

T.C.  
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KOLLAGEN TİP-1 KAPLAMALI  
HİDROKSİAPATİD HÜCRE KÜLTÜRÜNDE  
OSTEOBLAST HÜCRELERİNİN MEKANİK  
YANITI**

ÖZGE F. ORAL

BİYOMEKANİK A.B.D.  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

İZMİR-2008

T.C.  
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KOLLAGEN TİP-1 KAPLAMALI  
HİDROKSİPATİD HÜCRE KÜLTÜRÜNDE  
OSTEOBLAST HÜCRELERİNİN MEKANİK  
YANITI**

BİYOMEKANİK A.B.D.  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

ÖZGE F. ORAL

Danışman Öğretim Üyesi: Prof.Dr. Hasan HAVİTÇİOĞLU

## YÜKSEK LİSANS TEZİ SINAV SONUÇ FORMU

**ÖZGE F. ORAL**, tarafından **PROF.DR. HASAN HAVİTÇİOĞLU** yönetiminde hazırlanan “**KOLLAGEN TİP-1 KAPLAMALI HİDROKSİAPATİD HÜCRE KÜLTÜRÜNDE OSTEOLAST HÜCRELERİNİN MEKANİK YANITI**” başlıklı tez tarafımızdan okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

.....  
\_\_\_\_\_  
Yönetici

.....  
\_\_\_\_\_  
Jüri Üyesi

.....  
\_\_\_\_\_  
Jüri Üyesi

\_\_\_\_\_  
Prof Dr.Gül GÜNER AKDOĞAN

Müdür

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

## İÇİNDEKİLER

1.	ÖZET .....	1
2.	ABSTRACT .....	2
3.	GİRİŞ VE AMAÇ .....	3
4.	GENEL BİLGİLER: .....	4
4.1.	Kemik .....	4
4.1.1.	Kemik Yapısı ve Organizasyonu .....	6
4.1.1.1.	Kemik Matriksi .....	6
4.1.1.2.	Kompakt Kemik Dokusu ve Yapısı .....	6
4.1.1.3.	Spongiyöz Kemik Dokusu (Trabeküllü Kemik) .....	9
4.1.2.	Kemik Dokunun Hücreleri .....	10
4.1.2.1.	Osteoprogenitör Hücreler .....	10
4.1.2.2.	Osteoblastlar .....	10
4.1.2.3.	Osteositler .....	10
4.1.2.4.	Osteoklastlar .....	11
4.1.3.	Kemik İliği Kök Hücrelerinin Farklılaşması .....	14
4.1.3.1.	Alkalın Fosfataz (ALP) .....	16
4.1.4.	Doku ve Yapı İskeletleri .....	17
4.1.4.1.	Doku Mühendisliği .....	18
4.1.4.2.	Skafold Malzemeleri .....	20
4.2.	Amaç .....	21
5.	YÖNTEM .....	23
5.1.	Kollagen Tip1 Kaplamalı Hidroksiapatid Skafoldlarının Kaplaması .....	23
5.1.1.	Kollajenlerin Apatit İle Kaplanması; .....	24
5.2.	In Vitro Hücre Kültürlerinin Hazırlanması .....	25
5.2.1.	Kullanılan Reaktif ve Malzemeler: .....	25
5.2.2.	Hazırlanan Solüsyonlar: .....	25
5.2.3.	Farklı Skafoldlarda Fibroblast Gelişimi .....	28
5.2.4.	Skafold Üzerinde Osteojenik Farklılaşma .....	29
5.3.	Osteoblast Hücrelerine Canlılık Testi .....	31
5.3.1.	Tripan Mavisi Canlılık Testi .....	31
5.4.	Osteoblast Hücre Sayımı .....	31
5.4.1.	Hücre Sayımı .....	31
5.5.	Osteoblastların Alp Aktivitesi .....	32
5.6.	Osteoblastların Alizarin Kırmızı Boyanması .....	33
5.7.	Farklı Skafoldlarda Osteoblast Gelişimi .....	33
5.7.1.	Hydroxyapatite (HA) ve Tip 1 Kollagen .....	33
5.8.	Osteoblast Geliştirilmiş Skafoldlarda TEM Ve SEM Görüntüleme .....	42
5.8.1.	Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Görüntüleme: .....	42
5.8.1.1.	Kullanılan reaktif ve malzemeler .....	42
5.8.2.	Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM) Görüntüleme: .....	42
6.	KISITLILIKLAR .....	44
7.	TARTIŞMA .....	45
8.	KAYNAKLAR .....	48

## **TABLO LİSTESİ**

Tablo 1: Kemik Dokusu Tablosu.....	13
Tablo 2: İyon konsantrasyonları.....	23
Tablo 3: YBS çözeltilisinin hazırlanmasında kullanılan kimyasal maddeler.....	24
Tablo 4: Farklı skafoldlarda fibroblast gelişimi; skafold ve hücrelerin dağılımı.....	30
Tablo 5: Skafold üzerinde osteojenik farklılaşma.....	30

## SEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Dekalsifiye edilmiş kompakt (lamelli) kemik dokusunda lameller (L), havers kanalı (H) ve osteositler görülüyor.....	5
Şekil 2. Masere kemikte osteositlerin bulunduğu osteoplastlar ve kanaliküller .....	5
Şekil 3. Kemik dokusundaki kanaliküller içinde osteositin yerleşimi. ....	7
Şekil 4. Kompakt ve spongiyöz kemiğin şematik görünümü. ....	8
Şekil 5. Hücre yerleşimi. ....	12
Şekil 6. Hücre yapılanması. ....	12
Şekil 7. Alkaline Phosphatase. ....	17
Şekil 8. Osteoblast hücrelerinin Phasecontrast mikrokopi görüntüsü. ....	30
Şekil 9. Thoma lamı. ....	31
Şekil 10. Thoma lamı sayım çizgileri. ....	32
Şekil 11. Collagen tip1deki osteoblastlar. ....	41
Şekil 12. Osteoblast hücrelerinin minerilizasyonu. ....	41

## 1. ÖZET

### **KOLLAGEN TİP-1 KAPLAMALI HİDROKSİAPATİD HÜCRE KÜLTÜRÜNDE OSTEOBLAST HÜCRELERİNİN MEKANİK YANITI**

Kemik hücresi biyolojik ve mekanik birçok etken altındadır. Hücrenin mekanik etkiye cevabı belli değildir. Hücre kültürleri invivodakine yakın ortamlar içine ekilmelidir. Üç boyutlu, ağsı bir yapıda olan ve mekanik uyarım yapılabilen kollagen uygun bir ortam gösterir.

Hücrenin invivo ortamına benzer hidroksiapatid kaplı kollagen jel yapı iskeleti içine osteoblast hücreleri ekilip gelişen hücrelerin; hücre morfolojisi, hücre sayısına, yapı iskeletindeki dağılımına ve oluşabilecek diğer değişikliklerin saptanması amaçlanmıştır. Ticari satılan kollagen jel bir çok kimyasal işlemde sonra hidroksiapatid kaplanarak çeşitli yeni üç biyomalzeme üretilmiştir.

HA kaplı üç farklı kollagen jelden oluşan biyomalzemelerin içine İnsan kemik iliğinden elde edilmiş osteoblast hücreleri yapı iskeletine ekildikten sonra Alkalen fosfataz (ALP) düzeyleri hücrenin matriks aktivitesini ve hücre sayısını belirlemek için ölçüm yapıldı. TEM ve SEM görüntüleri çekildi. Yapı iskeleti içine eklenmiş hücrelerin gözenek içindeki yerleşimi taramalı elektron mikroskopisine bakılarak değerlendirildi.

**Anahtar sözcükler:** Osteoblast, Kolajen, Hidroksiapatid.

## 2. ABSTRACT

### **MECHANICAL EFFECTS OF HUMAN OSTEOLAST CELLS CULTURED ONTO THE ABSORPTION OF COLLAGEN TYPE-1 TO THE SURFACE OF HYDROXYAPATITE**

Osteoblast cells are affected from many mechanical and biological factors; there is no certain answer about mechanical behaviors of them. Cells should be cultured on in vivo-like environment such as collagen gel. The collagen network in bone has three-dimensional structure and appropriate mechanical characteristics.

Human osteoblast-like cells are migrated in culture onto the absorption of collagen type-1 to the surface of hydroxyapatite (HA). In vitro cell responses were evaluated in terms of cell morphology, which is determined by cell count, and also other differentiations, which are examined using scanning electron microscopy (SEM).

Three different collagen-hydroxyapatite composite formations are produced by chemical composition methods. After culturing bone marrow derived human osteoblast cells, alkaline phosphatase (ALP) activity and osteoblast cell surface and/or the extracellular matrix activity are pictured by both Transmission Electron Microscope (TEM) and scanning electron microscopy (SEM).

**Keywords:** Osteoblast, Collagen, Hydroxyapatite



### 3. GİRİŞ VE AMAC

Kemik hasarlarının tedavisinde kullanılan otojen kemik yamalarının (greftlerinin) elde edilmesi zor olup, hasta rahatsızlığını artıran bir işlemdir. Ayrıca, otojen veya allojen yama alınacak kemik bölgelerinin sınırlı olması nedeniyle yamalar yetersiz kalmaktadır. Bu sorunların giderilmesinde otojen veya allojen erişkin kökhücrelerin kullanım üstünlükleri son yıllarda sıklıkla gündeme gelmektedir.

Kökhücrelerin bölünerek benzer hücreler meydana getirme ve yüksek farklılaşma özelliği sayesinde hasarlı doku tamiri mümkün görünmektedir. Böylece, doku kaybı ile işlevlerini yitirmiş olan organların iyileşmesinde katkılarının olabileceği düşünülmektedir. Son zamanlarda konuyla ilgili çalışmalar hız kazanmış, miyokard, böbrek, kemik dokusu ve eklem kıkırdak hasarlarında kökhücrelerin tedavi amaçlı kullanılabileceği bildirilmiştir.

Mezenkimal kökhücreler, yeni isimlendirme ile mezenkimal stromal hücreler (MSH) kolay çoğalma, yüksek farklılaşma ve bağışıklık baskılayıcı (immünsupresif) özellikleri nedeniyle bu amaç için çok uygun hücreler olarak gözükmekte ve kemik iliğinden kolaylıkla elde edilebilmektedir.

Mezenkimal stromal hücrelerin kemik iliği dahil tüm dokularda çok az sayıda bulunması nedeniyle deneysel veya klinik olarak kullanımı için canlı-dışı (*in vitro*) kültür besiyerine ekilmesi gerekir. Çoğalan hücrelerin istenilen doku yönünde farklılaşmasını sağlamak için de gerekli büyüme faktörleri veya diğer uyanların ortama eklenmesi gerekmektedir. Etik kurul onayı alınarak sağlıklı vericilerden çekilmiş kemik iliğinden MSH'lerin ayrılması ve canlı-dışı çoğaltılması tekniği, daha sonra da osteoblast farklılaşma kapasitesileri araştırılmıştır (1).

Ayrıca kütürlenmiş kemik hücrelerinin transplantasyonunun tekrar kemik üretme terapisine bir aday olması umulur. Kültürlenmiş kemik hücrelerinin transplantasyonu klinik açıdan önemlidir; bununla beraber, birkaç sorun klinik uygulamadan önce çözülmeyi beklemektedir. Ototrafitlerin çoğu kez yeterli olmadığı durumlarda, allograft veya biyomalzeme kullanılması sözkonusudur. Herşeyden önce skafoldunda uygun materyaller gereklidir. Klinik kullanım için ideal skafoldlar sadece iyi biyoyumluluğa ve kemiği bütünleştirici özelliklere değil fakat aynı zamanda mekanik güce ve biyolojik yolla parçalanabilme yeteneğine sahip bir gözenekli seramik materyal olabilir. İyi mekanik özellikler sahip tipik bir seramik materyal hidroxyapatite (HA)'dır. Bizim çalışmamız skafoldun ve invitro kültür yönteminin iyileştirilmesine odaklanır (2).

#### 4. **GENEL BİLGİLER:**

##### 4.1. **Kemik**

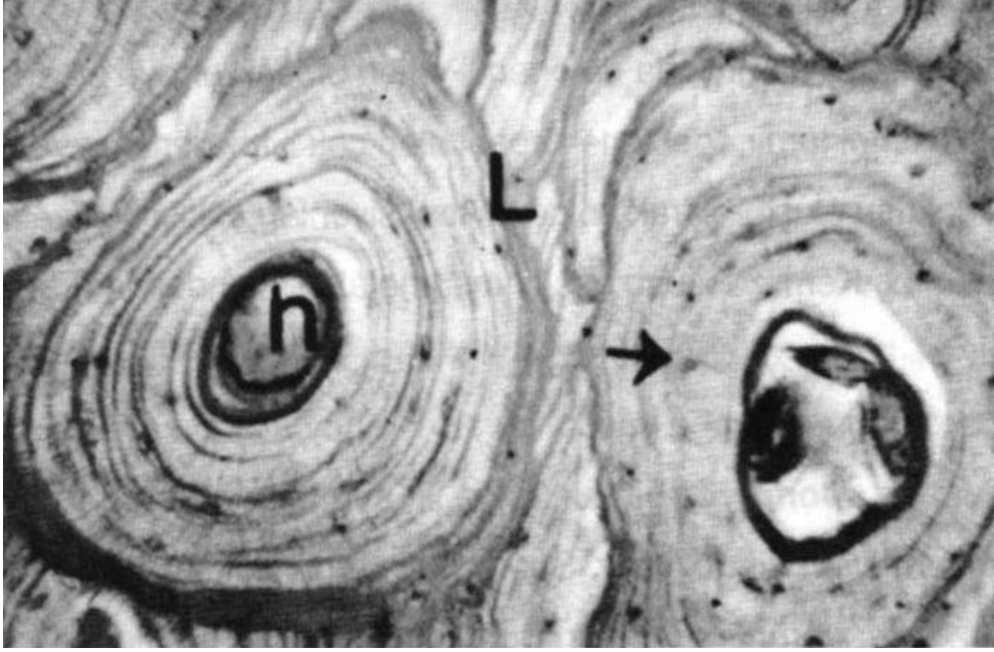
Organizmadaki diğer bağ dokularında olduğu gibi kemik dokusu da hücreler, lifler ve temel maddeden oluşmuş ancak yapısındaki kalsiyumdan ötürü sertleşmiş bir destek dokusudur. Kemikler herşeyden önce iskelet sisteminin en önemli yapıtaşdır. Ayrıca kaslarla beraber vücut hareketini de sağlarlar. Sertliğinden dolayı hayati önemi olan organların korumasını da üstlenmiştir. Örneğin kafatasında beyin, omurgayla omuriliği, göğüs kafesiyle başta kalp olmak üzere diğer organları çevreleyerek korumaya almaktadır.

Bunlar dışında kan hücrelerinin yapıldığı kemik iliğini içermesi ve metabolik önemi olan kalsiyum deposu olarak ele alınacak olursa, kemiğin destek dokusu olma dışında da önemli rolleri olduğu ortaya çıkar. Kemiklerin kırılması durumunda kendilerini tamir edebilme kapasiteleri çok iyi gelişmiştir ve böylece bozulan bölgede yeni kemik dokusu oluşturularak bölgenin fonksiyonları eskisi gibi yerine getirilir. Kemik dokusu beslenme, metabolik, endokrin (hormonal) ve mekanik koşullara çok duyarlı bir dokudur. Bu nedenle aktif doku olma özelliğini taşır.

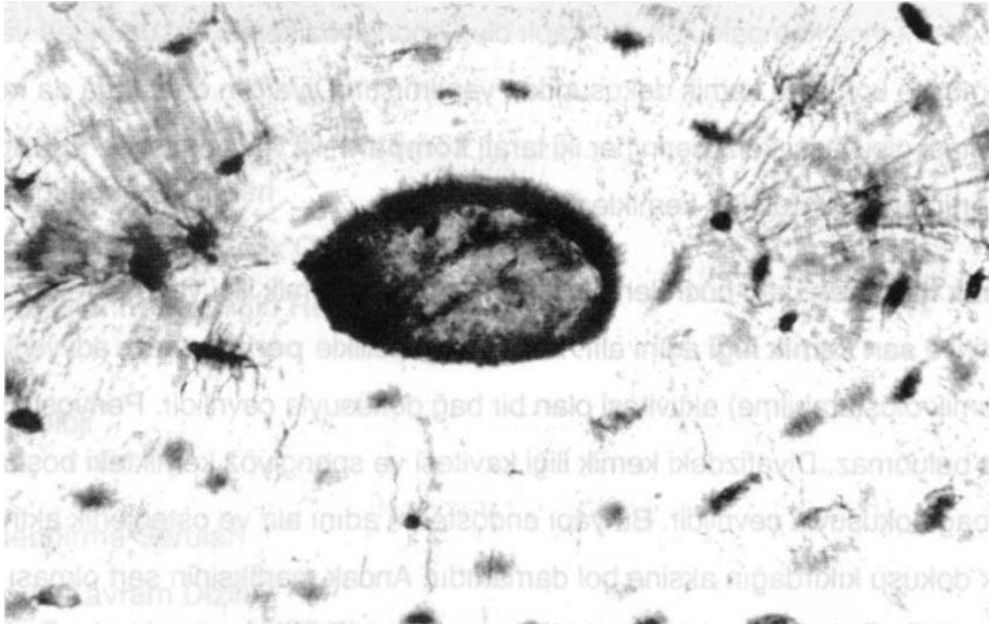
Kemik doku organik ve inorganik komponentlerden yapılmıştır. Kemiğin kompakt ve spongiyöz olmak üzere iki ayrı formu vardır. Kompakt kemik sıkı tertiplenmiş, boşluk içermeyen bir dokudur. Spongiyöz kemik dokusunun ise gevşek, labirent veya bol boşluklu tarzda bir görünümü vardır. Bu boşluklar kemik iliği ile doludur. Vücudun femur gibi uzun kemik içeren bir ekstremitesi ele alınacak olursa, bu kemiğin iki uç tarafı veya eklemlerinin bulunduğu bölge epifiz, bunların arasında yeralan uzun bölgeye ise diyafiz adı verilir. Epifiz bölgesi aynı zamanda kemiğin oluşumunda rol oynar (epifiz plağı). Epifiz kısmı ince kompakt kemikle kaplı olup spongiyöz kemik dokusundan yapılmıştır. Diyafiz bölümü ise kompakt kemik dokusundan yapılmıştır. Diyafizin ortasında da kemik iliği bulunur. Kafatası gibi yassı kemiklerin her iki tarafı kompakt, içi veya ortası ise spongiyöz kemik olarak tertiplenmiştir (diploe kemikler).

