon içeren nanokaplama yüzeyler üzerinde farklılaşmaya alınan hücrelerin sahip olduğu sağlıklı DNA miktarı ile ilgili veriler diğer deney sonuçlarıyla uyumlu olarak nanomalzemelerin herhangi bir toksik etki bırakmadığını doğrulamaktadır. OS+ ortamdaki hücreler arasında 1. gün DNA içeriği en yüksek olan hücre grubu HAP-ZAgCu kaplı yüzeylerde yetişen hücreler iken, 7. günde kontrol grubundan sonra HAP-Tic, 21. ve 28. günde HAP-ZAg gruplarında yetişen hücrelerdir. OS- ortamda büyütülen hücrelerde ise 1. gün HAP-Tic, HAP-Ag ve HAP-ZAgCu yüzeylerindeki hücre içeriğinden elde edilen sağlıklı DNA miktarları birbirine çok yakın ve diğer gruplardan daha yüksek seviyededir. 7. gündeki değerler birbirine oldukça yakın, 21. ve 28. günde ise HAP-ZAg ve HAP-ZAgCu üzerindeki hücrelerin DNA miktarı en yüksek olarak tespit edilmiştir. Ayrıca OS+ ve OS- gruplar arasında bir karşılaştırma yapılacak olursa OS- grupdan elde edilen OD değerlerinin OS+ gruptan daha yüksek olduğu görülmektedir. Hücrelerdeki DNA içeriğinin MTT deneyinden elde edilen verilerine benzer şekilde zamana bağlı olarak bir miktar düşüş göstermekte fakat kontrol değerlerinin altına düşmemektedir.

Hücre canlılığını ve proliferasyonunu değerlendirmek için yapılan MTT, LDH ve DNA içeriği belirleme deneylerinin sonuçları arasında görülen küçük farklılıklar kullanılan testlerin her birinin dayanak noktasının ve hassasiyetlerinin farklı olması ile açıklanabilir. Hücre canlılığının herhangi bir madde ya da materyale göre nasıl değiştiğinin tespit edilmesi sırasında birden fazla parametrenin değerlendirilmesi önerilmektedir [73, 81, 82].

Nanokompozitlere hücre tutunmasının hücre proliferasyonunu etkilediği bilinmektedir. Mikro ölçüdeki klasik kompozitlerin HAP parçacıklarının neden olduğu pürüzlülüğün hücrenin çoğalma hızını geriletmediği, aksine nanokompozitlerin ise olumlu bir etki bıraktığı rapor edilmiştir [48, 54]. Tripathi ve arkadaşlarının çalışmasında (2012), Cu-Zn alaşımı nanopartiküller kullanılarak yapılan çalışmalarda, bu hücre iskelelerinin sıçan osteoprogenitör hücrelerinde toksik olmadığı, antibakteriyal özellik gösterdiği ve protein absorpsiyonunu

artırdığı gösterilmiştir [59]. 2008 yılında, Faria ve grubu tarafından çinko ile modifiye edilmiş HAP'ın yüzey özellikleri ile ilgili bir çalışma yayınlanmıştır [83]. Pishbin ve grubunun yayınladığı bir çalışmada, gümüş içerikli biyocam ve kitosan kompozit malzemelerde düşük konsantrasyonlardaki Ag içeriğinin, 7 güne kadar yapılan ölçümlerde ostoblastik hücrelerde proliferasyonu desteklediği ancak yüksek konsantrasyonlarda sitotoksik etki bıraktığı söylenmektedir [84].

**- Çalışmada kullanılan metal iyon katkılı HAP malzemeler günümüzde yaygın kullanıma sahip olan ticari HAP'e göre ne gibi avantajlara sahiptir?**

Kalsiyum fosfat içeren malzemeler yüksek biyoyumluluk özellikleri ve kemik doku oluşumunu destekleme yeteneklerinden dolayı kemik onarımı ve kemik doku mühendisliği çalışmalarında tercih edilmektedirler. Yapılan çalışmalar HAP ve trikalsiyum fosfat içeren biyomalzemelerin hücre adezyonunu, göçünü, çoğalmasını ve farklılaşmasını desteklediğini göstermektedir [44].

Daha önceden gümüş nanopartiküllerin memeli germ kök hücrelerinde mitokondriyal fonksiyonu azalttığı, membran geçirgenliğini/sızıntısını artırdığı ve BRL 3A rat karaciğer hücrelerinde reaktif oksijen türlerini (ROS) artırdığı, antioksidant GSH içeriğini tükettiği ve mitokondriyal fonksiyonu azalttığı rapor edilmiştir [62]. Ancak biyomalzemelerin hazırlanmasında kullanılacak olan metal iyonlarının miktarının bu hücresel etkiyi değiştirebileceği bilinmektedir. Literatürde Ag, Cu ve Zn'nin artan doza bağlı olarak toksik etki bıraktığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Bu açıdan değerlendirildiğinde çalışma sonuçlarımızın literatürle uyumlu olduğu görülmektedir. Örneğin; Tripathi ve arkadaşları (2012), çinko iyon katkılı HAP'ın ve bakır iyon katkılı HAP'ın antibakteriyal aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir [59]. Kalita ve Bhatt'ın bir çalışmasında (2007) magnezyum ve çinko katkılı nanokristal yapıdaki HAP'ın sentezi ve karakterizasyonu ile birlikte biyoaktivitesi ve biyodegradasyon davranışı SBF (Simulated body fluid) içerisinde incelenmiş ve yapının stabil kaldığı gösterilmiştir [58]. Ciobanu ve ark. (2011)'in çalışmasında Ag katkılı

nano-HAP'ın hazırlanması, karakterizasyonu ve antibakteriyal özelliği ortaya konulmuş ve farklı konsantrasyonlardaki Ag içeriğinin malzemeye güçlü antibakteriyal özellik kazandırdığı gösterilmiştir [61].

Tüm bu çalışmalara ilave olarak yaptığımız deneyler de göstermektedir ki, nano HAP yapısına ilave edilen Ag, Zn ve Cu metal iyonları hücre canlılığı ve farklılaşmanın yönlendirilmesinde olumlu etki yaptığı gibi malzemeleme güçlü antibakteriyal özellik kazandırmaktadır.

Diğer bir taraftan ise, doku mühendisliğinde kök hücre teknolojisi, büyüme faktör teknolojisi ve biyomalzeme teknolojisi olmak üzere 3 yaklaşım uygulanmaktadır. Yaptığımız çalışma ile bu yaklaşıma bağlı olarak kullandığımız metal içerikli nano boyutlu HAP biyomalzemelerin dışarıdan büyüme faktörü eklenmeksizin kök hücre gelişimini ve farklılaşmasını uyarması hedeflenmiştir.

#### **- Kullanılan biyomalzeme üzerinde büyütülen hücrelerin farklılaşma kapasitelerinde ve hızlarında bir değişiklik görülüyor mu?**

Osteojenik hücrelerin farklılaşmalarını gösteren parametrelerden biri alkalen fosfataz enziminin spesifik aktivitesidir [53]. Kemikte osteoblastların oluşturduğu gözenekler arasındaki osteoid yapının içerisinde  $Ca^{+2}$  tuzları çökerek bu matriksi sertleştirirler. Matriksteki ara madde içerisinde  $Ca^{+2}$  tuzları çökmeden önce osteoblastlar sitoplazmaları içerisinde bol miktarda alkalen fosfataz enzimi oluştururlar ve daha sonra sitoplazma dışına salırlar. Bu şekilde osteoblastların salgıladığı alkalen fosfataz enzimi kemik mineralizasyonunda ve ayrıca kollojen fibrillerinin oluşumunda önemli bir rol oynamaktadırlar [48].

