



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ



YÜKSEK LİSANS TEZİ

TİTANYUM (Ti) VE TİTANYUM 500 (Ti 500) İMPLANTASYONUNUN SIÇAN
MAKROFAJ SUB GRUPLARI AKTİVASYONUNA ETKİSİ

KADRIYE YAĞMUR ORUÇ

DANIŞMAN
DOÇ. DR. SİBEL AKYOL

FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI
FİZYOLOJİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

İSTANBUL-2019

Bu çalışma 18.06.2019 Tarihinde aşağıdaki jüri tarafından
Fizyoloji Anabilim Dalı, Fizyoloji Tezli Yüksek Lisans Programı Yüksek Lisans Tezi olarak
kabul edilmiştir.

TEZ JÜRİSİ



Doç. Dr. Sibel AKYOL
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
Cerrahpaşa Tıp Fakültesi

Prof. Dr. Emine Gülderen şAHİN
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
Cerrahpaşa Tıp Fakültesi



Prof. Dr. Ahmet AYAR
Karadeniz Teknik Üniversitesi
Tıp Fakültesi



BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Kadriye Yağmur ORUÇ
(İmza)



İTHAF

Bana her zaman doğru yolu gösteren “Aileme” ithaf ediyorum,

ÖNSÖZ

Öğrencisi olmaktan gurur duyduğum; çalışmamız süresince bilgisini, deneyimlerini, sevgisini ve özellikle sabrını hiçbir zaman esirgemeyen, kullandığı her kelimenin hayatıma kattığı değerini yanı sıra araştırma, sorgulama ve tartışma yeteneklerimin gelişimine katkılarını asla unutmayacağım İÜC Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi biricik danışmanım Sayın, **Doç. Dr. Sibel AKYOL'a;**

Fikir, yorum ve değerlendirmelerini esirgemeyen, her konuda destek veren İÜC Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Başkanımız Sayın, **Prof. Dr. Emine Gülderen ŞAHİN'e;**

Tez projemin mihenk taşı olan materyallerimin üretim ve şekillendirmesini sağlayarak uluslararası anlaşma ile Türkiye'ye gönderen, danışmanım ile birlikte birçok projeye imza atan University of Technology Sydney Öğretim Üyesi Sayın, **Prof. Dr. B. B. Nissan'a;**

Hayvan deneylerime; emek, mesai ve bilgisi ile katkı veren Bezmialem Vakıf Üniversitesi Araştırma Merkezi üyesi Sayın, **Vet. Hek. Mert ÇELİKTEN'e;**

Verilerimin istatistik analizinde yardımcı olan İÜC Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Biyoistatistik Anabilimdalı değerli üyesi **Ar. Gör. İbrahim YILDIZ'a;**

Bu güzel günlere gelmemde en büyük payı olan, sevgilerini, desteklerini yaşamım boyunca gördüğüm, haklarını ve emeklerini asla ödeyemeyeceğim güzel ailem; biricik annem **Muazzez DİRİARIN'a,** biricik babam **Mehmet Emin DİRİARIN'a,** canım kardeşim **Furkan Paşa DİRİARIN'a** ve sevgisini hep hissettiğim, yardımını eksik etmeyen biricik eşim İÜC Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı **Uzm. Dr. Aykut ORUÇ'a;**

Teşekkürlerimle...

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TYL-2018-30595

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
ÖNSÖZ	V
İÇİNDEKİLER	Vİİ
TABLolar LİSTESİ.....	X
ŞEKİLLER LİSTESİ	Xİ
RESİMLER LİSTESİ	Xİİ
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	XİV
ÖZET	XVİİ
ABSTRACT.....	XVİİİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Biyomateryaller.....	3
2.1.1. Biyomateryallerin Tarihi.....	4
2.1.2. Biyomateryallerin Sınıflandırılması.....	6
2.1.3. Metalik Biyomateryaller	8
2.1.4. Titanyum ve Titanyum Alaşımları	10
2.1.5. Biyouyumluluk.....	12
2.1.6. İmplant materyalinin sahip olması gereken kemiğe benzer mekanik özellikleri	12
2.1.7. Korozyon Direnci.....	14
2.1.8. Yüzey Topoğrafyası.....	15
2.1.9. Yüzey Pürüzlülüğü (Porozite).....	15
2.1.10. Osseointegrasyon	16
2.2. İmmün Sistem	16
2.2.1. Doğal İmmün Sistem	17
2.2.2. Makrofajlar.....	18
2.2.3. Makrofaj Polarizasyonu	18
2.2.4. M1 Makrofajlar	21

2.2.5. M2 Makrofajlar	22
2.2.6. M2a Makrofajlar	23
2.2.7. M2b Makrofajlar	23
2.2.8. M2c Makrofajlar	23
2.3. Cerrahi yaralanmaya verilen makrofaj yanıtları	23
2.3.1. İnflamasyon fazında makrofajlar	26
2.3.2. Proliferasyon fazında makrofajlar	27
2.3.3. Yeniden modelleme fazında makrofajlar	30
2.4. Makrofaj Markırları	31
2.4.1. CCL3 (Makrofaj İnflamatuar Protein-1 α (MIP-1 α))	31
2.4.2. CCL4 (Makrofaj İnflamatuar Protein-1 β (MIP-1 β))	32
2.4.3. CD163 (Cluster of Differentiation 163)	32
2.4.4. CD206 (Cluster of Differentiation 206)	32
2.4.5. CCL1 (C-C Motif Ligand 1)	33
2.4.6. CD150 (Cluster of Differentiation 150)	33
3. GEREÇ VE YÖNTEM	34
3.1. Hayvan Deneyleri	34
3.2. ELISA Test Analizleri	37
3.3. İmplantasyon	40
3.4. ELISA Testi	43
4. BULGULAR	45
4.1. CCL3 (C-C motif chemokine ligand 3) Analiz Sonuçları	45
4.2. CCL4 (C-C motif chemokine ligand 4) Analiz Sonuçları	46
4.3. CD163 (Cluster of Differentiation 163) Analiz Sonuçları	47
4.4. CD206 (Cluster of Differentiation 206) Analiz Sonuçları	48
4.5. CCL1 (C-C motif chemokine ligand 1) Analiz Sonuçları	50
4.6. CD150 (Cluster of Differentiation 150 / SLAM (Signaling Lymphocytic Activating Molecule) Analiz Sonuçları	51
Grafik 4.6: CD150 Düzeyleri	51
4.7. 1. Günde Gruplar Arası Makrofaj Aktivatörü Yüzey Reseptör (CCL3, CCL4, CD163, CD206, CCL1, SLAM (CD150)) Düzeylerinin Karşılaştırılması	52
4.8. 3. Günde Gruplar Arası Makrofaj Aktivatörü Yüzey Reseptör (CCL3, CCL4, CD163, CD206, CCL1, SLAM (CD150)) Düzeylerinin Karşılaştırılması	53

4.9. 5. Günde Gruplar Arası Makrofaj Aktivatörü Yüzey Reseptör (CCL3, CCL4, CD163, CD206, CCL1, SLAM (CD150)) Düzeylerinin Karşılaştırılması.....	54
4.10. 7. Günde Gruplar Arası Makrofaj Aktivatörü Yüzey Reseptör (CCL3, CCL4, CD163, CD206, CCL1, SLAM (CD150)) Düzeylerinin Karşılaştırılması.....	55
5. TARTIŞMA.....	57
KAYNAKLAR.....	66
ETİK KURUL KARARI.....	80
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	81
ÖZGEÇMİŞ.....	82



TABLULAR LİSTESİ

Tablo 2.1.2.1: Metal, polimer, seramik, kompozit biyomateryallerin karşılaştırılması

Tablo 2.1.3.1: Vücuda implante edilecek biyomateryallerin sahip olması gereken özellikler

Tablo 2.1.3.2: Metalik biyomateryallerin uygulama ve kullanım alanları

Tablo 2.1.6.1: Kemik ve metalik biyomateryallerin Young Modülü değerleri

Tablo 3.2.1: ELISA Dilüsyon çözelti hazırlama prosedürü

Grafik 4.1: CCL3 Düzeyleri

Grafik 4.2: CCL4 Düzeyleri

Grafik 4.3: CD163 Düzeyleri

Grafik 4.4: CD206 Düzeyleri

Grafik 4.5: CCL1 Düzeyleri

Grafik 4.6: CD150 Düzeyleri

Grafik 4.7: 1. gün Parametrelerinin Karşılaştırılması

Grafik 4.8: 3. gün Parametrelerinin Karşılaştırılması

Grafik 4.9: 5. gün Parametrelerinin Karşılaştırılması

Grafik 4.10: 7. gün Parametrelerinin Karşılaştırılması

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1.1.1: Kullanılan biyomateryallerin tarihsel süreç içerisindeki gelişimsel evrimi

Şekil 2.1.4.1: Titanyum metalinin periyodik özellikleri

Şekil 2.2.1.1: Spesifik immün sistem ve doğal immün sistem komponentleri.

Şekil 2.2.3.1: M1 ve M2 makrofajlarının polarizasyon modelleri.

Şekil 2.3.3.1: Yara iyileşmesi sırasında farklı evrelerde rol alan makrofaj sub grupları

Şekil 3.1.1: Grup I, II ve III'e uygulanan cerrahi işlem özeti.

Şekil 3.2.1: ELISA veri analizlerinde kullanılan Standart Eğri grafik örneği.

RESİMLER LİSTESİ

Resim 2.1.4.1: Titanyum metali.

Resim 3.3.1: Titanyum ve Titanyum 500 biyomateryalleri.

Resim 3.3.1.1: Titanyum Pürüzlü Yüzey

Resim 3.3.1.2: Titanyum Pürüzsüz Yüzey.

Resim 3.3.1.3: Titanyum 500 Pürüzlü Yüzey.

Resim 3.3.1.4: Titanyum 500 Pürüzsüz Yüzey.

Resim 3.3.2: Sıçanlara Ketamin-Ksilazin Kokteyli intraperitoneal (IP) olarak uygulandı.

Tıraş makinesi ile implantasyon yapılacak lomber bölge hizası temizlendi.

Resim 3.3.3: Biyomateriyal implantasyonu için lomber L5-L6 hizasına insizyon yapıldı.

Rahat işlem yapabilmek için epidermis bölgesi iyice sabitlendi.

Resim 3.3.4: Fasyektomi yapıldı.

Resim 3.3.5: L5-L6 bölgesinde kas tabakası insizyonu yapıldı.

Resim 3.3.6: L5-L6 bölgesinde transvers ve spinöz prosesler açığa çıkarıldı.

Resim 3.3.7: Titanyum ve titanyum 500 biyomateryalleri L5-L6 bölgesinde transvers ve spinöz prosesler arasında kalan laminaya temas ettirilmesi sağlanarak yerleştirildi.

Resim 3.3.8: Titanyum ve Titanyum 500 biyomateryalleri sıkı bir şekilde dokuya gömüldü

Resim 3.3.9: İmplantasyon yapıldıktan sonra kas ve fasya tabakası 3/0 non-absorbe sütür ile kapatıldı.

Resim 3.3.10: Cilt insizyonu 3/0 non-absorbe sütür ile kapatıldı.

Resim 3.3.11: İmplantasyon aşaması tamamlanan sıçanlar tek tek kafeslerine konularak deney süresince gözlemlendi.

Resim 3.3.12: Sıçan juguler veninden periferik kan örneği alındı. Alınan periferik kan örnekleri 4000 rpm'de 10 dakika santrifüjlendi ve -86°C'de saklandı.

Resim 3.4.1: Her kite ait standart, standart dilüentler ile standart solüsyonlar hazırlandı.

Resim 3.4.2: Örnek kuyularına 40 µL örnek dilüent ve 10 µL örnek ELISA Kit plağına pipetlendi. Standart kuyularına 50 µL standart dilüenti ELISA Kit plağına pipetlendi

Resim 3.4.3: Tüm kuyulara 50 µL HRP-Konjugat antikoru eklendi

Resim 3.4.4: Tüm kuyulara 50 µL Kromojen solüsyonu A ve 50 µL Kromojen solüsyonu B eklendi.

Resim 3.4.5: Tüm kuyulara 50 µL stop solüsyonu eklendi.

Resim 3.4.6: Plaka ELISA okuyucuya yerleştirildi.

Resim 3.4.7: Tüm örneklerin adı bilgisayarda New Session – SkanIt Software 4.1 for Microplate Readers ELISA Programına girildi. 450 nm dalga boyunda ELISA Analizi yapıldı.



SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

Ti: Titanyum

Ti 500: Titanyum 500

316SS L: Paslanmaz Çelik

Co-Cr: Kobalt-Krom

Al₂O₃: Alümina

ZrO₂: Zirkonya

HA: Hidroksiapatit

PGA: Poliglikolik asit

PLA: Polilaktik asit

PE: Polietilen

PLGA: Polilaktiko glikolik asit

Fe: Demir

Co: Kobalt

Cr: Krom

Ni: Nikel

V: Vanadyum

Al: Alüminyum

Ta: Tantal

Au: Altın

Pl: Platin

Ni-Ti: Nikel-Titanyum Alaşımları

MRI: Manyetik Rezonans Görüntüleme

cp Ti: Ticari Olarak Saf Titanyum

Nb: Niobiyum

Zr: Zirkon

TiN: Titanyum Nitrit

TiO₂: Titanyum Oksit

NK: Natural Killer Hücreler, Doğal Katil Hücreler

GM-CSF: Granülosit Monosit Koloni Stimulant Faktör

IL: Interlökin
IFN- γ : Interferon- γ
TNF- α : Tümör Nekroz Faktör- α
CR1: Kompleman Reseptörü 1
CR3: Kompleman Reseptörü 3
TLR: Toll-Benzeri Reseptör
MHC: Major Histokompabilite Kompleksi
NO: Nitrik Oksit
M-CSF: Makrofaj Koloni Stimulan Faktör
ECM: Ekstrasellüler Matriks
TGF- β : Transforming Büyüme Faktörü- β
ROS: Reaktif Oksijen Türleri
CCL: C-C Motif Kemokin Ligandı
Ym1: Kitinaz-Benzeri 3 Geni
CD: Farklılaşma Kümesi, Cluster of Differentiation
LPS: Lipopolisakkarit
Dpi: Day per inflammation
CXCL: C-X-C Motif Kemokin Ligandı
Th1: T helper 1
Th2: T helper 2
SKH: Spinal Kord Hasarı
BSCB: Kan-Spinal Kord Bariyeri
OPC: Oligodendrosit Prekürsör Hücreleri
Fizz-1: Resistin Like Alpha Geni
IGF-1: İnsulin Benzeri Büyüme Faktörü-1
PDGF: Platelet Kaynaklı Büyüme Faktörü
FGF: Fibroblast Büyüme Faktörü
MMP: Matriks Metalloproteinaz
VEGF: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
MIP-1 α : Makrofaj İnflamatuar Protein 1- α
CCR1: C-C Motif Reseptör 1
MIP: Makrofaj İnflamatuar Protein
Hb: Hemoglobin

IL-1RA: IL-1 Reseptör Antagonisti

MRC1: Makrofaj MannoZ Reseptörü C Tip 1

MRC2: Makrofaj MannoZ Reseptörü C Tip 2

SLAM: Sinyal Lenfositik Aktivasyon Molekülü

IP: Intrapéritoneal

ELISA: Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay

α : Alfa

β : Beta

γ : Gama

μ : mikro



ÖZET

Oruç, K.Y. (2019). Titanyum (Ti) ve Titanyum 500 (Ti 500) İmplantasyonunun Sıçan Makrofaj Sub Grupları Aktivasyonuna Etkisi. İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Fizyoloji ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.

Günümüzde kırıklar ve spinal dejenerasyon problemlerinin çözümlenmesinde biyomateryaller (Paslanmaz çelik, Co-Cr bazlı alaşımlar, Titanyum ve titanyum alaşımları vs.) kas-iskelet sistemi stabilizasyonlarında kullanılmaktadır.

Çalışmamızda implantasyon sonrası oluşabilecek rejeksiyon, hastaya özgü inflamasyon olaylarını kontrol altına alabilmek amacıyla, *Wistar albino* soyu erkek sıçanlarda spinal bölgeye Titanyum ve Titanyum 500 implante ederek doğal immün sistem mekanizmasında ilk tetiklenen makrofaj ve sub gruplarının (M1, M2a, M2b, M2c) aktivasyonunu karşılaştırmalı olarak analiz ettik.

21 adet *Wistar albino* soyu erkek sıçanlar Kontrol (K) (n=7), Titanyum (Ti) (n=7), Titanyum 500 (Ti 500) (n=7) olmak üzere 3 grup oluşturuldu. Biyomateryaller (10 mm çap, 3 mm kalınlık) sıçanlarda L5 ve L6 arasına yerleştirildi. 1., 3., 5. ve 7. günlerde periferik kan alındı. Serum CCL3, CCL4, CD163, CD206, CCL1, CD150 parametreleri ELISA yöntemi ile analiz edildi.

K ve Ti grubu kıyaslandığında; 1. günde CD163 ve 5. günde CD206'da $p<0,001^{***}$ artış; K ve Ti 500 grubu kıyaslandığında; 1. günde CCL1'de $p<0,001^{***}$ düşüş, CCL4, CD206 ile 3. günde CCL1, CCL3, CD206 ve 7. günde CD206, CCL1 değerlerinde $p<0,001^{***}$ artış; Ti ve Ti 500 grubu kıyaslandığında 1. günde CCL1 ve CD163 değerlerinde $p<0,001^{###}$ düşüş, CCL3 değerinde çok anlamlı artış, 3. ve 7. günlerde CCL1 değerinde istatistiksel olarak $p<0,001^{###}$ artış saptandı.

Çalışmamızın sonuçlarına göre Ti 500 implante edilen hastalarda gelişebilecek immün yanıtların (inflamasyon, rejeksiyon vs.) kontrol edilebilir düzeyde düşük olmasının, inflamatuvar reaksiyonların önlenmesinde ve immünolojik terapötik metodların geliştirilmesinde yol gösterici olacağına inanıyoruz.

Anahtar Kelimeler: Biyomateryal, implantasyon, titanyum, immünoloji, makrofaj

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TYL-2018-30595.

ABSTRACT

Oruc, K.Y. (2019). Effect of Titanium (Ti) and Titanium 500 (Ti 500) Implantation on Rat Macrophage Sub Groups Activation. Istanbul University-Cerrahpasa, Institute of Graduate Studies, Department of Physiology. Master of Science Thesis. Istanbul.

Nowadays, biomaterials (Stainless steel, Co-Cr based alloys, Titanium and titanium alloys etc.) are used in the stabilization of musculoskeletal system to solve fractures and spinal degeneration problems.

In our study, we analyzed the activation of macrophages and sub groups (M1, M2a, M2b, M2c) which are the first triggered cells in the innate immune system mechanism by implanting Titanium and Titanium 500 into the spinal region in male *Wistar albino* strain, in order to control the specific inflammation events that may occur after implantation.

21 *Wistar albino* strain male rats were divided into three groups: Control (K) (n = 7), Titanium (Ti) (n = 7), Titanium 500 (Ti 500) (n = 7). Biomaterials (10 mm diameter, 3 mm thickness) were placed between L5 and L6 region in rats. Peripheral blood was collected on the 1st, 3rd, 5th and 7th days. Serum CCL3, CCL4, CD163, CD206, CCL1, CD150 parameters were analyzed with ELISA method.

When compared to K and Ti group; increasing in CD163 on 1st day and CD206 on 5th day $p < 0,001^{***}$; when compared K and Ti 500 group; decreasing in CCL1 on 1st day $p < 0,001^{***}$, increasing in CCL4, CD206 on 1st day, CCL1, CCL3, CD206 on 3rd day, CD206 and CCL1 on 7th day $p < 0,001^{***}$; when compared to Ti and Ti 500 group; decreasing in CCL1, CD163 and increasing in CCL3 on 1st day $p < 0,001^{###}$, increasing in CCL1 on 3rd and 7th day $p < 0,001^{###}$ in Ti 500 group was observed.

According to the results of our study, we believe that controllable low immune responses in Ti 500 implanted patients will guide the prevention of inflammatory reactions and development of immunological therapeutic methods.

Key Words: Biomaterial, implantation, titanium, immunology, macrophage

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No. TYL-2018-30595

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Ortopedi, diş hekimliği ve nöroşirurji gibi sağlık alanlarında çeşitli implant biyomateryalleri zarar görmüş yumuşak dokuların, kemik veya kıkırdak dokuların iyileşmesi, eklem yüzlerinin yeniden oluşturulması gibi birçok amaçla kullanılmaktadır.

Bugün kullanılan ve biyouyumluluğu denenmiş olan metal, plastik ve seramik materyaller biyoinert olarak kabul edilir. Bu materyaller de doku ile etkileşime girdiklerinde hücre–metal arayüzünde inflamatuvar yanıtlara neden olabilmektedir. Gelişen reaksiyonlar implant materyalinden beklenen işlevin yitirilmesine ve dolayısıyla implantın ömrünün kısalmasına sebep olabilir.

Kristal yapıları ve sahip oldukları güçlü metalik bağlar nedeniyle metal-metal alaşımlarının implant materyali olarak kullanım oranı daha yüksektir.

İdeal bir implant;

- ❖ Vücut içerisinde implante edildiği bölge ile empedansının sağlanması için gerekli fiziksel koşullar sağlaması,
- ❖ Yabancı cisim reaksiyonuna, inflamasyona, alerji ve hipersensitiviteye neden olmaması,
- ❖ Kimyasal ve biyolojik olarak inert olması,
- ❖ Anatomik yapıya uygun şekilde dizayn edilmesi,
- ❖ Yumuşak ve sert komşu dokular ile uyumlu ve stabil bir mekanik ilişki kurabilmesi,
- ❖ Vücut içerisindeki kimyasal dayanımı yüksek ve,
- ❖ Doku ile temas eden yüzey bölgesinin yük aktarım fonksiyonuna yetebilmesi gibi özellikleri taşımalıdır.

Titanyum ve alaşımları; korozyon direnci, biyouyumluluk ve vücudun doğal kemik yapısına uygun mekanik özellikleri ile sağlık alanında yaygın olarak kullanılan metaller arasına girmiştir.

Titanyum ve alaşımlarının yüzeyinde oluşan pasif oksit film tabakası; implante edilen biyomateryalin degradasyona uğramasına sebebiyet verebilecek dinamik vücut ortamındaki çeşitli faktörlere karşı izolasyon görevi sağlayarak, toksik iyon salınımı

yapmasını engeller. Vücutta toksik iyon salınımının yapılmaması, inflamatuvar veya alerjik reaksiyonların oluşmaması için başlıca nedenlerden biridir.

Titanyum ve titanyum alaşımları diğer metalik biyomateryallere göre kıyaslandığı zaman kemik sertliğine en yakın değere sahip olan metallerdir.

Titanyum 500 implant biyomateryali, henüz yeni üretilmiş bir alaşımdır. Titanyum 500 biyomateryalinin yüzey morfolojisi, korozyon direnci, Young Modülü, biyouyumluluk özellikleri ile ilgili gelişmiş bilgiler bulunmamaktadır.

Biyomateryallerden en güvenilir yapıda olanlar bile vücutta immün yanıtı tetikleyerek çeşitli komplikasyonlar oluşturabilirler.

Bu komplikasyonların kontrol altına alınması veya engellenmesinde ilk immün defans mekanizması, doğal immün sistemin hücresel ve humoral yanıtları ile sağlanabilir.

İnflamasyon, fagositoz, yara iyileşmesi gibi homeostazisi korumaya yönelik olaylarda doğal immün sistemin en önemli yapıtaşı olan makrofajlar enfeksiyöz ajan veya doku hasarı varlığında aktifleşen inflamatuvar yanıtlar oluşturan hücrelerdir.

Bu amaçla çalışmamızda implantasyon sonrası oluşabilecek rejeksiyon, inflamasyon olaylarını kontrol altına alabilmek amacıyla, *Wistar albino* soyu erkek sıçanlarda spinal bölgeye Titanyum (Ti) ve Titanyum 500 (Ti 500) implante ederek doğal immün sistem mekanizmasında ilk tetiklenen makrofaj ve sub gruplarının (M1, M2a, M2b, M2c) aktivasyonunu karşılaştırmalı olarak analiz ettik.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Biyomateryaller

İnsanın yaşam kalitesi ilerleyen yaşla birlikte hastalıkların artması, travmatik kırıkların oluşması ve dokuların özelliklerini yitirmeye başlaması ile birlikte değişir.

Özellikle doku kayıpları, kemiklerde meydana gelen kırılmaların onarılması ve tıbbi komplikasyonların giderilmesi için cerrahi müdahaleler gerekebilir. Bu onarım sırasında donörlerden elde edilen doku ve organların nakledilmesi (otogreft, allogreft veya ksenogreft) veya biyomateryallerin implantasyonu ile tedaviler yapılmaktadır. Bunlar arasında uzun zamandır başarılı klinik sonuçlar veren otogreftler altın standart olarak kabul edilmektedir, ancak otogreft tedariki sınırlıdır. Ayrıca, doku / organların elde edilmesi oldukça pahalı ve ek ameliyat gerektiren allogreft ve ksenogreftler, patojen transferi ve greft reddi olasılığı nedeniyle fazla tercih edilmemektedir.

Alternatif olarak son zamanlarda ilgi, alloplastik greft olarak isimlendirilen ve implantasyon sonrasında defektif sistemin fonksiyonlarını normal ve sağlıklı bir duruma çevirebilme yeteneğine sahip olan sentetik materyaller üzerine toplanmıştır. Bu amaçla kullanılan sentetik materyallere biyomateryaller denir.

Biyomateryaller görevini yerine getiremeyen hasarlı veya desteklenmesi gereken vücut doku/organlarının onarımında veya yerini almasında, eski fizyolojik ve anatomik işlevlerini yerine getirebilmesi için kullanılırlar (1).

Biyomateryal olarak insan vücudunda sıklıkla kullanılan yapılar iki farklı şekilde sıralanabilir:

a. Kısa süreli uygulamalarda kullanılan biyomateryaller:

Kontak lensler, kırılmış kemiği sabitlemek için kullanılan kemik plakaları, teller, vidalar, cerrahi iplikler vs.

b. Kalıcı uygulamalarda kullanılan biyomateryaller:

Damar protezleri, omurga kafesleri, eklem implantları, kalp stentleri, kalp kapakçığı protezleri, kateterler, göz içi lensler, anevrizma halkaları, kalça protezleri, dental implantlar ve dolgular vs.

Biyomateryallerin üretiminde kullanılacak materyal, insan vücudunda uygulanacağı bölgeye ve yerine konulacak doku/organın özelliklerine uygun olacak

şekilde seçilmeli ve dizayn edilmelidir. Doğru şekilde dizayn edilmedikleri takdirde vücut içerisinde doku hasarı oluşabilir ve/veya kullanılan implant materyali birçok yoldan hasara (korozyon) uğrayabilir.

“Biyomateryal bilimi ve mühendisliği” multidisipliner bir tema olduğu için materyal mühendisleri, biyologlar ve klinisyenler beraber çalışarak, yeni veya kullanımda olan biyomateryallerin gelişimine, dizaynına ve üretimine yönelik daha fazla araştırma yapmalıdırlar.

2.1.1. Biyomateryallerin Tarihi

Biyomateryallerle ilgili yapılan araştırmalar son yıllarda artış göstermesine rağmen tarihsel gelişimi oldukça eskiye dayanmaktadır.

Mısırlılar, M.Ö 2000’li yıllarda keteni suture olarak yarının kapanması için kullanırken, kırılan kemik ve eksik dişlerin yerine fil, mors gibi hayvanların dişlerini ve tahta kullanmışlardır (2).

M.Ö 200 civarında, Yunan edebiyatına ait verilerde metallerin (örneğin; altın) kullanıldığına dikkat çekilmiştir. Tıbbın babası olarak bilinen Hipokrat, o zamanki kemik kırıklarının tedavisinde altından yapılmış metal teller kullanmıştır (3).

1912’de vanadyum çeliği (4), 1926’da 18-8 paslanmaz çelik (%18 krom, %8 nikel paslanmaz çelik) (3), 1928’de korozyon direnci daha yüksek ve az miktarda molibden içeren 18-8sMo paslanmaz çelik (316 paslanmaz çelik (316SS-L)) (3), 1936’da Vitallium olarak bilinen kobalt krom (Co-Cr) alaşımı (5) ve 1939’da biyoinert metal olan tantal (3) kullanılmıştır. 1947 yılında Cotton, mükemmel biyoyumluluk, dayanıklılık, korozyon direnci ve aşınma direnci özelliklerine sahip titanyum (Ti) ve alaşımlarını cerrahi uygulamalarda kullanmıştır (3).

1952’de Voorhees tarafından Vinyon N (vinil klorür ve akrilonitrilin bir kopolimeri) yapıları vasküler protezde gözenekli vasküler greftin kullanılması bu alanda büyük ilerleme sağlamıştır (6).

1963 yılında, alümina (Al_2O_3) biyoyumluluk, sertlik, yorulma direnci ve korozyon direnci özellikleri ile klinikte kullanılan ilk seramik materyaldir. 1980’lerde, zirkonya da (ZrO_2) alümina gibi ortopedik ve dental implantasyon uygulamalarında kullanılmıştır (3).

