

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SIÇAN KEMİK İLİĞİ KAYNAKLI MEZENKİMAL KÖK
HÜCRELERİN YÜKLÜ SENTETİK HOMO-POLİMER KAPLI
YÜZEYLER ÜZERİNDEKİ FARKLILAŞMA VERİMLİLİĞİNİN
KARŞILAŞTIRMALI İNCELENMESİ**

Merve GÖRGÜÇ

Kocaeli Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin
Kök Hücre ve Doku Yenilenmesi Programı için Öngördüğü
BİLİM UZMANLIĞI TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır.

KOCAELİ
2016

T.C
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SIÇAN KEMİK İLİĞİ KAYNAKLI MEZENKİMAL KÖK
HÜCRELERİN YÜKLÜ SENTETİK HOMO-POLİMER KAPLI
YÜZEYLER ÜZERİNDEKİ FARKLILAŞMA VERİMLİLİĞİNİN
KARŞILAŞTIRMALI İNCELENMESİ**

Merve GÖRGÜÇ

Kocaeli Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin
Kök Hücre ve Doku Yenilenmesi Programı için Öngördüğü
BİLİM UZMANLIĞI TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır.

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Gökhan DURUKSU

KOCAELİ
2016

KABUL ve ONAY

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(Tez Onay Sayfası)

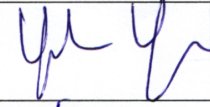


Tez adı: Sığan kemik iliği kaynaklı Mezenkimal kök hücrelerin
yüksek Sentetik Homopolimer Kaplı Yüzeyler Üzerindeki Terkiblenme
Verimliliğinin Karşılaştırmalı İncelenmesi

Tez yazarı: Merve GÖRGEN

Tez savunma tarihi: 18.07.2016

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Gökhan DURUKU

İş bu çalışma Jürimiz tarafından Kök Hücre Anabilim Dalı Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Sınavı jüri üyeleri Ünvanı Adı Soyadı	İmzası
Üye Doç. Dr. Yurufhan YAZIR	
Üye Doç. Dr. Ünal USLU	
Üye Yrd. Doç. Dr. Gökhan DURUKU	

ONAY

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylıyorum.

...../...../20

Prof. Dr. Mustafa Yıldız
Enstitü Müdürü

ÖZET

Sıçan Kemik İliği Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin Yüklü Sentetik Homopolimer Kaplı Yüzeyler Üzerindeki Farklılaşma Verimliliğinin Karşılaştırmalı İncelenmesi

AMAÇ: Bu tez çalışmasında, doku mühendisliği ön çalışmalarında kullanılabilir, hücre tutunma ve çoğalmasını destekleyen polimerleri belirlemek hedefiyle, sentetik homopolimerlerin *in vitro* ortamda sıçan kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin canlılığına, tutunmasına, çoğalmasına ve farklılaşma fonsiyonuna olan etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

YÖNTEM: Sıçan kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücreler, poli-L-lizin, poli-D-lizin, poli-L-prolin, poli-L-histidin, poli-L-alanin, poli-L-lösin, poli-L-glutamik asit gibi farklı sentetik homopolimerler kullanılarak kaplanan cam yüzeylerde kültüre edilmiş ve hayvansal kaynaklı bir protein olan kollajen tip-1 kaplı cam yüzeyde kültüre edilen hücrelerle kıyaslanarak canlılık, çoğalma, toksisite ve tutunma testleri yapılmıştır. Hücrelerin bu yüzeylerde adipojenik ve osteojenik farklılaşma potansiyelleri gen ekspresyonu analizleri ve immünohistokimyasal analizlerle gösterilmiştir.

BULGULAR: Elde ettiğimiz verilerden yola çıkarak poli-L-lizin ve poli-L-glutamikasit kaplı yüzeyin mezenkimal kök hücrelerin canlılığına ve çoğalmasına olumsuz etkilerinin olduğu görülmüştür. Poli-L-prolin ve poli-L-histidin kaplı yüzeylerin ise hücre tutunmasını en çok desteklerken hücreleri adipojenik ve osteojenik farklılaşmaya yönlendirdiği gözlemlenmiştir.

SONUÇ: Farklı homopolimerlerin kullanılmasıyla kök hücrelerin kültürdeki davranışları bu çalışmada incelenmiştir. Negatif yüklü yüzey kaplama malzemesi çok iyi bir sonuç vermezken pozitif toplam yükü olan polimerlerin, poli-L-prolin ve poli-L-histidin, hücrelerin çoğalmasını ve farklılaşmasını desteklediği görülmüştür. Ancak hücre tutunması için çok sık kullanılan poli-L-lizin pozitif yüklü olmasına rağmen kültürde hücre canlılığını koruyamamıştır.

Anahtar kelimeler: *biyomalzeme, farklılaşma, homopolimer, mezenkimal kök hücre*

ABSTRACT

Comparative Analysis of Differentiation Efficiency of Rat Bone Marrow Derived Mesenchymal Stem Cells on Charged Synthetic Homo-Polymer Coated Surfaces

OBJECTIVE: In this thesis study, it was aimed to investigate the effect of synthetic homopolymer coated surfaces on the viability, adhesion, proliferation and the differentiation function of bone marrow derived stem cell to determine the polymers that can support the cell adhesion and proliferation in both preliminary studies of tissue engineering and in the cell culture.

METHOD: Bone marrow derived stem cells cultured on the glass surface coated with various homopolymers, such as poly-L-lysine, poly-D-lysine, poly-L-proline, poly-L-histidine, poly-L-alanine, poly-L-leucine, poly-L-glutamic acid and were compared to the cells on the collagen type-1 coated glass surface with respect to the viability, proliferation, toxicity and adhesion tests. The differentiation potential of the mesenchymal stem cells into adipogenic and osteogenic cells were demonstrated by gene expression and immunohistochemical analyses.

RESULTS: According to our obtained data, poly-L-lysine and poly-L-glutamic acid coated surfaces demonstrated negative effect on the viability, adhesion and proliferation of mesenchymal stem cells. On the other hand, poly-L-proline and poly-L-histidine coated surfaces are the most supportive homopolymers for the cell adhesion. The adipogenic and osteogenic differentiation was committed on these two surfaces.

CONCLUSION: By using various homopolymers, the behaviour of the stem cells were analyzed in the culture. While the negatively charged coating material didn't yield a good output, the positively charged coating materials, poly-L-proline and poly-L-histidine, were observed to support the cell proliferation and differentiation. Although the poly-L-lysine was frequently used for cell adhesion, it didn't preserve the cell viability in the culture.

Keywords: *biomaterial, differentiation, homopolymer, mesenchymal stem cells*

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca tecrübelerinden ve bilgilerinden faydalandığım, bana yol gösteren, bu tezin oluşmasında desteğini ve yardımlarını esirgemeyen, tezin laboratuvar çalışmaları aşamasında yardımcı olan ve imkân sağlayan, her zaman sorularımı özveri ve sabırla cevaplayan, beni farklı konularda da aydınlatan pek kıymetli danışman hocam **Yrd. Doç. Dr. Gökhan DURUKSU**'ya;

Çalışma boyunca bilgi ve deneyimleri ile yol gösteren, öğüt ve önerileri ile yardımcı olan sayın bölüm başkanım, **Doç. Dr. Yusufhan YAZIR**'a;

Eğitim sürem boyunca değerli bilgilerini benimle paylaşan ve manevi desteğini hissettiğim, **Yrd. Doç. Dr. Gülçin GACAR**'a ve her zaman bize tavsiyelerde bulunan, karakteriyle bölüme neşe katan bölümümüzün seda ablası **Dr. Zehra Seda HALBUTOĞULLARI**'na;

Yüksek lisans eğitimim boyunca derslerde ve laboratuvarlarda birlikte olduğumuz, iyi ve güzel hatıralar biriktirmeme vesile olan, her zaman destek ve yardımlarını gördüğüm, tanıdığım için çok mutlu olduğum sevgili arkadaşlarım **Arş. Gör. Ahmet ÖZTÜRK**'e, **Biyomühendis Nilbeste BEKİROĞLU**'na, **Moleküler Biyolog Ceren ÖZEL**'e, **Biyolog Ayşen Meltem Kocagümüş BILDIRCİN**'a ve adı geçmeyen diğer tüm bölüm arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Her konuda sabırla yardımcı olan, maddi ve manevi desteklerini benden hiç eksik etmeyen, sevigili ve biricik eşim **Mustafa GÖRGÜÇ**'e, benim için çok özel olan, desteğini her zaman hissettiğim, beni yetiştiren ve bana emek veren canım **Ailem**'e desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

TEZİN AŞIRMA OLMADIĞI BİLDİRİSİ

Tezimde başka kaynaklardan yararlanılarak kullanılan yazı, bilgi, çizim, çizelge ve diğer malzemeler kaynakları gösterilerek verilmiştir. Tezimin herhangi bir yayından kısmen ya da tamamen aşırma olmadığını ve bir İntihal Programı kullanılarak test edildiğini beyan ederim.

26/07/2016

Merve GÖRGÜÇ



İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	iii
ÖZET.....	İV
ABSTRACT.....	V
TEŞEKKÜR.....	VI
TEZİN AŞIRMA OLMADIĞI BİLDİRİSİ	VII
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	X
ÇİZİMLER DİZİNİ.....	XI
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	XIV
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Kök Hücreler.....	3
1.2. Kök Hücre Çeşitleri.....	3
1.3. Mezenkimal Kök Hücreler.....	4
1.4. Mezenkimal Kök Hücrelerin in-vitro Kültürü.....	7
1.5. Doku Mühendisliği Yaklaşımları	8
1.5.1. Doğal Polimerler	9
1.5.2. Sentetik polimerler	10
1.5.3. Katyonik Polimerler.....	10
2. AMAÇ	17
3. YÖNTEM	18
3.1. Kemik İliği Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin Kültürü.....	18
3.2. Homo-polimerlerin Hazırlanması.....	18
3.3. Kültür Kaplarının Homo-polimerler ile Kaplanması	20
3.4. Mezenkimal Kök Hücrelerin Homopolimer Kaplı Yüzeylerde Kültürünün Canlılık Testi.....	20
3.5. Homo-Polimerlerin Mezenkimal Kök Hücelere Toksik Etkisinin Belirlenmesi	21
3.6. Farklı Homo-polimerler üzerinde Kemik İliği Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerinin Çoğalma ve Adezyon Özelliklerinin Ölçülmesi.....	22
3.7. Homo-Polimerlerin MKH'lerin Morfolojileri Üzerine Etsinin İncelenmesi	22
3.8. Homopolimer Kaplı Yüzeylerde Kimyasal Uyarım ile Hücrelerin Adipojenik ve Osteojenik Farklılaşmaya Yönlendirilmesi	23
3.8.1 Adipojenik Farklılaştırma Sonrası Hücrelerin Fiksasyonu ve Oil Red-O Boyaması	24
3.8.2 Osteojenik Farklılaştırmaya Alınmış Hücrelerin Fiksasyonu ve Alizarin Red S Boyaması.....	24
3.9. Farklılaşma Sonrası Hücrelerde Gen İfadesi Analizi.....	24
3.10. İstatistiksel Yöntem	25

4. BULGULAR.....	27
4.1 Kemik İliği Kaynaklı mezenkimal Kök Hücrelerin Kültürü	27
4.2. Homopolimer Kaplı Yüzeylerin Hücrelerin Canlılık, Adezyon, Çoğalma ve Morfolojilerine olan Etkisi	27
4.2.1. WST-1 Analizi ile Hücre Canlılığının ve Adezyonun Ölçülmesi.....	27
4.2.2. LDH Aktivitesinin Ölçülmesi.....	31
4.2.3. FDA/PI Boyaması ile Hücre Canlılığının Görüntülenmesi	33
4.2.4. Phalloidin FITC Boyaması ile Hücre Morfolojilerinin Görüntülenmesi.....	34
4.3. Homopolimer Kaplı Yüzeylerde Mezenkimal Kök Hücrelerin Adipojenik Farklılaşmaya Yönlendirilmesi.....	36
4.4. Homopolimer Kaplı Yüzeylerde Mezenkimal Kök Hücrelerin Osteojenik Farklılaşma Görüntüleri.....	40
4.5. Gen İfade Analizleri	42
4.5.1. Adipojenik Farklılaşma Gen ifade Analizleri	43
4.5.2. Osteojenik Farklılaşma Gen İfade Analizleri.....	45
4.5.3. Farklı Homopolimer Kaplı Yüzeylerde Normal Kültür Besiyeri ile Kültüre Edilen Hücrelerin Gen İfade Analizleri	50
5. TARTIŞMA	55
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	62
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	64
ÖZGEÇMİŞ.....	68
EKLER.....	70

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Alpha-MEM	: Alpha Modified Eagle Medium
cDNA	: Komplementer Deoksiribonukleik Asit
CO ₂	: Karbondioksit
DAPI	: 4' -6- Diamidino -2- fenilindol
DNA	: Deoksiribonukleik Asit
EKH	: Embriyonik Kök Hücre
FBS	: Fetal Sığır Serumumu
LDH	: Laktodehidrogenaz
ml	: Mikrolitre
ml	: Mililitre
mm	: Mikrometre
mM	: Milimolar
NF-kB	: Nuklear Faktör Kappa B
nm	: Nanometre
Oct4	: Oktamer Bağlayıcı Traskriptör Faktör-4
PBS	: Fosfat tamponu
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PEG	: Polietilenglikol
pH	: Potansiyel Hidrojen
PLH	: Poli-L-histidin
PLL	: Poli-L-lizin
Rex-1	: İndirgenmiş Ekspresyon-1
RNA	: Ribonukleik asit
SSEA-3	: Evreye Spesifik Embriyonik Antijen-3
SSEA-4	: Evre Spesifik Embriyonik Antijen-4
TRA-1-60	: Tümör Rejeksiyon Antijeni-1-60
TRA-1-81	: Tümör Rejeksiyon Antijeni-1-60
WST-1	: Suda Çözülebilir Tetrazolyum

ÇİZİMLER DİZİNİ

Çizim 1.1.Poli-L-Histidinin moleküler yapısı.....	14
Çizim 1.2. Poli-L-Lizinin moleküler yapısı	15
Çizim 1.3.Poli-D-Lizinin moleküler yapısı	15
Çizim 1.4.Poli-L-Lösinin moleküler yapısı.....	15
Çizim 1.5.Poli-L-Prolinin moleküler yapısı.....	16
Çizim 1.6.Poli-L-Alaninin moleküler yapısı.....	16
Çizim 3.1.Kültür kaplarındaki cam yüzeylerin homopolimerlerle kaplanması ve hücre ekimi şematik görüntüsü.....	20
Çizim 4.1.Kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin kültürünün morfolojik görüntüleri.....	28
Çizim 4.2.Farklı yüzeyler üzerinde hücrelerin adezyonu.....	29
Çizim 4.3. Farklı yüzeyler üzerinde hücrelerin adezyonu.....	30
Çizim 4.4.Yüzeyler üzerinde hücrelerin çoğalma analizi.....	31
Çizim 4.5.LDH aktivitesinin ölçülmesi.....	32
Çizim 4.6.Hücre canlılığının FDA/PI boyaması ile gösterilmesi.....	33
Çizim 4.7.Poli-L-Lizin ve Poli-D-Lizin kaplı yüzeylerdeki hücre morfolojilerini gösteren Phalloidin boyaması.....	35
Çizim 4.8.Poli-L-Prolin ve poli-L-Histidin kaplı yüzeylerdeki hücre morfolojilerini gösteren Phalloidin boyaması.....	35

Çizim 4.9. Poli-L-Lösin ve poli-L-Alanin kaplı yüzeylerdeki hücre morfolojilerini gösteren Phalloidin boyaması.....	36
Çizim 4.10. Kaplanmamış ve kollajen tip-1 kaplı yüzeylerdeki hücre morfolojilerini gösteren Phalloidin boyaması.....	36
Çizim 4.11. Poli-D-lizin, Poli-L-prolin ve Poli-L-histidin kaplı yüzeyde kimyasal uyarımla adipojenik farklılaştırmaya alınan mezenkimal kök hücrelerin Oil Red O boyaması.....	38
Çizim 4.12. Poli-L-alanin, Poli-L-lösin, kollajen Tip 1 kaplı ve kaplanmamış cam yüzeyde kimyasal uyarımla adipojenik farklılaştırmaya alınan mezenkimal kök hücrelerin Oil Red O boyaması.....	39
Çizim 4.13. Poli-L-prolin, poli-L-histidin ve poli-L-alanin kaplı yüzeylerde kimyasal uyarımla osteojenik farklılaştırmaya alınan mezenkimal kök hücrelerin Alizarin Red S boyaması.....	41
Çizim 4.14. Poli-L-lösin, kollajen Tip 1 kaplı ve kaplanmamış yüzeyde kimyasal uyarımla osteojenik farklılaştırmaya alınan mezenkimal kök hücrelerin Alizarin Red S boyaması.....	42
Çizim 4.15. Kimyasal uyarı sonrası hücrelerde PPAR γ gen ifade analizi.....	44
Çizim 4.16. Kontrol grubu PPAR γ gen ifade analizi.....	44
Çizim 4.17. Osteonectin ve Runx2 gen ifade analizi.....	45
Çizim 4.18. Kontrol grubuna göre osteonectin ve Runx2 gen ifade analizleri.....	46
Çizim 4.19. Poli-D-Lizin kaplı yüzeyde osteojenik farklılaştırmaya alınan hücrelerin gen ifade analizi.....	47
Çizim 4.20. Poli-L-Prolin kaplı yüzeyde osteojenik farklılaştırmaya alınan hücrelerin gen ifade analizi.....	48

Çizim 4.21. Poli-L-Histidin kaplı yüzeyde osteojenik farklılaştırmaya alınan hücrelerin gen ifade analizi.....	48
Çizim 4.22. Poli-L-Lösin kaplı yüzeyde osteojenik farklılaştırmaya alınan hücrelerin gen ifade analizi.....	49
Çizim 4.23. Poli-L-Alanin kaplı yüzeyde osteojenik farklılaştırmaya alınan hücrelerin gen ifade analizi.....	50
Çizim 4.24. Poli-D-Lizin kaplı yüzeylerde kültüre edilen mezenkimal kök hücrelerin farklı kaynaktan hücrelere özgü gen ifade düzeyleri.....	51
Çizim 4.25. Poli-L-Prolin kaplı yüzeylerde kültüre edilen mezenkimal kök hücrelerin farklı kaynaktan hücrelere özgü gen ifadelerinin düzeyleri.....	51
Çizim 4.26. Poli-L-Lösin kaplı yüzeylerde kültüre edilen mezenkimal kök hücrelerin farklı kaynaktan hücrelere özgü gen ifadelerinin düzeyleri.....	52
Çizim 4.27. Poli-L-Alanin kaplı yüzeylerde kültüre edilen mezenkimal kök hücrelerin farklı kaynaktan hücrelere özgü gen ifadelerinin düzeyleri.....	53
Çizim 4.28. Kollajen Tip 1 kaplı yüzeyde kültüre edilen mezenkimal kök hücrelerin farklı kaynaktan hücrelere özgü gen ifadelerinin düzeyleri.....	54
Çizim 4.29. Poli-L-Histidin kaplı yüzeyde kültüre edilen mezenkimal kök hücrelerin farklı kaynaktan hücrelere özgü gen ifadelerinin düzeyleri.....	54

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Hücre kültürde kullanılan Alpha MEM besiyeri içeriği	18
Çizelge 3.2. Hücre kültüründe kullanılan homo-pollimerlerin yüzey kaplama konsantrasyonları.....	19
Çizelge 3.3. Çalışmada kullanılan genler ve primer dizileri.....	26



1. GİRİŞ

Travma ve çeşitli hastalıklara bağlı organ kayıpları, nakil gerektiren kalp-karaciğer ve böbrek gibi organların yetmezlikleri, yanıklar, iyileşemeyen kırıklar, kemik dejenerasyonları, omurilik hasarları ve diyabet gibi hastalıklar insan ölümlerinin başlıca sebepleri arasındadır. Bu tarz tedavisi olmayan hastalıklar sonucu kaybedilen veya hasar görmüş organların yerine başka bir vericiden organ nakli akla gelen çözümlerin ilki olsa da verici sayısının yeterli seviyede olmaması ve doku uyumsuzlukları sebebiyle tam bir çözüm olmamaktadır. Amerika’da yapılan bir araştırmaya göre 2007 yılında organ yetmezliğinin son evresinde olan ve nakil bekleme listesinde olan 92.000 hastadan sadece 14.500’üne nakil yapılabilmiş ve birçok hasta organ beklerken hayatını kaybetmiştir. Türkiye’de ise İstanbul İl Sağlık Müdürlüğü’nün 2010 yılında yapmış olduğu araştırmaya göre Türkiye’de 2010 yılsonu itibariyle organ nakli merkezlerinde 2010 böbrek, 86 karaciğer, 80 kalp ve 63 pankreas nakli bekleyen hasta bulunduğu bildirilmiştir. Yine Türkiye Sağlık Bakanlığı’nın 2016 yılı verilerine göre 3.042 böbrek, 129 kalp, 755 karaciğer, 18 akciğer, 9 pankreas ve 1.299 kornea bekleyen hasta bulunmaktadır. Bunlardan sadece 1.124 böbrek, 26 kalp, 469 karaciğer, 8 akciğer, 4 pankreas ve 963 kornea nakli gerçekleştirilmiştir. Toplam organ bekleyen, sistemde kayıtlı hasta sayısı yaklaşık 29.000’dir.

Hem bilim adamları hem de klinisyenlerin ortak çalıştığı doku mühendisliği birçok farklı bilimsel alanı içerdiğinden disiplinler arası bir alandır. Doku mühendisliği çalışmalarında başta malzeme bilimcileri ve hücre biyologlarının temel amacı klinikte kullanabilecek çeşitli ürünler geliştirmek ve fonksiyonel yapay doku üretebilmektir. Bu doğrultuda uygun hücre kaynağı ve biyomalzemeler kullanılarak yapı iskeleleri oluşturulur ve daha sonra hasarlı bölgeye nakledilerek onarımın sağlanması amaçlanır. Özellikle bu alanda kullanılacak, biyolojik sistemlerle etkileştiğinde uyum sağlayabilecek yeni malzemelerin geliştirilmesi için yoğun çaba harcanmaktadır. Bu sebeple kullanılacak sentetik ve doğal biyo-malzemelerin biyo-uyumlu olması, biyobozunur olması, toksik olmaması, gerekli fiziksel ve mekanik özelliklere sahip olması önemlidir.

Son zamanlarda bilim adamları üç boyutlu biyo-yazıcılar kullanarak yapay doku iskeleleri oluşturabilmişlerdir. Hücre kaynağı olarak ta kök hücrelerin rejeneratif özelliklerinden yararlanmaktadırlar. Üç boyutlu organ tasarımları uygun yazılımlar ve biyomalzemeler kullanılarak oluşturulur ve hastalık modelleri ve ilaç denemeleri çalışmalarında kullanılabilir. Oluşturulmaya çalışılan dokuların *invivo*’dakine

benzer anatomik yapıya ve fizyolojik özellikte olabilmesi için hücre-hücre etkileşimleri hücre dışı matriks etkileşimleri, mikroçevre, hücrelerin dizilimi, kullanılan malzemenin mekanik ve fiziksel özellikleri önem arz etmektedir. Dokular için gerekli olan ekstraselüler matriks (hücre dışı matriks) yapısını oluşturabilmek amacıyla, doku iskelesi yapımında kullanılan malzemenin hücrelerin canlılığına ve çoğalmasına olan etkisi göz önünde bulundurulmalıdır. Çünkü kullanılan biyo-malzemenin yüzey deseni, yüzey topografisi, yüzey yükü ve elastikliği gibi özellikleri hücreler üzerinde etkilidir. Genelde PLA, PLGA, PCL gibi sentetik polimerlerde hücre tutunmasını elverişli hale getirebilmek için yüzey modifikasyonlarına ihtiyaç duyulmaktadır.

Doku mühendisliği uygulamalarında aşılması gereken sorunlardan biri de üretilen ürünün hastada kullanılabilirliğidir. Oluşturulan greftin iç kısımlarındaki hücrelere besin ve oksijenin düzgün bir şekilde iletilmesi ve anjiyogenik faktörlerle iç bölgelerde damarlaşmanın uyarılabilmesi gerekmektedir. Bu durumda mezenkimal kök hücrelerin anjiyogenik faktör üretebilme yeteneklerinden de yararlanılabilir. Hücre dışı matriks, hücrelerin birbirleriyle doğrudan teması ve birbirlerine tutunması, hücreleri destekleyen protein ve molekülleri içermesi, hücrelere besin ve madde alışverişini sağlayan destek yapısı olması bakımından hücreler için hayati önem arz etmektedir. Aynı zamanda hücre yapısını, hareketlerini, gelişimi ve farklılaşmasını da etkilemektedir. Doku ve organ yapısına göre farklılık gösteren hücre dışı matriks, in vivo ortamda içerdiği proteinler ile hücrelere destek sağlamaktadır. İn-vitro koşullarda yapılan çalışmalarda da in-vivo ortam taklit edilerek hücrelerin canlılığının korunması ve fonksiyonlarının desteklenmesi amaçlanmaktadır.

Doku mühendisliğinde kullanılacak olan malzeme ilk olarak hücre kültürü çalışmalarında denemeleri yapılarak gerekli kontrollerden geçmesi gerekmektedir. Malzeme kültürdeki hücrelerin yüzeye yapışmasını ve çoğalması gibi özelliklerini destekler nitelikte olmalıdır. Malzemenin hücreler tarafından sindirilememesi ve toksik olmaması sağlıklı kültür koşulları elde edebilmek için önem arz etmektedir.

1.1. Kök Hücreler

Kök hücreler özelleşmiş hücre tiplerine farklılaşabilen, uzun süre bölünebilme ve kendini yenileme yeteneğine sahip, çok hücreli canlıların doku ve organ oluşumunu sağlayan ana hücrelerdir. Dokulardaki somatik hücrelerden farklı olarak kök hücrelerin iyileştirici ve yenileyici özelliklerinin de olması bu hücrelerin klinikte uygulanabilme potansiyellerini artırmaktadır. Bu da birçok bilim adamının son yıllarda kök hücre araştırmalarına yönelmesine sebep olmuştur.

Vücudumuzdaki kan kas, karaciğer ve sinir hücreleri gibi özelleşmiş hücreler, buldukları organ ve dokularda belirli fonksiyonlara sahiptir ve bu hücreler bölündüklerinde yine kendileri gibi bir hücre oluştururlar. Fakat kök hücrelerin özelleşmiş hücreler gibi belirli bir fonksiyonları yoktur. Buldukları mikroçevreden aldıkları hücre dışı sinyallerle farklılaşmaya giderek özgül bir hücreye dönüşebilirler.

1.2. Kök Hücre Çeşitleri

Kök hücreler genel olarak embriyonik kök hücreler ve embriyonik olmayan kök hücreler olarak iki farklı kaynaktan elde edilirler. Embriyonik kök hücreler (EKH) blastokist denilen 4-5 günlük embriyonun iç hücre kütesinden elde edilirken embriyonik olmayan kök hücreler dokuya özgü, postnatal kök hücrelerdir ve elde edildikleri kaynaklar açısından farklılıklar gösterir. Embriyonik olmayan kök hücreler erişkin kök hücreleri, fetüs kök hücreleri, kadavradan elde edilen kök hücreler, göbek kordonu ve plasenta kök hücreleri başlığı altında toplanabilir. Aynı zamanda bu hücrelerin birbirlerine üstünlükleri vardır. Vücudumuzdaki tüm hücrelere dönüşebilme ve bir organizmayı oluşturabilme potansiyeline sahip kök hücreler totipotent olarak adlandırılır. Erken embriyonik dönemde 4 hücreden 8 hücreye kadarki bütün blastomerler totipotenttir. Erken embriyonik dönemin yaklaşık 5. gününde blastosöl boşluğunda bulunan hücreler, vücudun üç embriyonik germ tabakasından köken alan pek çok farklı hücre çeşidine farklılaşabilirler. Bu hücrelere pluripotent kök hücreler denir. Vücuttaki tüm dokulara kaynaklık etseler de yeni bir birey oluşturamazlar. Fetal dönemde hücreler biraz daha özelleşirler ve erişkin kök hücrelere dönüşürler.

Morfolojik olarak EKH'ler yoğun bir çekirdek sitoplazma içeriğine sahiptir ve her hücrede bir ya da daha fazla çekirdekçik bulunmaktadır. Bu hücrelerin telomeraz enzim aktivitesi oldukça yüksektir. Bu yüzden normal somatik hücrelerden farklı olarak in vitro

ortamda sınırsız bölünme ve çoğalma özelliği gösterirler. SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81, alkalen fosfataz, Rex-1, Oct4, Nanog ve Sox2 gibi özel belirteçleri yüksek düzeyde ifade ettikleri gözlemlenmiştir (Zhao ve diğ. 2012).

EKH'ler in vitro ortamda, gerekli sitokinleri salgılayan besleyici tabaka üzerinde kültüre edilirler. Besleyici tabaka olarak genellikle mitotik aktivitesi durdurulmuş fare embriyonik fibroblastlar tercih edilir. Bu şekilde EKH'ler uzun süre boyunca farklılaşmadan kültüre edilebilirler. Besleyici tabakasız kültürde hücrelerin tutunabilmesi için kollajen, fibronektin, laminin vb protein ekstraktları ile kültür kaplarının yüzeyleri kaplanır ve daha sonra hücreler ekilerek tutunması beklenir (Xu ve diğ. 2001; Baharvand ve diğ. 2006).

Son yıllarda bu hücrelerin hem araştırma hem de klinikte kullanımları üzerine birçok araştırma yapılmaktadır (Trounson ve DeWitt, 2016). EKH'lerin farklılaşma potansiyelleri çok yüksek olduğundan farklı hücre serileri elde etmek mümkündür. Aynı zamanda yeni ilaç tasarımı deneylerinde, ilaç toksisitesinin araştırılmasında ve erken embriyonik gelişim çalışmalarında model olabilecek hücrelerdir (Jensen ve diğ. 2009). Bütün bu özelliklerinden dolayı EKH hücrelerin birçok hastalığın tedavisinde kullanılma potansiyellerinin olmasına rağmen kültür koşullarının çok iyi tanımlanmamış olması, teratom oluşturuca özelliklerinin olması ve hem dinsel hem de politik nedenlerden dolayı bazı ülkelerde EKH araştırmalarına ve klinikte kullanımlarına yasal kısıtlamalar getirilmiştir. Bu yüzden bazı ülkelerdeki birçok bilim adamı embriyonik olmayan kök hücre kaynaklarını kullanarak tedavi amaçlı kök hücre çalışmalarına devam etmektedirler.

1.3. Mezenkimal Kök Hücreler

Mezenkimal kök hücreler (MKH) ilk defa 1982 yılında Friedenstein tarafından fibroblast benzeri koloniler oluşturan hücreler olarak tanımlanmıştır (Fridenshtein, 1982). Daha sonra yapılan çalışmalarda bu hücrelerin birçok doku ve hücreleri oluşturan multipotent hücreler olduğu belirlenmiştir. Mezenkimal kök hücrelerin kendilerini yenileme ve mezoderm endoderm ve ektodermden köken alan diğer hücre tiplerine farklılaşabilme özelliği vardır. Aynı zamanda vücuttaki hasarlı bölgeye giderek o dokunun yenilenmesi ve onarımında görev alırlar. Bu özellikleri bakımından bu hücrelerin klinikte kullanım potansiyelleri yüksektir (Patel ve diğ. 2013). Bu hücrelerle klinik çalışmalar daha

çok hematopoetik kök hücre nakli alanında kullanılmıştır. MKH'lerin nakil sonrası graft versus host hastalığında (GVHH) terapötik role sahip oldukları gözlemlenmiştir.

Mezenkimal kök hücrelerin klinik kullanımını açısından en belirgin özelliklerinden birisi de bu hücrelerin immunojenitesinin düşük olması ve immunsupresif olmalarıdır. Bu hücreler uygun mikroçevre ortamında T lenfosit proliferasyonunu ve inflamatuvar sitokin üretimini baskılar, ayrıca doğal bağışıklık sistemi üzerine de supresör (baskılayıcı) etki yaparlar (Karaöz ve Ovalı, 2004).