Birlikte ele alındığında alkalen fosfataz aktivitesi ve AK boyamada tespit edilen kalsiyum birikimi osteojenik farklılaşmanın açıklanması için en uygun metodlardandır. Osteojenik farklılaşma ayrıca, hücrenin tutunması, proliferasyonu ve hücre dışı matriksin mineralize edilmesiyle ilişkili olan, birkaç kalsiyum bağlanma bölgesi içeren bir fosfoprotein olan osteopontin gibi son derece önemli osteojenez markırı ile de değerlendirilebilir.

MKH'lerin metal katkılı HAP yüzeyler üzerindeki farklılaşma kapasitelerini değerlendirmek amacıyla yapılan AK boyama sonuçları hem OS+, hem de OS- ortamda hücre sitoplazmasındaki kalsiyum birikimin oldukça yüksek olduğunu göstermektedir. Özellikle OS- gruptan elde edilen sonuçlar hücrelerin herhangi bir farklılaşma uyarımı olmadan sadece yüzeylerin osteojenezi uyarmasıyla en az OS+ varlığındaki kadar iyi farklılaştığını göstermektedir. MKH'lerin matris sertliği, hücre çevresinin büyüklüğü ve şekli ve mekanik güç gibi çevredeki fiziksel işaretlere yanıt olarak kendiliğinden farklılaştıkları bilinmektedir [67].

Buna bağlı olarak osteojenik farklılaşmanın biyokimyasal olarak ölçülmesi sonucu elde edilen veriler OS+ için en yüksek ALP seviyesinin 7. gün HAP-ZAgCu yüzeyleri üzerindeki hücrelerde görüldüğünü, 21. günde HAP-Ag, HAP-ZAg ve HAP-ZAgCu yüzeyleri üzerindeki hücrelerde birbirine çok yakın ve oldukça artmış olduğunu, 28. günde ise ALP miktarı HAP-Ag > HAP-ZAgCu > HAP-ZAg > HAP-Tic olacak şekilde sıralanabilir. ALP aktivitesinin zamana bağlı olarak artış gösterdiği net bir şekilde görülmektedir. Aynı şekilde OS- deney grubundan elde edilen sonuçlar da hücre farklılaşmasının gerçekleştiğini, zamana bağlı olarak ALP miktarının arttığını ve en yüksek değerlerin 7. ve 21. gün HAP-Ag yüzeylerinde farklılaşan hücrelerde, 28. günde ise HAP-ZAg yüzeylerinde olduğunu söyleyebiliriz. HAP-ZAg/OS- gruptan elde edilen OD değerlerinin OS+ gruplardaki rakamlara oldukça yakın olması hücre farklılaşmasının osteojenik kokteyl olmadan metal iyon içeren yüzeyler tarafından uyarıldığını göstermektedir.

İlk haftanın sonunda; OS+ gruplar göz önünde bulundurulduğunda HAP-ZAgCu yüzeyi üzerindeki hücrelerde hem DNA içeriğinin hem de ALP enzim aktivitesinin yüksek olduğu görülmektedir. Bu durum MKH'lerde artan farklılaşma ile birlikte çekirdeklenen osteoblast sayısının artmasıyla da yorumlanabilir. OS+ grupta, HAP-Ag yüzeyinde hücre sayısının attığı, farklılaşma üzerindeki etkisinin ise hücre sayısındaki artışa oranla biraz daha düşük olduğu söylenebilir. OS- grupta ise HAP-Ag yüzeylerinin hem hücre sayısının artışı hem de farklılaşma açısından oldukça etkili olduğu, onun ardından



ise en etkili yüzeyin her iki aktivite için HAP-ZAgCu yüzey kaplaması olduğu görülmektedir.

21. günde OS+ gruplarda yapılan analizlere göre HAP-ZAg yüzeylerinde hem sayısının hem de hücre farklılaşmasının arttığı görülmektedir. En yüksek farklılaşma miktarı ve MTT sonuçlarına göre en yüksek hücre sayısı aşağı yukarı şu şekilde sıralanabilir: HAP-Ag > HAP-ZAg = HAP-ZAgCu. LDH ve DNA miktar ölçümüne bağlı olarak elde edilen sonuçlarda en yüksek hücre canlılığı ise HAP-ZAg yüzeylerindeki hücrelerde görülmüştür. OS- gruplardan elde edilen veriler de bu sonuçlara benzemektedir.

Bir aylık inkübasyonun ardından elde edilen veriler de en aktif yüzeylerin HAP-ZAg ve HAP-ZAgCu olduğunu ve bütün deneylerin aşağı yukarı birbirine yakın sonuçlar verdiğini göstermektedir.

Bu deneylerin hepsine bakıldığında metal iyon katkılı HAP nanoseramiklerin Ticari HAP'dan daha yüksek biyolojik aktivite gösterdiğini ve hücre farklılaşmasını uyarda tek başlarına da yeterli olduğunu ortaya koymaktadır. HAP yapı içerisine gömülen metal iyonlarının toksik etki bırakmadığı, aksine hücreleri osteojenik farklılaşma için uyardıkları görülmektedir.

Ayrıca rt-PCR deneylerinden elde edilen verilere göre osteopontin ekspresyonundaki değişim şu şekilde sıralanabilir: **HAP-Ag > HAP-ZAg > Kontrol > Kollojen > HAP-ZAgCu > Poli-l-lizin > HAP-Tic.** 14. günde OS-gruptan elde edilen bu veriler 7. Günde ALP deneyinden elde edilen verilere oldukça yakındır. Ve sonuçlara bakıldığında ticari HAP ile kaplanmış yüzeylerdeki hücrelerin osteopontin ekspresyonunun en düşük grup olduğu görülmektedir.

Bir proliferasyon aşamasından sonra MKH'ler farklılaşırlar ve hücre dışı matris üretirler. Artan ALP aktivitesi osteojenik farklılaşmanın ilk işaretleri olarak bilinirken, osteopontin ekspresyonu son işaret olarak değerlendirilmektedir.

Osteopontin aktivitesine bağlı olarak osteojenik farklılaşmanın değerlendirilmesinde literatürde 1 ila 28 gün arasında değişen uzun dönemli çok farklı ölçüm aralıkları belirlenmiştir. Öncelikli olarak elde ettiğimiz AK boyama ve alkalin fosfataz spesifik aktivitesi ölçümüne ve literatürde yer alan

protokollere bakılarak osteopontin için ölçümler hücrelerin yüzeyler üzerinde farklılaşmaya alınmasından sonraki 14. günde yapılmıştır.

Mezenkimal kök hücrelerin kültür ortamında askorbik asit,  $\beta$ -gliserofosfat ve dekzametazon içeren farklılaşma kokteyli eklenmiş medyum içerisinde kültüre edildiklerinde farklılaştığı bilinmektedir [85]. Askorbik asit, osteoblastik markırların ekspresyonu ve osteoblast hücrelerinin mineralizasyonu için gereklidir.  $\beta$ -gliserofosfat inorganik fosfat kaynağı olarak yine mineralizasyon için gerekmektedir. Dekzametazonun askorbik asit ve  $\beta$ -gliserofosfat ile kombinasyonlarından oluşan osteojenik kokteyl osteojenik farklılaşmayı uyarmaktadır. Çalışmamızda osteojenik kokteyl içeren grupların yanı sıra hücreler aynı sürelerde farklılaşma medyumunu içermeyen ortamlarda da bekletilmiştir. Bu şekilde osteojenik kokteyl içermeyen ortamda malzemelerin farklılaşma üzerinde herhangi bir etki yapıp yapmadığı incelenmiştir.