Kırmızı kemik iliğinden kan hücreleri oluşurken, diğer tip kemik iliği yağ hücrelerinden meydana gelmiştir ve sarı kemik iliği adını alır. Kemikler genellikle periosteum adı verilen ve osteojenik (kemik oluşturabilme) aktivitesi olan bir bağ dokusuyla çevrilidir. Periosteum eklem kıkırdağında bulunmaz. Diyafizdeki kemik iliği kavitesi ve spongiyöz kemikteki boşlukların etrafı ince bir bağ dokusuyla çevrilidir. Bu yapı endosteum adını alır ve osteojenik aktiviteye sahiptir. Kemik dokusu kıkırdağın aksine bol damarlıdır. Ancak matiksinin sert

olması diffüzyona elverişli değildir. Dolayısıyla dokunun beslenmesi kanaliküllerle olmaktadır. Bu kanaliküllerin içinde kemik hücreleri yerleşiktir. Hücreler sitoplazmik uzantılarıyla birbirleri ve komşu damarlarla ilişki kurarak metabolizma gerçekleştirilir.



Şekil 1. Dekalsifiye edilmiş kompakt (lamelli) kemik dokusunda lameller (L), havers kanalı (H) ve osteositler görülüyor



Şekil 2. Masere kemikte osteositlerin bulunduğu osteoplastlar ve kanaliküller

#### 4.1.1. Kemik Yapısı ve Organizasyonu

Kemikler organik ve inorganik bölümlerden oluşmuştur. Ayrıca konunun başında söz edildiği gibi kemikler yapısal olarak da 2 farklı formdadırlar: kompakt ve spongiyöz kemikler.

##### 4.1.1.1. Kemik Matriksi

###### 4.1.1.1.1. Organik Bölüm

Bu yapının büyük bölümü kollajen liflerden (Tip I), protein ve glikozaminoglikanlardan oluşan temel maddeden (amorf madde) yapılmıştır. Gelişmiş bir kemik dokuda lifler paralel ve belirli aralıklarla aralarında porlar bırakacak şekilde yerleşmiş olup aralarında hidroksiapatit kristalleri yerleşiktir (dokuya sertlik veren maddelerdir). Kemik matriksi genel olarak asidofildir. Doku kollajenlerden zengin olduğundan bu liflere uygun boyalarla gayet iyi boyanırlar. Histolojik incelemede dokuya eğer dekalsifikasyon uygulanırsa inorganik tuzların ortadan kalkmasıyla kemik demineralize olur ve yumuşar, ancak mikroskobik yapısını, şeklini ve sağlamlığını korur (şekil:1). Bunun yanısıra histolojik teknik organik elemanların ortadan kaldırılmasına yönelik ise kemiğin sağlamlığı ve esnekliği bozulur ve kolay kırılır hale gelir. Başka bir anlatımla kemiğin organizmadaki gerekli işlevlerini tam olarak yerine getirebilmesi ancak dokudaki organik, inorganik elemanların ve matriksin uyumlu birlikteliğine bağlıdır.

###### 4.1.1.1.2. İnorganik Bölüm

İnorganiklerin başında kalsiyum, fosfat, sitrat, magnezyum gibi maddeler gelir. Kalsiyum ve fosfat hidroksiapatit kristalleri şeklindedir ve kemik kollajenlerinin yanında amorf madde ile birlikte içiçe organize olmuşlardır. Hidroksiapatit kristallerinin kemikteki önemi, kollajenlerle beraber kemik sertliğini ve dayanıklılığını sağlamasıdır. İnorganik maddeler kemiğin kuru ağırlığının yaklaşık %50'sini oluşturmaktadırlar.

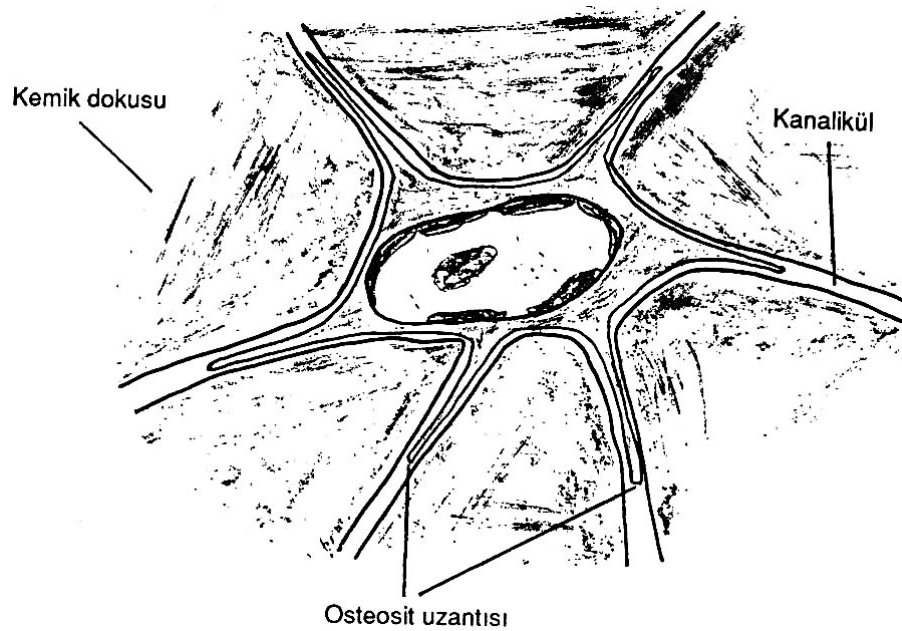
###### 4.1.1.2. Kompakt Kemik Dokusu ve Yapısı

Kompakt bir kemiğin (örneğin femurun diyafizi) mikroskobik incelemesinde dokunun havers kanalları etrafında 3-7 µm kalınlıktaki lamellerden, hücrelerden ve sert bir matriksten oluştuğu görülür (şekil:2). Düzgün ve boşluk içermeyen bir tertiplemede olan kompakt kemikteki osteoplastlar (laküna) dallıdır ve kanalikül adını da alır. İçine ise osteositler (kemik hücreleri) yerleşmiştir. Kompakt kemiklerdeki bu kanaliküller her bir lamelde birçok sayıda olduğundan ait olduğu Havers sisteminin en içinden en dış lameline kadar temas kurarlar.

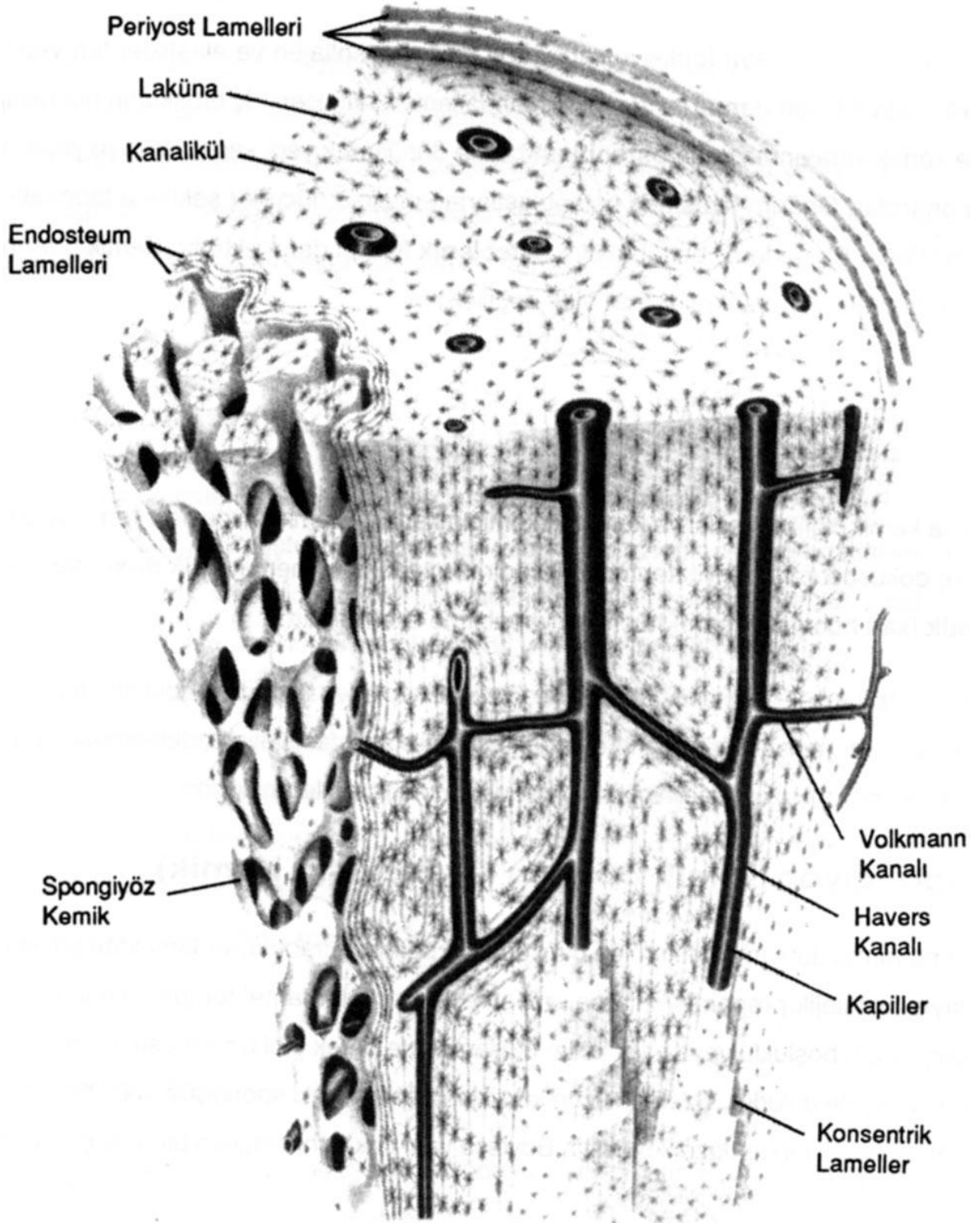
Böylece dokuda bir ağ oluşturarak metabolizmanın olaylanmasını sağlarlar. Lamellerin sayısı 4 ile 20 arasında değişmektedir. Özellikle enine yapılmış bir kemik kesitinde bu Havers sistemi konsetrik tertiplenmiş halkalar şeklinde ortaya çıkar. Dokunun incelenmesinde lamel sistemi şöyle sınıflandırılır:

1. Havers Lamelleri
2. Periyostun altında dış esas lameller
3. Endosteum etrafındaki iç esas lameller
4. Osteonların arasındaki ara lameller.

Bir Havers kanalıyla onun etrafındaki lamellerin tümüne birden osteon adı verilir. Bir Havers kanalı yan dallarla kemik iliği ve periyosteumla bağlantı kurar. Bu yan dallara Volkmann Kanalları adı verilir. Haversteki damarlar longitudinal tertiplenmiş olup yan dallarıyla da komşu damarlarla temastadırlar. Havers kanalı 20-100 µm çapındadır ve 1-2 adet damar içerir. Damarlar genellikle kapiller, postkapiller venül veya seyrek olarak arteriol olabilir (şekil:3). Sert bir matrikse sahip olan kemik dokusunda diffüzyon olanağı olmadığından kanal ve kanaliküllerle kemiğin dışından içine kadar ilişki kurulur ve bu şekilde metabolizma için gerekli maddeler damar ve kanaliküllerle hücrelere kadar ulaşır (şekil:4).



Şekil 3. Kemik dokusundaki kanaliküller içinde osteositin yerleşimi.



Şekil 4. Kompakt ve spongiöz kemiğin şematik görünümü.

#### 4.1.1.2.1. *Periosteum*

Bağ dokusundan yapılmış olan bu tabaka eklem yüzeyleri hariç tüm kemiği dıştan çevreler. Periosteumun; kemiğe desteklik yapmasında, beslenmesinde, gelişiminde ve tamir olaylarında büyük önemi vardır. Yapısında kollajen ve elastik lifler bulunur. Ayrıca Sharpey lifleri adı verilen kollajenler de matriks içine doğru ilerleyerek periosteumu kemiğe bağlamaktadır. Bunlar dış esas lameller ile ara lamellere kadar uzanabilirler. Perikondrium bol damar içerir ve 2 tabakası bulunur:

- Dış tabaka: daha çok sıkı bağ dokusu yapısındadır.
- İç tabaka: gevşek bağ dokusunda olup hücreden zengindir.

Tabakaların her birinin ayrı fonksiyonları vardır. Dış kat, kollajen ve elastiklerden yapılmıştır, metabolizmada rol alan damarları (aynı zamanda lenfatikleri) içerir. İç tabakanın hücreleri ise özellikle kemik yaralanmasında osteoblast haline dönüşerek yeni kemik dokuyu yapar ve o bölgeyi onarırlar. Onarım sırasında osteoblastların epitelloid hücreler şeklinde tabakalaşma yaptığı gözlenir. Bu nedenle bu tabakaya osteojenik kat da denmektedir. Kemik onarımına katılan bu hücreler normal koşullarda aktif değildir.

#### 4.1.1.2.2. *Endosteum*

Bu tabaka kemik iliği kavitesini ve kompakt kemiğin kanal sistemlerini çevreleyen ince bir retiküler bağ dokusudur ve periosteumdan incedir. Bu tabakanın hem kemik doku hem de hemopoetik (kan hücresi yapımı) hücreleri yapabilme özelliği vardır. Görüldüğü gibi kemiğin belirli boşluklarını ve yüzeyini kaplayan bu iki bağ dokusu tabakası çok önemli rolleri üstlenmiş olduğundan herhangi birisinin bozulması veya zedelenmesi durumunda kemik için hayati önemi olan fonksiyonlar da olumsuz etkilenmektedir.

#### 4.1.1.3. *Spongöz Kemik Dokusu (Trabeküllü Kemik)*

Kemiğin bu formu da kompakt kemiğe benzemekle beraber trabeküller lamelden yoksundur. Dolayısıyla histolojik preparasyonlarda enine kesitte sirküler lamel tertiplenmesi görülmez. Buna karşılık bol boşluklu veya trabeküller oluşan adeta petek gibi bir dokusu vardır. Bu boşluklar kemik iliği ile doludur. Özellikle uzun kemiklerin epifizindeki spongöz

doku basıncının veya kuvvetin geldiği yönde düzenlenmiştir. Böylece yapı çok daha sağlam bir hale gelmektedir.

#### **4.1.2. Kemik Dokunun Hücreleri**

Kemik dokusunda 4 tip hücre ayırt edilir:

- Osteoprogenitör hücre
- Osteoblast
- Osteosit
- Osteoklast

##### *4.1.2.1. Osteoprogenitör Hücreler*

Kemiğin ana hücreleri olup mezanşimden kaynaklanırlar. Genellikle soluk boyanan nükleuslu, asidofilik sitoplazmalı hücreler olup endosteumda, periyosteumun iç katında ve Havers kanalları gibi bölgelerde bulunurlar. Osteoprogenitor hücreleri mitozla olgun kemik hücrelerine farklılaşmaktadır. Bu hücreler kemik büyümesinde, zedelenmesi veya kırık tamirinde aktif hale gelerek bölünürler ve osteoblast hücrelerine dönüşürler.

##### *4.1.2.2. Osteoblastlar*

Kemik dokusunda matriksin yapımında sorumlu olan bu hücreler, kübik ya da alçak prizmatik boylu hücrelerden yapılmıştır. İri nükleusları olup sitoplazmaları koyu bazofiliktir. Elektron mikroskopunda Golgi ve endoplazmik retikulumları iyi gelişmiş olarak görülür. Lipid damlacıkları ve lizozom benzeri yapılar da sitoplazmada yer alır. Hücreler birbirleriyle kısa çıkıntılarla ilişkidir (şekil:5). Kuvvetli alkalin fosfataz ve PAS pozitif reaksiyon verirler. Alkalin fosfataz hem matriks hem de kalsifikasyonda rol alan önemli bir enzimdir. Enzim fosfatın hidroliziyle lokal inorganik fosfat konsantrasyonunu arttırmakta ve bunun kalsiyum iyonlarıyla birleşmesi sonucu kalsiyum tuzları halinde dokuya çökmesi sağlanmaktadır. Organizmada kemik yapım hızının ölçülmesi istendiğinde de kandaki alkalin fosfataz enzimi seviyesine bakılmaktadır.

##### *4.1.2.3. Osteositler*

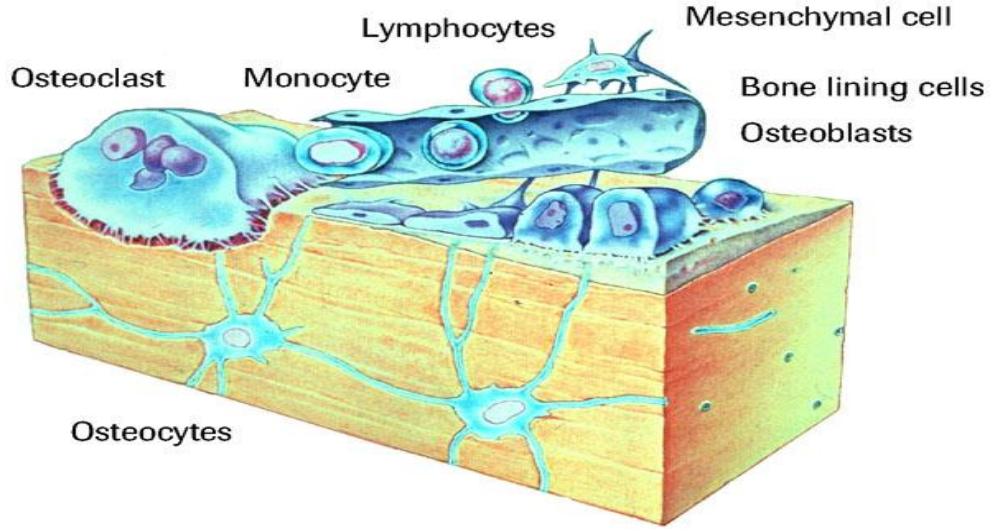
Kemiğin esas hücreleri olup, olgun kemik hücresi adını da alır. Bu hücreler lakünaları içinde yerleşmişlerdir. Gelişimlerini tamamlamış olduklarından sentez yapamazlar. Bu



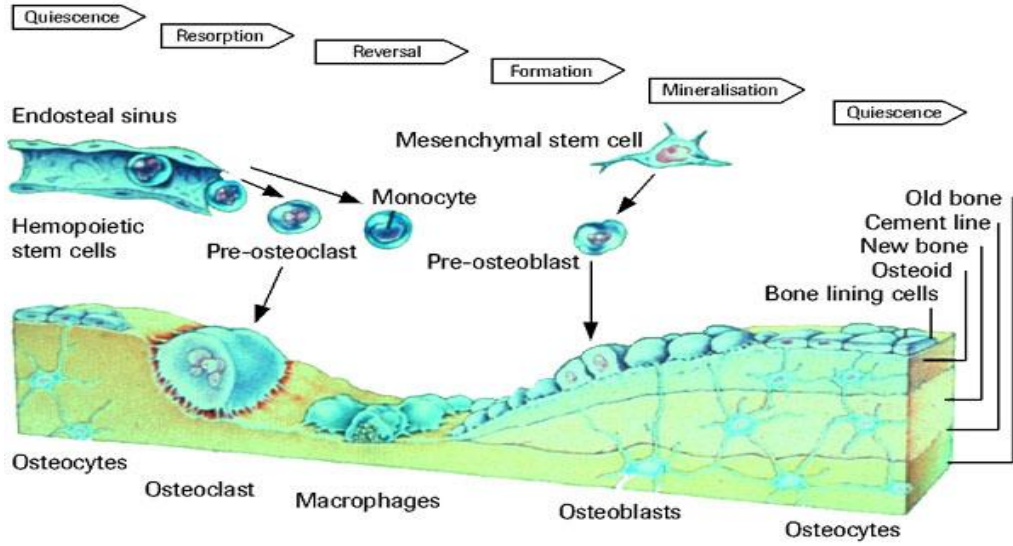
nedenle granüllü ER ve Golgilerinde azalma görülür. Sitoplazma bazofilisi de daha azdır. En tipik özelliklerinden biri de uzantıdır. Konunun başında değindiğimiz gibi bu sitoplazmik uzantılar kanaliküller içinde seyredir. Bu şekilde her hücre lakünası içine gömülü kalmayıp birbirleriyle temas kurmaktadır. Bu noktalarda neksuz ve aralıklı bağlantı kompleksleri olduğu elektron mikroskopunda gösterilmiştir (şekil:6). Osteositlerin kalsiyumun kemiklerden kana verilmesinde ve hameostatik mekanizmayı düzenleme (kalsiyum konsantrasyonunu düzenleyerek) gibi önemli metabolik rolleri de vardır. Hücrelerin ölmesi halinde ise matrikste rezorbsiyon olayı görülür.