MKH'ler hücreSEL özellikleri bakımından somatik hücrelerden farklıdır. Kültür koşullarında adeziv (yapışkan) özellik gösterirler ve kültür kabında koloniler oluşturarak çoğalırlar. Osteojenik, adipojenik, kondrojenik farklılaşma eğilimleri vardır (Dominici ve diğ. 2006). MKH'ler ışık veya faz mikrokobuyla incelendiğinde morfolojik olarak fibroblast benzeri hücreler olduğu görülür. İğsi yapıya sahip, küçük ve yıldızlı görünüşleri vardır. Uzun pasajlara kadar özelliklerini kaybetmeksizin kültüre edilebilirler. Bu hücrelerin kemik iliği aspiratlarında çekirdekli hücreler arasındaki oranı %0,01-0,001 olarak hesaplanmıştır (Pittenger ve diğ. 1999). Hücrelerin izolasyon ve kültürünün kolay olması ayrıca yüksek *ex vivo* potansiyelinin olması bu hücreleri tedavi edici bir araç haline getirmektedir. Aynı zamanda tüm dokularda, destek hücreleri olan stromal hücrelerin de kökenini teşkil etmektedirler.

MKH'lerin kesin bir yüzey belirteçleri olmamakla birlikte bu hücreler klinik veya araştırma amaçlı kullanılmadan önce akım sitometrisi yöntemiyle mutlaka CD13, CD29, CD44, CD90, CD 73, CD 105, CD146, CD 166, HLA ABC pozitif; CD3, CD8, CD11b, CD14, CD15, CD19, CD33, CD34, CD45, CD117 ve HLA-DR negatif olmaları açısından karakterize edilmelidir (Dominici ve diğ. 2006; Karaöz ve diğ. 2012).

Mezenkimal kök hücreler *ex vivo* ortamda uzun süre kültüre edilmelerine rağmen normal karyotip ve telomeraz etkinliklerini korurlar. Fakat hücreler her pasajda tripsine maruz kaldıkları için bu alt kültürler, hücrenin işlevini zayıflatmaktadır. Kültürde çoğaltılan bu MKH'ler akım sitometrisi yöntemiyle incelendiğinde kendilerine özgü kesin belirteçler eksprese etmedikleri; endotelyal, epitelyal ve kas hücrelerine benzer immunofenotipik özellikler de taşıdıkları görülmektedir.

Mezenkimal kök hücreler ve hematopoietik kök hücreler ICAM (İntraselüler hücreler arası tutunma molekülü), VCAM (Vasküler hücre adezyon molekülü) ve L-

selektin gibi bir çok tutunma molekülünü ortak olarak bulundururlar (Jiang ve diğ. 2002). Aynı zamanda MKH'lerin birçok sitokin, kemokin ve hücre dışı matris proteinlerini sentezleme yeteneği de vardır. Salgıladıkları başlıca sitokinler IL-6, IL-7, IL-8, IL-11, IL-12, IL-14, IL-15'dir.

Mezenkimal kök hücrelerin birçok mezenkimal doku tipine farklılaşma yeteneklerinin olduğu hem in vivo hem in vitro çalışmalarla gösterilmiştir. Mark Pittenger ve arkadaşlarının 1998 yılında yapmış olduğu bir çalışmada erişkin insan kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin uygun şartlar altında uyarıldıklarında birçok farklı bağ dokusu hücrelerine farklılaşabildiği gözlemlenmiştir (Pittenger ve diğ. 1999; Pittenger ve diğ. 2000; Toma ve diğ. 2002).

Çeşitli merkezi sinir sistemi hastalıklarında beyne nakledilen kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin nöral hücrelere farklılaştığı, bunu yaparken de bazı terapötik moleküller de sentezleyerek yararlı etkilerinin olduğu gözlemlenmiştir. Bu moleküllerin rejeneratif (yenileyici), anti apoptotik, anjiojenik ve anti-inflamatuvar özellikleri sahip olduğu görülmüştür (Daley ve Goodell, 2003). Bu şekilde hasarlı bölgedeki kaynak hücrelerin yaşamsal fonksiyonlarını düzenlediği ve anjiojenik faktörlerle de doku kanlanmasını artırarak onarımı sağladığı bilinmektedir.

Bilindiği üzere mezenkimal kök hücreler vücudun özellikle damardan zengin bağ dokusu içeren dokularından elde edilmektedir. Bunlar arasında da en çok kemik iliğinin MKH içerdiği kanısı hakim olsa da yağ dokusu ve göbek kordonu da mezenkimal kök hücre bakımından oldukça zengin kaynaklardır. Bununla birlikte farklı kaynaklardan elde edilen mezenkimal kök hücreler, hücre sayısı genetik yapıları (Wagner ve diğ. 2005) fenotipleri, büyüme çoğalma ve farklılaşma özellikleri, sitokin ve kemokin salgılama yetileri (Friedman ve diğ. 2007) birbirinden farklılık gösterir. Örneğin kemik iliğinden elde edilen MKH'lerin kondrojenik farklılaşma yetisi, yağ dokudan elde edilenlere göre daha yüksektir (Huang ve diğ. 2005). Aynı zamanda MKH'lerin sayısı yaşla ters orantılıdır. Yenidoğan kemik iliklerinde 10.000 çekirdekli hücreden biri MKH olurken, bu sayının ergenlikte 1:100.000, 50'li yaşlarda ise 1;400.000 olduğu varsayılmaktadır (Caplan 1994).

Mezenkimal kök hücrelerin ana kaynak olarak kemik iliği ve birçok dokudan (kas, kemik, kıkırdak, fetal kemik iliği, yağ dokuları, karaciğer, kordon kanı, periferik kan) izole edilebilir olması bu hücrelerin klinikte hücre kaynağı olarak seçilebilirliğini göstermektedir (da Silva ve diğ. 2006). Bu hücrelerin başta hematopoietik kök hücre

nakilleri, doku mühendisliği ve gen tedavileri olmak üzere birçok alanda klinik kullanım potansiyellerinin olması bu hücelere olan ilgiyi giderek artırmaktadır.

1.4. Mezenkimal Kök Hücrelerin in-vitro Kültürü

Hücre kültürü hücrelerin in vitro ortamda uygun besiyeri ortamında çoğaltılmasını sağlayan bir alandır. Hücre kültürü günümüzde patolojik durumlarda hücelere özgü işlevleri belirlemek ve tanı amacıyla bir hücre serisinden çoğaltılan hücrelerle çalışılarak sonuçlar elde etmemizi sağlamaktadır. Temel prensib olarak, canlı bir dokudan veya organdan alınan küçük bir parçanın in vitro ortamda çoğaltılıp büyütülmesine dayanmaktadır. Bu çalışmaları yaparken bazı yöntemler takip edilmektedir. Hücrelerin moleküler özelliklerine, cinsine göre çoğalma, çoğalmama, hücre kültür kabına yapışma veya süspansiyon halde kültüre edilme gibi özelliklerine göre medium içerikleri ve kültür koşulları değişiklik göstermektedir.

Günümüzde kültürler genellikle hücre süspansiyonları şeklinde yapılmaktadır. Ancak bazı hücreler hücre süspansiyon ortamında yaşamaya pek uygun değildir. Hücrelerin gereksinimleri çeşitlerine göre farklılık gösterdikleri için bazı hücreler kültüre edilirken kültür kaplarının yüzeyleri kollajen ve laminin gibi destekleyici proteinlerle kaplanarak hücrelerin yüzeyde tutunup çoğalması sağlanmaktadır.

Dokulardan elde edilen ilk hücreler ile doğrudan yapılan kültür primer kültür olarak geçmektedir. Daha sonra hücrelerin çoğalması sonucu diğer hücre kültür kaplarına aktarılması sekonder kültür olarak adlandırılmaktadır. Buna aynı zamanda subkültür ya da pasajlama adı da verilmektedir.

Omurgalı hücreleri kültürde sınırlı sayıda bölünebilirken mezenkimal kök hücreler telomeraz enzim aktivitelerinin yüksek olmasından dolayı sınırsız bölünme gerçekleştirebilir (Hiyama ve Hiyama 2007).

Mezenkimal kök hücreler uygun koşullarda dokudan izole edildikten sonra primer kültüre alınır. Daha sonra hücrelerin çoğaltılmasıyla kültür kabından enzim yardımıyla kaldırılır. Tüm hücreler süspansiyon haline geldiğinde hücre sayımı yapılarak gerekli miktarda hücre ekilir ve kalan hücreler dondurulur.

1.5. Doku Mühendisliği Yaklaşımları

Nanoteknoloji, 1-100 nm boyutundaki (nano) maddeleri atomik ve moleküler özelliklerinden faydalanılarak atomik boyutta kontrol etmeyi amaçlar ve bu maddelerin yapısal olarak devre ve sistemlerinin geliştirilmesiyle nanoyapılar tasarlayıp sentezlemeyi ya da nanoyapılara yeni özellikler kazandırmayı içermektedir.

Yirmibirinci yüzyılda nanoteknoloji birçok alanda oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır. Nanomalzemeler tekstil, otomotiv sanayi, ilaç sanayi ve yeni tedavi yöntemleri gibi hemen hemen her alanda fayda sağlanmaktadır (Çakmak, 2011). Özellikle malzemelerin sürtünme, yapışma, suyu sevme ya da sevmeme, biyolojik etkileşimleri gibi yüzey özelliklerinden yararlanılarak doku iskeleleri oluşturulup doku mühendisliği çalışmalarında sıklıkla karşımıza çıkmaktadır.

Doku mühendisliği çalışmalarında yapı iskelesi (scaffold) oluşturmada kullanılan biyomalzemelerin vücut içi (in vivo) ortamda biyobozunmaları ve biyouyumlulukları en önemli özelliklerdendir. Bu biyomalzemelerin sentezi, tasarımı, üretimi ve biyouyumluluğu konularında çok çeşitli çalışmalar yapılmakta ve yeni yöntemler geliştirilmektedir.

Doku mühendisliği, hasarlı ve işlevini kaybetmiş dokuların onarılmasına destek amaçlı o bölgedeki dokuyu fiziksel ve biyolojik olarak taklit eden eşdeğerlerinin geliştirilmesini amaçlar. Bu amaçla kullanılan biyomalzemelerin biyolojik sistemlerle etkileştiğinde uyum sağlayabilmesi için yoğun çaba harcanmaktadır. Aynı zamanda alerjik, toksik ve karsinogenik olmaması, kimyasal açıdan stabil olması, yeterli mekanik kuvvete sahip olması, uygun ağırlık ve yoğunlukta olması, büyük miktarlarda işlenebilme ve fabrikasyon kolaylığı göstermesi, ekonomik olması özelliklerine de dikkat edilmelidir.

Her gün milyonlarca hasta kardiyovasküler hastalıklar, deri yanıkları, ülser, kemik kırıklar ve eklemler, diyabet gibi hastalıklarla mücadele etmektedir. Bu durum hastaların hayat kalitelerini yükseltmek için yeni, acil terapötik stratejilerin geliştirilmesini gerekli kılmaktadır. Terapötik ve yenileyici tedavilerde metaller, seramikler, polimerler, proteinler ve başka bileşikler kullanılmaktadır. Burada önemli olan kullanılan malzemenin biyouyumluluğudur (Fournier ve diğ. 2003).

Polimerlerin çok yönlülük, işlenebilirlik, biyobozunabilirlik gibi özelliklerinden dolayı genellikle medikal cihazların ve implantların yapımında kullanılmaktadır. Proteinler (ör; kollajen, fibrin) ve polisakaritler (ör; kitosan, aljinat, hiyalüronik asit),

poli-L-laktik asit (PLLA), poli-L-glikolik asit (PLGA) ve polikaprolakton (PCL) gibi birçok polimer, biyouyumluluklarından dolayı, çalışmalarda yaygın olarak kullanılan biyomalzemelerdir (Ulery ve diğ. 2011)

1.5.1. Doğal Polimerler

Doğal polimerler mikroorganizma, bitki ve hayvanlar gibi biyolojik sistemler tarafından üretilen polimerlerdir. Doğal polimerlerin yara bandı, absorban, hazır kozmetikler, ilaç salınımı ve yapı iskelesi tasarımı gibi birçok kullanım alanı vardır (Malafaya ve diğ. 2007, Shanmugamve diğ. 2005). Fakat bu polimerlerin bazı avantaj ve dezavantajları vardır. Konak doku ile benzer olması, biyolojik sistemler ile iletişime geçmesi, metabolik uyumluluk, toksik olmaması, düşük inflamatuvar reaksiyon ve enzimler tarafından sindirilebilme gibi avantajları vardır. Bununla birlikte, sıcaklık hassasiyeti, doğal polimerlerin erime noktasına erişmeden bozulması ve karmaşık yapılarının işlem görmesini zorlaştırması gibi dezavantajları bulunmaktadır. Doğal polimerlerin hayvan, bitki veya başka canlı türleri gibi kaynaklardan elde ediliyor olması, insanlara hastalık geçişi ihtimalini artırmaktadır. Bu da doğal polimer için bilinen bir diğer dezavantajdır (Sonia ve Sharma 2012).

Kollajen ve jelatin en sık kullanılan protein kaynaklı polimerlerdendir. Kollajen hayvanlarda hücre dışı matriks bileşenidir ve yapısal olarak alfa olarak adlandırılan 3 çeşit polipeptit zincir bileşiminden oluşur (Myllyharju 2003). Kollajenin biyobozunma, vücutta ki enzimler tarafından kolayca sindirilebilme, biyouyumluluk ve hücre yapışmasını destekleme gibi özellikleri vardır (Lynnve diğ. 2004, Malafaya ve diğ. 2007) Hayvanların deri, tendon, kıkırdak ve kemiklerinden kollajen elde edilebilir. Tip 1 kollajen insan vücudunda en fazla bulunan kollajen çeşididir. Kollajen genelde fibroblastlar tarafından sentezlenir, kollajen tip 1 ise osteoblast ve odontoblastlar tarafından sentezlenmektedir. Bu yüzden kollajen tip 1'in mezenkimal kök hücreleri osteojenik farklılaşmaya yönlendirdiği bilinmektedir (Salasznyk ve diğ. 2004)

Jelatin hayvan derileri ve kemiklerindeki kollajenin hidrolizi ile elde edilen yarı saydam katı ve renksiz bir maddedir (Malafaya ve diğ. 2007, Shanmugam ve diğ. 2005). Jelatin kolloid oluşturur suda ise jel şeklini alır. Jelatinin birçok kimyasal özelliği kollajene benzer, aynı zamanda kollajen'in mekanik özellikleri gibi jelatin de sıcaklık bağımlıdır (Ross-Murphy 1992). Jelatinin tıp alanında ilaç salınım sistemleri (Olsenve diğ.2003), ilaç kapsül kılıfları (Digenisve diğ. 1994), hücre kültürü (PaguiriganveBeebe 2006), ve doku

mühendisliği yapı iskelesi hazırlanması gibi uygulamaları vardır ve doku mühendisliği alanında yaygın olarak kullanılmaktadır.

1.5.2. Sentetik polimerler

Doğal polimerlere ek olarak sentetik polimerler de doku mühendisliğinde kök hücre farklılaştırmasında kullanılmaktadır. Sentetik polimerler yüksek saflık, yeniden oluşturabilme, kontrol edilebilir kimyasal yapıları ve mekanik özelliklerinden dolayı çokça tercih edilmektedirler. Sentetik polimerler monomerlerin polimerizasyonu ile elde edilirler. Poliglikolik asit, polilaktik asit, polikaprolakton gibi sentetik polimerler doku mühendisliğinde sıklıkla kullanılan sentetik polimerlerdendir. Sentetik polimerler çalışma esnekliğine sahiptirler ve hücre dışı matriks proteinleriyle kıyaslandığında immünolojik kaygı barındırmazlar (Liu ve diğ. 2012). Polilaktikasit (PLA) ve Polilaktid-ko-glikolid (PLGA), PLGA-PEG (polietilenglikol) gibi ko-polimer şeklinde de kullanılabilirler. Biyobozunur poliester ailesi kontrol edilebilir biyobozunurluğu, mükemmel biyoyuumluluğu ve yüksek saflığı ile güvenli olarak kabul edilen nadir sentetik biyobozunur bir polimerdir (Eatemadi ve diğ. 2016). Biyoyumlu ve biyobozunur polimerler tarafından üretilmiş gözenekli yapı iskeleleri doku mühendisliği ve yenileyici tıp için hayati öneme sahip olduğundan benzeri uygulamalarda sentetik polimerlere ihtiyaç duyulmaktadır.

1.5.3. Katyonik Polimerler

Polimerik malzemeler arasında katyonik polimerler, negatif yüklü hücre membranı ile etkileşime girebilmekte ve doku mühendisliği uygulamalarında hücre çoğalmasını desteklediklerinden dolayı önem kazanmıştır. Yapı iskelesi ürünleri için genellikle kullanılan katyonik polimerler kitosan, jelatin, dekstran ve poli-etilenimin'dir (Samal ve Dubruel 2015)

Katyonik polimerler pozitif yüklü polielektrolit olarak tanımlanırlar ve hem kitosan gibi doğal kaynaklardan hem de kimyasal olarak sentezlenebilen kaynaklardan türetilirler. Katyonik poliektrolitler biyomedikal uygulamalarda anyonik polimerlere göre daha çok tercih edilirler. Çünkü katyonik polimerler elektrostatik etkileşimle anyonik biyomoleküllerle kompleks oluşturabilir ve hücreler negatif yüklü peptidler, nükleik asitler ve proteinlerle de etkileşime girebilirler. Katyonik polielektrolitlerin bazıları antimikrobiyal, antioksidan, antitümör ve anti enflamatuar özellik gösterirler. Bu

özellikler katyonik polimerlerin terapötik kullanım potansiyellerini artırmaktadır. Katyonik grup taşıyan biyo-bozunur ve biyo-uyumlu polimerlerin ilaç salınımı ve doku mühendisliği gibi biyolojik uygulamalar için önemi bir süredir bilinmektedir. Daha sonra yapılan çalışmalarda polimerlerin katyonik özelliklerinin hücrelerin yapışması gibi hücresele etkileşimlere yardımcı olduğu görülmüştür. Özgül tasarımlar ve yüzey değişiklikleri özellikle işlevsel yüzeyler ve medikal uygulamalar için önemlidir. Yüzey üzerinde ince bir tabaka oluşturmak için tabaka- tabaka (layer by layer) polielektrolit kaplama yöntemi kullanılan yöntemlerden biridir (Samal ve Dubruel 2015). Tabaka tabaka kaplama yöntemi malzemelerin biyouyumluluğunda ve yüzeylerin uygun hale getirilmesi gibi birçok alanda kullanılmaktadır. Biyolojik sistemlerle uyumlu yüzeyler oluşturmak için (implant veya tasarlanmış dokularda) kaplama yaparken yüzeyler peptitler (Müller 2001), DNA (Sukhorukov ve diğ. 1996), polisakkaritler, proteinler (Lvov ve diğ. 1995), nanoparçacıklar (Kotov ve diğ. 1995; Kleinfeld ve Ferguson 1994) ve diğer matriks bileşenleri (Ai ve diğ. 2003; Tang ve diğ. 2006) gibi geniş yelpazeli içeriklerle zenginleştirilir. Bu şekilde bir kaplama hücrenin gerçek mikroçevresini taklit ederek yüzeyde hücrelerin büyümesini sağlar.

Nanoparçacıkların katyonik polimerler ile salınımı ilaç salınımı uygulamaları Son yıllarda nanoparçacık ve taneciklerle ilaç salınımına olan ilgi giderek artmaktadır. Pozitif yüklü nanoparçacıklar, ilaç formüle edilmesinde önemli yardımcı maddeler olarak kullanılmaktadır. Kendiliğinden oluşan bu sistemlerin araştırılmasının önemli olmasının bu nanoparçacıkların pH ve sıcaklık uyarıcılarına cevap vermesidir. Bu sistemler vücudun fizyolojik çevresindeki pH değişimine cevap olarak tetiklenen, pH tetikli cevapların üretilmesi için tasarlanabilir.

Asiditeye duyarlı poli-L-histidin hidrojeller kullanılarak rekombinant adeno virüs aktarım çalışmalarında kullanılmaktadır (Zeng ve diğ. 2012).

Yüzey modifikasyonları özellikle medikal uygulamalarda fonksiyonel yüzeyler oluşturmada kullanıldığından oldukça ilgi çekicidir. Özellikle poli-L-histidine ve poli-L-glutamik asit gibi polimerler tanımlanmış ve fonksiyonel yüzeyler oluşturmada kullanıldığı bilinmektedir. Diğer poliaminoasit kompozisyonlarında görüldüğü gibi poli-L-histidin ve poli-L-glutamik asit polimerlerinin tabaka tabaka (layer by layer) kaplama yöntemiyle silikon tabakalar üzerinde ince bir katman oluşturulması sürekli kaplama sağlamaktadır (Vinzenz ve diğ. 2012).

Gen transferinde viral ve viral olmayan çeşitli vektör sistemleri kullanılmaktadır ve her biri kendine özgü avantaj ve dezavantajlara sahiptir. Viral olmayan gen tedavileri, plazmid DNA'nın hücre çekirdeğine iletebilmesi ve orada genin ifade olmasını amaçlar. Fakat gen aktarımının terapötik tedavilerde kullanımında bazı engeller vardır. Bu yüzden transfeksiyon verimi için gen aktarımında kullanılan gerekli yeni taşıyıcıların geliştirilmesi gerekmektedir. Yeni tasarlanan gen dağıtım araçlarındaki sorunlardan biri, plazmid DNA'nın hedef hücreye iletilmemesidir (Benns ve Kim, 2000; Choi ve diğ. 1998). Gen ifadesindeki verim konusundaki diğer sorun ise transfeksiyondan sonra, DNA'nın endozomal hücre içeriklerinden sitoplazmaya salınmamasıdır (Mulligan, 1993). Günümüzde en etkili gen aktarım araçları, genlerini hedef hücreye aktarma özellikleri nedeniyle, virüslerdir (Özcan, 2007). Fakat viral vektörlerin bazı dezavantajları vardır; örneğin retrovirüs bölünmeyen hücreleri enfekte edemez, adenovirüs olumsuz immünolojik yanıt gösterir, herpesvirüsün sitotoksik etkisi vardır ve adeno-ilişkili virüs kısıtlı yabancı genetik materyal taşıyabilme kapasitesine sahiptir. Tüm virüslerin ortak dezavantajı genin yanlış bir yere yerleşme tehlikesidir. Bunun nedeni de virüslerin rastgele olarak genoma yerleşmesidir (Rashnonejad ve diğ. 2014). Sağlık açısından hiçbir yan etkisi olmayan sentetik virüsler, araştırmacıların ilgisini, gerçek virüsü fonksiyonel olarak taklit eden, katyonik polimer aracılı gen dağıtım vektörlerine yöneltmiştir. Katyonik polimerler iyonik etkileşimle plazmidlerle kompleks (proplex) oluştururlar (Wadhwa ve diğ. 1995). Poli-L-lizin (PLL) gibi katyonik polimerler DNA'yı yoğunlaştırır ve nükleaz saldırılarından korurlar. Fakat PLL DNA'nın endozomal salınımını sağlayamaz. Ancak başka polimerlerin eklenmesiyle PLL ile birlikte çalıştırılabilir. Yapılan çalışmalarda katyonik polimerler olan PLL ve poli-L-histidin'in (PLH) membran füzyon özelliklerinin olduğu gözlemlenmiştir (Uster ve Deamer, 1985). PLL ile uyarılmış füzyon sadece normal fizyolojik durumların dışındaki pH bölgelerinde gerçekleşir. PLH kullanıldığında fizyolojik pH'da zar, membran füzyonu yapar (Benns ve diğ. 2000).

PLH, pH duyarlı bir polipeptid olduğundan gen aktarımı çalışmalarında kullanılmaktadır. Küçük interferans RNA (siRNA) 21 nükleotidli çift zincirli RNA'dan oluşur ve hedef mRNA'ların RISC (RNA induced silencing complex) yardımıyla protein üretimini engelleyerek hücreyi parazitik genlere ve karşı savunmada virüs ve transpozon gen ifadesinde önemli role sahiptir. siRNA salınım sistemlerinde polikasyon/siRNA polikasyon kompleksi oluşumu verimli salınımların tasarlanmasında önemli bir faktördür. siRNA'nın yapısı plazmid ve DNA'ya göre kısa olduğundan siRNA ve zıt yüklü

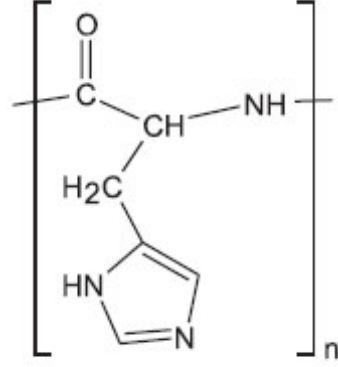
polikasyonlar arasındaki poli-iyon kompleksleri fizyolojik durumlarda stabiliteyi azaltmaktadır. Bu yüzden polikasyon/siRNA poli-iyon kompleksleri başarılı bir siRNA teslimi için gereklidir. Histidine (imidazol grup içeren) ile muamele edilen (modifiye edilen) polikasyonlar endozomal kaçış mekanizması olan ‘proton sünger’ mekanizmasına sahiptirler. Poli-L-histidin yüksek oranda katyonik yükü bulunan ve etkin gen aktarımı sağlayan bir polimerdir (Asayama ve diğ. 2012).

Poli-L-histidin (Çizim 1.1) yapısında imidazol halkası içeren sentetik bir poliaminoasittir ve nötr pKa’ya sahiptir. (Harris, 2001). Bu da histidin hücre içinde lokal pH değerindeki çok küçük değişikliklere duyarlı olmasına olanak sağlar.

İmidazol halkası doymamış nitrojende yalnız elektron çifti içerir bunu amfoterik doğasından dolayı poli-L-histidin’e verir. Moleküler ağırlığı 10,000 g/mol’den yüksek olan polimerler suda çözünabilir özelliğe sahiptirler ve protonasyondan dolayı pH değerleri 6,0’dır. Yapısına proton aldığımda poli-L-histidin anyonik yağlarla parçacıklar oluşturur bu da metal bağlayıcı özellik gösterir (General ve Thunemann, 2001; Mccurdie ve Belfiore, 1999).

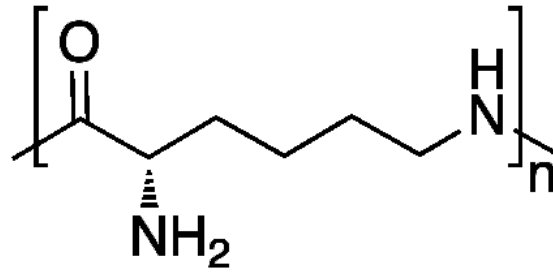
Son zamanlarda poli-L-histidin’in füzojenik aktivitesi (lizozom ve endozom gibi asidik hücre alt bölümlerinin zarlarını parçalaması) ile viral olmayan gen aktarım taşıyıcılarının tasarlanması dikkat çekici olmuştur. Plazmid DNA’sının kısa poli-L-histidin zinciri ile etkileşime girmesi sonrası oluşan katyonik polimerik taşıyıcıların gen aktarımında kullanılmasıyla aktarım verimini artırdığı gözlemlenmiştir (Mindox ve Monsigny 1999; Putnam ve diğ. 2001). Bu durum, endozomal zarın imidazol grupların proton sünger etkisi (proton-sponge effect) ile bozulduğu ve bunun da DNA/Polimer kompleksinin sitoplazmaya salınımını kolaylaştırdığı şeklinde yorumlanmıştır. Buna ek olarak poli-L-histidin, negatif yüklü zar fosfolipitlerinin etkileşimi sonucu imidazol grupların protonasyonu ile çift tabakalı lipid yapısıyla kaynaşabilmektedir (Wang ve Huang 1984). Fakat poli-L-histidin nötr pH seviyesinde plazmid DNA’sı ile kompleks oluşturamaması ve onun yerine poli-L-lizin kısmen histidil (veya imidazol) grup ile yer değiştirmesi nedeniyle poli-L-histidin’in gen taşıyıcısı olarak kullanılması sınırlıdır. Bu histidil poli-L-Lizin/plazmid DNA kompleksinin in-vitro transfeksiyon verimliliğini artırdığı gözlemlenmiştir (Benns ve diğ. 2000).

Poli-L-histidin farmasötik nanoteknolojide de kullanılmaktadır. Özellikle herseptin konjuge PLGA-PHis-PEG pH duyarlı nanoparçacıklar, hedefli ve kontrollü ilaç salınımında kullanıldığı bilinmektedir (Zhou ve diğ. 2015).

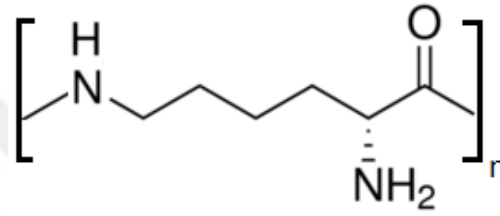


Çizim 1.1.: Poli-L-Histidin'in moleküler yapısı (Bergamini ve diğ. 2009)

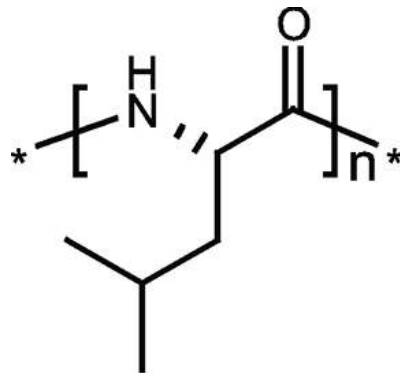
Poli-L-lizin (Çizim 1.2) ve poli-D-lizin (Çizim 1.3), DNA, hücre membranı ve bütün negatif yüklü proteinlere bağlanabilen bir polikasyonik ve sentetik moleküllerdir. Bu yüzden hücre kültür kapları ve cam yüzeyleri kaplama malzemesi olarak kullanılmaktadır (Bottenstein 1977, Jacobson 1977). Hücre membranının negatif iyonları ile elektrostatik etkileşime girdiğinden kültür yüzeylerini kaplamada kullanıldığı bilinmektedir. Cam ve plastik kültür yüzeyi poli-L-lizin ile kaplandığında yüzeyin pozitif yükünü artırır ve hücre bağlanmasını sağlar (McKeehan 1984). Hücre tutunmasını desteklemesinin yanı sıra poli-L-lizin, serum ve hücre dışı matriks proteinlerinin de kültür substratına bağlanmasını sağlar (McKeehan 1984). Poli-L-lizinin hem -L formu hem de -D formu kaplama malzemesi olarak kullanılabilir ve hücreler için non spesifik bir tutunma faktörüdür. Bazı hücre çeşitleri için özellikle PDL tercih edilmelidir. Çünkü PDL, PLL gibi hücrelerden salınan proteazlar tarafından parçalanmaz (Banker ve Goslin, 1991). Fakat bazı hücreler poli-L-lizini sindirebilmektedir. Bu durumda poli-D-lizin kullanılır ve böylece hücrelerin fazla L-Lizin alımı ile parçalanması önlenir. PDL ve PLL sentetik moleküllerdir ve üzerinde kültüre edilen hücrelerin biyolojik aktivitesini uyarmazlar (Ham ve McKeehan, 1979).