Mükemmel biyouyumlulukları ve biyoaktiviteleri sayesinde HAP seramikleri kemik greftlerinde, dental cihazlarda kemik takviyesi olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. HAP seramikleri MKH'leri osteoblastlara yönelik farklılaşmaya sevk etme yetenekleri nedeniyle kemik doku mühendisliğinde potansiyel materyal olarak karşımıza çıkmaktadır [48]. Titanium (Ti) ve HAP malzemelerinin her ikisi de biyouyumlu oldukları için genellikle klinik olarak diş ve kemik implantları için kullanılmaktadır. Weinlaender ve arkadaşları köpeklerde yaptıkları çalışmalarda, ışık mikroskobu seviyesinde HAP kaplı implantların, Ti implantlarına göre daha fazla kemik oluşturduğunu bulmuşlardır. Kohri ve arkadaşları ise taramalı elektron mikroskobunda (SEM) köpeklerle yaptıkları çalışmalarda Ti implantlarıyla tüm ara yüzeyler arasında boşluk bulunurken, HAP kaplı yüzeylerde hiç boşluk bulunmadığını göstermişlerdir. Ayrıca, *in vitro*da HAP üzerinde mineralize nodül oluşumu Ti'a göre daha belirgindir. Bu nedenle birçok çalışmada HAP kaplı implantların osseointegrasyonunun ve kemik oluşumunun daha üstün olduğu gösterilmektedir. HAP yüzeylerde hızlı ve güçlü mineralizasyon tıbbi başarıyı sağlayabilir. Buna rağmen klinik başarı oranlarındaki farklılıklara bakıldığında, implant materyalinin yüzeyinin osteojenezi nasıl teşvik ettiği ya da inhibe ettiği hala açık değildir [66].

Son on yılda, köpeklerde sentetik HAP seramik, köpeklerde, maymunlarda ve Babunda mercan kökenli HAP seramik,  $\alpha$ -trikalsiyum fosfat,  $\beta$ -trikalsiyum fosfat, bifazik kalsiyum fosfat,  $\alpha$ -pirofosfat ve  $\beta$ -pirofosfat seramikler gibi pek çok farklı kalsiyum fosfat biyomalzemelerle oluşturulmuş osteoindüksiyonu gösteren çok fazla miktarda makale yayınlanmıştır. Kalsiyum fosfat simanlara (cement) ve kaplamalara ilave olarak çeşitli hayvan modellerinde de osteoindüktivite gösterilmiştir. Osteoindüksiyon, kalsiyum fosfat içeren biyomalzemelerin yanısıra alümina seramikler, titanyum ve cam seramiklerde de gözlenmiştir [20].

Literatürde yer alan bazı çalışmalarda pürüzlü yüzeylerde hücre adezyonunun daha az olduğu ancak hücrelerin osteojenik özelliklerinin ve farklılaşma kapasitelerinin daha yüksek olduğu belirtilmiştir [86].

Miyaji ve çalışma grubu tarafından (2005) Zn içeren Ca-HAP üretimi yapılmış ve yapısal özellikleri incelenmiş, sonuçların kemik doku mühendisliği için oldukça faydalı olabileceği söylenmiştir [64]. Ye ve ark. (2010) nano-HAP/Mg-Zn-Zr kompozit materyallerle yaptıkları çalışmada, bu malzemelerin biyobozunur kemik implant materyali olarak kullanım potansiyellerinin olduğunu göstermişlerdir [87]. Sol-jel yöntemi ile hazırlanmış %0.5-5 çinko içeren nano-biyoaktif cam ve bifazik kalsiyum fosfat içeren biyomalzemenin osteoblastlar üzerindeki etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada hücre adezyonu, proliferasyon ve ALP aktivite ölçüm deneylerinden elde edilen veriler, - özellikle düşük miktarlarda çinko içeren gruplarda- çinko takviyesinin ALP enzim miktarını artırdığı ortaya konulmuştur [60]. Guan ve arkadaşlarının (2014) yapmış olduğu bir çalışmada, Mg-Zn-Ca alaşımları içeren çubuk form nano-HAP (rod-like HAP) ve tabaka/pul formunda nano-HAP (flake-like HAP)'ın biyoyumluluğu insan kordon kanından elde edilen MKH'ler üzerinde test edilmiştir. Araştırmacıların elde ettiği *in vitro* sonuçlara göre Mg-Zn-Ca alaşımları içeren çubuk form nano-HAP'ın hücre proliferasyonu ve osteoblastik farklılaşma için diğer malzemeye göre daha uygun olduğu tespit edilmiştir [54].

- **Malzemeler üzerinde hücreler adezyon gösteriyor mu?**

Steril bir implant dokuya yerleştirildiğinde çoğunluğu su moleküllerinden oluşan kanla karşılaşır. Kan içerisindeki su molekülleri yüzeyde çift sıralı bir su tabakası oluştururlar. Bu tabakanın oluşumu implant yüzeyinin hidrofobik ya da hidrofilik olmasına göre değişiklik gösterir. Daha sonra  $Cl^-$  ve  $Na^+$  gibi iyonlar da bu tabakaya entegre olurlar. Su tabakasının ardından biyomoleküller yüzeye ulaşırlar ve absorbe olurlar. Daha sonra yüzeyin kimyasına bağlı olarak konformasyonel değişimlere uğrayarak denatüre olurlar veya desorbe olarak yerlerini daha büyük ve yüzeye daha fazla afinitesi olan başka proteinlere bırakırlar. Böylece yüzeyde farklı proteinlerden ve bu proteinlerin farklı dizilim ve konformasyonlarından oluşan bir biyolojik kılıf meydana gelir. Bu kılıf hiçbir zaman stabil değildir. Zaman içerisinde konformasyonel değişimlere uğrar. Öncelikle biyolojik sıvıda en yüksek konsantrasyondaki protein yüzeye absorbe olurken, bu protein daha sonra yerini konsantrasyonu düşük olmasına rağmen afinitesi yüksek olan başka bir proteine bırakır. Bu işlem hücrelerin bölgeye göçüne dek devam eder. Bu kılıfın en önemli görevi oluşması istenen dokunun üretimini üstlenecek hücrelerin yüzeye yapışmasını sağlamaktır. Dolayısıyla kemik implantları için osteojenik hücrelerin seçici olarak bağlanmasını sağlayacak bir protein kompozisyonu ve konformasyonu meydana getirecek yapıda bir materyal üretimi istenmektedir. Fibronektin, vitronektin, laminin, serum albümin, kollojen gibi hücre adezyon proteinlerinin bu açıdan çok önemli olduğu bilinmektedir [53].

Çalışmamızda hücre adezyonu öncelikli olarak kollojen, laminin ve fibronektin gibi hücre adezyon proteinleri ve poli-l-lizin ile kaplanan HAP-Tic, HAP-Ag, HAP-ZAg ve HAP-ZAgCu yüzeylerine yapışan hücre miktarı kolorimetrik olarak değerlendirilmiştir. Hücre adezyon deneyinden elde edilen veriler poli-l-lizin ile bağlanan en yüksek hücre miktarının HAP-ZAg ve HAP-Ag ile kaplanan yüzeylerde, kollojen proteinine bağlanan hücre sayısının HAP-ZAgCu > HAP-Tic > HAP-Ag > HAP-ZAg olacak şekilde değiştiğini, lamininde ve fibronektindeki en yüksek bağlanma aktivitesinin HAP-Ag, HAP-Tic ve HAP-ZAg gruplarında olduğunu göstermektedir. Bu veriler MTT, LDH, DNA ve ALP deneylerinden elde edilen verilerle uyumludur ve bir anlamda hücre

farklılaşmasının özellikle laminin ve fibronektin proteinleri ile bağlanan hücre sayısı ile bağlantılı olabileceğini düşündürmektedir.