#### 4.1.2.4. Osteoklastlar

Kemikte yıkımı veya kemik rezorbsiyonunu gerçekleştiren hücrelerdir. 20-100 µm çapında çok büyük hücrelerdir ve 2 den 50 kadar değişen sayılarda nukleusları bulunur (tablo:1). Fonksiyonlarından dolayı makrofaj türü hücre olarak da kabul edilirler. Ayrıca mononükleer fagositer sisteme dahil hücrelerdir ancak aktif fagositoz yapmazlar. Osteoklastlar içerdikleri kollagenaz ve diğer proteolitik enzimlerle kemiği rezorbe etmektedirler. Eritici enzimlerle eritilen kemik dokusu uzantılarla hücre içine alınmaktadır. Osteoklastların sitoplazmaları genellikle asidofil ve vakuollüdür. Hücrelerin çok sayıda lizozomları, mitokondriyonları ve iyi gelişmiş bir Golgi kompleksleri vardır. Bu hücreler kemikte Howship lakünası adı verilen boşluklarda yerleşmişlerdir. Osteoklastlarda kemiğe bitişik yüzlerinde hücre yüzeyinin genişletilmesinde rol oynayan fırça kenarlı hücre uzantıları gözlenir. Osteoklastlar hormonlara karşı da çok duyarlıdırlar. Örneğin paratiroid hormonu hücrede RNA sentezini arttırmada etkili olurken, kalsitonun hormonu bunun tersi etki yapmaktadır. Kemik yıkımı, kemiğin modelleşmesinde önemli rol oynar. Bu olay osteoklast ve osteoblastların uyumlu çalışması neticesinde gerçekleşmektedir (3).



Şekil 5. Hücre yerleşimi.



Şekil 6. Hücre yapılanması.

Tablo 1: Kemik Dokusu Tablosu.

Hücre Tipi	Özelliği	Liflerin Özelliği	Matriks Özelliği
Osteoprogenitor hücre	Yassı şekilli, soluk boyanmış nukleuslu hücrelerdir, mitoz yaparlar.	Tip 1 kollajendir. Lifler belirli aralıklarla düzgün bir tertipleme gösterirler. Bu aralıklara hidroksiapatit kristalleri çökmüştür.	Sert ve yoğun bir matriks vardır. Yapıya kalsiyum çökmüştür. Kanal sistemi çok iyi gelişmiş olup, burada damarlar yerleşiktir (Havers, Volkmann). Hücrelerin metabolizması kanalikül sistemiyle gerçekleşir. Kemik dokunun, Kompakt (sıkı tertiplenmiş) ve Spongiyöz (trabeküllü veya boşluklu) olmak üzere 2 formu bulunur.
Osteoblast	Kübik veya piramidal şekilli, uzantılı hücrelerdir. Kemik yapımında rol oynarlar. Sitoplazma koyu bazofilik ve granüllüdür.		

Osteosit	Oval şekilli, lipid, glikojen ve pigment içeren hücrelerdir. Mitoz yapmazlar. Uzantılı hücrelerdir.		
Osteoklast	Kemik yıkımını (rezorbsiyon) sağlayan hücrelerdir. Çok sayıda nukleus içerirler, sitoplazmada bol lizozom bulunur. Yıkım için kullanılan Kollagenaz ve proteolitik enzimleri salgırlar.		

#### 4.1.3. Kemik İliği Kök Hücrelerinin Farklılaşması

Kemik iliği, osteoblastlara, chondrocyte'lere, myoblastlara, adipocyte'lere vesaire dönüşme yeteneğine sahip multipotent kök hücreler olarak bilinen MSC ler içerir. Hücre bazlı stratejilerde, parçalanmamış taze kemik iliği, kültürde çoğaltılmış saf MCSler, farklılaşmış osteoblastlar veya chondrocyte'ler veya kemik morfojenik proteini (BMP) salgılayan genetik açıdan değişmiş hücreler aşılabilir.

Bu tip kemik dokusu mühendisliği heyecan verici olmakla ve MSC lerin klinik uygulamasında faydalı olmakla kalmaz fakat aynı zamanda bizim kök hücreleri anlayışımızı artırır. Hücrenin tutunmasını, farklılaşmasını ve proliferasyonunu destekleyen osteblast ve skafold matrislerine dönüşen hücre kaynaklarını kullanarak doğal kemik tamir işlemini taklit etmektir (2).

Hücreleri ayırmak için 1-3 ml kemik iliği numunesi kullanıldı. Bunun için en uygun miktarın 1-2 ml olduğu, fazla olması durumunda içinde bulunan kan hücreleri oranının artacağı, bunun da kültürdeki progenitör hücrelerin miktarını azaltacağı bildirilmiştir.

Kökhücrelerin özelliklerinin tanımlanmasındaki hızlı gelişmeler, insan doku hücrelerinin kökhücrelerinden farklılaştırılarak elde edilebileceği yönünde ümit vermektedir. Mezenkimal stromal hücrelerin bağ doku hücrelerine farklılaşma potansiyeli bulunduğunun gösterilmesi, bu hücreleri iskelet sistemi bozuklukları tedavisinde kullanılabilecek önemli hücreler haline getirmiştir. Kemik iliğindeki stromal hücrelerin kırık dahil olmak üzere birçok bağ dokusu hücresi oluşturma özelliği olduğu saptanmıştır.

Deksametazon kullanılarak yapılan kültürlerde 16. günde kondrosit nodülleri, 21. günde mineralize kemik nodülleri saptanmıştır. Mezenkimal stromal hücrelerin kaynağı olarak en sık kemik iliği ve lipoaspirasyon materyalleri kullanılmaktadır.

Vericilerden toplanan kemik iliğindeki mononükleer hücreler arasından yapışıcı karakterleri nedeniyle ayrılabilen MSH'lerin canlı-dışı kültürlerde çoğaltılmasıyla yeterli sayıda hücre elde edilmiştir. Stromal hücreler, kemik iliğindeki mononükleer hücrelerin %2-3'ünü oluşturmaktadır. Dönüşme potansiyeli olan MSH'lerin tarif edilmesi için taşınması gereken minimal özelliklerden biri yapışma özelliğidir. Hücrelerin az olması önemli potansiyel taşıyan bu hücrelerin klinik amaçlı kullanımı için engel oluşturmaktadır.

Uluslararası kabul edilmiş standartlarda, hastalara verilebilecek hücreleri çoğaltma şartlarını oluşturmak için ciddi ekonomik ve teknik altyapı gerekmektedir. Uzun süre kültürlerde çoğaltılan hücrelerde bulaşma, telomer kısalması, hücre genetik bozukluğu ve kanser yapma gibi özelliklerin gelişme olasılığı da başka bir sorun oluşturmaktadır.

Son yıllarda MSH tedavilerinde bu sorunlarla karşılaşılmamıştır. Hastaların uzun süreli takip sonuçlarının izlenmesi gerekmektedir. Yine de çok tekrarlanan ekimler yerine erken ekimlerin kullanımı önerilmektedir. Yakın zamanda bildirilen bazı hayvan deneylerinde malignite potansiyeline de değinilmektedir.

İnsan kemik iliği, hematopoietik ve endotel hücreler yanında kemik dokusu oluşturma potansiyeli bulunan osteoprogenitör hücrelerin öncüleri olan MSH'nin de bulunduğu farklı hücreler topluluğundan oluşmaktadır.

Mezenkimal stromal hücreler, kemik proteini depolayan ve TGF- $\beta$ 'ya yanıt veren, fakat hematopoietik büyüme etmenlerine yanıt vermeyen ayrı bir hücre grubu içermektedir. Mezenkimal stromal hücrelerden osteojenik progenitor özelliği olanların iki tür olduğu;

bunlardan az farklılaşmış ama çok sayıda hücre ile koloni meydana getiren hücrelerin  $\beta$ fibroblastik büyüme faktörü ( $\beta$ -FGF) ve transforme edici büyüme faktörü- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) ve D3 vitaminine yanıt vererek arttığı, sayıca daha az ama çok farklı küme oluşturan hücrelerde  $\beta$ -FGF yanıtının ortadan kalktığı gösterilmiştir.

Kemik iliği hücrelerini iki gruba ayırmak mümkündür. Birinci hücre grubu olan MSH'lerin tanımlanması için yüzeylerinde STRO-1, CD105, CD73 ve CD90 antijenlerinin varlığı gereklidir. İkinci grup olan hematolojik hücre grubunu tanımlayan önemli yüzey antijeni CD34'tür. Hematolojik hücre grubu için CD45, CD34, CD14 yüzey antijenleri karakteristiktir.

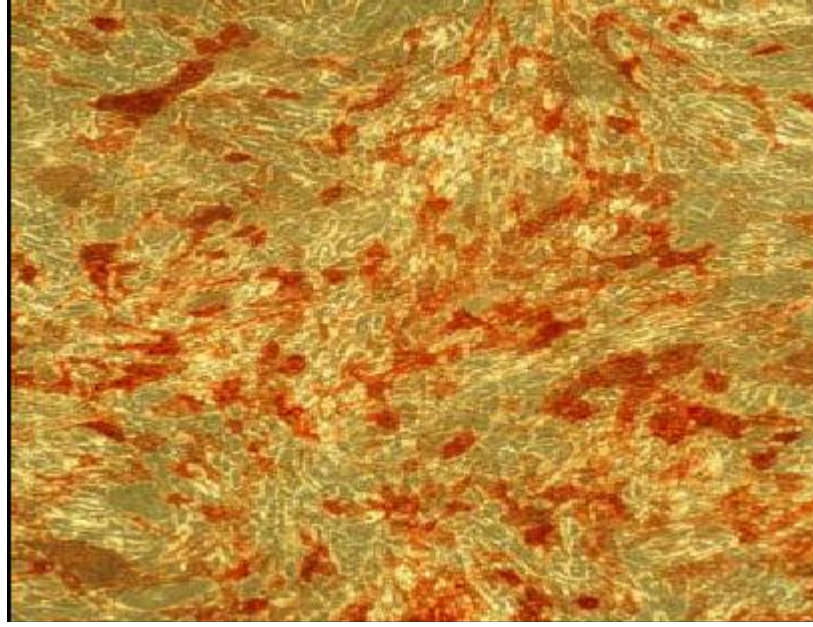
Canlı-dışı kültür ortamında çoğaltılan ve osteoblast farklılaşma ortamı ile uyarılan, kalsiyum depozitlerini oluşturan hücreler Alizarin kırmızısı ile boyanarak gösterilir. Osteoblastik karakterli hücreleri tanımlamak için, bu hücreler tarafından ortaya konan alkalin fosfataz aktivitesi, tip-1 kolajen oluşturma, D3 vitamini ile uyarılabilen kemik gla proteni, osteokalsinin tayini gibi yöntemler vardır. Bu şekilde osteoblastik hücre soylarının varlığı saptanmaktadır (1).

#### 4.1.3.1. Alkalın Fosfataz (ALP)

Kemikte osteoblastların hazırladığı gözenekler arasında yer alan osteoid yapının içine Ca tuzları çökerek bu organik matriksi sertleştirirler, böylece mekanik zorlanmalar karşısında kalan kemiğin dayanma gücünü artırırlar. Matriksteki ara madde içine Ca tuzları çökmeden önce osteoblastlar sitoplazmaları içinde bol miktarda alkalın fosfataz enzimi hazırlarlar ve bu enzimi sitoplazmaları dışına salarlar. Osteoblast hücrelerinden salınan kabarcıklar sonrasında in vitroda matriks mineralizasyonunu mümkün kılan ALP içermektedirler.(4) Böylece ekstrasellüler olarak fosfataz enzimi de ara madde içinde birikmiş olur. Bu şekilde osteoblastların salgıladığı alkalın fosfataz enziminin kemik mineralizasyonunda önemli bir işlevi, bir aracılık rolü bulunmaktadır.

Kemik oluşurken ya da ossifikasyon süreci ilerlerken alkalın fosfatazların açığa çıkması oldukça önem kazanan bir durumu yansıtmaktadır. Fosfatazlar yalnızca Ca tuzlarının organik matriks içerisine yerleştirilmesinde etkin bir rol oynamakla kalmazlar, ayrıca kollagen fibrillerin oluşmasında da bir işlevlerinin olduğu açıklanmıştır.(5)

Tüm ALP aktivitesi osteoblast işlevinin güvenilir bir delili olarak tanımlanır (6). Ayrıca ALP kemik oluşan tümörlerde osteoblastik aktivite için bir işaretleyici olarak kullanılır (şekil:7).



Şekil 7. Alkaline Phosphatase.

#### 4.1.4. Doku ve Yapı İskeletleri

Doku mühendisliği, biyomedikal mühendisliğinde doğmakta olan ve hasarlı veya hastalıklı dokuyu değiştirmeyi amaçlayan ve otologus kemik naklinin sınırlı yanlarının üstesinden gelmeye çalışan bilim dalları arası bir alandır. Biyomateryaller, hücrenin davranışını ve fonksiyonunu yönlendiren arzu edilebilir biyofiziksel ve biyokimyasal ortamlar olarak doku mühendisliği yaklaşımlarında önemli bir rol oynarlar. Doğal kaynaklardan temin edilen materyaller, reseptöre bağlanan ligantları sunmaları ve hücrenin tetiklediği proteolytic degradasyona ve tekrar şekillendirmeye duyarlı olmaları dahil yapılarında biyolojik tanıma özellikleri bulunduğundan avantajlıdır.

Hydroxyapatite (HA),  $(Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2)$  mükemmel biyo-uyumluluğu ve biyo-aktivitesi yüzünden insan implantasyonu için en umut verici materyallerden biri haline gelmiştir. HA' nın crystallographic ve kimyasal özellikleri kemiklerin ve dişlerinkini yakından andırır ve HA dokulara doğrudan bağlanabilir ve dokunun büyümesini arttırabilir, bu da onun ortopedik ve dental uygulamalarda yaygın olarak kullanılmasını sağlar.

Bir skafolda aşılana hücrelerin fonksiyonu hücreler tarafından materyalle etkileşime girmede kullanılan spesifik hücre yüzeyi reseptörlerine (yani, integrins) ve çözülebilir büyüme

faktörlerinin varlığına bir hayli bağlıdır. Kemikte hücre dışı matrisin önemli bir bölümü kollagenler tarafından oluşturulur. Kollagenler dokuların yapısal bütünlüğünü muhafaza etmekten sorumlu her yerde bulunabilen proteinlerdir. Kollagenler birçok doku mühendisliği uygulamalarında başarıyla kullanılırlar. Kemik dokusu mühendisliği konusunda kemik graftı takviyelerinin hücre bağlanma sekansları içeren (yani, RGD, hücreye bağlanan peptit p-15) sentetik peptitlerle yenilenmesinin yakın zaman önce osteoblastın hücre fonksiyonunu arttırdığı gösterilmiştir (7).

Bu nedenle Kemik dokusu mühendisliği 3 boyutlu skafold, otologus hücreler ve osteoindüktif büyüme faktörleri arasında başarılı karşılıklı etkileşim ister. Uygun bir skafoldun toksik olmaması, gayet biyoyumlu olması ve hiçbir koşul altında immunolojik tespit edilebilir primer veya sekonder yabancı madde reaksiyonuna yol açma potansiyeline sahip olmaması gerekir. Skafold bir ilave fonksiyon sunmak zorundadır, özellikle maxillofacial bölgenin arttırılmasında. Onun, host dokunun mekanik özelliklerine uyan yeterince geçici mekanik destek sunması gerekir. Doğal yolla elde edilmiş HA zamanla kemik iletisine (kemiğin yetiştiği bir skafold hizmeti görür) ve kemiğin entegrasyonuna (fibroz dokuya müdahale etmeden altta yatan kemik ile bir direkt kimyasal bağ oluşturur) izin veren bir biyoaktif alloplast materyaldir. Biomimetic skafoldların kemik dokusuyla bütünleşmesi çoğu zaman ilk hücre ve substrat etkileşimleri yoluyla saptanan materyal-doku ara yüzünde gerçekleşir. Osteoblastların kollagen tip I ile etkileşiminin alkalın fosfat aktivitesini, osteoblast bağlantılı gen ekspresyonunu ve mineralleşmenin uyarılmasını güçlendirdiği gösterilmiştir.

HA (Coll I/HA) parçacıklarının tip I insan kolajeniyle kaplanması in vitro da insan osteoblastlarının biyoaktivitesini daha da iyileştirebilir (7). Ancak biyomateryallerle temas halinde hücrenin, hücrelerin harici büyüme faktörlerine verdiği yanıtı etkileyen karmaşık düzenleyici mekanizmaların aydınlatılmasında daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır.

#### *4.1.4.1. Doku Mühendisliği*

Mevcut olan doku mühendisliğinin ana uygulamaları ortopedi, kalp ve sinir dokudur. Tüm bu uygulamalar yüksek derecede özel hücreler ve extra-cellular matriksten oluşan doku yenilemesini kapsar.