1980'lerin sonunda doku-implant etkileşimi olasılığını arttırmaya yönelik biyoaktif seramikler (hidroksiapatit (HA) vb.) geliştirilmiştir (3).

Biyomateryallerin tarih boyunca kullanımına rağmen, “biyomateryal” kelimesi yaklaşık 50 yıl önce türetilmiştir. 1950'lerden önceki biyomateryallerin çoğu, güvenlik ve biyouyumluluk hakkında bilgi kapsamının, cerrahi tekniklerin ve sterilizasyon yöntemlerinin zayıflığı nedeniyle düşük başarı oranları göstermiştir. Ayrıca yeni metodolojiler, tasarım ilkeleri ve cerrahi tekniklerin çoğu yalnızca 1940'ların sonlarında bilim, mühendislik ve tıp alanlarındaki çeşitli uzmanlar tarafından ortaya konulmuştur. Tüm bunların getirisi olarak bugün birçok insanın yaşam kalitesini arttıran biyomateryallere ilişkin cerrahi teknikler gelişmiştir (3).

20. yüzyıla dek farklı özelliklere sahip olan biyomateryallerin geliştirilmesinde birçok atılım olmasına rağmen hiçbir biyomateryal insan vücudu bileşimi, yapısı ve özelliği ile tam olarak eşleşmemektedir (Şekil 2.1.1.1) (3). Bu nedenle 21. yüzyıl, insan doku veya organlarını taklit edebilecek biyomateryalleri geliştirmeye yönelik heyecan verici bir dönem olarak görülmektedir (3).



Şekil 2.1.1.1: Kullanılan biyomateryallerin tarihsel süreç içerisindeki gelişimsel evrimi (3)

2.1.2. Biyomateryallerin Sınıflandırılması

Tıp alanında kullanılan materyaller genel olarak 3 gruba ayrılır (6) :

- a. **Sınıf 1 materyaller:** Dokularla doğrudan temas etmeyen materyallerdir (elastik bandajlar).
- b. **Sınıf 2 materyaller:** Dokularla bazen temas eden materyallerdir (tıbbi cihazlar, böbrek diyaliz makineleri, kalp-akciğer makineleri vs.).
- c. **Sınıf 3 materyaller:** Dokularla kalıcı teması olan materyallerdir (ortopedik, diş ve meme implantları vs.).

Günümüzde Sınıf 3 materyalleri çeşitli biyomedikal uygulamalarda yaygın olarak kullanılır ve biyomateryaller olarak adlandırılırlar. İmplant edilen biyomateryaller vücut sıvıları, kan, proteinler ve hücrel elementlerle doğrudan temas ederek çevre dokularla biyoentegrasyon başlatır. İyi bir biyoentegrasyon oluşumu iyileşme sürecini etkileyerek, kullanılan biyomateryalin başarısını gösterir (6).

Biyointegrasyon özelliklerine göre biyomateryaller 3 gruba ayrılırlar (3);

- a. **Biyoinert materyaller:** Konak doku ile çok az etkileşime sahip olan materyallerdir. Paslanmaz çelik, titanyum, alümina vs.
- b. **Biyoaktif materyaller:** Konak doku ile güçlü etkileşime girebilen materyallerdir. HA ve bioglass vs.
- c. **Biyoresorbe olabilen materyaller:** Zedelenmiş doku yerine yeni dokunun oluşumunu desteklemek için iskelet oluşturan, yeni doku oluşuktan sonra absorbe edilerek ortamdaki uzaklaştırılan materyallerdir. Trikalsiyum fosfat ve polilaktikoglikolik asit vs.

Biyomateryaller yapı ve özelliklerine bağlı olarak 4 gruba ayrılırlar (3);

- a. **Metalik biyomateryaller**
- b. **Seramik biyomateryaller**
- c. **Polimer biyomateryaller**
- d. **Kompozit biyomateryaller**

Metalik ve seramik biyomateryaller sert doku uygulamalarında, polimerik biyomateryaller ise mekanik özelliklerinden dolayı yumuşak doku uygulamalarında kullanılmaktadır. Üretimi zor, pahalı, gerilmeye karşı zayıf olan kompozit biyomateryal implantlar, dental dolgularda kullanılmaktadır (7).

Biyomateryaller ayrıca dental materyaller, ortopedik materyaller ve vasküler greft materyalleri gibi uygulama alanlarına göre de sınıflandırılabilir. Bu sınıflandırma tipinde her grupta metal, seramik, polimer veya kompozit materyaller kullanılabilir.

Tablo 2.1.2.1’de (3) özetlenen dört biyomateryal grubundan çalışma konumuzda odaklandığımız bölüm, metalik biyomateryallerdir.

Tablo 2.1.2.1: Metal, polimer, seramik, kompozit biyomateryallerin karşılaştırılması (3)

Materyal	Avantajları	Dezavantajları	Kullanım Alanları	Örnek
Metal	Sert Reaktif Kolay sterilizasyon Üretimi kolay Biyouyumlu	Korozyona uğrayabilir Yoğun yapı İşlenmesi zor Yüksek Young Modülü	Eklem replasmanları Kemik plakaları Kemik vidaları Dental implantlar	Titanyum ve alaşımları Co-Cr alaşımları 316L SS Altın
Polimer	Esnek Üretimi kolay	Dayanıksız Zamanla deforme olabilir Degradasyona uğrar Sterilizasyonu zor	Sütürler, Vasküler greftler, İntraoküler lensler	Naylon Polietilen Silikon Teflon Akrilat Poliglikolik asit (PGA) Polilaktik asit (PLA)
Seramik	Biyouyumlu, Biyoinert Korozyon direnci	Kırılgan Üretimi zor Yüksek Young Modülü	Dental implantlar, Total kalça replasmanında femur başı Ortopedik implant kaplamaları	Alüminyum oksit Kalsiyum fosfat Zirkonya
Kompozit	Dayanıklı Metallere göre yumuşak	Üretimi zor Pahalı Gerilmeye karşı zayıf	Eklem implantları Dental dolgular	Karbon-karbon seramik-polimer HA-PE (Polietilen) HA-PLGA (Polilaktiko glikolik asit)

2.1.3. Metalik Biyomateryaller

Metalik biyomateryaller; seramikler, polimerler ve kompozitler ile birlikte kullanılan en yaygın gruplardan biridir. Günümüzde kullanılan metalik biyomateryaller titanyum (Ti), demir (Fe), kobalt (Co), krom (Cr), nikel (Ni), vanadyum (V), alüminyum (Al) ve tantal (Ta) bileşenlerini içeren alaşımlardır. Paslanmaz çelik 316 L (SS316L), Co-Cr, Ti6Al4V ve Nitinol (Ni-Ti veya Nikel-Titanyum alaşımları, şekil hafızalı alaşımlar) en yaygın metalik biyomateryal alaşımlardır.

Bunların dışında, soy metaller de (Altın (Au), Platin (Pt)) metalik biyomateryaller arasında bulunmaktadır (3).

İlk nesil metalik biyomateryaller minimum toksisite için tasarlanmıştır.

İkinci nesil, materyalin biyolojik ortama entegrasyonunu dolayısıyla implantın ömrünü artırmak için hem mekanik hem de moleküler düzeyde fonksiyonelliği sürdürmek amacıyla tasarlanmıştır.

Üçüncü nesil ise sadece fonksiyonelliği sürdürmeye değil, aynı zamanda çevre dokunun da biyoaktif madde ile birlikte yenilenmesine odaklanmıştır (3).

Metalik materyallerin vücutla bir bütün oluşturabilmesi için korozyon direnci, biyoyumluluk gibi özelliklere de sahip olmalıdırlar (8).

Metalik biyomateryallerin biyoyumlulukları, hasar durumunda hızlı bir şekilde yenilenebilen pasif oksit film tabakasını oluşturabilmeleri ile desteklenmektedir. Materyal oksijene maruz kaldığında metal yüzeyinde pasif oksit film tabakası oluşur ve hasardan sonra milisaniyeler içinde yenilenebilir (9). Pasif oksit film tabakasının varlığıyla beraber *in-vivo* ortamda korozyon riski azalır (8).

Metalik biyomateryallerin diğer gereksinimleri ise biyotolerabilite, biyoadhezyon, biyoaktivite ve işlenebilirliktir. Her metal ve metal alaşım mekanik, kimyasal ve biyofonksiyonel özellikleriyle farklı uygulama bölgelerinde farklı avantajlara sahiptir (7).

Fazla yüke maruz kalan ağırlık taşıyan bölgelerde yapısal hasara sebep olmamak için kullanılacak implant materyalinin yorulma mukavemeti son derece önemlidir (7).

Tablo 2.1.3.1: Vücuda implante edilecek biyomateryallerin sahip olması gereken özellikler (3)

Biyomateryallerin Sahip Olması Gereken Temel Özellikler	
Biyouyumluluk	İnflamasyon, immün cevap ve rejeksiyonu uyarıcı olmamalı
Non-Toksik	Dokularda toksisite yaratmamalı
Non-İmmünojenik	İmmün reaksiyonları oluşturacak özellikten uzak olmalı
Non-Korozif	Fizyolojik pH derecesinde korozyona uğramamalı
Büyük Yüzey Alanı	Yüksek dansiteli hücrelere ev sahipliği yapmalı
Modifiye Edilebilir Yüzey	Yüzey işlemleri ile doku adhezyonu güçlendirilebilmeli
Yeterli Mekanik Güç	Stimulasyonlara dayanıklılık
Sterilize Edilebilirlik	Toksik kontaminasyondan korunmaya yönelik implantasyondan önce sterilize edilebilmeli

Yeni nesil metalik biyomateryaller sadece biyotolerable değil, aynı zamanda biyofonksiyoneldirler. Biyofonksiyonel materyaller, çevre doku ile bütünleşerek doku büyümesini desteklerler. Hücre adezyonu ile başlayarak, hücre yayılması, ve proliferasyonla devam eder ve sonuç olarak doku büyümesi sağlanmış olur (3, 7).

Biyouyumluluklarının kompozit, polimer ve seramik biyomateryallere göre daha düşük olması, vücut ortamında korozyona uğrayarak alerjik doku reaksiyonlarına neden olabilecek metal iyonu salımı yapmaları, doku ve organlara göre sert yapıda olmaları, yüksek yoğunluğa sahip olmaları gibi dezavantajlarına rağmen; moleküler düzeyde sahip oldukları kristal yapıları ve güçlü metalik bağlarından dolayı yüksek mukavemet, yorulma direnci ve kolay işleme gibi mekanik özellikleriyle metal ve metal alaşımları (paslanmaz çelik, altın, kobalt-krom alaşımları, titanyum ve titanyum alaşımları gibi) implant materyali olarak sıklıkla kullanılmaktadır (3).

Maruz kaldıkları yüke dayanıklılık göstermeleri, yorulma dirençlerinin olması ve plastik deformasyon ile esnek davranış sergilemeleri metalleri kullanışlı hale getirir. Bu nedenle metalik materyaller ağırlık taşıyan kemik, diş ve diğer vücut bölgelerinin desteklenmesinde önemli bir rol oynamaktadır.

Metalik biyomateryaller kobalt-krom alaşımları, paslanmaz çelikler, titanyum ve titanyum alaşımları olmak üzere 3 temel gruba ayrılırlar (Tablo 2.1.3.2) (3).

Tablo 2.1.3.2: Metalik biyomateryallerin uygulama ve kullanım alanları (3).

Uygulama Alanı		Kullanım Amacı
Titanyum ve Alaşımları	Nöroşirurjik Ortopedik Ortodontik	Dental implantlar, ortodontik teller, vasküler stentler, kalp kapakçık parçaları, total kalça replasmanları
Paslanmaz Çelik Alaşımları (316L SS)	Ortopedik Ortodontik Kardiyovasküler	Geçici aletler (vidalar, plakalar), total kalça replasmanı
Kobalt-Krom Alaşımları	Ortopedik Ortodontik Kardiyovasküler	Total eklem replasmanı, dental implantlar, takma dişler, ortodontik teller, kemik implantları, yük taşıyan implantlar

2.1.4. Titanyum ve Titanyum Alaşımları



Resim 2.1.4.1: Titanyum metali ⁽¹⁾

22	47.867
Ti	
1668°C	Titanyum
3287°C	

Şekil 2.1.4.1: Titanyum metalinin periyodik özellikleri

Titanyum periyodik cetvelin 4B grubuna ait sert, parlak, gümüş-beyaz renkli bir geçiş metalidir (Resim 2.1.4.1). Ergime noktası 1668°C, kaynama noktası 3287°C, atom numarası 22, atom ağırlığı 47.867 g/mol'dür (Şekil 2.1.4.1) (10). Titanyum bir metal olarak doğada serbest halde bulunmasa da, yeryüzünde en çok bulunan dokuzuncu element ve dördüncü metaldir (11).

Titanyum biyoyumluluk ve iyi korozyon direnci özelliklerinden dolayı 'altın standart' olarak değerlendirilmektedir (12).

Titanyum ve titanyum alaşımları, biyoyumluluğu yüksek ve osseointegrasyon açısından güçlü bir performans sergileyen metalik biyomateryallerdir (11). Kemiğe en yakın değerinde Young modülüne sahip olması, metalik implant materyali olarak kullanımı için avantajdır (13). Paramanyetik özellik göstermesi ve non-ferromanyetik olması nedeniyle post-operatif Manyetik Rezonans Görüntüleme (MRI) diğer metallere oranla daha az artefakt yaratmaktadır (14, 15, 16).

Saf titanyum (commercially pure, cp Ti, derece 2) ve Ti-6Al-4V (derece 5) medikal alanda ağırlıklı olarak kullanılan alaşımlardır (17). Kemik, eklem ve diş gibi sert doku replasmanında yaygın olarak kullanılırlar.

cp Titanyum sınırlı mekanik özellikleri nedeniyle diş implantlarında; kalça ve diz implantları, kemik vidaları ve plakaları gibi iyi mekanik özelliklerin gerekli olduğu durumlarda Ti-6Al-4V alaşımı kullanılmaktadır (17).

Young modülü ve stress shielding (stres koruma kalkanı) özelliği birbiri ile doğru orantılı olduğu için, titanyum ve alaşımlarının düşük Young modülüne sahip olması genel olarak biyomekanik bir avantaj olarak görülmektedir (18).

Pasivasyon ya da repasivasyon işleminde kendiliğinden oluşan oksit filmin varlığı, mükemmel biyoyumluluk ve korozyon direnci ile ilgili önemli bir faktördür (19, 20).

Titanyum; demir, alüminyum, vanadyum, molibden gibi elementler ile alaşımlanabilir (21). Titanyum alaşımları, belirli bir akma dayanımı ve yoğunluk arasındaki ilişkiye göre ($\sigma_{0.2}$ /yoğunluk) çelikler, nikel alaşımlar vb. materyal türleri ile karşılaştırıldığında 500°C sıcaklıkta dahi koruyabildiği yüksek dayanıma sahiptir (22, 23).

Günümüzde tüm Titanyum alaşımları içerisinde % 75-85 oranında tüketilmekte olan ilk titanyum alaşımı “Ti-6Al-4V (Ti-64)” olmak üzere 1954 yılında Amerika Birleşik Devletlerinde geliştirilmiş ve kullanılmıştır. Daha sonraki yıllarda üretilen diğer titanyum alaşımları Ti-6Al-4V alaşımına alüminyum, vanadyum, nikel, zirkonyum gibi elementlerin eklenerek, artırılıp azaltılması şeklinde oluşturulmuştur (23).

Bilim dünyasında geliştirilen yüzlerce çeşit titanyum alaşımından sadece 6-7 tanesi (Ti-6Al-4V, Ti-6Al-7Nb, Ti-5Al-2,5Sn, Ti-2Al-2,5Zr, Ti-32Mo, Ti-Mo-Ni, Ti-Pd gibi) en iyi bilinenlerdendir (23).

2.1.5. Biyouyumluluk

Biyomateryallerin biyolojik performansını belirten biyouyumluluk, herhangi bir ters etki yaratmadan canlı organizma ile etkileşim içinde olma yeteneğidir (24).

Biyouyumluluk, biyomateryalin yapısal uyumluluğu ve yüzey uyumluluğu olarak iki farklı şekilde açıklanmaktadır. Biyomateryalin doku ve organlara fiziksel, kimyasal ve biyolojik açıdan uyumluluk göstermesi yüzey uyumluluğu; biyomateryalin doku mekanik karakteristiği ve/veya davranışına ortalama bir uyumluluk göstermesi ise yapısal uyumluluk olarak tanımlanmıştır (25, 26).

Titanyum ve alaşımları diğer metalik biyomateryallere kıyasla kemik dokusu ile daha iyi derecede biyouyumluluğa sahip olmasına rağmen, vücuda implante edildikten sonra oluşturacağı immün yanıtlar titanyumun başarısını etkilemektedir (27).

Bazen implant materyalinin topografik modifikasyonu, implant yüzeylerinin biyouyumlu, biyobozunabilir veya immunotolerojenik biyomateryallerle kaplanması inflamasyonu ve/veya rejeksiyonu engellemek için yeterli olmayabilir (27).

İmplant materyallerinin non-toksik özelliği, inflamatuvar veya alerjik reaksiyona neden olmaması, insan vücudunun implanta karşı vereceği yanıtları engelleyerek biyomateryallerin başarısını artırır (27).

2.1.6. İmplant materyalinin sahip olması gereken kemiğe benzer mekanik özellikleri

Biyomateryal olarak kullanılacak bir implantın biyouyumluluğunun yanı sıra, özellikle yükün fazla olabileceği kalça-diz protezlerinin kemik ile mekanik benzerliklere sahip olması gerekmektedir.

Bazı bilimsel çalışmalarda, implant materyali seçiminde Ti alaşımlarının, 316L SS ve Co-Cr bazlı alaşımlara göre, düşük Young's modülü ve yüksek biyouyumluluğu ve korozyonlara direnci nedeniyle implant materyali olarak kullanımının oldukça arttığı ileri sürülmektedir (Tablo 2.1.6.1) (3).

Tablo 2.1.6.1: Kemik ve metalik biyomateryallerin Young Modülü değerleri (3)

Materyal	Young Modülü Değeri (GPa)
Kortikal Kemik	7-30
Süngerimsi Kemik	1-14
cp Titanyum	100
Titanyum (Ti-6Al-4V)	110
316 L Paslanmaz Çelik	190-200
Kobalt-Krom Alaşımı	210-230

Düşük elastisite modülüne sahip implantların imal edilmesi için, kemiğe özgü büyüklükte gözenekli yapıların kullanılması önerilmektedir. Materyalin türüne karar vermede yardımcı olan en önemli mekanik özellikler çekme mukavemeti, Young modülüdür (27).

Biyomekanik uyumsuzluk durumunda implant kırığı oluşabilir. Bu nedenle, kemik replasmanında kullanılacak materyal kemiğe benzer mekanik özellik göstermelidir (27).

2.1.7. Korozyon Direnci

İnsan vücudu normal koşullarda 1 atmosfer basınçta, 37°C'de 7.2-7.4 pH değerlikli %0,9 oranında NaCl içeren vücut akışkanlarına sahiptir (28). Bu hafif bazik ortam, metalik biyomateryallerin implante edildikleri yerde metal iyonlarının salınımına neden olarak lokal ters doku reaksiyonlara maruz kalmasına ve doku zedelenmesine yol açar (28, 29).

Metaller, aşındırma yeteneği yüksek sıvılardan etkilenebilirler. Vücut sıvıları metallerin yüksek oranda aşınmasına neden olabilecek dinamik bir ortamdır (30). O yüzden metal alaşımlarının elektrokimyasal reaksiyonlarla aşınarak değişikliğe uğraması olarak ifade edilen korozyon, implant materyali seçiminde ve implantasyonunda çok önemlidir.

Vücuda implante edilen materyalin korozyona uğramasıyla, materyalden salınan iyonlar ve dokulara elektronların geçişi kemiği çevreleyen dokulardaki hücrelerin fiziksel hareketlerini sınırlar. İmplantın neden olduğu bu inorganik reaksiyonlarla ortaya çıkan korozif parçacıklar diğer organlara iletilerek implantasyon bölgesinde toksik birikime, kas ve dokularda alerji eğilimine ve implantasyon bölgesinde inflamasyona neden olmaktadır (8, 30).

Kararlılığı belirsiz çözünemeyen oksitler üreten Ti ve Ta, niobiyum (Nb) ve zircon (Zr) gibi elementleri içeren biyomateryallerin kullanımı sınırlıdır (7). Yeni üretim teknolojileri, oksidasyon sonucu oluşan pasif biyofilm tabakasının oluşturduğu mekanik zedelenmeden kaçınmak için, implant materyalinin yüzeyini TiN (Titanyum nitrit) gibi sert tabakalarla kaplamaktadırlar (31). Bu tabakanın biyoyumlu olduğu, pasif oksit film tabakasının oluşumunu kontrol ettiği ve vücut ortamı içerisinde implantta oluşabilecek adheziv-abraziv aşınmayı yavaşlattığı rapor edilmiştir (31, 32).

Ti-6Al-4V, Ti-6Al-7Nb ve Ti-5Al-2.5 Fe gibi titanyum alaşımları, niobiyum, tantal ve 316L paslanmaz çelik korozyona dirençli materyaller olduklarından doku ve kemik ile biyoyumludur (33).

Ti-6Al-4V, Ti-6Al-7Nb, Ti-35Nb-5Ta-7Zr ve Ti-5Al-2,5Fe gibi korozyona dayanımı yüksek titanyum alaşımları kalp kapakçığı protezleri, ağır yük taşıyan diz, kalça ve diğer kemik implantasyonlarında yaygın olarak kullanılmaktadır (33).

Paslanmaya karşı iyi direnç gösteren çoğu metal ve alaşımlar pasif durumdadır. Ti, Ta ve Nb elementlerin yüzeyinde metal oksitlerden oluşan, metalleri ortamdan ayıran ince pasif oksit film tabakası (3-10 nm kalınlığında) (titanium yüzeyinde oluşan titanium oksit (TiO₂) tabakası), izolasyon etkisi meydana getirerek vücutta implant materyalinden kaynaklanan iyon salınımlarını engeller ve implantın dokuya olan biyouyumluluğunu artırır (34, 35).

Tüm metaller ve alaşımlar, vücut ortamındaki klor iyonları ve proteinlerin varlığı nedeniyle korozyona maruz kalmaktadır. Cerrahi olarak implante edilen metalik biyomateryallerin yüzeyinde çeşitli kimyasal reaksiyonlar meydana gelir. Biyomateryalin metalik bileşenleri iyonik formlarına oksitlenerek çözülmüş oksijen hidroksit iyonlarına indirgenir (34).

Titanium yüzeyler üzerindeki kararlı oksitlerin (TiO₂) uygun osseointegrasyon sağlayabildiği bilinmektedir. Oksit stabilitesi, bileşimin yapısına ve filmin kalınlığına güçlü bir şekilde bağlıdır (36).

Oksit filmin varlığı; belirli potansiyeldeki pasif metalin çözünme hızını, aktif bir metalin çözünme hızına göre daha çok düşürür. Metalin yüzeyinde kendiliğinden oluşan bu filmler, film boyunca metalik iyonların ve/veya elektronların aşırı transportunu engeller. Oluşan filmler kompakt yapılı ve metal yüzeyini tamamen kaplarsa; metal oksit-solüsyon arayüzü boyunca iyonların veya elektronların göçünü sınırlayan atomik bir yapıya sahip olduklarından alaşım yüzeyinde oluşabilecek mekanik stres veya korozyona karşı daha etkili bariyer özelliği sağladıkları gösterilmiştir (37).

2.1.8. Yüzey Topoğrafyası

Çoğu hekim sandblast işleminden geçmiş, termal asit ile kazınmış pürüzlü yüzeyi "altın standart" olarak düşünür. Pürüzlü yüzey, kemik ve implant yüzeyi arasında sağladığı fonksiyonel ve yapısal bağlantı ile yüksek implant stabilizasyonu açısından avantajdır. Pürüzlü yüzeyler; kemik ile implant yüzeyin birbirine bağlanmasını artırarak osteogenik hücrelerin farklılaşmasını yönetir (38).

2.1.9. Yüzey Pürüzlülüğü (Porozite)

Biyomateryal yüzeyindeki pürüzlülük, implante edildiği doku - doku çevresi ve implant arasındaki etkileşimi belirlemede büyük bir rol alır (39).

Yüzey pürüzlülüğü, aşınma hızı ve sürtüme katsayısı ile doğru orantılıdır (40). Birbiri ile etkileşim halinde olan iki materyalin birbiri üzerinde kaymaları sonucu ortaya çıkan direnç olarak ifade edilen sürtünmede, enerji kaybının artması ile birlikte ortaya ısı çıkar. Bu ısı kaygan yüzeylerden Young modülü daha az olan materyal üzerinde deformasyon (adheziv aşınma) oluşturur (41, 42).

Moleküler seviyede ise yüzey pürüzlülüğü, hücrelerin adezyonunda önemli bir faktördür. İmplant materyali üzerinde oluşacak hücre adezyonu miktarı, hücre proliferasyonu ve differansiyasyonun kapasitesini etkilemektedir (43, 44). Yapılan çalışmalarda ortalama %30-70 porozite ve 100-650 µm por boyutunun adhezyonu arttırdığı (45, 46), kemik büyümesi için 100–400 µm'lik por boyutunun optimum değer olduğu (47), osteoblastların büyümesi, differansiyasyonu ve vaskülarizasyonu için ideal por boyutunun ise 300-655 µm olduğu belirtilmiştir (48).

2.1.10. Osseointegrasyon

İmplant yüzeyinin, kemiklerle ve diğer dokularla mikro-hareketlere bağlı olarak bütünleşmemesi sonucu implant gevşemesi oluşur. Metalik biyomateryallerin güvenilir ve başarılı implantasyonunda osseointegrasyon önemli bir faktördür (49).

İmplant yüzeyi ve kemik arasındaki etkileşimin artırılması, pürüzlülüğün artırılmasıyla doğru orantılıdır (49, 50). İmplantın vücut ortamında aşınarak korozif parçacık ve toksik iyon salınımı yapması, implantasyon sürecinde cerrahi travma ile kemikte lezyon veya hasar oluşması, implantın stres koruma kalkını oluşturması sonucu kemik-implant arayüzey etkileşimi azalır (51).

Kemik hücresi kolonizasyonu için ideal por boyutunun 100-200 µm, ideal porozitenin % 60-65 oranında olması gerektiği belirtilmiştir (43, 48).

2.2. İmmün Sistem

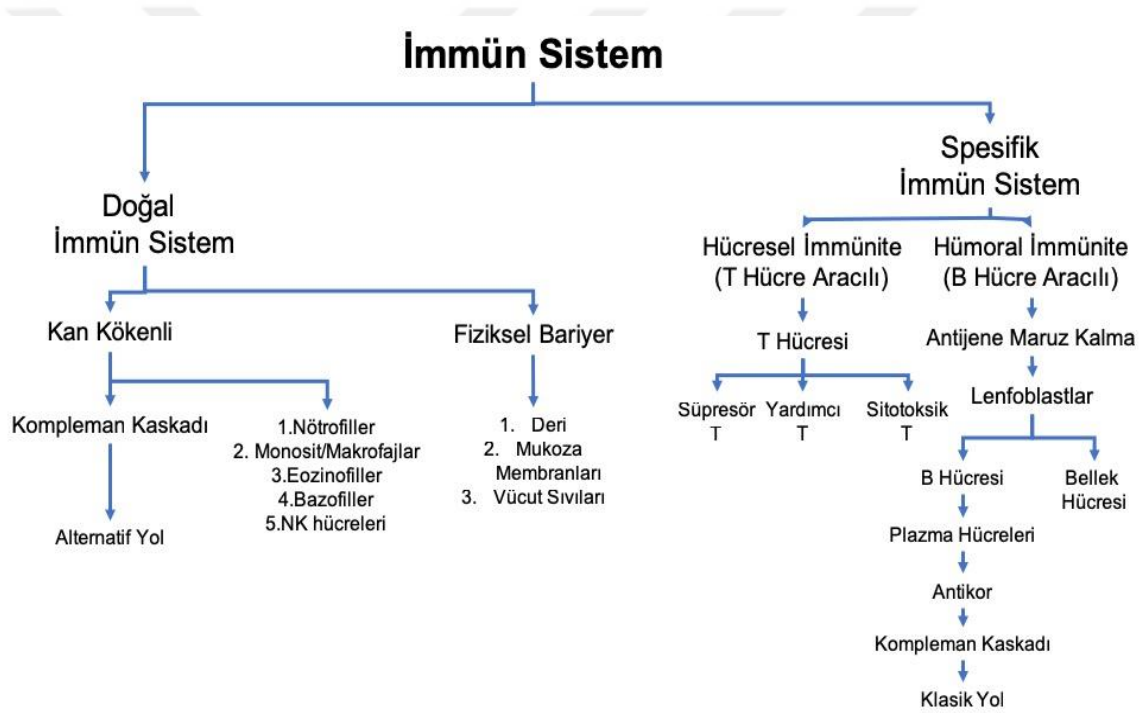
Organizmanın kendinden olmayan antijenik yapılara karşı, immün defans moleküllerinin koordineli ve karşılıklı etkileşimi sonucu oluşturduğu yanıtların tümüne **immün sistem** denir (52).