Hücre adezyonunun değerlendirilmesi için bir sonraki aşamada immunofloresan boyama ile vinkülin ve F-aktin hücre iskeleti elemanları boyanmıştır. HAP-Tic ve HAP-Ag yüzeyleri üzerinde büyüyen hücrelerdeki vinkülin elemanları hücre sınırlarını belirleyecek şekilde görülmektedir. Hücrelerin kontrol grubunda olduğu gibi HAP-ZAg ve HAP-ZAgCu kaplı yüzeylerde oldukça iyi adezyon göstererek geniş bir yüzeye yayıldıkları görülmüştür. Boyamalar, HAP-Tic ve HAP-Ag yüzeyleri üzerinde büyütülen hücrelerde birçok vinkülin pozitif fokal adezyonun olduğunu, bunların özellikle hücre sınırlarını belirleyecek şekilde hücre etrafında arttığını, fakat HAP-ZAg ve HAP-ZAgCu yüzeylerinde büyütülen hücrelerde ise nispeten azaldığını ve daha çok hücre sitoplazmasında yer aldığını göstermektedir. Bu sonuçlar hücre adezyon deneyindeki sonuçlarla da karşılaştırıldığında en yüksek adheziv etkinin HAP-Ag ve HAP-Tic yüzeyleri üzerinde olmasından yola çıkılarak vinkülin moleküllerinin üretiminin hücre adezyonu sırasında öncelikle çeperlerde başladığı ve hücre stabil olduktan sonra baskılanmış olabileceğini düşündürmektedir. Ek olarak, boyamalarda net bir şekilde görülmemekle birlikte mikroskop incelemeleri sırasında tespit edildiği üzere aktin boyamalar sonucunda HAP-ZAgCu yüzeyindeki hücrelerde sınırları daha belirgin ve polarize olmuş stress filamentler gözlenirken, HAP-Tic, HAP-Ag ve HAP-ZAg yüzeylerdeki hücrelerde daha kötü düzenlenmiş ve polarize olmuş, daha az ve zayıf stress filament oluşumu görülmektedir. Chang ve arkadaşlarının bir çalışmasında (2014) keratinlerin 3 boyutlu bir yapı içerisinde büyütülen mezenkimal kök hücrelerde diğer ara filamentlerden daha çabuk oluştuğu ve F-aktin depolimerizasyonuna ilk 15 dakikada hızlı bir şekilde cevap verdiği gösterilmiştir. Fizyolojik olarak, ara filament protein polimerizasyonu hücre membran periferinden çekirdek membranına doğru başlamaktadır ve genetik ekspresyondan protein üretimine kadar bir zaman aralığının geçmesi gerekmektedir. Araştırmacılar keratin ara filamentlerin oluşumunun daha geç oluşmasını buna bağlamaktadırlar [67]. Aynı şekilde bizim çalışmamızda da vinkülin elementlerin özellikle hücre çeperinde çok rahat gözlenirken, f-aktin filamentlerin tam olarak gözlenememesinin

sebebi hücre membranının periferinden başlayan ara filament polimerizasyonu ile genetik ekspresyon ile protein üretimi sırasında geçen süreye bağlı olabilir. Bu süre, farklı yüzeyler üzerinde büyütülen hücrelerde değişiklik gösteriyor olabilir.

MKH'lerde aktin hücre iskeleti, sitoplazma boyunca uzanan çok sayıda ince, paralel mikrofilament destesinden oluşmaktadır ve F-aktin depolimerizasyonu MKH'lerin üç hücre hattına farklılaşması sırasında değişmektedir. Chang ve ark. (2014) daha önce yaptıkları bir çalışmada bir F-aktin dağıtıcı peptid olan timosin beta-4 ile MKH'lerde F-aktin oluşumunun azaldığını ve bunun da osteojenik farklılaşmayı geciktirdiğini ortaya koymuşlardır [67]. İmmunofloresan boyama sonuçlarında göre F-aktin elementlerin özellikle HAP yüzeyler üzerinde depolimerize halde görülmesi, hücrelerin bu yüzeyler üzerinde ortamdan aldıkları (HAP ve metal içerikli yüzeylerin uyarısı) farklılaşma sinyallerine bağlı olarak aktin hücre iskeletinin yeniden düzenleniyor olmasına da bağlı olabilir.

Malzemelerin hücre adezyonu üzerindeki etkileri son aşama olarak moleküler açıdan rt-PCR array ile incelenmiştir. Buna göre ekspresyonu artan genler arasında bütün gruplarda ortak olanlar; COL11A1 (Kollojen tip XI, alfa 1), COL14A1 (Kollojen tip XIV, alfa 1), COL4A2 (Kollojen tip IV, alfa 2), COL8A1 (Kollojen tip VIII, alfa 1), ITGA2 (Integrin, alfa 2 (CD49B, alfa 2 subunit of VLA-2 reseptör)), ITGB2 (Integrin, beta 2 (tamamlayıcı bileşen 3 reseptör 3 ve 4 subunit)), MMP7 (Matriks metalloproteinaz 7 (matrilizin, uterin)) ve SPP1 (Salgılanan fosfoprotein 1) genleridir.

Ekspresyonu artmış olan gen sayısına göre incelediğimizde en fazla artışın HAP-ZAg yüzeylerindeki hücrelerde olduğu görülmektedir. Yapılan deneyler her ne kadar tekrarlanmış olsa da yüzeyler arasında hücre tepkilerdeki farklılığın yüzeylerin etkisinden kaynaklanmış olabileceği gibi hücrelerin bulunduğu moleküler saate göre de değişebileceği göz önünde bulundurulmalıdır. Her gruptaki ortak genlere bakıldığında bunların daha çok kollojen ilişkili hücre adezyonu, hücre substrat ve hücre hücre adezyonu ile hücre proliferasyonu ilişkili görevler yapan genler olduğu görülmektedir. Tüm bu genlerdeki artışın yapılan tüm diğer deney sonuçlarını doğrulayıcı ve açıklayıcı olduğu söylenebilir.

Yapılan çalışmalar yüzey pürüzlülüğü ile hücre adezyonu arasında bir ilişki olduğunu göstermektedir [57]. Park ve ark. (2005) HAP kaplı yüzeylerdeki protein absorpsiyonunun cilalı titanyum yüzeylere oranla çok daha yüksek olduğunu göstermişlerdir [88]. Kilpadi ve grubunun yaptığı çalışma ise HAP'ın titanyum ve çelik yüzeylere göre fibronektin ve vitronektin absorpsiyonunun daha fazla olduğunu böylece integrinlerin HAP yüzeylere daha kolay bağlandığını ortaya koymaktadır [89]. Bunun dışında malzemenin nano boyutta olmasının da hücre adezyon proteinlerinin yüzeye daha kolay absorbe olmasını sağladığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır [53].