Çenedeki büyük kemik kusurları çene ve yüz tekrar şekillendirme ameliyatında büyük güçlük çıkarır. Aynı canlıdan alınmış vaskularize kemik greftleri bu kusurların tedavisinde



altın standart olarak kabul edilmektedir. Bununla beraber, verici bölgedeki ek hastalık ve ağrı, verici bölgelerin sınırlı olması, kemik grafiti ölçüsüyle ilgili kısıtlılıklar ve ameliyatın 2 seansta yapılması ilginin allograflara çevrilmesine yol açmıştır.

Doku iskeletlerinin ortopedik uygulamaları eklem kıkırdağının kaldırıldığı yere skafold malzeme bloğunun implante edilmesini içerir. Kıkırdak hücreleri doku iskeleti içinde olgunluğa eriştiği zaman kıkırdak kayan yüzeylerde restore edilir. Doku skafoldlarının başka ortopedik uygulamaları implant kusurlarından gelen doku enflemasyonu gibi hatalar nedeniyle kaybedilmiş kemiğin restorasyonudur. Bu uygulamada cam ve apatit karışımı olan biyoaktif camdan oluşturulmuş bir skafold gözenekli bir yapıda oluşturulur. Osteo-progenitor gibi kemik oluşum hücreleri daha sonra gözeneklerin içine gömülür (8). Çalışmaların büyük bir kısmı, biyolojik olarak parçalanabilen kemik doku yapı iskeleti ve hidrojel kullanır (Jellerin yapay mineralizasyonunun gömülü osteoblastların durumuna etki etme mekanizması bilinmezliğini korumaktadır (9), kıkırdak doku mühendisliği üzerine yoğunlaşmıştır (10). Bunlar, kollagen, glikozaminoglikan, hiyaluronik asit, agros, jelatin ve alginat asitlere dayanan, çok çeşitli tabii jeller ve hidrojelldir (11). Polilaktik, poliglikolit ve bunların kopolimerleri gibi polihidroksiasitler de çeşitli geometrilere üç boyutlu yapı iskeletleri olarak kullanılmaktadır (12).

Doku mühendisliği bu sorunların üstesinden gelinmesinde ümit vaat eden bir araçtır. Onda, bağlanma özellikleri olan sentetik veya doğal biyomateryal yapı iskeleleri <skafoldlar> kullanılır ve materyalin morfolojisi süngerimsi kemiğinkine benzer. Bu materyaller kemik hücrelerinin göçünü, çoğalmasına ve farklılaşmasını artırır. Skafold olarak kullanılan gözenekli materyal, hücrenin çoğalmasını ve farklılaşmasını destekleyen damarlanmaya izin vermelidir. Kemik dokusu mühendisliği stratejilerinde kullanılan bir grup gözenekli biyomateryal kalsiyum fosfat seramikleridir; özellikle gerekli olan kimyasal ve fiziksel özelliklerin bir kısmına sahip olan hydroxyapatite (HA)'dir (13).

Kemik dokusu mühendisliği stratejilerinde kullanılan biyomateryallerin arzu edilen birçok özelliği gayet iyi dokümanite edilmektedir; bunlar şunlardan oluşmaktadır; kemik mineraline benzer bir bileşim (Mineralizasyon kemik oluşumunda vazgeçilmez bir işlemdir, kollagenli matrisin olgunlaşmasını takiben son safhada meydana gelir (9), kemik iletkenliği ve hücrenin fonksiyonunu ve farklılaşmasını artırma kabiliyetidir (6).

#### 4.1.4.2. Skafold Malzemeleri

İskelet malzemesinin sahip olması gerektiği önemli özelliklerden birisi iskelet malzemesinden gelen bozunan ürünlerin toksik olmamasıdır. Günümüzde farklı tipteki malzemeler özel uygulamaya bağlı olarak iskelet yapının imalatı için kullanılıyor.

Doku iskeleti olarak kullanılan polimerler belli başlı iki grup altında sınıflandırılabilir ki bunlar doğal ve sentetik polimerlerdir. Polilaktik asit ya da polilaktik asit ve onların türevleri, polikaprolakton v.b. malzemeler sentetik biyobozunur polimerlerin kategorisine girerken, kollagen ve aljinat doğal polimerler kapsamındadır (16).

Ancak asit ve baz gruplu polimerlerin bozunumu yerel pH değerlerini değiştiren asit ve baz grupların salınımını yapar. Yerel pH değerlerindeki değişim iyileşen dokunun geleceğini etkiler. Bu yüzden iskelet tekniğinin amacını bozar. Bu kısıtlamanın çaresi herhangi ters reaksiyona neden olmayan bozunabilir, vücutta emilmeye eğilimli biyoçözünür malzemelerin kullanımınıdır.

Tüm biyobozunur polimerler hasarlı doku ya da organ yenilenirken başlangıçtaki hücre ekimi ve bozunma zamanı esnasında minimum mukavemete sahip olması için tasarlanır. Hemen hemen tüm biyobozunur polimerler ana ögesi su olan vücut akışkanlarının varlığında hidroliz bozunmasına maruz kalır (17).

Ayrıca destek yapının işlevine hizmet eden bir skafold doku yetişmesi/hücre çoğalması ve farklılaşması için arzu edilen çevrenin belirli miktarına sahip olması da beklenir. Bu işlev skafoldun yüzeyi biyoaktif yapılarak kazandırılır. Biyoaktivite göstergesinin bir örneği ortopedik protezlerde hidroksiapatiti kaplamasının kullanımınıdır.

Biyoaktif yüzeyler insan hücreleriyle bağ yapısı karışık birleşmesi için tasarlanmış yüzeylerdir. Biyoaktif yüzeylerin en yaygın uygulaması ortopedi ve diş uygulamalarında kullanılan hidroksiapatit kaplamadır. Biyoaktivite özel hücre tipleri için çok az malzeme tarafından paylaşılmış bir niteliktir (14).

##### 4.1.4.2.1. Doku Skafoldları

Skafoldların iki temel uygulaması vardır

(a) İnsan hücrelerini iliştiirmek ve yetiştirmek için skafold kullanarak dokuların restorasyonu.

(b) Kademeli olarak parçalara ayrılan, bozulan skafoldlardan gelen farmasotik bileşimlerin yavaş salınımına dayanan tedavi olan tümör gibiler için kontrollü ve yerel ilaç salınımı.

#### 4.1.4.2.2. *Skafold İçinde Hücre Yetiştirilmesi*

Hücrelerin hem fiberlere hemde skafoldun gözeneklerine hızlı ve etkili yapışması kritik temel özelliğidir (15). Mükemmel biyo-uyumlulukları ve biyo-aktiviteleri yüzünden HA seramikleri kemik graftında ve dental cihazlarda kemik takviyesi olarak yaygın olarak kullanılmaktadır ve onların osteoindüktivitesi keşfedildiğinden bu yana geçen on yıl içinde biyomateryal alanında birçok araştırmacının ilgisini çekmiştir.

HA seramikleri mezenkimal hücreleri osteoblastlara yönelik farklılaşmaya sevk edebilme yeteneğine sahiptir, bu da onları kemik dokusu mühendisliğinde potansiyel bir skafold materyali yapar. HA kliniklerde bir kemik takviyesi ve dental cihaz olarak en yaygın kullanılan biyomateryallerden biri olduğundan hücrenin (özellikle osteoblastların ve osteoclastların) HA ların yüzeylerindeki davranışını anlamak HA seramiklerinin klinik uygulamasında hayati önem taşır (2).

## 4.2. Amaç

Mezenkimal destekdoku hücrelerin, kemik iliği aktarımı, kalıtsal hastalıklar ve organ hasarında; ortopedide kullanılması düşünülen biyomalzemelerin biyolojik etkilerinin canlı-dışı incelemesinde; kemik dokusundaki hasarlı bölgelerin tamirinde kullanılması mümkün görünmektedir.

Osteoblast ve kondroblastlar, ortopedide yeni üretilen biyomalzemelerin biyolojik etkilerinin incelenmesinde kullanılmaktadır. Doku hasarlarının giderilmesi için hücrelerin eriyebilen polimer kalıplar üzerinde hasarlı bölgeye nakledilerek, yenileyici olarak kullanılması hedeftir.

Mezenkimal kökhücreleri, özellikle bağ doku kökenli hücrelere kolayca farklılaşma özelliğinden dolayı kemik, kırıldak defektleri onarımı için uygun gözükmektedir. Canlı-dışı deneylerden elde edilen bu bulgular, MSH'nin canlı-içi ortamda da farklılaşabileceğini düşündürmektedir. Farklılaşma için gerekli uyarının organizmanın hasarlı bölgesinin yakın çevresinden salınan çözümlü faktörlerden sağlanabileceği bildirilmektedir (1).

Yapılan alışmalar, hasarlı dokulardan salınan kemokin, sitokin ve diğer çözünür faktörlerin kökhücrelerin göçü, çoğalması ve ihtiyaç olan yönde farklılaşmasında rol oynayabileceğini öne sürmektedir. Klinikte, yüksek riskli transplantasyonlarda ve/veya sistemik, ilerleyici bozukluklarda kullanımına başlanmış ve laboratuvarımızda bu amaçla ön çalışmaları yapılmakta olan bu hücreler, ortopedide kullanılabilecek materyallerin biyolojik etkilerinin canlı-dışı incelemesinde, daha ilerde de kemik ve kırıldaktaki hasarlı bölgelerin tamiri amacıyla kullanılabilir.

Bu deneyin osteojenik hücreler için var olan temel bilgilere katkı sağlaması beklenmektedir. Tekrarlı mekanik yüklenmelerin 3 boyutlu yapı iskeleti içinde daha az mekanik yüklenmeye maruz kalan hücrelerden daha fazla hücre çoğalmasına ve matris bileşiminin başlamasını gecikmesine neden olacaktır. Sonuçta bu çalışma araştırmacılara in-vivo da yeni yapı iskeleti hakkında da bir fikir sağlayacaktır. Bu bilgi yapı iskeletlerinde olduğu kadar osteoporosis ya da kemik yaralanmaları gibi kemik rahatsızlıkları tedavisinde yararlı olabilir. Belki de bu implant tasarımlarında değişimlere, yapı iskelet kullanımına öncü olabilir (18).

## 5. YÖNTEM

Bu çalışma Dokuz Eylül Üniversitesi Biyomekanik A.D. , Göğüs ve Kalp Damar Cerrahisi, Ortopedi ve Travmatoloji A.D. bölümleriyle işbirliği ile yapılacaktır. Araştırma ileriye yönelik planlanmıştır. Çalışmanın bu bölümünde amaç, Ege Üniversitesi Kimya Mühendisliği'nde hazırlanmış olan skafoldlar üzerinde, biyomekanik hücre kültürü Laboratuvarında üretilmiş olan fibroblastların gelişimini test etmek ve böylece en uygun skafoldu belirlemektir (tablo:2). Deney aşamaları aşağıdaki rehberine uygun yapılacaktır:

- Kollagen Tip1 Kaplamalı Hidroksiapatid skafoldları üç farklı yöntemle hazırlanacak.
- Bir donörden alınan kemik iliği mononükleer hücrelerinden, en iyi fibroblast gelişimi gözlediğimiz flask üzerinde osteojenik farklılaşma test edilecek.
- Osteoblast hücrelerine canlılık testi yapılacak.
- Osteoblast hücre sayımı yapılacak.
- Osteoblastların ALP aktivitesi ölçülecek.
- Osteoblastlar alizarin kırmızı ile boyanacak.
- Bir donörden alınan kemik iliği mononükleer hücrelerinden, farklı skafoldlarda osteoblast gelişimine bakılacak.
- Osteoblast geliştirilmiş skafoldlarda TEM ve SEM görüntüleme yapılacak.

### 5.1. Kollagen Tip1 Kaplamalı Hidroksiapatid Skafoldlarının Kaplaması

YBS: Yapay Beden Sıvısı

Tablo 2: İyon konsantrasyonları.

İyon	Kan plazması(mM)	YBSx1 (mM)	YBSx2.5 (mM)
Na <sup>+</sup>	142.0	142.0	142.0
Cl <sup>-</sup>	<b>103.0</b>	<b>103.0</b>	<b>103.0</b>
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	27.0	27.0	27.0
K <sup>+</sup>	5.0	5.0	5.0
Mg <sup>2+</sup>	1.5	1.5	1.5
Ca <sup>2+</sup>	2.5	2.5	<b>6.25</b>
HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	1.0	1.0	<b>2.5</b>
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	0.5	0.5	0.5
Na-laktat		<b>22</b>	<b>26.5</b>
Laktik asit			
Tris		-	-

Yukarıda verilen YBS çözeltisi, aşağıda ki tabloda verilen kimyasallar kullanılarak hazırlanmıştır. YBSx2.5 da Ca ve PO4 değerleri 2.5 kat katılmıştır (tablo:3).

Tablo 3: YBS çözeltisinin hazırlanmasında kullanılan kimyasal maddeler.

1.  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
2.  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
3. KCl
4. NaCl
5.  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
6.  $\text{Na}_2\text{SO}_4$
7.  $\text{NaHCO}_3$
8. Na laktat
9. Laktik asit

YBS nin hazırlanması: 1 Litrelik behere 3, 4, 5, 6, 7 ve 8 nolu kimyasallar hesaplanmış miktarda manyetik bar ile konuldu. 900 ml saf su ilave edilerek ısıtmalı karıştırıcıya konuldu pH=8.05 iken hızla karıştırılarak, içerisine 5+2=7 ml laktik asit (1M) ilave edildi ve sıcaklık 37 °C getirildi. pH=6.95 indiğinde 50 ml lik behere 1 ve 2 nolu tuzlar 10 ml saf suda çözülüp hızlı karıştırılan büyük behere konuldu. (pH=7, =37 °C ) Bu çözelti balon joje içinde 1L'ye tamamlanmıştır.

### **5.1.1. Kollajenlerin Apatit İle Kaplanması;**

1. Uygulama: 5X5 cm ebadındaki collogenler kesilerek 2.5X2.5 cm ebadına getirildi. 12 adetlik bir grup, 1M NaOH içinde 1 h oda sıcaklığında bekletildikten sonra çıkarılıp saf su ile yıkandı ve 8 adetlik NaOH ile işlem görmemiş grup ile beraber plastik tel yardımıyla, içinde yukarda tanımlanan çözelti bulunan kap içine asıldı ve üzerleri kapatıldı. 37 °C de çalkalamalı su banyosunda 24 h bekletildi. Bu süre sonunda çözelti pH=8.50 ye ulaştı.

Gözlem: NaOH ile işlem görmüş numuneler parçalandı, küçüldü ve kap dibine çökeldi. NaOH ile işlem görmemiş olanlarda küçülme gözlemlendi ama parçalanma olmadı. Collogenler çözeltiden çıkarıldı. Saf su ile yıkandı ve 40 °C de etüvde 24 h kurutuldu.

2. Uygulama: 4 adet collagen 5X5cm ebatıda doğrudan yukarıda tanımlanan çözeltinin bulunduğu kap içine konularak, çalkalamalı su banyosuna yerleştirildi. 37 °C de 24 h bekletildi. (işlem sonunda sıcaklık 41 °C ye çıkmıştı)

1 adet collagen ise 5X5 cm oda sıcaklığında ( yak. 30 °C) içinde aynı çözeltinin bulunduğu beher içine konulup ağzı kapatıldı. 24 h bekletme sonunda pH=7.04 oldu.

İşlem sonunda; Çalkalamalı su banyosundaki numunelerin ebatları 2.5X2.5 cm ye düştü. Saf su ile yıkandı ve etüvde 40 °C de kurutuldu.

Oda sıcaklığında bekletilen collagen ise boyutlarında bir değişiklik olmadı. Saf su ile yıkayıp kurutuldu ve yapı iskeletleri hücre ekimi yapılmadan önce kontamine riskine karşı etilen-oksit gaz sterilizasyon ile steril edildi.

## **5.2. In Vitro Hücre Kültürlerinin Hazırlanması**

### **5.2.1. Kullanılan Reaktif ve Malzemeler:**

1. MesenCult Basal medium for human Mesenchymal Stem Cells (StemCell Technologies Inc, 05401).
2. Osteogenic stimulatory supplements, human (StemCell Technologies Inc, 05405).
3. Foetal calf serum (FCS), (Biological Industries, 04-001-1B).
4. Pen-Strep Solution; 10000 U/ml penicilin, 10 mg/ml streptomycin (biological Ind. 03-031-1C).
5. Amphotericin B Solution; 2,5 mg/ml amphotericin B (biological Ind. 03-029-1C).
6. Dexamethasone, 1 mg (StemCell Technologies Inc, 05407).
7. Ascorbic Acid, 100 mg (StemCell Technologies Inc, 07157).
8. Histopaque 1077 (Sigma-Aldrich/10771).
9. Steril santrifüj tüpleri, 50 ml (TPP, 91050).
10. Steril doku kültür tüpleri, 10 ml (Greiner labortechnik, 164160).
11. 6-Well plate (Greiner labortechnik, 657160).
12. 35 mm x 10 mm Cell Culture Dish (Corning incorporated, 430165).
13. Trypan-blue,  $C_{34}H_{24}N_6O_{14}S_4Na_4$ , MW 960,8 Sigma/T 0776.

### **5.2.2. Hazırlanan Solüsyonlar:**

1. Fosfat-tampon solüsyonu (Phosphate-buffered solution, PBS): 137 mM NaCl (8.0 g), 2.7 mM KCl (0.2 g), 10mM Fosfat (0.92 g  $Na_2HPO_4$  ve 0.24 g  $K_2HPO_4$ ) karıştırılarak pH; 7.2-7.4'e ayarlanmıştır.

2. Trypan-blue hücre viabilite solüsyonu: % 0,4'lük trypan-blue solüsyonu hazırlandı. 3 ml trypan-blue solüsyonu ile 19 ml PBS karıştırıldı ve 0.22 µl steril filtreden süzülerek kullanıma hazır duruma getirildi (ref. BJC Health System).

3. Osteojenik uyarıcı ilaveli MesenCult Basal Medium: Steril 50 ml'lik dibi konik tüpe 42.5 ml MesenCult Basal Medium konuldu. Sırasıyla 7.5 ml Osteogenic supplement, 5 µl Dexamethasone ve 250 µl Ascorbic acid eklenerek tam ortam hazırlandı. Tam ortama 500'er µl amfoterisin-B ve penisilin-streptomisin solüsyonu ilave edildi.

Dokuz Eylül Üniversitesi, Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim dalı bölümünde herhangi bir sebepten dolayı ameliyatı önerilen hastaların aksiyel iskeletinden (sternum, vertebra ya da pelvis) 20 ml kemik iliği aspiratı steril koşullarda 1 ml heparin içeren enjektöre alınmıştır.