İmmün sistem, gelişme, üreme ve yara iyileşmesi gibi fizyolojik süreçlerin bütünleyici bir parçası olmakla birlikte, metabolizma, merkezi sinir sistemi, kardiyovasküler sistem gibi diğer vücut sistemleri ile de çift yönlü etkileşim halindedir.

2.2.1. Doğal İmmün Sistem

Doğal immün sistem, immün sistemin filogenetik olarak en eski bileşeni olmakla beraber bir o kadar karmaşıktır. Enfeksiyonlara (epitel doku, gastrointestinal, respiratuar, genitoüriner kanallar) ve antimikrobiyal peptitlere-proteinlere karşı; humoral (kompleman bileşenleri ve opsoninler) ve hücrenel bileşenlerle (nötrofil, monositler/makrofajlar, dendritik hücreler ve doğal lenfoid hücreler) bariyer oluşturarak cevap verir (65).

Defensif bariyerler; anatomik (cilt, mukozalar), fizyolojik (sıcaklık, düşük pH, kimyasal medyatörler), fagositik (mikroorganizmaların sindirilmesi) veya inflamatuardır (vasküler sıvı sızıntısı) (53).



Şekil 2.2.1.1. Spesifik immün sistem ve doğal immün sistem komponentleri

Doğal immünite patojenlere karşı ilk savunma hattını oluşturur, homeostazisi korumak, çeşitli enfeksiyöz ajanları ortadan kaldırmada oldukça etkilidir. Spesifik immün yanıtın gelişiminde, aktivasyonunda ve düzenlenmesinde de role sahiptir (54, 55). İmmün sistem hücreleri pluripotent hematopoietik kök hücreden türevlenmektedir. Doğal immün sistem hücreleri granülositler (nötrofiller, eozinofiller, bazofiller) ve agranülositler (Natural Killer hücreleri (NK)), monosit/makrofajlar ve dendritik hücreler) olmak üzere ikiye ayrılırlar.

2.2.2. Makrofajlar

Mononükleer fagositik sistemi, kemik iliğinde bulunan prekürsör promonositler, dolaşımdaki monositler ve dokulardaki makrofajlar oluşturur. Dolaşımdaki monositler ve doku makrofajları mononükleer fagositik sistemi olarak bilinen aynı hücre dizisinin iki farklı aşama hücreleridir (56).

Monositler kemik iliğinde 1-3 gün süren olgunlaşma evrelerinin ardından kan dolaşımına girerler. Dolaşımdaki monositler inflamasyon, enfeksiyon veya doku zedelenmesine yanıt olarak Granülosit-Monosit Koloni Stimulan Faktör (GM-CSF), İnterlökin-3'ü (IL-3) salgılayarak aktifleşirler. Damarlardan dokulara diyapedez ile göç ederek burada makrofajlara dönüşürler. Makrofajlar fagositik mononükleer hücrelerdir (57).

Monosit ve makrofajlar doku hasarı veya inflamasyon sırasında primer defans mekanizmasını oluştururlar ve başarılı doku rejenerasyonu için gerekli immün hücrelerdir (56).

Mikroorganizmaların makrofajlarca tanınmasını fagositoz aşaması izler ve fagositik hücrelerin aktivasyonu sonucunda mikroorganizmaların yıkımı meydana gelir (58).

Makrofajlar kompleman kaskatı için Kompleman Reseptörü 1 (CR1) ve Kompleman Reseptörü 3 (CR3) reseptörleri (59), çeşitli sitokin reseptörleri interferon- γ (IFN- γ), IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, TNF- α , scavenger reseptör (60), yüzey membranlarında antijen-antikor kompleksleri için antikor reseptörleri (61), diyapedezde yer alan rolling (yuvarlanma) ve adhezyon için selektin-integrin reseptörleri (62), mannoz reseptör, adaptif immünite ile etkileşebilmek için Toll-benzeri reseptör (TLR) (63), MHC I, MHC II (64) gibi çeşitli reseptörleri eksprese ederler.

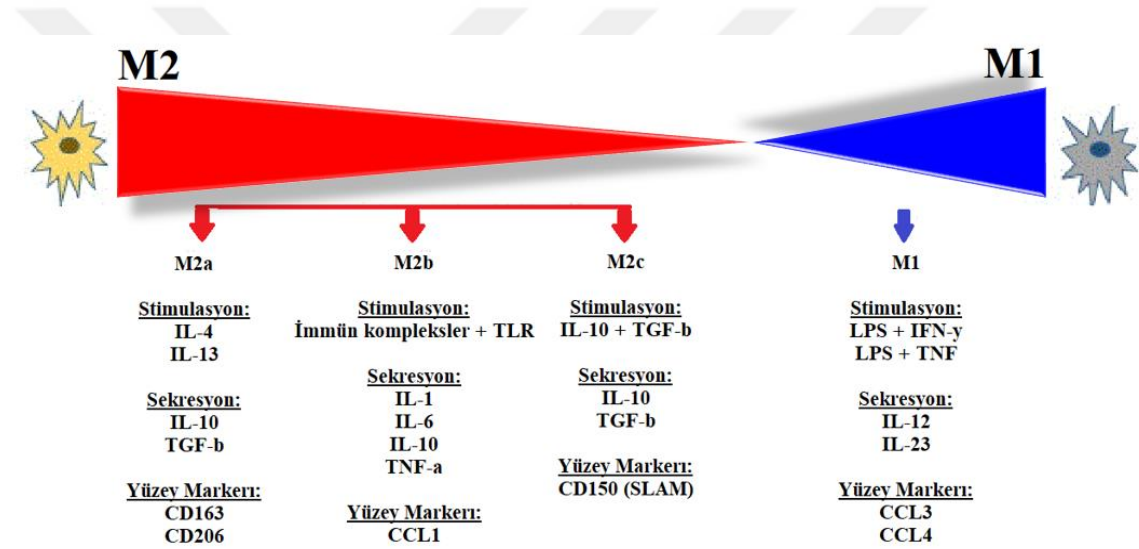
İnflamasyon varlığında dokuya göç ederek değişen makrofaj hücreleri buldukları ortamdaki mikro-çevre sinyallerine göre polarize olurlar. Makrofajlar M1 ve M2 makrofajlar olmak üzere iki ana gruba ayrılırlar (65).

2.2.3. Makrofaj Polarizasyonu

Makrofajlar; organların gelişiminde, dokuların fonksiyonlarını yerine getirmesinde ve rejenerasyonunda da rol alırlar. Makrofajlar sadece debris, bakteri ve konağın fonksiyonlarını yerine getiremeyen hücrelerinin ortamdaki uzaklaştırılmasından

sorumlu değil ayrıca zengin bir büyüme faktörü kaynağıdır. Aynı zamanda; makrofajlar yara iyileşmesinde hücrelerin, büyüme faktörlerinin ve matriks komponentlerinin düzenli bir şekilde davranmalarını sağlayan orkestra yönetmenleridir.

Viral, mikrobiyal, paraziter antijenler, immün kompleksler ve apoptotik/nekrotik hücreler tarafından salınan çeşitli mediyatörlerle uyarılarak aktive olurlar. Bu aktivasyon patojenlerle savaşmada, immünmodülasyonda ve doku bütünlüğünün korunmasında etkindir. Makrofaj aktivasyonunun karmaşık mekanizmasını açıklayabilmek için M1 (klasik aktivasyon, proinflamatuvar) ve M2 (alternatif aktivasyon, antiinflamatuvar) polarizasyon modelleri geliştirilmiştir (66, 67).



Şekil 2.2.3.1: M1 ve M2 makrofajlarının polarizasyon modelleri

M1 aktivasyonu; hücre içi patojenler, bakteriyel hücre duvarı bileşenleri, lipoproteinler, IFN- γ ve TNF- α gibi sitokinler tarafından indüklenir. İnflamatuvar sitokin sekresyonu ve nitrik oksit (NO) üretimi ile karakterize olan, etkili bir patojen öldürme mekanizmasına sahiptir (66).

M2 aktivasyonu; fungal hücreler, parazitler, immün kompleksler, kompleman ürünleri, apoptotik hücreler, Makrofaj Koloni Uyarıcı Faktör (M-CSF), IL-4, IL-13, IL-10, Transforming Büyüme Faktörü- β (TGF- β) tarafından tetiklenir. Ekstrasellüler matriks (ECM) bileşenleri, anjiyojenik ve kemotaktik faktörlerle birlikte IL-10 üretebilme ve yüksek fagositoz kapasitesine sahiptirler. Apoptotik hücrelerin

klirensinde, inflamatuvar yanıtın azaltılmasında ve yara iyileşmesini desteklemede de rol alırlar (66).

M2 makrofajları alerjik inflamasyona ve tümör dokularının büyümesine neden olabilirler (66, 67).İnsanlarda ve farelerde, GM-CSF, M1 makrofajlara farklılaşmayı sağlarken, M-CSF ise makrofajlarda M2-benzeri fenotip üretimini başlatmaktadır (68).

İyileşme fazlarının farklı aşamaları; yaralanma şiddeti, yaş, yaralanan doku/organ, bireyin sağlık durumu vb. gibi faktörlerden etkilenir. Deri ya da kas yaralanmasında normal doku onarımı sırasında inflamatuvar faz 1-2 gün sürerken, proliferasyon fazı yaralanmadan yaklaşık 1 hafta sonra en yüksek değere ulaşır. Doku rejenerasyonun son fazı olan yeniden modelleme fazı ise proliferasyon fazı sırasında başlatılır ve bu aşama aylarca sürebilir (69).

Spesifik fenotip ve fonksiyonlara sahip makrofajlar, yara onarımının farklı aşamalarında süreçlere dahil olur ve geçişlere katkıda bulunurlar. Yaralanmada erken proinflamatuvar evrede M1 makrofajlar ve proreparatif aşamada M2 makrofajlar aktive olurlar (69).

M1 makrofajlar travmaya karşı verilen akut yanıt sırasında gözlenir ve yüksek düzeylerde reaktif oksijen türleri (ROS) açığa çıkarırlar. Proinflamatuvar sitokin salınımını ve aynı zamanda fagositozu arttırarak, patojenleri ve yara debrislerini yara bölgesinden uzaklaştırarak doğal immün defansın etkinliğini arttırırlar (69).

Buna karşılık M2 makrofajlar; proinflamatuvar sitokin ve ROS ürünlerinin üretimini azaltarak doku onarımına destek olurlar. Antiinflamatuvar lökositleri (T supresör hücreler) yara bölgesine toplayarak, ECM bileşenlerini ve büyüme faktörlerini upregüle eden immünosupresif sitokinleri (IL-10) ve kemokinleri (CCL17, CCL18 ve CCL22) salgılatırlar. Bunun sonucu olarak inflamatuvar yanıtların regülasyonunu, debris klirensini ve doku yeniden modellenmesini (doku remodeling) sağlarlar (69).

Makrofaj aktivasyonunu etkileyen çeşitli çevresel ve dokuya özgü uyaranlardan dolayı, in vivo ortamda yaralanma sürecine eşlik edecek spesifik makrofaj fenotiplerinin kesin olarak tanımlanması zordur. Makrofajlar adaptasyon özellikleri nedeniyle yeni uyaranlara yanıt olarak fenotiplerini değiştirebilirler (67).

Bu nedenle, *in vitro* ortamda tanımlanmış fenotipler, makrofaj aktivasyon sürekliliğini çok basite indirgemektedir. Bu sınıflandırma sistemi kullanılarak, makrofaj aracılıklı yara onarımı süreci modellenilebilir (66, 69).

İnflamatuvar fazda; hem M1 hem de M2a makrofajlar aktif rol oynar. M1 makrofajları, proinflamatuvar sitokinler; IL-1, TNF- α ve IL-6 salgırlar. M2a makrofajları ise inflamatuvar fazda yüksek seviyede Arginaz-1 ve Kitinaz Benzeri-3 (Ym1) genlerini eksprese ederler (69).

Erken proliferatif fazdaki makrofajlar, proinflamatuvar sitokinleri salgılamaya devam ederler, ancak bu evrede IL-10 gibi bazı antiinflamatuvar markırların salımına doğru geçiş yapılır. Proliferatif fazda M2b makrofajları aktive olur. Geç proliferatif fazda M2b aracılı IL-10 salınımı, M2c'nin stimulasyon markırı olan TGF- β ekspresyonunun artmasıyla M2c makrofajlarının aktivasyonunu uyarır (70).

Yeniden modellenme fazında ise, eşzamanlı olarak Arginaz-1 ekspresyonunda azalma, TGF- β ve CD206 ekspresyonunda ise artışın gözlemlenmesi; yeniden modelleme fazında M2c makrofajların baskın olduğunu göstermektedir (70).

Başarılı yara onarımı sonrasında makrofajların sayısı; yaranın kapanması ile paralel olarak normal seviyelere geri döner. Kalıcı makrofaj aktivasyonu ile karakterize olan, 3 ay içinde iyileşmeyen yaralar, "kronik" olarak kabul edilir. Devamlı ve yanlış makrofaj aktivasyonu, farklı onarım aşamaları arasındaki geçişleri bozar. Makrofajların en üst düzeydeki aktivasyonun %50 azaldığı dönem olan resolüsyon dönemi, spinal kord hasarından sonraki >7 haftaya denk gelmektedir. Makrofajların en üst düzeydeki (pik) aktivasyonunun >%45'i kronik dönemde hala devam etmektedir. Bu bilgiler makrofaj aktivasyonunun büyük katkısının olduğu spinal kord hasarının kronik bir yara olarak kabul edilebileceğini gösterir (69).

2.2.4. M1 Makrofajlar

M1 makrofajlar, fırsatçı patojenlerle enfeksiyonlara karşı doğal immünyetede ana efektör hücreler olarak karakterize edilirler (71).

Bakteriyel ürünler (lipopolisakaridler (LPS)), IFN- γ , GM-CSF gibi sitokin ve büyüme faktörlerinden gelen uyarılar ile makrofajlar M1 fenotipine polarize olurlar (72).

M1 makrofaj fenotipi; oldukça yüksek seviyelerde IL-1 β , TNF- α , IL-8, IL-12, IL-18 gibi proinflamatuvar sitokinlerin salınımı ile inflamasyonun yaygınlaşmasını desteklerler. Patojenlere karşı güçlü mikrobisidal özelliklere sahiptir (67).

M1 makrofajları yüzeylerinde; CCL3, CCL4, MHC II, CD68, CD80 ve CD86 markırlarını eksprese ederler. Active olduklarında Th1 hücre yanıtını uyaran C-X-X Motif Kemokin Ligandı 9 (CXCL9) ve CLXCL10 kemokinlerini salgırlar. Yüksek oranda reaktif nitrojen ve oksijen ara ürünlerinin üretimi sonucu Th1 immün yanıtını desteklerler (72).

2.2.5. M2 Makrofajlar

Antiinflamatuvar M2 makrofajlar, alternatif olarak aktive edilen makrofajlar olarak da bilinirler. M2 makrofajlar; parazitlerin kontrolü, dokunun yeniden modellenmesi, immünregülasyon, tümör desteklenmesi ve güçlü fagositotik yetenekleri ile karakterizedir (67).

M2 makrofaj aktivasyonu fungal hücreler, immün kompleksler, helmint enfeksiyonları, kompleman bileşenleri, apoptotik hücreler, M-CSF, IL-4, IL-13, IL-10, TGF- β tarafından indüklenir. Bu aktivasyon yüksek miktarda IL-10, düşük miktarda IL-12 sekresyonuna neden olur. TGF- β , IL-10 gibi antiinflamatuvar sitokin salınımı yaparlar (67).

M2 makrofajları; işlevsel olarak farklı aktivasyon durumlarında olmalarından dolayı çeşitli grupları kapsamaktadırlar. Buna göre, M2 makrofajlar özel olarak ayrı gen ekspresyon profilleri, aktivasyon sinyalleri, hücre yüzey reseptörleri ve fonksiyonel çeşitliliğe dayanarak M2a, M2b ve M2c subgruplarına ayrılırlar. M2 makrofajlarının tüm alt tipleri eşit derecede immünsupresiftir (65).

Yapılan çalışmalarda M2d, M4, Mox, ve Mha gibi farklı makrofaj subgrupları da bulunmuştur. Plastisite gücü yüksek olan M2 makrofajları tüm M2 alt tiplerine dönüşebilme yeteneğindedirler (65).

2.2.6. M2a Makrofajlar

Non-polarize M0 makrofajlar; IL-4, IL-13 veya helmint enfeksiyonlarıyla indüklenerek M2a makrofaj fenotipine dönüşürler (67).

Wound healing (yara iyileşmesi) makrofajlar olarak da adlandırılan M2a makrofajları (73), IL-4'e yanıt olarak yüksek seviyede Arginaz-1 eksprese ederek kollajen ve fibroblast uyarıcı faktör öncüllerinin oluşturulmasını sağlar, ECM birikimi ve yara kapanmasını kolaylaştırır (74).

M2a hücrelerinin matriks-yeniden modelleme rolü, yara stabilizasyonuna katkıda bulunmalarını sağlar. Aynı zamanda, hasarlı dokuda veya implant biyomateryalinin çevresinde istenmeyen fibrotik değişikliklerin oluşmasının önlenmesi için sıkı bir şekilde regüle edilmelidirler (65).

2.2.7. M2b Makrofajlar

M2b makrofaj fenotipi; IL-1 reseptör (IL-1R) ligandı, TLR, immün kompleksler ve LPS ile indüklenir (65).

M2b makrofajlar, IL-10'nun salgılanması yoluyla inflamasyonu suprese edebilirler. M2b makrofajları, IL-10'un yüksek ekspresyonu ve aynı zamanda IL-12, IL-1 β ve TNF- α 'nın düşük üretimi ile karakterizedir (65).

M2b makrofajları CD163 ve CCL1 için yüzeyinde ilgili mRNAları eksprese eder. M2b makrofajları, yerleşik makrofajlardan (M0) M1 makrofajlarına makrofaj dönüşümde inhibitör etkiye sahiptir (67).

2.2.8. M2c Makrofajlar

M2c subgrubu; IL-10, TGF- β ve glukokortikoidlerle indüklenir. M2c makrofajları IL-10 ve TGF- β salgılayarak inflamasyonu suprese edebilirler. Akut ve kronik inflamasyona katılabilirler. Th2 yanıtı desteklerler. ECM sentezi yapabilirler (65).

2.3. Cerrahi yaralanmaya verilen makrofaj yanıtları

Spinal kord hasarından sonra stereotipik, birbirini takip eden inflamatuvar kaskad başlatılır. Nötrofiller dolaşımdan alınır ve merkezi sinir sisteminin glial hücrelerinden olan astrositler ve mikroglialar spinal kord hasarından (SKH) sonraki ilk 24 saat içinde aktive edilir. Yaralanmadan 2–3 gün sonra monositler yara bölgesine göç ederek, aktive

olmuş mikroglialardan fenotipik ve morfolojik olarak ayırt edilemeyen makrofajlara farklılaşmalar (69).

Bu hücrel reaksiyonlar, memeli spinal kord hasarının tüm formlarındaki patolojik sekellerin asıl nedeni olarak kabul edilmektedir. Spinal kord hasarının sebebi ne olursa olsun, hem temel bilimlerde hem de klinik gözlemlerde makrofajların yaralanma bölgesinde persistan olarak kaldığı görülmüştür. SKH'dan sonra monosit ve mikroglia kökenli makrofaj aktivasyonunun zamanlaması ve dağılımı daha önceki çalışmalarda değerlendirilmiştir (73).

İnflamasyonun iyileşme sürecindeki farklı aşamaları, yaralanmanın şiddeti, yaş, yaralanan organ/doku ve bireyin sağlık durumu gibi faktörlerden etkilenmektedir. Deri ya da kas yaralanmalarında; doku onarımı sırasında inflamatuvar faz sadece 1-2 gün sürer. Bunu takip eden proliferasyon fazı ise yaralanmadan yaklaşık 1 hafta sonra pik yapar. Remodeling (Yeniden modelleme) fazı ise proliferasyon fazı sırasında başlatılır, yaralanma öncesi doku bütünlüğü sağlanıncaya kadar, aylar hatta yıllar boyunca sürebilir (75).

Spesifik fenotip ve fonksiyonlara sahip makrofajlar, farklı onarım aşamalarında yer alırlar. Ve yara onarımındaki süreçlere ve geçişlere katkıda bulunurlar (81). Yaralanmada makrofaj aktivasyonunda; proinflamatuvar erken evre de, M1 makrofajlar daha sonraki aşamada ise M2 makrofajlar devreye girer. M1 makrofajlar travmaya karşı verilen akut yanıt sırasında gözlenir ve yüksek düzeylerde ROS açığa çıkarır. M1-makrofajlar proinflamatuvar sitokin salınımını ve fagositozu arttırarak, patojenleri ve yara debrislerini hasar alanından uzaklaştırmak suretiyle immün yanıtı kolaylaştırır (69).

M2 tip makrofajlar proinflamatuvar sitokinlerin ve ROS ürünlerinin üretimini azaltarak doku onarımı özellikleri gösterirler. Ayrıca, antiinflamatuvar lökositleri çekmek, fagositik reseptörleri arttırmak ve ECM bileşenlerini ve büyüme faktörlerini en üst düzeyde regüle eden immünsupresif sitokin IL-10 ve kemokinler CCL17, CCL18 ve CCL22 gibi kemokinleri salgırlar (67).

Bu medyatörler, M2 makrofajlarının inflamatuvar yanıtları regüle etmesine, debrisleri temizlemesine, dokunun yeniden modellemesine ve tamir edilmesine destek olur. Bu sayede, deri ve kas yaralanmalarında, ardışık olarak oluşan M1-M2 makrofaj yanıtları başarılı yara iyileşmesi ile sonuçlanmaktadır (76).

In-vivo ortamda spesifik fenotiplerin tanımlanması, makrofaj aktivasyonuna katkıda bulunan çeşitli çevresel ve dokuya özel uyaranlardan dolayı zordur (77). Ayrıca makrofajlar fonksiyonel olarak adaptasyon özellikleri ile yeni uyaranlara yanıt olarak fenotiplerini değiştirebilirler (76). Bu nedenle, *in vitro* ortamda tanımlanmış fenotipler, makrofaj aktivasyon sürekliliğini çok basite indirgemesinin yanısıra, farklı yara onarım sistemleri arasında yararlı bir karşılaştırma platformu sağlar. Bu sınıflandırma sistemini kullanarak, makrofaj aracılı yara onarımını M1-M2c makrofaj aktivasyonu yoluyla bir progresyon olarak modelleyebiliriz. İnflamatuar faz hem M1 hem de M2a fenotipine sahip olan makrofajları içerir (67).

M1 makrofajları proinflamatuar sitokinler olan IL-1, TNF- α ve IL-6 salgılar. M2a makrofajları ise erken aşamada yüksek seviyelerde Arginaz-1 ve Ym1 ekspresyon eder (69).

Erken proliferatif fazdaki makrofajlar, proinflamatuar sitokinleri salgılamaya devam etmekte, ancak IL-10 gibi bazı antiinflamatuar markırların salımına doğru geçiş olmaktadır (69). Proinflamatuar ve antiinflamatuar sitokinler ile IL-10 ekspresyonundaki artış göz önüne alındığında, proliferatif fazdaki makrofajların kolayca M2b fenotipine aktive olduğu söylenebilir (67).

Daha sonraki proliferatif aşamalar sırasında, M2b aracılı IL-10 salımı, M2c'nin stimülasyon markırı olan TGF- β ekspresyonunun artmasıyla M2c makrofajlarının aktivasyonunu uyarır (78). Yeniden modelleme fazında ise, eşzamanlı olarak Arginaz-1'de düşüşler ile TGF- β ve CD206 ekspresyonunda artış gözlemlenir ve bu da yeniden modelleme fazında M2c makrofajların baskın olduğunu göstermektedir (69). Yeniden modelleme fazı bittiğinde, makrofajlar devre dışı bırakılır ve inflamasyonun iyileşme aşaması gelir.

Başarılı yara onarımı söz konusu olduğunda makrofajların sayıları, yaranın kapanması ve iyileşme zamanlaması ile paralel olarak haftalar içinde normal seviyelere geri döner. Aksine, 3 ay içinde iyileşmeyen yaralar kronik kabul edilir ve kalıcı makrofaj aktivasyonu bu kronik durumun ayırt edici özelliğidir. Devamlı ve yanlış makrofaj aktivasyonu, farklı onarım aşamaları arasındaki geçişleri bozar (79).

Hücrelerin %50 sinin pik aktivasyonunun azaldığı resolüsyon intervali noktası, SKH'den sonra makrofajlar için >7 haftadır. Makrofaj aktivasyonu, pik aktivasyon seviyelerinin %45'inde kronik zaman noktalarında kalmaktadır (>2,5 ay) (79).

2.3.1. İnflamasyon fazında makrofajlar

Doku onarımının ilk aşaması olan inflamatuvar faz, doku homeostazının hasarı/bozulması ile başlar. Spinal kord hasarında inflamatuvar faz, omurilik dokusunun, hücrelerin kesilmesi ve mekanik hasar ile tetiklenir. Yaralanmadan hemen sonra, mikroglia ve nötrofiller dahil olmak üzere, inflamatuvar hücreler harekete geçer ve yaralanma bölgesinde toplanır. Deri, kas ve omurilik yaralanmalarından sonra nötrofil birikimi saatler içinde başlar ve genellikle bir gün içinde en üst seviyeye ulaşır (74).

İnflamasyon fazı aşamasındaki inflamatuvar hücrelerin temel işlevleri;

- a. Hasarlı dokuları uzaklaştırmak,
- b. Nötrofillerin tekrardan hareketini kolaylaştırmak ve
- c. Fibroblastların (veya merkezi sinir sistemi hasarı durumunda astrositler), trombositlerin ve endotel hücrelerin iyileşme sürecini proinflamatuvar sitokinler salarak düzenlemektir (69).

İnflamasyon fazında spinal kord hasarının belirteçleri arasında;

- a. Kan-omurilik bariyerinin (BSCB) bozulması,
- b. Oligodendrosit prekürsör hücrelerinin (OPC) aktivasyonu, migrasyonu ve
- c. Endojen astrositlerin şişmesi yer alır (74).

Ayrıca, miyelin debrisleri spinal kord hasarından sonra temizlenmelidir.

İnflamatuvar faz sırasında merkezi sinir sistemi bileşenleri ile cilt/kas hasarındaki bileşenler daha önceki çalışmalarda karşılaştırılmıştır (74). İnflamatuvar fazdaki makrofajlar, *in vitro* uyarılan M1 hücrelerine benzer sitokin profillerine sahiptir (74). Özellikle, iskelet kası ve deri hasarından hemen sonra, makrofajlar yüksek seviyelerde TNF- α , IL-6, IL-12 ve IL-1 β eksprese ederler (80).

İnflamatuvar fazdaki makrofajlar; M2a makrofaj aktivasyonunun iki belirteci olan yüksek seviyede Arginaz ve Ym1 eksprese eder (80). Sonuç olarak, normal yara onarımının inflamatuvar fazı sırasında M1 ve M2a makrofaj fenotipleri rol almaktadır (69).

Proinflamatuvar sitokinlerin salınmasıyla M1 makrofajları, nötrofilleri çeker ve hasarlı dokuların çıkarılmasını kolaylaştırmak için inflamatuvar yanıtı artırır. M1 makrofajlar; debris temizlenmesi, bakteriyel sterilizasyon ve kullanılmış nötrofillerin eliminasyonunu kolaylaştıran fagositik yeteneklere sahiptir. Diğer taraftan M2a hücreleri, antiinflamatuvar sitokinlerin salınmasıyla proliferatif fazı başlatır, arginaz ve Ym1 salınımı yoluyla hücre proliferasyonunu ve göçünü artırır, büyüme faktörlerinin salgılanmasıyla doku oluşumunun başlangıcını teşvik ederek destekler (79). Benzer bir karma M1-M2a makrofaj cevabı, spinal kord hasarlanmasından hemen sonra ortaya çıkar (81). Spinal kord hasarlanmasına yanıt olarak IL-6, TNF- α , IL-1 β ve IL-12 proinflamatuvar markırların ekspresyonu ani bir şekilde artar (69).

Makrofaj Arginaz ekspresyonu, M2a aktivasyonunun diğer markırları olan IL-4, CD206 ve Fizz-1 (resistin like alpha geni) ile birlikte hasarlanmadan sonraki 1–3 gün içerisinde en yüksek düzeye ulaşır. Buna ek olarak, nötrofil birikimi spinal kord hasarı saatlerinde başlar ve inflamatuvar fazın normal zaman dilimi (post-hasarlanma devamındaki 1-3 gün) içinde pik yapar (69).

Elde edilen sonuçlar; spinal kord hasarlanmasında ve normal doku hasarındaki iyileşme sürecinin ilk fazı olan inflamatuvar fazda verilen makrofaj ve doku yanıtlarının birbirine benzer olduğunu vurgulamaktadır.