Nanoboyutlu materyaller üzerinde osteoblast adezyonunun arttığı ilk kez 1999 yılında rapor edilmiştir. Özellikle tanecik boyutları 49 ve 67 nm aralığında olan alüminyum oksit ve tanecik boyutları 32 ve 56 nm aralığında olan titanyum oksit mikro taneli yapılara oranla osteoblast adezyonunu desteklemektedir. Bu tarihten sonra yapılan araştırmalar nanoseramiklerin (alüminyum oksit, titanyum oksit ve HAP gibi) *in vitro* osteoblast proliferasyonunun ve uzun süreli fonksiyonlarının (kollojen gibi intrasellüler ve ekstrasellüler matriks proteinlerinin sentezi ve alkalen fosfataz gibi depolanmış kalsiyum içeren minerallerin ölçümüyle) 100 nm'den daha küçük fiber ya da tanecikli seramiklerin üzerinde arttığını göstermiştir. Örneğin, konvensiyonel alüminyum oksit, titanyum oksit ve HAP üzerinde kültüre edilen osteoblastlarla karşılaştırıldığında nanofaz üzerinde olan osteoblastlar sırasıyla 4-3-2 kat daha fazla kalsiyum depolanması göstermiştir. Ek olarak, osteoblast fonksiyonlarının (özellikle canlı hücre adezyonu, proliferasyonu ve kalsiyum depolanması) nanofiber yapı üzerinde bile nano-küre yapıdaki alüminyum oksite göre daha fazla olduğu görülmüştür [22].

Zn içeren nanokristal yapıdaki HAP ile yapılan bir diğer çalışmada, esansiyal proteinlerin absorpsiyon oranı incelenmiştir. Artan Zn içeriğiyle birlikte BSA içerisinden absorbe edilen protein miktarının arttığı ve  $\beta_2$ -mikroglobulin gibi patojenik proteinlere karşı seçici absorpsiyon olduğu gösterilmiştir. Çalışmada özellikle insan kemik ve kan plazması için esansiyal iz element olduğu için Zn iyonu seçilmiştir [90].

- **Tez çalışması sırasında elde edilen veriler bundan sonra yapılacak çalışmalara nasıl yol gösterecek?**

HAP hem bilimsel araştırmalarda, hem de klinikte yaygın olarak kullanılan bir biyomalzeme olduğundan hücrelerin HAP yüzeyler üzerindeki davranışının anlaşılması çok büyük önem taşımaktadır. Literatürde gümüş ya da çinko nanopartikülleri ile ilgili pek çok çalışma bulunmasına rağmen, özellikle Zn, Ag ve Cu metal iyonları içeren HAP ile yapılmış biyoyumluluk çalışmalarının oldukça az olduğu ve hücre adezyonu ile farklılaşması üzerine etkileri ile ilgili hücresel cevabın değerlendirilmemiş olduğu görülmektedir. Bu malzemelerin antibakteriyal özelliği ile ilgili yapılmış ayrıntılı ilk çalışmalardan birisi Ciobanu ve arkadaşlarının (2011) çalışmasıdır [61]. Var olan çalışmaların çoğu bu metal iyonlarının toksik etkisine dikkat çekmektedir. Nano seramik malzemelerin hazırlanma protokolü nedeniyle toksik etki göstermediği ve bu iyonların vücut içerisinde esansiyel metaller olarak oldukça önemli biyolojik süreçlerde rol oynadıkları düşünöldüğünde sonuçlarımızın bundan sonra yapılacak çalışmalara ışık tutacağını düşünmekteyiz.

Ayrıca kemik doku rejenerasyonu için tasarlanmış biyomalzemelerde iAMK'lerin uygulanması bilim dünyası için gelişmekte olan oldukça heyecan verici alanlardan birisidir. Adipoz dokudan kolaylıkla ve büyük miktarlarda MKH elde edilebilmesi, ilaçlar ve büyüme faktörleri gibi biyoaktif moleküllerle birleştirilmiş yeni biyomalzemeler üzerinde gittikçe büyüyen araştırmalarla yapılan kombinasyonlar yeni terapotik uygulamalar için yol açmaktadır. Klinik çalışmalar özellikle kranofasiyal defektlerin onarımı için iAMK'lerin kullanımında incelenmeyi ve çözölmeyi bekleyen birçok husus bulunduğunu göstermektedir. iAMK'lerin klinik uygulamalarda kullanımı için hücrelerin toplanması, izolasyonu, kültüre edilmesi ve hazırlanmasında kullanılacak protokollerin standardize edilmesi gerekmektedir. Günümüzde kullanılan tekniklerdeki farklılıklar çalışmaların karşılaştırılmasını zorlaştırmaktadır [13]. Özellikle hücrelerin elde edildiği vericinin cinsiyeti, yaşı, elde edildiği bölge-organ, izolasyonda kullanılan protokol, hücre kültürü yöntemleri gibi yöntemlerin mezenkimal kök hücrelerin özelliklerini ve çalışma sonuçlarını etkilediği bilinen



bir gerçektir. Çalışmada kullanılan insan yağ dokusu kaynaklı mezenkimal kök hücreler, çalışmanın diğer çalışmalarla karşılaştırılmasını kolaylaştırmak, yukarıda sayılan nedenlere bağlı farklılıkları önlemek ve belli bir standardı sağlayabilmek amacıyla dünyanın en güvenilir hücre bankalarından olan ATCC'den satın alınmıştır. Giriş kısmında ayrıntılı olarak bahsedildiği gibi kemik doku mühendisliğinde kullanılan çeşitli otolog hücre kaynakları arasında çalışmalar çok uzun bir süre kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücreler üzerinde odaklanmıştır. Ancak bu hücrelerin düşük miktarda elde edilmeleri, onların *in vitro* ortamda çoğaltılmalarını gerektirmektedir. Adipoz doku kaynaklı kök hücreler de, kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücreler gibi yüksek osteojenik potansiyele sahip olmalarının yanı sıra elde edilmeleri kolay ve dokuda bol miktarda bulunabildikleri için kemik doku mühendisliği çalışmalarında ilgi çekmeye başlamışlardır [91]. Çalışmamızda adipoz kökenli MKH'lerin seçilmesinin temelini bu anlayış oluşturmaktadır.

İmplantların üretim stratejilerinden en önemlisi implant yüzeyine daha iyi hücre yapışmasını ve kemik oluşumunun uyarılmasını sağlamaktır. Bu çalışma MKH'lerin HAP yüzeyler üzerindeki proliferasyonlarında ve osteointegrasyonda rol oynayabilecek adezyon müküllerin değerlendirilmesi ve bu parametrelerin geliştirilmesi açısından önem taşımaktadır. Bu çalışma, kullanılan yüzeylerdeki hücresel cevaba, bu cevabın yorumlanmasında kullanılacak parametrelerin değerlendirilmesine dair bilgiyi artırmayı ve yeni toksik olmayan, kısa sürede osteojenik farklılaşmayı uyarabilecek ve kimyasal, fiziksel ve mekanik özelliklerinin yanı sıra antibakteriyal özellikte yeni implant yüzeylerine dair bilgiyi literatüre kazandırmayı hedeflenmiştir.

## 5. SONUÇ

Bu çalışma, değişik kimyasal ve yüzey özelliklerine sahip metal katkılı (Zn, Ag ve Cu) HAP nanokaplama malzemeler üzerinde büyütölen iMKH'lerinin canlılık ve osteoblastik farklılaşma potansiyelleri ile substrat-materyal arasındaki ilişkiyi ve hücre davranışını incelemektedir. Sonuçlar genel olarak Zn, Ag ve Cu metal iyonları içeren HAP yüzeyler üzerinde, hücre canlılığının ticari olarak kullanılan ve hiçbir metal iyonu içermeyen HAP'e göre daha yüksek olduğunu, hücre adezyonunun ve farklılaşmasının da olumlu yönde etkilendiğini göstermektedir. Zn, Ag ve Cu metal iyon katkılı nano-HAP yüzeylerin kemik doku rejenerasyonu açısından büyük potansiyele sahip olduğunu düşünmekteyiz.