Kemik iliği aspiratı steril koşullarda (laminar flow'da) %2 FCS içeren PBS karışımı ile dilüe edildi. Dilüe edilen kemik iliği aspiratı, 12 ml'lik dibi konik dört ayrı tüpte, her 5 ml'si oda sıcaklığında bekletildikten sonra 5 ml Ficoll-paque üzerinde dikkatlice tabakalandırıldı. Tabakalandırma işleminden sonra 1650 rpm'de yirmi dakika santrifüj edildi. İnterfaz tabakasında yer alan hücreler steril pastör pipeti ile alındı ve dibi konik polipropilen tüpe transfer edildi. 10 ml %2 FCS içeren PBS karışımı eklenerek, oda sıcaklığında 1200 rpm'de beş dakika santrifüj edilerek süpernatantı atılarak yıkama işlemi yapıldı. Dipte kalan mononükleer hücreler 5 ml %2 FBS içeren PBS karışımında dilüe edildi. 5 ml'lik mononükleer hücre süspansiyonuna 100µl RosetteSep Human Mesenchymal Stem Cell Enrichment Coctail eklenip 50 ml'lik tüpte yirmi dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.

İnkübasyon sonunda 12 ml'lik dibi konik tüpte 5 ml'lik hücre süspansiyonu 5 ml Ficoll-paque üzerinde dikkatlice tabakalandırıldı ve 1650 rpm'de yirmi dakika santrifüj edildi. İnterfaz tabakasında yer alan hücreler steril pastör pipeti ile toplandı ve dibi konik polipropilen tüpe transfer edildi. Ficoll-paque altında hücreler ise bir başka tüpe transfer edilerek ve her bir tüp üzeri yazılarak işaretlendi. Tüplere 10'ar ml %2 FCS içeren PBS karışımı eklenerek 1200 rpm'de beş dakika santrifüj edilerek yıkama işlemi iki defa yapıldı. Dipte kalan mononükleer hücreler, 1.5 ml Osteojenik uyarıcı ilaveli MesenCult Basal ortamda resüspanse edildi. Hücre süspansiyonlarından 0.5'er ml'lik iki örnek alındı. Örneklerden biri hücre sayımı için (Coulter STKS, Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyomekanik Anabilim dalı) kullanıldı.



Diğer hücre süspansiyonu tyrpan mavisi ile boyanarak hücre viabilitesi kontrol edildi ve viabilitenin %96'nın üzerinde olduğu saptandı. RosetteSep uygulama sonrası interfazdaki hücrelerin sayısı  $\sim 12 \times 10^6$  hücre/ml bulundu. RosetteSep uygulama sonrası Ficoll-Paque altında kalan hücrelerin sayısı ise  $\sim 20 \times 10^6$  hücre/ml olarak belirlendi. Kontrol grubu ve mekanik uyarım yapılacak grup için altışar adet  $35 \times 10$  mm'lik petri kaplarına RosetteSep ayırımı yapılan hücre süspansiyonundan 60'ar  $\mu$ l ( $\sim 2 \times 10^5$  hücre/ml) ilave edildi. Üzerine 4 ml Osteojenik uyarıcı MesenCult Basal ortam eklendi. %5 CO<sub>2</sub> ve nemli ortam içeren inkübatöre kaldırıldı.

Hücrelerin ortamlarının değiştirilmesi üç günde bir aralıklarla yapıldı. Hücreler her ortam değişikliğinde Inverted mikroskop (Nikon, ELWD 0,3 206039, Japonya) ile incelendi ve onyedinci gün osteoblast kemik hücrelerinin olduğu gözlemlendi. Oluşan osteoblast kemik hücrelerin ortamları 10 ml'lik pipetler ile 12 ml'lik santrifüj tüplerine konuldu. Santrifüj tüplerine konulan ortamlar 1200 rpm'de beş dakika santrifüj edildi. Kuyucukların üzerlerine kapatacak kadar PBS eklenip yıkandı. Santrifüj edilen tüplerin ortamları atıldı. 2 ml yeni ortam ile tüplerin diplerindeki hücrelere pipetaj yapıldı. Daha sonra bunlar 12 ml'lik tüplere konuldu. Hücre kültür kaplarının tabanlarına yapışmış olan hücreleri kaldırmak için hücrelerin üzerlerini örtecek kadar Tripsin/EDTA eklendi. Bir süre hücrelerin kalkması için beklenildi ve sonra üzerlerine Tripsin/EDTA'yı nötralize etmek için %10 FCS bulunan ortam ilave edildi. Kaldırılan hücreler 12 ml'lik santrifüj tüplerine konuldu. Daha sonra santrifüj tüplerine konulan ortamlar 1200 rpm'de beş dakika santrifüj edildi. Santrifüjden sonra tüplerdeki süpernatant atıldı. Tüplerin dibinde bulunan hücrelerin üzerlerine 5 ml toplam osteojenik uyarıcı ortam ile ardı ardına pipetleme yapıldı.

Daha sonra hücrelerin hepsi tek bir tüpte toplandı. Elde edilen hücrelerden 0.5 ml örnek alınıp hücre sayısı hesaplandı. Hücre sayısı  $\sim 0.6 \times 10^6$  hücre/ml bulundu. Kontrol grubu ve mekanik uyarım yapılacak grup için altışar adet  $35 \times 10$  mm'lik petri kaplarının her bir kuyucuğuna hazırladığımız 8 mm boyutunda yapı iskeletleri yerleştirildi. Daha sonra 3 ml ortam eklendi. Hücre süspansiyonundan 350'şer  $\mu$ l ( $\sim 2 \times 10^5$  hücre/ml) ilave edildi. Daha sonra hücreler 37 °C'de %5 CO<sub>2</sub> inkübatörüne yerleştirildi.

### 5.2.3. Farklı Skafoldlarda Fibroblast Gelişimi

1. Hastaların opere edilen kemiklerinden (sternum, vertebra, pelvis, femur, humerus, tibia) alınan 20 ml kemik iliği aspiratı steril koşullarda 1 ml heparin içeren enjektöre alınacaktır. Alınan kemik iliği aspirat örneği işlem yapılana dek +4<sup>0</sup>C'ta korunacaktır.
2. Kemik iliği aspiratının her 1 ml'si için 5 µl RosetteSep Human Mesenchymal Stem Cell Enrichment Cocktail eklenip 50 ml'ik tüpte 20 dakika oda ısısında inkübe edilecektir.
3. RosetteSep ile işaretlenmiş kemik iliği aspiratının birim hacmi, 2 hacim oda ısındaki %2 FBS içeren PBS karışımı ile dilüe edilecektir.
4. RosetteSep ile işaretlenmiş, %2 FBS içeren PBS karışımı ile dilüe edilmiş kemik iliği aspiratının her 5 ml'si oda ısısında bekletilmiş 5 ml Ficoll-Paque üzerinde dikkatlice göllendirilip, 25 dakika 300 x g'de santrifüj edilecektir.
5. İnterfaz tabakasında yer alan hücreler alınıp, dibi konik polipropilen tüpe konulacak, 10 ml %2 FBS içeren PBS karışımı eklenecek, 1,200 rpm'de oda ısısında 10 dakika santrifüj edilecek, süpernatant uzaklaştırılacaktır. Dipte kalan hücreler 3 ml %2FBS içeren PBS karışımı ile dilüe edilecektir. Hücrelerin viabilitesi trypan mavisi ile boyanarak kontrol edilecektir.
6. 5 ml Mesenchymal Stem Cell Stimulatory Supplement +4<sup>0</sup>C'ta bir gecede çözülecek, 45 ml MesenCult Basal Medium for Human Mesenchymal Stem Cells ile iyice karıştırılarak 50 ml tam ortam hazırlanacaktır (gereğinde daha fazla ortam hazırlanabilir). Tam ortama amfoterisin-B 4µg/ml, penisilin-G 100U/ml eklenecektir.
7. Tam ortamdan 6 kuyucuklu kültür flasklarına her kuyucuğa 5 ml olacak şekilde konacak, 6 kuyucuklu flaskın 1. kuyucuğuna 1 x 10<sup>6</sup>, 2. kuyucuğa 2 x 10<sup>6</sup> ve üçüncü kuyucuğa 2 x 10<sup>7</sup> hücre konacaktır. İlk test için kuyucuklara (1-2-3) A skafoldu, ikinci test için kuyucuklara (1-2-3) B skafoldu, üçüncü test için kuyucuklara (1-2-3) C skafoldu konacaktır (Tablo 1).
8. Kültürler 37<sup>0</sup>C'ta, 5% CO<sub>2</sub> ve >95% nem olan inkübatörde 14 gün tutulacaktır.
9. 14 günün sonunda kültür flasklarındaki A, B ve C skafoldlarından kesitler alınacak, Giemsa ile boyanacak, fibroblastlara ait hücresel yoğunluk ve fibroblast koloni gelişimi semikantitatif olarak değerlendirilecektir.
10. Tüm testler 1 donörden alınan örnekler ile çiftli olarak yapılacaktır.

#### 5.2.4. Skafold Üzerinde Osteojenik Farklılaşma

1. Hastaların opere edilen kemiklerinden (sternum, vertebra, pelvis, femur, humerus, tibia) alınan 20 ml kemik iliği aspiratı steril koşullarda 1 ml heparin içeren enjektöre alınacaktır. Alınan kemik iliği aspirat örneği işlem yapılana dek +4<sup>0</sup> C'ta korunacaktır.
2. Kemik iliği aspiratının her 1 ml'si için 5 µl RosetteSep Human Mesenchymal Stem Cell Enrichment Cocktail eklenip 50 ml'ik tüpte 20 dakika oda ısısında inkübe edilecektir.
3. RosetteSep ile işaretlenmiş kemik iliği aspiratının birim hacmi, 2 hacim oda ısındaki %2 FBS içeren PBS karışımı ile dilüe edilecektir.
4. RosetteSep ile işaretlenmiş, %2 FBS içeren PBS karışımı ile dilüe edilmiş kemik iliği aspiratının her 5 ml'si oda ısısında bekletilmiş 5 ml Ficoll-Paque üzerinde dikkatlice göllendirilip, 25 dakika 300 x g'de santrifüj edilecektir.
5. İnterfaz tabakasında yer alan hücreler alınıp, dibi konik polipropilen tüpe konulacak, 10 ml %2 FBS içeren PBS karışımı eklenecek, 1,200 rpm'de oda ısısında 10 dakika santrifüj edilecek, süpernatant uzaklaştırılacaktır. Dipte kalan hücreler 3 ml %2 FBS içeren PBS karışımı ile dilüe edilecektir. Hücrelerin viabilitesi trypan mavisi ile boyanarak kontrol edilecektir.
6. 42.5 mL of MesenCult Basal Medium 50 mL konik tüpe konulacak ardından 7.5 mL Osteogenic supplement, 5 µL of Dexamethasone ve 250 µL Ascorbic acid eklenerek tam ortam hazırlanacaktır. Tam ortama amfoterisin-B 4 µg/ml ve penisilin-G 100 U/ml eklenecektir.
7. Tam ortamdan 6 kuyucuklu kültür flasklarına her kuyucuğa 5 ml olacak şekilde konacak, 6 kuyucuklu flaskın 1. kuyucuğuna 1 x 10<sup>6</sup>, 2. kuyucuğa 2 x 10<sup>6</sup> ve üçüncü kuyucuğa 2 x 10<sup>7</sup> hücre konacaktır. Daha önce en iyi fibroblast gelişimi izlenen skafolddan her kuyucuğa konacaktır (Tablo 2).
8. 5. gün kültür flasklarındaki tam ortam ve adhere olmayan hücreler uzaklaştırılacak, yerine 5'er ml tam ortam konacaktır. Bu günden itibaren bu değişim 3 günde bir yapılacaktır. Değişimler yapılırken kültür ortamları faz mikroskopisi ile kontrol edilecek, multi-layering hücre tabakalanması izlendiğinde ortam değişimi tam ortama 175 µL of b-Glycerophosphate eklenerek yapılacaktır.
9. Kültürler 37°C'ta, 5% CO<sub>2</sub> ve >95% nem olan inkübatörde 5 hafta tutulacaktır.

10. 5. haftanın sonunda sonunda kültür flasklarındaki skafoldlardan kesitler alınacak, von Kossa ile boyanacak, osteoblastlara ait hücresel yoğunluk semikantitatif olarak değerlendirilecektir.

11. Tüm testler 1 donörden alınan örnekler ile ve çiftli olarak yapılacaktır (tablo:4).

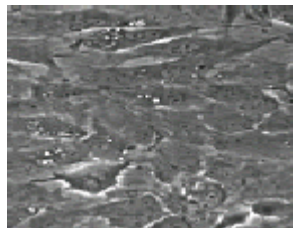
Tablo 4: Farklı skafoldlarda fibroblast gelişimi; skafold ve hücrelerin dağılımı.

1. hasta	A skafold Hücre $1 \times 10^6$	A skafold Hücre $2 \times 10^6$	A skafold Hücre $2 \times 10^7$
1. hasta	A skafold Hücre $1 \times 10^6$	A skafold Hücre $2 \times 10^6$	A skafold Hücre $2 \times 10^7$
1. hasta	B skafold Hücre $1 \times 10^6$	B skafold Hücre $2 \times 10^6$	B skafold Hücre $2 \times 10^7$
1. hasta	B skafold Hücre $1 \times 10^6$	B skafold Hücre $2 \times 10^6$	B skafold Hücre $2 \times 10^7$
1. hasta	C skafold Hücre $1 \times 10^6$	C skafold Hücre $2 \times 10^6$	C skafold Hücre $2 \times 10^7$
1. hasta	C skafold Hücre $1 \times 10^6$	C skafold Hücre $2 \times 10^6$	C skafold Hücre $2 \times 10^7$

Duplikasyondan sonra Tablo 5 aşamasına geçilir.

Tablo 5: Skafold üzerinde osteojenik farklılaşma.

1. hasta	En iyi skafold Hücre $1 \times 10^6$	En iyi skafold Hücre $2 \times 10^6$	En iyi skafold Hücre $2 \times 10^7$
1. hasta	En iyi skafold Hücre $1 \times 10^6$	En iyi skafold Hücre $2 \times 10^6$	En iyi skafold Hücre $2 \times 10^7$



Şekil 8. Osteoblast hücrelerinin Phasecontrast mikrokopi görüntüsü.

### 5.3. Osteoblast Hücrelerine Canlılık Testi

#### 5.3.1. Tripan Mavisi Canlılık Testi

Tripan mavisi canlılık testinde prensip ölü hücrelerin membran bütünlükleri bozulması nedeniyle boyayı hücre içine almaları canlıların ise almamalarıdır. Spektrofotometrik hücre yoğunluğu belirleme yöntemleri olmakla birlikte tripan mavisi ile hücre sayımı canlı hücre sayısının belirlenmesini sağladığı için çok önemlidir (şekil:8).

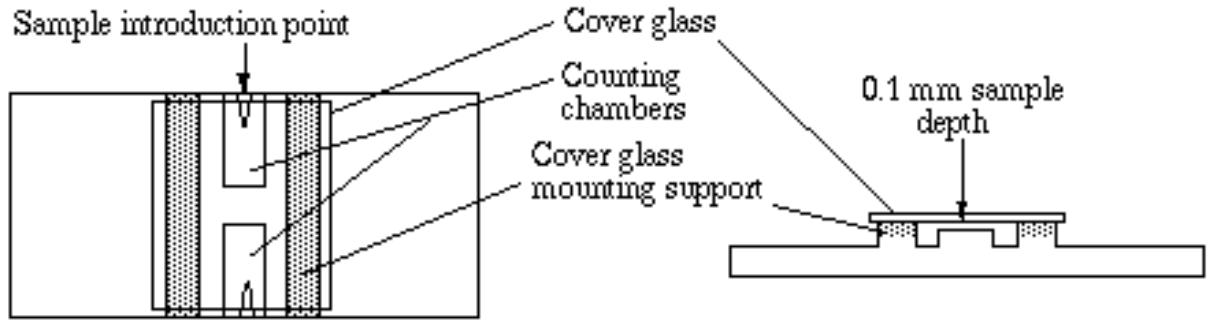
Bu nedenle mikroskopta mavi görülen hücreler ölü, saydam görülen hücreler ise canlı olarak nitelendirilir. İlk önce tripan mavisini ½ oranında PBS ile dilüe edilir. Ardından eşit hacimde hücre süspansiyonu ile karıştırılır.

**Not:** Hücre süspansiyonunun homojen olmasına dikkat edilmelidir.

### 5.4. Osteoblast Hücre Sayımı

#### 5.4.1. Hücre Sayımı

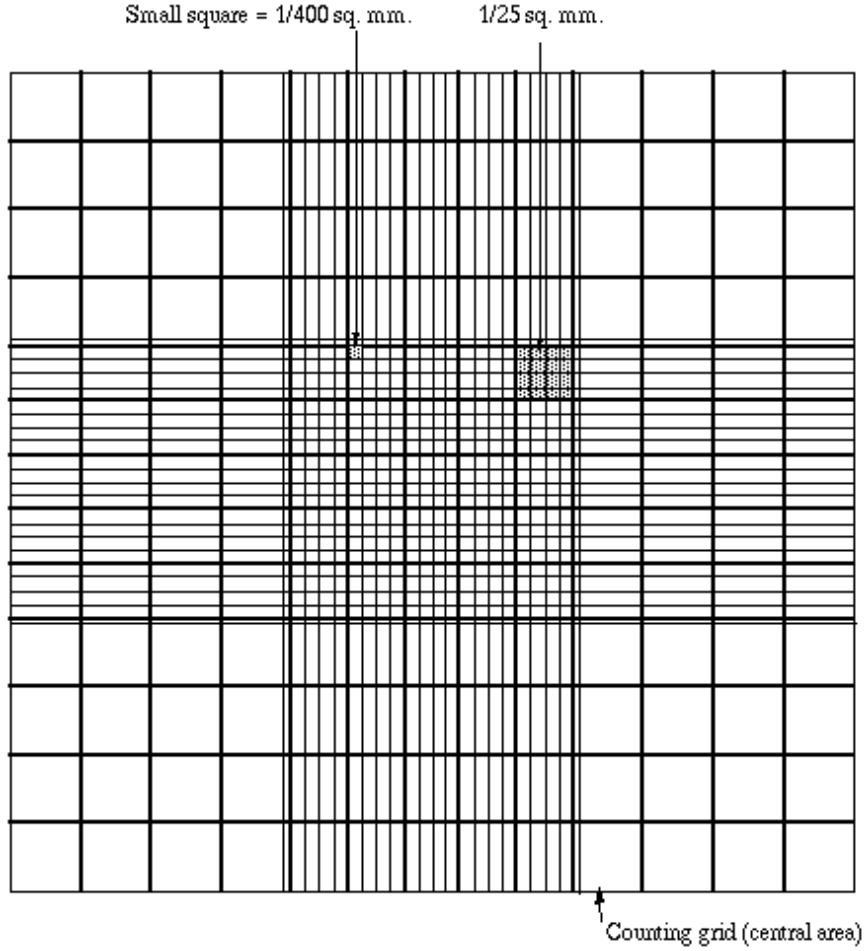
Hücre kültürü çalışmalarında tripan blue ile boyama ve hemositometre ( Neubeur ya da Thoma lamı ) ile hücre sayımı altın standart olarak kabul edilir.