2.3.2. Proliferasyon fazında makrofajlar

Normal iyileşme sırasında proliferasyon fazı;

- 2 dpi (Day per inflammation) civarında başlangıç hücre proliferasyon periyodundan,
- 5 dpi civarında proliferasyonda pik ve
- 10 ile 12 dpi civarında proliferasyonun azalmasından oluşur (75).

Endotel hücreleri ve fibroblast-lineage hücreleri gibi doku yeniden modelleme için önemli olan hücreler, göç ederek doku bütünlüğünü ve bariyer fonksiyonlarını restore eder. Proliferasyon fazı sırasında çoğu dokuda anjiyogenez, kolajen birikimi, doku granülasyonu ve ECM oluşumu meydana gelir. Spinal kord hasarı sonrası proliferatif olaylar, glia ve nöral progenitör hücrelerin proliferasyonunu ve skar oluşturan astrositlerin indüksiyonunu içerir. Spinal kord hasarı sonrası geç proliferasyon fazında başlatılan analog maturasyon, OPC'lerin oligodendrositlere diferansiyasyonunu, azalan aksonal dieback ve stabilizasyona, astrositik skar oluşumuna, Wallerian

dejenerasyon resolüsyonuna ve BSCB tamirini içerir. Spinal kord hasarı ve deri-kas yaralanmasından sonraki yara iyileşmesi yanıtları birbiriyle daha önceki çalışmalarda karşılaştırılmıştır (69).

Bu çalışmalar hücrel olayların kapsamlı analizlerinin, proliferatif faz sırasında meydana gelen hücrel yanıtların SKH sonrası geciktiğini veya eksik olduğunu göstermektedir. Deri ve kas yaralanmasından sonra proliferatif fazdaki makrofajlar, proliferasyona uğrayan hücrelerin olgunlaşmasını ve hasarlı dokunun stabilizasyonunu kolaylaştırır (69).

Spesifik olarak makrofajlar; geç inflamatuvar faz sırasında başlangıç hücre proliferasyonunu kolaylaştırır ve proliferatif faz sırasında proliferasyonu sürdürür, devamında ise remodelleme fazını başlatmak için proliferatif fazın sonunda hücreleri matürasyona uğratar (69). Cilt yaralarında proliferatif faz sırasında makrofaj deplesyonu vasküler stabiliteyi ve granülasyon dokusundan yeni oluşacak skar dokusuna geçişi bozar.

Normal yara iyileşmesinde, makrofajların proinflamatuvar sitokin salınımı azalır (IL-12 azalması) ve antiinflamatuvar sitokinlerin ve büyüme faktörlerinin ekspresyonu artar (IL-10, TGF- β , İnsulin Benzeri Büyüme Faktörü-1 (IGF-1)), böylece doku onarımı inflamatuvar fazdan yeniden modelleme fazına yönlendirilir (67).

Proliferatif fazdaki M2 makrofajları, inflamatuvar fazdaki M2 makrofajlarından farklı fenotipik profillere sahiptir (75). IL-10, dokunun yeniden modellemei kolaylaştıran proliferatif onarım fazında makrofajlar tarafından üretilen önemli bir antiinflamatuvar sitokindir (69).

IL-10 salınımı, M2b'nin düzenleyici makrofaj fenotipi olduğunun bir işaretidir (100). Bu nedenle, M2b makrofaj aktivasyonu, doku yeniden modellemesini tetiklemek için orta-geç proliferatif fazda gereklidir (75).

Spinal kord hasarı sonrasında proliferatif fazın uygun şekilde başlatıldığının anlaşılması için, M2b makrofaj fenotipi ile ilişkili bir markör gen ekspresyonu incelenmiştir. Proliferasyon fazının başlamasından (3 dpi) proliferatif fazın pik (7 dpi) evresine kadar M2b fenotipiyle ilişkili genlerde anlamlı bir azalma saptanmıştır.

Benzer şekilde, Spinal kord hasarından sonra IL-10'un gen ekspresyonu, normal yara iyileşmesinden sonra bir pik ekspresyon süresi olan 6. dpi'de azalmıştır. Elde edilen bu sonuçlar, proliferatif fazı düzenleyen fenotipin M2b makrofajlar olduğunu ve spinal kord hasarından sonra hatalı bir şekilde aktive edildiğini göstermektedir. Bu nedenle, spinal kord hasarından sonra proliferatif fazdaki makrofajlar doğru değişime uğrayamadıklarından, makrofaj değişimini kolaylaştırılmazlar (75).

Benzer şekilde, deri/kas yaralanması ve SKH sonrasında paralel zaman dilimlerinde bir dizi tipik proliferatif olay başlatılır, ancak bu olaylar eksik olduğundan yara resolüsyonu ile sonuçlanmaz (69).

SKH'nin ilk haftasında OPC proliferasyonu pik yapar ve bunu takip eden yaklaşık 2 hafta boyunca oligodendrosit matürasyonu sürer. Bununla birlikte sinyal transdüksiyonu kronik olarak bozulmaya devam etmektedir. Spinal kord hasarından sonra ECM ve kollajen oluşumu, deri ve kas yaralarına benzer bir zaman sürecini izler. Ancak ECM bileşenleri inflamasyonu uzatır ve yara kapanmasını bozar (82).

Makrofaj fenotiplerinin değiştirilmesi, daha yapıcı bir proliferasyon fazını kolaylaştırma potansiyeline sahiptir. OPC diferansiyasyonu ve maturasyonu, M2a ve M2c makrofajlarının aktivasyonu ile kolaylaştırılabilir (103). Periferik sinir hasarından sonra makrofajlar 2-4 dpi'de Wallerian dejenerasyon alanlarına çekilir. Sonuç olarak, miyelin ve akson klerensi iki hafta içinde tamamlanır ve daha sonra yaralanan sinir iyileşir. Aksine, SKH'de Wallerian dejenerasyon bölgesinde ve debris bölgesinde makrofaj yanıtı gecikmelidir (83).

Debrisler spinal kord hasarında makrofajlara ek uyarılar verilerek hızlandırılmış şekilde ortadan kaldırılabilir. Makrofajları manipüle etmek; normal yara iyileşmesi sürecindeki tipik olayların maturasyonunu kolaylaştırmaktadır (84).

SKH'den sonra, hasarlı aksonlar zamanla hasar bölgesinden geri çekilir. Başlangıç travması, erken fazda akson retraksiyonuna neden olurken (1-2 gün), Silver ve ark. retraksiyonun geç safhalarının aktifleşmiş makrofajlardan kaynaklandığını göstermişlerdir (85, 86).

Tüm bu bulgular, özellikle M2b ve M2c makrofaj fenotiplerini hızlandırarak makrofaj yanıtlarının değiştirilebilirliğinin, SKH onarımını desteklemek için yara iyileşmesinin proliferatif fazını düzenleyebileceğini düşündürmektedir.

2.3.3. Yeniden modelleme fazında makrofajlar

Normal yara iyileşmesinin üçüncü ve son aşaması olan yeniden modelleme fazı, yaralanmadan 2–3 hafta sonra başlar ve aylarca, hatta yıllarca sürebilir (Şekil 2.3.3.1.) (86). Bu aşamada, proliferasyon fazında proliferasyona uğrayan hücreler yeni dokuya göre maturasyona uğrar. Önceki aşamalarda başlatılan işlemler genellikle inflamasyon, skarlaşma ve anjiyogenez de dahil olmak üzere yavaşlar ve sonunda durur.

Kas ve deri yaralarında, kollajen ve ECM ve parçalanma, yara kontraktürüne yol açan sabit bir duruma ulaşır. Büyüme faktörleri (örn. PDGF, TGF- β , FGF), matriks metalloproteinazlar (MMP) ve diğerleri, yeniden modelleme fazını düzenler ve onarılan dokuyu güçlendirir (87).

Sonunda yeniden modelleme fazı, tam yara tamiri ile sonuçlanır. Yeniden modelleme fazında M2c fenotipi makrofajlar CD206, CD163 ve TGF- β 'nin artmış ekspresyonu ile karakterize edilirken, M2a veya M2b fenotipi ile ilişkili markırların ekspresyonunun azalması ile gösterilir: VEGF, Arginaz-1 ve IGF-1, rolleri iyi anlaşılmamıştır (69).

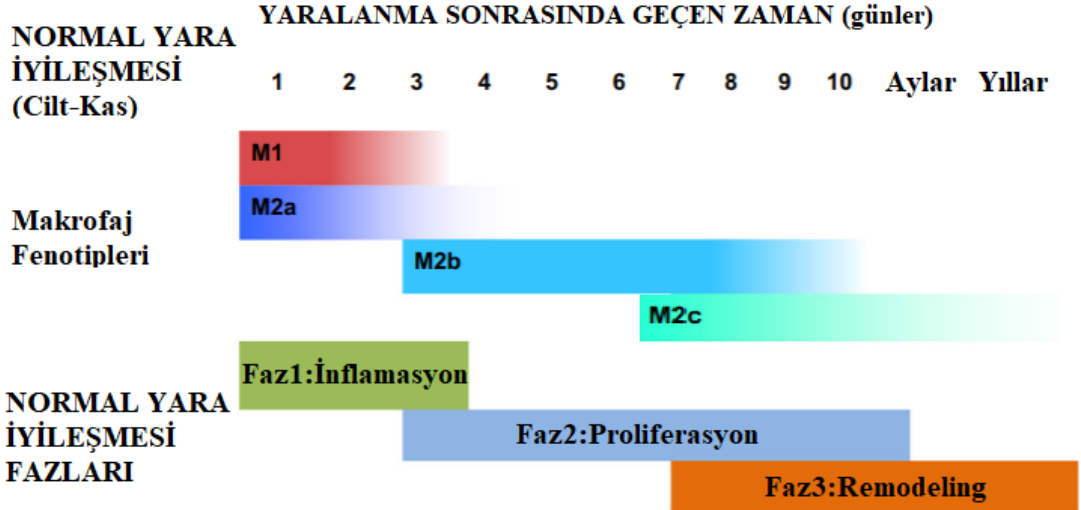
Makrofajlar, yeniden modelleme fazının farklı yönlerine öncülük etmekten ziyade inhibe edilerek daha büyük bir rol oynarlar.

Bu fazdaki makrofajların tükenmesi, skar oluşumu ve kollajen üretimini etkilemez. Bunun aksine devam eden bir proinflamatuvar makrofajların varlığı, çeşitli dokularda, iyileşmeyen kronik bir yara durumu ile ilişkilidir (79).

SKH'den sonra yeniden modelleme fazında makrofajların oynadığı rol hakkında yeterli bilgi yoktur. Bunun sebebi kısmen SKH'den sonra endojen olarak meydana gelen yeniden modelleme olaylarının başarılı bir iyileşmeye yol açmaması ve bu nedenle yeniden modelleme evresinin düzgün bir şekilde yürütülmemesidir (88).

M2c makrofajlarının fenotipik karakterizasyonu, SKH sonrasında yapılan kısıtlı sınıflandırmanın ötesine pek gidememiştir. Onarım aşamaları boyunca uygun makrofaj aracılı geçişler, yaralanma şiddeti, yaş, bireyin sağlığı, enfeksiyonlar ve hasarın biyokimyasal çevresi ve doku özelliklerinden etkilenir (69).

Hasarlı dokunun mekanik, hüresel ve biyokimyasal yapısındaki değişiklikler makrofaj fenotipini ve dolayısıyla iyileşme yanıtını etkileyebilir. Spinal kord hasar bölgesinde bulunan spesifik faktörlerin makrofaj fenotipleri üzerindeki katkısında tam olarak anlaşılmamıştır (69).



Şekil 2.3.3.1: Yara iyileşmesi sırasında farklı evrelerde rol alan makrofaj subgrupları (69)

2.4. Makrofaj Markırları

2.4.1. CCL3 (Makrofaj İnflamatuar Protein-1 α (MIP-1 α))

Makrofaj inflammatuar protein 1- α (MIP-1- α) olarak da bilinen CCL3 membran proteindir. C-C motif Reseptör 1 (CCR1) reseptörüne bağlanarak akut inflammatuar yanıtlarda ve polimorfonükleer lökositlerin toplanma süreci ve aktivasyonunda rol oynar (89).

CCL3, insan TNF- α ve IL-1 sitokinleri ile üretilen ateşin büyüklüğüne eşit veya daha büyük, çok hızlı başlangıçlı tipte monofazik ateş üretir (90).

Yapılan bir çalışmaya göre, CCL3 kemokini kemikteki bakteriyel bir enfeksiyona yanıt olarak lokal olarak üretilmektedir. CCL3'ün enfeksiyonun akut veya kronik fazlarında karşı konak yanıtına katıldığı başka çalışmalarda da gösterilmiştir (91, 92).

CCL3'ün; monositler, makrofajlar veya nötrofiller dışında, endotelial hücreler, fibroblastlar, nöral doku ve çeşitli tümör hücreleri gibi hücreler tarafından üretildiği de gösterilmiştir.

Sadece enfeksiyöz koşullar altında değil, aynı zamanda steril inflamasyonda, CCL3 lokal olarak üretilmektedir. Makrofaj İnflamatuar Protein'ler (MIP) osteoklast oluşumuna katkıda bulunduğu için, yapılan çalışmadaki bulgular implantın gevşemesine yol açan lokal inflamasyon ve kemik rezorpsiyonu arasında bir bağlantı sağladığını öne sürmüştür (93).

2.4.2. CCL4 (Makrofaj İnflamatuar Protein-1 β (MIP-1 β))

CCL4 olarak da bilinen insanlarda CCL4 geni tarafından kodlanan bir proteindir.

2.4.3. CD163 (Cluster of Differentiation 163)

CD163 bir membran proteindir. Kırmızı pulpa makrofajları, kemik iliği makrofajları, karaciğer makrofajları (Kupffer hücreleri), akciğer makrofajları gibi doku makrofajlarında yüksek ekspresyona sahip monositik-makrofaj hattında insan CD163 ekspresyonu sınırlıdır.

CD163 ekspresyonunun en güçlü stimulatorleri glukokortikoid, IL-6, IL-10 ve heme/hb (hemoglobin) iken, IL-4, LPS, TNF- α ve IFN- γ , CXCL4 ve GM-CSF ise CD163 ekspresyonunu azaltmaktadır.

CD163'ün regülasyonuna ilişkin verilerde, CD163'ün, M2 makrofajların yüzeyinde buldukları bildirilmiştir (94).

CD206 ve CD163'ü birlikte eksprese eden makrofajlar yüksek seviyelerde IL-10, IL-1 reseptör antagonisti (IL-1RA) ve CCL18 üretirler (66).

2.4.4. CD206 (Cluster of Differentiation 206)

Mannoz reseptörü CD206, birincil olarak makrofajların, sekonder olarak henüz olgunlaşmamış dendritik hücrelerin membran yüzeyinde bulunur (95).

İnsanlar, her biri kendi geni tarafından kodlanan iki tip mannoz reseptörü eksprese eder; Makrofaj mannoz reseptörü C tip 1 (MRC1 geni ile, CD206) ve Makrofaj mannoz reseptörü C tip 2 (MRC2 geni ile, CD280) mikrobiyal karbonhidratları tanıyabilir ve fagositoza aracılık edebilir.

CD206; bariyerleri (keratinositler, lenfatik ve hepatik epitelyum, böbrek mezankimal hücreleri, trakeal düz kas ve retinal pigment epitelyum gibi) ve antijen sunan hücreleri (makrofajlar, insan monositlerinden kökenlenen dendritik hücreler ve bazı fare dendritik hücrelerinin alt popülasyonları gibi) oluşturan hücrelerde bulunur.

Fonksiyonel olarak CD206, doğal immün yanıtta önemli bir rol oynayan antijen işlenmesi, endositoz ve fagositozda aktiftir (96).

MRC1 olarak da adlandırılan CD206, hem fare hem de insanda bir M2 makrofaj markırıdır. Ayrıca CD206' nın olmaması, inflamatuvar proteinlerin serum seviyesinin yükselmesine ve inflamasyonun resolüsyonuna neden olur. Bununla birlikte, CD206 eksprese eden makrofajlar, fibroblast büyümesini TGF- β ve CCL18 sekresyonu ile destekledikleri için, olumsuz profibrotik etkilere sahiptirler (66).

2.4.5. CCL1 (C-C Motif Ligand 1)

CCL1, kemokinler olarak bilinen bir inflamatuvar sitokin ailesine ait olan aktive T hücreleri, monosit ve mast hücreleri tarafından salgılanan küçük bir glikoproteindir. CCL1, CCR8 ligandı ile etkileşerek monositleri, NK hücrelerini, olgunlaşmamış B hücrelerini ve dendritik hücreleri inflamasyon bölgesine doğru çeker (96). CCL1 makrofajlar için kemotaktik görev yapmaktadır (97).

2.4.6. CD150 (Cluster of Differentiation 150)

Sinyal lenfosit aktivasyon molekülü (Sinyal Lenfositik Aktivasyon Molekülü, SLAM / CD150) SLAMF1 geni tarafından kodlanan, self-ligand glikoproteindir.

Aktif T hücreleri, bellek T hücreleri, aktif B hücrelerinin yüzeyinde bulunduğu gibi dendritik hücrelerin ve makrofajların yüzeyinde de bulunur. SLAM, T hücreleri ve antijen sunucu hücreler arası adhezyonda önemli bir rol oynamaktadır. İnsan ve fare makrofajlarının, dendritik hücrelerinin sitokin sekresyonlarının regülasyonunda oldukça önemlidir (98).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Hayvan Deneyleri

Çalışmamız İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı “Sitokin ve Reseptörleri Araştırma Laboratuvarı” nda gerçekleştirildi.

Bezmialem Vakıf Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından 2017/218 no’lu kararla onaylanmıştır. Bezmialem Vakıf Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarı’nda sıçanların takibi yapıldı. Hayvan deneyleri 11.09.2018 – 25.11.2018 tarihleri arasında yürütüldü.

Titanyum (Ti) ve Titanyum 500 (Ti 500) biyomateryalleri University of Technology, Sydney, Avustralya’da üretilmiştir. Biyomateryallerin yüzey şekillendirmesi ise Université de Toulouse, CIRIMAT CNRS-INPT-UPS, ENSIACET, Toulouse, Fransa’da yapılmıştır.

Çalışmamız Biyoistatistik Anabilim Dalında yapılan Power Analiz programına göre sayıları belirlenen ortalama ağırlıkları 250 - 300 gr. 10 haftalık a/a *Wistar albino* soyu 21 adet erkek sıçan üzerinde gerçekleştirildi.

Çalışmamızda dişi sıçanlarda ovaryum siklusu boyunca gözlenecek hormonal değişikliklerin immün sistem üzerine etkili olacağını düşündüğümüzden erkek sıçanların seçilmesi uygun görüldü.

Sıçanlar $21\pm 1^{\circ}\text{C}$ ’de (oda sıcaklığı), 12 saat aydınlık/ 12 saat karanlık foto periyodunda, polikarbon yapılı sıçan kafesinde bireysel olarak, standart pelet sıçan yemi ve su ile ad-libitum beslenerek takip edildi. Her kafeste 1 hayvan olmak üzere 21 kafes kullanıldı. Sıçanlar rastgele numaralandırıldı.

Her grupta 7 adet olmak üzere toplam 3 deney grubu

Grup I (n: 7, Sham grubu) (K),

Grup II (n: 7, Titanyum alloy) (Ti),

Grup III (n: 7, Titanyum 500) (Ti 500) olarak oluşturuldu (Şekil 3.1.1).

Ti ve Ti 500 biyomateryalleri cerrahi işlem öncesi Ultraviyole UV-C; 200 - 286 nanometre dalga boyunda sterilize edildi.

Hayvanlara anestezi ajanı Ketamin (50 mg/kg) ve Ksilazin (10 mg/kg) kokteyli intraperitoneal (IP) olarak cerrahi işlemden 10 dakika önce uygulandı.

Anestezi sonrası sıçanlar spinal implantasyonun yapılabilmesi için prone pozisyonda ameliyat masasına yatırıldı. Cerrahi başlangıcında insizyon yapılacak olan lomber bölge traşlanarak, povidon iyot ile cilt temizliği yapıldı. Lomber omurga bölgesinde orta hatta cilt-ciltaltı insizyonu sonrasında (yaklaşık 4 cm) künt diseksiyon ile lamina-faset bileşkesine kadar olan paravertebral alan ortaya konuldu.

Grup I'e (Sham grubu) (K) sadece cerrahi stres uygulandı.

Türk Standardı TS EN ISO 10993-6 şartlarına uygun olarak 1,987 gr. ağırlığında, 3 mm. kalınlığında, 10 mm. çapında daire şeklindeki Ti ve Ti 500 biyomateriyalleri Grup II (Ti) ve Grup III (Ti 500)'te transvers ve spinöz prosesler arasına vertebral kemik ve kaslara temas edecek şekilde L5 ve L6 arasına yerleştirildi.

Materyallerin yerleştirilmesi sırasında pürüzlü yüzey kemiğe temas ettirildi. Fasya ve cilt insizyonu 3/0 non-absorbe suture ile kapatıldı.

İşlem gören tüm sıçanların ameliyat bölgeleri povidon iyot ile temizlenerek, sıçanlar kafeslerine yerleştirildi.

Deney gruplarının hazırlanmasından itibaren (implantasyon aşamasını takiben) 1. , 3. , 5. , 7. günlerde saat 15.00'te (operasyon sonrası ilk gün kan alımı bu saatte gerçekleştirildiği için) tüm sıçanlardan 1 mL periferik kan örneği alındı.

Alınan kan örnekleri oda sıcaklığında iki saat boyunca pıhtılaşmaya bırakıldı. Serum separatör tüpündeki örnekler 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Serumlar ependorf tüplerinde -86° C'de saklandı.

Serumlarda makrofaj aktivatörü yüzey reseptörleri olarak,

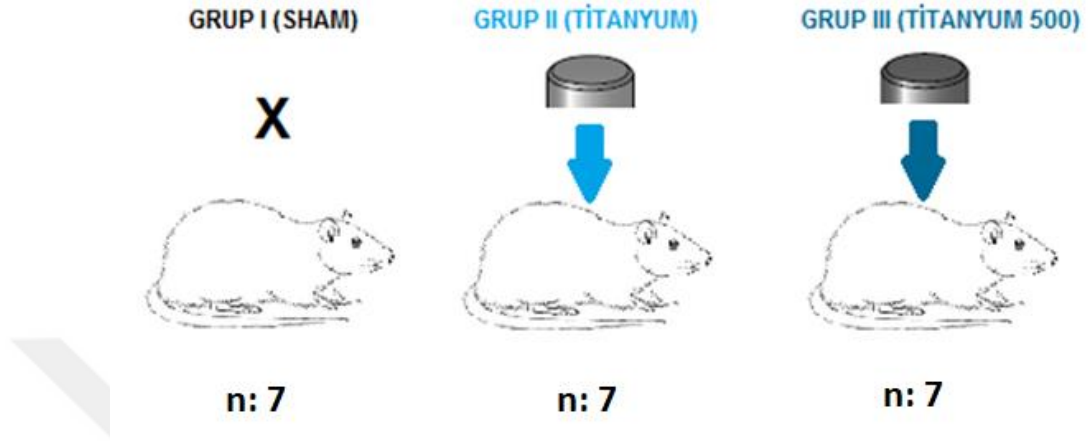
M1 makrofajlar için CCL3, CCL4

M2a makrofajlar için, CD163, CD206

M2b makrofajlar için, CCL1

M2c makrofajlar için, SLAM (CD150) markırları ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay) yöntemi ile analiz edildi.

7. günde periferik kan alımından sonra hayvanlar etik kurallara bağlı olarak sakrifiye edildi. Bir sonraki proje adımımda kullanılmak üzere beyin, femur, timüs, karaciğer, dalak ve lenf nodları çıkartıldı ve dokular -86°C 'de saklandı.

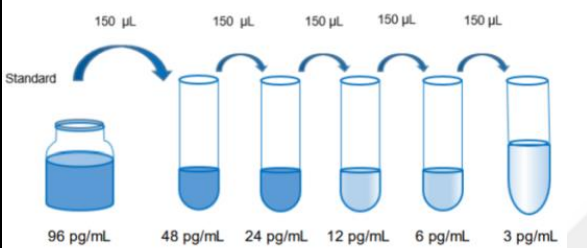
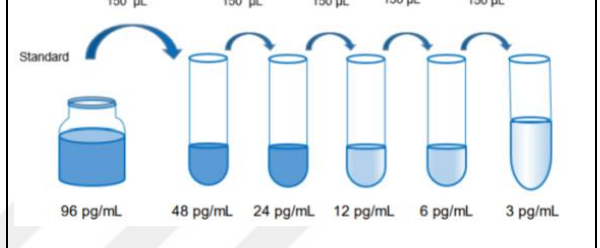
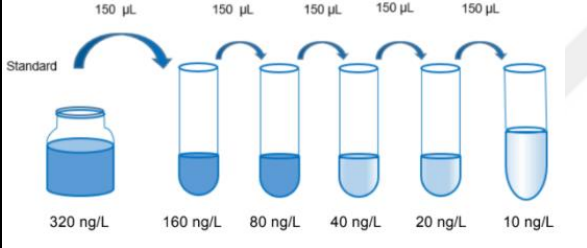
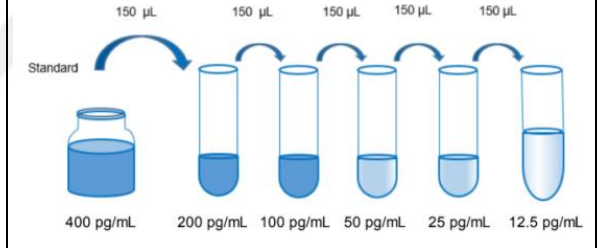
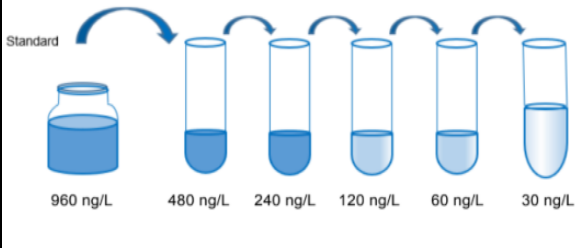
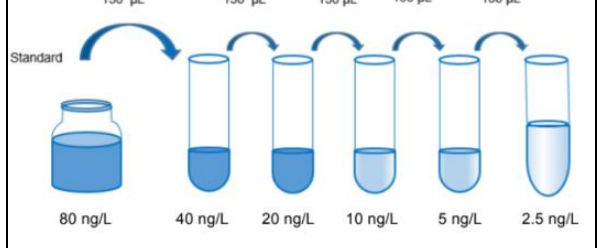


Şekil 3.1.1: Grup I (K), II (Ti) ve III (Ti 500)'e uygulanan cerrahi işlem özeti

3.2. ELISA Test Analizleri

Çalışmamızda parametrelerin analizi sırasında kullanacağımız dilüsyon çözeltileri, parametrelere özel olarak aşağıdaki şekilde hazırlandı (Tablo 3.2.1).

Tablo 3.2.1: ELISA Dilüsyon çözeltili hazırlama prosedürü

<p>CCL4 (KTE101092 - Abbkine - ELISA)</p>  <p>Standard 150 µL 150 µL 150 µL 150 µL 150 µL</p> <p>96 pg/mL 48 pg/mL 24 pg/mL 12 pg/mL 6 pg/mL 3 pg/mL</p>	<p>CCL3 (KTE101091- Abbkine - ELISA)</p>  <p>Standard 150 µL 150 µL 150 µL 150 µL 150 µL</p> <p>96 pg/mL 48 pg/mL 24 pg/mL 12 pg/mL 6 pg/mL 3 pg/mL</p>
<p>CCL1 (KTE101089 - Abbkine - ELISA)</p>  <p>Standard 150 µL 150 µL 150 µL 150 µL 150 µL</p> <p>320 ng/L 160 ng/L 80 ng/L 40 ng/L 20 ng/L 10 ng/L</p>	<p>CD150 (KTE101086 - Abbkine - ELISA)</p>  <p>Standard 150 µL 150 µL 150 µL 150 µL 150 µL</p> <p>400 pg/mL 200 pg/mL 100 pg/mL 50 pg/mL 25 pg/mL 12.5 pg/mL</p>
<p>CD206 (KTE101095 - Abbkine - ELISA)</p>  <p>Standard 150 µL 150 µL 150 µL 150 µL 150 µL</p> <p>960 ng/L 480 ng/L 240 ng/L 120 ng/L 60 ng/L 30 ng/L</p>	<p>CD163 (KTE101100 - Abbkine - ELISA)</p>  <p>Standard 150 µL 150 µL 150 µL 150 µL 150 µL</p> <p>80 ng/L 40 ng/L 20 ng/L 10 ng/L 5 ng/L 2.5 ng/L</p>

CCL4, CCL3, CD206, CD163, CCL1, CD150 Parametrelerinin ELISA Analizinde Kullanılan;

a. Ortak Reaktif Hazırlama Prosedürü

Tüm reaktifler kullanılmadan önce oda sıcaklığına getirildi.