## 6. KAYNAKLAR

- [1] Camurdanoglu, B.Z. ve E. Kansu, *Kök Hücre Tanımları*, Kök Hücre Biyolojisi ve Klinik Uygulamalar/TÜBA Kök Hücre Çalışma Grubu, (Ed: F.Ç. Bil) TÜBA, Ankara. 41-52, 2009.
- [2] Çetinkaya, U.D., *Mezenkimal Kök Hücrelerin Klinikte Kullanımı*, *Kök Hücre Biyolojisi ve Klinik Uygulamalar/ TÜBA Kök Hücre Çalışma Grubu*, (Ed: F.Ç. Bil) TUBA, Ankara. 99-103, 2009.
- [3] Yanez, R., ve ark., "Prostaglandin E2 plays a key role in the immunosuppressive properties of adipose and bone marrow tissue-derived mesenchymal stromal cells", *Exp Cell Res*, 316(19), 3109-3123, 2010.
- [4] Gritti, A., A.L. Vescovi, ve R. Galli, "Adult neural stem cells: plasticity and developmental potential", *J Physiol Paris*, 96(1-2), 81-90, 2002.
- [5] Choi, Y.S., ve ark., "Adipogenic differentiation of adipose tissue derived adult stem cells in nude mouse", *Biochem Biophys Res Commun*, 345(2), 631-637, 2006.
- [6] Chen, Y., ve ark., "Mesenchymal stem cells: A promising candidate in regenerative medicine", *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 40(5), 815-820, 2008.
- [7] Çetinkaya, U.D., *Mezenkimal Kök Hücreler*, Kök Hücre Biyolojisi ve Klinik Uygulamalar/ TÜBA Kök Hücre Çalışma Grubu, (Ed: F.Ç. Bil), TUBA, Ankara. 53-62, 2009.
- [8] Güngör, P.S., *Low level laser therapy on human adipose tissue derived mesenchymal stem cells/İnsan yağ dokusundan elde edilen mezenkimal kök hücrelerde düşük düzey laser terapisi*, Yüksek Lisans Tezi, Boğaziçi Üniversitesi Biyo-Medikal Mühendislik Enstitüsü, İstanbul, 2007.
- [9] Zuk, P.A., Benhaim, P. ve Hedrick, M.H., *40-Stem Cells from Adipose Tissue, Handbook of Stem Cells*, (Ed: Lanza R., Gerhard J., Hogan B., Melton D., Pedersen R., Thomson J., West M.), Academic Press: Burlington, 425-447, 2004.
- [10] Zuk, P.A., Zhu, M., Ashjian, P., De Ugarte, D. A., Huang, J. I., Mizuno, H., Alfonso, Z. C., Fraser, J. K., Benhaim, P., Hedrick, M. H., "Human

- adipose tissue is a source of multipotent stem cells", *Mol Biol Cell*, 13(12), 4279-4295, 2002.
- [11] Gimble, J. ve Guilak, F., "Adipose-derived adult stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential", *Cytotherapy*, 5(5), 362-369, 2003.
- [12] Rodriguez, A.M., Elabd, C., Amri, E. Z., Ailhaud, G., Dani, C., "The human adipose tissue is a source of multipotent stem cells", *Biochimie*, 87(1), 125-128, 2005.
- [13] Romagnoli, C. ve Brandi M.L., "Adipose mesenchymal stem cells in the field of bone tissue engineering", *World J Stem Cells*, 6(2), 144-152, 2014.
- [14] Odabaş, S., *Mezenkimal kök hücre saflaştırması için manyetik yüklü nanosorbentlerin üretimi*, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, *Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, 2006.
- [15] Keller, R., "Stem cells on the way to restorative medicine", *Immunology Letters*, 83(1), 1-12, 2002.
- [16] Taha, M.F. ve Hedayati, V., "Isolation, identification and multipotential differentiation of mouse adipose tissue-derived stem cells", *Tissue Cell*, 42(4), 211-216, 2010.
- [17] Wang, L., Wang, Z. H., Shen, C. Y., You, M. L., Xiao, J. F., Chen, G. Q., "Differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells grown in terpolyesters of 3-hydroxyalkanoates scaffolds into nerve cells", *Biomaterials*, 31(7), 1691-1698, 2010.
- [18] Tuan, R.S., "Adult Stem Cells and Nanomaterials for Skeletal Tissue Engineering and Regeneration", *FASEB J.* 2009.
- [19] Ando, Y., Miyamoto, H., Noda, I., Sakurai, N., Akiyama, T., Yonekura, Y., Shimazaki, T., Miyazaki, M., Mawatari, M., Hotokebuchi, T., "Calcium phosphate coating containing silver shows high antibacterial activity and low cytotoxicity and inhibits bacterial adhesion", *Materials Science and Engineering: C*, 30(1), 175-180, 2010.
- [20] Habibovic, P. ve Groot K. de, "Osteoinductive biomaterials--properties and relevance in bone repair", *J Tissue Eng Regen Med*, 1(1), 25-32, 2007.

- [21] Ragel, C.V., Vallet-Regi, M., ve Rodriguez-Lorenzo, L.M., "Preparation and in vitro bioactivity of hydroxyapatite/solgel glass biphasic material", *Biomaterials*, 23(8), 1865-1872, 2002.
- [22] Liu, H. ve Webster, T.J., "Nanomedicine for implants: A review of studies and necessary experimental tools", *Biomaterials*, 28(2), 354-369, 2007.
- [23] Wang, D., Chu, L., Paradelo, M., Peijnenburg, W. J., Wang, Y., Zhou, D. "Transport behavior of humic acid-modified nano-hydroxyapatite in saturated packed column: effects of Cu, ionic strength, and ionic composition", *J Colloid Interface Sci*, 360(2), 398-407, 2011.
- [24] Melton, D., '*Stemness*': *Definitions, Criteria, and Standards*, in *Essentials of Stem Cell Biology*, Chapter 2, Third Edition, (Ed: Lanza R. ve Atala, A.), Academic Press: Boston, 7-17, 2014.
- [25] Mediclinic. *Stem cell applications*, [02.01.2015], <http://www.medic-link.com/en/msc-1.html>.
- [26] Can, A., *Kök Hücre Biyolojisi, Türleri ve Tedavide Kullanımları*, Ankara, Akademisyen Tıp Kitabevi, 720, 2014.
- [27] Loya, K., *Stem Cells, Handbook of Pharmacogenomics and Stratified Medicine*, Chapter 11, (Editör S. Padmanabhan), Academic Press: San Diego, 207-231, 2014.
- [28] Massia, S.P., *Cell-Extracellular Matrix Interactions Relevant to Vascular Tissue Engineering, Tissue Engineering of Vascular Prosthetic Grafts*, (Ed: Z. Peter), R.G. Landes Company, 1999.
- [29] Can, A., *Kök Hücre Tanımları*, Kök Hücre Biyolojisi ve Klinik Uygulamalar/TÜBA Kök Hücre Çalışma Grubu, (Ed: Bil, F.Ç.), TUBA, Ankara. 15-22, 2008.
- [30] Karaöz, E. ve E. Ovalı, *Kök Hücreler*, Derya Kitabevi, 2004.
- [31] National Research Council, I.O.M., *Stem Cells and The Future Of Regenerative Medicine*, First Edition, 2002.
- [32] Health, N.I.O. *What are adult stem cells?*, 07.07.2012 [2015.02.02], <http://stemcells.nih.gov/info/basics/pages/basics4.aspx>.