Şekil 9. Thoma lamı.

Çalışmaya başlamadan önce lam ve lamel iyice temizlenmelidir. Hücre sayım lamı üzerine bir lamel kapatılır. Lam lamel arası kalan aralıktan 9 – 10 mikrolitre kadar örnek verilir (şekil:9).

**Not:** Hava kabarcığı kalmamasına dikkat edilmelidir. 10 X Büyütmede ve PH 1 de sayım yapılır ve ışık yoğunluğu düşük tutulmalıdır.



Şekil 10. Thoma lamı sayım çizgileri.

Hücre süspansiyonu birbirleri ile overlap etmeyecek kadar yani bir büyük karede ortalama 100 hücre olacak kadar dilüe edilmelidir. Alan 9 büyük kareye bölünmüştür. Her büyük karenin  $1 \text{ mm}^2$  lik alanı ve  $0,1 \text{ mm}$  yüksekliği vardır (şekil:10). Yani bir büyük kare alanı :  $1 \text{ mm}^2 \times 0,1 \text{ mm} = 0,1 \text{ mm}^3 = 0,0001 \text{ cm}^3 = 10^{-4} \text{ ml.}$  dir. Hücre sayısı: Bir büyük karede sayılan hücre x dilüsyon faktörü x  $10^4$

Canlı hücre sayısı: Bir büyük karede sayılan canlı hücre x dilüsyon faktörü x  $10^4$

Ölü hücre sayısı: Bir büyük karede sayılan ölü hücre x dilüsyon faktörü x  $10^4$

Canlı hücre sayısı

**% Canlı hücre** = -----

Toplam hücre sayısı

### 5.5. Osteoblastların Alp Aktivitesi

Hücreler anlatıldığı gibi kaplara yerleştirildi ve osteojenik farklılaşma için işlendi. Alkalın fosfatez aktivitesi sadece kültür ortamında veya OS ortamında kültürlenmiş

hücrelerde p-nitrophenol metodu kullanılarak değerlendirildi. Hücreler buz gibi soğuk fosfat tamponlu tuzla (PBS) iki kez yıkandı ve protein ekstraktları 10 mM TrisHCl (pH 7.6) ve % 0.1 Triton X-100 de hazırlandı. Tüm protein ekstraktları OS ortamı endüksiyonundan 0, 7, 14, 21 ve 28 gün sonra hazırlandı. Alkalin fosfatez enzim aktivitesi mikroplat okuyucusunda (Bio-Rad, Hercules CA) 405 nm de oluşmuş p-nitrophenol ürününün Emilimi ölçüldükten sonra hesaplanacak (18).

## **5.6. Osteoblastların Alizarin Kırmızı Boyanması**

Hücreler kaplara kondular ve anlatıldığı gibi osteojenik farklılaşma için işlendiler. (% 4) Paraformaldrehyde'ye sabitlenmiş hücreler % 1 alizarin kırmızısı ve % 1 amonyum hidroksit içeren bir eriyikte oda sıcaklığında (RT) 30 dakika kuluçkaya yatırılacak ve Hücreler damıtılmış suyla iki kez durulandı ve tamamen kurumaya bırakılacak.

MSC aşılınmış veya aşılınmamış kolajen skafold kesitleri xylene ile deparafinize edildip, % 70 alkole daldırıldı ve 30 saniye alizarin kırmızısı eriyiğiyle boyanacak. Fazla boyadan kurtulup ve boyalı kesitler aseton (20 daldırma), aceton-xylene (20 daldırma) ile sabitlenip, xylene ile temizlenip ve kalıcı ortama yerleştirilecek (18).

## **5.7. Farklı Skafoldlarda Osteoblast Gelişimi**

Üç farklı yöntemle hazır olarak temin edilen gelfix kollajen (Gelfix® collagen, EURORESEARCH s.r.l., İtalya) hydroxyapatite ile kaplandı. Yetiştirilecek olan osteoblastlar üç farklı skafolda ekilip, osteoblastların skafoldlardaki gelişimine bakılıp, en iyi gelişimin olduğu sakafold tespit edilecek.

### **5.7.1. Hydroxyapatite (HA) ve Tip 1 Kollajen**

Hücre skafoldunda uygun materyaller gereklidir. Bu trasplantasyon için birkaç gözenekli seramik skafold türü incelenmiştir. Klinik kullanım için ideal skafoldlar sadece iyi biyouyumluluğa ve kemiği bütünleştirici özelliklere değil fakat aynı zamanda mekanik güce ve biyolojik yolla parçalanabilme yeteneğine sahip bir gözenekli seramik materyal olabilir. Bazı seramikler önceki iki özelliğe sahiptirler; bununla beraber hiçbir gözenekli skafold sonraki iki özelliği karşılamaz. İyi mekanik özelliklere sahip tipik bir seramik materyal **hydroxyapatite (HA)** dir.

Kütle halindeki HA'nın yüksek mekanik güce sahip olduğu doğrudur, eski sentetik yöntemler klinik kullanım için güçlü gözenekli HA materyalleri üretmede başarılı olamadılar. Makrogözenekli kalsiyum fosfat seramiklerinin sıkma gücü çok zayıftır; gözeneklenme yüzdesine, gözenek ölçüsüne, kimyasal bileşimine, tane ölçüsüne ve sentez prosedürüne bağlı olarak 0.5 – 10 MPa ölçüleri arasındadır. Başka bir sorun gözenekli HA'nın eksik olan birbirine bağlantısıdır, bu da vaskulatür istilasını güçleştirir. Yüksek sıkma gücü ve iyi vaskulatür skafoldların kemiğin tekrar yenilenmesindeki önemli özellikleridir.

Gözenekli HA materyallerinin kemik dokusu mühendisliğinde uygulanmasının sıkma gücünün dengeli olma ve sürdürülme avantajına sahip olduğu doğrudur. Bununla beraber, iskeletin tekrar yapılandırılmasında sert emilemeyen bir HA kullanılması yük taşıyan alanlarda mekanik stres ve sıkıntıyla potansiyel uzun dönem engellemeyle bağlantılıdır. Bundan başka, HA yeni kemikle değiştirilemez. Ya HA'nın kendisinde veya host kemikle olan ara yüzde bir kırık meydana gelebilir. Bu nedenle, kemik dokusuyla değiştirilebilen bir biodegradable materyal önemlidir. Kemiğin geniş bir kısmını yitirmiş hastalar için kültürlenmiş kemik hücreleri transplantasyonunun klinik uygulamasında geniş bir skafold gerekir.

Osteoblastların in vivo da bitişikteki kan damarlarından oksijen ve besin ikmaline ihtiyaçları vardır; bununla beraber, gözenekli seramikler içindeki osteoblastlar in vitro kültür sırasında kan damarlarından hiçbir ikmal alamazlar.

Bazı yapılan çalışmalarda alkalın fosfatez aktivitesi, aşılandıktan 1-8 hafta sonra HA/BMO bileşik grafitlerinde tespit edildi. Alkalın fosfatez aktivitesi aşamalı olarak arttı ve 3 haftada tepe yaptı. İmplantasyondan 2 hafta sonra HE ile boyanmış dekalsifiye kesitler HA'nın bazı gözeneklerinde kemik oluşumu sergilediler. İmplantasyondan 4 hafta sonra gözeneklerdeki olgunlaşmış kemik alanları ve kemikle yüz-yüze olan aktif osteoblastların sayısı arttı. Bu sonuçlar kemiğe benzer süngerimsi bir mikroyapıya sahip topaklaşmış gözenekli HA'nın kemik iliğinden türetilmiş osteoblastların osteojenik farklılaşmasında iyi bir skafold olduğunun ispatlandığını ve in vivo da kemik oluşturan bir biyomateryal sunduğunu ortaya koydular (2).

Gözenekli HA osteogenesis'in yürütülmesinde etkin biçimde çalışır. 1980 lerden beri birçok HA test edilmiş ve klinik uygulamada onaylanmıştır. Sentezlenmiş gözenekli HA ların yapısı içeride kemiğin büyümesini kolaylaştırır. HA lar kemik iletkeni değildirler fakat kemik



iliği hücrelerinden kemik oluşumunu desteklerler, hatta extraosseous bölgelerde bile. Bununla beraber, klinik talepleri tatmin edici bir şekilde karşılayabilen hiçbir materyal olmamıştır.

Bundan başka, hala uygulamada bazı sorunlar vardır; örneğin, HA'nın mekanik özellikleri. Makrogözenekli kalsiyum fosfat seramiklerinin sıkma gücü çok zayıftır (0.5 ile 10 MPa arasında) ve çoğunlukla gözenek yüzdesine, gözenek ölçüsüne, kimyasal terkinine, tanenin boyutuna ve sentez prosedürüne bağlıdır. Başka bir sorun ise gözenekli HA ların birbiri arasındaki yetersiz irtibattır, bu da vaskulatür istilasını zorlaştırır. Kan ikmalı gözenekli HA da kemik dokusunun yetişmesini garanti eder. Kemik graft materyalinin yüksek sıkma gücü ve iyi vaskulatür ortopedide kemik tamirinde önemli özelliklerdir (2).

Osteoblastlar tarafından salgılanan HA, immunolojik ve toksik reaksiyonlar olmadan iyi bir biyouyumluluğa sahiptir. Bundan başka, o, normal MSC gelişimini sürdüren kemik mikro ortamında iyi bir osteoendüksiyonuna sahiptir. Bu nedenle, osteoblastlar ve mineralize kemik matrisi HA bloğu içindeki gözeneklerin inorganik yüzeyine doğrudan biriktirilebilir. Bu özellik, kemik dokusu ve graft arasındaki ara yüze fibroz dokunun müdahalesini (bu gevşemeye sebep olur, kemik-graft takviyesinin içinde ve etrafındaki yapıyı tahrip eder) önlemek için kemik-graftı takviyelerinde önemlidir.

HA'nın uygulanmasının, kemik dokusu mühendisliğinde bir skafold olarak bastırma gücünü dengeleme ve sürdürme avantajına sahip olduğu doğrudur. Bununla beraber, iskeletin tekrar yapılandırılmasında sert emilemeyen bir HA kullanılması yük taşıyan alanlarda mekanik stres ve sıkıntıyla potansiyel uzun dönem engellemeyle bağlantılıdır. Dahası, HA yeni kemikle değiştirilemez. Ya HA'nın kendisinde veya host kemikle olan ara yüzde bir kırık meydana gelebilir. Dolayısıyla, kötü emilimi ve kırılabilirliği yüzünden HA'nın klinik uygulaması sınırlıdır (2).

Fakat mükemmel biyouyumlulukları ve biyoaktiviteleri yüzünden HA seramikleri kemik graftında ve dental cihazlarda kemik takviyesi olarak yaygın olarak kullanılmaktadır. HA seramikleri mezenkimal hücreleri osteoblastlara yönelik farklılaşmaya sevk edebilme yeteneğine sahiptir, bu da onları kemik dokusu mühendisliğinde potansiyel bir skafold materyali yapar.

Topaklanma ısısı HA seramiklerinin kristalliğini ve biyoaktivitesini değiştirebilir ve dolayısıyla farklı sıcaklıklarda sintirlendiğinde farklı biyokimyasal güce ve başka fiziksel özelliklere, osteogenecity'ye ve kemikle ilk bağlanma davranışına sahip olurlar. HA seramiklerinin toplanma sıcaklıkları aynı zamanda in vitro monositlerdeki iyon konsantrasyon

değişiklikleri sayesinde gösterildiği gibi hücrelerdeki fizyolojik değişiklikleri etkiler. Sinterlenmiş ve sintirlenmemiş HA ların biyolojik davranışları karşılaştırıldığında protein emiliminde tamamen farklı özellikler rapor edildi. Moleküler biyoloji seviyesinde farklı sinterleme ısılarında farklı alkalın fosfatez ve osteocalcin protein ekspresyonu bildirildi. Bunlar in vivo da aşılandıklarında, aynı zamanda farklı biyolojik yanıtlar gözlenmiştir.

HA kliniklerde bir kemik takviyesi ve dental cihaz olarak en yaygın kullanılan biyomateryallerden biri olduğundan hücrenin (özellikle osteoblastların ve osteoclastların) HA ların yüzeylerindeki davranışını anlamak HA seramiklerinin klinik uygulamasında hayati önem taşır. Osteocyte'ler HA yüzeyine temas ettiklerinde hücrenin davranışı yüzeyin topografyası, kimyası ve enerjisi sayesinde değişebilir. Bu hücre dışı faktörler osteoblast membranında spesifik reseptörlere bağlanarak hücrelerde bir zincirleme reaksiyon başlatırlar; bu reaksiyon eninde sonunda kemikle ilgili gen ve protein ekspresyonununun değişmesine yol açar ve netice osteoblast proliferasyonundaki ve farklılaşmasındaki değişikliklerdir. Bazen, gen ekspresyonundaki bu değişiklikler osteoblast fonksiyonuna elverişlidir. Bununla beraber bu değişiklikler osteoblast'ın farklılaşmasına ve fonksiyonuna zararlı olabilir ve implantın başarısız olmasına yol açabilir.

Alkalın fosfatez, osteocalcin, osteonectin, kemik sialoproteini ve tip I kolajen osteoblastlar tarafından salınan en önemli genlerden bazılarıdır; **Tip I kolajen**, yeterli biyokimyasal güce sahip kemik sağlamak için hidroxyapatite kristale bağlanan temel kemik matrisi proteindir. Membrana bağlı bir protein olan alkalın fosfatez erken osteogenesisin bir işaretidir ve vücutta kalsiyum dengesi ve hydroxyapatite kristal yetişmesi için serbest kalsiyum ve fosfatez sağlama görevi yapar. Osteocalcin kalsiyum iyonunun bağlanmasından sorumludur ve ileri safha kemik oluşumunun bir işareti olduğuna inanılır. Aynı zamanda osteocalcin' in kemikte hydroxyapatite kristal oluşumunu engelleyerek kemiğin mineralleşmesini azaltabileceğini göstermiştir.

Birçok dokuda yaygın olarak salgılanan çok fonksiyonlu bir protein olan Osteocalcin kollagene bağlanan bir proteindir ve osteoblast proliferasyonunda bir regülatör görevi yapar. Kemik sialoproteini HA kristalinin çekirdeklenmesinden sorumludur ve bu nedenle, kemiğin mineralleşmesinde çok önemlidir. Kemikle ilgili bütün bu genler osteogenesis sürecinde adım adım salgılanırlar ve osteonesis de önemli bir rol oynarlar. Bu genlerin yeterince salgılanmadığı bazı patolojik vakalarda tespit edilmiştir (19).

Aşılana materyale verilen biyolojik yanıtın, onun kimyası, yüzey enerjisi ve topografyası sayesinde belirlendiği daha önce rapor edilmiştir. Buna göre HA'nın kristal parçacıklarının boyutu 1 µm den daha büyüktü buna karşılık diğer iki seramiğinki 0.5 µm den daha küçük olan skafoldta; daha yüksek sintirleme ısısının bu deney koşulunda kristal parçacığının büyümesini güçlendirebileceğini ve 1000°C den daha yüksek sintirleme sıcaklığının HA kristal parçacığının ölçüsünü büyük oranda arttırabileceğini ortaya koyar. Yüksek sintirleme ısısı hücrenin proliferasyonunu güçlendirebilir

Kemik sialoprotein'i mineralize dokuya özgüdür ve yüksek ekspresyonu novo kemik oluşumuyla eşzamanlıdır. O, matrisin mineralleşmesinde, HA'nın çekirdeklenmesinde, hücrenin tutunmasında ve kalsiyuma bağlanmasında, hücre sinyali ve kolajen bağlanmasında bir rol oynar. Tip I kolajen kemik matrisinde en bol hücre dışı proteindir ve toplam matris organik komponentinin % 90'ından sorumludur. Farklı sitokinler, hormonlar, vitaminler ve büyüme faktörleri onun sentezini değiştirebilirler. Osteocalcin önemli bir kemik şekillendirme modülatörü ve osteoblastın olgunlaşmasının son safhasının bir işaretidir. Fiziksel özelliklerindeki farklılıklardan başka farklı ısıda sintirilmiş HA seramikleri in vitro da farklı biyolojik yanıtı sebep olurlar ve klinikte kullanıldıklarında sintirleme sıcaklığı söz konusu olabilir (19).

Gingistat kollagen sünger yapısı SEM de gözlenmiş; bu da ortalama 300 µm lik bir ölçüye sahip birbiriyle irtibatlı gözeneklerin olduğunu ortaya koyar. Hematoxylin-eosin'in Gingistat kollagen skafold süngerine aşılansmış MSC'nin seri kesitlerinde boyanması hücrelerin tüm sünger boyunca homojen biçimde dağıldığını gösterilmiş çalışmalar vardır. Aynı çalışmada kollagen skafoldu degradasyonu, Gingistat disklerinin çoğunlukla linear bir trendle yaklaşık 4-5 haftada parçalandıklarını gösterdi. Aynı zamanda disklerin ölçüsündeki azalmada yansıdığı gibi inkübasyonun her haftasında yaklaşık % 20 lik bir kütle kaybı oldu (18).

Ticari lyophilized kollagen süngeri Gingistat, periodontal hastalıklarda kemiğin kendiliğinden tekrar yenilenmesinde bir skafold olarak yaygın biçimde kullanılır. Onun yaygın ve uzun süre kullanılması bu tür materyalin iyi histo-uyumluluğunu yansıtır. Birbiriyle irtibatlı geniş oyuklara sahip kolajen süngerinin yapısal karakteristikleri yüzünden MSC kolayca emilir ve tüm skafolda dağılır. Skafolda da aşılansmış MSC dönüşüme teşvik edilme kapasitesini kaybetmez. Dolayısıyla, Osteoblast ortamına tabi tutulmuş ve skafoldlar üzerinde aşılansmış MSC tarafından oluşturulan kalsiyum birikintileri çok yaygındır.