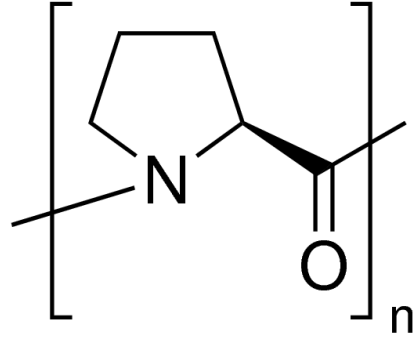
Çizim 1.2.: Poli-L-Lizinin moleküler yapısı



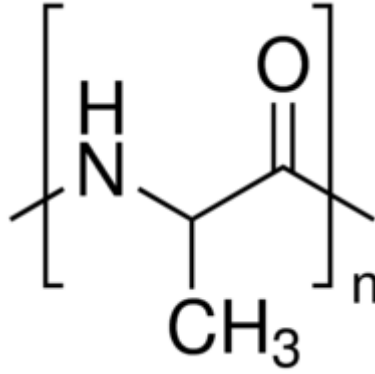
Çizim 1.3.: Poli-D-Lizinin moleküler yapısı



Çizim 1.4.: Poli-L-Lösinin moleküler yapısı [Moleküler formülü: (C₆H₁₁NO)_n]



Çizim 1.5. : Poli-L-Prolinin moleküler yapısı. [Moleküler formülü $(C_5H_9NO_2)_n$]



Çizim 1.6.: Poli-L-Alaninin moleküler yapısı [Moleküler formülü $(C_3H_5NO)_n$]

2. AMAÇ

Kollajen ve jelatin gibi doğal polimerler *in vivo*'da hücre dışı matriks yapısında bulunduğu ve hücreleri desteklediğinden dolayı hücre kültürü çalışmalarında da hücre dışı matriks yapısını karşılamak amacıyla yüzey kaplama malzemesi olarak sıklıkla kullanılmaktadır. Ancak hücreler terapotik amaçla kullanılmak istendiğinde hayvansal kaynaklı proteinler polipeptidler veya polimerler, hayvana ait zararlı virüs ve diğer enfekte edici ajanlar taşıma riskinden dolayı insan çalışmalarında kullanılamamaktadır. Buna ek olarak virüsler ve diğer patojenler hücre kültür koşullarını da olumsuz etkileyebilmektedir.

Bazı sentetik ve kimyasal olarak tanımlanmış yüzeylerin hücre kültüründe hücre adezyonu ve canlılığı gibi hücrenin yaşamsal faaliyetlerini desteklediği ve patojen kontaminasyon riskini ortadan kaldırdığı bilinmektedir. Sentetik polimerler yüzey kalınlığı, sertliği, kimyasal özelliği, şişebilirliği bakımından geniş ve esnek özelliklere sahip olduklarından yüzey kaplama malzemesi olarak doğal polimerlere alternatif olarak hücre kültürü çalışmalarında kullanılmaktadır.

Bu çalışmada hücre kaynağı olarak rejeneratif özelliği yüksek olan mezenkimal kök hücreler ve kaplama malzemesi olarak ta homopoliaminoasitler kullanılmıştır. Homopoliaminoasitlerin yüklülük özelliklerinden yararlanarak hücre membranı ile etkileşimi sonucu kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin canlılık ve çoğalma gibi yaşamsal faaliyetleri üzerine etkisinin araştırılması hedeflenmiştir. Aynı zamanda yüzeylerin mezenkimal kök hücreleri üç germ tabakası kaynaklı hücre çeşitlerine farklılaşmasını destekleyip desteklemediği ve hücre kültürü çalışmalarında yüzey kaplama malzemesi olarak kullanılabilirliğinin keşfedilmesi hedeflenmiştir.

3. YÖNTEM

3.1. Kemik İliği Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin Kültürü

Bu çalışmada daha önceden elde edilen GFP (Green fluorescent protein) geni aktarılmış pasaj 3-5'teki sıçan kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücreler kullanılmıştır. Bu çalışmada kullanılan hücreler Kök Hücre ve Gen Tedavileri Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde bulunan hücre stoğundan temin edilmiştir. Bu hücrelerin karakterizasyonu yapılmış ve mezenkimal kök hücre özelliklerini taşıdığı gösterilmiştir (Karaoz ve diğ. 2012). Kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin izolasyonu için etik kurul kararı (14.06.2011 tarihli KOÜ HADYEK 6/4-2011 no.lu karar) daha önceden alınmıştır.

İlk olarak kriyo dondurucuda saklanmış hücreler gerekli işlemler yapılarak çözüldükten sonra içerisinde %10 fetal sığır serumu (FBS) , %1 penisilin-streptomisin, ve alpha-MEM (Çizelge 3.1) bulunan kültür besiyeri ile T175 kültür kabına ekim yapıldı.

Hücreler kültür kabında %80 oranında çoğaldıklarında %0,25 tripsin-EDTA ile kaldırıldı ve tripsin/besiyeri karışımından 1:1 oranında tripan mavisini ile karıştırılarak Thoma Lamında sayım yapıldı. Hücreler bu şekilde pasajlanıp yeterli sayıda hücre elde edilinceye kadar kültüre edildi. Hücrelerin morfolojileri günlük olarak mikroskop altında takip edildi.

Çizelge 3.1.: Hücre kültürde kullanılan Alpha MEM besiyeri içeriği

Alpha MEM Eagle İçeriği	Hacim	Katalog Numarası
L-Glutamin	500 mL	P04-21500
Ribonükleositler		
Deoksiribonükleositler		
2,2 g/L NaHCO ₃		

3.2. Homo-polimerlerin Hazırlanması

Hücre membranının negatif yüklü olmasından yararlanılarak pozitif ve negatif yüklü homo-polimerlerin elektrostatik etkileşim ile hücrelerin polimer kaplı yüzeylere yapışması

amaçlandığından poli-aminoasit kaynaklı homo-polimer olan poli-L-lizin (Sigma), poli-D-lizin (Sigma), poli-L-prolin (Santa Cruz), poli-L-histidin (Santa Cruz), poli-L-alanin (Santa Cruz), poli-L-glutamik asit (Santa Cruz), poli-L-lösin (Santa Cruz) belirli konsantrasyonlarda hazırlanarak cam yüzeyler kaplandı ve bu homo-polimerlerin mezenkimal kök hücreler üzerine etkisi araştırıldı. Pozitif kontrol olarak hayvansal kaynaklı sıçankuyruğu kollajeni olan kollajen tip1 (Sigma) kullanıldı, negatif kontrol olarak ta yüzeyi hiçbir polimer ya da protein ile kaplanmamış cam yüzey (lamel) kullanıldı.

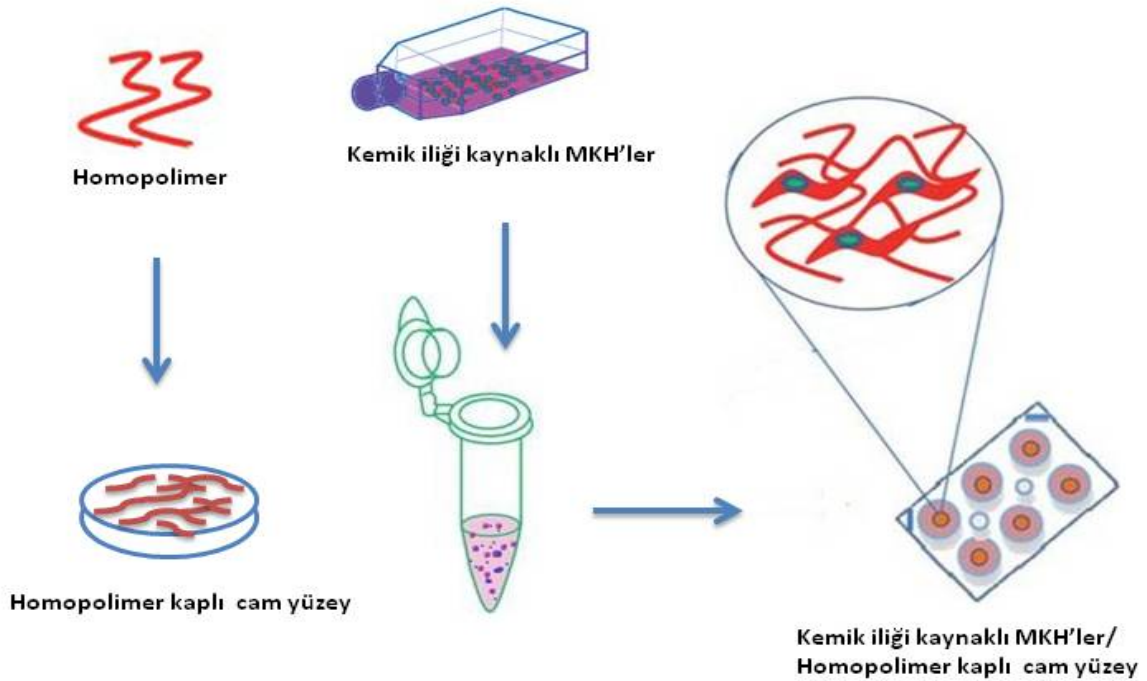
Poli-L-lizin ve poli-D-lizin hariç diğer polimerler daha önce hücre kültürü çalışmalarında kullanılmadığından, bu polimerlerin konsantrasyonları literatürlerde yer alan poli-D-lizin'nin konsantrasyonuna göre belirlenerek, bütün polimerler eşit konsantrasyonda kullanıldı (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2.: Hücre kültüründe kullanılan homo-polimerlerin yüzey kaplama konsantrasyonları ve deney grup çizelgesi

Homo-Polimer	Konsantrasyon	Kullanımı
Poli-L-Lizin	1 µg/mL	Stoktan 125 µL
Poli-D-Lizin	100 µg/mL	Stok: 200 µg/mL 1:1 oranında distile su ile dilüe edilerek kullanılır
Poli-L-Prolin	100 µg/mL	Stok: 1000 µg/mL 1:10 distile su ile dilüe edildi
Poli-L-Histidin	100 µg/mL	Stok: 200 µg/mL 1:1 oranında (1:1 N,N-dimetil formamid : distile su) ile dilüe edildi
Poli-L-Lösin	100 µg/mL	Stok: 200 µg/mL 1:1 oranında etil alkol ile dilüe edilerek kullanılır
Poli-L-Alanin	100 µg/mL	Stok: 200 µg/mL 1:1 oranında etil alkol ile dilüe edilerek kullanılır
Poli-L-Glutamik asit	100 µg/mL	Stok: 200 µg/mL 1:1 oranında kloroform ile dilüe edilerek kullanılır.
Kollajen Tip-1	1000X'lik Kollajen T1'den	1:50 oranında PBS ile dilüe edilerek kullanılır.

3.3. Kültür Kaplarının Homo-polimerler ile Kaplanması

Yüzeylerin kaplanması için ilk olarak kültür kaplarına cam lameller yerleştirildi ve belirlenen konsantrasyonlarda (Çizelge 3.2) poli-L-lizin (Sigma), poli-D-lizin (Sigma), poli-L-prolin (Santa Cruz), poli-L- histidin (Santa Cruz), poli-L-alanin (Santa Cruz), poli-L-glutamik asit (Santa Cruz), poli-L-lösin (Santa Cruz) homo-polimerleriyle ve kollajen tip 1 ile kaplanarak gece boyu 37 °C 'de inkubatörde bekletilerek yüzeylerin kaplanması gerçekleştirildi (Çizim 3.1) 16 saat sonra homo-polimerler çekilerek fosfat tampon (PBS) ile yıkama işleminden sonra hücre ekimi yapıldı.



Çizim 3.1. : Kültür kaplarındaki cam yüzeylerin homopolimerlerle kaplanması ve hücre ekimi şematik görüntüsü

3.4. Mezenkimal Kök Hücrelerin Homopolimer Kaplı Yüzeylerde Kültürünün Canlılık Testi

Kültür kaplarına cam lameller yerleştirilerek belirtilen konsantrasyonlarda (Çizelge 3.2) poli-L-lizin (Sigma), poli-D-lizin (Sigma), poli-L-prolin (Santa Cruz), poli-L- histidin (Santa Cruz), poli-L-alanin (Santa Cruz), poli-L-glutamik asit (Santa Cruz), poli-L-lösin

(Santa Cruz) homo-polimerleriyle ve kollajen tip 1 ile kaplandıktan sonra hücre ekimi yapıldı. Hücreler 24 saat boyunca 37°C 'de, %5 CO₂'li inkübatörde kültüre edildikten sonra FDA-PI (Floresan diasetat-Propidyum iyodür) boyaması yapıldı. FDA-PI boyaması için 420 µl PI (7 mg/100 mL Hank's; P-4170-10 Sigma Aldrich, ABD), 280 µl FDA (1mg/100 mL aseton, Life Technologies, ABD) ve 9,3 ml Hank's karışımı hazırlandı ve 24 saat boyunca inkübe edilen hücrelerin üzerine bu karışımdan 250 µl olacak şekilde eklendi. 20 dakika oda sıcaklığında karanlıkta bekletildikten sonra FDA-PI kuyucuklardan çekildi ve kuyucuklar 2 kez PBS (Fosfat tampon çözeltisi) ile yıkandı. Son olarak kuyucuklara tekrar 250 µl PBS (Fosfat tampon çözeltisi) koyularak floresan mikroskopta incelendi. Floresan mikroskoptaki incelemelerde FDA pozitif hücreler yeşil (canlı), PI pozitif hücreler kırmızı (ölü) olarak izlendi.

Propidyum iyodür canlı hücrelerin plazma membranına girmeyerek boyanma gözlemlenmez. Fakat hasar görmüş hücrelerin membranına girerek intraselüler nükleik asidi boyaması ve böylece floresanda kırmızı ışığa verir. Canlı hücreler ise mavi ışık altında FDA yeşil floresan ışığa yaparak hücre canlılığını gösterir.

3.5. Homo-Polimerlerin Mezenkimal Kök Hücrelere Toksik Etkisinin Belirlenmesi

Laktodehidrogenaz (LDH), intraselüler bir enzimdir ve sadece hücre membranında bulunur. Membran bütünlüğü zarar gördüğünde hasar görmüş hücrelerden hızlıca salınırlar. Bundan dolayı yüksek laktatdehidrogenaz salınımı hücrelerin kültür ortamında canlılıklarının kaybını ya da zarar gördüklerini gösterir. Toksikite testi homo-polimerlerin hücreler üzerindeki toksik etkisini belirlemek için yapılmıştır. Bunun için laktodehidrogenaz (LDH) aktivitesi ölçülmüştür. Bu da Roche Applied Science Cytotoxicity Detection Kit Plus kullanılarak yapılmıştır. 24 saat boyunca canlılık testi için kültüre edilen hücrelerin besiyerlerinden 50 µl alınarak 96 kuyucuklu kültür kaplarına koyuldu, üzerlerine substrat ve katalizör içeren 50 µl reaksiyon karışımı eklendi. 20 dakika 37 °C'de inkübe edildikten sonra 50 µl durdurma solüsyonu eklenerek reaksiyon durduruldu. Daha sonra spektrofotometrede 490 nm dalga boyunda absorbans ölçümü yapıldı.

3.6. Farklı Homo-polimerler üzerinde Kemik İliği Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerinin Çoğalma ve Adezyon Özelliklerinin Ölçülmesi

Homo-polimerlerin mezenkimal kök hücrelerin çoğalımı ve adezyonu üzerindeki etkilerini belirlemek amacıyla WST-1 (water soluble tetrazolium salt) analizi gerçekleştirildi. Homo-polimerlerle kaplanmış cam yüzeylere ekilen hücrelerin çoğalmalarını incelemek için kültürün 0., 2. ve 4.günlerinde, adezyonlarının ölçülmesi için de hücrelerin ekiminden 30 dakika ve 6 saat sonra WST-1 analizi yapıldı.

Yöntemin prensibi kısaca canlı hücrelerdeki mitokondriyal dehidrogenaz hücre sel enzimiyle WST-1 yapısındaki tetrazolyum tuzları formazan kristallerine dönüşmektedir. Canlı hücre sayısındaki artışa bağlı olarak hücrelerde bulunan mitokondriyal dehidrogenaz aktivitesinde de artış olur ve bu da formazan kristallerinin miktarını artırarak renk değişimi gözlemlenir. Oluşan formazan kristallerinin (boyanın) miktarındaki artış metabolik olarak aktif hücre sayısı ile doğru orantılıdır.

WST-1 analizi için 24 kuyucuklu hücre kültür kaplarına cam lamel yerleştirildi ve daha sonra yüzeyler homo-polimerler ile kaplandı. Her bir kuyucuğa $1,5 \times 10^4$ hücre olacak şekilde ekim yapılarak %10 fetal sığır serumu (FBS) , %1 penicilin-streptomycin, ve alpha-MEM içeren kültür besiyeri ile hücreler kültüre edildi. Kültürün 0., 2. ve 4. günlerinde kuyucuklardaki besiyeri çekildi ve kuyucuklara WST-1 solüsyonu eklendi. 2 saat boyunca $37\text{ }^\circ\text{C}$ 'de inkübe edildikten sonra kuyucuklardaki WST-1 solüsyonları 96 kuyucuklu kültür kaplarına alındı ve oluşan koyu renkli formazan kristallerinin absorbansı mikroparka okuyucuda 450 nm 'de okutulmuş olarak ölçüldü. Aynı işlem hücre ekiminden 30 dakika ve 6 saat sonra hücrelerin yapışması ölçümü için tekrarlandı.

3.7. Homo-Polimerlerin MKH'lerin Morfolojileri Üzerine Etsinin İncelenmesi

Homo-polimerlerin mezenkimal kök hücrelerin morfolojileri üzerindeki etkilerini belirlemek amacıyla Phalloidin-FITC (Sigma-Aldrich) boyaması yapılmıştır. Phalloidin *Amanita Phalloides*'dan elde edilen fungal toksindir. Phalloidin sadece polimerik ve oligomerik haldeki aktine bağlandığı monomerik aktine bağlanmadığı gözlenmiştir. Phalloidin hücrelerde aktin filamentlerine (F-aktin) bağlanır ve floresan doğasından dolayı mikroskop altında ışımaya verir. Bu özelliklerinden yararlanılarak hücre iskeletinde bulunan F-aktinlerin boyanarak hücre morfolojisi hakkında bilgi elde edilmesi hedeflenmiştir. Bunun için homo-polimerlerle kaplanmış cam yüzeylere ekilen hücreler 48 saat boyunca

inkübatörde (%5 CO₂'li) bekletildi. Ardından kültür mediumu çekilerek hücreler fikse edildi. Fiksasyon aşamasında hücreler PBS (Fosfat tampon çözeltisi) ile iki kez yıkandı. Ardından 4%'lük paraformaldehid solüsyonunda 5 dakika karanlıkta bekletildi. Daha sonra tekrar PBS ile yıkanarak %0,5 Triton-X içerisinde 5 dakika inkübe edildi. Bu işlemde sonra 0,5 mg/ml stok Phalloidin-FITC saf DMSO'da çözüldü. Çözünmüş olan stok Phalloidin (50µM), 1:10 oranında %1 DMSO içeren PBS ile seyreltildi ve daha sonra hücreler 50µg/ml floresan phalloidin ile boyandı. 40 dakika inkübasyondan sonra hücreler 3 kez PBS ile yıkandı. Daha sonra lameller nükleus boyası DAPI (4' -6- Diamidino -2-fenilindol) UltraCruz Mounting Medium ile kapatılarak floresan mikroskopta (Leica DMI 4000B Microsystems) görüntüleme yapıldı.

3.8. Homopolimer Kaplı Yüzeylerde Kimyasal Uyarım ile Hücrelerin Adipojenik ve Osteojenik Farklılaşmaya Yönlendirilmesi

Mezenkimal kök hücrelerin farklılaştırılmasında dikkat edilmesi gereken en önemli unsurlardan biri farklılaştırılmak istenen hücre kaynağına giden yolların ölçülü bir şekilde uyarılmasıdır. Bu çalışmanın farklılaştırma aşamasında homopolimerlerle kaplı yüzeylerde kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin adipojenik ve osteojenik farklılaşma potansiyellerinin karşılaştırılması hedeflenmiştir. Kontrol grubu olarak kaplanmamış cam yüzey kullanılmıştır. İlk olarak 6 kuyucuklu hücre kültür kaplarına cam lameller yerleştirildi ve daha sonra yüzeyler Çizelge 3.2' de belirtilmiş olan konsantrasyonlarda homopolimerle 2 tekrar olacak şekilde kaplandı. Hücreler, kaplanmış yüzeylere kuyucuk başına 1×10^5 hücre olacak şekilde ekilerek %10 FBS (Gibco) %1 penisilin streptomisin (Gibco) ve alpha MEM (PAN Biotech) içeren kültür besiyerinde 24 saat 37°C'de kültüre edildi. Hücrelerin yoğunluğu ışık mikroskopunda gözlemlendi. Her bir kuyucuktaki hücre yoğunluğu %80-90'a ulaştığında standart kültür besiyeri kuyucuklardan çekilerek ve yerine 0,5mM IBMX (3-izobütil-1-metilksantin), 1µm dekzametazon (Fluka), 200µM indometazin, 10 µl insülin (25mM) (Sigma-Aldrich), %10 FBS, %1 penisilin streptomisin ve alpha MEM içeren adipojenik farklılaştırma besiyeri ve 10 mM β-gliserofosfat, 0,05mM askorbat-2-fosfat, 10⁻⁸dexamethasone (Fluka), %10 FBS, %1 penisilin streptomisin ve alpha MEM içeren osteojenik farklılaştırma besiyeri kuyucuk başına 2 ml olacak şekilde eklendi. Kontrol grubu hücrelerine standart %10 FBS, %1 penisilin streptomisin ve Alpha MEM içeren besiyeri eklendi. Daha sonra 2 günde bir besiyeri değişimi yapılarak hücreler 21 gün boyunca 37°C'de kültüre edildi. Hücrelerin farklılaştığı mikroskobik olarak gözlemlendiğinde gruplandırılmış kuyucuklardaki hücreler

immünohistokimyasal analizler için uygun koşullar altında fikse edildi. Fiksasyon yapılmamış gruplardaki hücreler % 0,25 Tripsin-EDTA (Gibco) enzimi ile kaldırılarak gen ifadelerine bakıldı.

3.8.1 Adipojenik Farklılaştırma Sonrası Hücrelerin Fiksasyonu ve Oil Red-O Boyaması

Adipojenik farklılaştırmaya alınan hücreler kültürün 21. gününde fikse edildi. Hücreler üzerinden kültür besiyeri çekilerek PBS ile 1 kez yıkandı. Daha sonra %4 paraformaldehid kullanılarak hücreler 30 dakika boyunca oda sıcaklığında fikse edildi. Ardından tekrar PBS ve distile su ile yıkandıktan sonra %60 izopropanol'de 5 dakika bekletildi.

Boyanın hazırlanması aşamasında ilk olarak Oil Red O izopropanol içerisinde çözüldü. Hazırlanan bu çözelti 3:2 (Oil Red O: distile su) oranında distile su ile seyreltilerek boyama işleminde kullanıldı.

3.8.2 Osteojenik Farklılaştırmaya Alınmış Hücrelerin Fiksasyonu ve Alizarin Red S Boyaması

Alizarin red hazırlama aşamasında ilk olarak Alizarin Red S (Fluka) distile su içerisinde çözüldü. Ardından pH sodyum hidroksit ile pH 4,1'e getirildi. Osteojenik farklılaştırmaya alınan hücreler kültürün 21. gününde fikse edildi. Hücreler 1 kez PBS ile yıkandıktan sonra %70 alkol ile 5 dakika oda ısısında fikse edildi. Distile su ile yıka işleminden sonra hazırlanan Alizarin Red S boyasında 45 saniye bekletildi. Daha sonra üzerinde fikse edilmiş ve boyanmış hücrelerin bulunduğu lameller sırasıyla aseton, ksilen+aseton, ksilen serilerinden geçirildi ve daha sonra lameller kurutularak ışık mikroskobunda görüntülendi.

3.9. Farklılaşma Sonrası Hücrelerde Gen İfadesi Analizi

Farklı homopolimerlerin hücrelerin foksasyonlarına olan etkisini gözlemlemek amacıyla Real Time PCR (Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu) ile hücrelerin gen ifadeleri incelendi. Farklı homopolimerler üzerinde adipojenik farklılaştırma besiyeriyle 21 gün boyunca kültüre edilen hücrelerde adipojenik farklılaşma belirteci olan PPAR- γ ve referans gen olarak β -actin genlerinin ifadelerine, aynı şekilde osteojenik farklılaşma besiyerinde kültüre edilen hücrelerde osteojenik farklılaşma belirteci olan Osteonectin,

Runx2 ve referans gen olarak β -actin'in gen ifade seviyelerine bakıldı. Kontrol grubu hücrelerinde farklı homopolimerlerle kaplı yüzeylerin mezenkimal kök hücreleri kendiliğinden farklılaşmaya gidip gitmediğini veya hangi yöne farklılaştığını gözlemlemek amacıyla 11 genin ifadesine bakıldı. Adipojenik belirteç PPAR γ , osteojenik belirteç Osteonectin ve Runx2, miyojenik belirteç MyoD1 (Myogenic Differentiation 1), kondrojenik belirteç Kollajen tip-2 ve Sox9, endokrin belirteç Ins-1 ve Gcg (Glukagon), hepatosit belirteci HNF4- α , apoptoz belirteci NF- κ B, referans gen olarak β -actin geninin ifadelerine bakılmıştır (Çizelge 3.3). Daha sonra Cp değerlerine göre hesaplamalar yapılarak grafikler oluşturulmuş ve yüzeyler karşılaştırılmıştır.

Homopolimer kaplı yüzeylerde adipojenik farklılaştırma, osteojenik farklılaştırma ve kontrol grubu hücreleri kültürün 21. gününde tripsin ile kaldırılarak RNA izolasyon kiti (High Pure RNA Isolation Kit, Roche) kullanılmış ve RNA izolasyonu yapılmıştır. İzole edilen RNA örneklerinde cDNA sentezi yapıldı. cDNA eldesi için cDNA sentez kiti (RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit, Thermo Scientific) kullanıldı. Real Time PCR cihazındaki (Lightcycler 480, Roche) sıcaklık ayarlamaları şu şekilde belirlendi; enzim aktivasyonu için 95°C'de 10 dk, denaturasyon 95°C'de 30 saniye, bağlanma için 55°C'de 30 saniye ve 60°C'de 1 dakika uzama şeklinde 45 siklus (döngü) uygulandı.

3.10. İstatistiksel Yöntem

Deneysel çalışmalar en az üç kez tekrar edilmiş olup elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak analiz edilmiştir. Araştırmadan elde edilen veriler Kruskal-Wallis ve Wilcoxon İşaretili Sıralar testleri ile analiz edilmiştir. Örneklerin karşılaştırılması sonucu P değeri 0,05'ten küçük ($P < 0,05$) olması durumunda karşılaştırılan gruplar arasında farkın istatistiksel açıdan anlamlı olarak yorumlanmıştır.

Çizelge 3.3.: Çalışmada kullanılan genler ve primer dizileri

GEN	PRİMER DİZİSİ
Adiponectin	ATGCTACTGTTGCAAGCGCT
	GTGATACATGTAAGCGGCTTCTC
PPAR	GAAGACATCCCGTTCACAAGA
	GTGGATCCGACAGTTAAGATCA
Osteonectin	GGAAGCTGCAGAAGAGATGG
	TGCACACCTTTTCAAACCTCG
Runx2	GCCGGAATGATGAGAACTA
	TTGGGGAGGATTTGTGAAGA
Sox9	AGGAGAACACGTTCCCAAG
	GTTGTGCAGATGCGGGTACT
Collagen II	GCCACGGTCCTACAATGTCA
	TGCAAAGTTTCCTCCACCAA
MyoD1	GACTTCTATGATGATCCGTGTTTC
	ATGCCATCAGAGCAGTTGGA
HNF4a	GAGCTAGCAGAGATGAGCCG
	GAGAGTCATACTGCCGGTCG
Gcg	GAGAAGGATCCATCAGCATGT
	GGTGAAAGGCCGAGGAAG
NF-kB	AGAGAAGCACAGATAACCACTAAG
	CAGCCTCATAGAAGCCATCC
Ins-1	CCAGTTGGTAGAGGGAGCAG
	GACCTTGGCACTGGAGGTT
B-actin	AGAGAAGCTGTGCTATGTTG
	GTACTCCTGCTTGCTGATCC

4. BULGULAR

4.1 Kemik İliği Kaynaklı mezenkimal Kök Hücrelerin Kültürü

Daha önceden KÖGEM laboratuvarlarında izole edilip karakterizasyonları yapılmış GFP⁺ kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücreler çözülerek çoğaltılmak amacıyla kültür kaplarına ekildi. Hücreler yeterli sayıya ulaşıncaya kadar 3 günde bir pasaj gerçekleştirildi. Bu süre zarfında hücre morfolojileri ışık mikroskobu ile görüntülendi.

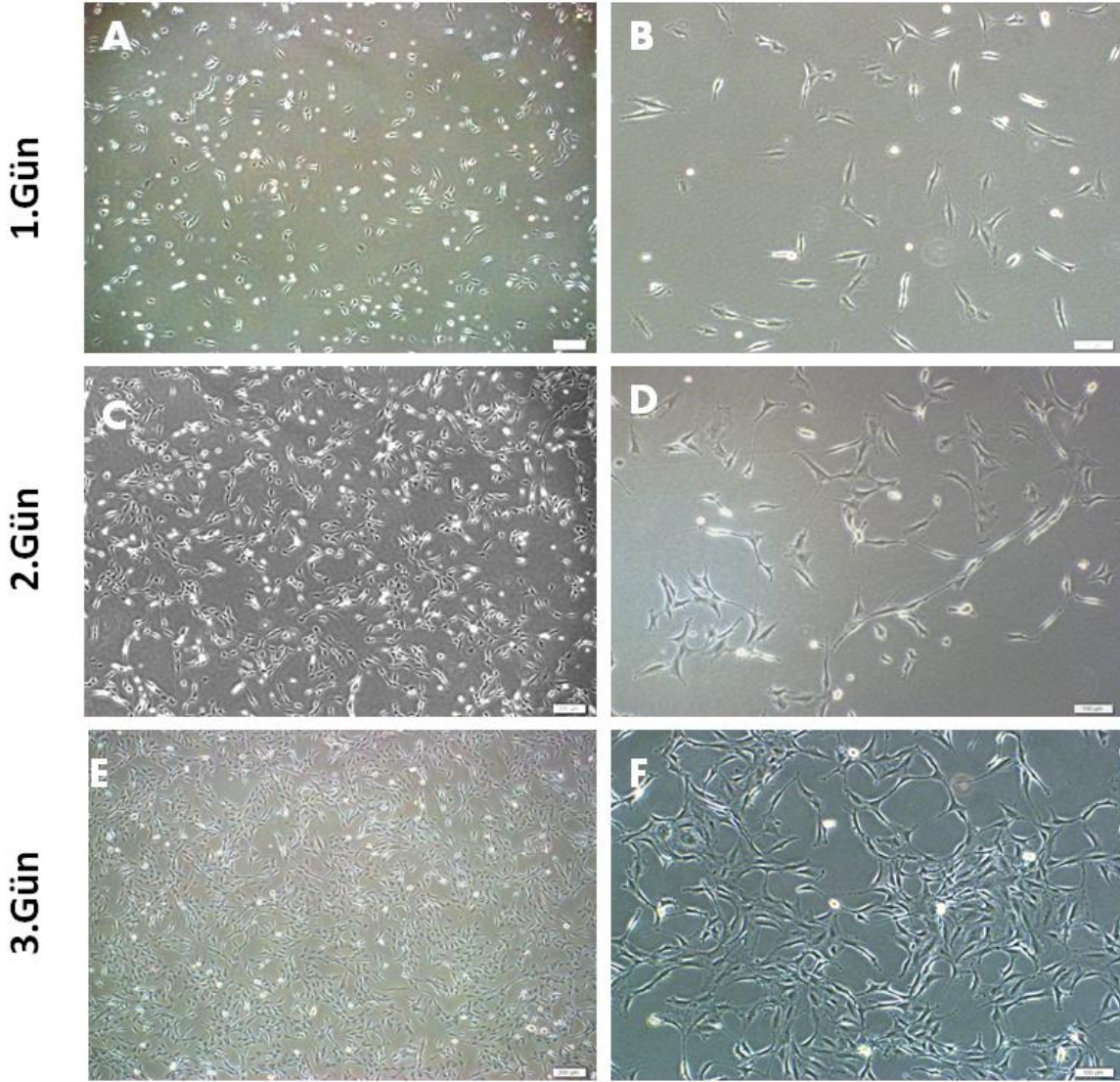
Hücrelerin ekimi sonrasında %70-90 oranında hücrelerin canlı olarak kültür kabının yüzeyine yapıştığı gözlemlendi. Hücrelerin çoğalması ilk günlerde yavaş iken ilerleyen zamanda hücre çoğalması hızlandı ve pasaj sonrasında aynı hızda devam etti. İlk pasaj sonrasında hücrelerin plastik kültür kabının yüzeyinde ince uzun iğsi yapıda hücre morfolojisi gösterdiği gözlemlenmiştir (Çizim 4.1).