Yıkama Tamponu: Distile su ile seyreltildi. 1:20 (48T) / 1: 30 (96T).

Standart Hazırlanması: Her tüpe 150 µL standart dilüent pipetlendi. Her tüp, yapılacak transferden önce iyice karıştırıldı. Dilüe edilmemiş standart, en yüksek standart olarak belirlendi. Standart dilüent sıfır standart olarak belirlendi.

b. Ortak Test Prosedürü

CCL4, CCL3, CD206, CD163, CCL1, CD150 seviyeleri Sandviç ELISA yöntemi ile belirlendi.

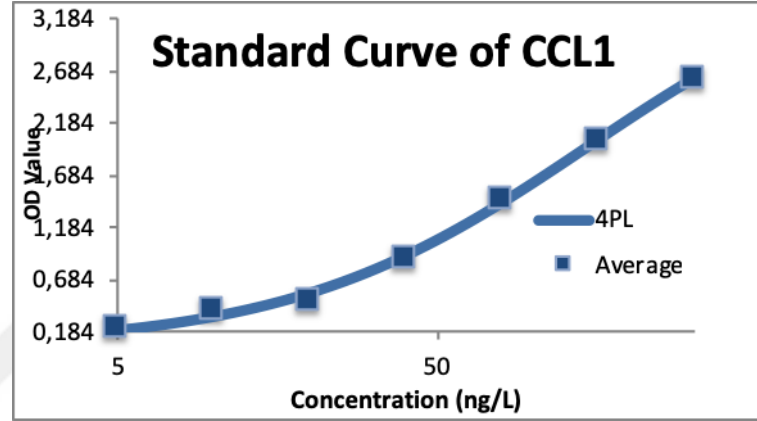
1. Çalışmaya başlamadan önce tüm reaktifler hazırlandı.
2. Standart kuyularına 50 µL dilüe standart eklendi. Örnek kuyularına 40 µL örnek dilüent + 10 µL örnek eklendi. Blank kuyulara örnek eklenmedi.
3. Plağın kapağı kapatıldı ve 37°C' de 45 dakika inkübe edildi.
4. Her kuyu aspire edildi, bu işlem 5 kez tekrarlandı. Her kuyuya 250 µL Wash Buffer eklenerek yıkama işlemi gerçekleştirildi. Plak ters çevirilerek kağıt havluya yumuşak vuruşlarla içinin iyice kuruması sağlandı.
5. Blank kuyu haricinde her kuyuya 50 µL HRP-Konjuge tespit antikoru eklendi.
6. Plağın kapağı kapatıldı ve 37°C' de 30 dakika inkübe edildi.
7. Yıkama işlemi 5 kez tekrarlandı.
8. Her bir kuyuya 50 µL Kromojen solüsyon A ve 50 µL Kromojen solüsyon B eklendi. Yavaşça karıştırıldı ve 37°C' de 15 dakika inkübe edildi. Işıktan kaçınıldı.
9. Her kuyuya 50 µL stop solüsyonu eklendi.
10. Optik Dansite (O.D.) mikrotiter plak okuyucu kullanılarak 450 nanometre dalga boyunda okutuldu.

c. Data Analizi

Dataların değerlendirilmesi sırasında standart bir eğri oluşturularak x ve y eksenini belirlendi. Eksenler üzerinde çizilen standart eğri temel alınarak bulunan değerler analiz edildi.

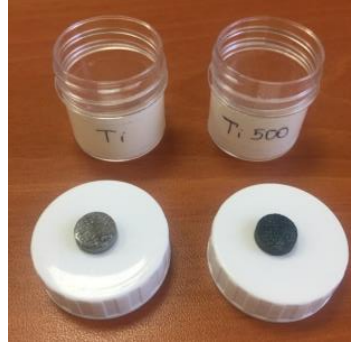
Örnek; CCL1

Conc. of Std.	Av. Abs. of Stds.
320 ng/L	2,598
160 ng/L	2,01
80 ng/L	1,446
40 ng/L	0,883
20 ng/L	0,471
10 ng/L	0,386
5 ng/L	0,212



Şekil 3.2.1: ELISA veri analizlerinde kullanılan Standart Eğri grafik örneği

3.3. İmplantasyon



Resim 3.3.1: Titanyum ve Titanyum 500 biyomateryalleri



Resim 3.3.1.1: Titanyum Pürüzlü Yüzey



Resim 3.3.1.2: Titanyum Pürüzsüz Yüzey

Titanyum biyomateryalinin pürüzlü (Resim 3.3.1.1) ve pürüzsüz (Resim 3.3.1.2) yüzeyi. Her bir Titanyum biyomateryalinin ağırlığı 1,957 gr., çapı 10 mm., kalınlığı 3 mm.'dir.



Resim 3.3.1.3: Titanyum 500 Pürüzlü Yüzey



Resim 3.3.1.4: Titanyum 500 Pürüzsüz Yüzey

Titanyum 500 biyomateryalinin pürüzlü (3.3.1.3) ve pürüzsüz (3.3.1.4) yüzeyi. Her bir Titanyum biyomateryalinin ağırlığı 1,957 gr., çapı 10 mm., kalınlığı 3 mm.'dir.



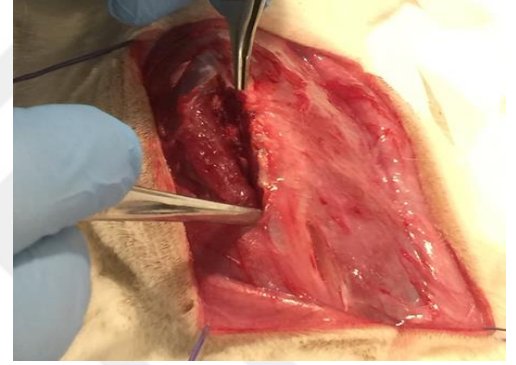
Resim 3.3.2: Sıçanlara Ketamin-Ksilazin Kokteyli intraperitoneal (IP) olarak uygulandı. Traş makinesi ile implantasyon yapılacak lomber bölge hizası temizlendi.



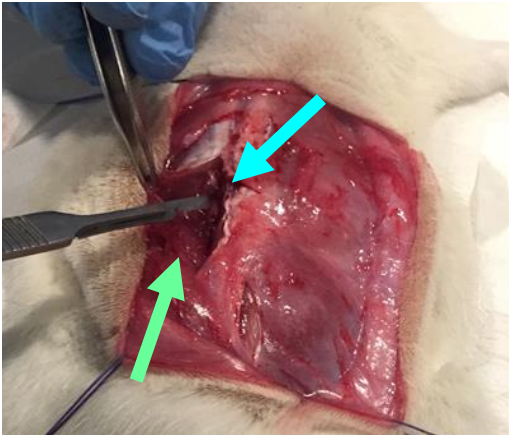
Resim 3.3.3: Biyomateryal implantasyonu için lomber L5-L6 hizasına insizyon yapıldı. Epidermis bölgesi iyice sabitlendi.



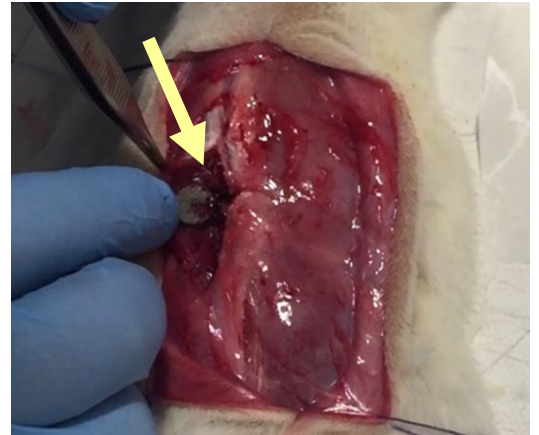
Resim 3.3.4: Fasyektomi yapıldı.



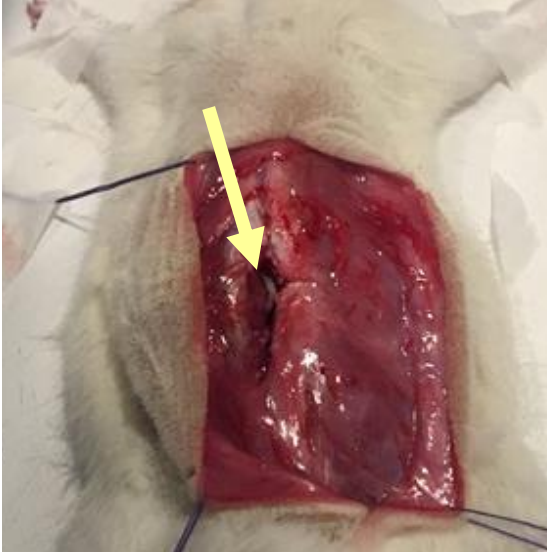
Resim 3.3.5: L5-L6 bölgesinde kas tabakası insizyonu yapıldı.



Resim 3.3.6: L5-L6 bölgesinde transvers ve spinöz prosesler açığa çıkarıldı.



Resim 3.3.7: Titanyum ve titanyum 500 biyomateryalleri L5-L6 bölgesinde transvers ve spinöz prosesler arasında kalan laminaya temas ettirilmesi sağlanarak yerleştirildi.



Resim 3.3.8: Titanium ve Titanium 500 biyomateryalleri sıkı bir şekilde dokuya gömüldü.



Resim 3.3.9: İmplantasyon yapıldıktan sonra kas ve fasya tabakası 3/0 non-absorbe suture ile kapatıldı.



Resim 3.3.10: Cilt insizyonu 3/0 non-absorbe suture ile kapatıldı.

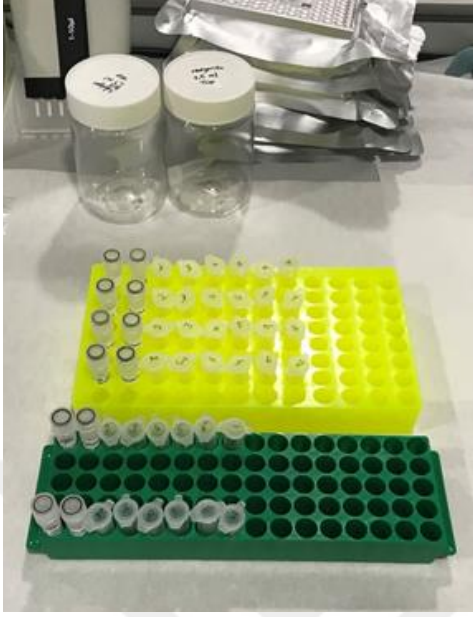


Resim 3.3.11: İmplantasyon aşaması tamamlanan sıçanlar tek tek kafeslerine konularak deney süresince gözlemlendi.

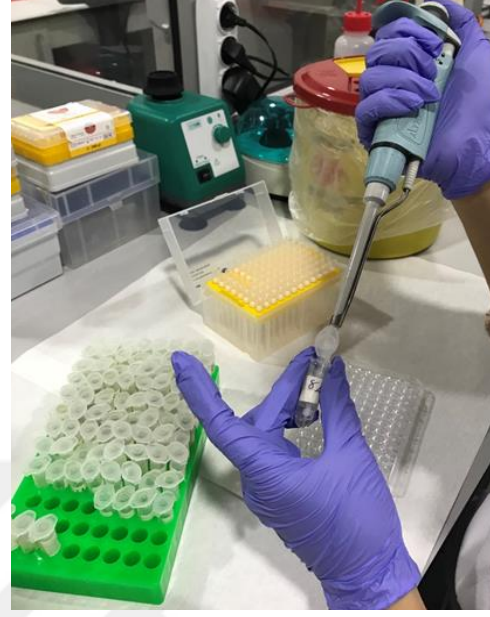


Resim 3.3.12: Sıçan juguler veninden periferik kan örneği alındı. Alınan periferik kan örnekleri 4000 rpm'de 10 dakika santrifüjlendi, -86°C'de saklandı.

3.4. ELISA Testi



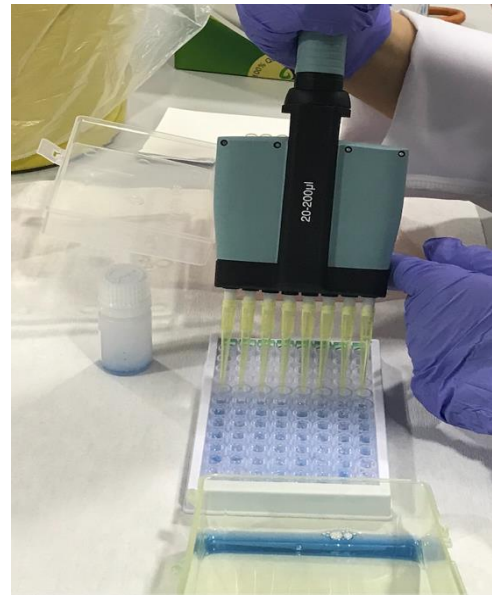
Resim 3.4.1: Her kite ait standart, standart dilüentler ile standart solüsyonlar hazırlandı.



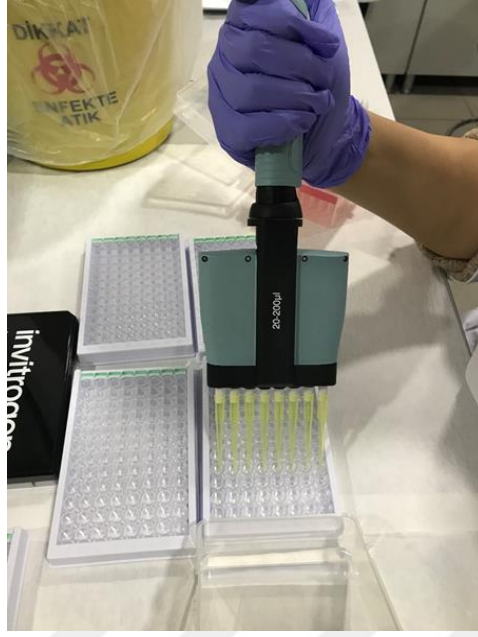
Resim 3.4.2: Örnek kuyularına 40 µL örnek dilüent ve 10 µL örnek ELISA Kit plağına pipetlendi. Standart kuyularına 50 µL standart dilüenti ELISA Kit plağına pipetlendi.



Resim 3.4.3: Tüm kuyulara 50 µL HRP-Konjugat antikorunu eklendi.



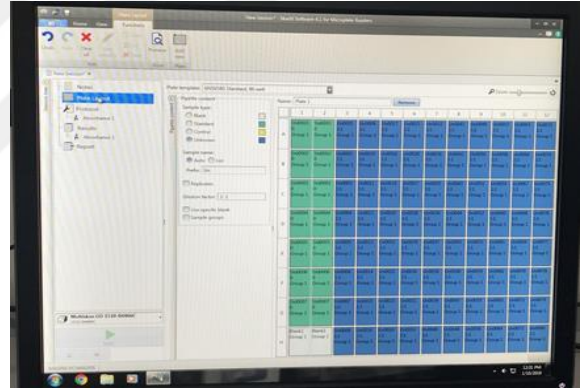
Resim 3.4.4: Tüm kuyulara 50 µL Kromojen solüsyonu A ve 50 µL Kromojen solüsyonu B eklendi.



Resim 3.4.5: Tüm kuyulara 50 μ L stop solüsyonu eklendi.



Resim 3.4.6: Plaka ELISA okuyucuya yerleştirildi.



Resim 3.4.7: Tüm örneklerin adı bilgisayarda New Session – SkanIt Software 4.1 for Microplate Readers ELISA Programına girildi. 450 nm dalga boyunda ELISA Analizi yapıldı.

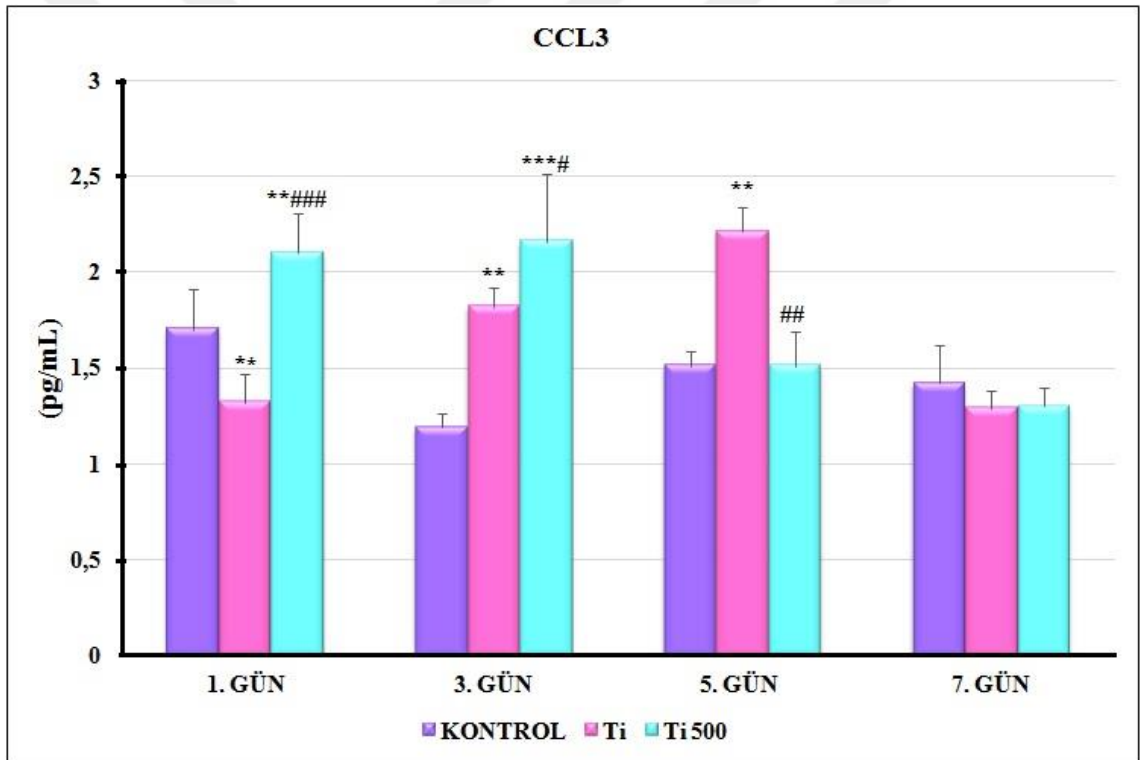
4. BULGULAR

Çalışmamızda serumlarda makrofaj aktivatörü yüzey reseptörleri olarak, CCL3, CCL4, CD163, CD206, CCL1, SLAM (CD150) analiz edildi ve sonuçlar karşılaştırmalı olarak aşağıda detaylı olarak verildi.

Gruplar Kruskal-Wallis H testi ile ve farklılık olduğu tespit edilen gruplar ise Mann-Whitney U testi ile ikişerli olarak karşılaştırıldı.

4.1. CCL3 (C-C motif chemokine ligand 3) Analiz Sonuçları

Grafik 4.1: CCL3 Düzeyleri



*: Kontrol Grubu ile Titanyum Grubu karşılaştırması

*: Kontrol Grubu ile Titanyum 500 Grubu karşılaştırması

#: Titanyum Grubu ile Titanyum 500 Grubu karşılaştırması

p<0,05*, p<0,01**, p<0,001*** / p<0,05#, p<0,01##, p<0,001###

CCL3 değerleri; 1. günde Kontrol grubu (K) ile kıyaslandığında Ti grubunda anlamlı düşüş (%22,36) ve Ti 500 grubunda anlamlı artış olduğu (%23,52) (p<0,01**); Ti ve Ti 500 grupları kıyaslandığında ise Ti 500 grubunda istatistiksel olarak çok anlamlı artış olduğu (%59,09) (p<0,001###),

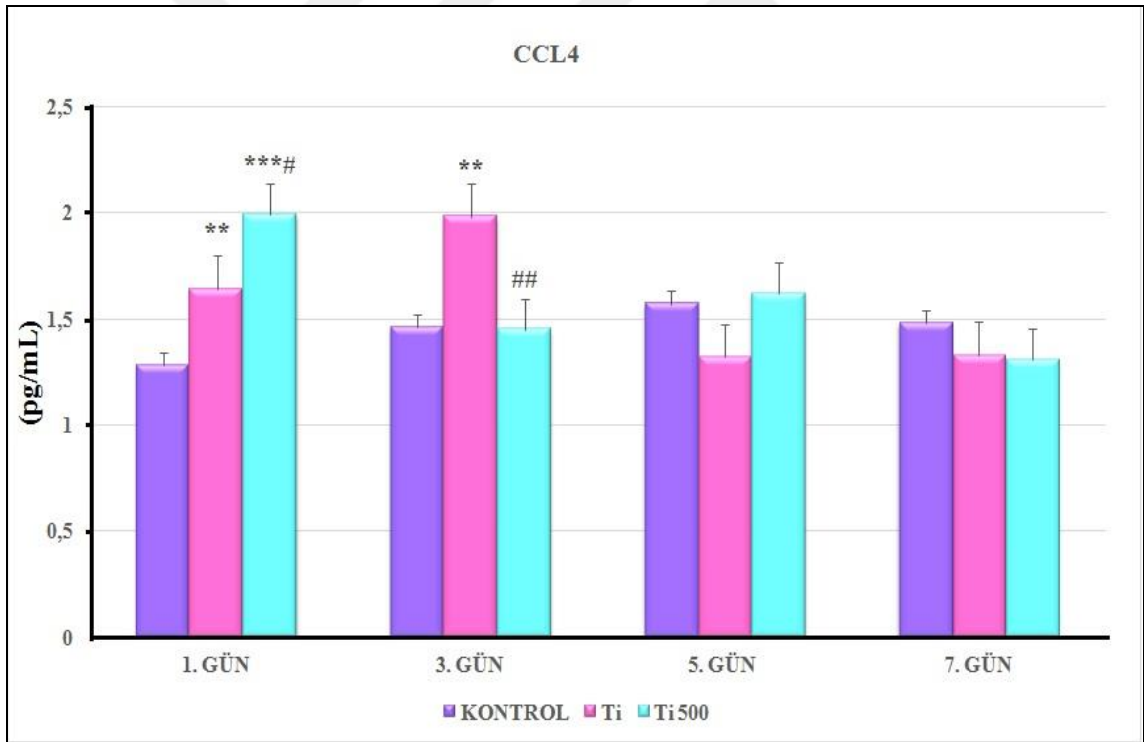
3. günde K grubu ile kıyaslandığında Ti grubunda anlamlı artış olduğu (%52,94) ($p<0,01^{**}$) ve Ti 500 grubunda çok anlamlı artış olduğu (%81,51) ($p<0,001^{***}$); Ti ile Ti 500 grupları kıyaslandığında ise Ti 500 grubunda istatistiksel olarak az anlamlı artış olduğu (%18,62) ($p<0,05^{\#}$),

5. günde K grubu ile kıyaslandığında Ti grubunda anlamlı artış olduğu (%46,35) ($p<0,01^{**}$); Ti 500 grubunda istatistiksel olarak anlamlı farklılık olmadığı, Ti ve Ti 500 grupları kıyaslandığında ise Ti 500 grubunda anlamlı azalma olduğu (%32,67) ($p<0,01^{\#\#}$),

7. günde değerler arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olmadığı görülmüştür (Grafik 4.1).

4.2. CCL4 (C-C motif chemokine ligand 4) Analiz Sonuçları

Grafik 4.2: CCL4 Düzeyleri



*: Kontrol Grubu ile Titanyum Grubu karşılaştırması

*: Kontrol Grubu ile Titanyum 500 Grubu karşılaştırması

#: Titanyum Grubu ile Titanyum 500 Grubu karşılaştırması

$p<0,05^*$, $p<0,01^{**}$, $p<0,001^{***}$ / $p<0,05^{\#}$, $p<0,01^{\#\#}$, $p<0,001^{\#\#\#}$

CCL4 değerleri; 1. günde K grubu ile kıyaslandığında Ti grubunda anlamlı artma (%28,12) ($p<0,01^{**}$) ve Ti 500 grubunda çok anlamlı artış olduğu (%54,68)

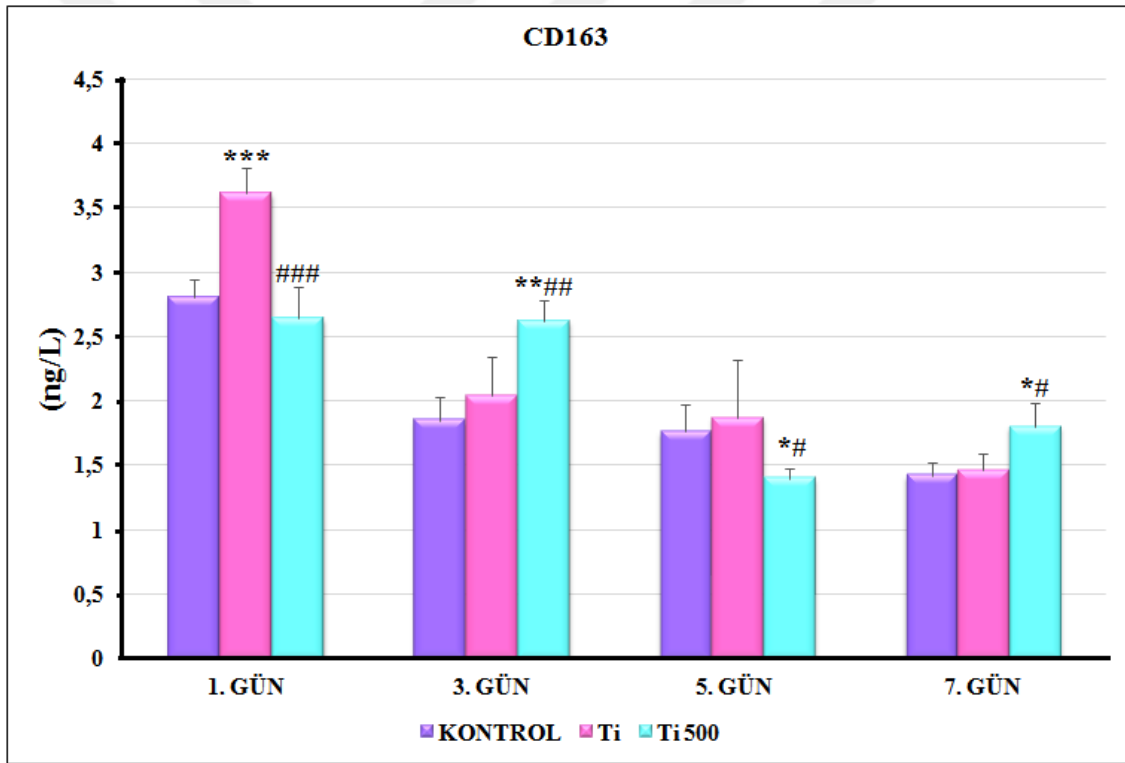
($p < 0,001^{***}$); Ti ve Ti 500 grupları kıyaslandığında ise Ti 500 grubunda istatistiksel olarak az anlamlı artış olduğu (%21,34) ($p < 0,05^{\#}$),

3. Günde; K grubuyla Ti grubu kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı artış (%35,61) ($p < 0,01^{**}$) olduğu, Ti 500 grubunda ise istatistiksel olarak anlamlı farklılık olmadığı, Ti ve Ti 500 grupları kıyaslandığında ise Ti 500 grubunda (%26,77) ($p < 0,01^{\#\#}$) anlamlı azalma olduğu,

5. ve 7. günlerde; gruplar arası kıyaslamada istatistiksel olarak anlamlı farklılık olmadığı saptanmıştır (Grafik 4.2).