- [33] Meirelles Lda, S., Fontes, A. M., Covas, D. T., Caplan, A. I., "Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells", *Cytokine Growth Factor Rev*, 20(5-6): s. 419-27, 2009.
- [34] Hocking, A.M. ve Gibran, N.S., "*Mesenchymal stem cells: Paracrine signaling and differentiation during cutaneous wound repair*", *Experimental Cell Research*, 316(14), s. 2213-2219, 2010.
- [35] Delorme, B. ve Charbord, P., *Culture and Characterization of Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells*, *Tissue Engineering*, (Ed: H. Hauser ve M. Fussenegger) Humana Press., 67-81, 2007.
- [36] Valentin, J.E., Donnenberg, A. D., Marra, K. G., Rubin, J. P., *Regenerative Medicine Therapies Using Adipose-Derived Stem Cells*, *Translational Regenerative Medicine*, Chapter 25, (Ed: Atala, A. ve Allickson, J.G.) Academic Press: Boston, 335-344, 2015.
- [37] Toyserkani, Christensen, M. L., Sheikh, S. P., Sorensen, J. A., "Adipose-Derived Stem Cells: New Treatment for Wound Healing?", *Ann Plast Surg*, 2014.
- [38] Hass, R., Kasper, C., Böhm, S., Jacobs, R., "Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC", *Cell Communication and Signaling-CCS*, 9, 12-12, 2011.
- [39] Wagner, W., Wein, F., Seckinger, A., Frankhauser, M., Wirkner, U., Krause, U., Blake, J., Schwager, C., Eckstein, V., Ansorge, W., Ho, A. D., "Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood", *Exp Hematol*, 33(11), 1402-1416, 2005.
- [40] Bilgiustam, [02.01.2015], Adipoz kökenli mezenkimal kök hücrelerin farklılaşma potansiyelleri ve kullanım alanları. <http://www.bilgiustam.com/kordon-kani-ve-kok-hucre-tedavileri/>.
- [41] Yoshimura, K., Shigeura, T., Matsumoto, D., Sato, T., Takaki, Y., Aiba-Kojima, E., Sato, K., Inoue, K., Nagase, T., Koshima, I., Gonda, K., "Characterization of freshly isolated and cultured cells derived from the

- fatty and fluid portions of liposuction aspirates", J Cell Physiol, 208(1), 64-76, 2006.
- [42] Bourin, P., Bunnell, B. A., Casteilla, L., Dominici, M., Katz, A. J., March, K. L., Redl, H., Rubin, J. P., Yoshimura, K., Gimble, J. M, "Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT)", Cytotherapy, 15(6), 641-648, 2013.
- [43] Kalfas, I.H., "Principles of bone healing", Neurosurgical Focus, 10(4), 1-4, 2001.
- [44] Koç, A., *Mezenkimal kök hücrelerinin ve kompozit iskelelerin kullanımıyla kemik doku mühendisliği*, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı, Ankara. 105, 2008.
- [45] Yıldırım, A., Tunik, S., Çetin, Ç., Akkuş, M., "Osteogenezde Fibroblast Büyüme Faktörleri (FBF) ve Kemik Morfogenetik Proteinlerin (KMP) Rolü", Journal of Inonu University Medical Faculty, 16(2), 135-140, 2009.
- [46] Smink, J.J. ve Leutz, A., "Instruction of mesenchymal cell fate by the transcription factor C/EBPbeta", Gene, 497(1), 10-7, 2012.
- [47] Schilling, T., Noth, U., Klein-Hitpass, L., Jakob, F., Schutze, N., "Plasticity in adipogenesis and osteogenesis of human mesenchymal stem cells", Mol Cell Endocrinol, 271(1-2), 1-17, 2007.
- [48] Oral, Ö.F., *Kollojen tip-1 kaplamalı hidroksiapatid hücre kültüründe osteoblast hücrelerinin mekanik yanıtı*, Dokuz Eylül Üniversitesi, Biyomekanik ABD., İzmir, 51, 2008.
- [49] Kulinets, I., "Biomaterials and their applications in medicine, in Regulatory Affairs for Biomaterials and Medical Devices", (Ed: Amato S.F. ve Ezzell R.M.), Woodhead Publishing, 1-10, 2015.
- [50] Paital, S.R. ve Dahotre N.B., "Calcium phosphate coatings for bio-implant applications: Materials, performance factors, and methodologies", Materials Science and Engineering: R: Reports, 66(1-3), 1-70, 2009.

- [51] Picollet-D'hahan, N., Picollet-D'hahan, N., Gerbaud, S., Kermarrec, F., Alcaraz, J.-P., Obeid, P., Bhajun, R., Guyon, L., Sulpice, E., Cinquin, P., Dolega, M. E., Wagh, J., Gidrol, X., Martin, D. K., "The modulation of attachment, growth and morphology of cancerous prostate cells by polyelectrolyte nanofilms", *Biomaterials*, 34(38), 10099-10108, 2013.
- [52] Thomas, T., Thomas, K., Sadrieh, N., Savage, N., Adair, P., Bronaugh, R., "Research strategies for safety evaluation of nanomaterials, part VII: evaluating consumer exposure to nanoscale materials", *Toxicol Sci*, 91(1), 14-9, 2006.
- [53] Ramazanoğlu, M., *Titanyum dioksit nanotüp kaplı mikropürüzlü yüzeylerde mezenkimal kök hücre aktivitesinin değerlendirilmesi / Evaluation of mesenchymal stem cell activity on microrough nanotubular titanium dioxide surfaces*, İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ağız, Diş, Çene Hastalıkları ve Cerrahisi Anabilim Dalı, İstanbul, 111, 2008.
- [54] Guan, F., Ma, S., Shi, X., Ma, X., Chi, L., Liang, S., Cui, Y., Wang, Z., Yao, N., Guan, S., Yang, B., "Biocompatibility of nano-hydroxyapatite/Mg-Zn-Ca alloy composite scaffolds to human umbilical cord mesenchymal stem cells from Wharton's jelly *in vitro*", *Sci China Life Sci*, 57(2), 181-187, 2014.
- [55] Rosiak, J.M., "Radiation Formation of Hydrogels for Biomedical Applications", [02.01.2015], *Biyomalzemelerin insan vücudundaki kullanım bölgeleri*, 2002, [http://mitr.p.lodz.pl/biomat/old\\_site/raport/1\\_radiation\\_hydrogels.html](http://mitr.p.lodz.pl/biomat/old_site/raport/1_radiation_hydrogels.html).
- [56] Miron, R.J. ve Zhang, Y.F., "Osteoinduction: a review of old concepts with new standards", *J Dent Res*, 91(8), 736-744, 2012.
- [57] Yenyol, S., *Saf titanyum implant yüzeylerinin değişik yöntemlerle modifikasyonu ve karakterizasyonu-in vitro çalışma*, İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Oral İmplantoloji Anabilim Dalı, İstanbul, 132, 2006.