Hücreler ekildikten sonra %10 FBS 'nin etkisiyle 6 saat içerisinde yüzeye yapıştıkları dikkat çekmiştir. Hücreler çoğalırken kendi aralarında bağlantı kurduğu ancak yoğun tek koloni oluşumu göstermediği görüldü. Kültür ortamındaki hücrelerin görünümü, bu kültürün homojen olduğu, diğer bir deyişle hücreler arasında görünüm olarak bir fark göstermedikleri gözlemlendi.

4.2. Homopolimer Kaplı Yüzeylerin Hücrelerin Canlılık, Adezyon, Çoğalma ve Morfolojilerine olan Etkisi

4.2.1. WST-1 Analizi ile Hücre Canlılığının ve Adezyonun Ölçülmesi

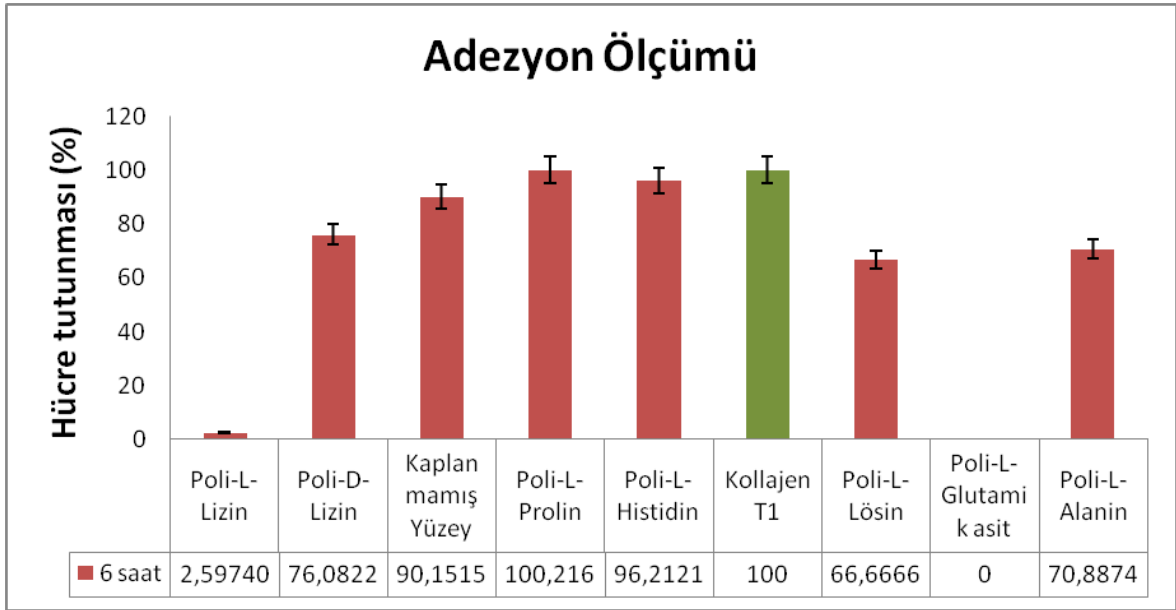
Mezenkimal kök hücrelerin belirli konsantrasyonlarda (Çizelge 3.2) homopolimerlerle kaplı yüzeylerde kültürlerinin çoğalma ve adezyonlarına olan etkisini belirlemek amacıyla WST-1 analizi yapıldı. Bunun için hücreler homopolimerlerle kaplı yüzeylere ekildi ve kültürün ilk 30 dakika ve 6 saat sonrasında WST-1 deneyi gerçekleştirildi.



Çizim 4.1.: Kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin kültürünün morfolojik görüntüleri. Pasaj 4' teki mezenkimal kök hücrelerin kültürün 1.,2. ve 3. günlerindeki morfolojik görüntüleri (Ölçüm çubukları: A, C, E, 200 µm; B, D, F 100 µm).

Homopolimerlerle kaplı yüzeylerden mezenkimal kök hücrelerin adezyonunu en çok destekleyen polimerin poli-L-prolin olduğu belirlendi. Yapılan hesaplamalarda hücre tutunmasının poli-D-lizin, -L-histidin ve kollajen tip1 için de belirgin ($p>0,05$) olduğu görüldü (Çizim 4.2). Poli-D-lizin, poli-L-lösin ve poli-L-alanin kaplı yüzeylerdeki adezyon miktarlarının benzer olduğu ancak poli-L-prolin ve -L-histidin kadar iyi olmadığı gözlemlendi (Çizim 4.2). Herhangi bir polimerle kaplanmamış cam yüzeydeki hücre adezyon oranının %90 olduğu belirlenmiştir. Diğer yandan kollajen tip1 kaplı yüzeye göre poli-L-lizin, poli-D-lizin, poli-L-lösin ve poli-L-glutamik asit kaplı yüzeyler arasında

anlamli bir fark ($p \leq 0,05$) olduğu gözlemlenmiştir (Çizim 4.2). Bu ölçümlerde poli-L-lizin ve –L-glutamik asitin hücre tutunmasını desteklemediği görüldü.

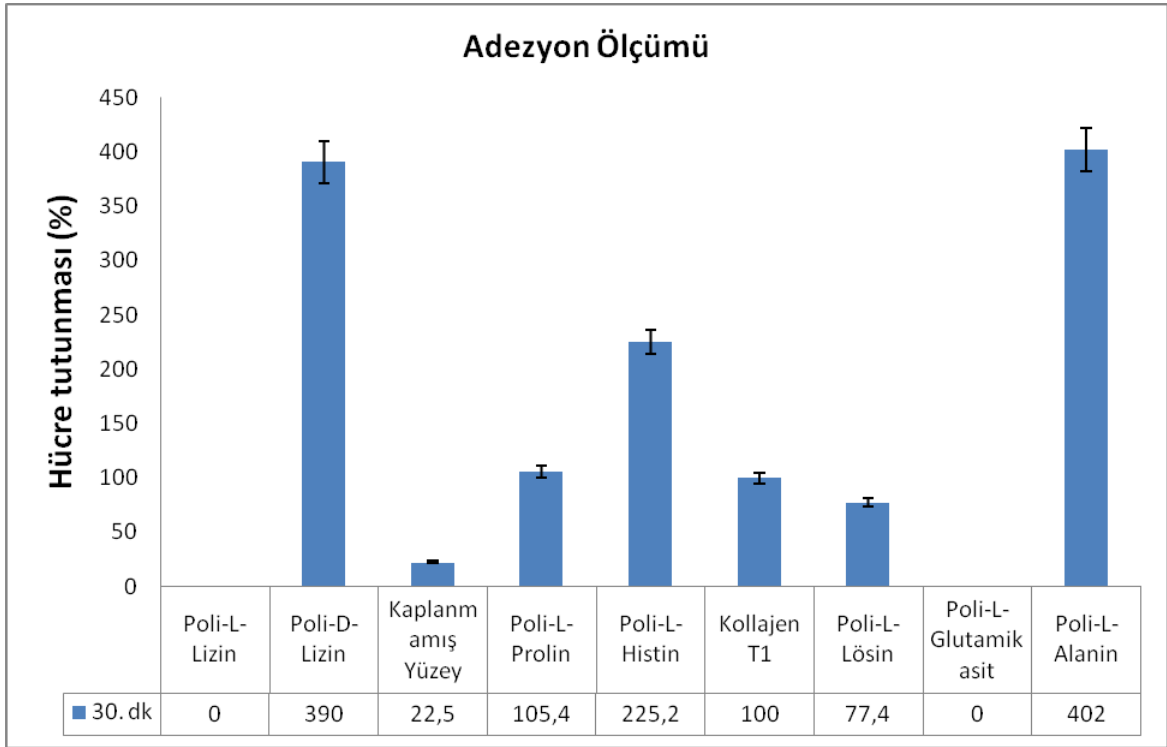


Çizim 4.2.: Farklı yüzeyler üzerinde kültüre edilen hücrelerin adezyonu. Aynı konsantrasyonlardaki farklı homopolimerlerle kaplı yüzeylerde 6 saat boyunca kültüre edilen kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin adezyon tayini.

İlk anda hücre tutunma oranları farklı olsa da 6 saat sonra yapılan adezyon ölçümünde poli-L-prolin, L-histidin ve kollajen tip 1 kaplı yüzeylerdeki hücrelerin tutunma oranları benzer seviyeye geldiği görüldü (Çizim 4.2).

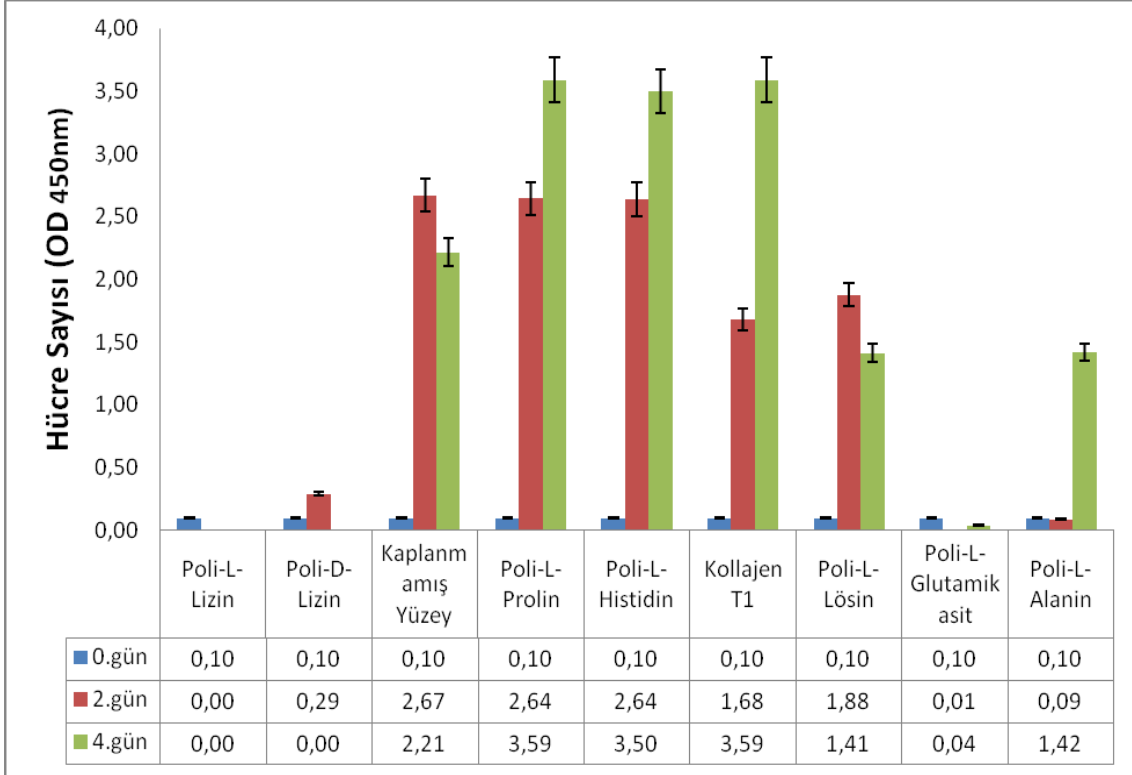
Homopolimer kaplı yüzeylerde hücrelerin ekildiği andaki tutunma oranlarını gözlemek amacıyla hücre ekildin sonra 30 dakika sonra WST-1analizi yapıldı ve elde ettiğimiz gözlemlere göre hücrelerin ilk ekildiğindeki hücre kabına tutunma oranlarının birbirinden farklı olduğu sonucuna varıldı (Çizim 4.3).

Poli-L-lizin ve poli-L-glutamik asit kaplı yüzeylerdeki hücrelerde kültürün ilk saatlerinde tutunma gözlemlenmedi. Poli-L-lizin pozitif yüklü bir polimer olmasına rağmen tutunmanın gerçekleşmemesi beklenmedik bir sonuç oldu (Çizim 4.3). Poli-L-glutamik asit negatif yüklü bir polimer olduğundan ilk anda hücrelerin tutunmaması beklenen bir sonuçtu. 6 saat sonra yapılan WST-1 analizinde de poli-L-glutamik asit kaplı yüzeyde hücre tutunması gözlemlenmedi (Çizim 4.2). Kollajen Tip1 kaplı yüzeye göre kıyaslandığında poli-D-lizin, poli-L-histidin ve L-alanin kaplı yüzeylerde hücre tutunma oranının çok yüksek olduğu görüldü. Poli-L-prolin ve L-lösin kaplı yüzeyin tutunma oranı kollajen tip 1 kaplı yüzey ile benzer olduğu belirlendi. (Çizim 4.3)



Çizim 4.3.: Farklı yüzeyler üzerinde kültüre edilen hücrelerin adezyonu. Aynı konsantrasyonlardaki farklı homopolimerlerle kaplı yüzeylerde 30 dakika boyunca kültüre edilen kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin adezyon tayini.

Farklı yüzeyler üzerinde hücrelerin çoğalması incelendiğinde yüzeylerin hücreleri çok farklı oranlarda etkilendiği belirlendi (Çizim 4.4). İlk gün (0. gün) eşit sayıda hücre ekimi gerçekleştirildi ve 48 saat (2 gün) sonra 6 yüzey üzerinde hücrelerin çoğaldığı gözlemlendi. Poli-L-lizin ve -L-glutamik asit yüzeyi üzerinde hücre sayılarının azaldığı ve poli-L-alanin üzerinde hücrelerin çoğalmadığı gözlemlendi. Ancak poli-L-alanin kaplı yüzeyler üzerinde 96 saat (4 gün) sonra hücre çoğalmasının hızlandığı görüldü. Cam yüzey üzerinde hücre çoğalmasına rağmen 4. gün yapılan ölçümlerde hücrelerin çoğalmadığı ve hatta sayılarının düştüğü gözlemlendi. Benzer durumun poli-L-lösinde de gerçekleştiği belirlenmiştir. Çoğalmayı en iyi destekleyen homo-polimer yapıları poli-L-prolin ve -L-histidin olmuştur. 2. gün sonrasında kolajen kaplı yüzeye göre çok hızlı hücre çoğalması görülürken 4. güne gelindiğinde hücre çoğalmalarının kolajen kaplı yüzeyler ile yaklaşık aynı olduğu görüldü. Poli-L-lizin ve poli-L-glutamik asit kaplı yüzeylerde 0., 2. ve 4. günlerde yapılan WST-1 testi sonucu hücre çoğalması gözlemlenmedi (Çizim 4.4).

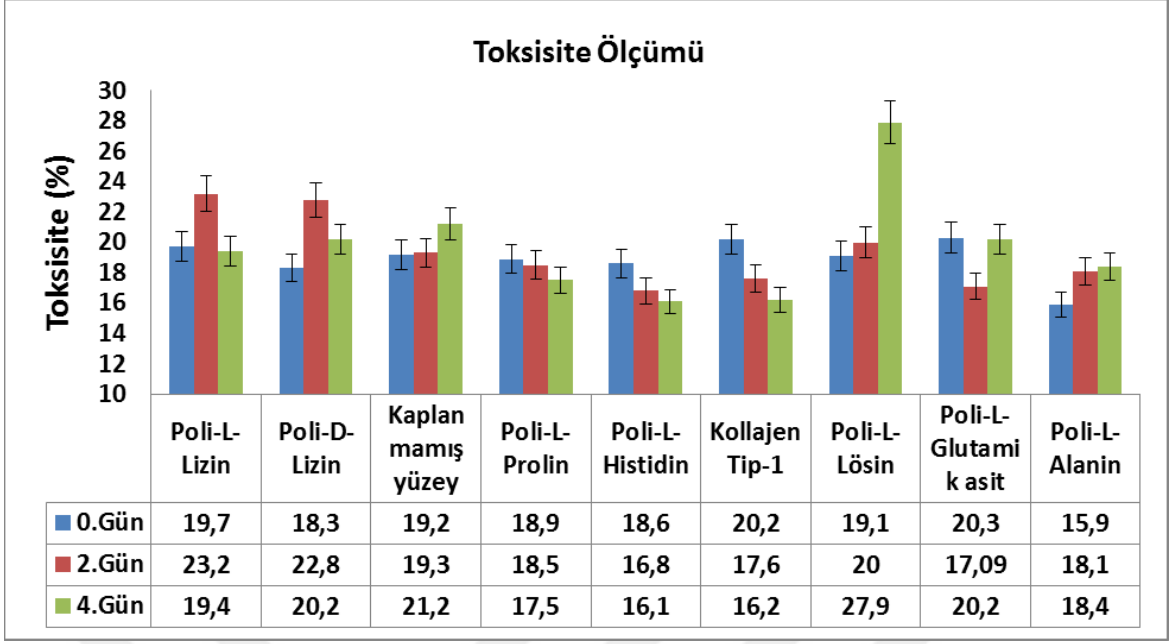


Çizim 4.4. : Yüzeyler üzerinde hücrelerin çoğalma analizi. WST-1 analizi ile hücrelerin farklı polimerler üzerinde çoğalma verileri optik soğurma (450 nm) değerleri cinsinden verilmiştir.

Mezenkimal kök hücrelerin homopolimerlerle kaplı yüzeylerde 0, 2 ve 4 gün boyunca kültürlere edilmelerinin ardından, homopolimer kaplı yüzeylerin hücrelerin çoğalma verimleri incelendi (Çizim 4.4). Gün bazında hücrelerin kolajen yüzeyler üzerinde çoğalması diğer yüzeyler ile karşılaştırıldı. 2. gün sonunda poli-L-prolin ve -L-histidin kaplı yüzeylerde çoğalma verimleri kolajen tip 1 kaplı yüzeye göre 1,6 katına yakın olduğu gözlemlendi. Ancak önceleri yüksek de olsa 96 saat sonra çoğalma verimleri kolajen yüzeyler ile aynı olduğu hesaplandı.

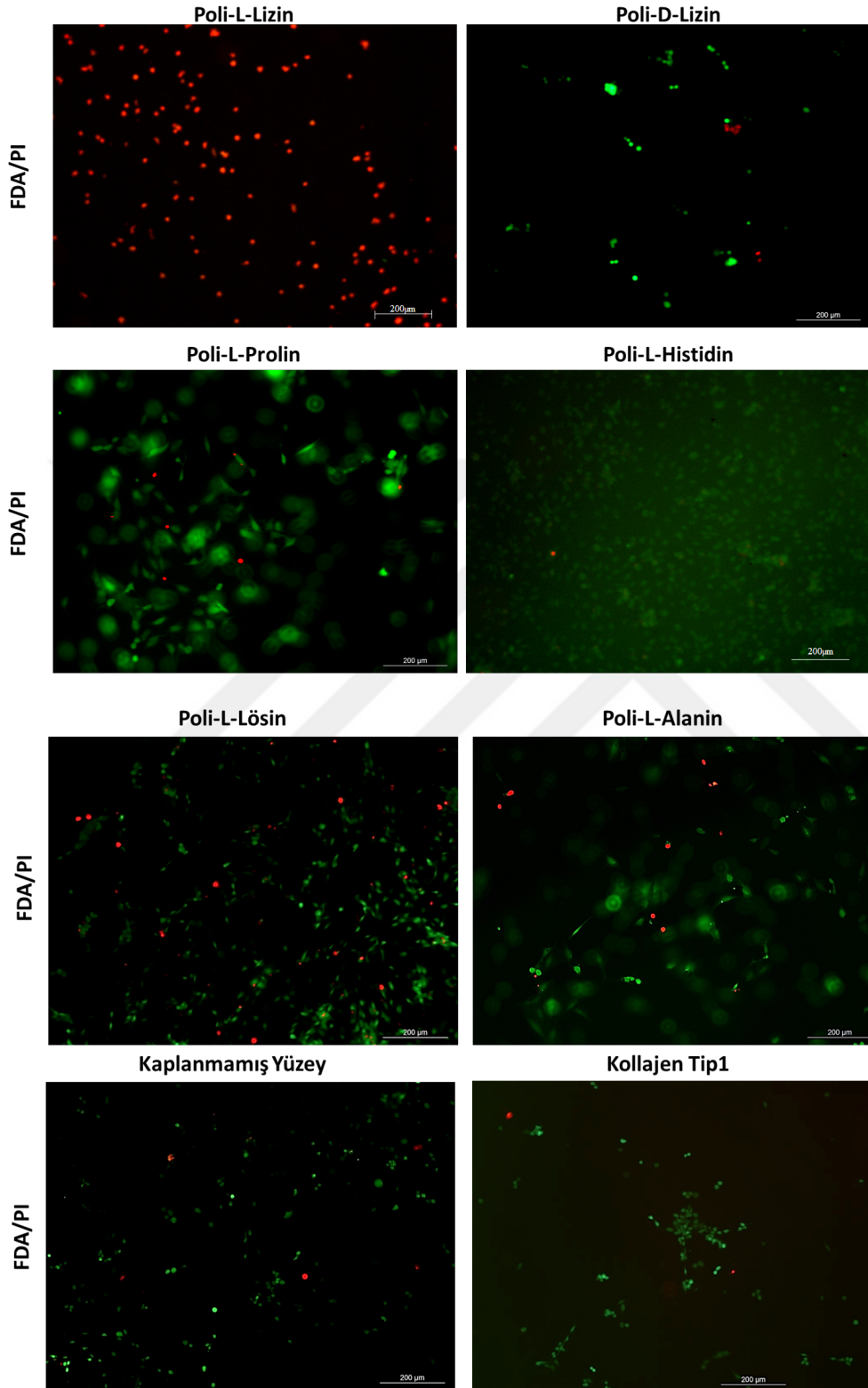
4.2.2. LDH Aktivitesinin Ölçülmesi

Homopolimerlerle kaplı yüzeylerin hücreler üzerinde toksik etkisinin belirlenmesi amacıyla hücre kültür süpernatantlarından LDH aktivitesi ölçümü yapıldı. Yapılan deney sonucunda yüzeylerin hücreler üzerinde %16 ile %28 oranında hücre dejenerasyonu gözlemlendi. Kollajen tip1 ve cam yüzey ile kıyaslandığında diğer yüzeylerin hücreler üzerinde ciddi bir toksik etkisinin olmadığı sonucuna varıldı. Ancak poli-L-lösin kaplı cam yüzeyin 4. günde toksisitesi diğer yüzeylere göre arttı (Çizim 4.5).



Çizim 4.5. : LDH aktivitesinin ölçülmesi. Farklı homopolimerlerle kaplı cam yüzeylerde kültüre edilen mezenkimal kök hücrelerin süpernatantından ölçülen LDH aktivitesi ölçümü ile toksisitenin belirlenmesi.

4.2.3. FDA/PI Boyaması ile Hücre Canlılığının Görüntülenmesi

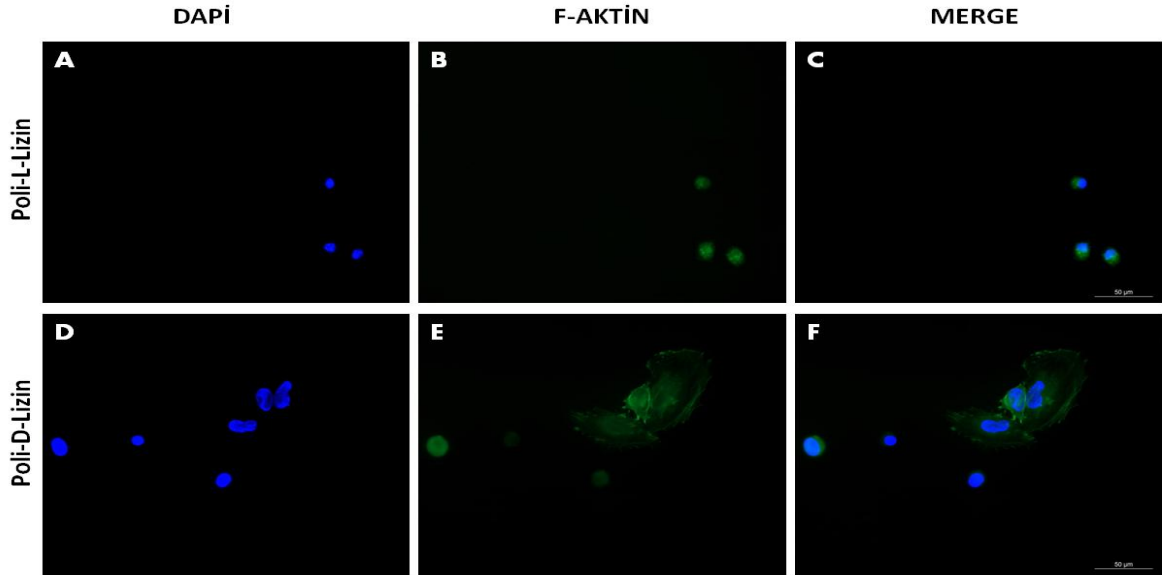


Çizim 4.6.: Hücre canlılığının FDA/PI boyaması ile gösterilmesi. Homopolimerler ile kaplı cam yüzeylerin hücrelerin canlılığına olan etkisinin FDA/PI boyaması ile görüntülenmiştir. FDA (canlı-yeşil) ve PI (ölu-kırmızı) boyamaları hücrelerin yüzeylere gösterdikleri tepkiyi ortaya koymaktadır. (Ölçüm çubukları: 200µm)

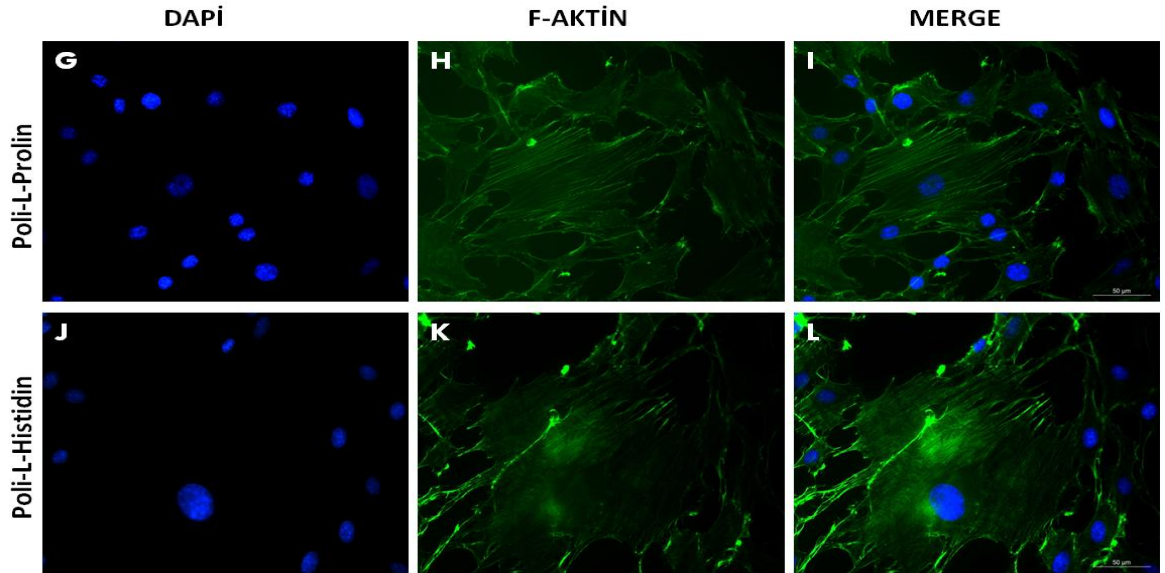
Farklı homopolimerlerle kaplı cam yüzeylerde kültüre edilen mezenkimal kök hücrelerin canlılık testi için, FDA-PI (Floresan diasetat-Propidyum iyodür) floresan boyamaları gerçekleştirildi. Floresan mikroskoptaki incelemelerde FDA pozitif hücreler yeşil (canlı), PI pozitif hücreler kırmızı (ölü) olarak izlendi (Çizim 4.6). Poli-L-lizin kaplı yüzeyin hücre canlılığını desteklemediği gözlemlendi. Poli-L-histidin kaplı yüzeyin hücre canlılığını çok iyi hatta kolajen kaplı yüzeyden bile daha kuvvetli hücre canlılığı sağladığı 24 saat sonraki deneylerle ortaya konmuştur. Diğer yüzeyler üzerindeki hücrelerin canlılık oranları birbirleri ile benzerlik göstermektedir (Çizim 4.6).

4.2.4. Phalloidin FITC Boyaması ile Hücre Morfolojilerinin Görüntülenmesi

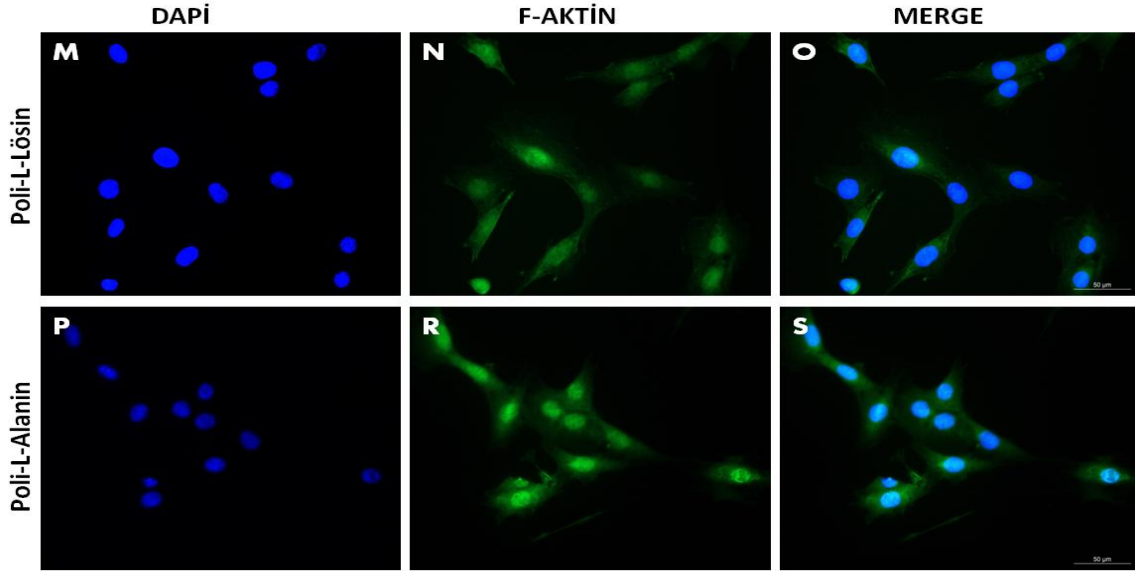
Farklı homopolimerlerle kaplı cam yüzeylerde 48 saat boyunca kültüre edilen mezenkimal kök hücrelerin morfolojilerini gözlemek amacıyla phalloidin FITC boyaması yapılmıştır. Boyama sonucunda Çizim 4.7’de görüldüğü gibi poli-L-Lizin ve poli-D-lizin kaplı yüzeylerde kültüre edilen hücrelerin hücre iskeleti aktin filamentlerinde bozulmalar olduğu ve hücre stoplazmalarının kollajen tip 1 kaplı yüzeye göre küçüldüğü gözlemlendi. Ayrıca tüm yüzeylere ekilen hücre yoğunlukları eşit olmasına rağmen 48 saat sonra hücre yoğunluklarının aynı olmadığı görüldü. Poli-L-lösün ve poli-L-alanin kaplı yüzeylerde kültüre edilen hücreler morfolojik olarak incelendiğinde F- aktin yapılarının belirgin bir şekilde görülmedi (Çizim 4.9). Hücre morfolojilerini en çok destekleyen yüzeylerin kollajen tip1, poli-L-histidin ve poli-L-prolin kaplı yüzeyler olduğu belirlendi (Çizim 4.8 ve 4.10)



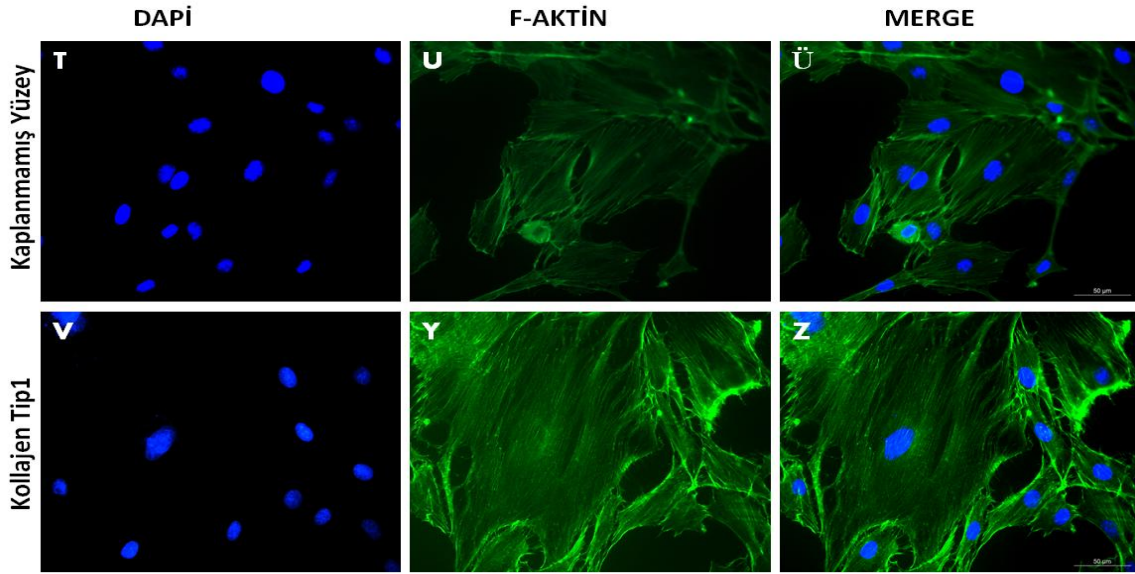
Çizim 4.7.: Poli-L-Lizin ve Poli-D-Lizin kaplı yüzeylerdeki hücre morfolojilerini gösteren Phalloidin boyaması. Poli-L-Lizin ve Poli-D-Lizin kaplı cam yüzeylerde 48 saat boyunca kültüre edilerek F-aktin (yeşil) yapılarındaki değişim gözlemlendi. Hücre çekirdekleri DAPI (mavi) ile boyanarak gösterildi. (Ölçüm çubukları: A, B, C, D, E ve F 50 μm)



Çizim 4.8.: Poli-L-Prolin ve poli-L-Histidin kaplı yüzeylerdeki hücre morfolojilerini gösteren Phalloidin boyaması. Poli-L-prolin ve poli-L-histidin kaplı cam yüzeylerde 48 saat boyunca kültüre edilerek F-aktin (yeşil) yapılarındaki değişim gözlemlendi. Hücre çekirdekleri DAPI (mavi) ile boyanarak gösterildi. (Ölçüm çubukları:50 μm)



Çizim 4.9.: Poli-L-Lösin ve poli-L-Alanin kaplı yüzeylerdeki hücre morfolojilerini gösteren Phalloidin boyaması. Poli-L-Lösin ve poli-L-Alanin kaplı cam yüzeylerde 48 saat boyunca kültüre edilerek F-aktin (yeşil) yapılarındaki değişim gözlemlendi. Hücre çekirdekleri DAPI (mavi) ile boyanarak gösterildi. (Ölçüm çubukları: M,N, O,P,R ve S 50 µm).