4.3. CD163 (Cluster of Differentiation 163) Analiz Sonuçları

Grafik 4.3: CD163 Düzeyleri



*: Kontrol Grubu ile Titanyum Grubu karşılaştırması

*: Kontrol Grubu ile Titanyum 500 Grubu karşılaştırması

#: Titanyum Grubu ile Titanyum 500 Grubu karşılaştırması

$p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$, $p < 0,001^{***}$ / $p < 0,05^{\#}$, $p < 0,01^{\#\#}$, $p < 0,001^{\#\#\#}$

CD163 değerleri; 1. günde K grubu ile kıyaslandığında Ti grubunda istatistiksel olarak çok anlamlı artış olduğu (%28,92) ($p < 0,001^{***}$), Ti 500 grubunda herhangi bir

anlamli değişim gözlenmemiş olup, Ti ve Ti 500 grupları kıyaslandığında ise Ti 500 grubunda istatistiksel olarak çok anlamli azalma olduğu (%26,86) ($p<0,001^{###}$),

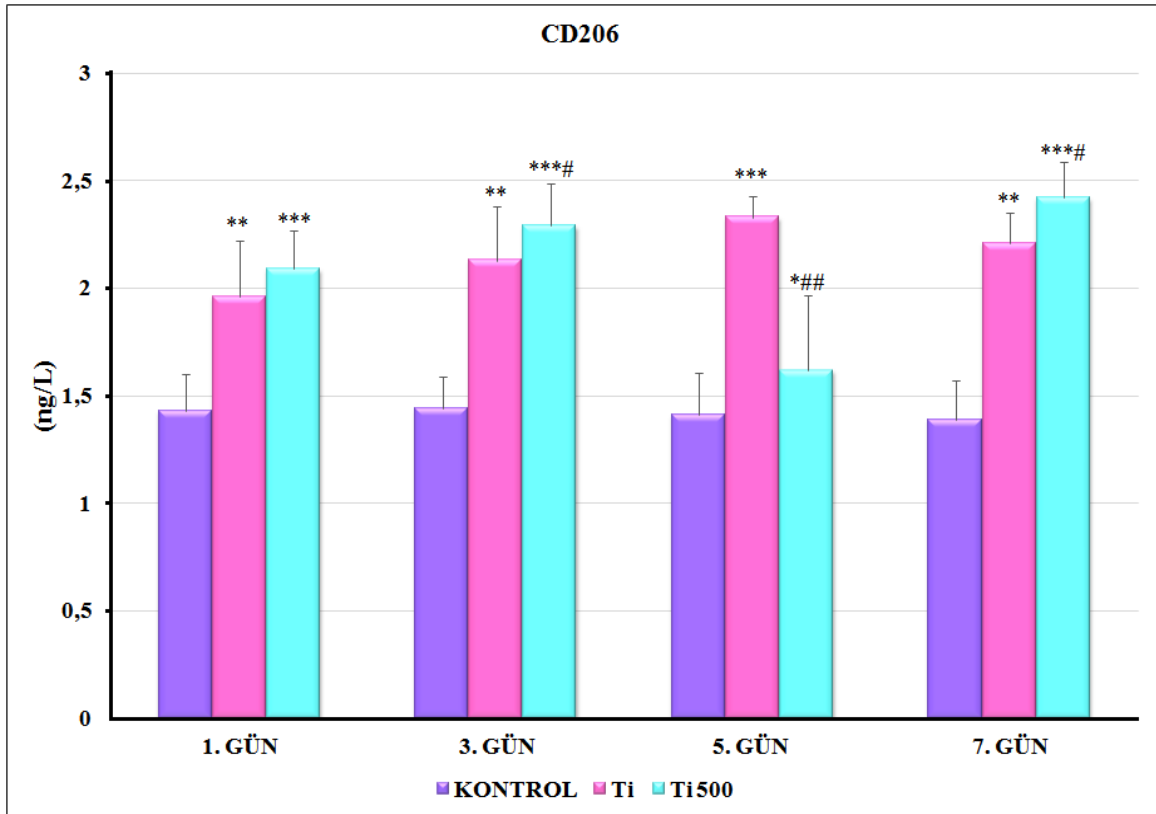
3. günde K grubu ile kıyaslandığında Ti grubunda anlamli bir değişim gözlenmemiş olup, Ti 500 grubunda anlamli artış olduğu (%41,62) ($p<0,01^{**}$); Ti ve Ti 500 grupları kıyaslandığında ise Ti 500 grubunda istatistiksel olarak anlamli artış olduğu (%28,43) ($p<0,01^{##}$),

5. ve 7. günlerde; K grubu ile kıyaslandığında Ti grubunda istatistiksel olarak anlamli bir değişim olmadığı, 5. günde K grubu ile kıyaslandığında Ti 500 grubunda istatistiksel olarak az anlamli azalma (%20,45) ($p<0,05^*$); Ti ve Ti 500 grupları kıyaslandığında az anlamli azalma (%25,13) ($p<0,05^{\#}$) olduğu,

7. günde K ile Ti grubu kıyaslandığında istatistiksel olarak herhangi bir anlamlilik saptanmamıştır. K grubu ve Ti 500 grubu kıyaslandığında istatistiksel olarak az anlamli artış (%26,76) ($p<0,05^*$), Ti ile Ti 500 grubu kıyaslandığında istatistiksel olarak az anlamli artış (%23,28) ($p<0,05^{\#}$) olduğu gözlenmiştir (Grafik 4.3).

4.4. CD206 (Cluster of Differentiation 206) Analiz Sonuçları

Grafik 4.4: CD206 Düzeyleri



***: Kontrol Grubu ile Titanyum Grubu karşılaştırması**

***: Kontrol Grubu ile Titanyum 500 Grubu karşılaştırması**

#: Titanyum Grubu ile Titanyum 500 Grubu karşılaştırması

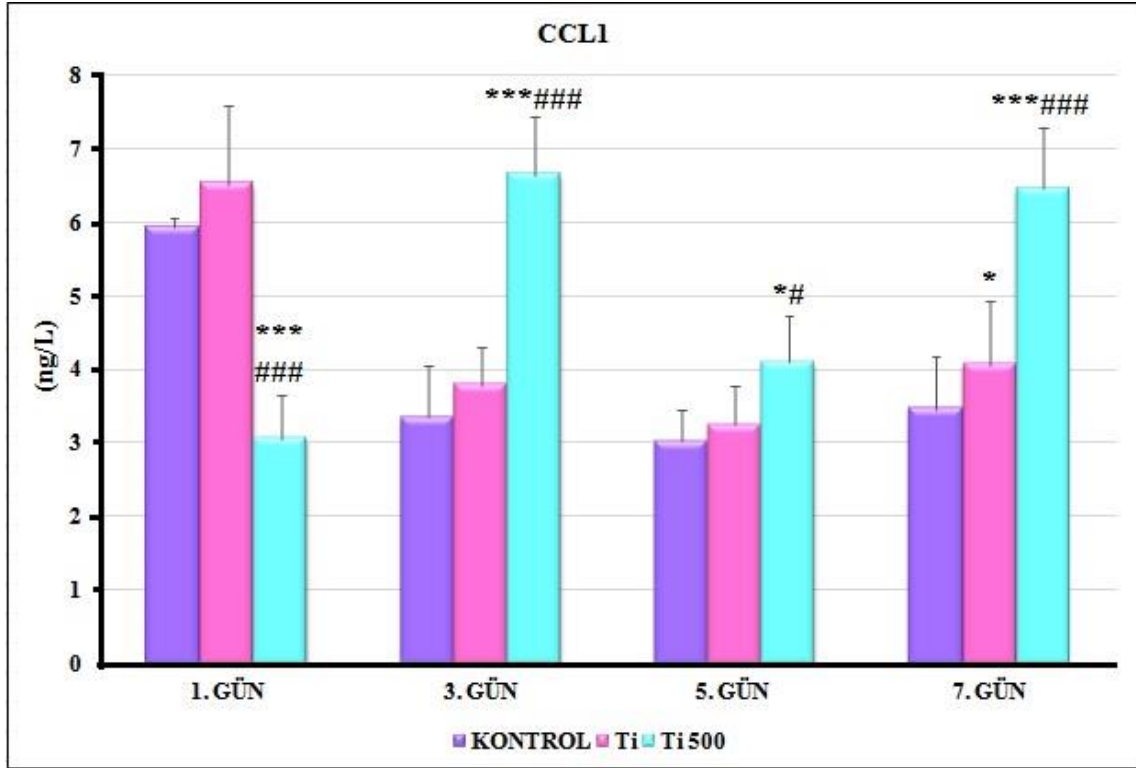
p<0,05*, p<0,01, p<0,001*** / p<0,05#, p<0,01##, p<0,001###**

CD206 değerlerinde 1. günde; K grubu ile kıyaslandığında Ti grubunda istatistiksel olarak anlamlı artış (%37,06) ($p<0,01^{**}$) olup, ve Ti 500 grubunda çok anlamlı artış olduğu (%46,15) ($p<0,001^{***}$), Ti ve Ti 500 grupları kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir değişimin olmadığı, 3. günde; K grubu ile kıyaslandığında Ti grubunda anlamlı artış (%47,91) ($p<0,01^{**}$), ve Ti 500 grubunda ise çok anlamlı artış olduğu (%59,02) ($p<0,001^{***}$); Ti ve Ti 500 grupları kıyaslandığında ise Ti 500 grubunda istatistiksel olarak az anlamlı artış olduğu (%7,5) ($p<0,05^{\#}$),

5. Günde; K grubu ile kıyaslandığında Ti grubunda çok anlamlı artış (%65,24) ($p<0,001^{***}$), ve Ti 500 grubunda ise az anlamlı artış olduğu (%14,89) ($p<0,05^{*}$); Ti ve Ti 500 grupları kıyaslandığında ise Ti 500 grubunda istatistiksel olarak anlamlı azalma olduğu (%30,47) ($p<0,01^{##}$), 7. Günde; K grubu ile kıyaslandığında Ti grubunda anlamlı artış (%58,99) ($p<0,01^{**}$), ve Ti 500 grubunda çok anlamlı artış olduğu (%74,1) ($p<0,001^{***}$); Ti ve Ti 500 grupları kıyaslandığında ise Ti 500 grubunda istatistiksel olarak az anlamlı artış olduğu (%9,5) ($p<0,05^{\#}$) bulunmuştur (Grafik 4.4).

4.5. CCL1 (C-C motif chemokine ligand 1) Analiz Sonuçları

Grafik 4.5: CCL1 Düzeyleri



*: Kontrol Grubu ile Titanyum Grubu karşılaştırması

*: Kontrol Grubu ile Titanyum 500 Grubu karşılaştırması

#: Titanyum Grubu ile Titanyum 500 Grubu karşılaştırması

p<0,05*, p<0,01**, p<0,001*** / p<0,05#, p<0,01##, p<0,001###

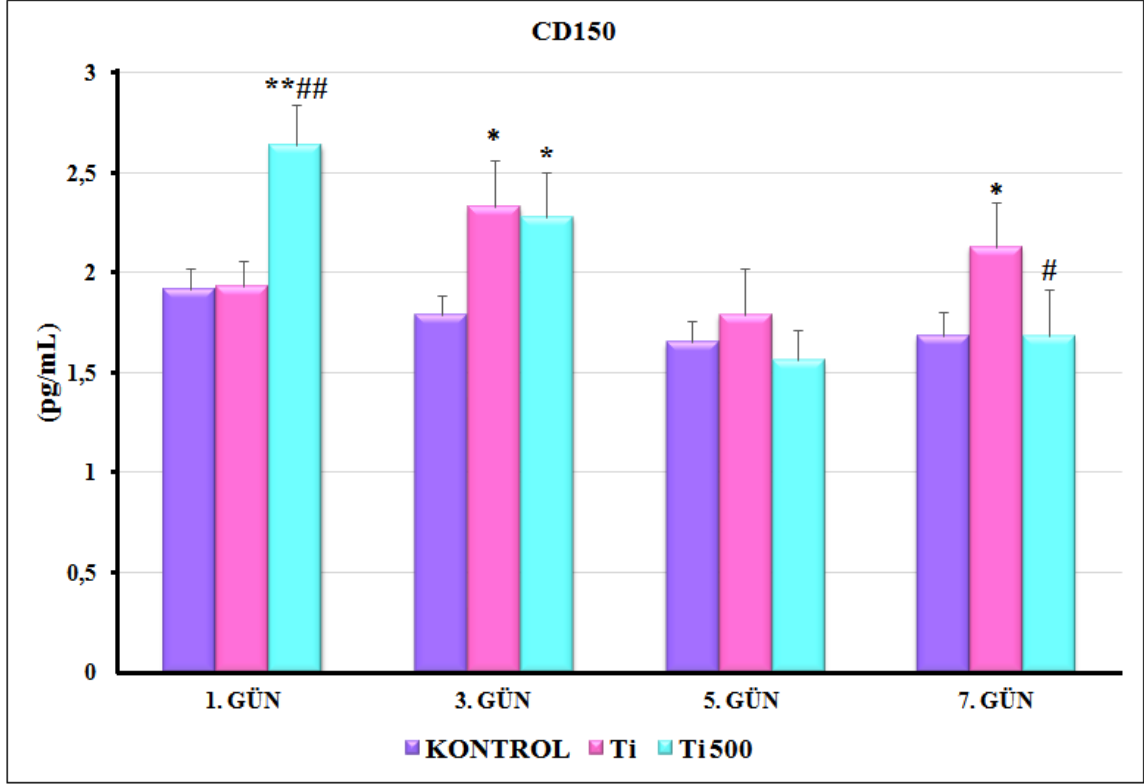
CCL1 değerlerinde; 1.,3.,5. günlerde K grubu ile kıyaslandığında Ti grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir değişim olmadığı, 7.günde ise az anlamlı artış (%17,34) (p<0,05*);

1. günde K ile Ti 500 grubu kıyaslandığında, Ti 500 grubunda çok anlamlı azalma (%48,39) (p<0,001***), 3. ve 7. günlerde çok anlamlı artış (%98,80; %86,41 sırasıyla) (p<0,001***) olduğu, 5. günde K grubu ile Ti 500 grubu kıyaslandığında az anlamlı artış (%35,43) (p<0,05*) olduğu saptanmıştır.

1.günde Ti ve Ti 500 grupları kıyaslandığında ise Ti 500 grubunda istatistiksel olarak çok anlamlı azalma (% 52,99) (p<0,001###), 3. günde çok anlamlı artış (% 75,66) (p<0,001###), 5. günde az anlamlı artış (% 26,23) (p<0,05#), 7 .günde çok anlamlı artış (% 58,86) (p<0,001###) gözlenmiştir (Grafik 4.5).

4.6. CD150 (Cluster of Differentiation 150 / SLAM (Signaling Lymphocytic Activating Molecule) Analiz Sonuçları

Grafik 4.6: CD150 Düzeyleri



*: Kontrol Grubu ile Titanyum Grubu karşılaştırması

*: Kontrol Grubu ile Titanyum 500 Grubu karşılaştırması

#: Titanyum Grubu ile Titanyum 500 Grubu karşılaştırması

p<0,05*, p<0,01**, p<0,001*** / p<0,05#, p<0,01##, p<0,001###

CD150 değerlerinde; 1. günde K grubu ile kıyaslandığında Ti grubunda istatistiksel olarak anlamlı farklılık olmadığı, ve Ti 500 grubunda anlamlı artış olduğu (%37,5) (p<0,01**), Ti ve Ti 500 grupları kıyaslandığında Ti 500 grubunda anlamlı artış olduğu (%36,78) (p<0,01##),

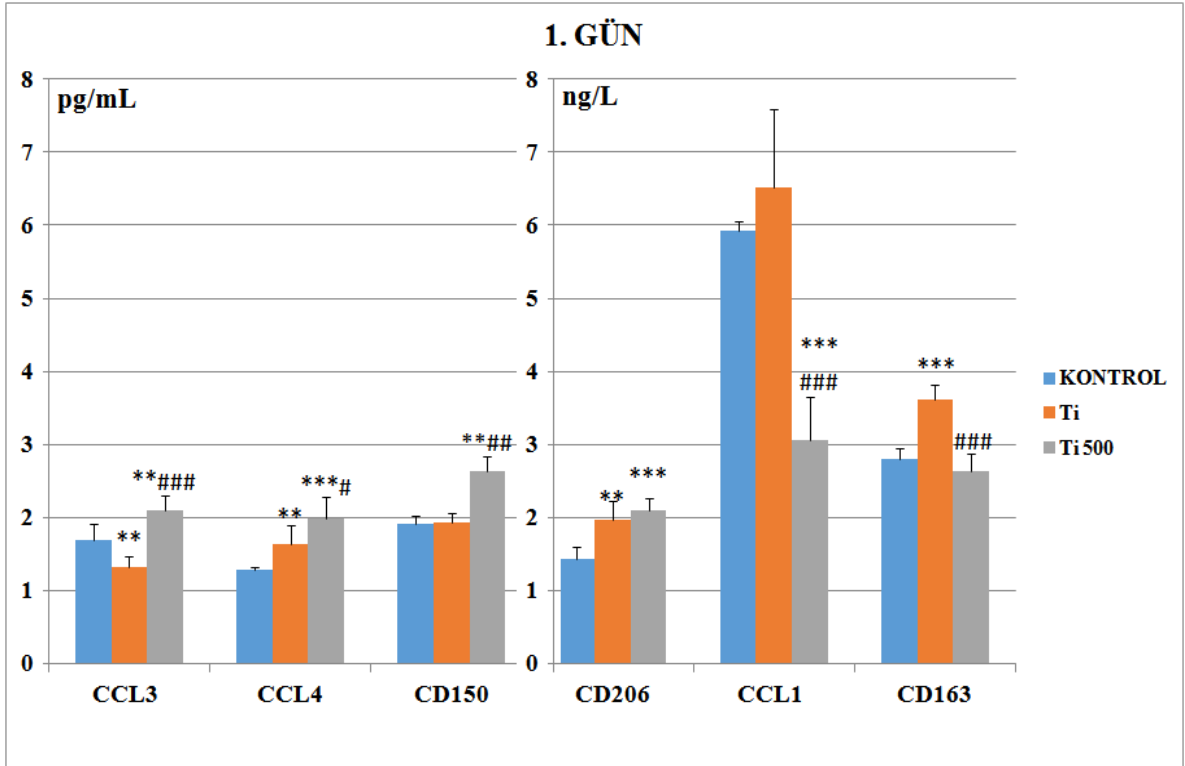
3. günde K grubu ile kıyaslandığında Ti ve Ti 500 grubunda istatistiksel olarak az anlamlı artış olduğu (%30,16 - %27,37 sırasıyla) (p<0,05*), Ti ve Ti 500 grupları kıyaslandığında ise anlamlı bir değişimin olmadığı ,

5. günde gruplar arasında istatistiksel olarak herhangi bir anlamlılık saptanmamıştır. 7. günde K grubu ile kıyaslandığında Ti grubunda istatistiksel olarak az anlamlı artış olduğu (%26,78) (p<0,05*), ve Ti 500 grubunda anlamlı bir değişimin

olmadığı, Ti ve Ti 500 grupları kıyaslandığında ise az anlamlı azalma olduğu (%21,12) ($p<0,05^{\#}$) gözlenmiştir (Grafik 4.6).

4.7. 1. Günde Gruplar Arası Makrofaj Aktivatörü Yüzey Reseptör (CCL3, CCL4, CD163, CD206, CCL1, SLAM (CD150)) Düzeylerinin Karşılaştırılması

Grafik 4.7: 1. gün Parametrelerinin Karşılaştırılması



*: Kontrol Grubu ile Titanyum Grubu karşılaştırması

*: Kontrol Grubu ile Titanyum 500 Grubu karşılaştırması

#: Titanyum Grubu ile Titanyum 500 Grubu karşılaştırması

$p<0,05^*$, $p<0,01^{**}$, $p<0,001^{***}$ / $p<0,05^{\#}$, $p<0,01^{\#\#}$, $p<0,001^{\#\#\#}$

K ile Ti grubu kıyaslandığında CCL3 azalırken ($p<0,01^{**}$); CCL4 ($p<0,01^{**}$), CD163 ($p<0,001^{***}$) ve CD206 ($p<0,01^{**}$) değerlerinde istatistiksel olarak artış görülmektedir. CCL1 ve CD150 değerlerinde anlamlı bir değişim görülmemiştir.

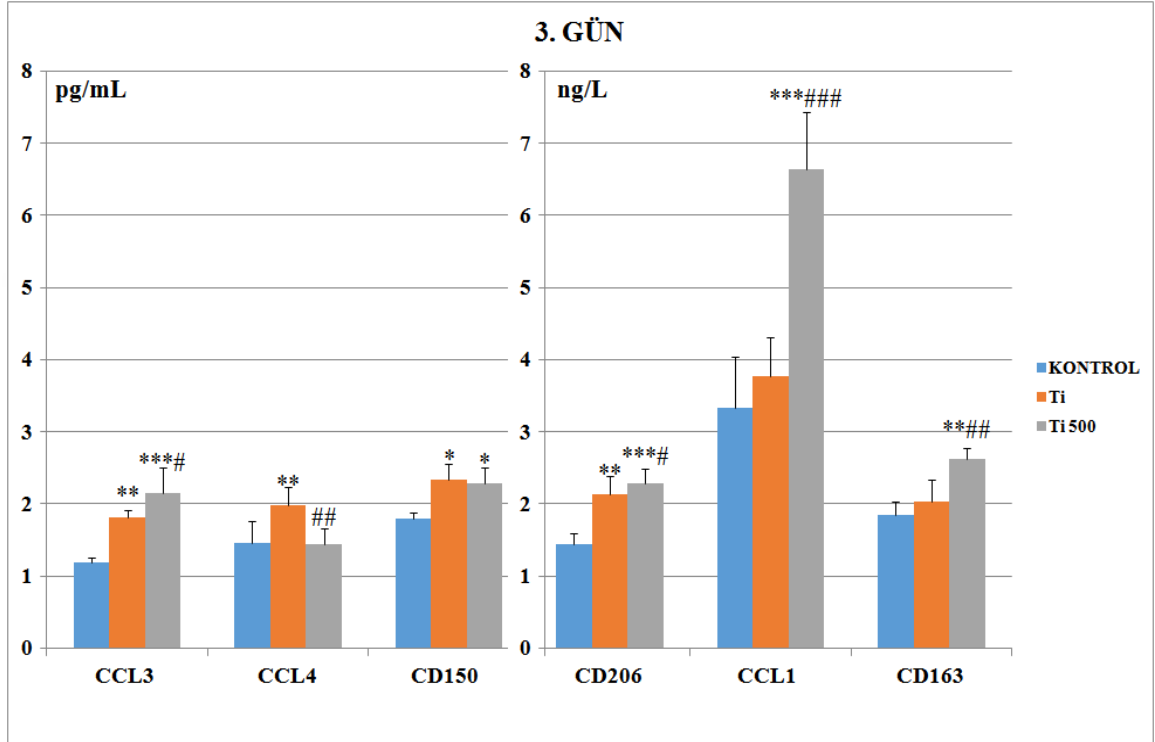
K ile Ti 500 grubu kıyaslandığında CCL3 ($p<0,01^{**}$), CCL4 ($p<0,001^{***}$), CD206 ($p<0,001^{***}$) ve CD150 ($p<0,01^{**}$), değerlerinde istatistiksel olarak artış görülürken, CCL1 ($p<0,001^{***}$) değerinde azalma saptanmıştır.

Ti ve Ti 500 grupları kıyaslandığında CCL3 ($p<0,001^{\#\#\#}$), CCL4 ($p<0,05^{\#}$), CD150 ($p<0,01^{\#\#}$) değerlerinde artış gözlemlenirken; CD163 ($p<0,001^{\#\#\#}$), CCL1

($p < 0,001^{###}$) değerlerinde azalma ve CD206 değerinde istatistiksel olarak herhangi bir anlamlılık saptanamamıştır (Grafik 4.7).

4.8. 3. Günde Gruplar Arası Makrofaj Aktivatörü Yüzey Reseptör (CCL3, CCL4, CD163, CD206, CCL1, SLAM (CD150)) Düzeylerinin Karşılaştırılması

Grafik 4.8: 3. gün Parametrelerinin Karşılaştırılması



*: Kontrol Grubu ile Titanyum Grubu karşılaştırması

*: Kontrol Grubu ile Titanyum 500 Grubu karşılaştırması

#: Titanyum Grubu ile Titanyum 500 Grubu karşılaştırması

$p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$, $p < 0,001^{***}$ / $p < 0,05^{\#}$, $p < 0,01^{##}$, $p < 0,001^{###}$

K ve Ti grupları kıyaslandığında CCL3 ($p < 0,01^{**}$), CCL4 ($p < 0,01^{**}$), CD206 ($p < 0,01^{**}$), CD150 ($p < 0,05^*$) değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı artış gözlemlenirken; CD163 ve CCL1 değerlerinde ise istatistiksel olarak herhangi bir farklılık saptanamamıştır.

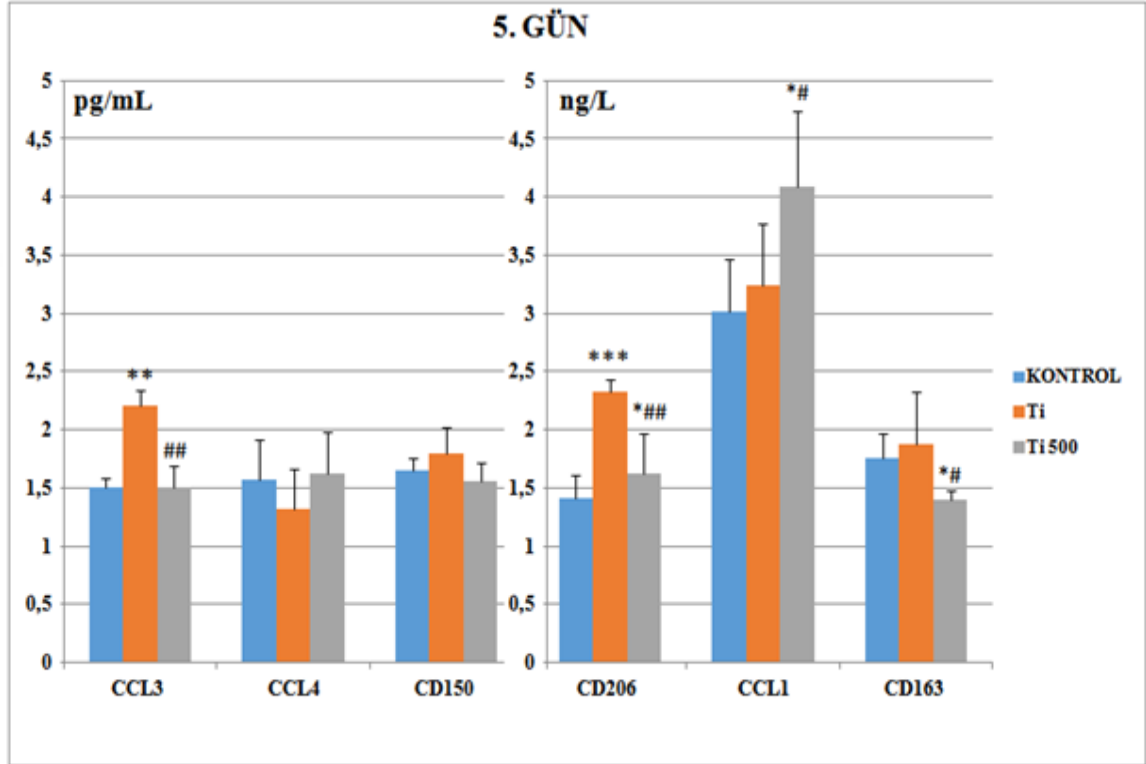
K ve Ti 500 grupları kıyaslandığında CCL3 ($p < 0,001^{***}$), CD163 ($p < 0,01^{**}$), CD206 ($p < 0,001^{***}$), CCL1 ($p < 0,001^{***}$) ve CD150 ($p < 0,05^*$) değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı artış gözlemlenirken, CCL4 değerinde istatistiksel olarak herhangi bir anlamlı farklılık olmadığı saptanamamıştır.

Ti ve Ti 500 grupları kıyaslandığında CCL3 ($p < 0,05^{\#}$), CD163 ($p < 0,01^{##}$), CD206 ($p < 0,05^{\#}$), CCL1 ($p < 0,001^{###}$) değerlerinde istatistiksel olarak artış olduğu,

CCL4 ($p<0,01^{##}$) değerinde istatistiksel olarak azalma olduğu ve CD150 değerinde ise istatistiksel olarak herhangi bir farklılık olmadığı saptanmıştır (Grafik 4.8).

4.9. 5. Günde Gruplar Arası Makrofaj Aktivatörü Yüzey Reseptör (CCL3, CCL4, CD163, CD206, CCL1, SLAM (CD150)) Düzeylerinin Karşılaştırılması

Grafik 4.9: 5. gün Parametrelerinin Karşılaştırılması



*: Kontrol Grubu ile Titanyum Grubu karşılaştırması

*: Kontrol Grubu ile Titanyum 500 Grubu karşılaştırması

#: Titanyum Grubu ile Titanyum 500 Grubu karşılaştırması

$p<0,05^*$, $p<0,01^{**}$, $p<0,001^{***}$ / $p<0,05^{\#}$, $p<0,01^{##}$, $p<0,001^{###}$

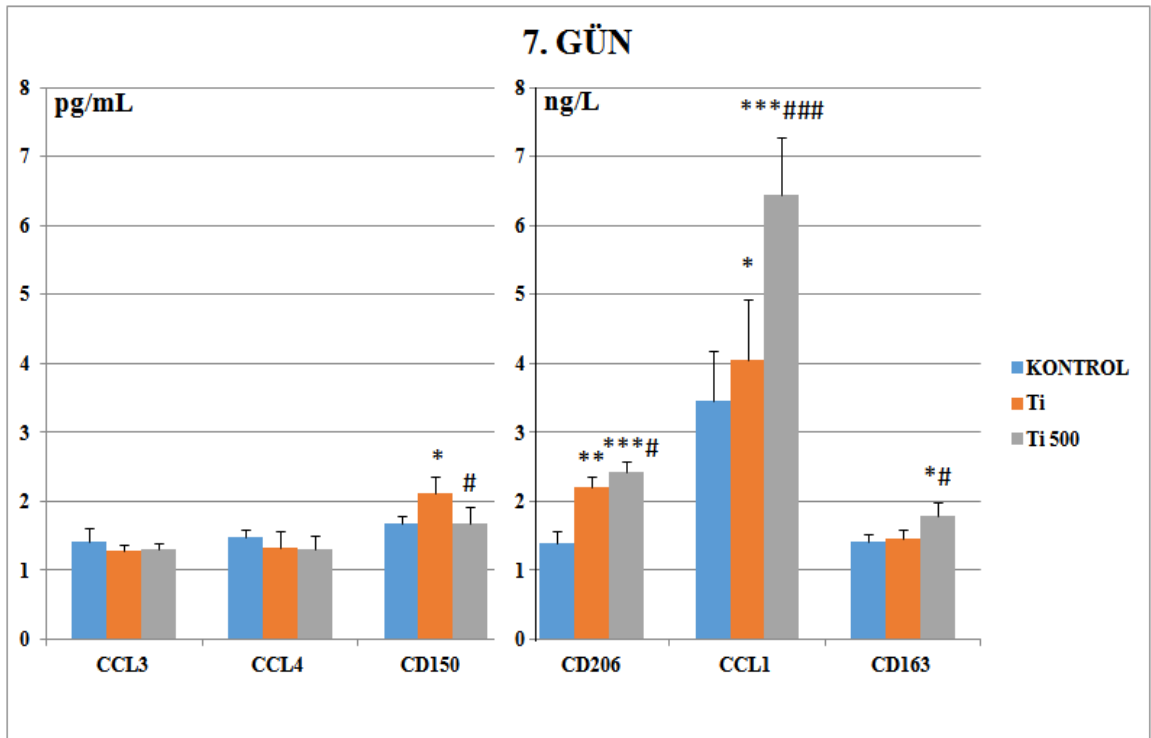
K ve Ti grubu kıyaslandığında; CCL3 ($p<0,01^{**}$) ve CD206 ($p<0,01^{***}$) değerlerinde istatistiksel olarak artış olduğu; CCL4, CD163, CCL1, CD150 değerlerinde ise herhangi bir anlamlı farklılık olmadığı görülmüştür.