- [58] Kalita, S.J. ve Bhatt, H.A., "Nanocrystalline hydroxyapatite doped with magnesium and zinc: Synthesis and characterization", *Materials Science and Engineering: C*, 27(4), 837-848, 2007.
- [59] Tripathi, A., Saravanan, S., Pattnaik, S., Moorthi, A., Partridge, N. C., Selvamurugan, N., "Bio-composite scaffolds containing chitosan/nano-hydroxyapatite/nano-copper-zinc for bone tissue engineering", *Int J Biol Macromol*, 50(1), 294-299, 2012.
- [60] Badr-Mohammadi, M.R., Hesaraki, S., ve Zamanian, A., "Mechanical properties and *in vitro* cellular behavior of zinc-containing nano-bioactive glass doped biphasic calcium phosphate bone substitutes", *J Mater Sci Mater Med*, 25(1), 185-97, 2014.
- [61] Ciobanu, C.S., Massuyeau, F., Constantin, L. V., Predoi, D., "Structural and physical properties of antibacterial Ag-doped nano-hydroxyapatite synthesized at 100 degrees C", *Nanoscale Res Lett*, 6(1), 613, 2011.
- [62] Ahamed, M., Karns, M., Goodson, M., Rowe, J., Hussain, S. M., Schlager, J. J., Hong, Y., "DNA damage response to different surface chemistry of silver nanoparticles in mammalian cells", *Toxicol Appl Pharmacol*, 233(3), 404-410, 2008.
- [63] Chen, Q. ve Thouas, G.A., "Metallic implant biomaterials", *Materials Science and Engineering: Reports*, 87(0), 1-57, 2015.
- [64] Miyaji, F., Kono, Y. ve Suyama, Y., "Formation and structure of zinc-substituted calcium hydroxyapatite", *Materials Research Bulletin*, 40(2), 209-220, 2005.
- [65] Doherty, K., Connor, M., Cruickshank, R., "Copper deficiency", *Dental Abstracts*, 57(3), 150-152, 2012.
- [66] Okumura, A., Goto, M., Goto, T., Yoshinari, M., Masuko, S., Katsuki, T., Tanaka, T., "Substrate affects the initial attachment and subsequent behavior of human osteoblastic cells (Saos-2)", *Biomaterials*, 22(16), 2263-2271, 2001.
- [67] Chang, T.H., Huang, H. D., Ong, W. K., Fu, Y. J., Lee, O. K., Chien, S., Ho, J. H., "The effects of actin cytoskeleton perturbation on keratin

- intermediate filament formation in mesenchymal stem/stromal cells", *Biomaterials*, 35(13), 3934-44, 2014.
- [68] Wight, T.N. ve Potter-Perigo, S., "The extracellular matrix: an active or passive player in fibrosis?", 301, G950-G955, 2011.
- [69] Mosmann, T., "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays", *J Immunol Methods*, 65(1-2), 55-63, 1983.
- [70] Boncler, M., Rozalski, M., Krajewska, U., Podsedek, A., Watala, C., "Comparison of PrestoBlue and MTT assays of cellular viability in the assessment of anti-proliferative effects of plant extracts on human endothelial cells", *J Pharmacol Toxicol Methods*, 69(1), 9-16, 2014.
- [71] Wu, F., Lukinius, A., Bergstrom, M., Eriksson, B., Watanabe, Y., Langstrom, B., "A mechanism behind the antitumour effect of 6-diazo-5-oxo-L-norleucine (DON): disruption of mitochondria", *Eur J Cancer*, 35(7), 1155-1161, 1999.
- [72] Takahashi, [15.01.2015], MTT deneyi sırasında gerçekleşen reaksiyon ], <http://www.dojindo.co.jp/letterj/131/review/01.html>.
- [73] Fotakis, G. ve Timbrell, J.A., "In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride", *Toxicology Letters*, 160(2), 171-177, 2006.
- [74] Bernhardt, A., Thieme, S., Domaschke, H., Springer, A., Rosen-Wolff, A., Gelinsky, M., "Crosstalk of osteoblast and osteoclast precursors on mineralized collagen--towards an in vitro model for bone remodeling", *J Biomed Mater Res A*, 95(3), 848-856, 2010.
- [75] Ashley, N., Harris, D., ve Poulton, J., "Detection of mitochondrial DNA depletion in living human cells using PicoGreen staining", *Exp Cell Res*, 303(2), 432-446, 2005.
- [76] Ygonaar, 2006, [2015, PicoGreen boyasının topolojik formülü], [http://commons.wikimedia.org/wiki/File:PicoGreen\\_\(topological\\_formula\).png](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:PicoGreen_(topological_formula).png).

- [77] Banfi, A., Muraglia, A., Dozin, B., Mastrogiacomo, M., Cancedda, R., Quarto, R., "Proliferation kinetics and differentiation potential of ex vivo expanded human bone marrow stromal cells: Implications for their use in cell therapy", *Exp Hematol*, 28(6), 707-715, 2000.
- [78] Small, B.C., Murdock, C. A., Bilodeau-Bourgeois, A. L., Peterson, B. C., Waldbieser, G. C., "Stability of reference genes for real-time PCR analyses in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) tissues under varying physiological conditions", *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 151(3), 296-304, 2008.
- [79] Morse, D.L., Carroll, D., Weberg, L., Borgstrom, M. C., Ranger-Moore, J., Gillies, R. J., "Determining suitable internal standards for mRNA quantification of increasing cancer progression in human breast cells by real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction". *Anal Biochem*, 342(1), 69-77, 2005.
- [80] Gene, N.G.E, [2015, Gene definition], <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>.
- [81] Ulukaya, E., Özdikicioglu, F., Oral, Yilmaztepe A., Demirci, M., "The MTT assay yields a relatively lower result of growth inhibition than the ATP assay depending on the chemotherapeutic drugs tested", *Toxicology in Vitro*, 22(1), 232-239, 2008.
- [82] Lobner, D., "Comparison of the LDH and MTT assays for quantifying cell death: validity for neuronal apoptosis?", *Journal of Neuroscience Methods*, 96(2), 147-152, 2000.
- [83] Faria, R.M.B., César, D.V., ve Salim, V.M.M., "Surface reactivity of zinc-modified hydroxyapatite", *Catalysis Today*, 133–135(0), 168-173, 2008.
- [84] Pishbin, F., Mourino, V., Gilchrist, J. B., McComb, D. W., Kreppel, S., Salih, V., Ryan, M. P., Boccaccini, A. R., "Single-step electrochemical deposition of antimicrobial orthopaedic coatings based on a bioactive glass/chitosan/nano-silver composite system", *Acta Biomater*, 9(7), 7469-7479, 2013.

- [85] Bellows, C.G. ve Aubin, J.E., "Determination of numbers of osteoprogenitors present in isolated fetal rat calvaria cells *in vitro*", *Dev Biol*, 133(1), 8-13, 1989.
- [86] Schwartz, Z., Lohmann, C. H., Oefinger, J., Bonewald, L. F., Dean, D. D., Boyan, B. D., "Implant surface characteristics modulate differentiation behavior of cells in the osteoblastic lineage", *Adv Dent Res*, 13, 38-48, 1999.
- [87] Ye, X., Chen, M., Yang, M., Wei, J., Liu, D., "In vitro corrosion resistance and cytocompatibility of nano-hydroxyapatite reinforced Mg-Zn-Zr composites", *J Mater Sci Mater Med*, 21(4), 1321-1328, 2010.
- [88] Park, B.S., Heo, S. J., Kim, C. S., Oh, J. E., Kim, J. M., Lee, G., Park, W. H., Chung, C. P., Min, B. M., "Effects of adhesion molecules on the behavior of osteoblast-like cells and normal human fibroblasts on different titanium surfaces", *J Biomed Mater Res A*, 74(4), 640-651, 2005.
- [89] Kilpadi, K.L., Chang, P.L. ve Bellis, S.L., "Hydroxylapatite binds more serum proteins, purified integrins, and osteoblast precursor cells than titanium or steel", *J Biomed Mater Res*, 57(2), 258-267, 2001.
- [90] Fujii, E., Ohkubo, M., Tsuru, K., Hayakawa, S., Osaka, A., Kawabata, K., Bonhomme, C., Babonneau, F., "Selective protein adsorption property and characterization of nano-crystalline zinc-containing hydroxyapatite", *Acta Biomater*, 2(1), 69-74, 2006.
- [91] Hutton, D.L. ve Grayson, W.L., "Stem cell-based approaches to engineering vascularized bone", *Current Opinion in Chemical Engineering*, 3(0), 75-82, 2014.