Birlikte ele alındığında, hücre dağılımını ve kalsiyum birikintilerini değerlendirmede kullanılan metotlar Gingostat skafoldunun MSC nin ve onun kemik dokusu oluşturmaya adanmışlığını desteklemeye uygun olduğunu gösterir. Diğer taraftan, kollagen süngerinin degradasyon zamanının in vitro da değerlendirilmesi, skafoldun kemik oluşumu tamamlanmadan önce tamamen çözülmesinin onun in vivo deneylerinde kullanılmasını engelleyebileceğini öne sürer. İnsan MSC si kullanılan ön sonuçlar bu hücrelerin kollagen skafoldunda büyüme ve kalsiyum biriktirme yeteneğini doğrulamıştır. MSC nin bir doku mühendisliği yaklaşımında periodontal hastalıklarda kemiğin yenilenmesinde kullanılmasını destekler. MSC nin kemik iliğinden elde edilebildiği basit yol ve kemikten türetilmiş tüm hücre popülasyonunun çoğalma ve farklılaşma kapasitesi bu MSC kaynağını özellikle tamir ameliyatında klinik uygulamaya elverişli yapar. Özellikle in vitro MSC sayısının çoğaltılabilir olasılığı önemli bir özelliktir çünkü bu, insanlarda sınırlı bir kemik iliği aspiratının klinik uygulamalara yeterli sayıda hücre temin edebileceğini ortaya koyar (18).

Sentetik HA yüksek derecede bir saflıkla nispeten kolayca hazırlanır ve kemiklerde ve dişlerde bulunan doğal HA'ya benzer crystallographic özellikler sergiler. Dişlerdeki gayet eksik apatite'lerdir,  $PO_4^{3-}$  ye güçlü bir  $CO_3^{2-}$  takviyesi vardır ve  $Na^+$ ,  $K^+$  ve  $Mg^{2+}$  gibi düşük seviyelerde iyonlar  $Ca^{2+}$  yi takviye eder. Tersine, kontrollü koşullarda sintirlenmediği sürece bağlantılı  $CO_3^{2-}$  ları yitirme eğilimi gösteren sentetik HA mekanik gücünü ve biyoyumluluğunu arttırmak için HA kafesinde farklı birçok element içerecek biçimde üretilir. Örneğin, son çalışmalar  $P_2O_5 - CaO-Na_2O$  sisteminde  $PO_4^{3-}$  bazlı çözülebilir camlarla güçlendirilmiş HA nın mekanik özellikleri güçlendirdiğini ve dolayısıyla sert bağ dokusunda ümit vaat eden biyomateryaller olduğunu gösterdiler. Dahası bu gibi camla güçlendirilmiş HA bileşik yüzeylerinin hem in vitro hem de in vivo da insan kemik hücrelerinin tutunmalarını ve çoğalmalarını destekledikleri gösterilmiştir. Bundan başka, önceki % 2.5 ve % 5 çözülebilir cam ilavesinin mekanik özellikleri arttıran materyal safhaları olan bir son HA ürünü meydana getirdiğini gösterilmiştir. Bununla beraber, bu yeni bileşiklerin fiziksel ve mekanik özellikleri ile biyolojik aktivitesi arasındaki ilişki henüz bilinmemektedir (21).

Biyomateryallerin, yüzey kimyası ve topografyası gibi fizyokimyasal özellikleri hücrenin tutunması, yayılması, proliferasyonu, farklılaşması ve fonksiyonu üzerinde derin etkiler yaratır. İlaveten, kullanılan HA materyalleri dahil birçok materyalin çevredeki sıvıya inorganik iyonlar salgıladığı bilinir ve bu maddeler aynı zamanda hedef dokuların biyolojik

aktivitesini belirgin şekilde etkilerler. Dolayısıyla, emilebilir cam bileşiklerin bu materyallerin çözülebilirliğini ve biyodegratabilitesini belirleyen terkihi onların in vivo yararında ve biyouyumluluğunda hayati önem taşır. Örneğin, sadece HA ile kıyaslandığında HA-cam bileşiklerinden yüksek seviyelerde salınan kalsiyum sert dokularda bir apatit mineral safhasının oluşumunda yer alır ve hücrenin yapışmasının ve aktivasyonunun ayarlanmasında önemli bir rol oynadığı bilinir. Cam bileşiklerinin yüksek hydrophobicity ve negatif şarjı gibi yüzeyle bağlantılı farklılıklarla birlikte bu fiziko-kimyasal parametreler şüphesiz ki host hücrelerin biyolojik yanıtında derin etkiler meydana getirir. Bu nedenle HA ve HA cam bileşiklerinin in vitro büyüme ve belirli anahtar aktiviteler üzerindeki kesin etkilerini belirlemek üzere; hücrelerinin yapışabildiklerini, tutulu kalabildiklerini ve yaşamlarını sürdürebildiklerini ve daha sonra hem HA hem de HA bileşiklerinde doğrudan çoğalabildiklerini gösteriliş çalışmalarıdır. Aynı zamanda farklı substratlar üzerinde büyümenin hücrenin fonksiyonundaki belirgin değişikliklerle bağlantılı olduğu bilinir (21).

HA veya HA-trikalsiyum fosfat seramikleri gibi kalsiyum bazlı sentetik seramikler iyi mekanik özellikler ve açık gözeneklilik gibi arzu edilen bir karışım sunmazlar. Tersine, doğal olarak üretilmiş organik bileşikler iyi mekanik özellikleri açık gözeneklilikle birleştirirler, bu da onları mezenkimal kök hücrelerinde veya kemik dokusu mühendisliği stratejilerinde kullanılan başka hücre tiplerinde dağıtım araçları olarak kullanılmaya aday yapar (13).

Jelatin-%30 HA nanokompozitlerinde proteinler bütün dönemlerde klasik kompozittekinden anlamlı şekilde daha yüksek derecelerde tutundular. Bu anlamlı fark aynı zamanda bütün protein konsantrasyonlarında gözlemlendi. Hücrenin tutunma seviyesi nano-kompozitte bir hayli yüksektir, özellikle nispeten düşük hücre yoğunluğunda ve ilk kültür döneminde. Yüksek hücre yoğunluğunda ve uzun dönemde iki skafold arasındaki fark azalır. Daha sonraki proliferasyon ve farklılaşma testlerinde tutunma koşulları  $5 \times 10^4$  hücre/ml yoğunluğuna, 150 rpm çalkalama hızına ve 6 saatlik kültür dönemine sabitlenir (22).

Farklı fiziko-kimyasal özelliklere sahip iki veya daha fazla komponentin uygulanması onların pratikteki kullanımlarını genişletebilir, bu da her bir komponentle karşılanabilir. Jelatin-HA, organik-inorganik bileşiklerden biri olarak, sert doku mühendisliğindeki uygulanabilirliğinin genişleme potansiyelini incelemek üzere üretilmiştir. Doğal kemiğin kolajen fiberlerinden ve mineralize HA nanokristallerinden oluştuğu göz önüne alındığında jelatin-HA sistemi kemik yapısını taklit ederek bir kemik skafoldu olarak kullanılabilir. Böylece, bir jelatin ağında Ca ve P prekürsörlerinden çökelme prosesinin bir örnek HA

nanokristalleri ve gözenek konfigürasyonu yaratmaya yeterli olduğuna inanılır. SEM ve TEM uygulamalarında gösterildiği gibi jelatin-HA nanokompozitleri iyi gelişmiş bir gözenek yapısı sergiler (gözenek ölçüsü ~ 400-500 µm ve gözeneklilik ~ % 90) ve çökelmiş HA nanoscale üzerinde kötü kristalleşir. Nanokompozitler, geleneksel kompozitlerle ve saf jelatinle karşılaştırıldığında osteblastik hücresel yanıtları uyardılar.

Hücrelerin nanokompozitlere çok daha yüksek seviyede tutunması sadece gözenek tıkanıklığı olmayan iyi yapılandırılmış gözenek yapısına değil, aynı zamanda bir örnek dağılmış nanoölçüde HA kristallerinden kaynaklanır. Nanokompozitlerdeki daha açık alanlı gözenek yapısı hücre göçüne daha geniş bir alan ve hücrenin tutunması için yüzey alanı sağlar. Bundan başka, nanoölçüde HA kristalleri başka bir yerde bildirildiği gibi hücrelerin ilk tutunuşlarını artırır. Hücrelerin ilk tutunuşları çoğunlukla yapışan moleküllerin bağlanmasından ve onların daha sonra hücreler ile materyalin yüzeyi arasında aracılık ettiklerinden nanokompozitlerdeki yüksek seviyede hücre tutunması aynı zamanda serumda bol miktarda bulunan fibronectin ve vitronectin gibi yapışan proteinlerin katılımlarıyla da ilişkilendirilebilir.

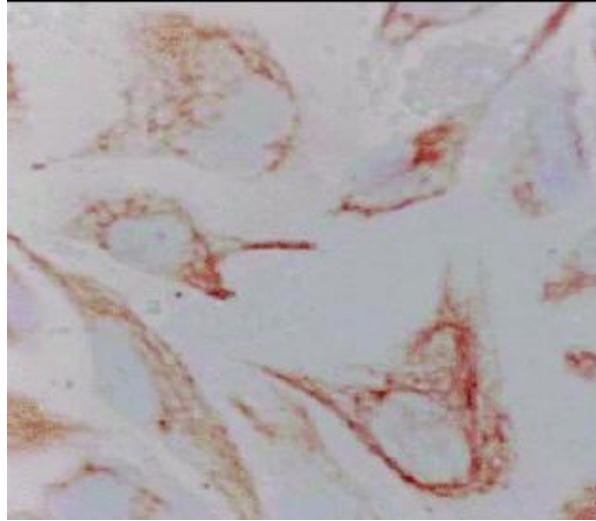
Proteinin skafoldlara tutunması testinde, HA nanokristalleri içeren jelatin bileşik skafoldunun serum proteinlerine bağlanma eğilimi klasik kompozitten çok daha fazladır; bu da farklı derecelerde protein tutunmasının hücrenin ilk tutunuşunu etkileyebileceğini ortaya koyar. Osteoblastlar gibi demir atmaya dayanan hücreler materyalin yüzeyine ilk tutunmalarında yapışma proteinlerinin aracılığını istediklerinden nanokompozitlere daha yüksek derecede proteinin tutunması hücrelere daha çok miktarda tutunma bölgesi sağlayabilir (şekil:11). Her ne kadar özel protein tiplerinin rolü açıklanamasa da serum proteinlerinin nanokompozitlere daha yüksek derecede tutunması hücre tutunmasının arttığını açıklar (22).

Nanokompozitlere hücre tutunmasının artması proliferasyon seviyesini etkiler. Mikroölçüde klasik kompozitlerin HA parçacıklarının sebep olduğu pürüzlü yüzeyinin hücrenin çoğalma hızını geriletğine inanılır; bu başka polimerik/metalik substratlarda ve polimer matrise gömülen seramik tozlu birleşik sistemlerde rapor edilmiştir. Tersine, nanokompozit ve saf jelatin düz ve tek düze bir yüzeye sahipse ve hücre büyüme morfolojisinde anlatıldığı gibi daha olumlu bir hücre çoğalma davranışı sergiler. Jelatin-HA gözenekli nanokompozitlerin bir sert doku mühendisliği skafoldu olarak potansiyel açıdan faydalı olduğu düşünülmektedir. İnsan osteoblast hücreleri nanokompozitlere klasiklerden çok

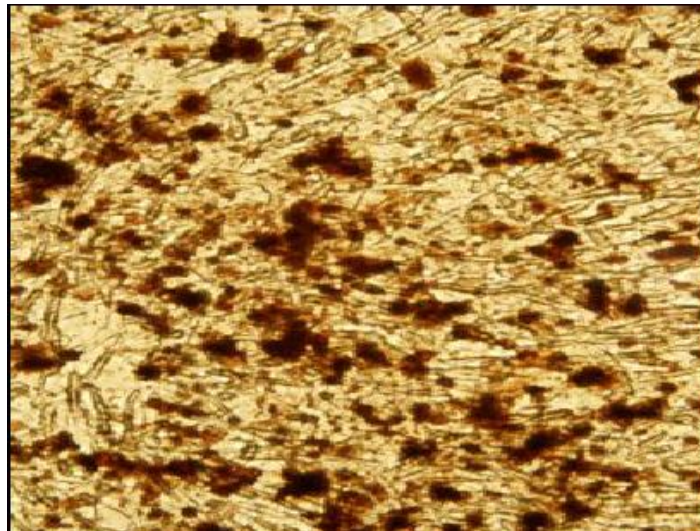
daha yüksek derecede tutunurlar. Hücreler nanokompozitlerde olumlu şekilde büyüyüp, çoğalabilirler (şekil:12).

HA parçacıklarının kolajen tip I ile kaplanması kültürlenmiş hücrelerin yaşayabilirliği üzerinde olumlu etkiler yarattır. HA parçacıklarının kolajen tip I ile kaplanması kültürlenmiş hücrelerde alkalın fosfatez aktivitesi üzerinde başlangıçta pozitif bir etki yarattır.

Özetle, HA granüllerinin kolajen tip I ile kaplanması hücrenin hayatıyeti ve in vitrodaki osteoblast hücrelerinin biyoaktivitesi üzerinde olumlu etkiler yarattığı birçok çalışmada kanıtlanmıştır. Bizim çalışmamız skafoldların ve in vitro kültür yönteminin iyileştirilmesine odaklanır.



Şekil 11. Collagen tip1deki osteoblastlar.



Şekil 12. Osteoblast hücrelerinin minerilizasyonu.

## 5.8. Osteoblast Geliştirilmiş Skafoldlarda TEM Ve SEM Görüntüleme

### 5.8.1. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Görüntüleme:

#### 5.8.1.1. Kullanılan reaktif ve malzemeler

1. Fizyolojik serum.
2. Hekzametildisilazan (HMDS) solüsyonu (Sigma, 52620).
3. Sodyum kakodilat (Sigma, C0250).
4. %25'lik Glutaraldehit 450ml (TEM-SEM Firması, 16400)
5. Osmium Tetroxide 0.1gr (TEM-SEM Firması, 19134)
6. Sukroz.
7. Saf Etanol.
8. Tampon A: %5 Glutaraldehit (pH 7,2) (0,1 M sodyum kakodilat içinde)
9. Tampon B: %7 Sukroz (7g/100ml) (0,1 M sodyum kakodilat içinde)
10. Tampon C: %2 Ozmiyum tetroksit (0,1 M sodyum kakodilat içinde).

Uygulamalar 1 'den 4'e kadar +4°C'de (buz üstünde), 5'den 10'a kadar oda sıcaklığında yapılacaktır. Örnekler 30 saniye fizyolojik serum ile yıkanacak ve Tampon A'ya alınarak 30 dakika bekletilecek. Başka bir solüsyonla yıkama yapmadan Tampon B'ye alınarak 15 dk. bekletildikten sonra bu basamak bir kez daha tekrarlanacaktır. Başka bir solüsyonla yıkama yapmadan Tampon C'ye alınarak 30 dk. bekletilecektir. Daha sonr örnekler 5 dakika distile suda yıkanacak ve bu basamak iki kez daha tekrarlanacaktır. Örnekler artan derecelerdeki alkol serileri (%35, %50, %70, %85, %95, %100, %100) içerisinde her bir basamak 5 dakika olacak şekilde dehidrate edilecektir. Örnekler hekzametildisilazan (HMDS) solüsyonunda 5 dakika bekletildikten sonra oda sıcaklığında 30 dakika kurutulup nem alıcı bir ajan (fosfor pentoksit, kalsiyum klorür) içeren desikatöre 24 saat süre ile yerleştirilecektir. Bu süre sonunda, pirinç taşıyıcılar üzerine yerleştirilen örnekler, özel bir kaplama cihazında (*sputter-coater*) yaklaşık 200 Å kalınlığında altın ile kaplandıktan sonra taramalı elektron mikroskobunda incelenecektir.

### 5.8.2. Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM) Görüntüleme:

#### 5.8.2.1.1. Kullanılan reaktif ve malzemeler:

1. Feather Microtome Blades (stainless steel) S35 (TEM-SEM Firması)
2. %25'lik Glutaraldehit 450ml (TEM-SEM Firması, 16400)



3. Osmium Tetroxide 0.1gr (TEM-SEM Firması, 19134)
4. Propilen Oxide 450ml (TEM-SEM Firması, 20401)
5. Sorenson's Phosphate Buffer 1lt (TEM-SEM Firması, 11600-10)
6. Glider Grid 200 mesh bakır 1kutu/100adet (TEM-SEM Firması, G200Cu)
7. Grid Storage Box 1paket/10 adet (TEM-SEM Firması, 71147)
8. 8.0mm Glass Knife Boat 1paket/100 adet (TEM-SEM Firması, 71008-08)
9. Flat Embedding Mould 21 Kuyucuklu (TEM-SEM Firması, 70901)
10. Slotted Cassettes 2x500/cs (TEM-SEM Firması, 700-70-P) X 2 adet
11. Araldite CY 212 resin (TAAB) 500gr (Opturonic Firması, E006)
12. DDSA EM (TAAB) 500gr (Opturonic Firması, DO25)
13. EMTP Tissue Processor (Leica)

Elektron mikroskopik inceleme için agara gömülmüş izole hücreler 1mm<sup>3</sup>'lük parçalara ayrılarak %2.5'lik gluteraldehit ile tespit edileceklerdir. Post fiksasyonları %1'lik osmiyum tetraoksit ile yapılacak olan dokular, alkol serilerinden geçirilecek ve daha sonra dehidrate edilerek araldit CY212, DDSA (dodesenyl süksinik anhidrit) ve BDMA (benzil dimetil amin) den oluşan kit ile hazırlanan gömme materyali içeren jelatin kapsüllere gömülecek ve 56<sup>0</sup>C' de polimerize olmaları sağlanacaktır. Hazırlanan bloklardan alınan yarı ince kesitler toluidin blue ile boyanarak ışık mikroskopunda değerlendirilecek, işaretlenen bölgelerden ultramikrotom (Leica) ile 0.5 mikron kalınlığında bakır gridler üzerine alınacak olan ince kesitler uranil asetat-kurşun sitrat ile boyanarak transmission elektron mikroskopta (TEM) incelenecektir.

## 6. KISITLILIKLAR

Deneyley yapılıırken santrüfjümüzün başlık kısmında yaşanılan sorun hücre pelletinin tam oluşamamasına sebep olmaktadır. Buna rağmen toplanan hücrelerde yoğunluk hematoptik hücrelerdeydi, bu da osteoblast gelişimine izin vermiyordu. Besi yeri, kontaminasyon gibi birçok etkene rağmen hücrelerimizi bir ay yaşattığımızda oldu ve deneye başlamadan hücreleri kaybetik. Süremin kısıtlı olmasından dolayı tezi bir ön çalışma olarak sonlandırdık.