K ve Ti 500 grubu kıyaslandığında; CD163 ($p<0,05^*$) değerinde azalma olduğu görülürken; CCL1 ($p<0,05^*$) ve CD206 ($p<0,05^*$) değerlerinde az anlamlı artış olduğu, CCL3, CCL4 ve CD150 değerlerinde istatistiksel olarak herhangi bir anlamlılık olmadığı görülmüştür.

Ti ve Ti 500 grubu kıyaslandığında CCL1 ($p<0,05^{\#}$) değerinde artış olduğu, CCL3 ($p<0,01^{\#\#}$), CD163 ($p<0,05^{\#}$), CD206 ($p<0,01^{\#\#}$) değerlerinde istatistiksel olarak azalma olduğu ve CCL4 ile CD150 değerlerinde herhangi anlamlı bir fark görülmediği saptanmıştır (Grafik 4.9).

4.10. 7. Günde Gruplar Arası Makrofaj Aktivatörü Yüzey Reseptör (CCL3, CCL4, CD163, CD206, CCL1, SLAM (CD150)) Düzeylerinin Karşılaştırılması

Grafik 4.10: 7. gün Parametrelerinin Karşılaştırılması



*: Kontrol Grubu ile Titanyum Grubu karşılaştırması

*: Kontrol Grubu ile Titanyum 500 Grubu karşılaştırması

#: Titanyum Grubu ile Titanyum 500 Grubu karşılaştırması

$p<0,05^*$, $p<0,01^{**}$, $p<0,001^{***}$ / $p<0,05^{\#}$, $p<0,01^{\#\#}$, $p<0,001^{\#\#\#}$

K ve Ti grubu kıyaslandığında; CD206 ($p<0,01^{**}$), CCL1 ($p<0,05^*$), CD150 ($p<0,05^*$) değerlerinde istatistiksel olarak artış görülürken; CCL3, CCL4, CD163 değerlerinde ise istatistiksel olarak herhangi bir anlamlılık görülmemiştir.

K ve Ti 500 grubu kıyaslandığında; CD163 ($p<0,05^*$), CD206 ($p<0,001^{***}$), CCL1 ($p<0,001^{***}$) değerlerinde artış olduğu, CCL3, CCL4, CD150 değerlerinde ise istatistiksel olarak herhangi bir anlamlılık saptanmamıştır.

Ti ve Ti 500 grubu kıyaslandığında ise; CD163 ($p<0,05^{\#}$), CD206 ($p<0,05^{\#}$), CCL1 ($p<0,001^{\#\#\#}$) değerlerinde artış gözlemlenirken; CD150 ($p<0,05^{\#}$) değerinde azalma gözlemlenmiştir. CCL3, CCL4 değerlerinde ise istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmemiştir (Grafik 4.10).



5. TARTIŞMA

Hasarlı organ ve dokuların işlevlerinin iyileştirilmesi konusunda son yıllarda geliştirilen medikal implantlar ve teknolojik yöntemlere rağmen, implantasyon sonrası karşılaşılan hücresel ve moleküler reaksiyonlar, entegrasyonun gerçekleşmesindeki sorunlar çalışmaların ilerleme hızını etkilemektedir.

Rejeneratif tıpta, inflamasyonun önlenmesi için biyomateryal odaklı immünmodülasyon stratejileri geliştirilmeye çalışılmaktadır.

İmplantasyonun başarısı, implanta karşı yanıtın derecesine, inflamasyona ve yara iyileşmesinin hücresel süreçlerine yol açan homeostatik mekanizmaya bağlı olarak değişir (99).

İmplantların kullanımında istenmeyen ters etkileri önlemek veya en aza indirmek için stratejiler ve çözümler geliştirmek biyomedikal alanda en önemli hedefdir.

Çalışmamızı planlarken yaptığımız makale taramalarında biyomateryaller ve doku uyumu ile ilgili yayınlarda değişik deneysel prosedürlere rağmen fikir birliği olan nokta, osseointegrasyonun pürüzlü yüzeylerde daha fazla olduğu ile ilgiliydi.

Boyan BD. (2002) (100) ile Abrahamsson I. ve arkadaşları (2004) (101) tarafından osseointegrasyonun farklı implant yüzeylerine cevap olarak farklı hızlarda ve derecelerde geliştiği, pürüzlü yüzeylerde güçlü olduğu gösterilmiştir.

Goene RJ. ve arkadaşları (2007) implant yüzeyinde yapılan nano düzeydeki modifikasyonların, daha az pürüzlü yüzeylerle karşılaştırıldığında osseointegrasyona daha yüksek oranda katkı sağladığını, özellikle iyileşmenin erken döneminde kemik-implant etkileşiminin arttığını saptamıştır (102).

An N. ve arkadaşları (2012) (103) Ti implant yüzeylerinin yüzey topografisi ile yüzey hidrofiliğinin etkisini kombinasyon halinde araştırmaya yönelik yaptıkları çalışmada; epitel hücrelerinin hidrofilik ve pürüzsüz yüzeyleri tercih ettiği, osteoblastik hücrelerin ise mikro/makro pürüzlü ve hidrofilik yüzeyleri tercih ettiğini bildirmişlerdir.

Baharloo ve arkadaşları da (2005) (104), epitel hücrelerin pürüzlü titanyum yüzeylerden ziyade pürüzsüz yüzeylere daha kolay bağlandığını ve yayıldığını belirterek, pürüzsüz titanyum biyomateryal yüzeylerinin epitel hücre yapışması ve yayılması için en uygun yüzey olduğu belirtmişlerdir.

Titanyumun yüzey pürüzlülüğünü arttırmak genel olarak kompresif, tensil ve shear kuvvetlerin direncinin artmasını ve implant yüzeyinde kemik oluşumunun artmasını sağlar (105). Yapılan bu çalışmalar, titanyumun pürüzlü ve pürüzsüz yüzeylerinin uygulandığı bölgede oluşturduğu yanıtların farklılığını ortaya koymaktadır. Bu bilgilerin ışığında deneylerimiz sırasında Ti ve Ti 500 biyomateryallerinin implantasyonunun gerçekleştirilmesinde, implant materyallerinin pürüzlü yüzeylerinin L5-L6 transvers ve spinöz proseslere temas etmesine dikkat edilmiş ve bu şekilde pürüzsüz yüzeylerin bağ dokuya temas etmesi sağlanmıştır.

Çalışmamızda implantasyon sonrası oluşabilecek rejeksiyon, inflamasyon olaylarını kontrol altına alabilmek amacıyla, Titanyum (Ti) ve Titanyum 500 (Ti 500) implantasyonu sonrası doğal immün sistemde ilk tetiklenen makrofaj ve sub gruplarının (M1, M2a, M2b, M2c) aktivasyonunu karşılaştırmalı olarak analiz ettik. Makrofajlar doku hasarı veya inflamasyon sırasında primer defans mekanizmasını oluşturan ve başarılı doku rejenerasyonunu sağlayan immün hücrelerdir (65).

Makrofajların implante edilen materyallerle etkileşimi, implant bölgesinde adhezyon, aktivasyon, sitokin salınımını içermektedir (106). Spesifik fenotip ve fonksiyonlara sahip makrofajlar, yara onarımının farklı aşamalarında süreçlere dahil olur ve geçişlere katkıda bulunurlar. İmplantasyondan sonra erken inflamatuvar evrede M1 makrofajlar ve erken proliferasyon evresinde M2 makrofajlar aktive olurlar (69).

Çalışmamızda M1 yüzey markırı, proinflamatuvar membran proteini olan CCL3(C-C Motif Kemokin Ligandı 3 veya MIP-1 α) implantasyon sonrası 1. günde Ti grubunda %22,36 oranında azalırken ($p<0,01^{**}$), Ti 500 grubunda %23,52 ($p<0,01^{**}$) oranında anlamlı artış göstermiştir.

1. günden sonra Ti grubunda, 3. (%52,94) ($p<0,01^{**}$) ve 5. günlerde (%46,35) ($p<0,01^{**}$) anlamlı artış bulunmuştur. Oysa Ti 500 grubunda 5. ve 7. günde anlamlı bir değişim görülmemiştir.

Proinflamatuvar hücreleri toplayarak implant bölgelerinde akut ve kronik inflamatuvar yanıtları düzenleyen, güçlü kemoatraktan olan MIP-1 ailesi üyelerinden CCL3'ün, Ti grubunda 1. gündeki azalması akut dönemin başlangıcında o bölgeye yönelecek lökosit sayısının azaldığını göstermektedir. Daha sonraki günlerde CCL3 düzeyindeki anlamlı artışlar bu alanda ateş oluşumunda etkin rol oynarken (90) kemik matriksini yok ederek kemik dokusunu ortadan kaldıran osteoklastların oluşumunu ve

aktivitesini de arttırabileceğini düşündürmektedir. Bu durum kemik rezorpsiyonunu tetikleyerek implantın gevşemesine de yol açabilir (91, 92).

Buna karşılık Ti 500 grubunun 1. ve 3. gündeki artışı bu bölgeye yönelecek hücre sayısının arttığını göstermektedir. Kemotaktik aktiviteye sahip olan CCL3 ün, inflamatuvar süreçte gerekli makrofajların implant bölgesine toplanmasında kilit rol oynadığını görmekteyiz (40). CCL3'ün implantasyonun erken evresinde salınması, implant bölgesine hücrelerin toplanması ve kemik formasyonundaki değişiklikler konak tarafından implanta verilen yanıtıdır. Daha sonraki günlerde ise Ti 500 grubunda CCL3 yanıtı plato şeklinde devam etmektedir. Materyale konağın bu sabit yanıtı, osteoklast aktivitesinin zayıf olduğunu, implantın Ti grubuna göre daha güçlü dokuya tutunduğunu göstermektedir.

Bizim çalışmamıza benzer sonuçları olan Hamlet S. ve arkadaşlarının (2011) (107) yaptığı çalışmada pürüzlü implant yüzeylerinde özellikle 6. saatte başlayıp 24. saate kadar devam eden proinflamatuvar sitokin salınımının (özellikle artmış CCL3 salgılanması) ve 48. saatte ön yara iyileşmesine geçişin (azalmış TNF- α ve CCL3 ile artmış VEGF salgılanması) daha hızlı ve büyük oranda olduğunu göstermişlerdir. Çalışmada CCL3'ün down regülasyonu implant gevşemesi (108) ve Ti64 (Ti-6Al-4V) alaşımının, proinflamatuvar makrofaj genotipinde bir azalmaya neden olduğu ile ilişkilendirilmiştir.

Diğer M1 yüzey markırı CCL4 (C-C Motif Kemokin Ligandı 4 veya MIP-1 β), 1. günde K grubu ile kıyaslandığında Ti grubunda %28,12 oranında ($p<0,01^{**}$) ve Ti 500 grubunda %54,68 oranında ($p<0,001^{***}$) artış; Ti ve Ti 500 grupları kıyaslandığında ise Ti 500 grubunda %21,34 oranında ($p<0,05^{\#}$) artış gözlemlendi.

3. Günde; K grubuyla Ti grubu kıyaslandığında %35,61 oranında ($p<0,01^{**}$) artış olduğu, Ti 500 grubunda ise istatistiksel olarak anlamlı farklılık olmadığı, Ti ve Ti 500 grupları kıyaslandığında ise Ti 500 grubunda %26,77 oranında ($p<0,01^{\#\#}$) azalma olduğu, 5. ve 7. günlerde gruplar arası kıyaslamada istatistiksel olarak anlamlı farklılık olmadığı saptanmıştır.

MIP-1 β seviyelerindeki azalmanın, kemokin kullanımının artması veya parçalanmasına ya da kemokin üretiminin lenfosit aracılı inhibisyonundan dolayı olabileceğini bize düşündürmektedir.

David T. Chang ve arkadaşlarının (2013) yaptığı çalışmada biyomateryallerin yüzey morfolojilerindeki değişikliklere cevap olarak lenfositler ve makrofajlar tarafından üretilen sitokinleri, kemokinleri ve hücre dışı matris (ECM) proteinlerini incelemişler ve 4 farklı materyal yüzeyde kültürleme yapmışlardır (109).

Yüksek monosit ko-kültürlerinde CCL4'ün, başlangıçtan itibaren ilk 3 günde çok yüksek düzeyde olduğunu 10 güne kadar, tüm materyallerdeki CCL4 seviyelerinin azaldığını göstermişlerdir. David T. ve arkadaşlarının sonuçları bizim çalışmamızdaki Ti grubu ile paralellik göstermektedir (109). Ancak Ti 500 grubunda ise 1. günden sonra CCL4 seviyesi değişmeden aynı düzeyde devam etmiştir.

Warren GL. (2004) ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmalarda, in vivo olarak CC-kemokin sinyallerinin rolünü göstermişlerdir. Bu araştırmacılar CCL3, CCL4 ve CCL2'nin ve bunların reseptörleri olan CCR5 ve CCR2' nin, yaralanmayı takiben hızlı bir şekilde arttığını ve doku rejenerasyonu sırasında yavaş bir şekilde kontrol seviyelerine geri döndüğünü göstermişlerdir (110).

Bir membran proteini olan ve M2 makrofajların yüzeyinde bulunan CD163 güçlü antiinflamatuvar özellikler gösteren monosit / makrofaj hücre popülasyonlarının spesifik bir belirteçidir (111).

Çalışmamızda M2a yüzey markırı, antiinflamatuvar membran proteini olan CD163 (Cluster of Differentiation 163) implantasyon sonrası 1. günde Ti grubunda %28,92 oranında artarken ($p < 0,001^{***}$), Ti 500 grubunda herhangi bir anlamlı değişim görülmemiştir.

1. günden sonra Ti grubunda, 3., 5., 7. günlerde anlamlı bir değişim saptanmamıştır. Ti 500 grubu 3. günde % 41,62 ($p < 0,01^{**}$) ve 7. günde %26,76 ($p < 0,05^{*}$) oranında artarken, 5. günde %20,45 ($p < 0,05^{*}$) azalma göstermiştir. Ti ve Ti 500 grubu karşılaştırıldığında Ti 500 grubunda 1. günde % 26,86 ($p < 0,001^{###}$) ve 5. günde % 25,13 ($p < 0,05^{#}$) oranında azalma; 3. günde % 28,43 ($p < 0,01^{##}$) ve 7. günde % 23,28 ($p < 0,05^{#}$) oranında artış olduğu görülmüştür.

Bu artan CD163'ün ligandına bağlanmasıyla interlökin-10 (IL-10) gibi antiinflamatuvar mediatörlerin salınmasına yol açarak Th1 yanıtını Th2 ye yönlendirebilir. Pro ve antiinflamatuvar mediatörlerin çoğu CD163 ekspresyonunu güçlü bir şekilde etkilemektedir. İlginç bir şekilde, sadece Th1 tipi sitokinlerin (interferon-gama; IFN- γ) değil, aynı zamanda Th2 tipi sitokinlerin (IL-4 ve IL-13) de CD163 ekspresyonunu azalttığı gösterilmiştir (112).

Çalışmamızda CD163'ün Ti 500 grubunda özellikle 3. ve 7. gündeki artışın nedeni CCL3 seviyesindeki azalma olabilir. Bu azalma; osteoklastların oluşumunu ve aktivitesini azaltarak implant gevşemesini engelleyebilir, aynı zamanda proinflamatuvar sitokin salınımını baskılayabilir. Yapılan çalışmalar bizim sonuçlarımızı desteklemektedir.

Kowal K. (2011) ve arkadaşlarının (113) yaptıkları çalışmalarda CD163 eksprese eden makrofajlar ve Th2 hücrelerinin, inhibitör bir sitokin olan IL-10 üreterek, IFN- γ 'nın Th1 hücreleri tarafından üretimini inhibe ettikleri, böylece bağışıklık yanıtının Th2 tipe kaydığı gösterilmiştir.

Mononükleer fagositlerde CD163 ekspresyonunu etkileyen birçok kemokin de bildirilmiştir. CCL-3 (MIP-1 α) ve CXCL-8 insan monosit kültürlerinde spontan ve glukokortikoid kaynaklı CD163 ekspresyonunun baskılandığı gösterilmiştir (112). Aktive edilmiş makrofajlarda sitokin üretimini, MHC II ekspresyonunu, antijen sunan hücrelerin aktivasyonunu ve makrofaj üzerindeki ko-stimulatör molekülleri inhibe ederek immün yanıt baskılanmaktadır.

CD163, hemoglobin ve haptoglobin kompleksi için bir makrofaj spesifik reseptördür ve makrofaj fenotipinin düzenlenmesine katkıda bulunabilir. (114, 115)

Moestrup SK (2004) ve arkadaşları CD163'ün hemoglobin/haptoglobin kompleksinin fagosite edilerek parçalanmasını ve hücre dışı hemoglobinin toksik olmayan düzeylerde bulunmasını sağlayarak travmatik yaralanmalardan sonra hücrel hasarı azalttığını göstermişlerdir (116).

CD163 eksprese eden makrofajlar, enflamasyonun kontrolünde rol oynayan IL-1 reseptör antagonistini (IL-1RA) üretirler. IL-1RAnın en önemli özelliği güçlü enflamatuvar etkisi olan interlökin-1 (IL-1)'i nötralize etmektir. Eğer bu makrofajlar yeteri kadar IL-1RA üretimini uyaramazlarsa IL-1 baskılanamaz, enflamasyon gelişir. Bu nedenle çalışmamızda Ti 500 grubundaki CD163 düzeyindeki artışlar enflamasyonun gelişiminin engellenmesi ve yara iyileşmesinin hızlanması açısından önemlidir. CD163'ün doku makrofajları üzerindeki ekspresyon seviyesinin, akut inflamatuvar yanıtın rezolüsyonu sırasında veya yara iyileşme fazı sırasında arttığı gösterilmiştir (117).

Yapılan diğer farklı çalışmalarda da görüldüğü gibi (113), membrana bağlı CD163 endojen ve eksojen ligandlar için bir reseptör işlevi görmekte, böylece inflamatuvar yanıtın başlatılması ve / veya sürdürülmesine katkıda bulunmaktadır. İlginç

şekilde, CD163'ün bazı ligandlar ile olan etkileşimi, güçlü bir antiinflamatuvar yanıt ile sonuçlanırken, diğer ligandlar, proinflamatuvar mediatörlerin salınmasını tetiklemektedir. Bu farklı durum CD163'ün hücre dışı kısmı içindeki ligand bağlama bölgesinin konumuna bağlı olabilir. Bizim çalışmamızda diğer parametrelerle karşılaştırmalı sonuçlarımıza baktığımızda özellikle Ti 500 grubunda CD163'ün antiinflamatuvar özelliğinin baskın olduğunu gözlemlemekteyiz. CD163 ligasyonu makrofajların M1 fenotipinden M2c fenotipine kaymasına katkıda bulunabilir ve serbest radikallerin aracılık ettiği doku hasarını azaltabilir. Bu geçiş, yaralanmayı takiben doku yenilenmesi için yeni bir adım olabilir (118).

Krzyszczuk P. ve arkadaşları (2018) (119), antiinflamatuvar makrofaj geçişini daha iyi anlamak için insanlarda akut yara modeli oluşturdular. Blister sıvısı, sırasıyla yara iyileşmesinin inflamatuvar ve resolüsyon fazlarını temsilen yaralanmadan 16 ve 40 saat sonra toplandı. Sıvıdan elde edilen hücre sayımı sonucunda, 16. saat ile karşılaştırıldığında 40. saatte daha fazla monosit / makrofaj saptanmıştır. CD163⁺ makrofajları 40. saatteki zaman noktasında 10 kat artmıştır (3.4' ten % 47.6'ya), bu da CD163'ün iyileşme fazı ile güçlü bir şekilde ilişkili olduğunu göstermektedir. 16 saatlik "inflamatuvar" zaman noktasında, CCL3, CCL4 anlamlı olarak artış göstermiştir. 40 saatlik "resolüsyon" zaman noktasında ise, sıvıda makrofaj türevli kemokin (MDC) ve TGF- β bulunmuştur. Çalışmayı fazlara göre değerlendirdiğimizde bizim çalışma sonuçlarımızla benzerlik göstermektedir.

Çalışmamızdaki diğer bir M2a markırı, antiinflamatuvar membran proteini olan CD206 (Cluster of Differentiation 206) değerlerinde implantasyon sonrası 1. günde Ti grubunda %37,06 oranında ($p<0,01^{**}$), Ti 500 grubunda ise % 46,15 ($p<0,001^{***}$) oranında artış göstermiştir.

1. günden sonra Ti grubunda, 3. günde % 47,91 ($p<0,01^{**}$), 5. günde % 65,24 ($p<0,001^{***}$) ve 7. günde % 58,99 ($p<0,01^{**}$) oranlarında; Ti 500 grubunda ise 3. günde % 59,02 ($p<0,001^{***}$), 5. günde %14,89 ($p<0,05^{*}$) ve 7. günde % 74,1 ($p<0,001^{***}$) oranında artış olduğu görülmüştür.

Ti ve Ti 500 grupları karşılaştırıldığında, Ti 500 grubunda 1. günde anlamlı değişimin olmadığı, 3. günde % 7,5 ($p<0,05^{\#}$) oranında ve 7. günde % 9,5 ($p<0,05^{\#}$) oranında artış olduğu; 5. günde ise % 30,47 ($p<0,01^{\#\#}$) oranında azalma olduğu görülmüştür.

MRC1 olarak da adlandırılan CD206, M2 makrofaj markırıdır, birincil olarak makrofajların, ikincil olarak olgunlaşmamış dendritik hücrelerin membran yüzeyinde bulunur (95). Fonksiyonel olarak CD206, doğal immün yanıtta önemli bir rol oynayan antijen işlenmesi, endositoz ve fagositozda aktif olan CD206'nın düşük seviyede olması, inflamatuvar proteinlerin serum seviyesinin yükselmesine ve inflamasyonun resolüsyonuna neden olur (96). CD206 kas inflamasyonunun ve hasarının azalmasına yol açabilecek M2 makrofaj fonksiyonlarına aracılık eder. CD206, inflamasyonlu dokuda yüksek seviyelerde bulunan moleküller üzerindeki şeker kısımlarını bağlayan ve fagosit eden bir mannoz reseptörüdür (118).

M2 makrofajları tarafından CD206 ekspresyonu, antiinflamatuvar sitokinler tarafından arttırılır ve ligandına bağlanması, antiinflamatuvar sitokinlerin ekspresyonunu arttırır. Böylece M2 makrofajlarının, serbest radikal aracılı hasara yol açabilen Th1 hücrelerini daha hızlı bir şekilde inhibe etmesini sağlar (118). Çalışmamızda özellikle Ti 500 grubunda CD206 düzeyinin artmış olması, antiinflamatuvar sitokinlerin artışı ve Th1 sitokinlerin inhibe edilerek enflamasyona yatkınlığın önlenmesine neden olabilir.

M2b grubunun markırı olan CCL1 (C-C Motif Kemokin Ligandı 1) değerlerine baktığımızda implantasyon sonrası 1., 3., ve 5. günlerde Ti grubunda herhangi bir değişim gözlenmezken, Ti 500 grubunda 1. günde % 48,39 ($p<0,001^{***}$) oranında azalma, 3. günde %98,8 ($p<0,001^{***}$) , 5. günde % 35,43 ($p<0,05^*$) ve 7. günde % 86,41 ($p<0,001^{***}$) oranında artma olduğu görülmüştür.

Ti ve Ti 500 grupları karşılaştırıldığında, Ti 500 grubunda 3. günde % 75,66 ($p<0,001^{###}$) oranında, 5. günde % 26,23 ($p<0,05^{\#}$) oranında ve 7. günde % 58,86 ($p<0,001^{###}$) oranında artış olduğu ve 1. günde ise % 52,99 ($p<0,001^{###}$) oranında azalma olduğu saptanmıştır.

CCL1, makrofajlar için kemotaktik görev yapan; monositleri, NK hücrelerini, olgunlaşmamış B hücrelerini ve dendritik hücreleri inflamasyon bölgesine doğru çeken, inflamatuvar süreçte önemli rol oynayan kemokinlerdir (120). CCL1 konak savunma mekanizmasında ve enfeksiyonlara karşı defansta CCL1 up-regülasyonunda kilit rol oynar (121).

Çalışmamızda başlangıçta düşük düzeyde tayin edilen CCL1'in zamanla yüksek seviyeye çıktığını saptadık. Birkaç çalışmada CCL1'in aşırı ekspresyonunun akut inflamatuvar reaksiyonu değiştirmedeği kronik inflamatuvar cevabı değiştirebileceği

konusunda açıklamalar bulunmaktadır. Adaptif immünitede CCL1'in aktif rol oynadığı da vurgulanmaktadır. Bu bulgular bizim çalışmamızı destekler niteliktedir (122).

M2c grubunun markırı olan CD150 (Cluster of Differentiation 150 veya SLAM (Sinyal Lenfosit Aktivasyon Molekülü)) değerlerine baktığımızda ise, implantasyon sonrası 1. ve 5. günlerde Ti grubunda anlamlı bir farklılık gözlenmezken; 3. günde % 30,16 ($p<0,05^*$) ve 7. günde % 26,78 ($p<0,05^*$) oranında artma olduğu görülürken; Ti 500 grubunda 1. günde % 37,5 ($p<0,01^{**}$), 3. günde % 27,37 ($p<0,05^*$) oranında artma olduğu, 5. ve 7. günlerde anlamlılık olmadığı görülmüştür.

Ti ve Ti 500 grupları karşılaştırıldığında, Ti 500 grubunda 1. günde % 36,78 ($p<0,01^{##}$) oranında artış varken; 7. günde ise % 21,12 ($p<0,05^{\#}$) oranında azalma olduğu saptanmıştır. 3. ve 5. günlerde anlamlı bir değişiklik görülmemiştir.

SLAM, T hücreleri ve antijen sunucu hücreler arası adhezyonda, makrofajların, dendritik hücrelerin sitokin sekresyonlarının regülasyonunda (98), özellikle T hücre ve ASH arasındaki kostimülasyondan sorumlu olan sinyallerin oluşumunda önemli rol oynamaktadır (98). CD150'nin monoklonal anti-SLAM bloke edilmesi sonucu, T hücre reseptöründen (TCR) bağımsız CD4+ T hücre çoğalması ve IFN- γ sekresyonunu uyarır. SLAM'ın Th1 sitokin üretimini uyaran yeni bir aktivatör reseptör olduğu da düşünülmektedir.

CD150'nin kostimülasyonu sonucu T hücrelerin sitotoksik aktivitesi, T hücre aktivasyonundan sonra CD8, Th1, Th2 ve regülatör T (Treg) hücrelerinde ve sitokinle indüklenmiş NK hücrelerinde CD150'nin açığa çıkışı artmaktadır (98).

Çalışmamızda CD150 düzeyinin Ti 500 grubuna göre Ti gruplarında artmış olması inflamatuvar sitokin yanıtlarının bu grupta daha baskın olduğunu göstermektedir.

Çalışmamızın sonuçları Ti ve Ti500 implantlarının akut dönemde makrofaj aktivasyonuna etkisini net olarak ortaya koymaktadır.

Projemizin bir sonraki aşamasında kronik dönemdeki makrofaj aktivasyonu değişikliklerini de göstererek; akut ve kronik dönem arasındaki farklılıkların karşılaştırmalı analizini yapmayı planlamaktayız.