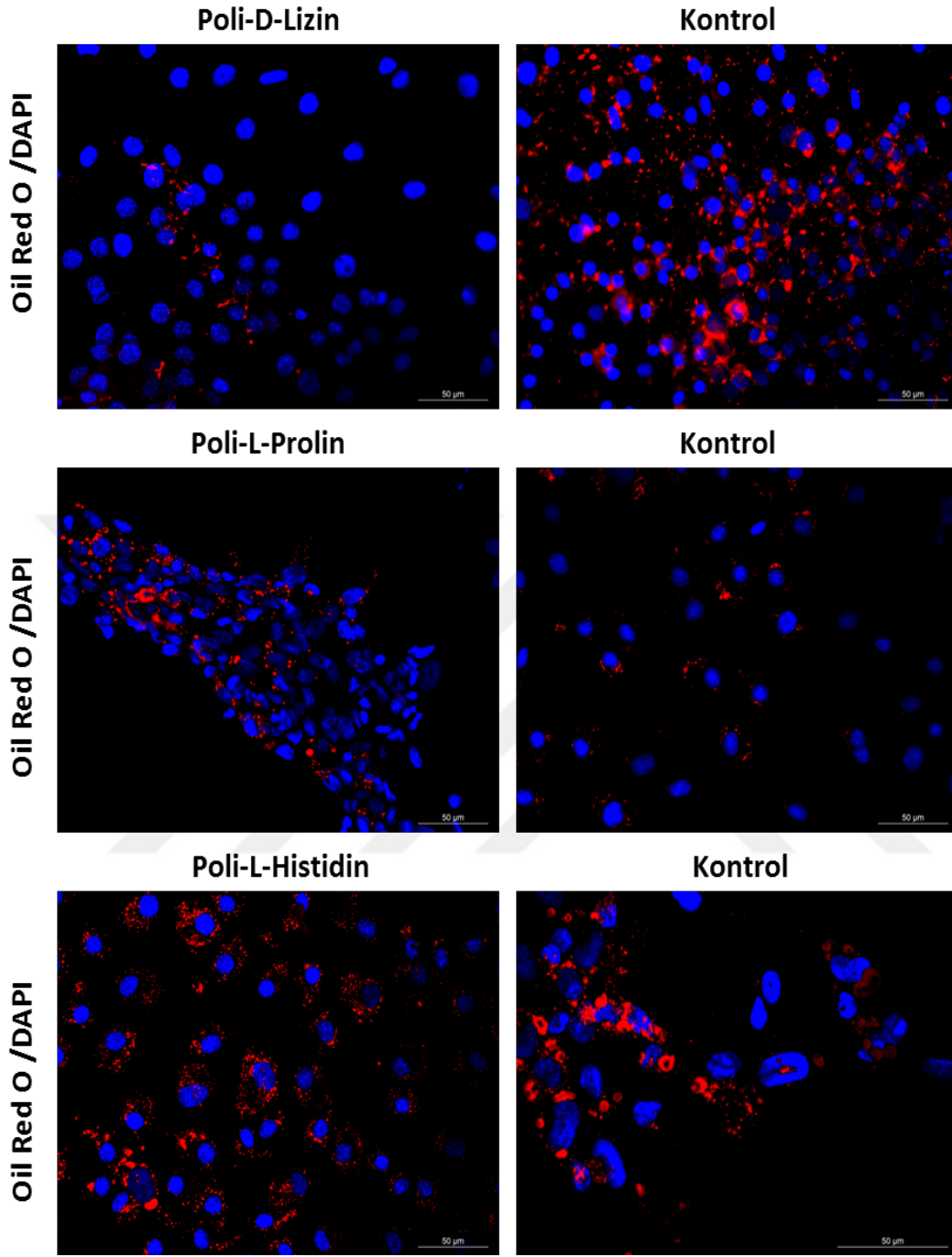


Çizim 4.10.: Kaplanmamış ve kollajen tip-1 kaplı yüzeylerdeki hücre morfolojilerini gösteren Phalloidin boyaması. Kaplanmamış ve kollajen tip-1 kaplı cam yüzeylerde 48 saat boyunca kültüre edilerek F-aktin (yeşil) yapılarındaki değişim gözlemlendi. Hücre çekirdekleri DAPI (mavi) ile boyanarak gösterildi. (Ölçüm çubukları: G, H, I, J, K ve L 50 µm).

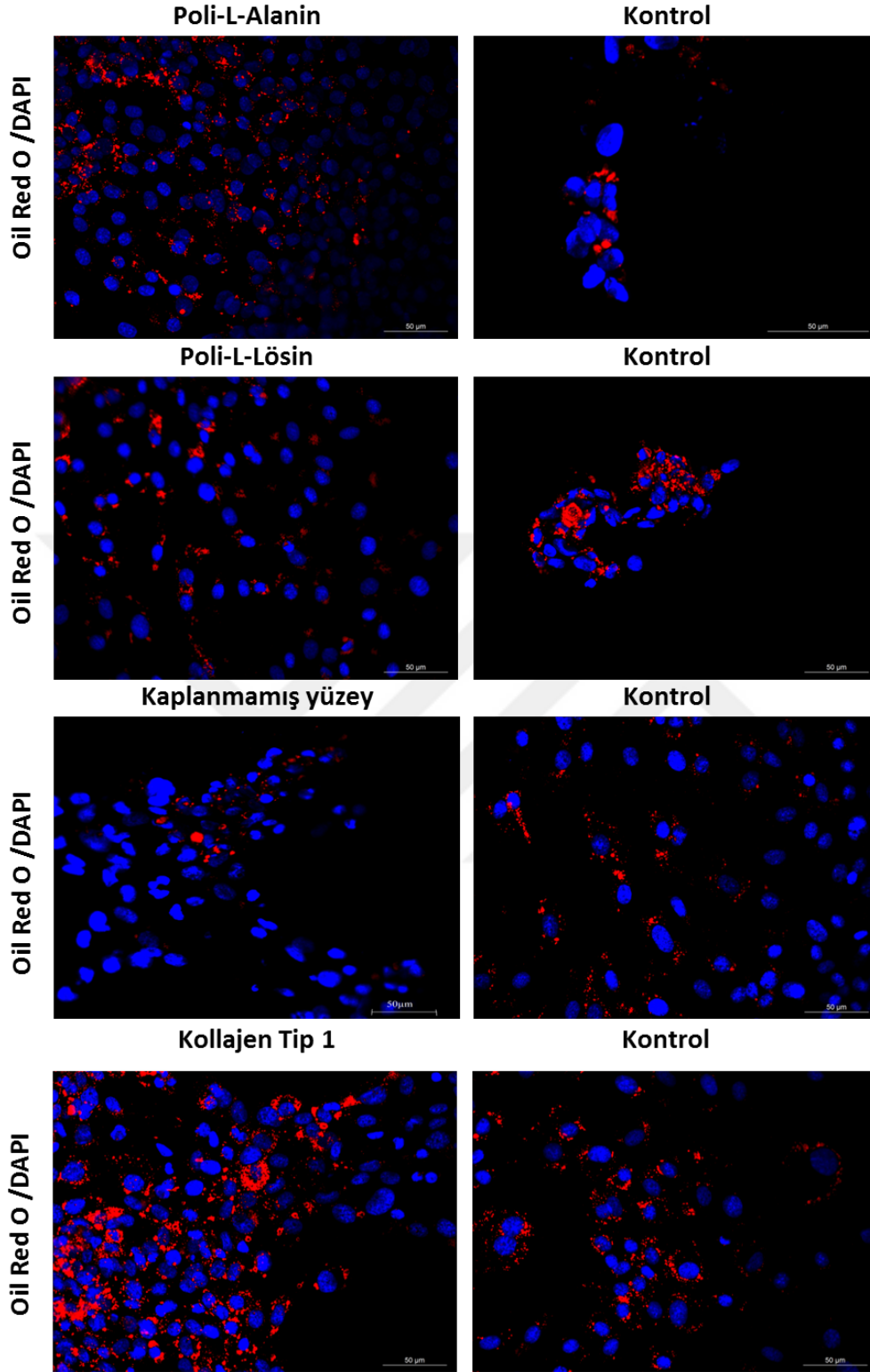
4.3. Homopolimer Kaplı Yüzeylerde Mezenkimal Kök Hücrelerin Adipojenik Farklılaşmaya Yönlendirilmesi

Kimyasal uyarım ile adipojenik farklılaşmaya alınan mezenkimal kök hücreler 21 gün boyunca farklılaştırma besiyerinde kültüre edildi ve 21. gün kültür sonlandırılarak hücreler paraformaldehid ve izopropanol ile fikse edildi. Ardından adipojenik

farklılaştırmayı gözlemleyebilmek için Oil Red O boyaması yapıldı. Kimyasal uyarımla farklılaştırmaya yönlendirilen mezenkimal kök hücreler farklı homopolimerlerle kaplı yüzeylerde farklı oranlarda pozitiflik gösterdi. Poli-L-lizin ile kaplı yüzeylerde kültüre edilen hücrelerde canlılık, çoğalma ve adezyon (Çizim 4.2, 4.4 ve 4.6) analizleri sonucunda mezenkimal kök hücreleri desteklemediği ve farklılaşma için gerekli olan %80-90 hücre yoğunluğuna ulaşamadığı görülmüştür. Bu sebepten ötürü farklılaşma işlemi için gerekli koşulları sağlayamadığı için hücreler farklılaşmaya yönlendirilemedi. Poli-D-lizin kaplı yüzey üzerinde farklılaştırmaya alınan hücrelerin Oil Red O boyaması işleminde adipojenik farklılaşmanın kontrol grubuna göre çok yüksek olmadığı gözlemlendi. Kontrol grubunda farklılaşmanın gözlemlenmesi poli-D-lizin kaplı yüzeyin hücreleri adipojenik farklılaştırmaya yönlendirdiği fakat farklılaşma veriminin çok yüksek olmadığını göstermektedir. Gen ifade analizleri ile PPAR γ gen ifadesinin D-lizin kaplı yüzeydeki hücrelerde çok yüksek olmadığı gösterilmiştir. (Çizim 4.11). Poli-L-prolin, poli-L-histidin, poli-L-lösin ve poli-L-alanin kaplı yüzeylerde farklılaştırmaya alınan hücrelerin Oil Red O boyamasında yağ damlacıkları oldukça belirgin bir şekilde boyanmıştır. Gen ifade analizinde de PPAR γ gen ifadesi yüksek olan bu yüzeylerdeki hücrelerin, homopolimer kaplı yüzeylerde adipojenik farklılaşmaya çok iyi yönlendiği görülmüştür. Kontrol gruplarında da farklılaşmanın gözlemlenmesi bu yüzeylerin hücreleri hiçbir kimyasal uyarım olmaksızın adipojenik farklılaşmaya yönlendirdiği hem gen ifade ile hem de Oil Red O boyaması ile gösterilmiştir. Kollajen Tip1 kaplı yüzey hücreleri adipojenik farklılaşmaya en iyi yönlendiren yüzey olmuştur. Gen ifade analizlerinde de görüldüğü gibi PPAR γ gen ifadesi hem kontrol grubunda hem de kimyasal uyarımla farklılaştırmaya alınan grupta yüksek olarak belirlenmiştir (Çizim 4.11 ve 4.12).



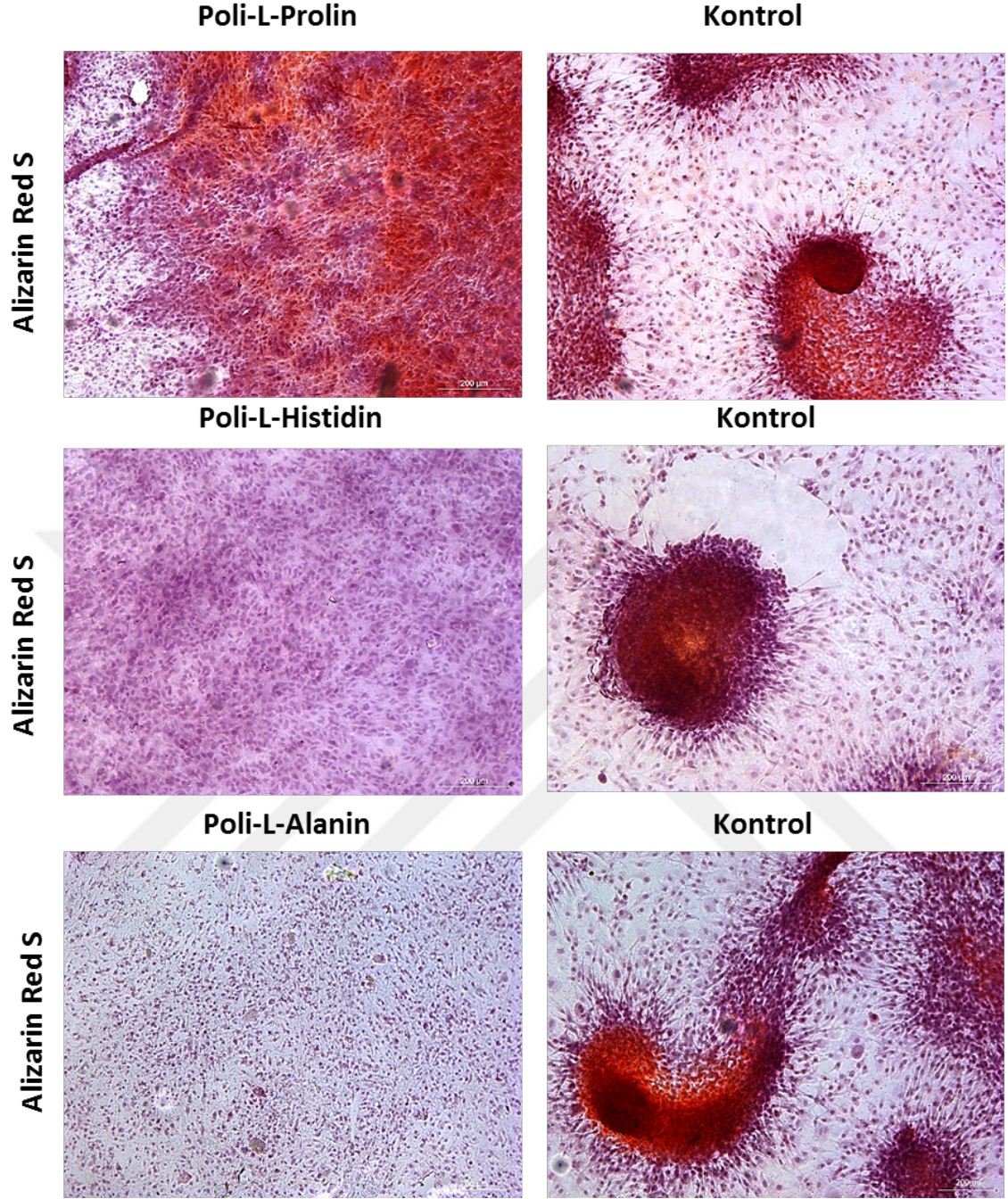
Çizim 4.11.: Poli-D-lizin, Poli-L-prolin ve Poli-L-histidin kaplı yüzeylerde kimyasal uyarımla adipojenik farklılaştırmaya alınan mezenkimal kök hücrelerin Oil-Red-O boyaması ve kontrol grupları (Ölçüm çubuğu: 50µm)



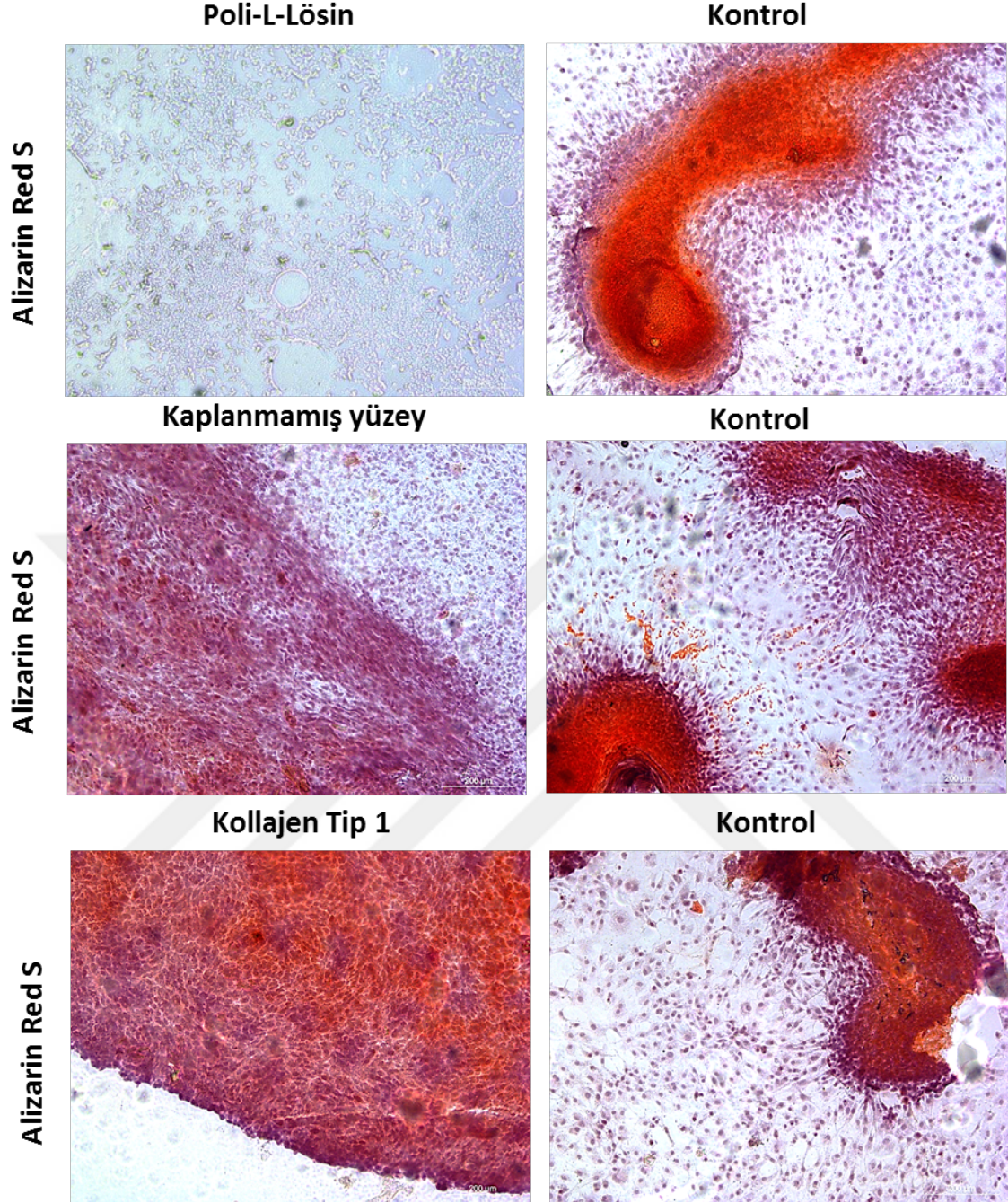
Çizim 4.12.: Poli-L-alanin, Poli-L-lösin, kollajen Tip 1 kaplı ve kaplanmamış cam yüzeyde kimyasal uyarımla adipojenik farklılaştırmaya alınan mezenkimal kök hücrelerin Oil Red O boyaması (Ölçüm çubuğu: 50µm)

4.4. Homopolimer Kaplı Yüzeylerde Mezenkimal Kök Hücrelerin Osteojenik Farklılaştırma Görüntüleri

Farklı homopolimerlerle kaplı yüzeylerde 21 gün boyunca kimyasal uyarımla osteojenik farklılaştırmaya alınan mezenkimal kök hücrelerin osteojenik farklılaştırmaya gittiğini gözlemek amacıyla Alizarin Red S boyaması gerçekleştirildi. Homopolimerle kaplı yüzeyler hücreleri osteojenik farklılaştırmaya farklı oranlarda yönlendirmiştir. Poli-D-lizin kaplı yüzey 21 gün boyunca hücre tutunmasını desteklemeyip, hücreler tabaka şeklinde cam yüzeyden kalkmıştır. Bu sebeple poli-D-lizin kaplı yüzeyde Alizarin Red S boyaması gerçekleştirilememiştir. Poli-L-prolin, poli-L-histidin, poli-L-alanin, kollajen tip 1 kaplı ve kaplanmamış cam yüzeylerde Alizarin Red S boyaması farklı sonuçlar görülmüştür (Çizim 4.13 ve 4.14). Kontrol gruplarındaki hücreler 21 gün boyunca standart kültür besiyerinde kültüre edildi. Farklı homopolimerlerle kaplı yüzeylerde ve kaplanmamış cam yüzeyde hücrelerin kümelenip birbirlerine doğru çekildiği ve hücrelerin üst üste gelecek şekilde toplandığı gözlemlendi (Çizim 4.13 ve 4.14). Kontrol gruplarında da Alizarin Red S boyanmasının pozitif sonuç vermesi, bu yüzeylerin hücreleri osteojenik farklılaşmaya yönlendirdiğini göstermektedir. Gen ifade analizlerinde kontrol gruplarında çok yüksek ifade olmasa da Osteonectin ve Runx2 gen ifadelerine rastlanmıştır (Çizim 4.16)



Çizim 4.13.: Poli-L-prolin, poli-L-histidin ve poli-L-alanin kaplı yüzeylerde kimyasal uyarımla osteojenik farklılaştırmaya alınan mezenkimal kök hücrelerin Alizarin Red S boyaması (Ölçüm çubukları: 200µm)



Çizim 4.14.: Poli-L-lösin, kollajen Tip 1 kaplı ve kaplanmamış yüzeyde kimyasal uyarımla osteojenik farklılaştırmaya alınan mezenkimal kök hücrelerin Alizarin Red S boyaması (Ölçüm çubukları: 200µm)

4.5. Gen İfade Analizleri

Homopolimerlerin mezenkimal kök hücrelerin gen ifadelerine olan etkisini gözlemlemek amacıyla 21 gün boyunca hem normal besiyeri hem de farklılaştıma besiyerinde kültüre edilen hücrelere real time pcr ile gen ifade analizi yapıldı. Sonuç olarak

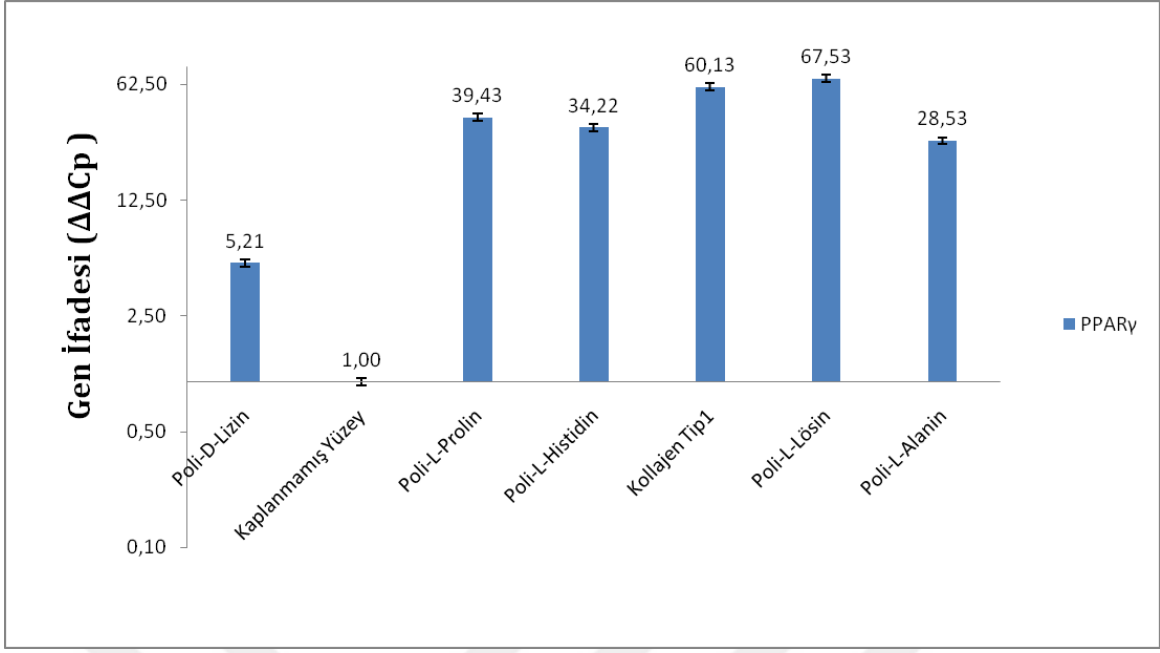
farklı homopolimerlerle kaplı yüzeylerde kültürü yapılan mezenkimal kök hücrelerin aynı genleri farklı oranlarda ifade ettikleri görüldü.

4.5.1. Adipojenik Farklılaştırma Gen ifade Analizleri

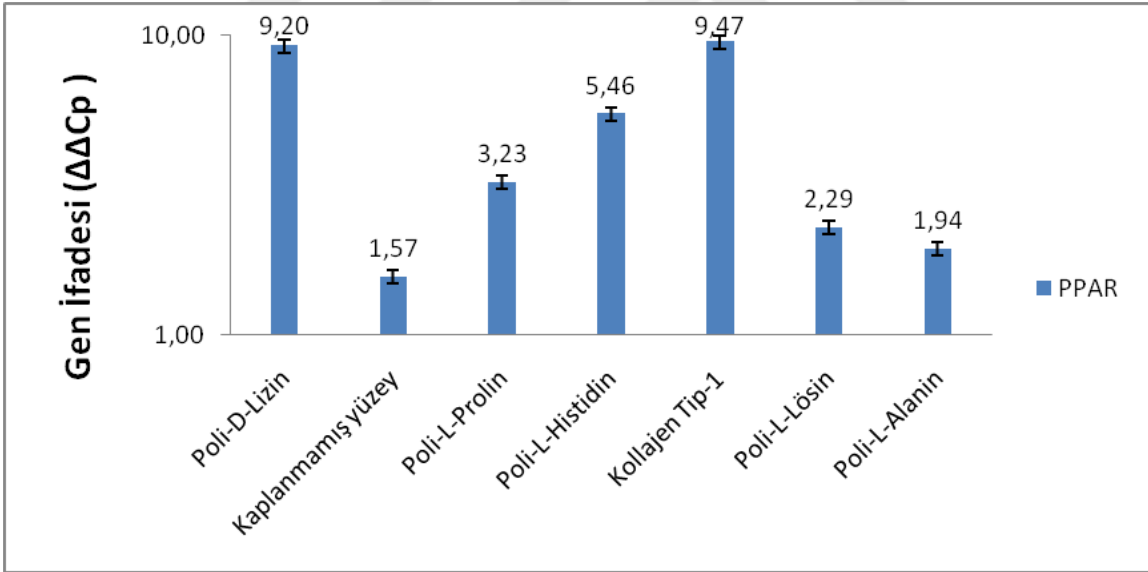
Kimyasal indüksiyon sonucu farklı homopolimerlerle kaplı yüzeylerde farklılaşmaya alınmış mezenkimal kök hücrelerde üç germ tabakasından hücrelere özgü bazı genlerin (Çizim 3.3) ifade düzeyleri real time PCR ile analiz edildi. Adipojenik ve osteojenik farklılaştırmanın 21. gününde analiz edilen hücrelerin gen ifadelerinde kimyasal yolla uyarılmamış hücrelere oranla anlamlı farklılıklar gözlemlendi. Homopolimer kaplı yüzeylerde adipojenik farklılaştırmaya alınan hücrelerin adipoz dokuya özgü belirteç olan PPAR γ gen ifade seviyelerine bakıldığında poli-L-lösin ve kollajen tip 1 kaplı yüzeylerde PPAR γ gen ifadesinin diğer gruplara göre daha yüksek olduğu görüldü (Çizim 4.15).

Homopolimerlerle kaplı yüzeylerde normal kültür besiyerinde 21 gün boyunca kültüre edilen mezenkimal kök hücrelerin PPAR γ gen ifade oranlarına bakıldığında deney grubu ile farklılıklar gözlemlendi (Çizim 4.15 ve 4.16). Genel olarak homopolimer kaplı yüzeylerin birçoğunda, deney grubundaki hücrelerin (farklılaştırmaya alınan) PPAR γ gen ifadeleri kontrol grubundaki (farklılaştırmaya alınmamış) hücrelerin PPAR γ gen ifade oranına göre yüksek olduğu gözlemlendi. Poli-D-lizin kaplı ve herhangi bir polimerle kaplanmamış yüzeylerde normal besiyeri ile kültüre edilen hücrelerdeki PPAR γ gen ifade oranının, poli-D-lizin kaplı yüzeyde kimyasal yolla farklılaştırmaya alınan hücrelerdeki PPAR γ gen ifade oranından fazla olduğu gözlemlendi (Çizim 4.15 ve 4.16).