## 7. TARTIŞMA

Büyük kemik kusurlarının tekrar yapılandırılması ortopedi alanında önemli konulardan biridir. Otoplastlar, allopastlar veya tek başına veya kemik graftlarıyla birlikte yapay materyaller kullanılan birçok yaklaşımda bulunulmuştur. Otoplastlarda büyük bir sorun yetersiz ikmal ve verici bölgede ağrı ve fonksiyon kaybıyla birlikte cerrahi morbiditedir. Bundan başka, hastalar iki kez ameliyat sıkıntısı çekmek zorunda kalmaktadır. Allopastlar aynı zamanda enfeksiyon ve inflamasyonla bağlantılıdır. Bu sorunların üstesinden gelmek üzere yakın zaman önce doku mühendisliği stratejileri geliştirilmiştir. Temel görüş, hücrenin tutunmasını, farklılaşmasını ve proliferasyonunu destekleyen osteoblast ve skafold matrislerine dönüşen hücre kaynaklarını kullanarak doğal kemik tamir işlemini taklit etmektir.

Kemik iliği, osteoblastlara, chondrocyte'lere, myoblastlara, adipocyte'lere vesaire dönüşme yeteneğine sahip multipotent kök hücreler olarak bilinen MSC ler içerir. Hücre bazlı stratejilerde, parçalanmamış taze kemik iliği, kültürde çoğaltılmış saf MCSler, farklılaşmış osteoblastlar veya chondrocyte'ler veya kemik morfojenik proteini (BMP) salgılayan genetik açıdan değişmiş hücreler aşılabilir. Bu tip kemik dokusu mühendisliği heyecan verici olmakla ve MSC lerin klinik uygulamasında faydalı olmakla kalmaz fakat aynı zamanda bizim kök hücreleri anlayışımızı artırır. Otojen kemik graftları sorunlarını azaltmak üzere periodontal rejenerasyonu için bir doku mühendisliği stratejisi öne sürülmüştür (2).

Yetişkin kemik iliğinden elde edilmiş mezenkimal kök hücreler (MSC) doku mühendisliği için, özellikle iskelet ve sert doku tamirindeki ve aynı zamanda periodontal doku rejenerasyonundaki uygulamalarda muhtemel bir hücre kaynağıdır. Kemik iliğinden elde edilmiş MSC, dexamethasone, askorbik asit ve  $\beta$ -glycerolphosphate (osteojenik takviyeler) in varlığında bir osteojenik türe dönüşebilir fakat aynı zamanda başka besleyici faktörlerin veya ilaçların ya in vitro ya da hayvan modellerinde kullanılması önerilmektedir.

MSC den kemik oluşması hücresel büyümeyi ve farklılaşmayı harekete geçirecek üç boyutlu bir skafold gerektirir. Hücreler ile onların matrisi arasında karmaşık bir etkileşimin meydana geldiği bir ortam yaratmak amacıyla doku rejenerasyonunda skafold olarak gittikçe artan sayıda biyomateryal öne sürülmektedir. Kemik oluşumunu destekleyecek uygun bir skafold kullanmanın ön koşulu onun biyolojik ve yapısal özelliklerini bilmektir. Ağız kemik kusurlarını tamir etmede kemik kusuru şeklinde skafoldlar kullanılması önerilmektedir. İdeal skafold belirli özelliklere sahip olmak zorundadır; (a) kemik kusurunun biçimini kolayca almalıdır, (b) MSC'yi yetiştirme, olgunlaştırma ve ona iyi bir ev sahipliği etme kapasitesine

sahip olmalı, (c) komşu dokulara bir bariyer oluşturmalı ve (d) kemik oluşumu için gereken zamanla uyumlu fakat kemiğin skafoldla takviye edilmesine engel olmayacak bir tekrar emilme zamanına sahip olmalıdır (18).

MSC nin osteojenik farklılaşmaya bağlılığı, birkaç kalsiyum bağlanma alanına sahip, hücrenin tutunmasıyla, proliferasyonu ve hücre dışı matrisin kemikte mineralleşmesiyle bağlantılı olan, kemik oluşturan hücreler ve osteocalcin (kalsiyumun bağlanmasında gerekli bir protein) tarafından sentezlenen bir fosfo-protein olan, osteopontin ekspresyonu sayesinde sergilenir. Bu proteinler, osteoblastik farklılaşmanın soya özgü işaretler olduğu düşünülür. Aynı zamanda alkalik fosfatez aktivitesinin seviyelerindeki artış (mineralizasyon için gerekli bir hücre içi enzimdir ve osteojenik üretime yönelik hücrelerin bir erken işareti olduğu düşünülür) ortama maruz kalmış yetişkin MSC nin osteoblastik soya doğru farklılaştığını gösterir. Başka deneysel çalışmalara göre, MSC işlemine tabi tutulmuş ortamda ALP aktivitesi bir tepe noktasına kadar çıkar ve kontrol seviyesine düşer. ALP aktivitesindeki artış osteoblastik soya yönelik bir eğilimin işaretidir buna karşılık daha sonraki düşüş matrisin ileri derecede mineralleşmesi ve daha olgun bir fenotiple ilişkilidir.

MSC osteojenik farklılaşmasının teşvik edilmesinde birkaç trofik faktör öne sürülmüştür. Bu çalışmada bu hedefe, başlıca unsurun dexamethasone olduğu üç farklı ilacın bir kokteyli kullanılarak basit ve güvenli bir biçimde ulaşılır. Dexamethasone, diğer glucocorticoid'lerde olduğu gibi, doza bağlı olarak osteojenik farklılaşma üzerinde hem uyarıcı hem de engelleyici bir etkiye sahiptir. Dexamethasone, ilik stroma'sından türetilmiş hücre kültürlerinde in vitro kemik nodülü oluşumunda ve mineralleşmesinde gereklidir fakat aynı zamanda zamanla ve dozla ilişkili bir tarzda bu hücrelerin adipogenesis'inde yer alır (18).

Bir proliferasyon safhasından sonra osteoblastlar farklılaşırlar ve hücre dışı matris üretirler. ALP nin artan aktivitesi, kolajen tip I üretimiyle, osteoblast fenotipinin ve farklılaşmasının ilk işaretidir buna karşılık OC farklılaşan osteoblastların son işaretidir. Bu davranış biyomateryallerin kültürlendiği substrat tarafından etkilenir ve düşük proliferasyon oranı daha bariz farklılaşmayla ilişkilidir.

Travma veya tümör reseksiyonunun sebep olduğu şiddetli kemik kusurlarının tedavisi tekrar yapılandırma ameliyatında hala büyük bir sorundur. Her ne kadar son 20-30 yıl içinde önemli ilerlemeler kaydedilmiş olsa da aynı canlıdan alınan kemik transplantasyonu hala tercih edilen tedavi görüşüdür. Bu tedavinin başarısı ve adapte edilebilirliği ikinci bölge ameliyatının ilgili riskleri yüzünden sınırlıdır (23).

Bir skafolda aşılana hücrelerin fonksiyonu hücreler tarafından materyalle etkileşime girmede kullanılan spesifik hücre yüzeyi reseptörlerine (yani, integrins) ve çözülebilir büyüme faktörlerinin varlığına bir hayli bağlıdır. Kemikte hücre dışı matrisin önemli bir bölümü kollagenler tarafından oluşturulur. Kollagenler dokuların yapısal bütünlüğünü muhafaza etmekten sorumlu her yerde bulunabilen proteinlerdir. Kollagenler birçok doku mühendisliği uygulamalarında başarıyla kullanılırlar. Kemik dokusu mühendisliği konusunda kemik grafit takviyelerinin hücre bağlanma sekansları içeren (yani, RGD, hücreye bağlanan peptit p-15) sentetik peptitlerle yenilenmesinin yakın zaman önce osteoblastın hücre fonksiyonunu arttırdığı gösterilmiştir (7).

Kemik dokusu mühendisliği 3 boyutlu skafold, otologus hücreler ve osteoindüktif büyüme faktörleri arasında başarılı karşılıklı etkileşim ister. Uygun bir skafoldun toksik olmaması, gayet biyoyumlu olması ve hiçbir koşul altında immunolojik tespit edilebilir primer veya sekonder yabancı madde reaksiyonuna yol açma potansiyeline sahip olmaması gerekir. Skafold bir ilave fonksiyon sunmak zorundadır, özellikle maxillofacial bölgenin arttırılmasında. Onun, host dokunun mekanik özelliklerine uyan yeterince geçici mekanik destek sunması gerekir. Doğal yolla elde edilmiş HA zamanla kemik iletimine (kemiğin yetiştiği bir skafold hizmeti görür) ve kemiğin entegrasyonuna (fibroz dokuya müdahale etmeden altta yatan kemik ile bir direkt kimyasal bağ oluşturur) izin veren bir biyoaktif alloplast materyaldir. Biomimetic skafoldların kemik dokusuyla bütünleşmesi çoğu zaman ilk hücre ve substrat etkileşimleri yoluyla saptanan materyal-doku ara yüzünde gerçekleşir. Osteoblastların kollagen tip I ile etkileşiminin alkalın fosfat aktivitesini, osteoblast bağlantılı gen ekspresyonunu ve mineralleşmenin uyarılmasını güçlendirdiği gösterilmiştir (7).

Bizim çalışmamızda Osteoblast hücreleri için elde edilen bu optimizasyon hücrelerin üremesine ve kliniğe dönük çalışmalara önemli ışık tutmada yol göstericektir. Gelecekte hastanın kendisinden alınan kök hücrelerin laboratuvar koşullarında in vivo geliştirilerek yeniden hastaya uygulanması ve böylece kemik defektlerinin giderilmesi mümkün olabilecektir. Günümüzde optimal yapı iskeletinin oluşmamasındaki sorunlar malzemenin mekanik dayanıklılığı, çözünebilirliğinin kontrol edilebilmesindeki sıkıntılar, toksik özellik içermemesi gibi özellikler aşıldığı oranda üstesinden gelinebilecek ve gelişebilecektir. Bir ön çalışma olan kollagen Tip1 kaplamalı hidroksiapatid hücre kültüründe osteoblast hücrelerinin yanıtı birçok yönden desteklenmesi gereken bir projedir.

## 8. KAYNAKLAR

- 1- Kılıç E, Ceyhan T, Uçkan D, Inkaya C. Evaluation of differentiation potential of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells to cartilage and bone cells. *Acta Orthop Traumatol Turc.* 2007;41(4):295-301
- 2- Uemura T, Dong J, Wang Y, Kojima H ve ark. Transplantation of cultured bone cells using combinations of scaffolds and culture techniques. *Biomaterials.* 2003;24(10):2277-86.
- 3- Johnson KE; *Histology and cell biology.* Second Edition. Harwall Pub,1991:125-144.
- 4- Fedde KN. Human osteosarcoma cells spontaneously release matrix-vesicle-like structures with the capacity to mineralize. *Bone Miner.*1992;17(2):145-51.
- 5- Millett PJ. Investigations into the activity of osteoblasts in vitro and in vivo. Dissertation. University of Cambridge; 1994.
- 6- Skojdt M, Russell G. *Cytokines and Bone Metabolism.* Second Edition. CRC Press, 1992: 1-70.
- 7- Rodan SB, Imai Y, Thiede MA. Characterization of a osteosarcoma cell line with (saos-2) osteoblastic properties. *Cancer Res* 1987;47:4961-66.
- 8- Turhani D, Weißenböck M, Stein E, Wanschitz F ve ark. Exogenous recombinant human BMP-2 has little initial effects on human osteoblastic cells cultured on collagen type I coated/noncoated hydroxyapatite ceramic granules. *J Oral Maxil Surg.* 2007;65:485-93.
- 9- Livingston T, Ducheyne P, Garino J. In vivo evaluation of a bioactive scaffold for bone tissue engineering. *J Biomed Mater Res.* 2002;62(1):1-13.
- 10- Maeno S, Nikia Y, Matsumoto H, Morioka H ve ark. The effect of calcium ion concentration on osteoblast viability, proliferation and differentiation in monolayer and 3D culture. *Biomaterials.* 2005;26:4847-55.
- 11- Richardson SM, Curran JM, Chen R, Vaughan-Thomas A ve ark. The differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells into chondrocyte-like cells on poly-L-lactic acid (PLLA) scaffolds. *Biomaterials.* 2006;27:4069-78.
- 12- Grad S, Kupcsik L, Gorna K, Gogolewski S ve ark. The use of biodegradable polyurethane scaffolds for cartilage tissue engineering: potential and limitations. *Biomaterials.* 2003;24:5163-71.

- 13- Masuoka K, Asazuma T, Ishihara M, Sato M ve ark. Tissue engineering of articular cartilage using an allograft of cultured chondrocytes in a membrane-sealed atelocollagen honeycomb-shaped scaffold (ACHMS scaffold). *J Biomed Mater Res.* 2005;75:177–84.
- 14- Ma HL, Hung SC, Lin SY, Chen YL ve ark. Chondrogenesis of human mesenchymal stem cells encapsulated in alginate beads. *J Biomed Mater Res.* 2003;64:273–81
- 15- Turhani D, Cvikl B, Watzinger E, Weissenböck M ve ark. In vitro growth and differentiation of osteoblast-like cells on hydroxyapatite ceramic granule calcified from red algae. *J Oral Maxillofac Surg.* 2005;63(6):793-9.
- 16- Zhao F, Yin Y, Lu WW, Leong JC ve ark. Preparation and histological evaluation of biomimetic three-dimensional hydroxyapatite/chitosan-gelatin network composite scaffolds. *Biomaterials.* 2002; 23(15):3227-34.
- 17- Hu Y, Winn SR, Krajbich I, Hollinger JO. Porous polymer scaffolds surfacemodified with arginine-glycine-aspartic acid enhance bone cell attachment and differentiation in vitro. *J Biomed Mater Res.* 2003;64(3):583-90.
- 18- Yang J, Shi G, Bei J, Wang S ve ark. Fabrication and surface modification of macroporous poly (lactic acid) and poly (lactic-co-glycolic acid) (70/30) cell scaffolds for human skin fibroblast cell culture. *J Biomed Mater Res.* 2002;62(3):438-46.
- 19- Zhang Y, Zhang M. Three-dimensional macroporous calcium phosphate bioceramics with nested chitosan sponges for load-bearing bone implants. *J Biomed Mater Res.* 2002;61(1):1-8.
- 20- Donzelli E, Salvade A, Mimo P, Vigano M ve ark. Mesenchymal stem cells cultured on a collagen scaffold: In vitro osteogenic differentiation. *Arch Oral Biol.* 2007;52:64–73.
- 21- Wang C, Duana Y, Markovic B, Barbarad J ve ark. Proliferation and bone-related gene expression of osteoblasts grown on hydroxyapatite ceramics sintered at different temperature. *Biomaterials.* 2004;25:2949-56.
- 22- Chen RM, Liu HC, Lin YL, Jean WC ve ark. Nitric oxide induces osteoblast apoptosis through the de novo synthesis of Bax protein. *J Orthopaed Res.* 2002;30:295-302.
- 23- Salih V, Georgiou G, Knowles JC, Olsen I. Glass reinforced hydroxyapatite for hard tissue surgery—part II: in vitro evaluation of bone cell growth and function. *Biometaterials.* 2001;22(20):2817-24.
- 24- Kim HW, Kim HE, Salih V. Stimulation of osteoblast responses to biomimetic nanocomposites of gelatin–hydroxyapatite for tissue engineering scaffolds. *Biomaterials.* 2005;26(25):5221-30.

- 25- Elisa B, Torricelli P, Gazzano M, Giardino R ve ark. Nanocomposites of hydroxyapatite with aspartic acid and glutamic acid and their interaction with osteoblast-like cells. *Biomaterials*. 2006;27(25):4428-33.
- 26- Matsumuraa K, Suong SH, Nakajimaa N, Iwata H ve ark. Surface modification of poly(ethylene-co-vinyl alcohol): hydroxyapatite immobilization and control of periodontal ligament cells differentiation. *Biomaterials*. 2004;25:4817-24.
- 27- Campoccia D, Arciola CR, Cervellati M, Maltarello MC ve ark. In vitro behaviour of bone marrow-derived mesenchymal cells cultured on fluorohydroxyapatite-coated substrata with different roughness. *Biomaterials*. 2003;24(4):587-96.
- 28- Ramires PA, Romito A, Cosentino F, Milella E. The influence of titania/hydroxyapatite composite coatings on in vitro osteoblasts behaviour. *Biometaterials*. 2001;22(12):1467-74.
- 29- Kaspar D, Seidl W, Neidlinger-Wilke C, Claes LE. In vitro effects of dynamic strain on the proliferative and metabolic activity of human osteoblasts. *JMNI*. 2000; 1(2):161-64
- 30- Ignatius A, Blessing H, Liedert A, Schmidt C ve ark. Tissue engineering of bone: effects of mechanical strain on osteoblastic cells in type I collagen matrices. *Biometaterials*. 2005;26:311-18.
- 31- Claes LE, Heigele CA, Neidlinger-Wilke C, Kaspar D ve ark. Effects of mechanical factors on the fracture healing process. *CORR*. 1998; 355: 132-47.
- 32- Declercq H, Van den Vreken N, Maeyer ED ve ark. Isolation, proliferation and differentiation of osteoblastic cells to study cell/biomaterial interactions; comparison of different isolation techniques and source. *Biometaterials*. 2004; 25:757-68.
- 33- Wang JH, Grood ES, Florer J, Wenstrup R. Alignment and proliferation of MC3T3-E1 osteoblasts in microgrooved silicone substrata subjected to cyclic stretching. *J Biomech*. 2000;33(6):729-35.
- 34- Boyan BD, Schwartz Z, Lohmann CH, Sylvia VL ve ark. Pretreatment of bone with osteoclasts affects phenotypic expression of osteoblast-like cells. *J Orthopaed Res*. 2003; 21: 638-47.
- 35- Pioletti DP, Muller J, Rakotomanana LR, Corbeil J ve ark. Effect of micromechanical stimulations on osteoblasts: development of a device simulating the mechanical situation at the bone-implant interface. *J Biomech*. 2003;36:131-35.
- 36- Altman GH, Horan RL, Martin I, Farhadi J ve ark. Cell differentiation by mechanical stress. *FASEB J*. 2002;16:270-272.



- 37- Palmaa FD, Douet M, Boachon C, Guignandon A ve ark. Physiological strains induce differentiation in human osteoblasts cultured on orthopaedic biomaterial. *Biomaterials*. 2003;24(48): 3139– 51.
- 38- Garvin J,Qi J,Maloney M, Banes AJ. Novel system for engineering bioartificial tendons and application of mechanical load. *Tissue Eng*. 2003;9(5): 967-79.
- 39- Sotoudeh M, Jalali S, Usami S, Shyy JY ve ark. A strain device imposing dynamic and uniform equi-biaxial strain to cultured cells. *Ann Biomed Eng*. 1998;26(2):181-9.
- 40- Neidlinger-Wilke C, Wilke HJ, Claes L. Cyclic stretching of human osteoblasts affects proliferation and metabolism: a new experimental method and its application. *J Orthop Res*. 1994;12(1):70-8.
- 41- Martin RB, Burr DB. Structure function, and adaptation of compact bone. Third Edition. New York: Raven Press, 1989; 130-35.