Titanyumun (Ti-6Al-4V) Young modülünün 110 GPa, korozyon direnci ve biyoyumluluğunun yüksek olmasına, pasif oksit film tabakası içermesine (Titanyum oksit (TiO₂)), por büyüklüğü 100-500 nm aralığında ve porozitesinin % 60-70 olmasına, MRI görüntüleme artefakt oluşumunun diğer metallere göre oldukça düşük olmasına rağmen;

Pek çok yönü net olarak aydınlatılmamış olan, 500°C ısı uygulanarak (normal hava veya argon gazı içeren oda) 3D lazer printerda üretilen Ti 500'ün (Young modülü henüz belli değil), implantasyon sonrası Ti'ye göre, doğal immün sistemde ilk tetiklenen makrofaj ve sub gruplarının (M1, M2a, M2b, M2c) aktivasyonunu regüle ederek inflamasyona yatkınlığı inhibe ettiğini gösterdik.

Çalışmamızın sonuçlarına göre Ti 500 implante edilen hastalarda gelişebilecek immün yanıtların (inflamasyon, rejeksiyon vs.) kontrol edilebilir düzeyde düşük olmasının, inflamatuvar reaksiyonların önlenmesinde ve immünolojik terapötik metodların geliştirilmesinde yol gösterici olacağına inanıyoruz.



KAYNAKLAR

1. Vert M, Doi Y, Hellwich KH, Hess M, Hodge P, Kubisa P ve ark. Terminology for biorelated polymers and applications. IUPAC Recommendations 2012. *Pure and Applied Chemistry, De Gruyter*, 2012; 84: 377-410.
2. Friedman DW, Orland PJ, Greco RS. *Biomaterials: An historical perspective*. İçinde Greco RS, editor. *Implantation Biology*. Boca Raton, FL, ABD: CRC Press; 1994; pp. 1–12.
3. Ramakrishna S, Ramalingam M, Kumar TSS, Winston O. Soboyejo WO. *Biomaterials: A Nano Approach*. Boca Raton, FL, ABD: CRC Press; 2010.
4. Sherman WD. Vanadium steel plates and screws. *Surg. Gynecol. Obstet.* 1912; 14: 629–634.
5. Hoffman AS, Schoen FJ, Lemons JE. *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*. 2nd ed. CA, ABD: Elsevier Academic Press; 2004.
6. Suh H. Recent advances in biomaterials. *Yonsei Med. J.* 1998; 39: 87-96.
7. Murphy W, Black J, Hastings G. *Handbook of Biomaterial Properties*. 2nd ed. NY, ABD: Springer; 2016.
8. Balamurugan A, Rajeswari S, Balossier G, Rebelo AHS, Ferreira JMF. Corrosion aspects of metallic implants - An overview. *Materials and Corrosion*. 2008; 59: 855-869.
9. Pound BG. Passive films on metallic biomaterials under stimulated physiological conditions. *J Biomed Mater Res A*. 2014; 102A: 1595–1604.
10. Meija J. Atomic weights of the elements 2013 (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*. 2016; 88(3): 265–291.

11. Leyens C, Peters M. *Titanium and Titanium Alloys Fundamentals and Applications*. Weinheim, DE: Wiley Vch; 2003.
12. Ottria L, Lauritano D, Andreasi Bassi M, Palmieri A, Candotto V, Tagliabue A ve ark. Mechanical, chemical and biological aspects of titanium and titanium alloys in implant dentistry. *J Biol Regul Homeost Agents*. 2018; 32(2 Suppl. 1): 81-90.
13. Niinomi M, Liu Y, Nakai M, Liu H, Li H. Biomedical titanium alloys with Young's moduli close to that of cortical bone. *Regen Biomater*. 2016; 3(3): 173-185.
14. Knott PT, Mardjetko SM, Kim RH, Cotter TM, Dunn MM, Patel ST ve ark. A comparison of magnetic and radiographic imaging artifact after using three types of metal rods: stainless steel, titanium, and vitallium. *Spine J*. 2010; 10(9): 789-794.
15. Filli L, Jud L, Luechinger R, Nanz D, Andreisek G, Runge VM ve ark. Material-dependent implant artifact reduction using SEMAC-VAT and MAVRIC: A prospective MRI phantom study. *Invest Radiol*. 2017; 52(6): 381-387.
16. Krupa K, Figatowska MB. Artifacts in magnetic resonance imaging. *Pol J Radiol*. 2015; 80: 93-106.
17. Goutam M, Giryapura C, Mishra SK, Gupta S. Titanium allergy: a literature review. *Indian J Dermatol*. 2014; 59(6): 630-640.
18. Niinomi M, Nakai M. Titanium-based biomaterials for preventing stress shielding between implant devices and bone. *Int J Biomater*. 2011; 2011: 1-10.
19. Hanawa T, Asami K, Asaoka K. Repassivation of titanium and surface oxide film regenerated in simulated bioliquid. *J. Biomed. Mater. Res*. 1997; 40: 530-538.

20. Chávez-Díaz MP, Escudero-Rincón ML, Arce-Estrada EM, Cabrera-Sierra R. Effect of the heat-treated Ti6Al4V alloy on the fibroblastic cell response. *Materials (Basel)*. 2017; *11(1)*: 21-44.
21. Rolf S. *The corrosion properties of titanium and titanium alloys*. İçinde Brunette DM, Tengvall P, Textor M, Thomsen P, editors. *Titanium in Medicine*. Berlin, DE: Springer-Verlag; 2001. p. 145.
22. Cui C, Hu B, Zhao L, Shuangjin L. Titanium alloy production technology, market prospects and industry development. *Mater Design*. 2011; *32*: 1684-1691.
23. Ivasyshyn OM, Aleksandrov AV. Status of the titanium production, research and applications in the CIS. *Mater Sci*. 2008; *44(3)*: 311–327.
24. Remes A, Williams DF. Immune response in biocompatibility. *Biomaterials*. 1992; *13(11)*: 731-743.
25. Dahman Y. *Biomaterials Science and Technology: Fundamentals and Developments*. Boca Raton, FL, ABD: CRC Press; 2019.
26. Swetha M, Sahithi K, Moorthi A, Srinivasan N, Ramasamy K, Selvamurugan N ve ark. Biocomposites containing natural polymers and hydroxyapatite for bone tissue engineering. *Int J Biol Macromol*. 2010; *47(1)*: 1-4.
27. Viteri VS, Fuentes E. Titanium and titanium alloys as biomaterials. *Tribology-Fundamentals and Advancements*. 2013; 154-181.
28. Hasirci V, Hasirci N. *Fundamentals of Biomaterials*. NY, ABD: Springer; 2018.
29. Sumita M, Hanawa T, Ohnishi I, Yoneyama T. Failure Processes in Biometallic Materials. *Bioengineering*. 2003; *9*: 131-167.
30. Hedberg YS, Wallinder IO. Metal release from stainless steel in biological environments: A review. *Biointerphases*. 2016; *11(1)*: 018901-17.

31. Jabbari YSA, Fehrman J, Barnes AC, Zapf AM, Zinelis S, Berzins DW ve ark. Titanium nitride and nitrogen ion implanted coated dental materials. *Coatings*. 2012; 2: 160-178.
32. Oshida Y, Hashem A. Titanium-porcelain system Part I: Oxidation kinetics of nitrated pure titanium, simulated to porcelain firing process. *Biomed. Mater. Eng.* 1993, 3: 185–198.
33. Kaur G. *Bioactive Glasses: Potential Biomaterials for Future Therapy*. NY, ABD: Springer; 2017.
34. Zhu X, Chen J, Scheideler L, Reichl RR, Geis-Gerstorfer J. Effects of topography and composition of titanium surface oxides on osteoblast responses. *Biomaterials*. 2004; 25: 4087-4103.
35. Choi AH, Akyol S, Bendavid A, Ben-Nissan B. *Nanobioceramic Thin Films: Surface Modifications and Cellular Responses on Titanium Implants. Titanium in Medical and Dental Applications*. UK: Springer, Woodhead Publishing Series in Biomaterials 2018, pp: 147-173.
36. Hallab NJ, Urban RM, Jacobs JJ. *Corrosion and Biocompatibility of Orthopedic Implants*. İçinde Yaszemski MJ; Debra J. Trantolo DJ; Lewandrowski KU; Hasirci V, Altobelli DE, Wise DL, editor. *Biomaterials in Orthopedics*. ABD: Marcel Dekker, Inc.; 2004. pp. 63-92.
37. Albrektsson T, Wennerberg A. Oral implant surfaces: Part 1 review focusing on topographic and chemical properties of different surfaces and in vivo responses to them. *Int J Prosthodont*. 2004; 17: 536-543.
38. Kulkarni M, Mazare A, Schmuki P, Iglič A. Biomaterial surface modification of titanium and titanium alloys for medical applications. *Nanomedicine*. 2015; 5: 111-136.
39. Pacelli S, Manoharan V, Desalvo A. Tailoring biomaterial surface properties to modulate host-implant interactions: implication in cardiovascular and bone therapy. *J Mater Chem B*. 2015; 4: 1586-1599.

40. Al-Samarai HR, Ahmad K, Al-Douri Y. Evaluate the effects of various surface roughness on the tribological characteristics under dry and lubricated conditions for Al-Si alloy. *J Surf Eng Mater Adv Technol.* 2012; 2(3): 167-173.
41. Katano Y, Nakano K, Otsuki M, Matsukawa H. Novel friction law for the static friction force based on local precursor slipping. *Sci Rep.* 2014; 4: 6324-6326.
42. Sandeep CS, Senetakis K. Effect of Young's Modulus and Surface Roughness on the Inter-Particle Friction of Granular Materials. *Materials.* 2018; 11(2): 217-231.
43. Chung TW, Liu DZ, Wang SY, Wang SS. Enhancement of the growth of human endothelial cells by surface roughness at nanometer scale. *Biomaterials.* 2003; 24(25): 4655-4661.
44. Akyol S, Ben Nissan B, Karacan I, Yetmez M, Gokce H, Suggett DJ, Oktar FN. Morphology, Characterisation and conversion of the corals *Goniopora* spp. and *Porites cylindrica* to Hydroxyapatite. *J Aust Ceram Soc.* 2019; 1-9.
45. Li F, Li J, Xu G, Liu G, Kou H, Zhou L. Fabrication, pore structure and compressive behavior of anisotropic porous titanium for human trabecular bone implant applications. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 2015; 46: 104–114.
46. Ryan GE, Pandit AS, Apatsidis DP. Porous titanium scaffolds fabricated using a rapid prototyping and powder metallurgy technique. *Biomaterials.* 2008; 29: 3625–3635.
47. Tsuruga E, Takita H, Itoh H, Wakisaka Y, Kuboki Y. Pore size of porous hydroxyapatite as the cell-substratum controls BMP-induced osteogenesis. *J. Biochem.* 1997; 121: 317–324.

48. Nandi SK, Roy S, Mukherjee P, Kundu B, De DK, Basu D. Orthopaedic applications of bone graft & graft substitutes: a review. *Indian J Med Res.* 2010; *132*: 15-30.
49. Mavrogenis A, Dimitriou R, Parvizi J, Babis G. Biology of implant osseointegration. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2009; *9*: 61-71.
50. Park JY, Davies JE. Red blood cell and platelet interactions with titanium implant surfaces. *Clin Oral Implants Res.* 2000; *11*: 530-539.
51. Hallab NJ, Jacobs JJ. Orthopedic implant fretting corrosion. *Corrosion Reviews.* 2003; *21(2-3)*: 183-213.
52. Sattler S. The Role of the Immune System Beyond the Fight Against Infection. In: Sattler S, Kennedy-Lydon T. Editor. *The Immunology of Cardiovascular Homeostasis and Pathology. Advances in Experimental Medicine and Biology.* Berlin, Germany: Springer; 2017.
53. Riera RM, Pérez MD, Castillo FC. Innate immunity in vertebrates: an overview. *Immunology.* 2016; *148(2)*: 125-139.
54. McDonald DR, Levy O. Innate Immunity. In: Rich RR, Fleisher TA, Shearer WT, Schroeder HW, Frew AJ, Weyand CM (editor), *Clinical Immunology.* 5th ed. Amsterdam, Netherlands: Elsevier; 2019.
55. Actor JK. Innate Immunity. In: Saunders WB (editor) *Elsevier's Integrated Review Immunology and Microbiology.* 2nd ed. Amsterdam, Netherlands: Elsevier; 2012.
56. Ogle ME, Segar CE, Sridhar S, Botchwey EA. Monocytes and macrophages in tissue repair: implications for immunoregenerative biomaterial design. *Experimental Biology and Medicine.* 2016; *10*: 1084–1097.
57. Selvaraj SK, Giri RK, Perelman N, Johnson C, Malik P, Kalra VK. Mechanism of monocyte activation and expression of proinflammatory cytochemokines by placenta growth factor. *Blood.* 2003; *102(4)*: 1515-1524.

58. Geissmann F, Manz MG, Jung S, Sieweke MH, Merad M, Ley K. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science*. 2010; 327(5966): 656-661.
59. Law SK. C3 receptors on macrophages. *J Cell Sci Suppl*. 1988; 9: 67-97.
60. Peiser L, Gordon S. The function of scavenger receptors expressed by macrophages and their role in the regulation of inflammation. *Microbes Infect*. 2001; 3(2): 149-159.
61. Dorrington KJ. Properties of the Fc receptor on macrophages. *Immunol Commun*. 1976; 5(4): 263-280.
62. Tchernychev B, Furie B, Furie BC. Peritoneal macrophages express both P-selectin and PSGL-1. *J Cell Biol*. 2003; 163(5): 1145-1155.
63. Billack B. Macrophage activation: role of toll-like receptors, nitric oxide, and nuclear factor kappa B. *Am J Pharm Educ*. 2006; 70(5): 102-120.
64. Mantegazza AR, Magalhaes JG, Amigorena S, Marks MS. Presentation of phagocytosed antigens by MHC class I and II. *Traffic*. 2012; 14(2): 135-152.
65. Röszer T. Understanding the mysterious M2 Macrophage through activation markers and effector mechanisms. *Mediators of Inflammation*. 2015; 2015: 816460-43.
66. Chistiakova DA, Myasoedovac VA, Revine VV, Orekhovc AN, Bobryshevc YV. The impact of interferon-regulatory factors to macrophage differentiation and polarization into M1 and M2. *Immunobiology*. 2018; 223(1) : 101-111.
67. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol*. 2004; 25(12): 677-686.
68. Novak ML, Koh TJ. Phenotypic transitions of macrophages orchestrate tissue repair. *Am. J. Pathol*. 2013; 183: 1352-1363.

69. Gensel JC, Zhang B. Macrophage activation and its role in repair and pathology after spinal cord injury. *Brain Res.* 2015; 4;1619: 1-11.
70. Huen SC, Cantley LG. Macrophage-mediated injury and repair after ischemic kidney injury. *Pediatr Nephrol.* 2014; 30(2): 199-209.
71. Bertani FR, Mozetic P, Fioramonti M, Luliani M, Ribelli G, Pantano F et al. Classification of M1/M2-polarized human macrophages by label-free hyperspectral reflectance confocal microscopy and multivariate analysis. *Sci Rep.* 2017; 7(1): 8965-8972.
72. Jaguin M, Houlbert N, Fardel O, Lecureur V. Polarization profiles of human M-CSF-generated macrophages and comparison of M1-markers in classically activated macrophages from GM-CSF and M-CSF origin. *Cell Immunol.* 2013; 281(1): 51-61.
73. Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT. Wound repair and regeneration. *Nature.* 2008; 453(7193): 314-321.
74. Novak ML, Koh TJ. Macrophage phenotypes during tissue repair. *Journal of Leukocyte Biology.* 2013; 93(6): 875-881.
75. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol.* 2008; 8(12): 958-969.
76. Lech M, Anders HJ. Macrophages and fibrosis: how resident and infiltrating mononuclear phagocytes orchestrate all phases of tissue injury and repair. *Biochim. Biophys. Acta* 2013; 1832: 989–997.
77. Stout RD, Suttles JD. Functional plasticity of macrophages: reversible adaptation to changing microenvironments. *J. Leukoc. Biol.* 2004; 76: 509-513.
78. Sindrilaru A, Peters T, Wieschalka S, Baican C, Baican A, Peter H, et al. An unrestrained pro-inflammatory M1 macrophage population induced by iron impairs wound healing in humans and mice. *J. Clin. Investig.* 2011; 121: 985–997.

79. Prüss H, Kopp MA, Brommer B, Gatzemeier N, Laginha I, Dirnagl U, Schwab JM. Non-resolving aspects of acute inflammation after spinal cord injury (SCI): indices and resolution plateau. *Brain Pathol.* 2011; *21*: 652–660.
80. Kigerl KA, Gensel JC, Ankeny DP, Alexander JK, Donnelly DJ, Popovich PG. Identification of two distinct macrophage subsets with divergent effects causing either neurotoxicity or regeneration in the injured mouse spinal cord. *J. Neurosci.* 2009; *29*: 13435–13444.
81. Sato A, Ohtaki H, Tsumuraya T, Song D, Ohara K, Asano M, et al. Interleukin-1 participates in the classical and alternative activation of microglia/macrophages after spinal cord injury. *J. Neuroinflamm.* 2012; *9*: 65–82.
82. Gaudet AD, Popovich PG. Extracellular matrix regulation of inflammation in the healthy and injured spinal cord. *Exp. Neurol.* 2014; *258*: 24–34.
83. George R, Griffin JW. Delayed macrophage responses and myelin clearance during Wallerian degeneration in the central nervous system: the dorsal radicotomy model. *Exp. Neurol.* 1994; *129*: 225–236.
84. Busch SA, Hamilton JA, Horn KP, Cuascut FX, Cutrone R, Lehman N, et al. Multipotent adult progenitor cells prevent macrophage-mediated axonal dieback and promote regrowth after spinal cord injury. *J. Neurosci.* 2011; *31*: 944–953.
85. Stirling DP, Cummins K, Mishra M, Teo W, Yong VW, Stys P. Toll-like receptor 2-mediated alternative activation of microglia is protective after spinal cord injury. *Brain.* 2014; *137*: 707–723.
86. Velnar T, Bailey T, Smrkolj V. The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms. *J. Int. Med. Res.* 2009. *37*: 1528–1542.

87. Beattie MS, Bresnahan JC, Komon J, Tovar CA, van Meter M, Anderson DK ve ark. Endogenous repair after spinal cord contusion injuries in the rat. *Exp. Neurol.* 1997; *148*: 453–463.
88. Lucas T, Waisman A, Ranjan R, Roes J, Krieg T, Müller W ve ark. Differential roles of macrophages in diverse phases of skin repair. *J. Immunol.* 2010; *184*: 3964–3977.
89. Davatelis G, Wolpe SD, Sherry B, Dayer JM, Chicheportiche R, Cerami A. Macrophage inflammatory protein-1: A prostaglandin independent endogenous pyrogen. *Science.* 1989; *243(4894)*: 1066-1068.
90. Maurer M, von Stebut E. Macrophage inflammatory protein-1. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology.* 2004; *36(10)*: 1882–1886.
91. Sallusto F, Baggiolini M. Chemokines and leukocyte traffic. *Nature Immunology.* 2008; *9(9)*: 949–952.
92. Schluger NW, Rom WN. Early responses to infection: chemokines as mediators of inflammation. *Current Opinion in Immunology.* 1997; *9(4)*: 504–508.
93. Etzerodt A, Moestrup SK. CD163 and Inflammation: Biological, Diagnostic, and Therapeutic Aspects. *Antioxidants & Redox Signaling.* 2013; *18(17)*: 2352-2363.
94. Sheikh H, Yarwood H, Ashworth A, Isacke CM. Endo180, an endocytic recycling glycoprotein related to the macrophage mannose receptor is expressed on fibroblasts, endothelial cells and macrophages and functions as a lectin receptor. *Journal of Cell Science.* 2000; *113 (6)*: 1021–1032.
95. Yamamoto H. Sphingosylphosphorylcholine and lysosulfatide have inverse regulatory functions in monocytic cell differentiation into macrophages. *Arch Biochem Biophys.* 2011; *506*: 83-91.

96. Nakamura AAK, Kobayashi M, Herndon DN, Suzuki F. CCL1 released from M2b macrophages is essentially required for the maintenance of their properties. *Journal of leucocyte biology*. 2012; 92(4): 859-867.
97. Toews GB. *Asthma and COPD*. 2nd ed. *Chapter 11 – Macrophages*. Editor: Barnes PJ, Drazen JM, Rennard IS, Thomson NC. Minnesota, ABD: mAcademic Press; 2009; pp.133-143.
98. Wang N. The cell surface receptor SLAM controls T cell and macrophage functions. *J Exp Med*. 2004; 199: 1255–1264.
99. Akyol S. *Tıpta İnovasyon ve Renovasyon Mozaiği*. Çankaya-Kızılay, ANKARA, TR: Berikan Yayınevi; 2018, pp. 1-72.
100. Boyan BD, Bonewald LF, Paschalis EP, Lohmann CH, Rosser J, Cochran DL ve ark. Osteoblast-mediated mineral deposition in culture is dependent on surface microtopography. *Calcified Tissue International*. 2002; 71(6): 519–529.
101. Abrahamsson I, Berglundh T, Linder E, Lang NP, Lindhe J. Early bone formation adjacent to rough and turned endosseous implant surfaces. An experimental study in the dog. *Clin Oral Implants Res*. 2004; 15(4): 381-392.
102. Goene RJ, Testori T, Trisi P. Influence of a nanometer-scale surface enhancement on de novo bone formation on titanium implants: a histomorphometric study in human maxillae. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2007; 27(3): 211-219.
103. An N, Rausch-fan X, Wieland M, Matejka M, Andrukhov O, Schedle A. Initial attachment, subsequent cell proliferation/viability and gene expression of epithelial cells related to attachment and wound healing in response to different titanium surfaces. *Dent Mater*. 2012; 28(12): 1207-1214.
104. Baharloo B, Textor M, Brunette DM. Substratum roughness alters the growth, area, and focal adhesions of epithelial cells, and their proximity to titanium

- surfaces. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2005; 74(1): 12–22.
105. Sun L, Pereira D, Wang Q, Barata DB, Truckenmüller R, Li Z ve ark. Controlling Growth and Osteogenic Differentiation of Osteoblasts on Microgrooved Polystyrene Surfaces. *PLoS One*. 2016; 11(8): e0161466.
 106. Ziats NP, Miller KM, Anderson JM. *In vitro* and *in vivo* interactions of cells with biomaterials. *Biomaterials* 1988; 9(1): 5–13.
 107. Hamlet S, Ivanovski S. Inflammatory cytokine response to titanium chemical composition and nanoscale calcium phosphate surface modification. *Acta Biomater*. 2011; 7(5): 2345-2353.
 108. Garlet GP, Martins W, Ferreira BR, Milanezi CM, Silva JS. Patterns of chemokines and chemokine receptors expression in different forms of human periodontal disease. *J Periodontal Res*. 2003; 38(2): 210-217.
 109. Chang DT, Jones JA, Meyerson H, Colton E, Kwon IK, Matsuda T ve ark. Lymphocyte/macrophage interactions: biomaterial surface-dependent cytokine, chemokine and matrix protein production. *J Biomed Mater Res A*. 2008; 87(3): 676-687.
 110. Warren GL, O'Farrell L, Summan M, Hulderman T, Mishra D, Luster MI ve ark. Role of CC chemokines in skeletal muscle functional restoration after injury. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2004; 286: C1031–C1036.
 111. van Gorp H, Delputte PL, Nauwynck HJ. Scavenger receptor CD163, a Jack-of-all-trades and potential target for cell directed therapy. *Mol Immunol*. 2010; 47(7-8): 1650-1660.
 112. Sulahian TH, Hogger P, Wahner AE. Human monocytes express CD163, which is upregulated by IL-10 and identical to p155. *Cytokine*. 2000; 12: 1312–1321.

113. Kowal K, Silver R, Sławińska E, Bielecki M, Chyczewski L, Kowal-Bielecka O. CD163 and its role in inflammation. *Folia Histochem Cytobiol.* 2011; 49(3): 365-374.
114. Schaer DJ, Boretti FS, Hongegger A, Poehler D, Linnscheid P, Staeger H, Muller C, Schoedon G, Schaffner A. Molecular cloning and characterization of the mouse CD163 homologue, a highly glucocorticoid-inducible member of the scavenger receptor cysteine-rich family. *Immunogenetics.* 2001; 53: 170–177.
115. Philippidis P, Mason JC, Evans BJ, Nadra I, Taylor KM, Haskard DO, Landis RC. Hemoglobin scavenger receptor CD163 mediates interleukin-10 release and heme oxygenase-1 synthesis: anti-inflammatory monocyte-macrophage responses in vitro, in resolving skin blisters in vivo, and after cardiopulmonary bypass surgery. *Circ Res.* 2004; 94: 119–126.
116. Moestrup SK, Moller HJ. CD163: a regulated hemoglobin scavenger receptor with a role in the anti-inflammatory response. *Ann Med.* 2004; 36: 347–354.
117. Zwadlo G, Voegeli R, Schultze, Osthoff K, Sorg C. A mAb to a novel differentiation antigen on human macrophages associated with the down-regulatory phase of the inflammatory process. *Exp Cell Biol.* 1987; 55: 295–304.
118. Tidball JG, Villalta SA. Regulatory interactions between muscle and the immune system during muscle regeneration. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2010; 298(5): R1173-87.
119. Krzyszczyk P, Rene Schloss R, Andre Palmer A, Berthiaume F. The Role of Macrophages in Acute and Chronic Wound Healing and Interventions to Promote Pro-wound Healing Phenotypes. *Frontiers in Physiology.* 2018; 9: 419-469.
120. Dembic Z. *The Cytokines of the Immune System, The Role of Cytokines in Disease Related to Immune Response.* MA, ABD: Academic Press 2015.

121. Chiu BC, Freeman CM, Stolberg VR, Komuniecki E, Lincoln PM, Kunkel SL ve ark. Cytokine-chemokine networks in experimental mycobacterial and schistosomal pulmonary granuloma formation. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2003; 29: 106–116.
122. Kishi H, Sato M, Shibata Y, Sato K, Inoue S, Abe S ve ark. Role of chemokine C-C motif ligand-1 in acute and chronic pulmonary inflammations. *Springerplus.* 2016; 2;5(1): 1241-1255.

Resim Referans:

1. <http://www.theodoregray.com/Periodictable/Samples/SC.Brookite/s14s.JPG>

ETİK KURUL KARARI



T.C.
BEZMİÂLEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
KARAR METNİ

SAYI: 2017/218
KONU: Sn. Doç. Dr. Sibel AKYOL

29.09.2017

Sayın, Doç. Dr. Sibel AKYOL

“Titanium (Ti) Ve Titanium 500 (Ti 500) İmplantasyonunun Sıçan Makrofaj Subgrupları Aktivasyonuna Etkisi” başlıklı projenize ait başvurunuz 29.09.2017 tarihinde yapılan Yerel Etik Kurul toplantısında değerlendirilmiş ve onanmıştır.

Doç. Dr. Fabrı AKBAŞ
Etik Kurul Başkanı

Prof. Dr. Ahmet BELCE
Üye

Prof. Dr. Erhan AYŞAN
Üye

Prof. Dr. İsmail MERAL
Üye

Yrd. Doç. Dr. Fatemeh BAHADORI
Üye

Yrd. Doç. Dr. Ömer UYSAL
Üye

KATILMADI

Vet. Hek. Mert ÇELİKTEN
Üye

Harun SARIKAMIŞ
Üye

Şerife GÖNCÜ

- Etik kurulumuzdan onam alan her proje için, çalışma başlamadan üç ay önce çalışılacak hayvan rezervinin uygunluğunu (tür, yaş, cinsiyet) belirlemek amacıyla Deney Hayvanları Laboratuvarına başvurulmalıdır.

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

TİTANYUM (Ti) VE TİTANYUM 500 (Ti 500) İMLANTASYONUNUN SIÇAN MAKROFAJ SUB GRUPLARI AKTİVASYONUNA ETKİSİ

ORJİNALLİK RAPORU

%5	%4	%3	%
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	documents.mx İnternet Kaynağı	%1
2	sagens.erciyes.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
3	dergipark.gov.tr İnternet Kaynağı	<%1
4	nobel.gen.tr İnternet Kaynağı	<%1
5	www.bioport.com.tr İnternet Kaynağı	<%1
6	www.jneurosci.org İnternet Kaynağı	<%1
7	theses.gla.ac.uk İnternet Kaynağı	<%1
8	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<%1

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Kadriye Yağmur	Soyadı	ORUÇ
Doğ.Yeri	Siirt/Merkez	Doğ.Tar.	31.03.1992
Email	kyagmurd@gmail.com	Uyruğu	TC

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora		
Yük.Lis.	İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa	2019
Lisans	Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi	2015
Lise	Füsun Yönder Anadolu Lisesi	2010

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Kısmi Zamanlı Öğrenci	İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa-Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı	2017-2018
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	Çok iyi	İyi	İyi		YÖKDİL - 88

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	72	78	78

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
MS Office Word, Excell, Power Point	İyi