Kollajen tip 1 kaplı yüzeyde adipojenik farklılaştırma besiyeri ile kültüre edilen hücrelerdeki PPAR γ gen ifadesi poli-D-lizin kaplı yüzeyde kültüre edilen hücrelerdeki PPAR γ gen ifadesinin 11 katı, poli-L-prolin kaplı yüzeyde kültüre edilen hücrelerdeki PPAR γ gen ifadesinin 1.52 katı, poli-L-histidin kaplı yüzeyde kültüre edilen hücrelerdeki PPAR γ gen ifadesinin 1,75 katı, poli-L-alanin kaplı yüzeyde kültüre edilen hücrelerdeki PPAR γ gen ifadesinin 2,1 katı ve kaplanmamış yüzeyde kültüre edilen hücrelerdeki PPAR γ gen ifadesinin ise 60 katı olduğu gözlemlendi. Kollajen tip 1 kaplı yüzeyde kültüre edilen hücrelerdeki PPAR γ gen ifadesi Poli-L-Lösin kaplı yüzeyde kültüre edilen hücrelerdeki PPAR γ gen ifadesinden %10 az olduğu görüldü. Poli-L-alanin, poli-L-histidin, poli-D-lizin ve kaplanmamış yüzey ile kollajen tip 1 kaplı yüzey arasındaki PPAR γ gen ifadesinde anlamlı farklılık olduğu saptandı ($p \leq 0,05$).



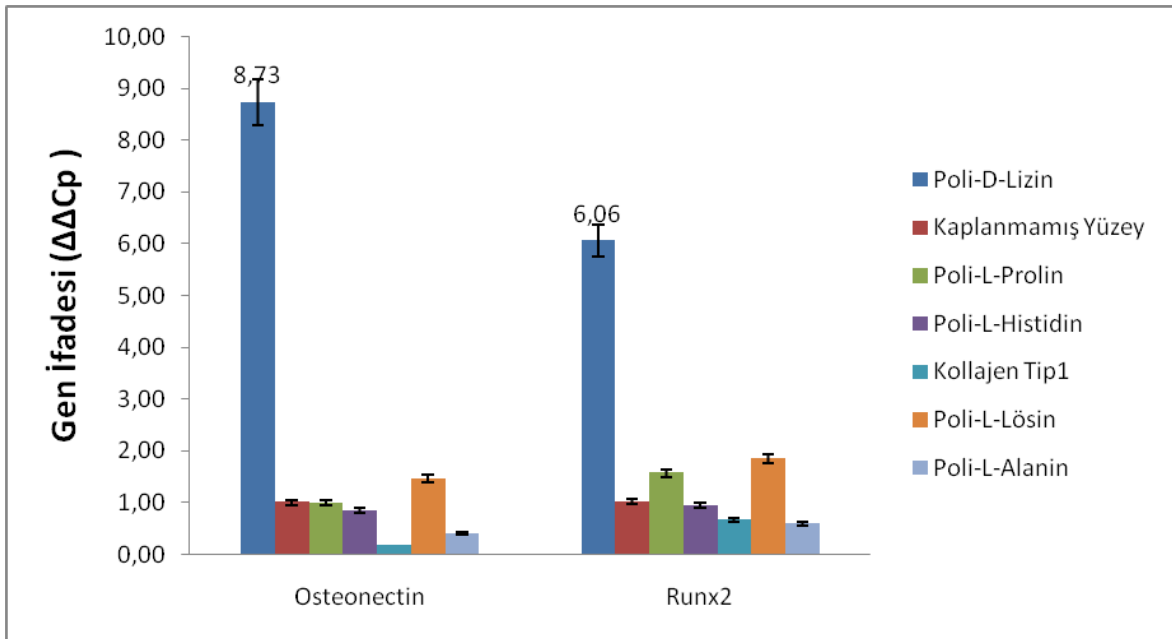
Çizim 4.15.: Kimyasal uyarı sonrası hücrelerde PPAR γ gen ifade analizi. Farklı homopolimerlerle kaplı yüzeylerde kültüre edilen mezenkimal kök hücrelerin kimyasal uyarımla adipojenik farklılaştırılmasının 21.gününde hücrelerdeki PPAR γ gen ifadesi düzeyleri (Poli-L-histidin, Poli-D-Lizin, Poli-L-Alanin ve kaplanmamış yüzey $p \leq 0,05$).



Çizim 4.16.: Kontrol grubu PPAR γ gen ifade analizi. Farklı homopolimerlerle kaplı yüzeylerde normal kültür besiyeri ile 21.gün boyunca kültüre edilen mezenkimal kök hücrelerin PPAR γ gen ifadesi düzeyleri

4.5.2. Osteojenik Farklılaştırma Gen İfade Analizleri

Farklı homopolimerlerle kaplı yüzeylerde 21. gün boyunca kimyasal uyarımla osteojenik farklılaştırmaya alınan hücrelerde, yapılan real time pcr analizi sonucu yüzeyler arasında hücrelerdeki Osteonectin ve Runx2 gen ifadeleri karşılaştırıldı. Poli-D-lizin kaplı yüzeyde kültüre edilen hücrelerin Osteonectin ve Runx2 gen ifade oranlarının diğer yüzeylerde kültüre edilen hücrelere göre daha yüksek olduğu gözlemlendi. Bu da poli-D-lizin kaplı yüzeyin osteojenik farklılaşmayı diğer yüzeylere göre daha iyi desteklediğini göstermektedir (Çizim 4.17).

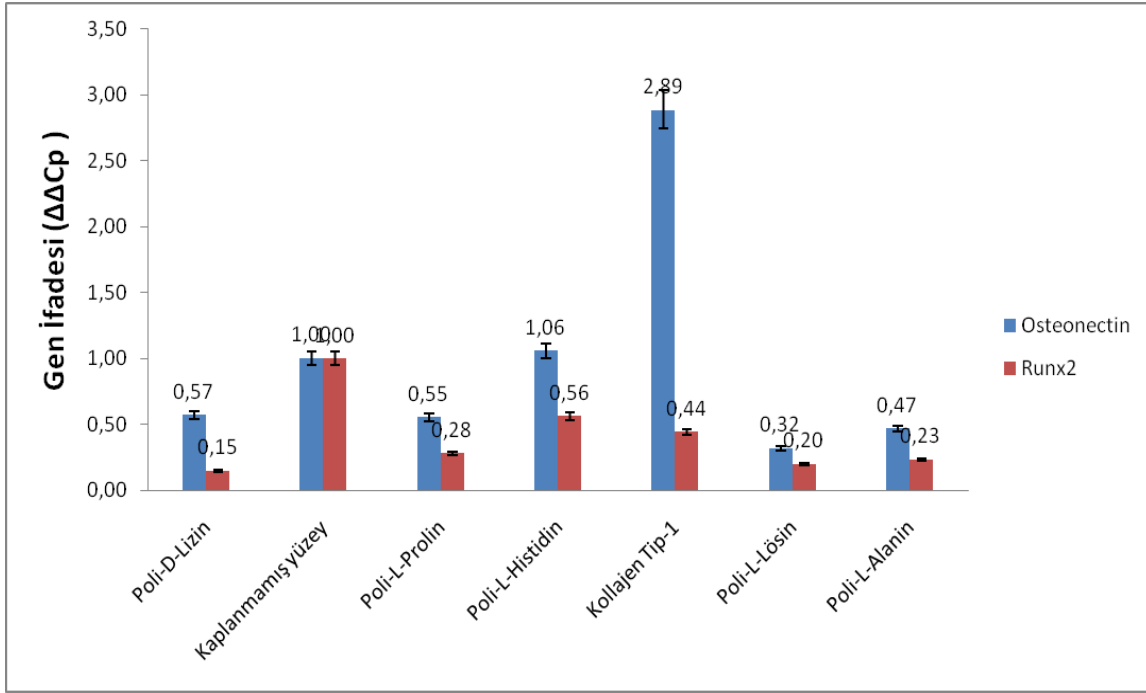


Çizim 4.17.: Osteonectin ve Runx2 gen ifade analizi. Farklı homopolimerlerle kaplı yüzeylerde kültüre edilen mezenkimal kök hücrelerin kimyasal uyarımla osteojenik farklılaştırılmaya alınmasının 21.gününde hücrelerdeki Osteonectin ve Runx2 gen ifade düzeyleri. $\Delta\Delta C_p$ değerlerinin hesaplanmasında beta-aktin ve kaplanmamış yüzey hücrelerin gen ifadeleri kullanılmıştır.

Poli-L-lösın kaplı yüzeydeki hücrelerin Osteonectin ve Runx2 gen ifade oranlarının poli-L-prolin, -L-histidin, -L-alanin, kollajen tip 1 ve kaplanmamış yüzeylerdeki hücrelerin Osteonectin ve Runx2 gen ifade oranlarına göre biraz daha yüksek olduğu görülmüştür. poli-L-prolin, -L-histidin, -L-alanin, kollajen tip 1 ve kaplanmamış yüzeylerdeki Osteonectin ve Runx2 gen ifadeleri birbirleri ile benzerlik göstermektedir.

Normal besiyeri ile 21 gün boyunca homopolimer kaplı yüzeylerde kültüre edilen mezenkimal kök hücrelerin osteonectin ve Runx2 gen ifadelerine bakıldığında osteojenik

farklılaştırma besiyeri ile kültüre edilen hücrelerdeki osteonectin ve Runx2 gen ifadeleri arasında farklılıklar gözlemlendi. Osteojenik farklılaştırma grubunda Poli-D-lizin kaplı yüzeydeki osteonectin gen ifadesi kaplanmamış yüzey üzerindeki hücrelerdeki osteonectin gen ifadesinin yaklaşık 8 katı ve Runx2 gen ifadesinin ise yaklaşık 6 katıdır.



Çizim 4.18: Kontrol grubuna göre osteonectin ve Runx2 gen ifade analizleri. Farklı homopolimerlerle kaplı yüzeylerde kültüre edilen mezenkimal kök hücrelerin normal kültür besiyeri ile kültürünün 21.gününde hücrelerdeki Osteonectin ve Runx2 gen ifade düzeyleri. $\Delta\Delta C_p$ değerlerinin hesaplanmasında beta-aktin ve kaplanmamış yüzey hücrelerin gen ifadeleri kullanılmıştır.

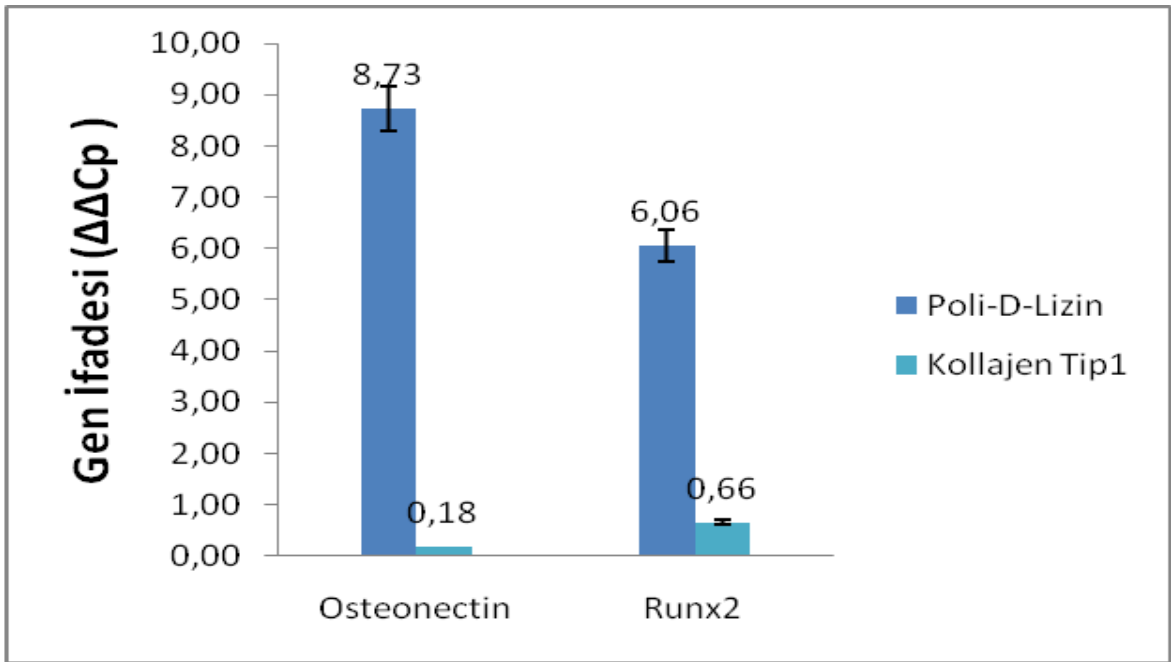
Farklılaşma grubundaki Poli-L-prolin kaplı yüzeyin osteonectin gen ifade düzeyi kaplanmamış yüzey üzerindeki hücrelere göre fark göstermemiştir. Ancak poli-L-prolin kaplı yüzeyde Runx2 gen ifadesi ise kontrol grubunun 1,5 katıdır (Çizim 4.17)

Poli-L-histidin kaplı yüzeyler üzerindeki hücreler karşılaştırıldığında, farklılaşma grubundaki osteonectin gen ifade değeri 0,85 iken farklılaşmamış kontrol grubunda 1,05'tir. Kontrol grubunda ise Runx2 gen ifadesi ise farklılaştırma grubundaki Runx2 gen ifadesinden %40 daha azdır.

Kollajen tip 1 kaplı yüzeyde kontrol grubundaki osteonectin gen ifadesi farklılaşma grubundaki osteonectin gen ifadesinin 16 katıdır. Kollajen tip 1 kaplı yüzeyde kontrol grubundaki Runx2 gen ifadesi farklılaşma grubunun 0,75 katıdır.

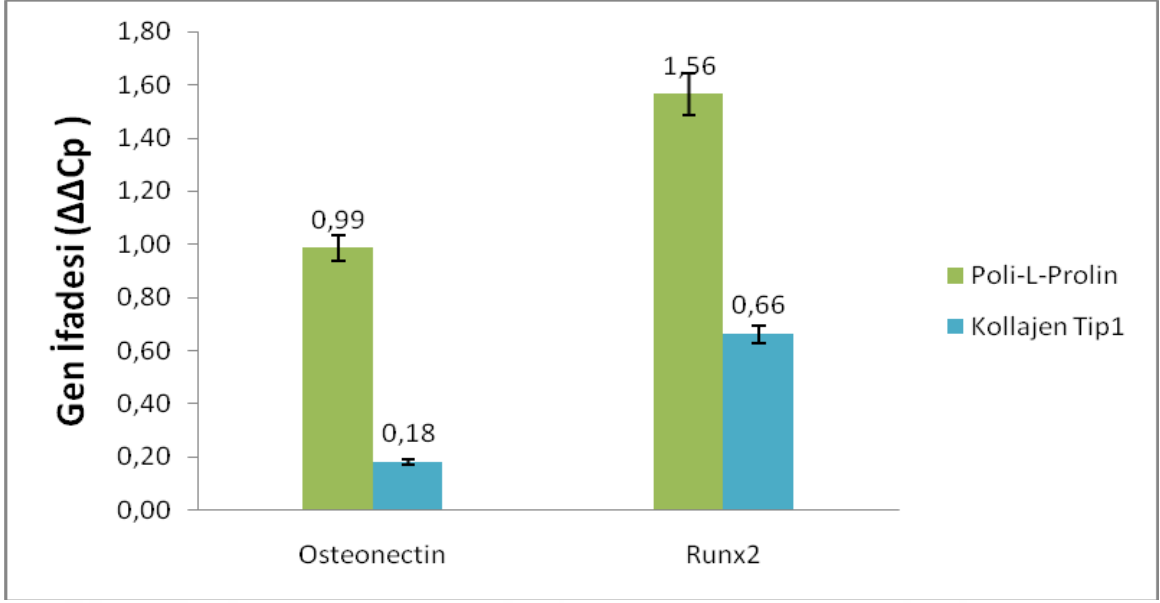
Farklılaşma grubunda Poli-L-lösin kaplı yüzeyde kültüre edilen hücrelerin osteonectin gen ifadesi kontrol grubundaki osteonectin gen ifadesinin 4,7 katıdır. Farklılaşma grubundaki Runx2 gen ifadesi kontrol grubundaki hücrelerin Runx2 gen ifadesinin 9,7 katıdır.

Poli-L-alanin kaplı yüzeyde farklılaşma grubundaki hücrelerin osteonectin gen ifadesi kontrol grubundaki hücrelerin osteonectin gen ifadesi ile benzerdir. Runx2 gen ifadesi kontrol grubunun 2,6 katıdır.



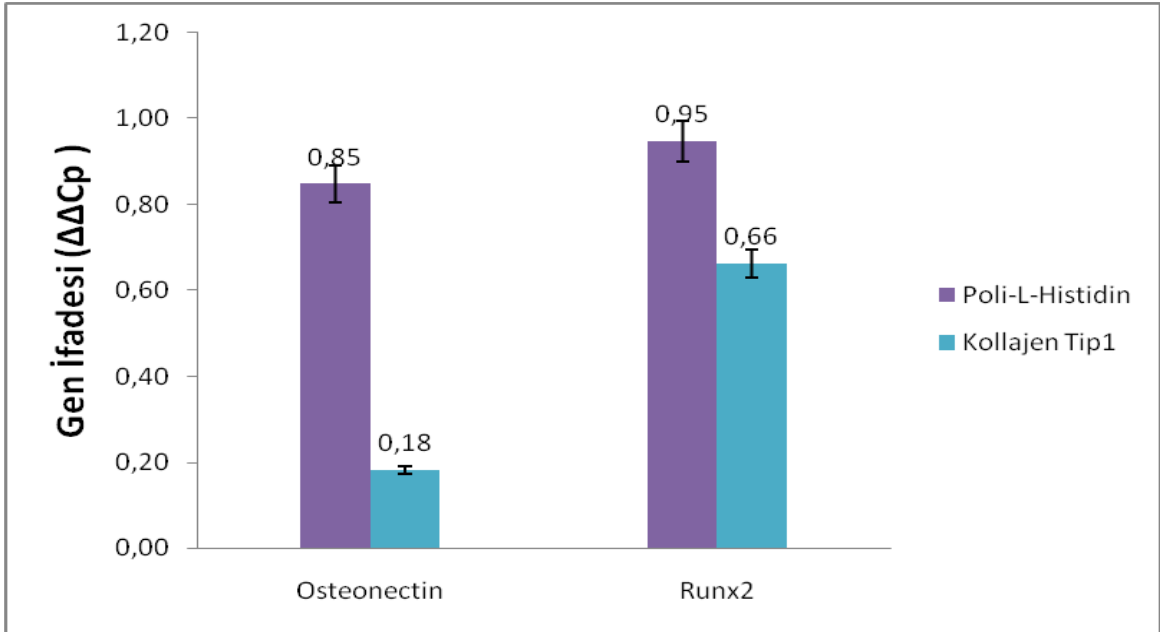
Çizim 4.19.: Poli-D-Lizin kaplı yüzeyde osteojenik farklılaştırmaya alınan hücrelerin gen ifade analizi. Osteojenik farklılaştırma belirteçleri olan osteonectin ve Runx2 genlerinin ifade düzeyleri.

Poli-D-lizin kaplı yüzeyde osteojenik farklılaşımaya besiyeri ile kültüre edilen hücrelerdeki osteonectin gen ifadesi kollajen tip1 kaplı yüzeydeki hücrelerin osteonectin gen ifadesinin 48 katıdır. Runx2 gen ifadesinin 9 katıdır. (Çizim 4.19).



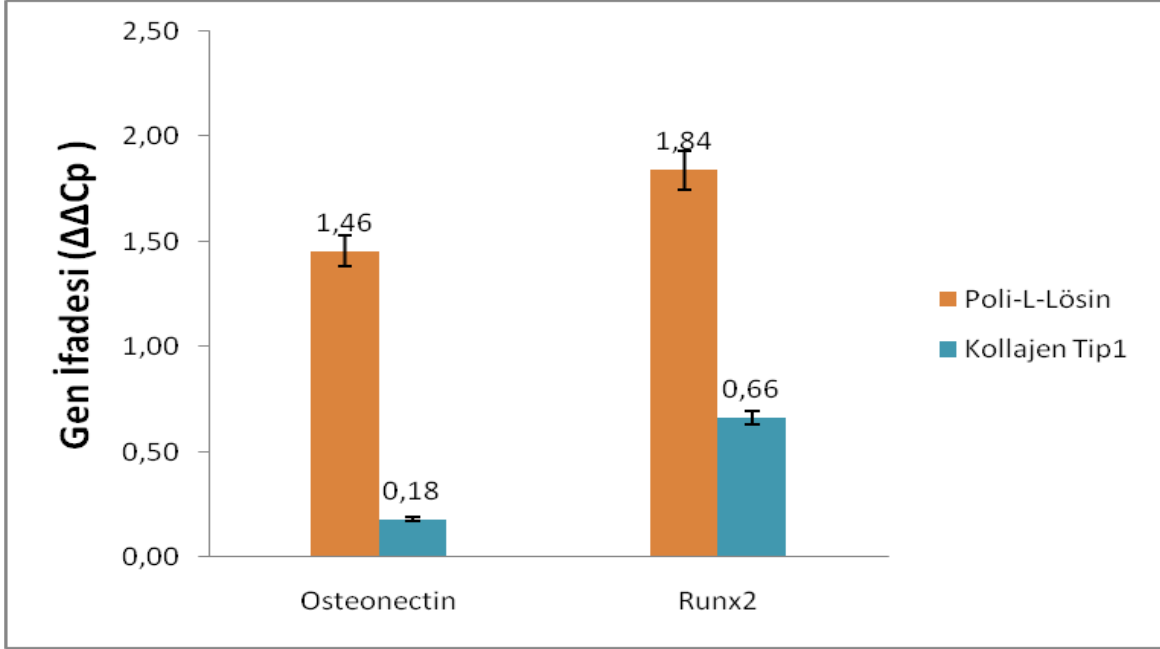
Çizim 4.20.: Poli-L-Prolin kaplı yüzeyde osteojenik farklılaştırmaya alınan hücrelerin gen ifade analizi. Osteojenik farklılaştırma belirteçleri olan osteonectin ve Runx2 genlerinin ifade düzeyleri.

Poli-L-prolin kaplı yüzeyde kültüre edilen hücrelerin osteonectin gen ifade oranı kollajen tip 1 kaplı yüzeydeki hücrelerin osteonectin gen ifade oranının 5,4 katıdır. Runx2 gen ifade oranı ise kollajen tip 1 kaplı yüzeydeki hücrelerin Runx2 gen ifade oranının 2,4 katıdır (Çizim 4.20).



Çizim 4.21.: Poli-L-Histidin kaplı yüzeyde osteojenik farklılaştırmaya alınan hücrelerin gen ifade analizi. Osteojenik farklılaştırma belirteçleri olan osteonectin ve Runx2 genlerinin ifade düzeyleri.

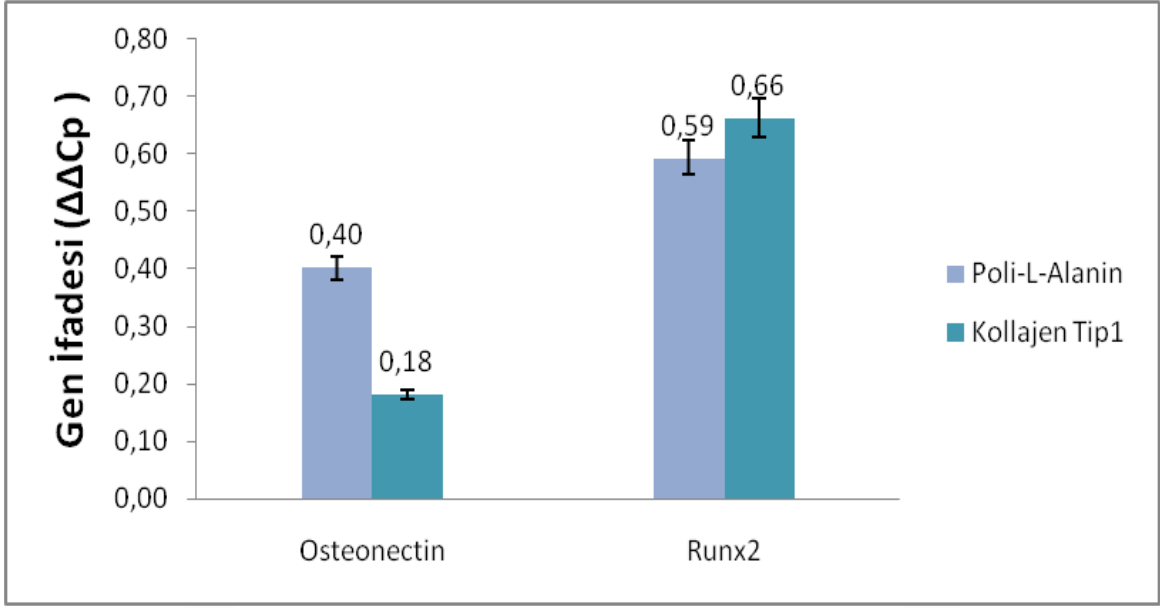
Poli-L-histidin kaplı yüzeyde kültüre edilen hücrelerde osteonectin gen ifadesi oranı kollajen tip 1 kaplı yüzeyde kültüre edilen hücrelerin osteonectin gen ifade oranının 4,7 katıdır. Runx2 gen ifadesi oranı 1,4 katıdır (Çizim 4.21).



Çizim 4.22. Poli-L-Lösin kaplı yüzeyde osteojenik farklılaştırmaya alınan hücrelerin gen ifade analizi. Osteojenik farklılaştırma belirteçleri olan osteonectin ve Runx2 genlerinin ifade düzeyleri.

Poli-L-lösin kaplı yüzeyde kültüre edilen hücrelerde osteonectin gen ifade oranı kollajen tip 1 kaplı yüzeyde kültüre edilen hücrelerin osteonectin gen ifade oranının 8 katıdır. Runx2 gen ifadesi oranı 2,8 katıdır (Çizim 4.22).

Poli-L-alanin kaplı yüzeyde osteojenik farklılaştırmaya alınan hücrelerde osteonectin gen ifadesi kollajen tip 1 kaplı yüzeyde osteojenik farklılaştırmaya alınan hücrelerdeki osteonectin gen ifadesinin 2,2 katıdır. Kollajen tip1 ve poli-L-alanin kaplı yüzey de kültüre edilen hücrelerin Runx2 gen ifadelerinde istatistiksel olarak belirgin bir fark gözlemlenmemiştir. (Çizim 4.23).

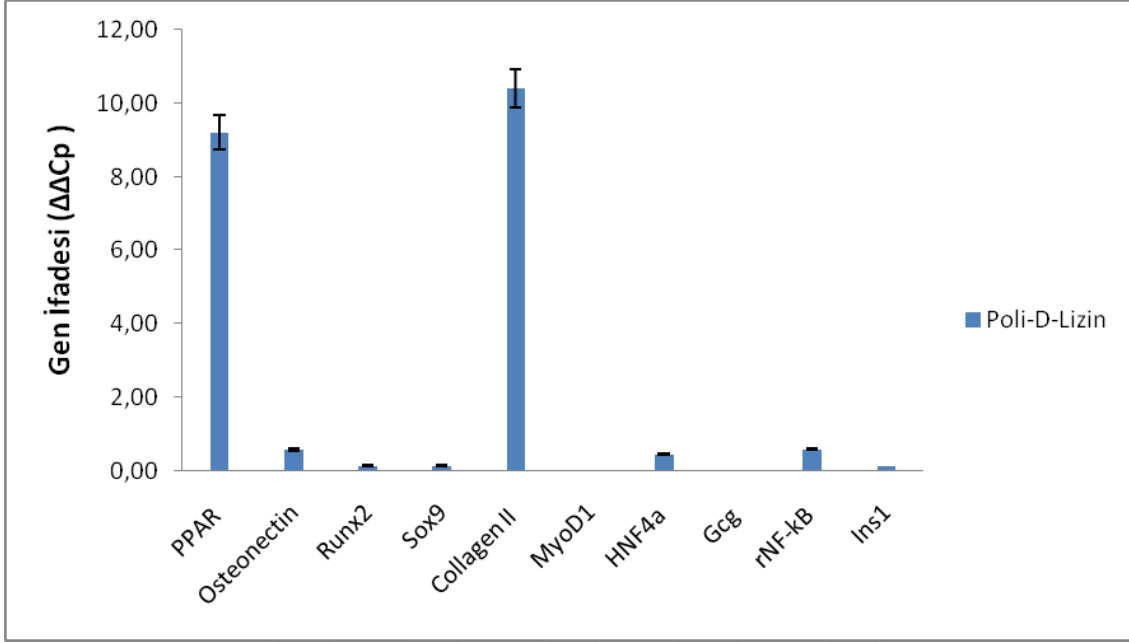


Çizim 4.23.: Poli-L-Alanin kaplı yüzeyde osteojenik farklılaştırmaya alınan hücrelerin gen ifade analizi. Osteojenik farklılaştırma belirteçleri olan osteonectin ve Runx2 genlerinin ifade düzeyleri

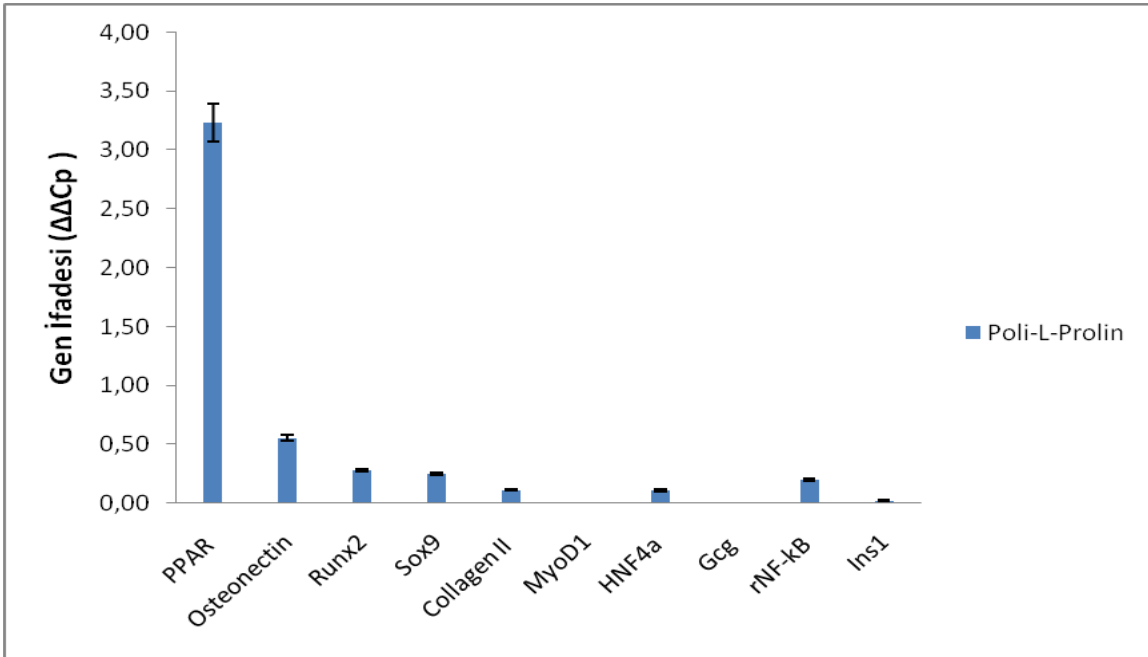
4.5.3. Farklı Homopolimer Kaplı Yüzeylerde Normal Kültür Besiyeri ile Kültüre Edilen Hücrelerin Gen İfade Analizleri

Adipojenik ve osteojenik farklılaştırma deney gruplarının kontrolü olarak farklı polimerlerle kaplı cam yüzeylerde 21 gün boyunca normal kültür besiyeri (Alpha MEM, %10 FBS, %1 penisilin streptomisin) ile kültüre edilen mezenkimal kök hücreler enzimatik pasaj yöntemiyle hücre kültür kaplarından kaldırılarak Real Time PCR ile gen ifade analizi yapıldı. Yapılan analiz sonucunda farklı yüzeylerde kültüre edilen hücrelerin gen ifade seviyelerinde farklılıklar gözlemlendi. Diğer yandan kontrol grubundaki hücrelerin gen ifade profillerine bakılarak homopolimer kaplı yüzeylerin hücreleri hangi hücre tipine farklılaşmaya yönlendirdiği gözlemlendi. Kaplanmamış yüzey üzerindeki hücreler ile karşılaştırıldığında poli-D-lizin kaplı yüzeyde 21 gün boyunca normal kültür besiyeri ile kültüre edilen hücrelerde PPAR γ ve Collagen tip II gen ifadelerinin diğer gen ifadelerine göre oldukça yüksek olduğu görülmüştür (9,2 ve 10,4 kat). NF- κ B gen ifadesi poli-D-lizin kaplı yüzeyler üzerindeki hücrelerde 1,7 kat azaldığı görülmüştür. En az ifade edilen gen myojenik farklılaşma belirteci olan MyoD1 olduğu görüldü. Endoderm kaynaklı hücre belirteçleri glucagon, insülin ve HNF4a gen ifadeleri benzer şekilde düşük gözlemlendi. Poli-D-Lizin kaplı yüzey hücreleri adipojenik ve kondrojenik yönde desteklediği söylenebilir (Çizim 4.24). Poli-L-histidin kaplı yüzeyde 21 gün boyunca kültüre edilen

hücrelerde PPAR γ gen ifadesi ifade olunan genlerin en yükseği olduğu görüldü. Aynı zamanda Osteonectin, Runx2, Sox9, Collagen II, NF- κ B gen ifadelerine de rastlandı. Myod1 ve Gcg ifadeleri gözlemlenmedi (Çizim 4.29).



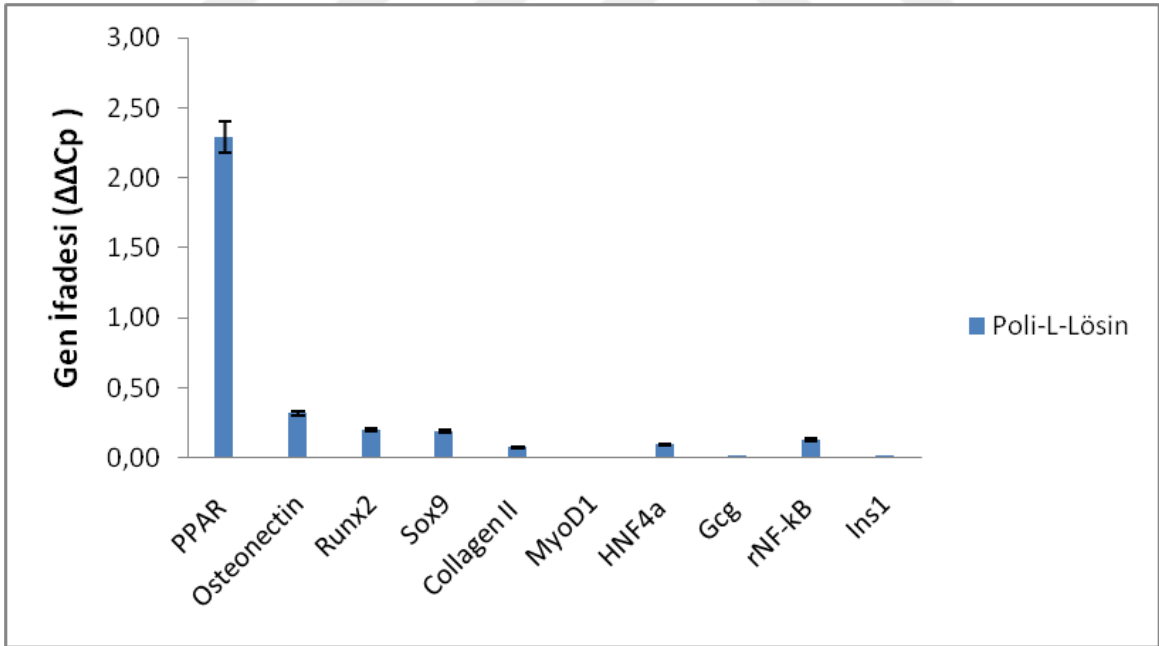
Çizim 4.24.: Poli-D-Lizin kaplı yüzeylerde kültüre edilen mezenkimal kök hücrelerin farklı kaynaktan hücrelere özgü gen ifade düzeyleri. $\Delta\Delta$ Cp değerlerinin hesaplanmasında beta-aktin ve kaplanmamış yüzeydeki hücrelerin gen ifadeleri kullanılmıştır.



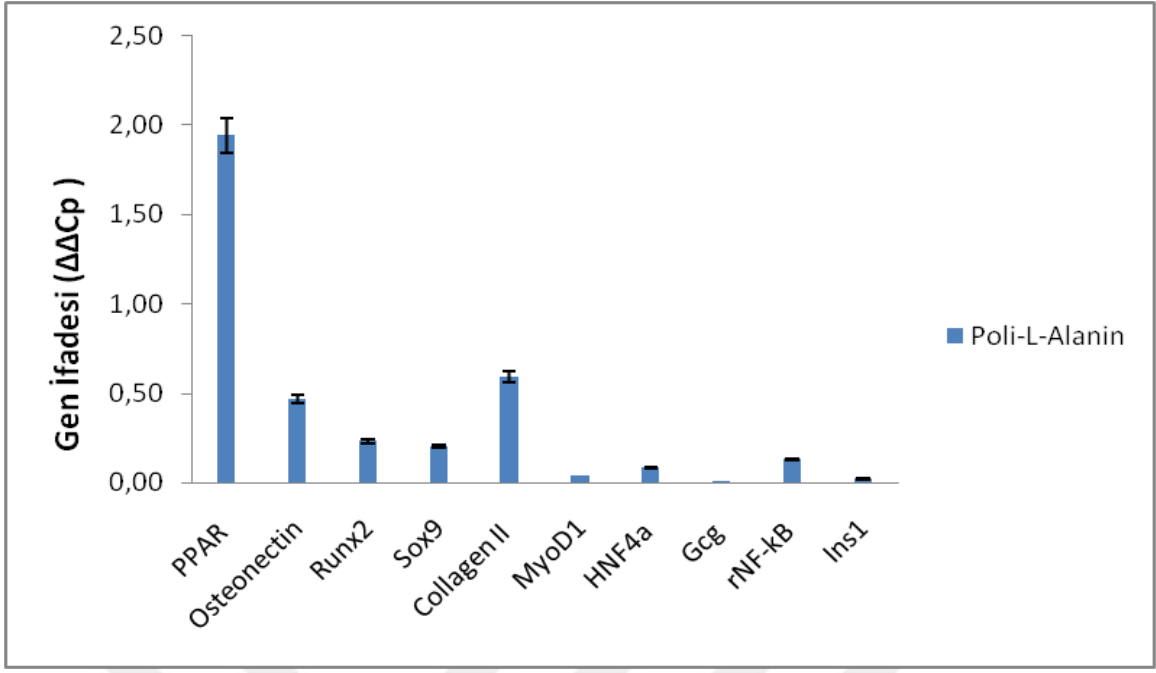
Çizim 4.25.: Poli-L-Prolin kaplı yüzeylerde kültüre edilen mezenkimal kök hücrelerin farklı kaynaktan hücrelere özgü gen ifadelerinin düzeyleri.

Poli-L-prolin kaplı yüzeyde kültüre edilen hücrelerde PPAR γ gen ifadesi diğer genlere göre daha fazladır. MyoD1 ve Gcg gen ifadelerine poli-L-prolin kaplı yüzeyde yok denecek kadar az olduğu gözlemlenmiştir. Apoptoz belirteci olan NF- κ B gen ifadesi de kaplanmamış yüzeye göre 5 kat daha az olduğu belirlenmiştir. Runx2 ile Sox9 ve HNF4a ile Collagen II gen ifadeleri var olmakla beraber düşük olarak (0,25, 0,25, 0,11, 0,11) gözlemlenmiştir (Çizim 4.25)

Poli-L-lösin kaplı yüzeyde kültüre edilen hücrelerin gen ifadelerine bakıldığında PPAR γ gen ifadesi diğer genlere oranla yüksektir. Poli-L-lösin kaplı yüzeyin hücreleri adipojenik farklılaştırmaya yönlendirdiği söylenebilir. Fakat hücrelerin MyoD1 gen ifadesine bakarak kas hücrelerine, Gcg ve İns1 gen ifadelerine bakarak da endokrin hücreye farklılaşmadıkları söylenebilir. Sonuç olarak poli-L-lösin kaplı yüzey hücreleri kas ve endokrin farklılaşmayı destekleyen bir polimer olmadığı görülmektedir. NF- κ B gen ifadesi ise bu yüzey üzerinde 7,6 kat azaldığı belirlenmiştir. Runx2 ve Sox9 gen ifade seviyeleri ise benzerlik göstermektedir (Çizim 4.26).



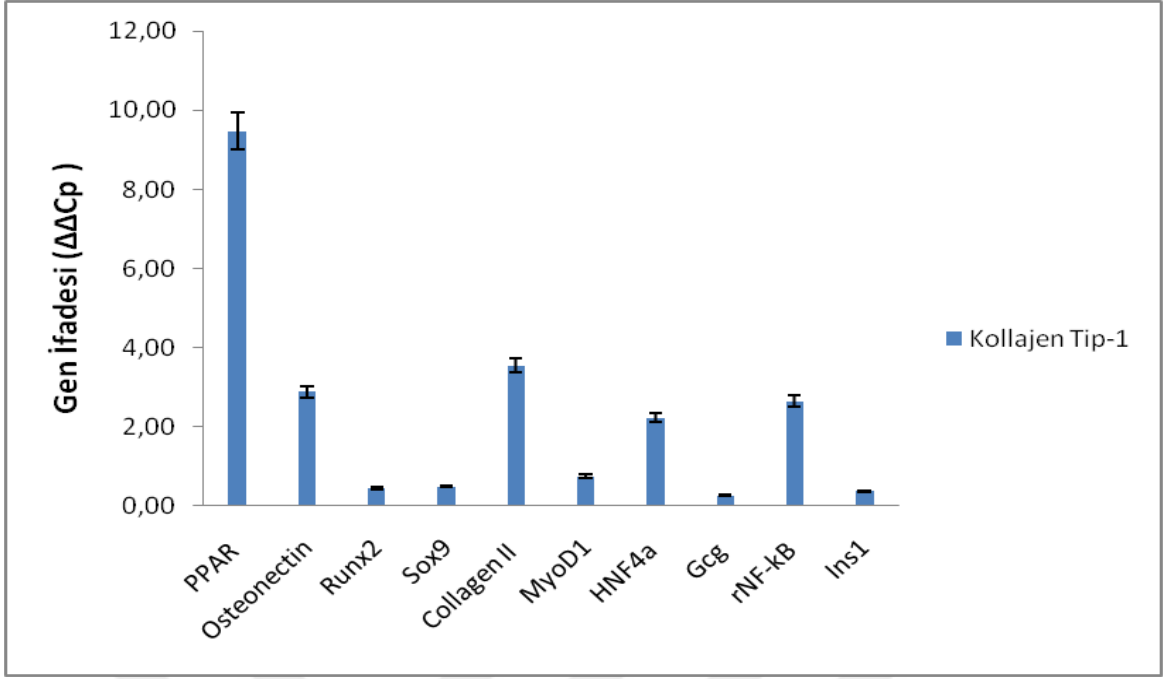
Çizim 4.26.: Poli-L-Lösin kaplı yüzeylerde kültüre edilen mezenkimal kök hücrelerin farklı kaynaktan hücrelere özgü gen ifadelerinin düzeyleri.



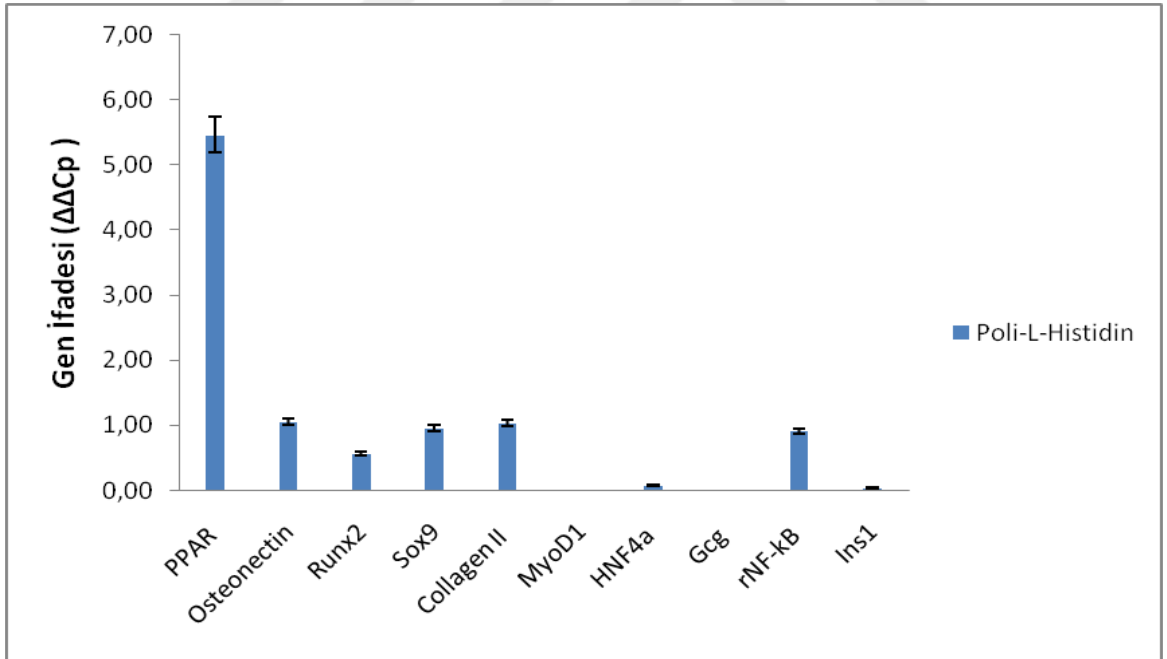
Çizim 4.27.: Poli-L-Alanin kaplı yüzeylerde kültüre edilen mezenkimal kök hücrelerin farklı kaynaktan hücrelere özgü gen ifadelerinin düzeyleri.

Poli-L-alanin kaplı yüzeyde kültüre edilen hücrelerde ifade olan genlere bakıldığında yine PPAR γ gen ifadesinin yüksek olduğu görülmektedir. Collagen II gen ifadesi kaplanmamış hücrelerinki ile aynı seviyede olduğu belirlendi. Gcg geni yok denecek kadar az ifade olmuştur. Apoptoz belirteci olan NF- κ B gen ifadesi 0,13 katıdır. Bu homopolimerin MyoD1, İns1, Gcg gen ifadelerine bakarak kas ve endokrin farklılaşmayı desteklemediği fakat adipojenik farklılaşmayı desteklediği söylenebilir (Çizim 4.27)

Kollajen tip 1 kaplı yüzeyde çoğalan hücrelerin PPAR γ , Osteonectin, Collagen II genlerinin ifadeleri incelendiğinde adipojenik, osteojenik ve kondrojenik farklılaştırma yönünde desteklediği yapılan hesaplamalarla belirlenmiştir. Ullanılan diğer kaplama malzemelerine göre kollajen tip 1'in hepatosit belirteci olan HNF4a gen ifadesini desteklediği ve gen ifadesinin kaplanmamış yüzeye göre 2,3 kat artırdığı gözlemlenmiştir. Runx2 ve Sox9 genlerinin ifade oranları birbirine yakın olup değerleri yüksek olmadığı görülmektedir. NF- κ B gen ifadesi kollajen tip-1 için yüksek olduğu gözlemlendi. Kaplanmamış yüzey üzerindeki hücrelere göre 2,65 katlık bir artış apoptozun uyarıldığı gibi görülse de gen ifadesinin çok yüksek olmaması hücreler üzerinde ciddi bir apoptoz sürecini başlatmadığı söylenebilir. (Çizim 4.28)



Çizim 4.28. : Kollajen Tip 1 kaplı yüzeyde kültüre edilen mezenkimal kök hücrelerin farklı kaynaktan hücrelere özgü gen ifadelerinin düzeyleri.



Çizim 4.29. : Poli-L-Histidin kaplı yüzeyde kültüre edilen mezenkimal kök hücrelerin farklı kaynaktan hücrelere özgü gen ifadelerinin düzeyleri.

5. TARTIŞMA

Son on yılda mezenkimal kök hücrelerin özgün hücre hatlarına farklılaştırılabilmesi amacıyla gerekli biyokimyasal ve fiziksel mikroçevre ve biyosinyaller anlaşılmaya çalışılmış ve bunun için birçok araştırma yapılmıştır (Singh ve Elisseff 2010, Fisher ve diğ. 2010). Sonuç olarak malzeme özelliklerinin kök hücre farklılaşması üzerine etkileri olduğu görülmüştür. Malzemenin kimyasal fonksiyonel grupları, sertliği ve topografisi, nişin boyutu ve yüzey geometrisinin kök hücre farklılaşmasını etkilediği raporlanmıştır (Engler ve diğ. 2006; Benoit ve diğ. 2008; Kilian ve diğ. 2010).

Hücrelerin canlılık, proliferasyon ve farklılaşma gibi özelliklerini in vitro ortamda koruyabilmeleri için gerekli besin ve moleküllerin kültür ortamında sağlanması gerekmektedir. Bu amaçla organik ve inorganik besinler, kollajen, fibronektin ve laminin gibi hayvansal kaynaklı proteinler kültür besiyerine eklenerek yapay fakat verimli bir mikroçevre oluşturulmaya çalışılmaktadır. Bunun amacı hücrenin in vivo ortamını taklit ederek fizyolojik ve biyolojik özelliklerini kaybetmeden kültüre edebilmektir.

Son zamanlarda sentetik kök hücre mikroçevresi oluşturmada sentetik polimerler en çok tercih edilen biyomalzemeler arasındadır. Özellikle doku mühendisliği çalışmalarında yapı iskelesi yapımında ve hücrelerin çoğalıp farklılaşabileceği yüzeyler oluşturmada polimerler karşımıza çıkmaktadır. Burada hücre dışı matriksin in vitro ortamda modellenmesi hücrelerin farklılaşmaları açısından önem arz etmektedir. Sunulan bu çalışmada, farklı sentetik polimerler üzerinde mezenkimal kök hücreler kültüre edilerek canlılık, çoğalma ve farklılaşma olguları incelenmiştir. Kullanılan homo-polimerlerin hücrelerin farklılaşmasını hangi yönde uyardığı ya da baskıladığı bu tez çalışması ile ortaya konmuştur.

Sentetik mikroçevrenin en temel fonksiyonu kök hücre yapışması ve migrasyonu için doğal hücre dışı matrikse benzer fiziksel bir tabaka oluşturmaktır. Doğal hücre dışı matriks, biyolojik makromoleküllerin yapısal hiyerarşiyle bir araya gelerek oluşturdukları heterojen bir ağıdır. Hücre dışı matriksin moleküler içerikleri hücrelere direkt veya ara faktörlerle bağlanarak adezyon eğiliminde çeşitlilik gösterir. Bu faktörler aynı zamanda bazı adezyon ligandlarına veya özgün olmayan fizyokimyasal özelliklerine göre kök hücrelerin davranışlarını ve diğer hücrelerle etkileşimini etkilemektedir. (Fisher ve diğ. 2009) Birçok sentetik biyomalzeme, kök hücre doğal hücre dışı matriksini taklit etmek ve kök hücre kaderini kontrol etmek amacıyla çalışmalarda kullanılmıştır. Örneğin polietilen

glikol (PEG) hidrojelleri, kök hücre enkapsülasyonunda kullanılan ve hücreleri yüksek hacimli sıvı içerisinde hapsederek hücrelere doğal ortamlarındaki gibi mekanik bir etki oluşturmayı amaçlayan bir biyomalzemedir. Bu şekilde kök hücrelere mekanik kuvvet uygulayarak hücreleri farklı doku tiplerine farklılaştırma çalışmaları vardır (Engler ve diğ. 2006). Örneğin kemik yapısı gibi sert jel yüzeylerde kök hücrelerin osteoblasta, kas yapısı gibi gergin yüzeylerde kas hücrelerine, yumuşak yüzeylerde ise hücrelerin nöral farklılaşmaya yöneldikleri gözlemlenmiştir. Benoit ve diğ. 2008’de yapmış olduğu bir model çalışmasında küçük miktarda karboksil grup, fosfat grup ve tert-bütül ile katıştırılan PEG (polietilen glikol) hidrojeller kullanarak sırasıyla kıkırdaktaki glikozaminoglikan, kemik mineralizasyonu ve adipoz dokudaki lipitten zengin çevre taklit edilmeye çalışılmıştır. Oluşturulan bu modele göre mezenkimal kök hücrelerin kondrojenik, osteojenik ve adipojenik farklılaşmaya yöneldiği gözlemlenmiştir. Kök hücrelerin farklılaşma potansiyelleri çok yüksek olduğu için hangi yöne farklılaştırmaya yönlendirileceklerse kültürde o yöne farklılaşmayı destekleyecek biyomalzemeler kaplama malzemesi olarak kullanılmalıdır. Bu tez çalışmasında, tek bir aminoasit tipinden oluşmuş lineer yapıda polimerik yapılar kullanılmıştır. Bu malzemeler poli-L-lizin, poli-D-lizin, poli-L-prolin, poli-L-histidin, poli-L-alanin, poli-L-lösin, poli-L-glutamik asit olarak sıralanmaktadır. Bu yüzeyde kültüre edilen hücrelerin farklılaşma potansiyelleri kaplanmamış yüzey veya kollajen tip-1 kaplı yüzey üzerindeki hücreler ile karşılaştırılarak ortaya konmuştur.

Yapılan bu çalışmada L-formundaki poli-aminoasitlerden oluşan homopolimerlerin yüklülük özelliklerinden yararlanılarak hücre membranındaki negatif iyonlarla etkileşime girmesi sonucu hücrelerin davranışlarına olan etkileri ve kimyasal yolla adipojenik ve osteojenik farklılaşmaya yönlendirildiklerinde yüzeylerin hücreler üzerindeki farklılaşma potansiyellerine olan etkisi incelenmeye çalışılmıştır. Gen ifadesi analizleri ile de homopolimer kaplı yüzeylerin hücrelerin gen ifadeleri üzerindeki değişimleri gözlemlenmiştir.

Çalışmada ilk olarak homopolimer kaplı yüzeylerde kültüre edilen hücrelerin canlılık, adezyon ve çoğalma değerlerine bakılmıştır. Daha sonra homopolimerlerin hücreler üzerinde toksik etkisinin olup olmadığı LDH analizi ile gösterilmiştir.

Sonuç olarak kollajen tip 1 kaplı yüzey hariç birçok yüzeyde hücrelerin ikinci günden sonra homopolimer kaplı yüzeylerde çoğalma oranlarının 0. ve 2. güne göre

azalma olduğu gözlemlenmiştir. Özellikle, poli-L-lizin ve poli-L-glutamik asit kaplı yüzeyde hücrelerin hiç çoğalmadıkları ve hücre adezyonunu da desteklemediği belirlenmiştir. Toksik etki ölçümler sonrasında bu malzemeler için belirgin bir seviyede gözlemlenmezken hücre sayılarında ciddi azalışların olduğu gözlemlendi. Bu sebeple çalışmanın ileriki aşamalarında bu iki polimer çalışma dışı bırakılmıştır.

Hücrelerin hem birbirleriyle hem de hücreşı matriks ile adezyonunu sağlayan selektinler, kadherinler, immünglobülin süper ailesi ve integrinler gibi bir çok hücre adezyon molekülü vardır. Bunlardan bir kısmı hücre-hücre adezyonunda görevliken integrinler hücrelerin hücre dışı matrikse veya diğer hücrelerin yüzeyine tutunmasını sağlar. İntegrinlerin ligand bağlanma bölgeleri kollajen yapılarının C-terminal bölgelerine, laminin ve fibronektinin farklı bölgelerine bağlanabilirler (Zeltz ve Gullberg, 2016). İntegrinler çeşitli hücrelerde ifade edildikleri ve hücre dışı matriks proteinlerine bağlandıkları bilinmektedir (Klamer ve Voermans, 2014). Hücrelerin matriks içeriklerine bağlanması hücre yüzeyindeki integrin moleküllerinin *downregülasyonuna* sebep olabilir (Lodish ve diğ. 2000). Örneğin, İntegrin $\alpha4\beta1$ birçok öncül hematopoetik hücrelerde bulunur ve fibronektine bağlanırlar. Hematopoetik hücreler de direkt olarak stromal hücrelerle iletişim kurar ve matrikse yapışır. Geç dönem hematopoetik hücreler farklılaşarak olgun kan hücrelerine dönüştüklerinde integrin $\alpha4\beta1$ moleküllerindeki azalma görülür ve hücreler tutunma özelliklerini kaybederek kan sirkülasyonuna karışır (Rettig ve diğ. 2012).

Hücrelerin büyüyüp çoğaldıkları yüzeyin doğası, kültürdeki hücrelerin davranışlarını etkilediği bilinmektedir (Salzing ve diğ. 2016). Yapılan adezyon ölçümlerinde kültür besiyeri içeriği ve hücre çeşidi aynı olmasına rağmen kültür yüzeylerinin farklı homopolimer ile kaplanması hücrelerin tutunma davranışları üzerine farklı etkilerinin olduğu gözlemlendi. Bu çalışmadaki adezyon ölçümlerinde 30 dakika ve 6 saat sonra yapılan WST-1 analizi sonucu farklı veriler elde edildi. İlk 30 dakikada poli-D-lizin ve poli-L-alanin ve poli-L-histidin kaplı yüzeydeki hücreler polimerin pozitif yüklü olmasından dolayı yüksek çekimle bağlanırken daha sonra adezyon oranının sırasıyla %76, %70, %96 seviyelerine kadar düştüğü gözlemlendi. Bunun sebebi ilk 30 dakikada fiziksel etkileşimin ön planda olduğu ve tutunmanın moleküler yüke göre belirlenmesi olarak açıklanabilir. Ancak adezyon oranının düşmesi, mezenkimal kök hücrelerin 6 saat içerisinde polimerik yüzey üzerinde hücresel etkileşime girip protein profilini tekrar düzenleyerek integrin moleküllerinin sayılarında ve tiplerinde olası değişime gitmesi ve buna bağlı

olarak integrin moleküllerinin azalmasından kaynaklanabilir. Poli-L-glutamik asit homopolimeri negatif yüklü bir polimer olduğu için ilk 30 dakikada ve 6 saat sonraki ölçümlerde hücrelerin adezyonunu desteklemediği görüldü. Negatif yüklü yüzeyler hücre membranının negatif iyonlara sahip olmasından dolayı hücre ile etkileşime girmediğinden hatta birbirlerini itmesiyle sonuçlandığından adezyon için uygun polimerler olmayabilir. Poli-L-lizin katyonik bir polimer olmasına rağmen adezyon ölçümünde hücrelerin tutunmasını desteklememesi beklenmedik bir sonuç olmuştur. 30 dakika ve 6 saat sonra yapılan adezyon ölçümünde ilk 30 dakikada hiçbir şekilde hücreler tutunamazken 6 saat sonra sadece %2 oranında hücre tutunması gözlemlendi.

Yapılan adezyon ölçümü sonucu bir çok yüzeyde hücrelerin adezyon davranışı gösterdikleri gözlemlendi. Protein kaplı yüzey olan kollajen tip 1 ile diğer yüzeyler kıyaslandığında poli-L-prolin, poli-L-histidin ve kaplanmamış yüzeylerdeki hücre adezyon davranışları arasında çok küçük, anlamlı olmayan farklılıklar gözlemlendi. Kültür sırasında %10 FBS içeren besiyeri kullanımının da hücre adezyonunu desteklediği düşünülmektedir. Poli-L-prolin kaplı yüzeyin mezenkimal kök hücrelerin adezyon davranışı bakımından kollajen tip 1 kaplı yüzeye benzer özellik gösterdiği görüldü. Kollajen yapısı incelendiğinde kolajenin yapısının %12-17 arasında L-proline içerdiğinden tutunma özelliklerini benzer olması beklenmektedir (Szipak, 2011). Poli-L-prolin kaplı yüzeyde ilk andaki hücre tutunması ile 6 saat sonraki adezyon ölçümünün %100 oranında olması hücrelerin bu yüzeye sıkı bağlandığı ve ilk ve son 6 saat de yapılan ölçümlerde adezyon oranında bir düşüş olmaması ile hücrelerin bu yüzeye karşı afinitesi olduğu kanısına varılabilir.

Poli-L-lösin kaplı yüzeyde ilk 30 dakika ve 6 saat sonra yapılan adezyon ölçümünde %10'luk bir düşüş olduğu gözlemlenmiştir. Literatürde mezenkimal kök hücrelerin hücre dışı matriks ve diğer fiziksel uyarılarla mekanik regülasyonu ve adaptasyonu rapor edilmiştir. (Steward ve Kelly 2015) Poli-L-Lösin kaplı yüzeyde hücreler yüzeye ilk ölçüm sırasında bir afinite göstermiş olabilir fakat daha sonra yüzeye adapte olamayan hücrelerin integrin moleküllerinde azalma olmuş ve bu sebepten dolayı hücre adezyon oranında %10'luk bir düşüş gözlemlenmiş olabilir.

Çoğalma deneylerinde 0.,2 ve 4.gün sonucu yapılan ölçümlerde kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin çoğalma davranışlarında günlere göre farklılıklar gözlemlendi. 0.gün ekilen hücre sayısı aynı olduğu için bütün yüzeylerde yapılan WST-1 ölçümü sonucu

çoğalma değerlerinin aynı olduğu görüldü. 2. ve 4. günlerde çoğalma verimi poli-L-lizin ve L-glutamik asit kaplı yüzeylerde artış göstermezken poli-L-prolin, L-histidin, L-lösin, kollajen tip 1 kaplı ve hiçbir polimerle kaplanmamış cam yüzeylerde çoğalma verimi yüksek oranda arttığı gözlemlendi. poli-D-lizin kaplı yüzeyde çoğalma çok az miktarda görüldü. Yüzeylerin 4.gün çoğalma oranlarının adezyon oranları ile ilişkisi olduğu gözlemlendi. Hücrelerin tutunmasını çok iyi destekleyen poli-L-prolin, L-histidin ve kollajen tip 1 kaplı yüzeylerin, hücre çoğalmasını da desteklediği görüldü.

Hücrelerin farklı yüzeyler üzerinde 4 gün boyunca kültür edildikten sonra hücrede oluşan olası toksik etki LDH testi ile belirlenmiştir. Bu analiz sonucunda ilk gün %16-20, 2. gün %17-23 ve 4. gün %16-28 toksik değer ölçülmüştür. Kaplanmamış yüzey üzerindeki hücrelerin toksisite değerleri dikkate alındığında ciddi toksisite gözlemlenmemiştir. Kollajen tip-1 üzerinde kültüre edilen hücrelerin toksik değerleri de benzer şekilde diğer malzemelere yakın ve düşük hesaplanmıştır. Hücre sayılarında gözlemlenen düşüklük hücre toksisitesi ile açıklanması oldukça zordur.

Hücre canlılığı FDA-PI boyamaları ile incelendiğinde poli-L-lizin üzerinde ciddi hücre ölümlerinin olduğu gözlemlenmiştir. Daha önce WST-1 ile yapılan ve hücre tutunmasını ölçen deneyde canlı hücrelerin görülememesi bütün bu hücrelerin 6-24 saat içerisinde öldüklerini ortaya koymaktadır. Canlılıktaki bu azalma tutunmadan kaynaklanan sorunların dışında hücrelerde meydana gelen ve tutunma sonrasında poli-L-lizin polimerinin hücrenin apoptotik yollarını uyarması ile de açıklanabilir (Chan ve diğ. 2013). LDH ölçümlerinin düşük olmasından olayı nekroz olgusunun olmadığı görülmektedir.

Hücrelerin F-aktin uzantılarının falloidin ile işaretlenmesi, hücrelerin çevreye ya da içsel sinyallere gösterdiği cevabın hızı, hücre membranı absorpsiyonu ve hücre tutunması gibi hücresel özelliklerinin dolaylı olarak karşılaştırılmasına olanak sağlamaktadır (Le Clainche ve Carlier 2008; McGough ve diğ. 1997). Poli-L-lizin, poli-D-lizin, Poli-L-lösin ve poli-L-alanin kaplı yüzeylerin hücre tutunması ve çoğalması gibi temel unsurları çok iyi desteklemedikleri falloidin boyanmasıyla da ortaya konmuştur. Bu hücrelerde görülen yüksek F-aktin yapısındaki bozulma hücrelerde meydana gelen dejenerasyonu göstermektedir. Buna karşın poli-L-prolin ve poli-L-histidin üzerinde çoğalan hücreler kollajen tip-1 kadar iyi boyanmışlardır. Bu bulgu hücre tutunması ve çoğalması ile de paralellik göstermektedir.

Poli-L-lizin ve poli-L-glutamik asit üzerine ekilmiş olan hücrelerin tutunmadan kaynaklanan sorunlardan dolayı adipojenik ya da osteojenik farklılaşmaları mümkün olmamıştır. Adipojenik farklılaşma kimyasal olarak uyarıldığında ise yüzeyler üzerinde kültüre edilen hücreler arasında yalnız poli-D-lizin üzerinde olanların farklılaşmaya gitmediği ancak diğer hücrelerin farklılaştığı gözlemlenmiştir. Tutunmanın gözlemlenmesine rağmen hücrelerin poli-D-lizin üzerinde adipojenik farklılaşmaya gitmemesi hücrelerin yüzey üzerinde değişen gen ifadesi durumuyla açıklanabilir. Real Time PCR ile yapılan analizlerde kimyasal uyarıyı takiben farklılaşma belirteci PPAR γ ifadesinin arttığı gözlemlenmiştir. Poli-D-lizin dışındaki tüm yüzeylerde bu artış ciddi (29-68 kat) iken poli-D-lizin grubu hücrelerde artış 5,21 kat ile sınırlı kalmıştır. Kimyasal uyarı öncesinde poli-D-lizin yüksek PPAR γ ifadesi gösterse de bu durum farklılaşma sürecinde tersine çevrilmiştir. Farklılaşmaya alınmadan normal kültür besiyeri ile 21 gün boyunca kültüre edilen hücrelerin gen ifade profillerine bakıldığında poli-D-lizin kaplı yüzeydeki hücrelerde PPAR γ ve Collagen II gen ifadelerinin diğer grupların gen ifadelerine göre yüksek olduğunun görülmesi poli-D-lizin kaplı yüzeyin hücreleri kendiliğinden adipojenik ve kondrojenik farklılaştırmaya yönlendirme eğiliminde olduğu sonucuna varılabilir.

Kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin PPAR γ gen ifadesinin osteogenez baskıladığı, dolayısıyla Runx2 gen ifadesini baskıladığı bilinmektedir (Shockley ve diğ. 2009). Poli-D-Lizin kaplı yüzeyde kültüre edilen hücrelerin 21 gün sonunda PPAR γ genini ifade ettikleri fakat Runx2 genini ifade etmedikleri görülmüştür. PPAR γ geninin Runx2 ifadesini baskıladığı düşünülmektedir. Aynı zamanda Osteonectin kemik gelişimi ve mineralizasyonda rol oynayan bir genidir. Yapılan bir çalışmada mezenkimal stromal hücrelerde cbfa1/Runx2 geni RNA interfaz (siRNA) ile azaltıldığında osteocalcin, osteonectin, osteopontin, osterix ve alkalen fosfataz gibi osteoblasta özgü genlerin ifadesinde de düşüş gözlemlenmiştir fakat kondrosite özgü gen ifadelerini negatif veya açık bir şekilde etkilememiştir (Gordeladze ve diğ. 2008). Bu çalışmamızda poli-D-lizin kaplı yüzeyde kültüre alınan hücrelerde Runx2 geninin PPAR γ tarafından baskıladığı, Runx2 geninin baskılanmasının da osteonectin gen ifadesini yüksek oranda düşürdüğü sonucuna varılabilir. Fakat Kollajen tip 2 gen ifadesini etkilememiştir.

Kondrositler gelişimi ve devamlılıklarını sağlamak için birçok gen ifade ederler bu genlerden bazıları kollajen 2, tip 8, tip 11 ve aggrecan gibi matris proteinlerini kodlar, bazıları ise Sox9, Sox6, Msx2 gibi transkripsiyon faktörlerini kodlamaktadır (Goldring ve diğ. 2006). Yapmış olduğumuz çalışmada 21 gün boyunca poli-D-Lizin kaplı yüzeyde

kültüre edilen hücrelerde Sox9 geni ifade olmazken, Collagen II gen ifadesinin yüksek olduğu görülmüştür. Sox9 gen ekspresyonu erken dönem kondrojenik farklılaşma belirteci iken kollajen-2 'nin geç dönem olduğu daha önceden bildirilmiştir (Goldring ve dig. 2006). Hücrelerin kondrojenik farklılaşmaya gittiği kollajen-2'nin gen ekspresyonu göz önünde bulundurularak söylenmesi doğru olmayabilir. Hücrede kondrojenik hücelere yönelik belli bir farklılaşma gözlemlenmemiş olmasının yanı sıra yalnız kollajen-2'nin gen ekspresyonunun yükselmesi yeterli olmayabilir. Poli-L-alanin ve kollajen tip-1 için de bu durum geçerlidir.

Polimer kaplı yüzeyde normal kültür besiyeri ile kültüre edilen hücrelerde ins1, Gcg, MyoD1 genlerinin ifadelerinde artış gözlemlenmemiştir. Poli-L-prolin kaplı yüzeyin hücre adezyonunu (Çizim 4.2) ve hücre çoğalmasını (Çizim 4.4) kollajen tip 1 kaplı yüzey kadar desteklediği görülmüştür. Hepatosit hücre farklılaşma belirteci olan HNF4a 'nın gen ifadesi kollajen tip-1 dışında hiçbir hücrede gözlemlenmemiştir. Kollajen tip-1'in karaciğer dokusunda bulunmasından dolayı farklılaşmayı olumlu yönde etkilemiş olduğu görülmekle beraber sentetik polimerlerin bu konuda endoderm kaynaklı hücelere farklılaşmalarını desteklemedikleri gözlemlenmiştir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Yapılan bu tez çalışmasında farklı sentetik homopolimerlerin kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin canlılık, çoğalma ve adezyon davranışlarına olan etkisi incelenerek, hücrelerin homopolimer kaplı yüzeylerde hangi yöne farklılaşmaya gittiği gen ifade analizleriyle incelenmiştir. Poli-L-histidin ve poli-L-prolin kaplı yüzeylerin hem hücre çoğalması hem de hücre tutunmasını sağladığı aynı zamanda bu yüzeylerin hücreler üzerindeki toksik etkisinin düşük olduğu tespit edilmiştir. Poli-D-lizim kaplı yüzey üzerindeki hücrelerin tutunma ve çoğalma oranları kollajen tip 1 kaplı yüzey üzerindeki hücrelere göre az olmasına rağmen adipojenik ve osteojenik farklılaşmayı desteklediği gözlemlenmiştir. Bu çalışmadaki bütün bulgular göz önünde bulundurulduğunda, hücre kültürü çalışmalarında hayvansal kaynaklı bir kaplama materyali olmaksızın hücrelerin poli-aminoasit kaynaklı sentetik homopolimerler üzerinde de kültürünün mümkün olabileceği ortaya konmuştur. Bu homopolimerlerden bazılarının hücre canlılığı ve tutunmasını kollajen tip 1 kaplı yüzeye yakın oranlarda desteklediği dolayısıyla mezenkimal kök hücrelerin kültüründe kullanılabileceği sonucuna varılmıştır. Aynı zamanda bu polimerlerin hücreleri farklı oranlarda farklılaşmaya yönlendirdiği göz önüne alındığında kök hücre farklılaşma çalışmalarında destek materyali olarak kullanılabileceği düşünülmektedir. Ayrıca, hücrelerin canlılığını ve çoğalmasını sağlayan homopolimerlerin üzerinde daha kapsamlı araştırmalar yapılarak bu polimerlerin doku mühendisliği çalışmalarında yapı iskelesi tasarımında kullanılabileceği, hatta *invivo* çalışmalar ile desteklenmesi durumunda klinikte kullanımının bile mümkün olabileceği düşünülmektedir.

Kullanılan homopolimerlerin iyi karakterize edilmemiş ve birçoğunun daha önce hiç hücre kültürü çalışmalarında yer almamış olmasından dolayı sonuçların yorumlanmasında zorluklarla karşılaşmıştır. Ayrıca, malzemelerin sentezinin zor olması malzeme temininde de sıkıntıların yaşanmasına sebep olmuştur. Bu homopolimerlerin yeni ve kolay sentez yöntemleri geliştirilmesi bu konuda yapılacak ileri çalışmalara büyük katkılarda bulunacağı düşünülmektedir.

Mezenkimal kök hücreler üzerindeki etkileri göz önünde bulundurulduğunda poli-L-histidin ve poli-L-prolin sentetik polimerlerin doku mühendisliği açısından hücreleri çok iyi desteklediği bu çalışmada gösterilmiştir. Kültür ortamında çok daha iyi verim alabilmek için hücrelerin canlılık, çoğalma ve tutunmasını en iyi destekleyen bu farklı homopolimerlerin karışımları ile kültür yapılarak homopolimerlerin daha etkili sonuçlar vereceği düşünülmektedir.

Yapılan bu çalışmanın daha da geliştirilebilmesi için yapılacak olan sonraki *invivo* çalışmalarda bu homopolimerlerden küçük yapı iskeleleri oluşturularak immün sistemi baskılanmış hayvanlara nakil gerçekleştirilip polimerin kan analizleri ile immün cevap oluşturmadığı ve biyomalzemenin biyobozunurluğunun incelenmesine ihtiyaç duyulmaktadır.



KAYNAKLAR DİZİNİ

Ai H, Jones SA, Lvov YM. *Cell Biochem Biophys*. 39 (2003) 23.

Baharvand H, Hashemi SM, Kazemi Ashtiani S ve diğ. Differentiation of human embryonic stem cells into hepatocytes in 2D and 3D culture systems in vitro. *Int J Dev Biol*. 2006; 50(7):645-52.

Banker G ve Goslin K. *Culturing Nerve Cells*. MIT Press. 1991; p. 65. Cambridge.

Benns JM, Choi JS, Mahato RI ve diğ. pH-sensitive cationic polymer gene delivery vehicle: N-Ac-poly-(L-histidine)polyHis-graft- poly(L-lysine) comb shaped polymer, *Bioconjug. Chem*. 2000; 11 637-645.

Benns JM ve Kim SW. Tailoring New Gene Delivery Designs for Specific Targets. *J Drug Targeting*. 2000;8, 1-12.

Benoit, DSW, Schwartz MP, Durney AR. Small functional groups for controlled differentiation of hydrogel-encapsulated human mesenchymal stem cells. *Nat Mater*. 2008, 7, 816-823

Bergamini MF, Santos DP, Zanoni MVB. Screen-printed carbon electrode modified with poly-L-histidine applied to gold(III) determination. *J Braz Chem. Soc*. 2009; vol.20 no.1 São Paulo

Bottenstein JE. *Adv. Biosciences*. 1977; v. 61, 3

Chan FK, Moriwaki K, De Rosa MJ. Detection of necrosis by release of lactate dehydrogenase activity. *Methods Mol Biol*. 2013; 979.65-70.

Choi YH, Liu F, Park JS ve diğ. Lactose-poly(ethylene glycol)-grafted poly-L-lysine as hepatoma cell-targeted gene carrier. *Bioconjugate Chem*. 1998; 9, 708- 718.

Çakmak S. Nanobülten Aylık Nanoteknoloji ve Nanotıp Bilim Dergisi. 2011; Sayı: 14 Eylül, 12-20

da Silva ML, Chagastelles PC, Nardi NB. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci*. 2006; 119:2204-13.

Digenis GA, Gold TB, Shah VP. Cross-linking of gelatin capsules and its relevance to their in vitro-in vivo performance. *J PharmSci*. 1994; 83:915-921

Dominici M, Blanc K, Mueller I ve diğ. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006; vol. 8, No. 4, 315-317.

Eatemadi A, Daraee H, Zarghami N, Melat Yar H, Akbarzadeh A. Nanofiber: Synthesis and biomedical applications. *ArtifCellsNanomedBiotechnol*. 2016; 44:111-121.

Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, Discher DE. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell*. 2006; 126, 677-689.

Fisher OZ, Khademhosseini A, Langer R ve diğ. *Acc Chem Res* 2010, 43, 419

Fournier E, Passirani C, Montero-Menei CN ve diğ. Biocompatibility of implantable synthetic polymeric drug carriers: focus on brain biocompatibility. *Biomaterials*. 2003; 24, 3311-3331

Fridenshtein Ala. Stromal bone marrow cells and the hematopoietic microenvironment. *Arkh Patol*. 1982; 44(10):3-11.

General S ve Thunemann AF. pH-sensitive nanoparticles of poly(amino acid) dodecanoate complexes. *Int J Pharm.* 2001; 230 11–24.

Glowacki J ve Mizuno S. Collagen scaffolds for tissue engineering. *Biopolymers.* 2008; 89:338–344.

Goldring M.B, K. Tsuchimochi K, Ijiri K. The control of chondrogenesis *J Cell Biochem.* 2006; 97, pp. 33–44

Gordeladze JO, Noëlb D, Bony C ve diğ. Transient down-regulation of cbfa1/Runx2 by RNA interference in murine C3H10T1/2 mesenchymal stromal cells delays in vitro and in vivo osteogenesis, but does not overtly affect chondrogenesis. *Exp Cell Res.* 2008; volume 314, Issue 7, 15, Pages 1495–1506

Govey PM, Loiselle AE, Donahue HJ. Biophysical Regulation of Stem Cell Differentiation *Curr Osteoporos Rep.* 2013; 11:83–91

Ham RG ve McKeehan WL, *Methods in Enzymology.* 1979; vol. LVIII, Cell Culture (W. Jakoby and I.H. Pastan, ed.) Academic Press Limited, London, p. 49

Harris DC. *Análise Química Quantitativa.* 2001; 6th ed., LTC: Rio de Janeiro,

Hiyama E ve Hiyama K. Telomere and telomerase in stem cells. *Br J Cancer.* 2007; 96(7): 1020–1024. Published online 2007 Mar 13

Jacobson BS ve Branton D. *Science.* 1977; v. 195, 302

Jensen J, Hyllner J, Björquist P. Human embryonic stem cell technologies and drug discovery. *J Cell Physiol.* 2009; 219(3):513-9.

Jonathan MB, Joon-Sig C, Ram IM ve diğ. pH-Sensitive Cationic Polymer Gene Delivery Vehicle: N-Ac-poly(L-histidine)-graft-poly(L-lysine) Comb Shaped Polymer. *Bioconjugate Chem.* 2000; 11, 637–645

Karaoz E, Kabatas S, Duruksu G ve diğ. Reduction of lesion in injured rat spinal cord and partial functional recovery of motility after bone marrow derived mesenchymal stem cell transplantation. *Turk Neurosurg.* 2012; 22(2):207-17.

Karaöz E ve Ovalı E. Kök Hücreler. *Celepler Matbaası,* 2004; Trabzon, s: 17-63.

Kilian KA, Bugarija B, Lahn BT. *Natl. Acad. Sci. USA.* 2010; 107, 4872.

Klamer S, Voermans C. The role of novel and known extracellular matrix and adhesion molecules in the homeostatic and regenerative bone marrow microenvironment. *Cell Adh Migr.* 2014;8(6):563-77.

Kleinfeld ER ve Ferguson GS, *Science.* 1994; 265 370.

Kotov NA, Dekany I, Fendler JH, *J. Phys. Chem.* 1995; 99 13065.

Le Clainche C, Carlier M.F. Regulation of Actin Assembly Associated With Protrusion and Adhesion in Cell Migration. *Physiol. Rev.* 2008; 88:489-513.

Liu X, Holzwarth JM, Ma PX. Functionalized synthetic biodegradable polymers scaffolds for tissue engineering. *MacromolBiosci.* 2012; 12:911–919.

Lodish H, Berk A, Zipursky SL ve diğ. *Molecular Cell Biology.* 4th edition. 2000; New York: W. H.

Freeman

Lvov Y, Ariga K, Ichinose I, Kunitake T, *Am J. Chem Soc.* 1995; 117 6117.

- Lynn A, Yannas I, Bonfield W. Antigenicity and immunogenicity of collagen. *J Biomed Mater ResPart B Appl Biomater*. 2004; 71:343–354.
- Malafaya PB, Silva GA, Reis RL. Natural-origin polymers as carriers and scaffolds for biomolecules and cell delivery in tissue engineering applications. origin as and for and delivery tissue applications. *AdvDrugDelivRev*. 2007; 59:207–233.
- McCurdie MP ve Belfiore LA. Solid-state complexes of poly(L-histidine) with metal chlorides from the first row of the D-block. *J Polym Sci. B: Polym. Phys*. 1999; 37 301–310
- McGough A, Pope B, Chiu W ve diğ. Cofilin changes the twist of F-actin: implications for actin filament dynamics and cellular function. *J Cell Biol*. 1997; 138 pp. 771–781.
- McKeehan WL. Methods for Preparation of Media, Supplements, and Substrata for Serum-free Animal Cell Culture. 1984; *A.R. Liss*, NY p.209
- Midoux P ve Monsigny M. Efficient gene transfer by histidylated polylysine/pDNA complexes. *Bioconjug. Chem*. 1999; 10 406–411.
- Mulligan RC. The basic science of gene therapy. *Science*. 1993; 260, 926-932.
- Müller M. *Biomacromolecules*. 2001; 2 262.
- Myllyharju J. Prolyl 4-hydroxylases, the key enzymes of collagen biosynthesis. *MatrixBiol*. 2003; 22:15–24.
- Olsen D, Yang C, Bodo M ve diğ. Recombinant collagen and gelatin for drug delivery. *AdvDrugDelivRev*. 2003; 55:1547–1567.
- Özcan AG. Gene Therapy and Biosafety. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*. 2007; 64 (1): 35-50
- Patel DM, Shah J, Srivastava AS. Therapeutic Potential of Mesenchymal Stem Cells in Regenerative Medicine. *Stem Cells Int*. 2013; 496218, 15 pages
- Putnam D, Gentry CA, Pack DW. Langer R. Polymerbased gene delivery with low cytotoxicity by a unique balance of side-chain termini, *Proc Natl Acad Sci*. 2001; 98 1200–1205.
- Rashnonejad A, Durmaz B, Özkinay F. The principles of gene therapy and recent advances. *Ege Tıp Dergisi / Ege Journal of Medicine* 2014; 53(4):231-240
- Rettig MP, Ansstas G, DiPersio JF. Mobilization of hematopoietic stem and progenitor cells using inhibitors of CXCR4 and VLA-4. *Leukemia*. 2012; 26(1):34-53.
- Ross-Murphy SB. Structure and rheology of gelatins: recent progress. *Polymer*. 1992; 33:2622–2627
- Salasnyk RM, Williams AW, Boskey A ve diğ. Adhesion to vitronectin and collagen I promotes osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *J Biomed Biotechnol*. 2004; Apr 27; 2004(1): 24–3
- Salzig D, Leber J, Merkwitz K ve diğ. Attachment, Growth, and Detachment of Human Mesenchymal Stem Cells in a Chemically Defined Medium. *Stem Cells International Volume*. 2016.
- Samal SK ve Dubrue P. Cationic Polymers in Regenerative Medicine. *RSC Adv*. 2015; Cambridge, UK
- Shanmugam S, Manavalan R, Venkappayya D ve diğ. Natural polymers and their applications. *NatlProdRadiance*. 2005; 4:478–481.
- Shoichiro A, Takao K, Hiroyoshi K. Synthesis and Characterization of Methylated Poly(L-histidine) To Control the Stability of Its siRNA Polyion Complexes for RNAi. *Bioconjugate Chem*. 2012; 23, 1437–1442

- Singh A, Elisseeff J, Mater J. *Chem.* 2010; 20, 8832.
- Sonia TA ve Sharma CP. An overview of natural polymers for oral insülin delivery. *DrugDiscovToday.* 2012; 17:784–792.
- Steward AJ ve Kelly DJ. Mechanical regulation of mesenchymal stem cell differentiation. *J Anat.* 2015; 227(6):717-31.
- Sukhorukov G, Möhwald H, Decher G ve diğ. *Thin Solid Films.* 1996; 284 220.
- Szpak, Paul. Fish bone chemistry and ultrastructure: implications for taphonomy and stable isotope analysis. *Journal of Archaeological Science.* 2011; 38 (12): 3358–3372.
- Tang Z, Wang Y, Podsiadlo P ve diğ. *Adv Mater.* 2006;18 3203.
- Trounson A ve DeWitt ND. Pluripotent stem cells progressing to the clinic. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 17, 194–200 (2016)
- Ulery BD, Nair LS, Laurencin CT. Biomedical Applications of Biodegradable Polymers. *J Polym Sci B Polym Phys.* 2012.
- Uster, PS ve Deamer DW. pH-dependent fusion of liposomes using titratable polycations. *Biochemistry* 1985 ; 24, 1-8
- Wadhwa MS, Knoell DL, Young AP ve diğ. Targeted gene delivery with a low molecular weight glycopeptide carrier. *Bioconjugate Chem.* 1995; 6, 283-291.
- Wang CY ve Huang L. Polyhistidine mediates an acid dependent fusion of negatively charged liposomes, *Biochemistry* 1984; 23 4409–4416.
- Vinzenz X, Hüger E, Himmerlich M ve diğ. Preparation and characterization of poly(L-histidine)/poly(L-glutamic acid) multilayer on silicon with nanometer-sized surface structures. *J. Colloid Interface Sci.* 2012; 386 252–259
- Xu C, Inokuma MS, Denham J ve diğ. Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol.* 2001; 19, 971–974
- Yi-Fang Zeng, S-Ja Tseng, Ivan M Kempson, Shu-Fen Peng, Wen-Teng Wu, Je-Ruei Liu Controlled delivery of recombinant adeno-associated virus serotype 2 using pH-sensitive poly(ethylene glycol)-poly-L-histidine hydrogels. *Biomaterials.*2012; 12-01
- Zeltz C ve Gullberg D. The integrin-collagen connection - a glue for tissue repair. *J Cell Sci.* 2016; 129(4):653-64.
- Zhao W, Ji X, Zhang F ve diğ. Embryonic Stem Cell Markers Molecules. 2012; 17, 6196-6236
- Zhou, Zilan, Badkas ve diğ. Pharmaceutical nanotechnology: Herceptin conjugated PLGA-PHis-PEG pH sensitive nanoparticles for targeted and controlled drug delivery. *Int. J. Pharm.* 2015; 487(1-2):81-90

ÖZGEÇMİŞ

1. Bireysel Bilgiler

- Adı Soyadı: Merve GÖRGÜÇ
- Doğum yeri ve tarihi: Gölcük/KOCAELİ 13.09.1990
- Uyuşu: Türk
- Medeni Durumu: Evli
- Çalıştığı kurum: Kocaeli Üniversitesi Kök Hücre A.D
- İletişim Adresi ve telefonu: 05345945032

2. Eğitimi

Lisans: Uluslar arası Saraybosna Üniversitesi Mühendislik ve Doğabilimleri Fakültesi Biyoloji Bilimleri ve Biyomühendislik Programı (2013)

Yüksek Lisans: Kocaeli Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Kök Hücre ve Doku Yenilenmesi Programı (2016)

Yabancı dili: İngilizce

Bilgisayar: Microsoft Office 2007 (Word, Excel, Power Point, Access)

Diğer: MATLAB Software, Pymol ve Rasmol (Protein Structure Prediction Software), SPSS – (Statistical Package for the Social Sciences), Biyoinformatik Tooları

3. Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

Kök Hücre ve Hücrel Tedavi Derneği

4. Bilimsel Etkinlikler

- Aldığı burslar

Proje Adı ve Burs Alınan Süre:

İn Vitro Koşullarda Apoptoza Yönlendirilen Kondrositlerin Prolaktin Geni Aktarılmış Mezenkimal Kök Hücrelere Yanıtı (01.08.2014-01.08.2016)

Prematür Over Yetmezliği Oluşturulan Ratlarda VEGF+ Adipoz Doku Kaynaklı Mezenşimal Kök Hücre ve Trombositten Zengin Plazmanın Over Fonksiyonlarına Etkisi (01.11.2014-01.11.2016)

- Poster Bildirileri

Gorguc M. ve Duruksu G. Poli-L- ve Poli-D-Lizin Sentetik Homo-Polipetitlerin Kemik İliği Kökenli Mezenkimal Kök Hücreler Üzerine Etkilerinin Kollajen ile Karşılaştırmalı İncelenmesi. 18. Ulusal Biyoteknoloji kongresi. 18-19 Aralık 2015. Konya-Türkiye

Gorguc M.and Duruksu G. The role of charged synthetic homo-polymer coated surfaces on rat bone marrow derived mesenchymal stem cells; interaction of the cells with the charged surfaces. TERMİS EU- 2016. Uppsala- Sweden

- Kurslar

III. Temel klinik Proteomiks Uygulamaları Kursu (26–28 Mayıs 2014) Kocaeli Üniversitesi, Deneysel ve Klinik Araştırmalar Merkezi, Proteomiks Laboratuvarı, Umuttepe/ İzmit (Sertifikası Alındı)

Farelerde Embriyo Manipülasyonları ve Transgenik Fare Üretiminde Kullanılan Yöntemler Uygulamalı Eğitimi (22-26 Eylül 2014) TÜBİTAK Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü, Hayvan Genetiği ve Üreme Biyolojisi Laboratuvarı, Gebze /KOCAELİ (Sertifika Alındı)

EKLER

Bu çalışmada kullanılan sıçan kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücreler Kök Hücre ve Gen Tedavileri Araştırma ve Uygulama Merkezi (KÖGEM) hücre stoklarından alınarak kültüre edilmişlerdir. Bu hücreler 111M443 nolu TÜBİTAK projesi kapsamında izole ve karakterize edilmiştir. İlgili Etik Kurul Onay Belgesi aşağıda sunulmuştur.

PROJE NO: 2011/20	ARAŞTIRMANIN ADI	Sürekli Kültür Sisteminde Kollajen Kaplanmış Mikrotaşıyıcılar Üzerine İmmobilize edilmiş Mezenkimal Kök Hücrelerde Rekombinant Tirozin Hidroksilaz Enziminin Ekspresyonu	
BAŞVURU BİLGİLERİ	SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI KURUMU	Dr. Gökhan DURUKSU KOU Kök Hücre ve Gen Tedavileri AUM	
	YARDIMCI ARAŞTIRMACILAR	-	
DEĞERLENDİRİLEN BELGE	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ ve EKLERİ		
KARAR BİLGİLERİ	Yukarıda başvuru bilgileri bulunan araştırma projesi Kocaeli Üniversitesi Hayvan DeneYleri Yerel Etik Kurulu Yönergesine dayanarak gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemler açısından incelenmiş olup, araştırmanın yürütülmesinin etik açıdan uygun olduğu kararına varılmıştır.		
	KARAR NO:	KOU HADYEK 694-2011	
		KARAR TARİHİ:	14.06.2011
ETİK KURUL ÜYELERİ			
UNVANI/ADI SOYADI ETİK KURUL GÖREVİ	BİRİMİ	TOPLANTIYA KATILMA	KARARA KATILMA İMZA
Prof. Dr. ARZU Serpil ARSLAN Başkan	Kocaeli Üniversitesi (KOU) Tıp Fakültesi Radyoloji AD	<input type="checkbox"/> Katıldı <input type="checkbox"/> Katılmadı	
Yrd. Doç. Dr. Mine ŞEHİRALTI Başkan Vekili, Raportör	KOU Tıp Fakültesi Tıp Tarihi ve Deontoloji AD	<input type="checkbox"/> Katıldı <input type="checkbox"/> Katılmadı	
Prof. Dr. Tijen UTKAN Üye	KOU DeneY Hayvanları Araştırma Birimi, Tıp Fakültesi Farmakoloji AD	<input type="checkbox"/> Katıldı <input type="checkbox"/> Katılmadı	
Yrd. Doç. Dr. Ülkem CİLASUN Üye	KOU Diş Hekimliği Fakültesi Ağız, Diş, Çene Hastalıkları ve Cerrahisi AD	<input type="checkbox"/> Katıldı <input type="checkbox"/> Katılmadı	
Yrd. Doç. Dr. Fevzi UÇKAN Üye	KOU Fen-Edebiyat Fakültesi Genel Biyoloji AD	<input checked="" type="checkbox"/> Katıldı <input type="checkbox"/> Katılmadı	
Prof. Dr. Zafer CANTÜRK Üye	KOU Tıp Fakültesi Genel Cerrahi AD	<input type="checkbox"/> Katıldı <input type="checkbox"/> Katılmadı	
Prof. Dr. Güner ULAK Üye	KOU Tıp Fakültesi Farmakoloji AD	<input type="checkbox"/> Katıldı <input type="checkbox"/> Katılmadı	
Prof. Dr. Melda YARDIMOĞLU YILMAZ Üye	KOU Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji AD	<input type="checkbox"/> Katıldı <input type="checkbox"/> Katılmadı	
Doç. Dr. Murat KASAP Üye	KOU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji AD	<input type="checkbox"/> Katıldı <input type="checkbox"/> Katılmadı	
Öğr. Gör. Veteriner Hekim Cüneyt Özer Üye	KOU DeneY Hayvanları Araştırma Birimi	<input type="checkbox"/> Katıldı <input type="checkbox"/> Katılmadı	
Veteriner Hekim Akın Ziya ÜNAL Üye	Hayvan Hakları Derneği Veterinerler Odası	<input type="checkbox"/> Katıldı <input type="checkbox"/> Katılmadı	
Asiye ASLAN Üye	Emekli Öğretmen	<input type="checkbox"/> Katıldı <input type="checkbox"/> Katılmadı	

Kocaeli Üniversitesi Hayvan DeneYleri Yerel Etik Kurulu Sekreterliği, Umurtepe Yerleşkesi, Eski İstanbul Yolu 10.km, 41380 Umurtepe / İZMİT
Tel: 0 262 303 70 15; - Faks: 0 262 303 70 03

Tez Denetleme Listesi

Tez, aşağıdaki denetimler yapılarak tamamlanmıştır.

- Kapak ve iç kapak sayfalarında BİLİM UZMANLIĞI ya da DOKTORA şeklinde elde edilen unvanlar yazıldı (Kapak sayfasına danışman adı yazılmamalıdır).
- Kapak sayfasına mezun olunan PROGRAMIN (Anabilim dalının değil) adı yazıldı.
- Tez kapağı sırt kısmına kılavuzda belirtilen çizimde (yazımın yönüne dikkat!) ad, program, yıl yazıldı.
- Onay sayfası uygun çizimde hazırlandı (kazanılan unvanlar BİLİM UZMANLIĞI ya da DOKTORA olmalıdır) imzalatıldı (Enstitü Müdürü'nün imzası da gereklidir, imzaların aynı renk kalemle atılmasına dikkat edilmelidir).
- Dizinler kılavuzda belirtildiği gibi sıralandı.
- Ön sayfalara i, ii, iii şeklinde Roma rakamları konuldu.
- Sayfa numaraları kılavuzda belirtildiği şekilde konuldu.
- Sayfa düzeni kılavuzda belirtildiği şekilde yapıldı.
- Ana metin yazı boyutu 12 olacak biçimde basıldı.
- Dipnot yazı boyutu 10 olacak şekilde basıldı.
- Ana metin satır aralığı 1.5 olacak şekilde yazıldı.
- Kaynaklar abecesel sıralamaya göre yazıldı.
- Kaynak gösterme ilkelerine ve yazım kurallarına uyuldu.
- Ekler kılavuzda belirtildiği gibi verildi.

26/07/2016

Yrd. Doç.Dr. Gökhan DURUKSU





This document was created with Win2PDF available at <http://www.win2pdf.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.
This page will not be added after purchasing Win2PDF.